



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**“Evaluación de la respuesta inmune celular mediante linfoproliferación,
en niños con inmunodeficiencia combinada”**

TESIS

Que para obtener el título de
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

Presenta

JESSICA MONSERRAT FLOREAN CRUZ

Asesor: Q.F.B. Ladislao Palomar Morales

Co-asesora: Dra. María Edith González Serrano

Cuautitlán Izcalli, Estado de México 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis**

Evaluación de la respuesta inmune celular mediante linfoproliferación, en niños con inmunodeficiencia combinada.

Que presenta la pasante: **Jessica Monserrat Florean Cruz**
Con número de cuenta: **308177206** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 24 de Agosto de 2016.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Andrés Romero Rojas	
VOCAL	Q.F.B. Ladislao Palomar Morales	
SECRETARIO	Dr. Salvador Fonseca Coronado	
1er. SUPLENTE	M. en C. Paola Edith Briseño Lugo	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Laura Gricelda Martínez Méndez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

IHM/cga*



Este trabajo fue realizado en la Unidad de Investigación en Inmunodeficiencias del Instituto Nacional de Pediatría.

INIP

“No quiero ser mayor jamás... Quiero ser siempre un niño y divertirme. Así que me escapé a los jardines de Kensington y viví mucho, mucho tiempo entre las hadas.”

James Matthew Barrie

Agradecimientos

A mi familia:

“Para que pueda ser he de ser otro, salir de mí, buscarme entre los otros, los otros que no son si yo no existo, los otros que me dan plena existencia, no soy, no hay yo, siempre somos nosotros...”

Octavio Paz

A mi abuelito por quererme y cuidarme tanto, por darme una infancia hermosa y los mejores consejos, una herencia cultural invaluable y enseñarme a defender lo que amo.

A mis papas, por darme la vida, una buena familia y lo mejor de ellos, los amo.

Mamá gracias por cuidarme y amarme tanto, sin tu apoyo no seria quien soy hoy.

Papá gracias por intentar comprenderme, aunque a veces sea imposible, aun no descubro como demostrarte que te amo, pero nunca dudes que lo hago.

A Claudia por ser mi compañera incondicional, mi hermana mayor, la que siempre me recuerda “Que las cosas malas pronto hay que olvidarlas”, gracias por complementar mi vida con tu alegría, y nunca olvides que: “A donde iras tú, que no vaya yo”.

A Jorge por cuidarme tanto, soportarme y por introducirme en la lectura, el mejor regalo que me han dado, te amo.

Conchita “Que magnifico enigma eres” gracias por estar siempre a mi lado, quererme y consolarme.

A Vane por estar conmigo en los momentos mas importantes y apoyarme siempre.

A Bran, Vane y Vale, por compartir conmigo su alegría, jugar conmigo y hacerme reir.

A Erick, Joshua, Nancy, Diego y Melissa por permitirme ser parte de su mundo y volver a ser niña.

A mis abuelitas, tíos, primos y sobrinos por su amor y confianza.

A mis amigos:

“La única gente que me interesa es la que está loca, la gente que está loca por vivir, loca por hablar, loca por salvarse, con ganas de todo al mismo tiempo, la gente que nunca bosteza ni habla de lugares comunes, sino que arde, arde como fabulosos cohetes amarillos explotando igual que arañas entre las estrellas.”

Jack Kerouac

Naye por su apoyo incondicional, por pasar horas en las filas para ver las exposiciones que me gustan jajaja, por compartir tantos buenos momentos, pero sobre todo por estar en los malos.

Vicky por su amistad incondicional y por su actitud positiva que te impulsa a dar lo mejor.

Aline, Wendy, Sonia y Araceli gracias por compartir momentos tan divertidos, las quiero mucho.

Gen, Silvia, Cristian, Maga, Erwin y Alan son parte importante de mi vida, los amo mucho, gracias por todas las locuras, soy muy feliz cuando estamos juntos.

Mary por ser mi confidente por ver virtudes en mí que no creí tener, por llevarme de la mano en esta aventura y sufrir conmigo. Gracias por enseñarme a florecer.

Clau, gracias por llegar a nuestro equipo, darnos tanta alegría y enseñarnos a disfrutar los pequeños placeres de la vida.

Itzel, mi muy amiga jaja por escucharme siempre y confiar en mí, te quiero.

Bel, te quiero mucho loquita, gracias por hacer el camino mas divertido.

Joaquin por los jueves de “hoy voy a cambiar” y los viernes de cantar en el laboratorio de Inmuno, pero sobre todo por compartir el amor por Mary jaja.

Nan y Lilo por compartir este año maravilloso lleno de risas y cosas buenas. Gracias por enseñarme a disfrutar de la vida y ver el lado positivo de las cosas.

Dra. Edith Gonzalez, gracias por confiar en mí y enseñarme tanto, disfrute mucho este periodo.

Gracias a todos por creer en mi, incluso cuando yo no podía hacerlo.

ÍNDICE

I.- Abreviaturas.....	III
II.- Índice de figuras.....	IV
III.-Índice de tablas	V
IV.-Introducción.....	VI
1.-Marco teórico.....	1
1.1 Generalidades de linfocito	1
1.2 TCR.....	2
1.3 Estructura y función de MHC.....	4
1.4 Señales de activación linfocitaria	7
1.4.1 Vías de activación.....	9
1.4.1.1 Vía Ras/ MAP cinasa.....	9
1.4.1.2 PLC.....	11
1.4.1.3 PKC.....	12
1.4.2 Mol. Coestimuladoras.....	13
1.5 Inmunodeficiencias.....	14
1.6 SCID.....	16
1.7 CID	25
1.8 Diagnóstico.....	28
1.9 Tratamiento.....	33
1.10 Linfoproliferación in vitro.....	34
1.10.1 CFSE.....	35
1.11 Citometria de flujo.....	40
1.11.1 Aplicaciones en el diagnóstico de ID	39
2.-Justificación	44
3.-Objetivos	45
4.-Metodología	45
5.-Resultados	50
6.-Análisis de resultados.....	54
6.1 Historias clínicas	51
6.2 Linfoproliferación.....	52
6.2.1 PMA con ionomicina.....	52
6.2.2 PHA	53
6.2.3 Anti- CD3 ⁺	54
6.2.4 Anti-CD28 ⁺	54
6.2.5 Anti- CD3 ⁺ / Anti-CD28 ⁺	55
6.3 Correlación de historias clínicas con datos de laboratorio	57
6.3.1 Pacientes con subpoblaciones y linfoproliferación alterados	57
6.3.2 Pacientes con subpoblaciones alteradas y linfoproliferación normal	62
6.3.3 Pacientes con ID diferente a CID	64

6.3.4 Pacientes en los que se descarto CID	72
7.- Conclusiones	75
8.- Apendice	79
9.-Referencias	77

ABREVIATURAS

ADA	Adenosina desaminasa
APC	Antigen-presenting cells
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
CD	Células dendríticas
CDR	Complementarity determining regions
CF	Carboxifluoresceína
CFSE	Diacetato de carboxifluoresceína éster de succinimidilo
CID	Inmunodeficiencia combinada
CMV	Citomegalovirus
CTL	Linfocitos T citotóxicos o citolíticos
DAG	Diacilglicerol
FSC	Forward scattered light
GVHD	Enfermedad de injerto contra hospedero
HCT	Hematopoietic cell transplantation
IDPs	Inmunodeficiencias primarias
Ig	Inmunoglobulinas
IGIV	Inmunoglobulina intravenosa
IGSC	Inmunoglobulina subcutáneas
κ B	Inhibidor de NF- κ B
IL2R γ	Receptor de interleucina 2
ITAM	Immuno-receptor Tyrosine Activation Motif
IUIS	Unión Internacional de Sociedades de Inmunología
JAK3	Janus cinasa 3
LT	Linfocitos T
MAP cinasas	Mitogen-Activated Proteinkinase
MHC	Complejo Principal de histocompetibilidad
PHA	Fitohemaglutinina
PIP2	Phosphatidyl Inositol bis-Phosphate
PIP3	Phosphatidyl Inositol tris-Phosphate
PLC	Fosfolipasa C
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato
RAG1	Recombinasa 1
RAG2	Recombinasa 2
SCID	Severe combined immunodeficiency
SCIDX1	SCID ligada al cromosoma X
SI	Sinapsis inmunológica
SSC	Side scattered light
TCR	T-cell receptor
TH	Linfocitos T cooperadores
TRECs	Receptor de células T círculos de escisión
ZAP70	Tirosina cinasa asociada a las cadenas zeta

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Poblaciones linfocitarias	1
Figura 2.	Estructura del TCR	3
Figura 3.	Estructura de MHC-I	5
Figura 4.	Estructura de MHC-II	6
Figura 5.	Sinapsis inmunológica	8
Figura 6.	Vía de señales mediadas por calcio	10
Figura 7.	Vía Ras/MAP cinasa	12
Figura 8.	Vías de activación de Linfocito	13
Figura 9.	Defectos que causan IDPs	16
Figura 10.	Incidencia de Inmunodeficiencias combinadas en Latinoamérica	17
Figura 11.	Algoritmo diagnóstico de SCID	31
Figura 12.	Algoritmo diagnóstico de CID	32
Figura 13.	Eventos moleculares durante el etiquetado de con CFDASE	36
Figura 14.	Esquema de las partes del citómetro de flujo	38
Figura 15.	Histograma del estudio de linfoproliferación	45
Figura 16.	Análisis de Subpoblaciones	46
Figura 17.	Agentes infeccioso	51
Figura 18.	Frecuencia de agentes infecciosos	51
Figura 19.	Grafica de la respuesta a PHA	54
Figura 20.	Organización del análisis según datos de laboratorio	56
Figura 21.	Histograma del estudio de linfoproliferación del paciente 13	57
Figura 22.	Radiografía de brazos	58
Figura 23.	Radiografía de piernas	58
Figura 24.	Radiografía donde se observa: Sindactilia	58
Figura 25.	Histograma del estudio de linfoproliferación del paciente 3	59
Figura 26.	Histograma del estudio de linfoproliferación del paciente 12	60
Figura 27.	Subpoblaciones linfocitarias del paciente 14	61
Figura 28.	Histograma del estudio de linfoproliferación del paciente 14	61
Figura 29.	Expresión de MHC-II	63
Figura 30.	Histograma de la Tinción intracelular de ZAP70	64
Figura 31.	Tinción de ZAP70	65
Figura 32.	Histograma del estudio de linfoproliferación paciente 16	66
Figura 33.	Western Blot	66
Figura 34.	Histograma del estudio de linfoproliferación del paciente 6	68
Figura 35.	Neutrófilos paciente 11	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	SCID T ⁺ B ⁺	19
Tabla 2.	SCID T ⁻ B ⁻	20
Tabla 3.	CID	21
Tabla 4.	Tipo de infecciones asociadas CID.....	27
Tabla 5.	Características clínicas.....	50
Tabla 6.	Resultados de laboratorio	53
Tabla 7.	Reporte de la disminución de la respuesta a mitógenos	52
Tabla 8.	BH seriada de paciente 11	71
Tabla 9.	Pacientes en los que se descarta inmunodeficiencia.....	72

INTRODUCCIÓN

Las inmunodeficiencias primarias (IDPs) son un grupo heterogéneo de enfermedades hereditarias, generalmente se consideran como raras, pero la frecuencia real se desconoce, algunas estimaciones van desde 1 en 10 000 a un máximo de 1 en 1 200. La más grave de estas es la inmunodeficiencia combinada grave (SCID, de sus siglas en inglés *Severe combined immunodeficiency*), un grupo heterogéneo de enfermedades que se caracterizan por falta de respuesta inmune mediada por linfocitos T que afecta la respuesta celular como la humoral. La patogénesis de las SCID refleja mecanismos distintos que afectan a varios pasos en el desarrollo de linfocitos T y se caracteriza por la falta de estos provocando un aumento en la susceptibilidad a las infecciones oportunistas que amenazan la vida.

Las manifestaciones clínicas de SCID se presentan en los primeros meses, generalmente con infecciones de repetición, retraso en el crecimiento o aparente intolerancia de alimentos.

Se han identificado numerosos defectos genéticos que permiten el desarrollo de linfocitos T, lo que da como resultado que algunos pacientes con manifestaciones clínicas de SCID presenten números residuales, normales o incluso elevados de linfocitos T, pero su función se ve afectada en pasos proximal o distal en la señalización intracelular, estos dan como resultado Inmunodeficiencia Combinada (CID de sus siglas en inglés *combined immunodeficiency*) en este padecimiento los niños presentan más de 500 linfocitos/ μ l, lo que complica su diagnóstico. En este trabajo se estudia la función de estos linfocitos así como las subpoblaciones linfocitarias, estos correlacionados con la historia clínica de los pacientes ayudan a orientar el diagnóstico de CID.

El diagnóstico temprano de CID y SCID, ayuda a dar un tratamiento oportuno, iniciar profilaxis antimicrobiana, en caso de cursar con procesos infecciosos tratarlos con antibióticos de amplio espectro, mantenerlos en aislamiento para disminuir el contagio, transfundir en caso de que sea necesario productos exclusivamente radiados, dar gammaglobulina de reemplazo; lo cual podría disminuir la presentación clínica.

El tratamiento definitivo para estas enfermedades es el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas y se pronostican mejores resultados en este, si se realiza en los primeros meses de vida, por lo cual es importante realizar un diagnóstico temprano.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Generalidades de linfocitos

Los linfocitos T (LT), son las células centrales de la inmunidad adaptativa y son los responsables de sus propiedades características de diversidad, especificidad y memoria, se generan en la médula ósea, pero a diferencia de los linfocitos B, que maduran dentro de ésta, los LT migran al timo para madurar. Son los encargados de la inmunidad celular, ésta elimina patógenos intracelulares, como virus o micobacterias que al estar en el interior de los fagocitos no pueden ser atacados por los anticuerpos, también elimina células propias neoplásicas o infectadas por virus u organismos intracelulares para suprimir los reservorios de la infección.

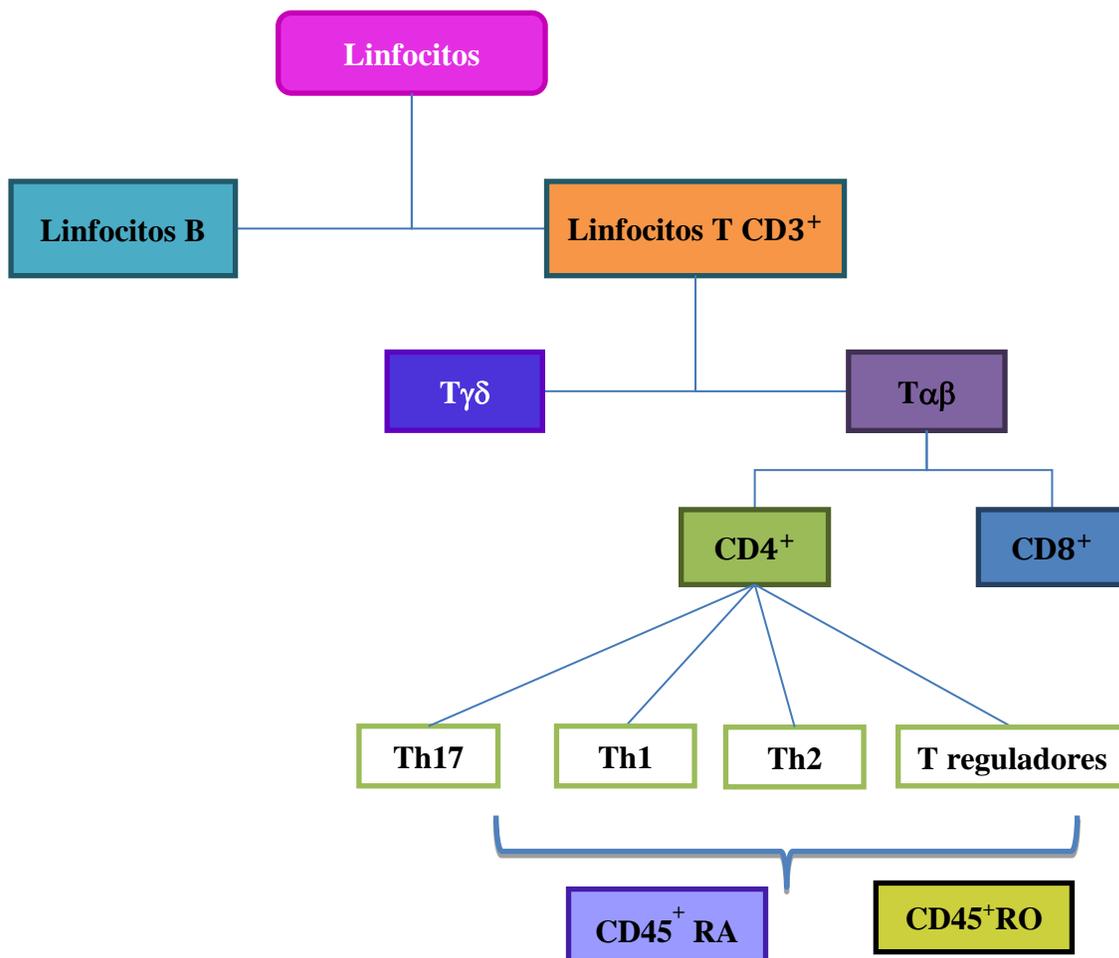


Figura 1. Poblaciones linfocitarias. El diagrama ilustra algunas de las subpoblaciones linfocitarias. $CD45^{+}RA$ corresponde a los linfocitos *naive* y $CD45^{+}RO$ a los linfocitos de memoria.

Constan de poblaciones con funciones diferentes (Figura 1), entre ellos los LT cooperadores (TH) ($CD4^+$) y los LT citotóxicos o citolíticos (CTL) ($CD8^+$) (Abbas, 2012).

Los LT maduros expresan en su membrana una molécula de reconocimiento a antígeno única, denominada receptor de célula T (TCR, del inglés *T-cell receptor*), se conocen dos tipos de estos receptores dependiendo de las cadenas que lo conforman: $TCR\alpha\beta$ y $TCR\gamma\delta$, la mayoría de los LT presentes en órganos linfoides expresan el $TCR\alpha\beta$, mientras que los LT $\gamma\delta$ se encuentran en las puertas de entrada en el organismo como epitelios de superficies mucosas y piel (De la Hera, 2000).

1.2 $T\alpha\beta$

El TCR es un heterodímero que consta de dos cadenas polipeptídicas transmembranarias, una α y otra β , unidas entre sí de forma covalente por un enlace disulfuro. Cada cadena $\alpha\beta$ del TCR consta de un dominio constante (C) y un dominio variable (V) N terminal, este último contiene aminoácidos que forman regiones determinantes de la complementariedad (CDR, del inglés *complementarity determining regions*) encargados de reconocer cadenas peptídicas unidos a moléculas presentadoras. Posee una región transmembranaria hidrófoba y una región citoplásmica corta (Figura 2). En el dominio constante se encuentra la secuencia conectora y debajo de esta una región transmembranaral que fija cada cadena en la membrana plasmática y que tienen la característica inusual de la presencia de aminoácidos con carga positiva, incluidas una lisina (en la cadena α), o una lisina y una arginina (en la cadena β), esto les permite interactuar con aminoácidos con carga negativa presentes en las porciones transmembranarias de otros polipéptidos (los del complejo CD3 y ζ) que forman parte del complejo TCR. Después se encuentran unas colas citoplásmicas cortas de 5 a 12 aminoácidos en el extremo carboxilo terminal (Kindt, 2007; Abbas, 2012).

Estas colas citoplásmicas son muy pequeñas para transmitir señales, por lo cual se requiere de la molécula accesoria CD3 para asociarse al TCR, este complejo de membrana TCR-CD3 es capaz de transmitir señales al complejo receptor para el antígeno. Las proteínas CD3 son necesarias no solo para la transmisión de señales en los LT, sino para la expresión en la superficie de estos del complejo receptor funcional completo.

La molécula CD3 es un complejo de cinco cadenas polipeptídicas invariantes que se relacionan para formar tres dímeros: un heterodímero de cadenas γ y ϵ ($\gamma\epsilon$), un heterodímero de cadenas δ y ϵ ($\delta\epsilon$), y un homodímero de dos cadenas ζ ($\zeta\zeta$). Cada complejo TCR contiene estos 3 heterodímeros unido por enlaces disulfuro (Kindt, 2007; Abbas, 2012).

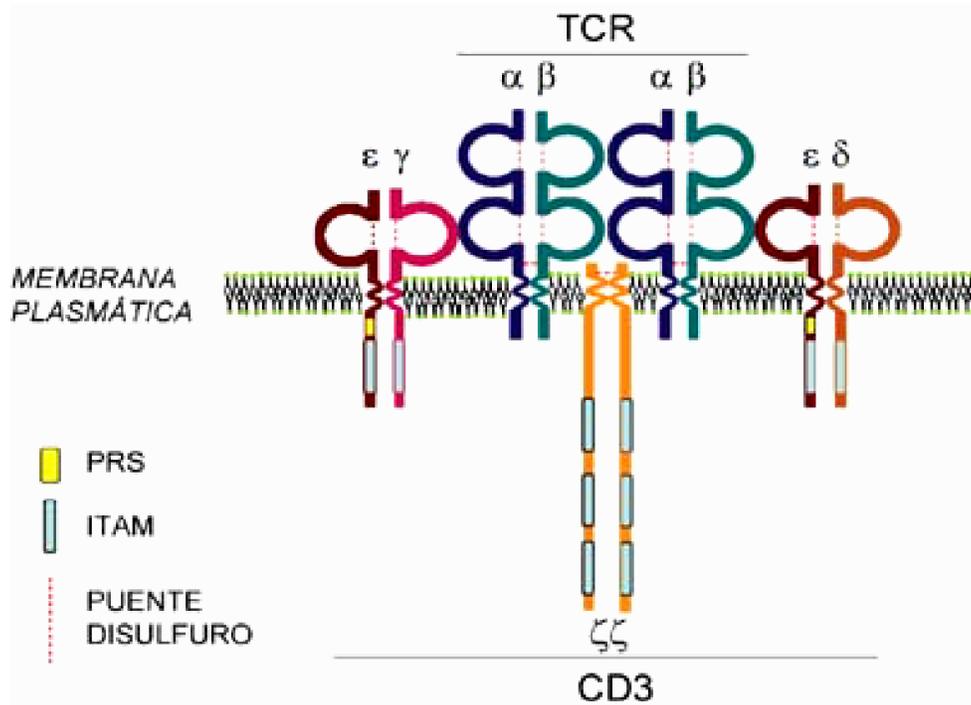


Figura 2. Estructura del TCR (Risueño y Alarcón, 2007).

Las colas citoplásmicas de las cadenas CD3 contienen un elemento llamado motivo de activación de inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM de inglés *Immuno-receptor Tyrosine Activation Motif*). Los ITAM son motivos de secuencia recurrentes que se encuentran en muchas proteínas emisoras de señales dentro del sistema inmunitario, que contienen tirosinas que quedan fosforiladas después de transducción de señal por medio del receptor asociado. La fosforilación de residuos de ITAM-tirosina a continuación permite el acoplamiento de moléculas adaptadoras, lo que facilita el inicio de la cascada de señalización. En CD3, cada cadena γ , δ y ϵ contiene una sola copia de ITAM, en tanto que las cadenas ζ incluyen tres copias (Kindt, 2007; Abbas, 2012).

A diferencia de los anticuerpos unidos a membrana en los linfocitos B, que reconocen antígenos libres, la mayoría de los TCR únicamente puede identificar antígenos que ha sido procesados y unidos a proteínas de membrana celular llamadas moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC, del inglés *major histocompatibility complex*). Cuando un LT virgen reconoce un antígeno asociado con una molécula MHC en una célula, prolifera y se diferencia en LT de memoria y varios LT efectores.

Las moléculas del MHC son glucoproteínas polimórficas de membrana que funcionan como moléculas presentadoras de antígeno, forman complejos con péptidos antigénicos, los cuales se exhiben en la superficie celular para ser reconocidas por los LT. Las MHC se dividen en dos grupos: clásicas y no clásicas. Las MHC clásicas se dividen en: moléculas MHC clase I, que casi todas las células nucleadas de las especies de vertebrados expresan, y moléculas MHC clase II, que sólo se expresan en las Células Presentadoras de Antígeno (APC, del inglés *antigen-presenting cells*) estas son macrófagos, células dendríticas, endoteliales y linfocitos B (López, 2005).

1.3 Estructura y función de las moléculas de MHC

MHC de clase I. Las moléculas de clase I están compuestas de dos cadenas polipeptídicas separadas, una cadena α y otra cadena β . Las tres cuartas partes de cada cadena α se encuentran en la región extracelular, incluyendo el extremo aminoterminal, un segmento corto que atraviesa la membrana y el restante, que incluye el extremo carboxiterminal, se interna en el citoplasma. La región de unión al péptido es la más importante dentro de la estructura de la molécula, está compuesta por aproximadamente 180 aminoácidos de la cadena α divididos en dos segmentos simétricos $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de 90 residuos cada uno. Estos segmentos forman una plataforma de ocho hojas planas β que soportan dos cadenas α hélices. Las dos cadenas α hélices forman las paredes de una hendidura cuyo piso está formado por las hojas planas β , es en este segmento donde se une el péptido (Figura 3). Las moléculas de clase I unen péptidos de proteínas intracelulares procesadas en el citoplasma de las CPA por estructuras llamadas proteosomas, el acoplamiento del péptido ocurre en el retículo endoplásmico; una vez formado el complejo péptido-molécula clase I, se transporta

a la membrana celular. Las moléculas de clase I presentan proteínas endógenas a los LT CD8⁺.

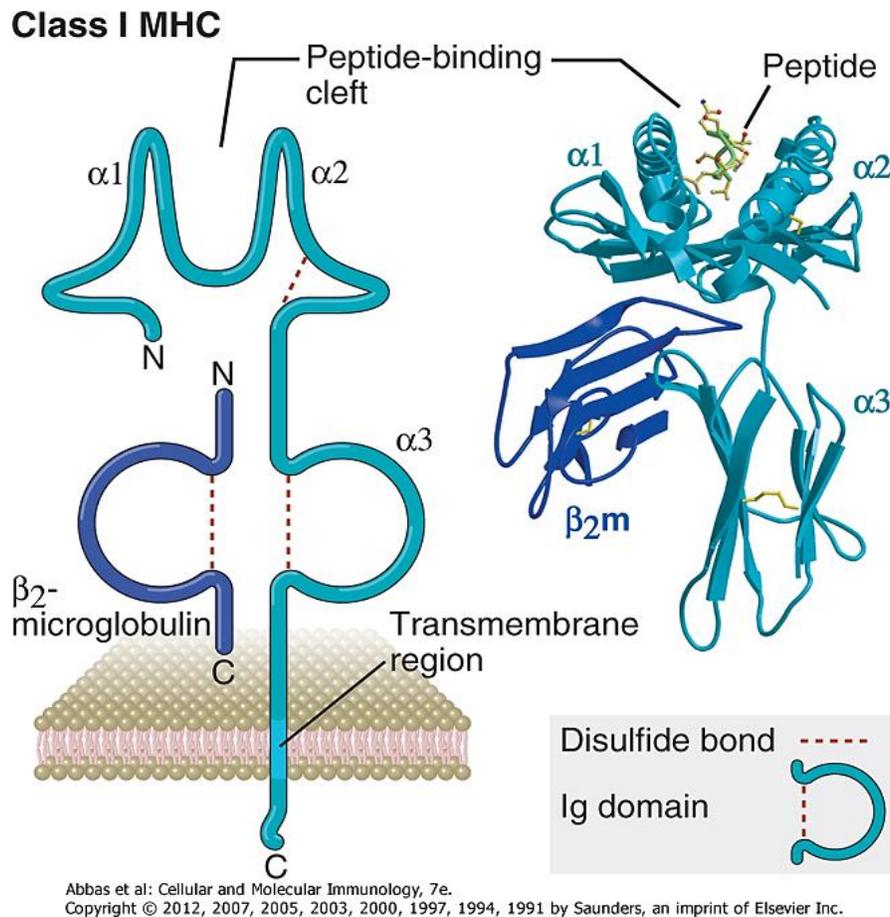


Figura 3. Estructura de MHC-I (Abbas, 2012).

Moléculas clase II

La molécula de clase II está formada por dos cadenas polipeptídicas diferentes que están asociadas no covalentemente. Existe una cadena α de 32 a 34 kD y una β de 29 a 32 kD. Se divide estructuralmente en una región extracelular y otra intracelular. La región extracelular se divide en segmentos de 90 aminoácidos, $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$. A diferencia de la clase I, la zona de unión al péptido está formada por ambas cadenas, segmentos $\alpha 1$ y $\beta 1$, respectivamente (Figura 4). Estas cadenas forman la hendidura, al igual que en la molécula clase I, los residuos más polimórficos se concentran en esta área (López, 2005).

Las moléculas de clase II presentan péptidos de proteínas extracelulares a los LT CD4⁺, los patógenos exógenos son endocitados por las APC, procesadas en los lisosomas para obtener el péptido y acoplarlo dentro de dicha vesícula, a la molécula clase II previamente formada en el retículo endoplásmico, el péptido debe tener un tamaño menor a 25 aminoácidos (Sanz, 2013; Vega Robledo, 2009).

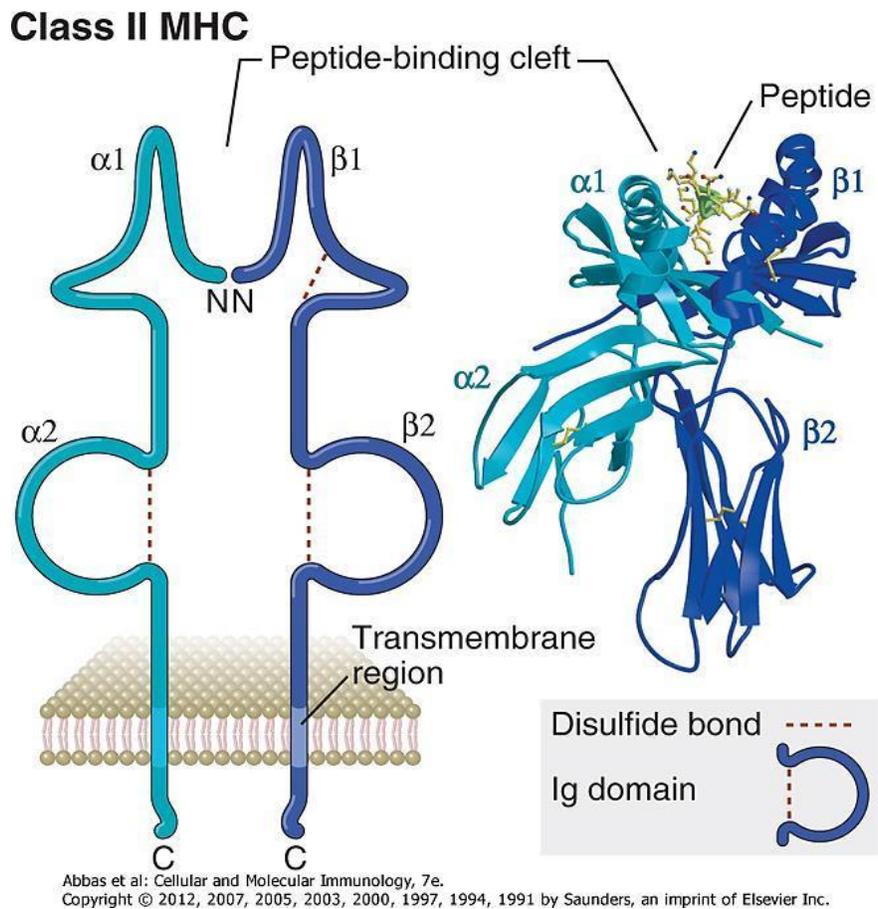


Figura4. Estructura de MHC-II (Abbas, 2012).

Una vez que la célula TH reconoce un complejo de antígeno y molécula MHC clase II e interactúa con él, se activa: experimenta una transformación metabólica y comienza a secretar diversas citocinas. Las citocinas secretadas tienen una función importante en la activación de células B, LT, macrófagos y varios tipos celulares más que intervienen en la inmunoreacción. Las diferencias en los tipos de citocinas producidas por células TH activadas tienen como resultado diferentes patrones de inmunorreacción (Kindt, 2007).

1.4 Señales de activación linfocitaria

Este proceso implica no sólo la interacción dinámica de múltiples moléculas de membrana presentes en las CPA y los linfocitos, sino también la transmisión intracelular de señales independientes que le permitan a los linfocitos vírgenes activarse, proliferar y diferenciarse en linfocitos efectores y de memoria (Fernández, 2006).

Las señales que conducen a la activación de las células T se producen en una estructura de carácter sináptico entre la célula T respondedora y las APC, el TCR y su ligando antígeno-MHC están en una posición central entre estas, mientras las moléculas de adhesión celular ICAM-1, integrinas y otras moléculas que establecen contactos intercelulares de forma antígeno- independiente forman un anillo que circunda el disco central donde se produce la reacción inmunológicamente específica.

En una etapa inicial, las células migran y son atraídas hacia el lugar de lesión por quimiocinas. En una segunda etapa, las células T se adhieren de forma antígeno inespecífica a las APC, empleando moléculas de adhesión intercelular. En esta etapa, sin saber si expresan el complejo antígeno-MHC específico de su TCR, “rastrean” la superficie celular para comprobar si se expresa dicho ligando. Las uniones celulares son en esta fase muy dinámicas; y si, no hay reconocimiento específico, la célula T se despegará rápidamente de esa célula para “reciclarse” y comenzar el rastreo de otra célula diana potencial, y otra secuencialmente.

Esta función de adhesión reversible se suspende si la célula encuentra un ligando específico para su TCR. Entonces la señalización del TCR/CD3 provoca un cambio del patrón de adhesión de integrinas como LFA-1, que aumentan su afinidad por la célula diana en un proceso llamado señalización de dentro-hacia-afuera (*in-outsignal*) al modificar la señal intracelular del TCR/CD3 la conformación del dominio extracelular de la integrina (De la Hera, 2000).

El reconocimiento del antígeno por parte del TCR inicia una secuencia de señales bioquímicas que estimulan la transcripción de genes que están silentes en los LT vírgenes y

cuyos productos intervienen en las respuestas funcionales de los LT activados. El reconocimiento del antígeno por parte del TCR induce el movimiento coordinado de varias moléculas de señalización de los LT (proteínas del CD3 y cadenas ζ , que son parte del complejo del TCR, $CD4^+$ o $CD8^+$, enzimas y proteínas adaptadoras) hacia el lugar donde se produce el contacto entre el LT y la CPA (Figura 5). Este lugar de contacto se denomina “sinapsis inmunológica” (SI).

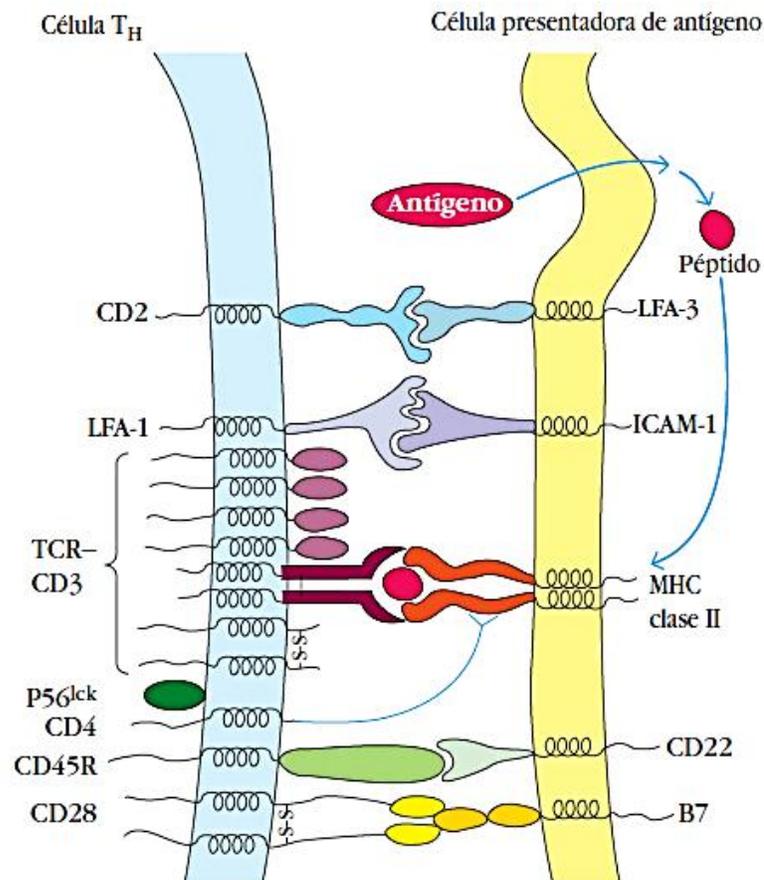


Figura 5. Sinapsis inmunológica (Kindt, 2007).

La unión del TCR al complejo péptido-MHC permite la unión de $CD4^+$ o $CD8^+$ a una región no polimórfica de la molécula MHC clase I o II, respectivamente, esta es la primera señal. La segunda señal es independiente del receptor antigénico, procede de moléculas de membrana presentes en las APCs denominadas coestimuladoras y cuyos ligandos se encuentran en la membrana de los linfocitos (Fernández, 2006).

Estas interacciones inducen la activación de señales interna generadas por múltiples mecanismos (generalmente fosforilación y desfosforilación), a través de 3 vías principales: PLC, PKC y vía de las MAP cinasas.

1.4.1 Vias de activación

1.4.1.1 Vía Ras/ MAP cinasa

Las proteínas ligadoras del nucleótido guanina (proteína G) son activadas por el reconocimiento de antígeno, Ras es una de estas proteínas, al estar inactiva la zona ligadora del nucleótido guanina está ocupada por difosfato de guanosina (GDP) y al activarse es sustituido por trifosfato de guanosina (GTP), para que esta se active se requiere que de ZAP70 que fosforila a LAT y en esta se acopla el dominio SH2 de Grb-2, unidos reclutan el factor de intercambio de GTP/GDP de Ras, llamado SOS, gracias a este se genera Ras-GTP, y este activa la cascada de las proteínas activadas por mitógenos MAP cinasas (del inglés *Mitogen Activated Protein Kinase*). Ras-GTP activa la cinasa c-Raf, y está a una cinasa de especificidad dual que fosforila una cinasa activada por el receptor extracelular activado (ERK), al estar activada ingresa al núcleo y fosforila una proteína llamada Elk, y Elk fosforilada estimula la transcripción de c-Fos, un componente del factor de transcripción de la proteína de activación 1 (AP-1).

Paralelo a la activación de Ras, también se activa una proteína de intercambio GTP/GDP llamada Vav, que actúa sobre la proteína G, Rac. Rac-GTP activa una cinasa de la porción amino terminal de c-Jun (JNK, del inglés c- Jun N-terminal kinase), esta fosforila c-Jun, el segundo componente de AP-1, este es esencial para la activación de las células T y regula la transcripción de IL2 (Figura 6).

Un tercer miembro de la familia de las Map cinasas es, p38, que también activa Rac-GTP y a su vez varios factores de transcripción (Kindt, 2007).

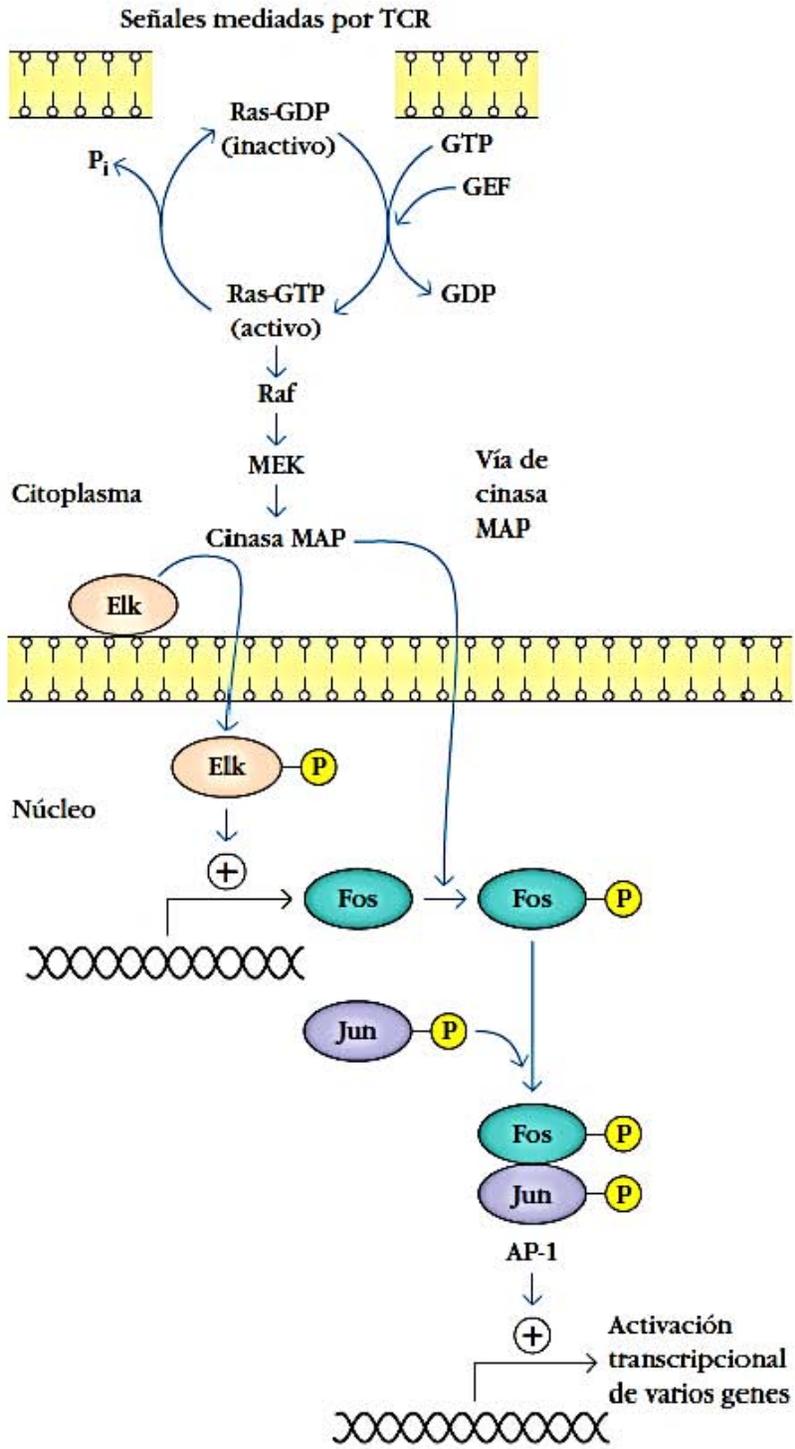


Figura 6. Vía Ras/MAP cinasa (Kindt, 2007).

1.4.1.2 La vía de la Fosfolipasa C (PLC)

La sinapsis inducen la activación de la Lck (tirosina cinasa asociada a los extremos citoplasmáticos de CD4⁺ y CD8⁺), la cual fosforila a las tirosinas de los ITAM de CD3 y las cadenas ζ. Las tirosinas fosforiladas de las cadenas ζ se convierten en sitios de anclaje para ZAP70 (tirosina cinasa asociada a las cadenas zeta). A su vez, la ZAP70 activada de este modo por Lck cataliza la fosforilación de varias moléculas adaptadoras como LAT. LAT fosforilada recluta la isoforma γ1 de la enzima fosfolipasa C (PLCγ1), la unión LAT fosforilada-PLCγ1 asegura que la PLCγ1 se localice a la membrana celular, donde es activada por fosforilación de ZAP70 y otras cinasas como Itk. La PLCγ1 fosforilada cataliza la hidrólisis del fosfolípido de membrana, fosfatidil inositol bifosfato (*Phosphatidyl Inositol bis-Phosphate* (PIP2)), generando dos productos, fosfatidil inositol trifosfato (*Phosphatidyl Inositol tris-Phosphate* [PIP3]) y diacelglicerol (DAG), estos activan 2 vías de transmisión de señales (Fernández, 2006; Abbas, 2012).

Vías de transmisión de señales mediadas por calcio

El IP3 difunde hacia el retículo endoplásmico (RE), donde interactúa con su receptor, un canal de calcio, lo que induce la liberación de iones calcio (Ca²⁺) almacenados en la membrana. Esto provoca un aumento de Ca²⁺ en el citoplasma y la pérdida de este en el retículo endoplásmico, esta es detectada por STIM una proteína del RE, la cual activa un canal iónico en la membrana plasmática llamado canal de calcio activado por la liberación de (CRAC del inglés *calcium reelease-activated calcium*), un componente clave de este canal es la proteína Orai (Figura 7). Como resultado de la activación del canal, entrada calcio extracelular (Kindt, 2007; Abbas, 2012).

El calcio libre citosólico forma un complejo con la calmodulina y dicho complejo Ca²⁺/calmodulina induce la activación de varias enzimas, incluida una serina/treonina fosfatasa denominada calcineurina. Esta enzima elimina grupos fosfato del factor de transcripción citoplásmico (NFAT) y descubre una región que permite su translocación hacia el núcleo. En el núcleo, NFAT estimula la transcripción de los genes de IL2 e IL4, entre otros (Fernández, 2006).

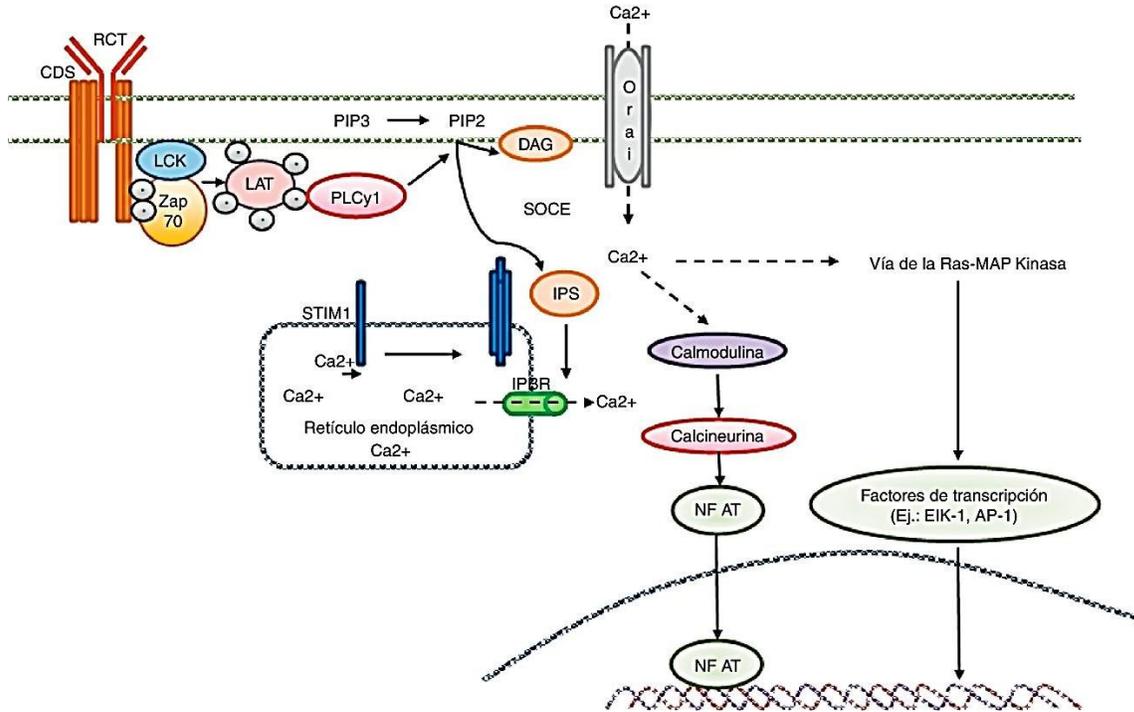


Figura 7. Vía de señales mediadas por calcio (Izquierdo, 2014).

1.4.1.3 PKC

La producción de DAG por PLC da por resultado la activación de cinasa de proteína C (PKC). Esto transpone la PKC a balsas lipídicas, donde la enzima inicia una cascada de sucesos cuya finalidad es la activación de factores de transcripción heterodiméricos NF- κ B, en las células en reposo, heterodímeros de NF- κ B son mantenidos en el citoplasma mediante unión a la proteína Inhibidor de NF- κ B ($I\kappa$ B). La activación celular induce la fosforilación de estas proteínas inhibitoras mediante un complejo de $I\kappa$ B cinasa (IKK). La proteína $I\kappa$ B fosforilada a continuación es establecida como objetivo para degradación proteosomal, lo que libera el NF- κ B para que entre al núcleo y se una a los promotores de una amplia gama de genes importantes desde el punto de vista inmunitario.

NF- κ B es importante en el control de la transcripción de proteínas necesarias para el funcionamiento apropiado de muchos tipos de células de los sistemas inmunitarios innato y adaptativo; en general, la transcripción mediada por NF- κ B está asociada con eventos proinflamatorios y de activación, más que con procesos reguladores.

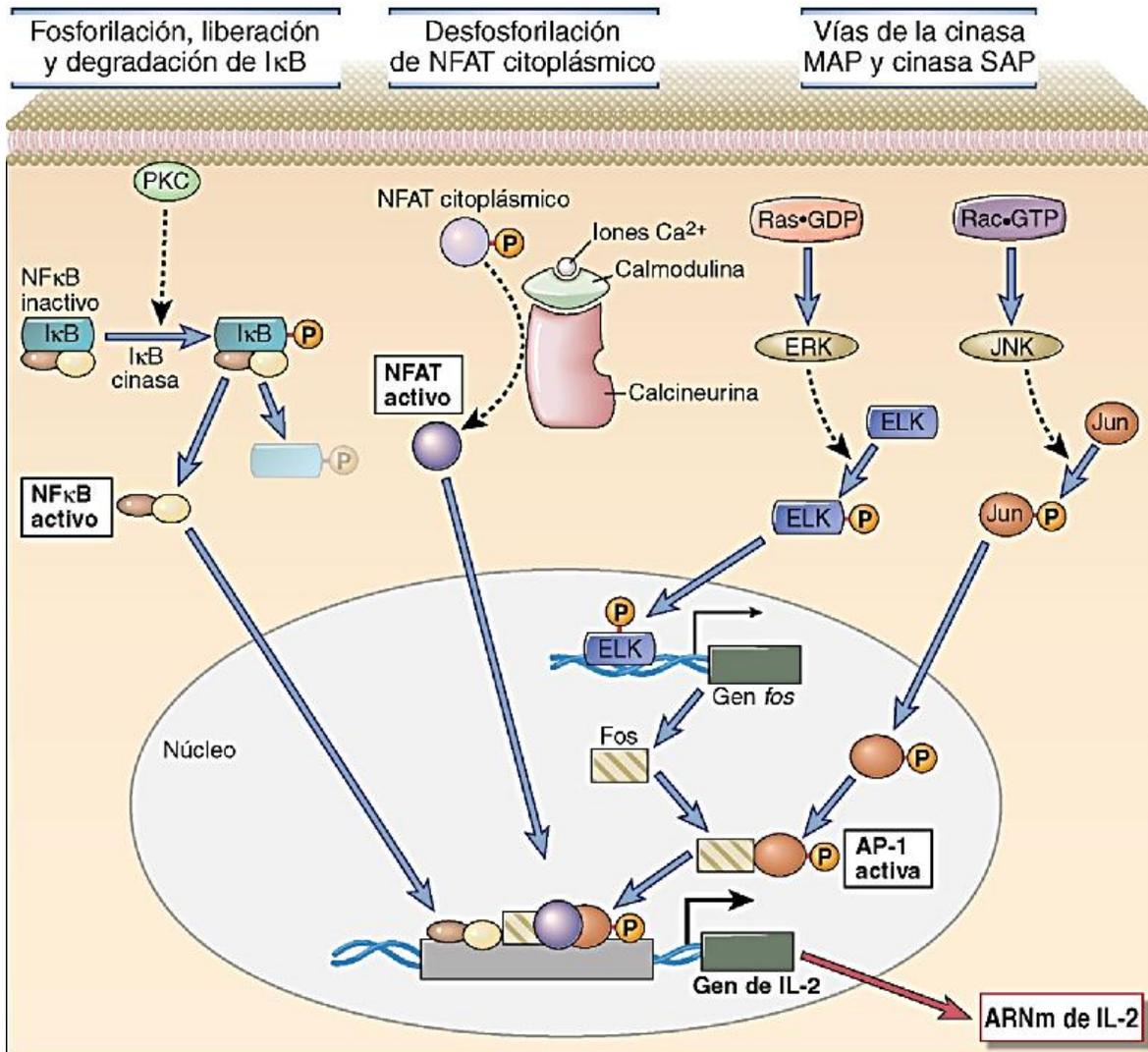


Figura 8. Vías de activación de Linfocito (Abbas, 2012).

La activación de estas vías de señalización contribuye a la expresión de diferentes genes que codifican proteínas necesarias para la expansión clonal (Figura 8), la diferenciación y las funciones efectoras de los LT, pero para la activación completa de los mismos son necesarias las señales coestimuladoras (Fernández, 2006; Kindt, 2007).

1.4.2 Moléculas coestimuladoras

La coestimulación es la modificación del proceso de activación de la célula T a partir de la interacción de receptores expresados en las células T con sus ligandos expresados en las membranas de las células dendríticas u otras APC (Saavedra, 2013).

Los linfocitos que carecen de esta señal cuando se encuentran con su antígeno ingresan en un estado de anergia o mueren por apoptosis. Las señales coestimuladoras son emitidas principalmente por las interacciones entre el receptor CD28⁺ que se encuentra en la superficie de los LT y sus ligandos B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) expresados por las CPA, con el fin de potenciar las respuestas de los LT frente a los antígenos, entre ellas, las señales de supervivencia y proliferación celular, la síntesis de citocinas, que permiten la cooperación célula-célula y la diferenciación de los linfocitos vírgenes en linfocitos efectores y de memoria.

Una variedad de mutaciones que afectan a la función y el desarrollo de la respuesta inmune dan como resultado una inmunodeficiencia.

1.5 INMUNODEFICIENCIAS

Las inmunodeficiencias primarias (IDPs) son un grupo heterogéneo de enfermedades hereditarias que comprenden alteraciones en el desarrollo, función o ambos, del sistema inmunitario, estas son causadas por más de 200 trastornos genéticos diferentes que afectan la función del sistema inmune y dan lugar a mayor susceptibilidad a infecciones, cáncer y procesos de autoinmunidad (Notarangelo, 2013; Coria, 2010).

La mayoría de los casos las IDPs son monogénicas es decir, siguen una herencia mendeliana simple; sin embargo pueden tener un origen poligénico más complejo. La penetrancia de la enfermedad y la variabilidad de expresión dependerá de las interacciones entre factores genéticos y ambientales lo cual contribuye a la diversidad fenotípica de las IDPs.

Generalmente las IDPs se consideran como raras, pero la evidencia indica que son más comunes de lo que se estimaba, se cree que del 70 % al 90 % de las IDPs permanecen subdiagnosticadas (Leiva, 2011). Por lo tanto la frecuencia real de IDPs se desconoce, pero algunas estimaciones van desde 1 en 10 000 a un máximo de 1 en 1 200 (Condino-Neto, 2011), observándose una tasa mucho más alta entre las poblaciones con altos índices de consanguinidad y entre poblaciones genéticamente aisladas (Notarangelo, 2010).

Las IDPs más comunes son las implicadas en deficiencias de anticuerpos, la mayoría de los casos restantes son causados principalmente por defectos fagocíticos e inmunodeficiencia combinada (Condino-Neto, 2011).

El diagnóstico precoz y el tratamiento adecuado son esenciales para el mejor pronóstico y la calidad de vida en pacientes con IDPs. Desafortunadamente este se retrasa debido a la variabilidad de sus manifestaciones clínicas o a la falta de conciencia acerca de estos trastornos, entre otras causas (Leiva, 2011).

La Unión Internacional de Sociedades de Inmunología (IUIS) clasifica las inmunodeficiencias primarias en nueve grupos de acuerdo al componente del sistema inmunológico involucrado (Picard, 2015):

- 1.- Inmunodeficiencias que afectan a la inmunidad celular y humoral
- 2.- Inmunodeficiencias combinadas con características asociadas o sindrómicas
- 3.- Deficiencias predominantemente anticuerpos
- 4.- Enfermedades de desregulación inmune
- 5.- Defectos congénitos del número de fagocitos, función, o ambos
- 6.- Defectos de Inmunidad Innata
- 7.- Trastornos autoinflamatorios
- 8.- Deficiencias del complemento
- 9.- Fenocopias de PID

Todas estas formas se caracterizan por el aumento de la susceptibilidad a infecciones recurrentes, infecciones graves o ambos, con susceptibilidad distintiva a diversos tipos de patógenos en función de la naturaleza del defecto inmune. Además, algunas formas de IDPs se presentan con desregulación inmune, y otros (síndromes de inmunodeficiencia) tienen un fenotipo más complejo en el que la inmunodeficiencia es sólo una de múltiples componentes del fenotipo de la enfermedad (Notarangelo, 2010).

1.6 Inmunodeficiencia combinada grave

La inmunodeficiencia combinada grave (SCID, de sus siglas en inglés *Severe combined immunodeficiency*) es un grupo heterogéneo de enfermedades que se caracterizan por falta de respuesta inmune mediada por LT que afecta tanto a la respuesta celular como la humoral. SCID fue identificado en 1950 y fue reconocido inmediatamente como la forma más grave de IDP en los seres humanos (Notarangelo, 2013).

Se debe a mutaciones en genes que participan en el desarrollo y función de los linfocitos. La enfermedad es siempre mortal, por lo que el diagnóstico precoz es esencial (Hernández, 2014).

Se han descrito más de 20 diferentes defectos moleculares que pueden dar como resultado el síndrome clínico de SCID. Estos incluyen defectos en los genes implicados en la reorganización de genes del receptor de antígeno (RAG1, RAG2, DCLRE1C, PRKDC, LIG4), en la señalización del receptor de células T (CD3 δ , ϵ , γ , ζ , CD45, ZAP70, ORAI1, STIM1), en la diferenciación de células T (IL2RG, IL7R, JAK3, ADA, PNP, AK2), y en el desarrollo y salida del timo de las células T (formas raras de microdelección 22q11 síndrome, FOXP1, FOXP3) (Felgentreff, 2011). La patogénesis de las SCID refleja mecanismos distintos que afectan a varios pasos en el desarrollo de células T (Figura 9).

Las SCID tienen una prevalencia de aproximadamente 1 en 50 000 nacidos vivos y son más común en los varones, lo que refleja la sobrerrepresentación de SCID ligada al cromosoma X (SCIDX1), la forma más común de SCID en humanos (Notarangelo, 2010).

La Sociedad Latinoamericana de Inmunodeficiencias (LASID) inició el registro de los pacientes con inmunodeficiencias primarias en línea desde 2009, para abril de 2016, se reportaron 6 518 casos de inmunodeficiencias primarias en Latinoamérica, siendo 476 inmunodeficiencias combinadas, de estas: 182 son casos de SCID y el resto son CID (Figura 10). De los 6518 casos 1231 casos fueron mexicanos, 356 fueron reportados por el Instituto Nacional de Pediatría (LASID, 2016).

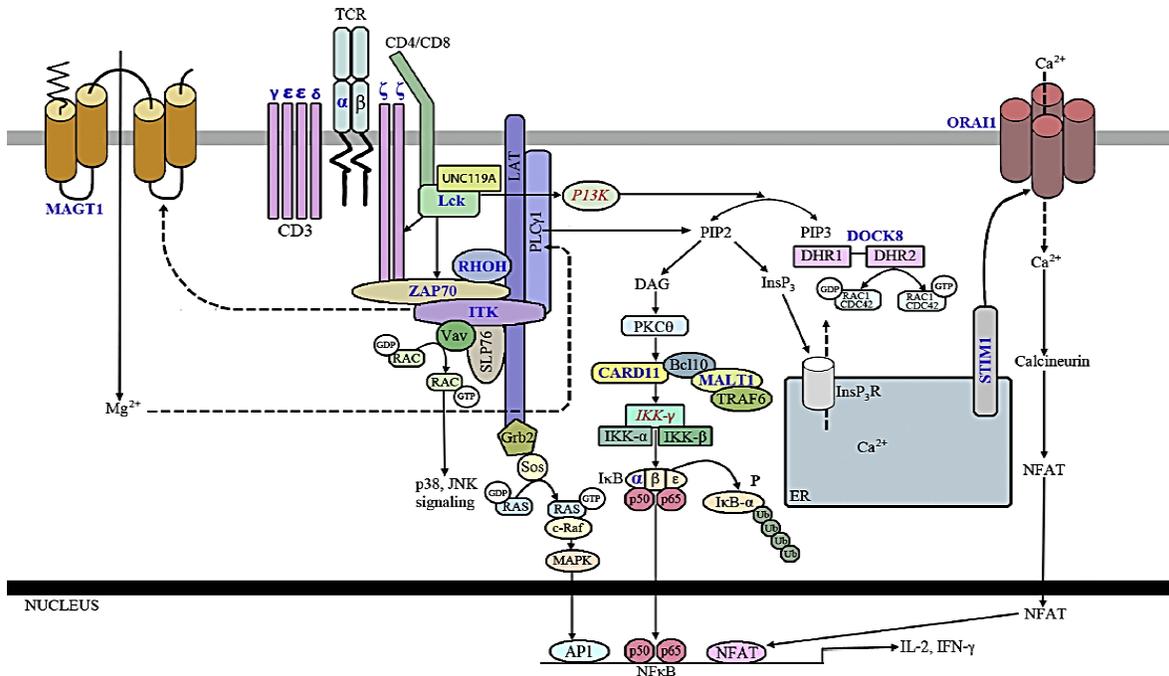


Figura 9. Moléculas cuyas mutaciones se han asociado con defecto parcial del desarrollo de las células T y la función de los LT. Se indican en azul. (Notarangelo, 2010).

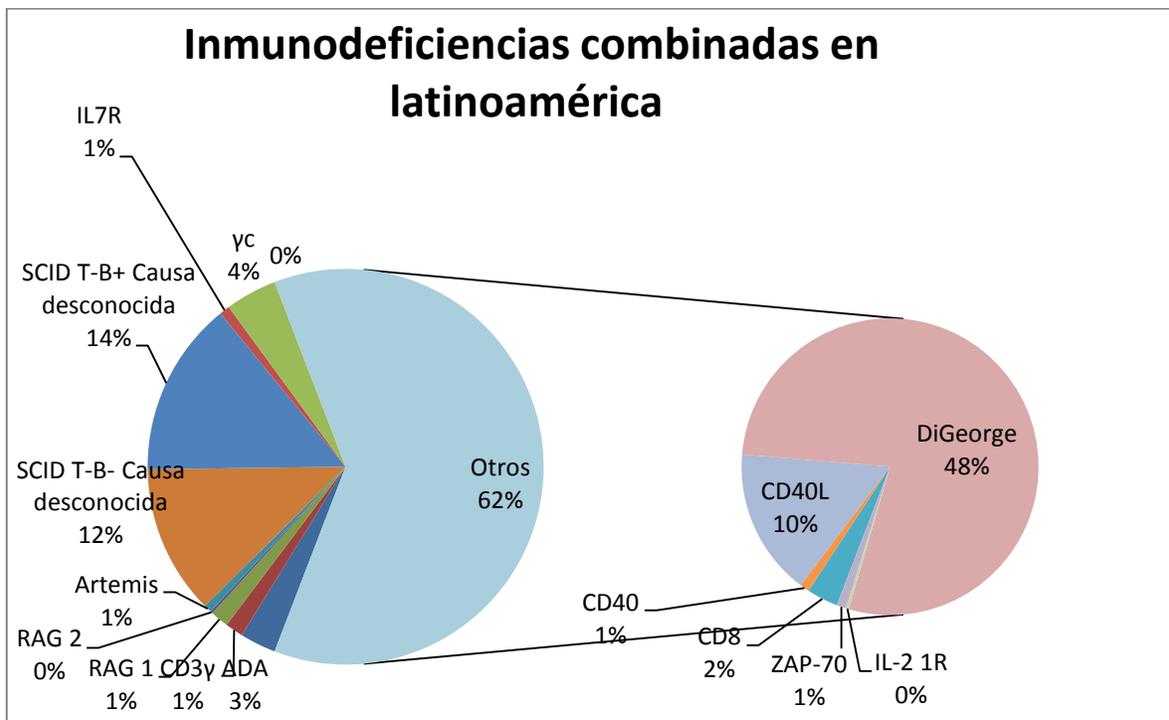


Figura 10. Grafica de la incidencia de Inmunodeficiencias combinadas en Latinoamérica. Podemos observar que las CID superan en número a las SCID, pese a estar subdiagnosticadas.

La SCID se caracteriza por la falta de LT circulantes, esto representa el aumento de la susceptibilidad a las infecciones virales y oportunistas que amenazan la vida. La producción de anticuerpos específicos (inmunidad humoral) también está afectada, debido a defectos en los linfocitos B circulantes (si es que los hay) o a la falta de LT cooperadores, lo que provoca susceptibilidad a infecciones bacterianas.

Los niños que padecen SCID, por lo general, presentan dentro de los primeros meses de la vida, infecciones recurrentes de origen bacteriano, viral, o de hongos en las vías respiratorias o sistema gastrointestinal, así como retraso en el desarrollo y, a veces, la intolerancia aparente de alimentos.

La neumonía causada por *Pneumocystis jiroveci* es común; así como enfermedad pulmonar intersticial debido a citomegalovirus (CMV), adenovirus, virus respiratorio sincitial, o virus tipo parainfluenza. Muchos niños con SCID tienen diarrea crónica, lo que lleva al retraso en el desarrollo. La diarrea crónica viral conduce a atrofia de las vellosidades, mala absorción, dando como resultado desnutrición.

Las infecciones bacterianas son menos comunes debido a la presencia de IgG materna en los primeros meses de vida. Sin embargo, la otitis media prolongada y las infecciones bacterianas invasivas, como la septicemia por *Staphylococcus* y neumonía, se producen y pueden responder mal al tratamiento adecuado. Los pacientes también presentan infecciones oportunistas, como la neumonía por *Pneumocystis jirovecii*.

Las infecciones fúngicas invasivas graves son poco frecuente, pero a menudo mortal, una amplia candidiasis mucocutánea persistente es común.

Organismos de las vacunas atenuadas, tales como el virus de la vacuna oral contra rotavirus, la varicela y el bacilo de *Calmette-Guérin* (BCG), puede causar enfermedades graves e incluso mortales.

Los niños con SCID también pueden sufrir de la enfermedad de injerto contra hospedero (GVHD), ya que carecen de la capacidad de rechazar tejido extraño. La GVHD puede ser el resultado de LT maternos alorreactivos que se cruzan en la circulación fetal en el útero, en el caso de transfundidos se debe a la aplicación de derivados sanguíneos no irradiados (Van Der Burg, 2011).

Las SCID se clasifican de acuerdo con el inmunofenotipo y se clasifican en SCID con ausencia de LT, pero la presencia de linfocitos B (SCID T⁻ B⁺) o SCID con ausencia de ambos LT y B (SCID T⁻ B⁻). Los dos grupos principales de SCID incluyen formas con o sin linfocitos natural killer (SCID T⁻ B⁺ NK⁺ o SCID T⁻ B⁺ NK⁻).

Tabla 1. Tipos de SCID con fenotipo T⁻B⁺ (Picard, 2015)

Deficiencia	Defecto genético	Herencia	Ig	Características asociadas
γ_c	Mutación de IL2R γ . Defecto en la cadena γ de receptores para IL2, IL4, IL7, IL9, IL15, IL21.	XL	Disminución	Disminución notable de las células NK.
Jak3	Mutación de JAK3 Defecto en la activación de Janus quinasa 3.	AR	Disminución	Disminución notable de las células NK.
IL7R α	Mutación de IL7R α . Defecto en la cadena α del receptor de IL7	AR	Disminución	Células NK normales
CD45	Mutación de PTPRC. Defecto en CD45.	AR	Disminución	Células T γ / δ normales.
CD3 δ / CD3 ϵ / CD3 ζ	Mutación de CD3D. Defecto en CD3 δ , cadena del complejo receptor de antígeno de células T.	AR	Disminución	Células NK normales No hay células T γ / δ
Coronin 1-A	Mutación de CORO1A. Defecto en la salida del timo de LT y su locomoción.	AR	Disminución	Timo detectable, Asociada con el EBV.

Tabla 2. Tipos de SCID con fenotipo TB (Picard, 2015)

Deficiencia	Defecto genético	Herencia	Ig	Características asociadas
RAG 1/2	Mutación de RAG1 y 2. Recombinación VDJ defectuosa. Defecto de la activación de genes (RAG) 1 y 2.	AR	Disminución	
Artemis	Mutación de Artemis. Recombinación VDJ defectuosa. Defectos en la proteína recombinasa Artemis de reparación del DNA.	AR	Disminución	Sensibilidad a la radiación.
DNA PKcs	Mutación de PRKDC. Recombinación VDJ defectuosa. Defecto en PKcs de DNA.	AR	Variable	Sensibilidad a la radiación, microcefalia, defectos en el desarrollo, autoinmunidad y granuloma.
Cernunos	Mutación de Cernunos. Recombinación VDJ defectuosa. Defecto en Cernunos.	AR	Disminución	Sensibilidad a la radiación, microcefalia y defectos en el desarrollo.
DNA ligasa IV	Mutación de LIG4. Recombinación VDJ defectuosa. Defecto en DNA ligasa IV.	AR	Disminución	Sensibilidad a la radiación, microcefalia y defectos en el desarrollo.
AK2	Mutación de AK2 Maduración defectuosa de células linfoides y mieloides (defecto de células madre). Defecto en la mitocondria adenilato quinasa 2.	AR	Disminución	Granulocitopenia y sordera.
ADA	Mutación de ADA Actividad de ADA ausente. Elevados metabolitos tóxicos.	AR	Disminución progresiva	Disminución de NK, a menudo con costochondritis, discapacidad auditiva, manifestaciones en pulmón e hígado. La deficiencia parcial de ADA puede llevar a presentaciones más suaves.

Tabla 3. Inmunodeficiencias combinadas generalmente menos profundas que la inmunodeficiencia combinada grave (Picard, 2015)

Deficiencia	Defecto genético	Herencia	Linfocitos T	Linfocitos B	Ig	Características asociadas
DOCK2	Mutaciones en DOCK2, esta se requiere para la activación de RAC1, la polimerización de actina, la proliferación de células T, inducida por quimiocinas, la migración de linfocitos y la desgranulación de las células NK.	AR	Disminuido. Mala respuesta PHA. TRECs bajos.	Normal	Disminuido/Normal. Pobres respuestas a anticuerpos.	Numero normal de NK con función defectuosa. Deterioro de la respuesta de interferón en células hematopoyético y no hematopoyéticas.
CD40L	Mutación de CD40LG, defectos en CD40 ligando (CD40L; también llamado TNF SF5 o CD154) causa defectos en el cambio de isotipo y deterioro en la señalización.	XL	Normal; pero con disminución progresiva.	LB sIgM ⁺ y sIgD ⁺ presentes, otros isotipos ausentes.	IgM aumenta o normal, otros isotipos disminuyen.	Neutropenia, trombocitopenia, anemia hemolítica e infecciones oportunistas.
CD40	La mutación de CD40 (también llamado TNFRSF 5) causa defectos en el cambio de isotipo y alteración en la señalización de células dendríticas.	AR	Normal	LB IgM ⁺ y IgD ⁺ presentes, otros isotipos ausentes.	IgM aumentada o normal, otros isotipos disminuyen.	Neutropenia, enfermedades gastrointestinales, de hígado o tracto biliar e infecciones oportunistas.
CD3γ	Mutación de CD3G. Defecto en el componente CD3 γ del TCR.	AR	Normal, pero con expresión reducida del TCR.	Normal	Normal	
CD8	Mutación de CD8 α . Defectos en la cadena α del CD8, importante para la maduración y función de células T CD8 ⁺ .	AR	Ausente CD8 ⁺ . Células CD4 ⁺ normales	Normal	Normal	
ZAP70	La mutación de la proteína intracelular ZAP70 deteriora la señalización.	AR	Disminución de CD8 ⁺ .	Normal	Normal	Autoinmunidad en algunos casos.
MHC-I	Las mutaciones en TAP1, TAP2, TAPBP o B2M, causan que el MHC-I no se exprese.	AR	Disminución de CD8 ⁺ , células CD4 normales; expresión ausente de MHC-I en linfocitos.	Normal	Normal	Autoinmunidad en algunos casos, vasculitis; pioderma gangrenoso, infecciones sinopulmonares, cutáneagranuloma, hipoproteinemia. Expresión ausente de β 2 asociadas con MHC-I, deficiente CD1a y CD1b, CD1c en β 2m células.

Deficiencia	Defecto genético	Herencia	Linfocitos T	Linfocitos B	Ig	Características asociadas
MHC-II	Mutación en factores de transcripción de MHC-II.	AR	Disminución de CD4 ⁺ Ausente expresión de MHC-II en Linfocitos.	Normal	Normal o disminuidos	Retraso del crecimiento, diarrea, infecciones respiratorias, enfermedad de la vía hepático/biliar.
ITK	Las mutaciones en ITK que codifican IL2 inducible de células T requieren quinas a para la activación mediada por TCR.	AR	Disminución progresiva	Normal	Normal o disminuidos	EBV, asociado a linfoproliferación de células B, Linfoma.
MAGT1	Mutaciones en MCT1, deterioro del flujo de Mg ²⁺ que conduce al daño en la señalización.	XL	Disminución de CD4 ⁺ , disminución de la proliferación en respuesta a CD3.	Normal	Normal	Infección por EBV, linfoma; infecciones virales, respiratorias y gastrointestinales.
DOCK8	Mutaciones en la codificación de DOCK8, un regulador intracelular en la reorganización de la actina.	AR	Disminución de LT, proliferación alterada; deficiencia de TRECs y función pobre.	Disminución; de LB de memoria CD27 ⁺ .	IgM bajo, aumento de IgE.	La disminución de las células NK con alteración de función, hipereosinofilia, infecciones recurrentes; grave atopia cutánea, infecciones virales y estafilocócicas, susceptibilidad a cáncer. Defectos intolerancia periférica.
RhoH	Mutaciones en RHOH (una GTPasa de transducción que genera señales en diversos receptores de membrana).	AR	Normal. Baja células T vírgenes, repertorio restringido de células T y alteración en la proliferación en respuesta a la estimulación con CD3.	Normal	Normal	Infección por VPH, linfoma, granulomas pulmonares, molusco contagioso.
MST1	Mutaciones en STK4 (Una serina/treonina quinasa).	AR	Disminución de células de memoria y células T vírgenes, alteración de proliferación.	Disminuido	Alto	Infecciones recurrentes bacterianas, virales, o por <i>Candida</i> ; neutropenia intermitente; EBV; linfoma; Enfermedad cardíaca congénita, citopenias autoinmunes; infección por VPH.

Deficiencia	Defecto genético	Herencia	Linfocitos T	Linfocitos B	Ig	Características asociadas
TCRα	Mutaciones en TCR α (Componente esencial del TCR)	AR	Células CD3 TCR $\gamma\delta$ normales, alteración de la proliferación.	Normal	Normal	Infecciones recurrente virales, bacterianas o por hongos, autoinmunidad, desregulación inmune, y diarrea.
LCK	Defectos en LCK (una tirosina quinasa que interactúa con el TCR)	AR	Número total normal, pero linfopenia de CD4 ⁺ , TRECs bajos, repertorio restringido de células T y alteración de la señalización del TCR.	Normal	Normal IgG e IgA. IgM elevada.	Diarrea, infecciones recurrentes, desregulación inmune, autoinmunidad.
MALT1	Mutaciones en MALT1	AR	Número normal pero proliferación deteriorada.	Normal	Normal. Respuesta de anticuerpos alterada.	Infecciones bacterianas, fúngicas y virales.
CARD11	Defectos en CARD11 (actúa como un andamio para la NF- κ B en la actividad de la respuesta inmune adaptativa)	AR	Normal, con predominio de LT vírgenes, proliferación deteriorada.	Normal	Ausente / baja	Neumonía por <i>Pneumocystis jirovicii</i> o infecciones bacterianas.
BCL10	Las mutaciones en BCL10 que codifica la CLL de células B. Linfoma de proteína 10 que forma un heterotrímero con MALT1 y CARD de la familia adaptadores y juega un papel en la señalización NF- κ B.	AR	Normal, LT memoria y TRECs bajos. Disminución de la proliferación con antígenos y anti-CD3.	Número normal; disminuido LB de memoria.	Bajo	Infecciones recurrentes, bacterianas, virales y/o candidiasis, gastroenteritis.
IL21	Mutación en IL21	AR	Número normal. Función normal/baja.	Bajo	Deficiencia de IgG	Colitis severa de inicio temprano.
IL21R	Defectos en IL21R (este junto con la cadena gamma común se une a IL21)	AR	Producción anormal de citocinas; proliferación de células T anormal a estímulos específicos.	Normal	Normal, pero deteriorada respuesta específicas.	Susceptibilidad a <i>Cryptosporidium</i> , <i>Pneumocystis</i> y colangitis.
OX40	Los defectos en OX40 (TNFSF4) que codifica una molécula coestimuladora expresada en células T activadas.	AR	LT normales; disminución de CD4 ⁺ de memoria antígeno específico.	LB normales; reducción de células B de memoria.	Normal	Sarcoma de Kaposi; HHV 8.

Deficiencia	Defecto genético	Herencia	Linfocitos T	Linfocitos B	Ig	Características asociadas
IKBKB	Defectos en IKK, la codificación IκB 2, quinasa 2, un componente de la vía NF-κB.	AR	LT totales normales; ausencia de TRECs y Tγδ; alteración de activación por TCR.	Número de células B normales; alteración de la activación de TCR.	Disminuido	Infecciones bacterianas, víricas y fúngicas recurrentes; fenotipoclínico de SCID.
CD27	Mutaciones en CD27 (TNFRSF 7) que codifica TNF-R, miembro de la superfamilia requerido para la generación y mantenimiento de la inmunidad de LT.	AR	Normal	No presenta células B de memoria.	Hipogammaglobulinemia después de infección con EBV.	Infección por EBV, HLH, anemia aplásica, linfoma, hipogammaglobulinemia, Baja células NKT.
NIK	Mutación en MAP3K14, codificación NIK (quinasa NF-κB inductor).	AR	Número normal; proliferación alterada en respuesta a la estimulación de antígeno. Repertorio Vβ policlonal.	Disminución total de LB y células B de memoria.	Hipogammaglobulinemia.	Infecciones recurrente por bacterias, virus y/o <i>Cryptosporidium</i> . Bajo número de células NK y activación de células NK defectuoso.
CTPS1	Mutación en CTPS1, codificaCTP sintasa 1, esencial para la proliferación de linfocitos.	AR	Número normal o disminuido. Proliferación normal o disminuida.	Número normal / baja	Normal/ IgG alta	Infecciones virales crónicas recurrentes/especialmente EBV y VZV, infecciones bacterianas, EBVconduce a Linfoma de células B no Hodgkin.
Síndrome de Omen	Mutaciones hipomórficas en RAG1, RAG2, Artemisa, IL7RA, RMRP, ADA, DNA ligasa IV, IL2RG, AK2 o asociado con Síndrome de DiGeorge; algunos casos tienen mutación genética no definida.		Repertorio restringido de células T y deterioro de la función.	Normal o baja	Disminución, excepto para el aumento de IgE.	Eritrodermia, eosinofilia, adenopatías, hepatoesplenomegalia.

1.7 CID

Se han identificado numerosos defectos genéticos que permiten el desarrollo de LT, lo que da como resultado que algunos pacientes con manifestaciones clínicas de SCID presenten números residuales, normales o incluso elevados de LT, pero su función se ve afectada en pasos proximal o distal en la señalización intracelular (Notarangelo, 2013; Felgentreff, 2011). A estos defectos se les conoce como CID o SCID atípico. Anteriormente se ha descrito como inmunodeficiencia combinada profunda, estos pacientes suelen sobrevivir más allá de 12 meses de edad, presentan infecciones graves y prolongadas, que puede resolver lentamente (Van Der Burg, 2011).

Debido a que en las SCID se puede presentar un número bajo o incluso normal de linfocitos se han delineado los límites entre SCID y CID dependiendo el número de células T. Se considera SCID clásico en pacientes que presentan menos 500 células/ μL y CID en pacientes con linfocitos por arriba de este valor. Los casos de CID y SCID pueden diferenciarse unos de otros no sólo sobre la base de los recuentos de CD3^+ sino también basado del tipo de presentación clínica y la capacidad de ser detectado mediante el uso de análisis de recién nacidos con receptor de células T círculos de escisión (TRECs) y la respuesta a mitógenos *in vitro* (Roifman, 2012).

Hay varias razones para la presencia de células T en pacientes CID. Las células T pueden ser injertos transplacentarios de la madre. En el 50 % de SCID B^- y en el 80 % de SCID B^+ , células T maternas pueden ser detectadas. Estas pueden estar presentes en baja frecuencia, pero también pueden estar elevadas al límite de referencia. El inmunofenotipo de estas células T puede ser diverso. La mayoría tienen un fenotipo maduro (CD45RO^+), pero esto no puede ser considerado como una regla de oro. Ellos quizás tengan una relación $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ perturbado o expresión aberrante (Burg, 2011).

Estudios genéticos han demostrado que la presencia de LT están relacionadas con mutaciones en genes que desempeñan un papel importante, pero no crítico, en el desarrollo y/o la función del LT. En otros casos se debe a mutaciones hipomórficas en los genes causantes de SCID, estas mutaciones permiten la expresión residual y la función de la proteína codificada, son a menudo parcialmente permisivos para el desarrollo de los LT, en

consecuencia, los pacientes con tales mutaciones pueden tener un número detectable de LT circulantes, con función defectuosa, pero no completamente abrogada. Estas anomalías son responsables del deterioro de la homeostasis inmune y las manifestaciones clínicas de desregulación inmune (Notarangelo, 2014).

Estos pacientes tienen un repertorio restringido de LT ya que la expansión es oligoclonal (Roifman, 2012). Mutaciones hipomórficas en los genes que codifican RAG1, RAG2, DCLRE1C, LIG4, componente de RNA de la endoribonucleasa procesadora del RNA mitocondrial (RMRP) y ADA obstaculizan pero no invalidan la función de las enzimas respectivas, lo que da como resultado defectos permeables que permiten la maduración de un limitado número de células T en el timo.

Otra causa de la presencia de células T autólogas en pacientes CID es la aparición de mutaciones somática de reversión. Estas mutaciones de reversión se han descrito en algunos casos SCID ligada al cromosoma X, en la deficiencia de RAG y en pacientes con una deficiencia CD3. En estos pacientes, la reversión de la mutación somática se produjo, probablemente los LT tempranos, y se corrige el defecto genético. Si se produce la reversión somática, los LT tienen una ventaja de crecimiento selectivo y el potencial del desarrollo de la función normal. El mecanismo por el cual surge la reversión somática es aún desconocido. En algunos pacientes con un defecto de recombinación parcial, se presenta una alta frecuencia de las células $T\gamma\delta$ (Van Der Burg, 2011).

Los pacientes con mutaciones en la cadena ζ asociados a las proteínas 70 kDa (ZAP70); CD3 γ ; y receptor α IL2 (IL2RA), son buenos representantes de este grupo, ya que presentan LT circulantes, pero su respuesta *in vitro* frente a anticuerpo anti-CD3 o mitógenos son con frecuencia disminuidas (Roifman, 2012).

Un fenotipo característico de los pacientes con mutaciones en los genes causantes de SCID, pero la inmunidad de células T residual, es el síndrome de Omenn (OS). La gran mayoría de los casos de debe a mutaciones hipomórficas en los genes RAG1 o RAG2, que deterioran pero no abolen el proceso de recombinación V (D) J, requerido para los LT y el

reordenamiento de receptores de células B y su expresión (Villa, 2008; Van Der Burg, 2011).

El OS se presenta con recuentos de LT normal o incluso aumentado y altos niveles de IgE, este síndrome se caracteriza por una erupción eritematosa, linfadenopatía y hepatoesplenomegalia, la susceptibilidad a infecciones graves y oportunistas así como retraso del desarrollo (Felgentreff, 2011). Estas características clínicas son secundarias a la expansión de las células T autorreactivas oligoclonales, predominantemente TH2 (T helper) (Kelly, 2013).

Se cree que estas son las principales responsables de la inflamación observada en estos pacientes, los LT anormales, en la ausencia de regulación adecuada por otros componentes del sistema inmune, secretar una gran cantidad de citocinas que promueven autoinmunidad, así como inflamación alérgica (Villa, 2008).

La presencia de LT circulantes con diversos grados de función residual complica el diagnóstico de CID, lo cual nos invita a poner especial atención en estudiar la función de estos (Roifman, 2012). Esto es posible mediante el estudio de linfoproliferación *in vitro*.

Además de una mayor susceptibilidad a las infecciones (Tabla 4), los pacientes afectados con estas condiciones presentan un espectro más amplio de manifestaciones clínicas, incluyendo autoinmunidad, enfermedad inflamatoria, linfoproliferación disminuida y un mayor riesgo de neoplasias malignas (Notarangelo, 2014).

Tabla 4. Tipo de infecciones asociadas CID (Notarangelo, 2010)

Organismos	Ejemplos
Virus	CMV, EBV, parainfluenza tipo 3.
Bacterias	<i>Salmonella typhi</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , flora entérica.
Micobacterias	No tuberculosas, incluyendo BCG.
Hongos	Las especies de <i>Candida</i> , de <i>Aspergillus</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Histoplasmosis capsulatum</i> .
Protozoarios	<i>Pneumocystis jiroveci</i> , <i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Cryptosporidium parvum</i> .

1.8 Diagnóstico

Como pauta general, un bebé con un recuento absoluto de linfocitos menor de 3000/ μ L induce una evaluación para un posible defecto inmunológico. La linfopenia, puede ser causada por VIH, por lo tanto se debe descartar. Es importante evaluar la carga viral de VIH por PCR, ya que es posible que los pacientes no serán capaces de generar una respuesta anti-VIH (Locke, 2014).

Se debe realizar una historia clínica completa, la historia familiar es importante en el enfoque de las PID debido a la naturaleza monogénica de la mayoría de las formas de estos trastornos. Sin embargo, la mayoría de los pacientes no tienen un familiar con IDPs, ya que representan mutaciones de novo o la primera ocurrencia de una enfermedad autosómica recesiva.

El examen físico también puede proporcionar pistas importantes, por ejemplo, los pacientes con agammaglobulinemia muestran ausencia de amígdalas y otros tejidos linfoides, la microcefalia es común en los PID asociados con defectos en la reparación del DNA, Petequias y otras manifestaciones asociadas con el eccema son muy sugestivos del síndrome de Wiskott-Aldrich y los pacientes con trastornos inmuno-óseo tienden a tener corta estatura.

Las pruebas inmunológicas de laboratorio son muy importantes para validar la sospecha de IDPs.

Se requiere de subpoblaciones linfocitarias, que demuestren linfopenia marcada o la reducción de los recuentos de LT en particular, que como ya se mencionó será menor a menos 500 células/mL en los casos de SCID pero puede ser mayor en CID.

Se requiere el uso de citometría de flujo para evaluar subconjuntos específicos de linfocitos ya que un recuento total de leucocitario manual, podría dar resultados normales por la presencia de linfocitos maternos, incluso en ausencia de células T en un paciente SCID (Randolph, 2016).

La presencia de injerto de células T materna o de las células T autólogas residuales en pacientes con CID podría dar lugar a conteos relativamente altos (e incluso normal) de los LT y por lo tanto ser confusos. Sin embargo, en estos casos LT circulantes presentes serán en su mayoría de memoria (CD45RO⁺) y pocos LT *naive* (CD45RA⁺) (Notarangelo, 2010).

El análisis de subpoblaciones por citometría de flujo debe incluir: recuento de LT, NK y linfocitos B; así como, evaluación de la porcentaje de las células que expresan CD45RA⁺ y CD45RO⁺ (Randolph, 2016). El fenotipo inmune es especialmente útil en el diagnóstico de la inmunodeficiencia combinada grave, ya que el patrón de la falta de tipos de células contribuye a delimitar el defecto inmunológico presente (Locke, 2014).

Interpretación de los resultados es más complicada en síndrome de Omenn o CID. Estos pacientes presentan un alto número de células T oligoclonales, su presencia puede inducir a error, por lo que un análisis detallado de los LT en pacientes con sospecha clínica de SCID típico o atípico es de suma importancia (Van der Burg, 2011).

La evaluación de la función de LT es esencial y está determinada por la medición *in vitro* de las respuestas a mitógenos, tales como fitohemaglutinina (PHA) y concanavalina A (ConA). Roiffman y colaboradores (2012) encontraron que el punto de corte de 50 % de proliferación en relación con el control permite identificar a un mayor número de pacientes afectados.

Se debe evaluar la respuesta humoral, para esto es necesario el recuento de LB, la medición del total de inmunoglobulinas, y la evaluación de anticuerpos específicos frente a antígenos de proteína y polisacárido. Es importante recordar que durante los primeros meses de vida, las IgG son en su mayoría de origen materno. Por lo tanto los niveles de IgG en suero son aparentemente normales durante los primeros 2 a 3 meses de vida, incluso en pacientes con deficiencia de anticuerpos.

Una prueba de reciente implantación es la cuantificación de TRECs (Receptor de células T círculos de escisión), esta ha ayudado a identificar linfopenia grave de células T en la infancia, por lo general antes de la primera infección del individuo. Esto permite un diagnóstico y tratamiento más temprano, reduciendo morbilidad y mortalidad (Locke, 2014).

Los TRECs, son subproductos del rearreglo de los genes del receptor de los LT en desarrollo (recombinación V (D) J) y éstos pueden ser detectados mediante el análisis del ácido desoxirribonucleico (DNA), de los linfocitos de sangre periférica, ya que se exportan a la periferia por LT recién generado que dejan el timo. Los Niveles de TRECs son particularmente altos en los recién nacidos y los bebés (que reflejan la función activa del timo) y disminuyen progresivamente con la edad. No se detectan TRECs en los bebés con SCID.

El ensayo TRECs es un biomarcador para el número de células T vírgenes que han surgido recientemente del timo. A medida que las células T naive se reducen en todas las formas de SCID, el ensayo TRECs debe identificar a los bebés con SCID independientemente del defecto molecular (Contreras-Verduzco, 2014).

El ensayo TRECs no ha estado exenta de desafíos. Los bebés prematuros (edad gestacional menor de 37 semanas al nacer) se presentan como un único problema en el uso de la prueba de TRECs, ya que muestran una tasa de falsos positivos mucho mayor en comparación a infantes a término.

Confirmación de SCID requiere el análisis de secuencia de los genes sospechosos, la identificación de mutaciones específicas es importante no sólo para confirmar el diagnóstico, sino también para guiar el asesoramiento genético y para facilitar la detección de portadores y la diagnosis prenatal. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que no todos los cambios en el DNA son necesariamente causa de la enfermedad; algunos podrían representar polimorfismos, variantes raras o variaciones que contribuyen con la enfermedad (Notarangelo, 2010).

La principal ventaja de la detección temprana de SCID o CID es que facilita la pronta iniciación del tratamiento adecuado (Fleisher, 2016).

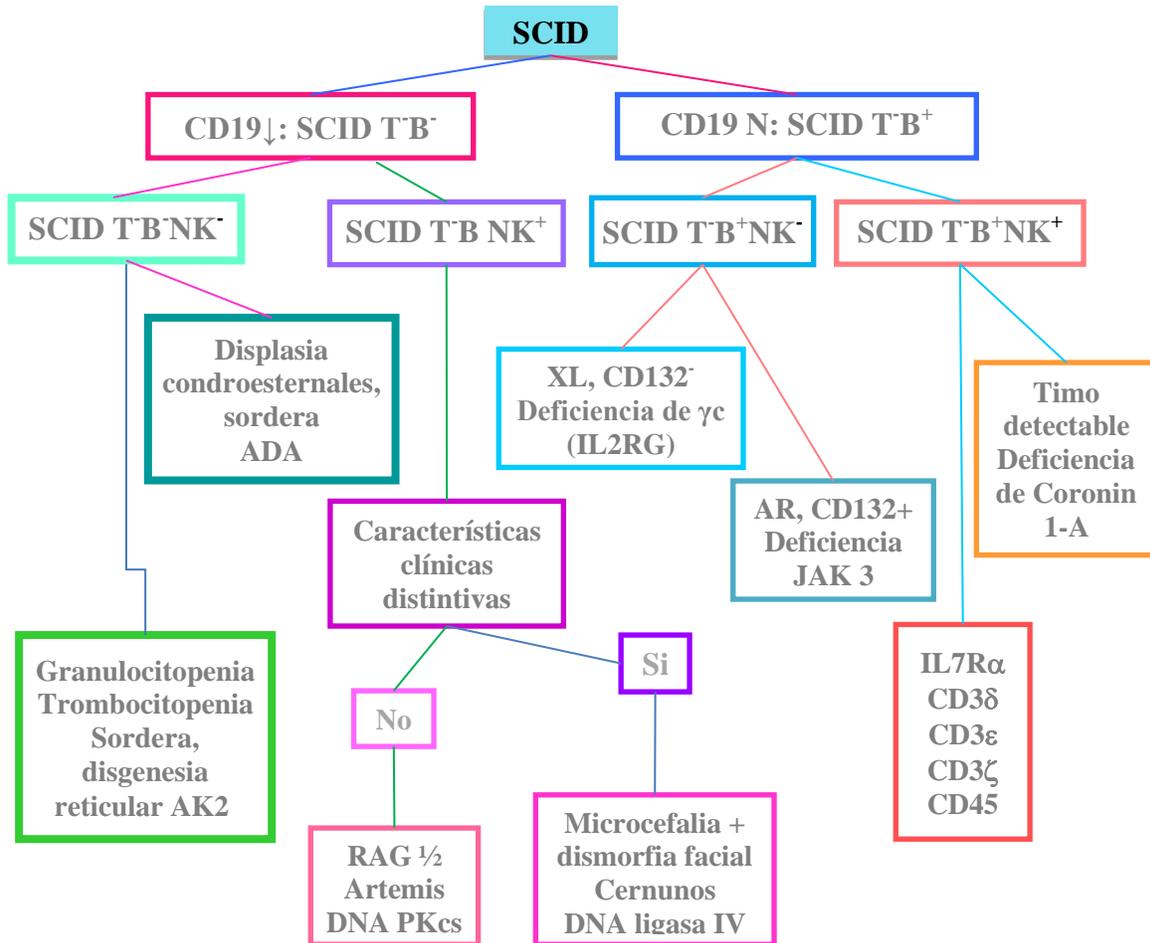


Figura 11. Algoritmo de diagnóstico por inmunofenotipo de SCID (Bousfiha, 2015). Este algoritmo ayuda a orientar el diagnóstico de SCID mediante el inmunofenotipo.

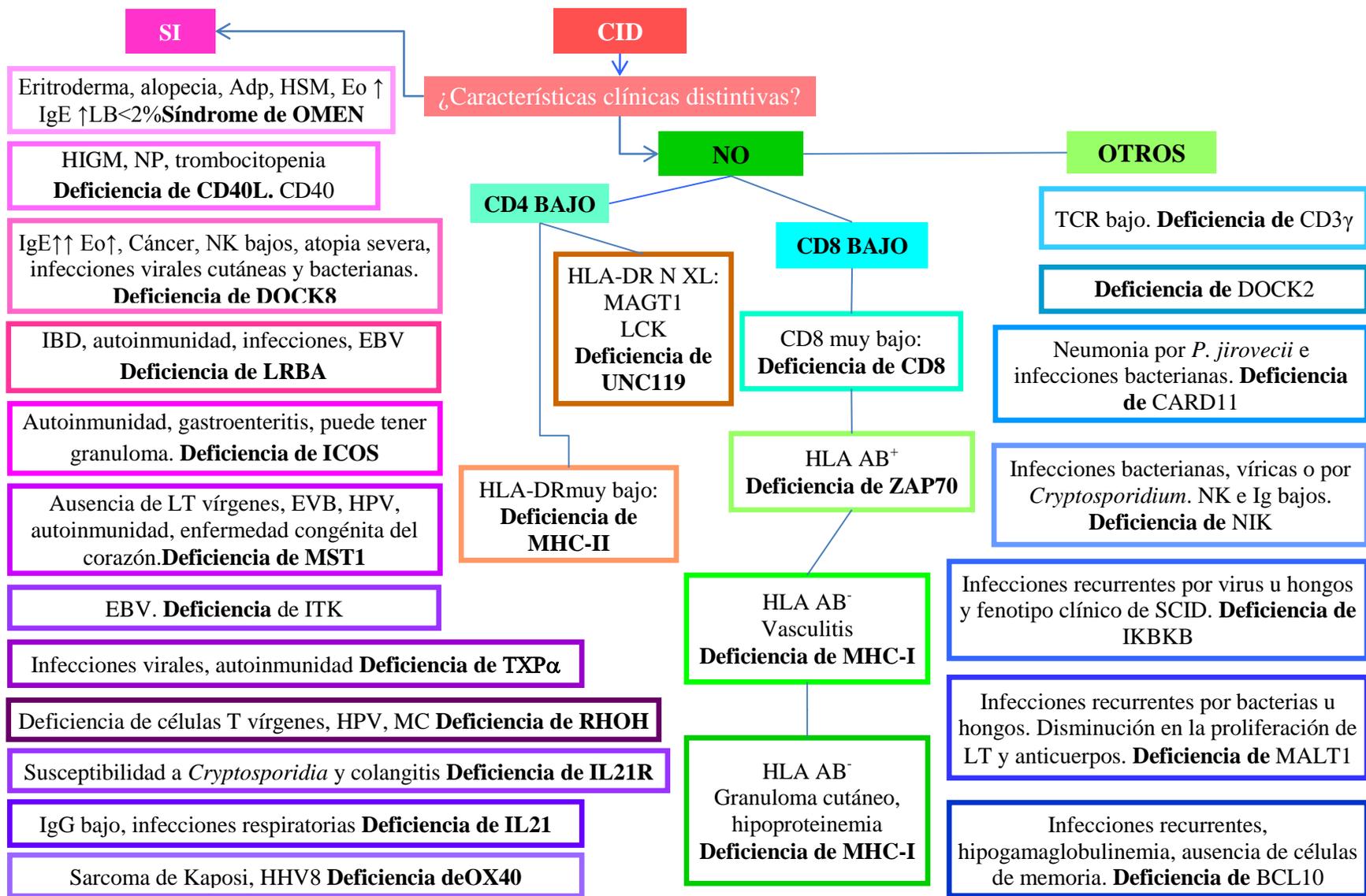


Figura 12. Algoritmo basado en los datos clínicos para el diagnóstico de CID (Bousfih, 2015).

1.9 Tratamiento

Los pacientes con SCID o CID reciben un régimen de profilaxis diseñado para evitar infecciones oportunistas de origen fúngico, bacteriano o viral (Kelly, 2013).

Las vacunas de virus vivos atenuados deben evitarse para prevenir infecciones descontrolada asociada a la vacuna, sólo los productos sanguíneos irradiados y filtrados debe ser utilizado en estos pacientes debido al riesgo de enfermedad injerto contra huésped o de transmitir infecciones por CMV (citomegalovirus) en particular.

El soporte nutricional es a menudo necesario. La inmunosupresión ayuda en el control de las reacciones inflamatorias asociadas con el síndrome de Omenn.

El tratamiento de la deficiencia de anticuerpo se basa en la terapia con inmunoglobulina de reemplazo. Esta se puede administrar intravenosa (IGIV) o subcutáneas (IGSC). Ambos son eficaces en la reducción de la incidencia de infecciones. La dosis habitual sustitutiva de IVIG es de 400 mg/kg por 21 días, pero podría ser necesario en dosis más altas pacientes con bronquiectasias o meningoencefalitis enteroviral (Notarangelo, 2010).

En 1968, Gatti y Good lograron la primera corrección inmunológica para un lactante con inmunodeficiencia combinada severa (SCID), mediante la infusión de células hematopoyéticas alogénicas obtenidas de la médula ósea de un hermano con HLA compatible (De la Morena, 2014). Actualmente el trasplante de células hematopoyéticas (HCT por sus siglas en inglés *Hematopoietic cell transplantation*) es el tratamiento de elección para los pacientes con SCID (Van Der Burg, 2011).

Cuando se realiza a partir de un hermano con HLA idéntico, HCT tiene 90 % de posibilidad de supervivencia a largo plazo y una buena reconstitución inmune. Cuando el HCT se realiza a partir donantes emparentados HLA no coincidentes proporciona excelentes resultados cuando se realiza en los primeros 3 a 5 meses de vida; sin embargo, el resultado es menos satisfactoria en pacientes mayores. Se han reportado resultados alentadores con HCT de donantes no emparentados. Es importante distinguir las formas típicas de SCID (T

B⁻ o T⁻ B⁺) de la CID ya que, la presencia de células T autólogas residuales en pacientes con CID tiene implicaciones importantes, podría causar síntomas asociados con la desregulación inmune y generalmente se necesita quimioterapia para eliminar células T autólogas antes del HCT. Algunas formas de CID se caracterizan por un peor resultado después de HCT, en particular reduce la supervivencia y se presenta una mayor tasa de complicaciones después del HCT (Notarangelo, 2010).

Un diagnóstico específico y temprano reduce el tiempo entre la presentación clínica y el trasplante, limitando las comorbilidades; permite aplicar regímenes de acondicionamiento más adecuados, optimizando la reconstitución inmune. La identificación de un defecto genético subyacente puede ser útil para informar la decisión en cuanto a si un paciente individual debe ser tratado por la HCT, especialmente si el gen se expresa exclusivamente en células hematopoyéticas (Worth, 2013).

Se pronostican mejores resultados cuando el trasplante se realiza en una edad temprana (menores de 1 año), y en el fenotipo T⁻ B⁺ NK⁻ sobre todo en ausencia de infección viral o complicaciones respiratorias, dando como resultado una mejor recuperación, la supervivencia y reconstitución inmunológica (Filipovich, 2008).

Posterior al trasplante se realiza exámenes de biometría hemática y química sanguínea periódicamente, también es importante conocer el inmunofenotipo de los linfocitos y monitorear las respuestas a mitógenos post-trasplante en varios intervalos (De la Morena, 2014).

1.10 Linfoproliferación in vitro

Los estudios de subpoblaciones linfocitarias deben ir acompañados de las pruebas de laboratorio que evalúan si los linfocitos son funcionales. Esto implica la evaluación *in vitro* de la respuesta de LT a mitógenos, como, PHA, la concanavalina A, o anticuerpos como, anti-CD3 solo o en combinación con anti-CD28 o IL2 para determinar la proliferación de LT no específica de antígeno. En general, estos ensayos implican un cultivo de 72 horas en células no estimuladas y estimuladas, los resultados se interpretan mediante un rango de

referencia establecido a través de una muestra de prueba de control emparejado con la muestra del paciente.

Par evaluar la proliferación de células T por citometría de flujo, se utilizan colorantes fluorescentes de seguimiento como el diacetato de carboxifluoresceína éster de succinimidilo (CFSE) que se incorporan en la célula y después de la activación se disminuye en un 50 % la intensidad de fluorescencia para cada ronda de la división celular o nucleósidos fluorescentes análogos como 5-etinil-2'-desoxiuridina que incorporan en el DNA de células proliferantes asociadas con una ganancia de señal.

En estados graves de deficiencia de células T, la respuesta de células T a los estímulos policlonales es típicamente menor de 10 % del límite inferior del valor de referencia. Como se ha señalado anteriormente, existen mutaciones CID, que permiten un cierto grado de respuesta de las células T, aunque los resultados en esta son a menudo significativamente anormales (Es decir, a menudo < 50 % del del valor de referencia).

Usualmente la proliferación inducida por mitógenos que activan directamente las células T tales como el PMA (forbol 12-miristato 13-acetato) más ionomicina es normal, siendo un control positivo del ensayo, pero anormal con agentes que actúan sobre el TCR (Rosenzweig, 2013).

1.10.1 DIACETATO DE CARBOXIFLUORESCEÍNA ÉSTER DE SUCCINIMIDILO (CFSE)

Por lo general, la proliferación de linfocitos puede ser monitoreado por citometría de flujo gracias a CFSE este tiene la capacidad de etiquetar de forma estable las moléculas dentro de las células, con cada división celular que resulta en una reducción a la mitad secuencial de fluorescencia, hasta ocho divisiones antes de que la fluorescencia CFSE se disminuye a la fluorescencia de fondo de las células no marcadas.

Inicialmente, diacetato de carboxifluoresceína succinimidil éster no es fluorescente, debido a la presencia de dos grupos etilo, estos dan la propiedad al compuesto de ser altamente

permeable con la membrana y por lo tanto permiten que el colorante fluya rápidamente a través de la membrana plasmática de las células. Una vez dentro de la célula, los grupos acetato se eliminan rápidamente por esterasas intracelulares para dar el CFSE altamente fluorescente, el cual tiene una permeabilidad reducida de la membrana. Los grupos succinimidilo de CFSE le permite reaccionar a pH neutro con grupos amino para formar un enlace covalente muy estable. Una proporción del carboxifluoresceína resultante (CF) conjugados representan moléculas que son capaces de salir a través de la membrana plasmática o son rápidamente degradada (CFR1). A la inversa, algunos de los conjugados CF (CFR2) son muy estables y permanecen dentro de las células. Son estos conjugados fluorescentes que persisten dentro de las células durante meses, pero serán repartidas entre las células hijas tras la división celular, lo que permite monitorear la proliferación de linfocitos por medio de citometría de flujo.

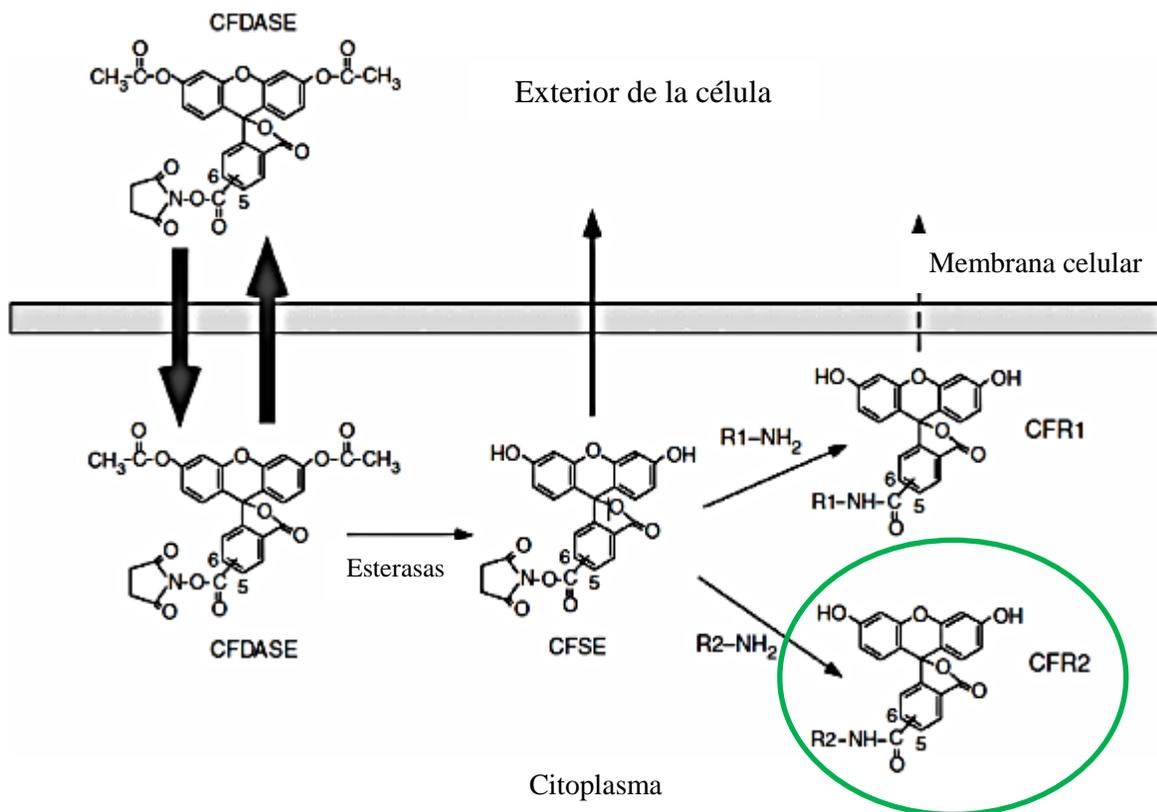


Figura 13. Eventos moleculares que se producen durante el etiquetado de células con CFDASE (Quah, 2007). El diacetato de carboxifluoresceína succinimidil éster no es fluorescente fuera de la célula, esta propiedad la obtiene al perder dos grupos acetato en presencia de esterasas intracelulares.

La autofluorescencia de los linfocitos en proliferación es mayor que el de los linfocitos en reposo y, por tanto, como una población no marcada, proporciona una medición de la autofluorescencia de una población de linfocitos activados. Células no estimuladas marcadas con CFSE proporcionan una medición de fluorescencia de los linfocitos que no se dividen. El uso de estos controles, se puede, por tanto, calcular el número de la división celular de la proliferación, los linfocitos marcados con CFSE (Quah, 2007; Quah, 2010).

Una de las principales ventajas de la técnica de división de CFSE es que las células en división pueden ser identificadas en mezclas complejas por inmunofenotipificación con anticuerpos monoclonal conjugado, además CFSE se reparte por igual entre células hijas con notable fidelidad (Lyons, 1999).

1.11 Citometría de flujo

La citometría de flujo es un método analítico que permite el análisis óptico e individual de diferentes partículas, este permite la medición rápida de ciertas características físicas y químicas de células o partículas suspendidas en líquido que producen una señal de forma individual al interferir con una fuente de luz. Una de las características analíticas más importantes de los citómetros de flujo es su capacidad de medir múltiples parámetros celulares, como el tamaño, forma, complejidad y cualquier componente celular o función que pueda ser marcada con un fluorocromo.

La conjugación de marcadores fluorescentes con anticuerpos monoclonales o policlonales ha hecho posible los estudios de la densidad y la distribución de determinantes y receptores de la superficie y del citoplasma celular, permitiendo identificar subpoblaciones celulares. En comparación con los métodos bioquímicos de análisis celular, en los que se obtiene un resultado promedio para toda la muestra, la citometría de flujo es capaz de proporcionar una información cuantitativa sobre cada célula en particular y permite identificar en una muestra subpoblaciones de células diferentes, incluso cuando están escasamente representadas.

El principio en el que se basa esta tecnología es simple: las partículas (generalmente células) pasan en fila dentro de un flujo a través del aparato con una velocidad de 500-4 000 partículas/segundo, por delante de un haz luminoso. Esta luz se detecta en dos posiciones diferentes, la luz dispersa hacia adelante (en inglés "*forward scattered light*", FSC) y la luz dispersa a un ángulo de 90 grados (en inglés "*side scattered light*", SSC).

Las partículas marcadas con un fluoróforo cuando capta la energía de la luz de la fuente emiten una señal fluorescente de menor energía que el rayo incidente que se detecta también a un ángulo de 90 grados. Esta luz dispersa atraviesa unos filtros ópticos que seleccionan una longitud de onda específica. La luz filtrada llega a los detectores del tipo fotomultiplicadores que detectan y amplifican la señal la cual se transmite al sistema electrónico que se encarga del procesamiento de los datos. Para ello la luz incidente se transforma en pulsos eléctricos y se generan histogramas generalmente biparamétricos, es decir, gráficas en las que se representan dos parámetros (en inglés "*dot plot*" o "*counter plot*"). En estas gráficas, la luz dispersa hacia adelante se relaciona con el tamaño de la partícula y la luz dispersa a un ángulo de 90 grados da una idea de la estructura interna de la partícula proporcionando información sobre la granularidad y morfología celular.

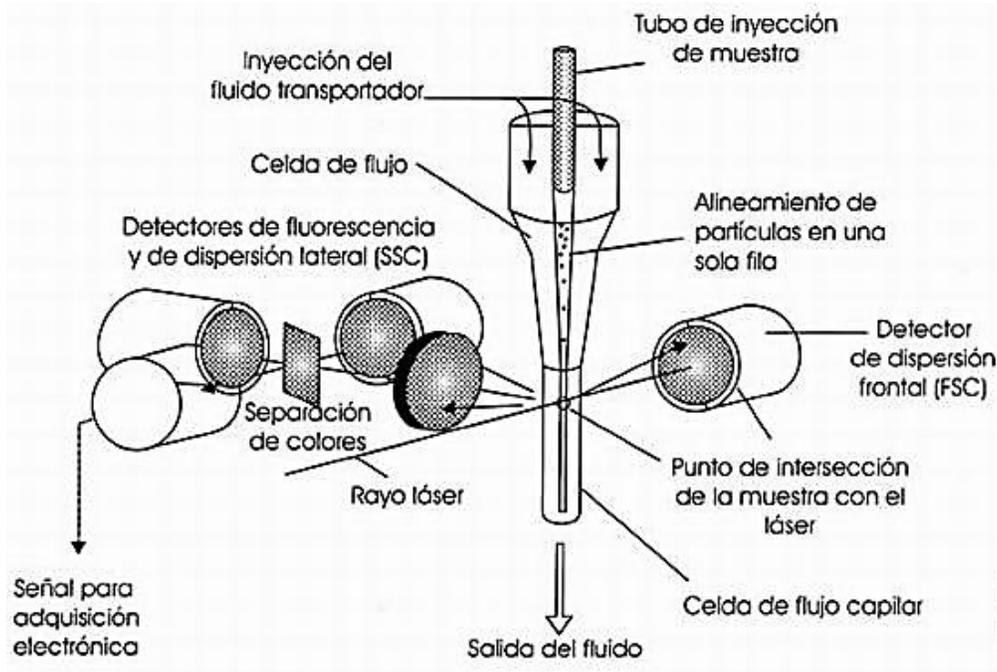


Figura 14. Esquema de las partes del citómetro de flujo (Barrera, 2004).

La citometría de flujo permite medir diferentes parámetros de una célula. Éstos se dividen en:

- Parámetros nucleares
- Parámetros citoplásmicos
- Parámetros de superficie
- Parámetros extracelulares

Las aplicaciones más relevantes de la citometría de flujo en la práctica médica se relacionan con la hematología e inmunología clínicas, midiendo parámetros como número y clasificación de células sanguíneas. Esta técnica es empleada también en el conteo de subpoblaciones de linfocitos en pacientes con el virus de la inmunodeficiencia humana, así como la caracterización de leucemias agudas y síndromes linfoproliferativos crónicos, entre otros padecimientos. Las aplicaciones de la citometría de flujo son numerosas, lo cual ha permitido el empleo de estos instrumentos de manera amplia en los campos, tanto de la investigación biológica como médica (Barrera, 2004; March, 2012).

1.11.1 Aplicaciones en el diagnóstico de inmunodeficiencias

La evaluación del inmunofenotipo en las IDPs proporciona pistas de diagnóstico, así como información útil para clasificar a los pacientes y predecir el resultado clínico. La evaluación de las proteínas intracelulares asociados con algunas IDPs se ha desarrollado como una herramienta útil en el cribado diagnóstico y ayudar a aclarar los posibles sitios de defectos genéticos asociados con IDPs específicas.

La evaluación de subpoblaciones linfocitarias por citometria de flujo abarca recuento absoluto de linfocitos (T, B y células NK), así como los subconjuntos de linfocitos *naive* y de memoria, estos deben ser comparados con valores de referencia, de la misma edad.

Esto es particularmente relevante para cualquier defecto que bloquea el desarrollo de las células T basada en el hecho de que T células constituyen el 60-75 % de los linfocitos circulantes, por lo tanto cualquier trastorno que interfiere con el desarrollo de células T sería espera que resulte en linfocitopenia, como ya se mencionó esta es muy importante en

el diagnóstico diferencial entre SCID y CID, por lo tanto siempre debe realizarse en el abordaje.

Otra aplicación diagnóstico para IDPs es la evaluación de la presencia o ausencia de proteínas específicas que están asociados con estados de inmunodeficiencia. Esta ahora consiste en no sólo la evaluación de proteínas de la superficie celular, sino también de proteínas intracelulares, el análisis de estas últimas requiere la fijación y permeabilización de la célula. Además, este método tiene la misma advertencia como cualquier inmunoensayo en el que la ausencia de la proteína es generalmente de diagnóstico, mientras presencia de la proteína puede estar asociada con la producción de una proteína disfuncional asociada con la enfermedad.

Recientemente, se ha utilizando la citometría de para evaluar las características funcionales que están vinculadas con IDPs, en el caso de SCID se evalúa la respuesta proliferativa a diferentes estímulos, demostrando con esto que las células son o no funcionales.

También ha demostrado ser útil en la evaluación de la recuperación inmunológica y supervisar el estado inmune en pacientes inmunodeficientes pos trasplante.

Sin embargo, con la amplia gama de defectos genéticos subyacentes SCID, la citometría de flujo debe ser visto como un método de laboratorio de detección, que proporciona información en cuanto al potencial defecto subyacente pero el diagnóstico definitivo requiere estudios genéticos (Oliveira, 2008; Fleisher, 2016).

2. JUSTIFICACIÓN

La inmunodeficiencia combinada es comúnmente subdiagnosticada, ya que los pacientes pueden presentar niveles de linfocitos e inmunoglobulinas dentro del rango de referencia lo cual descarta el diagnóstico de inmunodeficiencia, en este estudio se plantea realizar un estudio de linfoproliferación e inmunofenotipificación para orientar el diagnóstico de inmunodeficiencia combinada.

El estudio de linfoproliferación nos servirá para evaluar la función de los LT en pacientes que clínicamente cursan con deficiencia en la respuesta inmune celular en ausencia de linfopenia.

La inmunotipificación por citometría de flujo nos ayuda ya que en pacientes con CID se ha reportado disminución en la población de LT CD4⁺ *naive*, además de orientar el diagnóstico hacia un grupo de inmunodeficiencia combinada, según su fenotipo.

La correlación de la historia clínica con los estudios de laboratorio orientara el diagnóstico de CID.

3. OBJETIVOS

GENERAL

Mediante estudios de linfoproliferación e inmunotipificación, orientar el diagnóstico de CID en pacientes pediátricos con sospecha de inmunodeficiencia.

PARTICULARES

- ❖ Evaluar el funcionamiento de linfocitos T en pacientes pediátricos con sospecha o diagnóstico de inmunodeficiencia combinada.

- ❖ Cuantificar las subpoblaciones linfocitarias para orientar el diagnóstico de inmunodeficiencia combinada.

- ❖ Descripción de las características clínicas de los pacientes con CID y su correlación con los estudios inmunológicos.

4. METODOLOGÍA

4.1 Pacientes

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Pacientes con sospecha de CID, de acuerdo a los criterios de la Sociedad Europea de Inmunodeficiencias (ESID, por sus siglas en inglés *European Society for Immunodeficiencies*):

- a. Al menos una infección grave que requiera hospitalización, entendiéndose por enfermedad grave aquella que pone en riesgo la vida y/o sepsis, que requiere antibióticos de amplio espectro para su resolución. La cual puede ir acompañada de datos de disregulación inmune como formación de granulomas, linfoproliferación, eccema grave, enfermedad inflamatoria intestinal y autoinmunidad.
- b. Cualquier género
- c. Ausencia de linfopenia y/o CD3⁺ mayor o igual a 500 células por microlitro.
- d. Infecciones por oportunistas
- e. Síndrome de Omenn: eritrodermia, infecciones sistémicas, IgE elevada, eosinofilia.
- f. Haber descartado infección por HIV.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Pacientes cuyos padres o tutores no acepten su inclusión al estudio.

Todos los padres o tutores de los participantes firmarán la carta de consentimiento informado.

4.2 REVISIÓN DE CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES

Una vez seleccionados los pacientes se realizó un análisis de su historia clínica, este consistió en recabar los datos clínicos compatibles con CID (Tabla 5). Para lo cual se revisaron las bases de datos MEDSYS (expediente clínico electrónico), WINLAB (Base de datos de laboratorio de rutina) y PACS (Base de datos de estudios de imagen).

Posteriormente se realizaron los estudios de linfoproliferación y subpoblaciones (Tabla 6).

4.3 LINFOPROLIFERACIÓN

Se obtuvieron 6 mL de sangre venosa periférica con heparina como anticoagulante, de esta se extrajeron las células mononucleares por centrifugación (754 x g 30 min) en gradiente de densidad sobre Ficoll-Paque, estas se lavaron 2 veces con PBS 1x estéril a 524 x g 5 min. Se contaron las células con ayuda de azul de tripan y se colocaron 5 millones de células en tubo estéril, se tiñeron con carboxifluoresceína (CSFE) por 10 minutos a 37 °C y se lavaron 2 veces con PBS 1x a 524 x g 5 min. Se preparó la placa de cultivo con un mililitro de medio AIM-V y los siguientes mitógenos: PMA + ionomicina, fitohaglutinina, anti CD28⁺/CD3⁺ y anti-CD3⁺ y un pozo sin estimular. Se agregaron 1 millón de células por pozo y se incubaron durante 5 días a 37 °C y 5 % de CO₂. Las células sobrantes con CSFE se fijaron con paraformaldehído al 1 % para conservarlas hasta su adquisición en FACS Aria.

Al cabo de 5 días de incubación con las condiciones descritas previamente, las células se cosecharon y se tiñeron con un anticuerpo anti CD3-PerCP (BD® clona SK7), se fijaron con Paraformaldehído al 1 % y se realizó la lectura en el citómetro BD FACS Aria™ (San Jose, California, USA) (Figura 16), posteriormente los datos se analizaron con el programa FlowJo (TreeStar®) (Figura 17).

4.4 SUBPOBLACIONES

Se determinaron los números absolutos de células T, B y NK, así como LT *naive* y de memoria.

Se etiquetaron 4 tubos y se agregó el Ac correspondiente:

- **δδ:** BD Simultest™ Control γ2a clona X39 (FITC) /γ1 (PE) clona X40
- **CD19⁺:** BD TriTEST™ CD3 (FITC) clona SK7 /CD19 (PE) clona SJ25C1 /CD45 (PerCP) clona 2D1
- **CD16⁺/56⁺:** BD Tritest™ CD3 (FITC) clona SK7 /CD16+CD56 (PE) clona B73.1/CD45 (PerCP) clona 2D1
- **CD3⁺/4⁺/8⁺:** BD Tritest™ CD4 (FITC) clona SK3 /CD8 (PE) clona SK1 /CD3 (PerCP) clona SK7

Se agregaron 15 μ L de sangre total a cada tubo y se incubaron 30 min a temperatura ambiente y oscuridad, posteriormente se lisaron los eritrocitos y se incubaron 10 min a temperatura ambiente y oscuridad, se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 1 %.

Se realizó la lectura en el citómetro BD FACSAria™, adquiriendo 10 000 eventos totales. El análisis se realizó utilizando el programa FlowJo TreeStar® (Figura 17). La cuenta total de LT, B y NK se calculó en base al número total de leucocitos presentes en la muestra, estos se contaron previamente con ayuda de la solución de Turk.

La presentación clínica de la CID es muy heterogénea, por lo tanto fue necesario analizar a cada paciente de forma individual, en el caso de 2 pacientes la sospecha diagnóstica se orientó hacia una mutación en especial, se realizó la tinción correspondiente dentro de las posibilidades del laboratorio (Ver Apéndice).

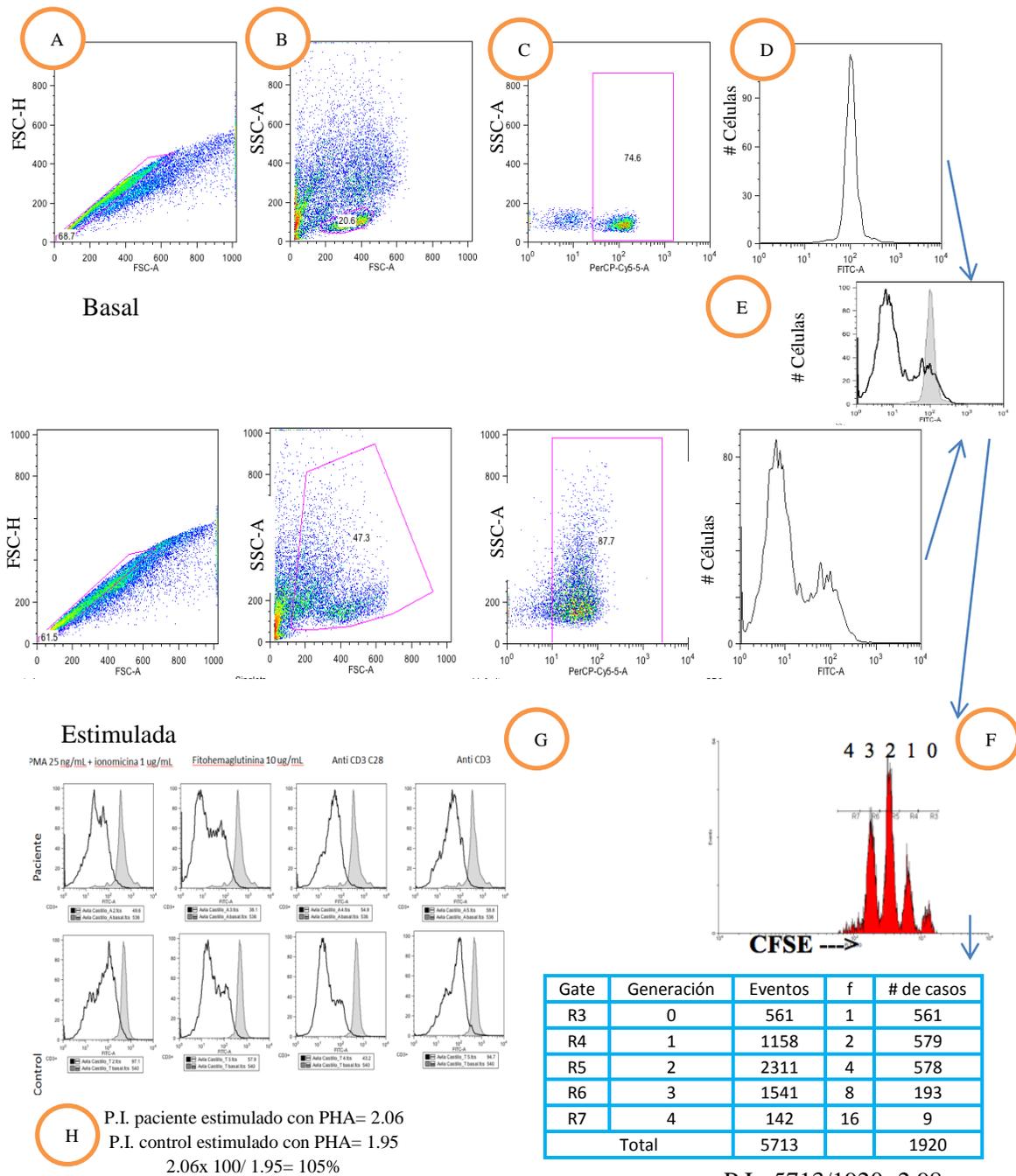


Figura 15. Histogramas de estudio de linfoproliferación. Para analizar la linfoproliferación en el programa FlowJo TreeStar® se aplicó la siguiente estrategia de análisis: A) Se seleccionaron los singlets definidos por tener un área (FSC-A) y un ancho de señal (FSC-W) uniformes. B) Sobre esta población, se identificaron los linfocitos de acuerdo con su tamaño (*forward scattered*) y complejidad interna (*side scattered*). C) Se evaluó la expresión de CD3, considerando la población CD3⁺ como LT. D) Se creó un histograma de la intensidad de fluorescencia de CFSE. E) se compararon la intensidad de fluorescencia en estado basal y posterior al estímulo. F) Se calculó el índice de proliferación. G) Se repitió este análisis con los 4 estímulos en el paciente y un control sano. H) Se comparó el índice de proliferación.

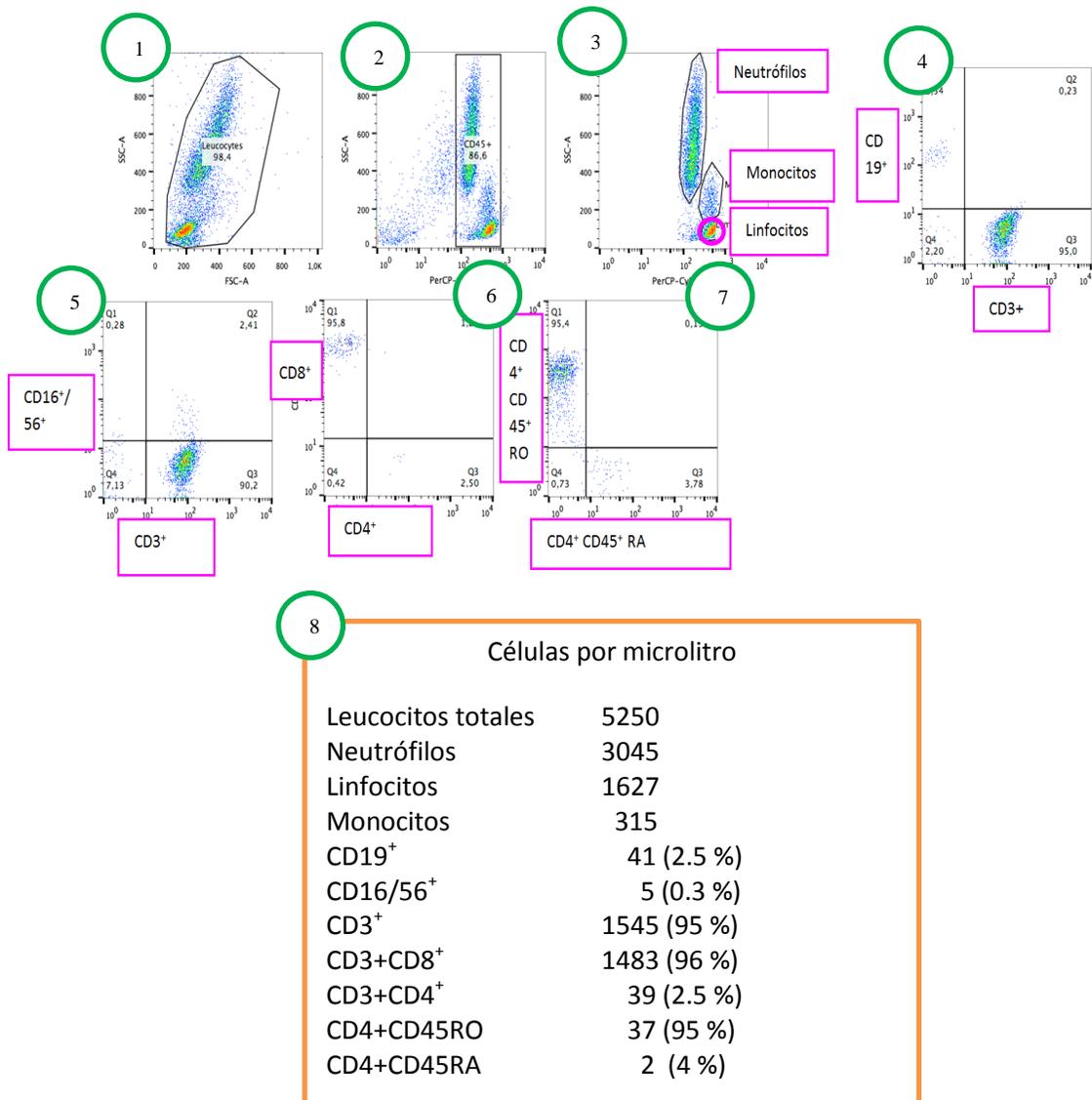


Figura 16. Análisis de subpoblaciones. Este estudio permite determinar las diferentes subpoblaciones linfocitarias, que nos dará el inmunofenotipo. Para analizar las subpoblaciones en el programa FlowJo TreeStar® se aplicó la siguiente estrategia de análisis: 1) Se seleccionaron los leucocitos de acuerdo con su tamaño (*forward scattered*) y complejidad interna (*side scattered*). 2) Se evaluó la expresión de CD45⁺ acoplado a PerCP. 3) Basándose en la morfología selecciona los diferentes tipos de leucocitos y se eligieron los linfocitos. 4) Se evaluó la expresión de linfocitos B CD19⁺. 5) Se evaluó la expresión de linfocitos NK⁺ CD16⁺/CD56⁺. 6) Se evaluó la expresión la cantidad de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺. 7) Se evaluó la expresión de de linfocitos CD4⁺ CD45⁺ RO y CD4⁺ CD45⁺ RA. 8) Se calculó el número de linfocitos por subpoblación en base a la cuenta total de leucocitos.

5. RESULTADOS

Tabla 5. Características clínicas de los pacientes estudiados

Paciente	Edad	Sexo	Consanguinidad	Exploración física	Infecciones	Aislamientos	Otras características
1	8 meses	M	Negativa	Ictericia neonatal.	Sepsis secundaria a infección por <i>S. Epidermidis</i> . Insuficiencia respiratoria tipo II secundaria a neumonía intrahospitalaria y sepsis por <i>klebsiella Pneumoniae</i> .	<i>K. pneumoniae candida</i> .	Dificultad respiratoria, broncodisplasia pulmonar, hipoglicemias, desnutrición severa, antecedente de ERGE y AMD, Gastrostomía y funduplicatura tipo Nissen, paro cardio respiratorio, fiebre, hipertensión arterial sistémica, traqueoendobronquitis moderada, discinecia traqueobronquial, TRECS en dos determinaciones menores de 5.
2	3 meses	M	Negativa	Broncoespasmo, microcefalia.	Neumonía por <i>Pseudomonas</i> , <i>Periestomatitis</i> por <i>Klebsiella</i> y probable meningitis <i>Estenotropomona maltofila</i> , en aspirado bronquial, Shock séptico que requirió aminas.	<i>Pseudomona auruginosa</i> Hemocultivo: <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Fiebre, Gastrostomía y funduplicatura tipo Nissen, Crisis convulsiva, Endocarditis infecciosa, Coagulación intravascular diseminada, Displasia broncopulmonar, infartos cerebrales múltiples, hipertensión arterial pulmonar, periestomatitis, leucocitosis, neutrofilia, plaquetopenia, epilepsia parcial compleja, Neuroinfección, colestasis, insuficiencia respiratoria, hemorragia pulmonar, periestomatitis USG de timo: con reporte de diámetro de 1/3 de parte del tamaño correspondiente para su edad, TRECS indetectables.
3	8 meses	M	Negativa	Dismorfias faciales, malformaciones en extremidades, rizomelia de las 4 extremidades, con sindáctila en pies así como acortamiento de 5° dedo de ambas manos, hipoplasia de falanges tanto de manos como pies, amígdalas pequeñas, con adenomegalias.	Gastroenteritis aguda, infección de vías aéreas superiores.	<i>S. Aureus</i> : en secreción. <i>S. hominis</i> Hemocultivo con crecimiento para un bacilo Gram (-) Bacteremia por <i>B. cepacia (E. coli)</i> .	Leucopenia persistente, Hipocalcemia, Hiperbilirrubinemia, dermatosis localizada, molusco contagioso, diarrea crónica intermitente por malabsorción, desnutrición crónica, gastroenteritis, alergia a la proteína de la leche de vaca, fiebre, vómito, braquidactilia tipo 3ª diplasia espinilo epifisaria multiple, laringotraqueitis, síndrome coqueluchoide.
4	1 año	M	Negativa	Pupilas con tendencia a la miosis.	Conjuntivitis y meningitis bacteriana, neuroinfección con aracnoiditis basal, neumonía viral por VSR, evento Isquémico de arteria Cerebral Medio Dorsal, Pbe meningitis Tuberculosa, dermatitis del pañal.	VSR	Leucocitosis, fiebre, neuropatía craneal: parálisis central VII par craneal derecho, síndrome encefálico, crisis convulsivas febriles, hemiparesia corporal derecha.

Paciente	Edad	Sexo	Consanguinidad	Exploración física	Infecciones	Aislamientos	Otras características
5	1 año	M	Negativa	Acrocianosis	Neumonía nosocomial, Sepsis de foco pulmonar sepsis por <i>blastocoidias</i>	<i>Candida</i> oral, urocultivo: <i>E. coli</i> , coprocultivo: <i>Morgagnella morgani</i> Hemocultivo: <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>E. faecalia</i> , <i>Elizabethkingia Meningoseptica.</i> , En catéter <i>Blastocoidias</i> . Aspirado bronquial: <i>Burkordelia cepacia</i> .	Hipertensión arterial, tos, taquicardia, vómitos, apnea, paro respiratorio, plaquetopenia, fiebre.
6	1 mes	M	Negativa	Cianosis peribucal, soplo sistólico en foco pulmonar, dismorfias menores, dermatosis, hepatomegalia.	Herpes simple	hemocultivo de cocos Gram (+)	Cardiopatía congénita acinógena (Fístula sistémico pulmonar izquierda), febrícula, aplasia de Timo, paro cardiorespiratorio.
7	3 meses	M	Negativa	Acrocianosis mucotegumentaria peristalsis disminuida, extremidades con acrocianosis, lesiones equimóticas, hepatomegalia.	Neumonía, infección fúngica, sepsis por <i>Cándida spp.</i> Choque séptico por BGN. Proceso séptico activo de foco pulmonar, sepsis nosocomial por <i>E. Coli</i> .	<i>Candida</i> . Hemocultivo positivo para: <i>Stenotrophomona maltophilia</i> , <i>Acitenobacter lloffi</i> . Aislamiento de <i>pseudomona aeruginosa</i> en bronco aspirado.	Choque cardiogénico, cardiopatía compleja, desnutrición, apnea, bradicardia, insuficiencia renal aguda, falla orgánica múltiple, coagulación intravascular diseminada, lesiones necróticas fasciocorporales multiples y orolingual. Trombocitopenia, Fístula abomino cutánea y leucopenia. RX o USG sin timo.
8	4 meses	M	Negativa	Dermatitis y ganglios no palpables.	Sepsis por <i>pseudomonas</i> .	<i>Pseudomonas</i> , CMV, Herpes Urocultivo: <i>E. coli</i> .	Cardiopatía congénita, distensión abdominal y ERGE.
9	2 años 6 meses	M	Si, primos segundos.	Hepatoesplenomegalia Aumento en el volumen de tobillos, rodillas muñecas y manos, xerodermia.	Infecciones de vías respiratorias.	<i>Salmonella</i> , <i>S. Aureus</i> Tuberculosis	Fiebre, diarrea y pancitopenia.
10	15 Año(s) 9 Mes(es)	M	Si, primos segundos.	Verrugas en pies y manos.			Neumonía, crisis convulsiva y otitis

Paciente	Edad	Sexo	Consanguinidad	Exploración física	Infecciones	Aislamientos	Otras características
11	6 meses	F	Negativa	Hepatomegalia y furunculosis de cuero cabelludo.	Sepsis por Pseudomonas/uros epsis por candida/panoftalmitis.	Coprocutliuvo: <i>Pseudomonas SP.</i> Hemocultivo con desarrollo de Candida Albicans.	Diarreico y febril, panoftalmitis con desprendimiento de retina, perforación ocular ameritando evisceración de ojo derecho, perforación intestinal, resección intestinal e ileostomía, abscesos y lesiones cutáneas, desnutrición, Retraso en neurodesarrollo y soplo sistólico.
12	15 años	M	Negativa	Hipertrofia, amígdalas grado II no exudativas, abdomen con esplenomegalia, Membrana timpánica izquierda perforada, campos pulmonares con estertores gruesos transmitidos, dedos en palillo de tambor piel con xerosis generalizada.	Infecciones sinopulmonares de repetición, neumonía viral.	<i>Stafilococcus aureus</i> , H pylori.	Síndrome de supuración pulmonar, neumonías complicada, bronquiolitis, tórax patrón en vidrio despulido bilateral, con datos de fibrosis, atelectasias de lóbulo inferior izquierdo, broquiectasias, otitis media crónica supurativa bilateral, mastoides escleróticas, sinusitis crónica, sangrado de tubo digestivo, pangastropatía erosiva severa, bulbo duodenitis nodular, hiato de Hill I, fiebre, diarrea, desnutrición, Deficiencia de anticuerpos específica a antígenos polisacáridos de neumococo post vacuna por lo que inicia gammaglobulina mensual sustitutiva.
13	1 año 5 meses	F	Si, Primos hermanos	Aumento de volumen a nivel inguinal derecho y Broncoespasmo.	De vías respiratorias	No	Rinorrea, tos, vómito, diaforesis, neumonía, reflujo gastroesofágico y fiebre.
14	13 años	M	Negativa	Líneas Denni Morgan y campos pulmonares con estertores gruesos.	Infección de vía aérea. Encefalitis por VHS 6	No	Epidermodisplasia verruciforme, granuloma anular, prurito nasal, otitis, rinitis alérgica, dermatitis atópica, hiperreactividad de la vía aérea, verrugas vulgares, pilomatrixomas, dermatitis seborreica y fiebre. Neuritis óptica y encefalitis por VHS 6.
15	11 meses	F	Negativa	Presencia decrecimiento amigdalino, abundante secreción mucosa, hernia inguinal derecha.	Neumonía viral y bacteriana.	VSR, Candidiasis, IVU, urocultivo con <i>E. Coli</i> multiresistente, VSR.	Pielonefritis derecha, reflujo vesicoureteral grado III bilateral y otitis media no supurada.
16	9 meses	F	Negativa	Palidez generalizada, dermatitis localizada en el tórax anterior.	Choque séptico.	Coprocutliuvo: rotavirus positivo, Dengue.	Diarrea, deshidratación, mala perfusión, choque hipovolémico y gastroenteritis.

Tabla 6. Resultados de laboratorio.

Paciente	Subpoblaciones								Fenotipo	Linfoproliferación %				Ig	
	Linfcitos	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD19 ⁻	CD16 ⁺ /56 ⁺	CD4 ⁺ RA	CD4 ⁺ RO		PMA	PHA	Anti-CD3/ Anti-CD28	Anti-CD3		
1	2100	1460	720	640	160	220			T ⁻ B ⁻ NK ⁺	110	127	102	100	Normales	
2	1864	1558	993	549	95	165			T ⁻ B ⁻ NK ⁺	129	145	142	106	Normales	
3	1600	767	445	292	137	126			T ⁻ B ⁻ NK ⁺	81	49	60	67	IgM 30.4, baja	
4	3370	1186	550	558	1428	212	397	105	T ⁺ B ⁺ NK ⁺	130	95	110	114	Normales	
5	854	284	74	196	114	302	11	52	T ⁻ B ⁻ NK ⁺					IgA 3.1 baja, IgG 235 baja.	
6	2204	1278	824	435	286	419			T ⁻ B ⁺ NK ⁺	67	79	76	79		
7	1178	624	443	170	183	177			T ⁻ B ⁺ NK ⁺	122	105	116	119	IgG 128 baja, IgM 9.59 baja.	
8	2805	1978	1266	554	561	112			T-B ⁺ NK ⁻	64	131	170	171	IgM 24.38, bajo, IgG 165.7 bajo.	
9	1744	942	575	324	620	145	405	98	T ⁻ B ⁺ NK ⁺	97	140	114	113		
10	1122	595	101	428	146	396	11	86	T ⁻ B ⁺ NK ⁺	177	102	122	120		
11	14118	8047	5311	2092	3388	1835	3452	956	T ⁺ B ⁺ NK ⁺	81	92	113	147	IgE 403.18, alta IgG 1687.5, alta IgM 245.7 alta.	
12	818	589	230	318	65	82	16	202	T ⁻ B ⁻ NK ⁺	CD4	81	59	85	83	IgG: 2520, alta IgA: 44.2, baja.
										CD8	130	81	94	95	
13	1620	211	160	21	1134	82	8	144	T ⁻ B ⁺ NK ⁻	73	57	80	68	IgE baja.	
14	1627	1545	39	1483	41	5	2	37	T ⁻ B ⁻ NK ⁻	166	65	70	53	Inmunoglobulinas en límite bajo.	
15	4252	2636	1819	738	595	729	1310	382	T ⁺ B ⁺ NK ⁺	111	132	132	111	IgE 40, alta.	
16	1726	794	691	32	552	345	345	187	T ⁻ B ⁻ NK ⁺	CD4	114	78	100	100	IgE 51.9 Alta.
										CD8	75	99	105	107	

6. ANÁLISIS DE RESULTADOS

6.1 Historias clínicas

Se analizaron 16 pacientes, 4 (25 %) del genero femenino y el resto (75 %) masculino. El rango de edad va de 1 mes hasta 15 años todos con sospecha clínica de CID, solo 3 de ellos tienen padres consanguíneos, en los tres casos se trata de primos segundos.

En los 16 pacientes se aislaron 22 tipos de agentes infectantes, siendo el 23 % virus, el 9 % hongos y el 68 % bacterias, de estas el 33 % fueron Gram (+) y 67 % Gram (-).

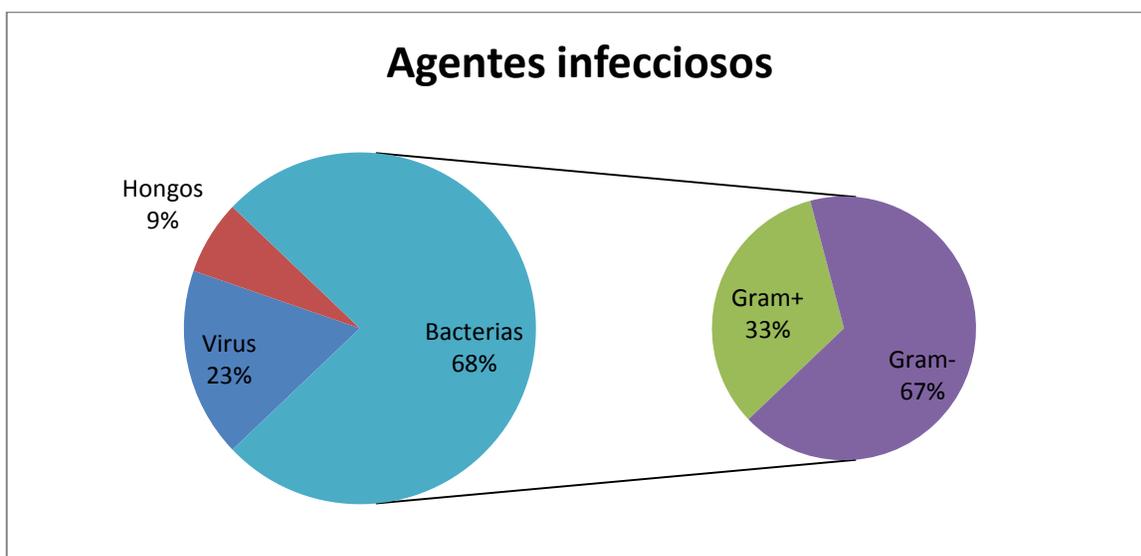


Figura 17. Agentes infecciosos.

Se observa mayor incidencia en las infecciones bacterianas Gram -.

De estas las más frecuentes fueron: *Candida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, y *S.aureus*

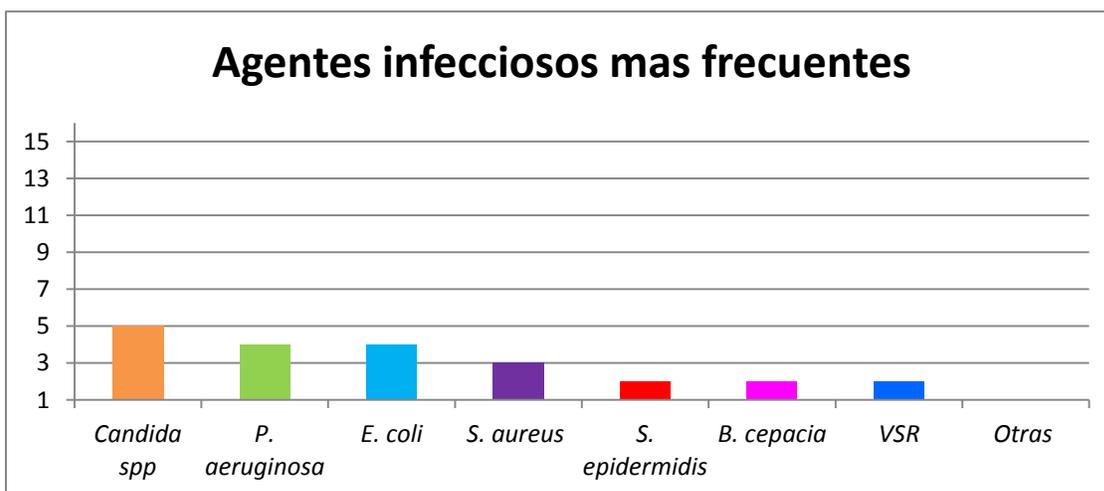


Figura 18. Frecuencia de agentes infecciosos. *Candida spp*. Se presento en 5 de los 16 niños.

Esta información se obtuvo de WINLAB (Base de datos de laboratorio de rutina), del INP.

6.2 Linfoproliferación

La ESID realiza reuniones anuales, en 2012 se realizó en Florencia y se presentó una tabla en la cual se describe la disminución de la respuesta inmune celular con distintos mitógenos dependiendo la mutación que causa la CID, sin embargo esto no está publicado en ningún artículo.

Tabla 7. Reporte de la disminución de la respuesta inmune a mitógenos

Mutación	Mitogeno	PMA+ ionomicina	PHA	Anti-CD3 ⁺
CD3 γ		+	↓↓	↓↓
TCR α		ND	↓↓	↓↓
LCK		+	↓↓	↓↓
ZAP70		+	↓↓	↓↓
ITK		ND	Normal	↓
ORAI1		+	↓	↓↓
STIM1		+	↓	↓↓
MAGT1		+	ND	↓
MST1/STK4		+	↓	↓
DOCK8		ND	ND	↓

En el presente estudio se realizó la linfoproliferación *in vitro* con 4 estímulos ya que cada uno activa diferentes vías y estas se ven afectadas de forma diferente dependiendo la mutación que cause la CID.

6.2.1 PMA con ionomicina.

El mitógeno forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) es un potente agente policlonal, conocido para inducir la señalización y la subsiguiente la producción de citocinas. PMA es análogo de diacilglicerol, mediador de la vía de señalización intracelular PKC, su activación con PMA puede activar cinasas efectoras de MAPK, como ERK1/2.

La Ionomicina estimula la liberación de Ca²⁺ este induce la activación de calcineurina y estimula la transcripción de los genes. PMA, en conjunción con ionomicina, actúa preferentemente sobre el crecimiento y la proliferación de células del sistema inmune y estimulan la producción intracelular de las citocinas IL2 e IL4 (Crawford, 2014).

6.2.2 Fitohemaglutinina (PHA)

La fitohemaglutinina (PHA) se obtiene a partir de diferentes variedades de frijol pertenecientes a la especie *Phaseolus vulgaris*, es una proteína que presenta una potente actividad mitogénica, estimula la actividad metabólica, la división celular, también es capaz de aglutinar distintos tipos de células, tales como eritrocitos y leucocitos. Esta comprende 5 glicoproteínas tetraméricas, isolectinas formadas por 2 polipéptidos (L=leucocito y E=eritrocito) en combinaciones L4, L3E1, L2E2, L1E3, E4. Las subunidades tipo E, son responsables de la eritroaglutinación, pero muestran poca actividad mitogénica o ninguna. Las subunidades L confieren propiedades leucoaglutinantes a la proteína nativa y tienen la máxima actividad estimulante de la mitosis. La isolectina L4 tiene una actividad mitogénica y leucoaglutinante potente, mientras que las isolectinas, L3E2 y LE3, presentan actividad leucoaglutinante y eritroaglutinante proporcionales a las cantidades de subunidades E y L (Ruiz, 2005; Hernández, 1999).

La subunidad L tiene una alta afinidad por los receptores de la superficie de linfocitos pero poco para eritrocitos y es responsable de las propiedades mitogénicas de las isolectinas. La Fitohemaglutinina tiene el potencial para inducir contactos más estrechos entre las membranas de las células adyacentes; se trata de un acetilgalactosamina/galactosa lectina N-azúcar específica con una amplia variedad de actividades biológicas (Movafagh, 2011).

La PHA es un mitógeno que promueve la activación de las células linfoides por medio de la estimulación, entre otros, de la maquinaria de transducción de señales del receptor de células T TCR provocando a su vez la proliferación policlonal de los linfocitos. La inespecificidad de los mitógenos policlonales reside en que generan activación de más de una vía de transducción de señales, a partir de su interacción con más de una molécula implicada en dicho proceso (Canda, 2007).

Como ya se mencionó Roifman y colaboradores, en 2012, publicaron que la proliferación *in vitro* de las células T en respuesta a PHA se reduce casi universalmente en pacientes con SCID, sin embargo en CID eran variable y se estimó que la respuesta a este mitógeno en

pacientes con CID es menor a 50 %, aun que algunas mutaciones causantes de CID como la deficiencia de MHC-II la respuesta fue normal.

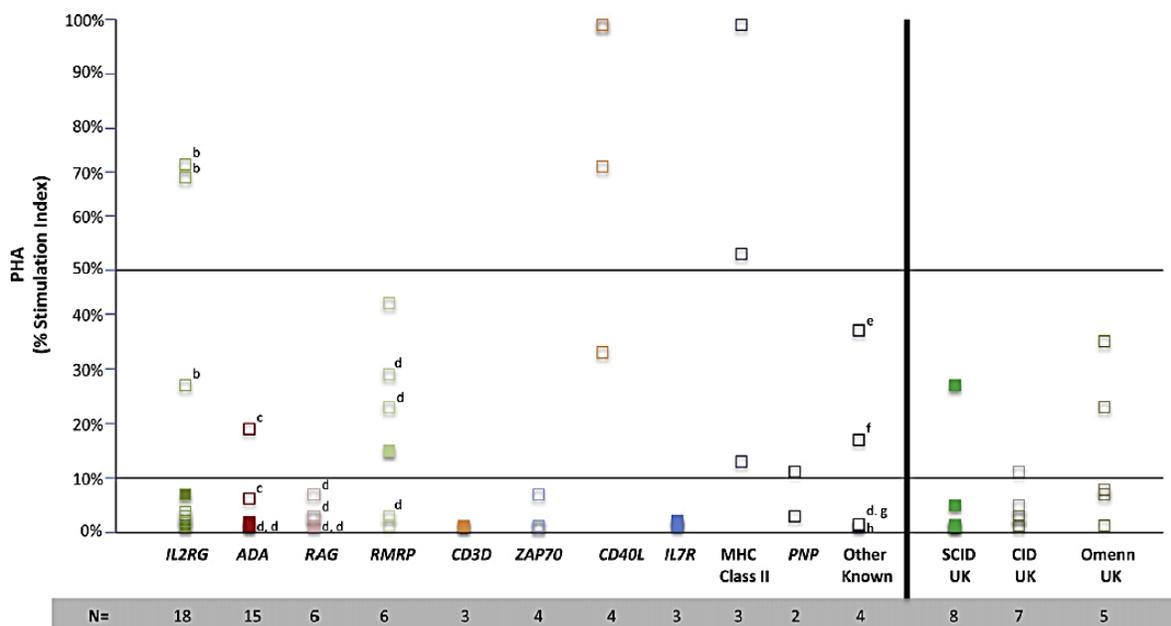


Figura 19. Grafica de la respuesta a PHA en donde se muestra el corte de respuesta menor a 50 % en la mayoría de los casos de CID (Roifman, 2012).

6.2.3 Anti-CD3⁺

El anticuerpo monoclonal OKT3 reacciona con un epítipo en la subunidad ϵ dentro del complejo CD3 humano. Las cadenas de subunidades CD3, γ , δ y ϵ son necesarios para el montaje correcto y la expresión en la superficie del complejo TCR. La reticulación de TCR inicia una vía bioquímica intracelular que resulta en la activación y la proliferación celular.

6.2.4 Anti-CD28⁺

La moléculas coestimuladoras CD28 es un homodimero de de 44 kDa, miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig), su expresión aumenta en presencia de productos microbianos (endotoxinas) y citocinas como el Interferón gamma (IFN γ), todo esto para que la respuesta de los linfocitos se inicie en el lugar y el momento oportuno.

Se han demostrado que CD28 es la principal molécula coestimuladora expresada en linfocitos vírgenes, ya que las señales mediadas por esta, aumentan la síntesis de citocinas, especialmente del factor de crecimiento autocrino IL2.

Esta elevación puede ser consecuencia de la activación de mecanismos inductores de la transcripción y la estabilización del RNA mensajero de IL2.

La interacción CD28-B7 induce la fosforilación de las tirosinas de su dominio intracitoplasmático, permitiendo así el reclutamiento y la activación de las GTPasas de pequeño tamaño Rac y CDC42, las cuales activan la cinasa activada por p21 (PAK), que a su vez activa la cascada de las MAP cinasas, y causa una posterior síntesis de IL2. Otra molécula con funciones coestimuladoras es la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), la cual se encuentra asociada al dominio intracitoplasmático de CD28 y se relaciona con la serina/treoninacinasa Akt (también conocida como proteína cinasa B o PKB) (Fernández, 2006).

6.2.5 Anti -CD3⁺/CD28⁺

Cuando Anti-CD3 entrega una señal proliferativa fuerte a través del complejo receptor de células T (señal 1), pero en ausencia de señales coestimuladoras adicionales (señal 2), la resultante la proliferación suele ir seguida de células T prematura apoptosis o anergia. Por la inmovilización de anti-CD3 y anti-CD28 para entregar simultáneamente la señal 1 y un co-estimuladora la señal 2, la proliferación se puede aumentar sin provocando la muerte celular temprana. En consecuencia, al tener ambos estímulos se obtiene la proliferación de linfocitos (Li, 2010).

Notarangelo (2010) reporta la alteración en la linfoproliferación *in vitro* al ser estimulados con Anti-CD3⁺ y Anti-CD3⁺/CD28⁺ en inmunodeficiencias combinadas.

Al estimular con estos mitógenos se busca orientar el diagnóstico hacia CID así como la mutación que la causa basándonos en la respuesta inmune celular desencadenada tras en estímulo. De los 16 pacientes analizados 4 no proliferaron con PHA, 2 de estos tampoco con Anti-CD3⁺, todos proliferaron con Anti-CD3⁺/CD28⁺. Al correlacionar con las subpoblaciones e historia clínica se oriento el diagnóstico hacia CID en los 4 casos.

Para orientar la sospecha diagnóstica se clasificaron dependiendo sus resultados de laboratorio (Figura 21) y se analizaron individualmente correlacionando sus historia clínica y evolución, apoyándonos en el algoritmo diagnóstico (Figura 11 y12).

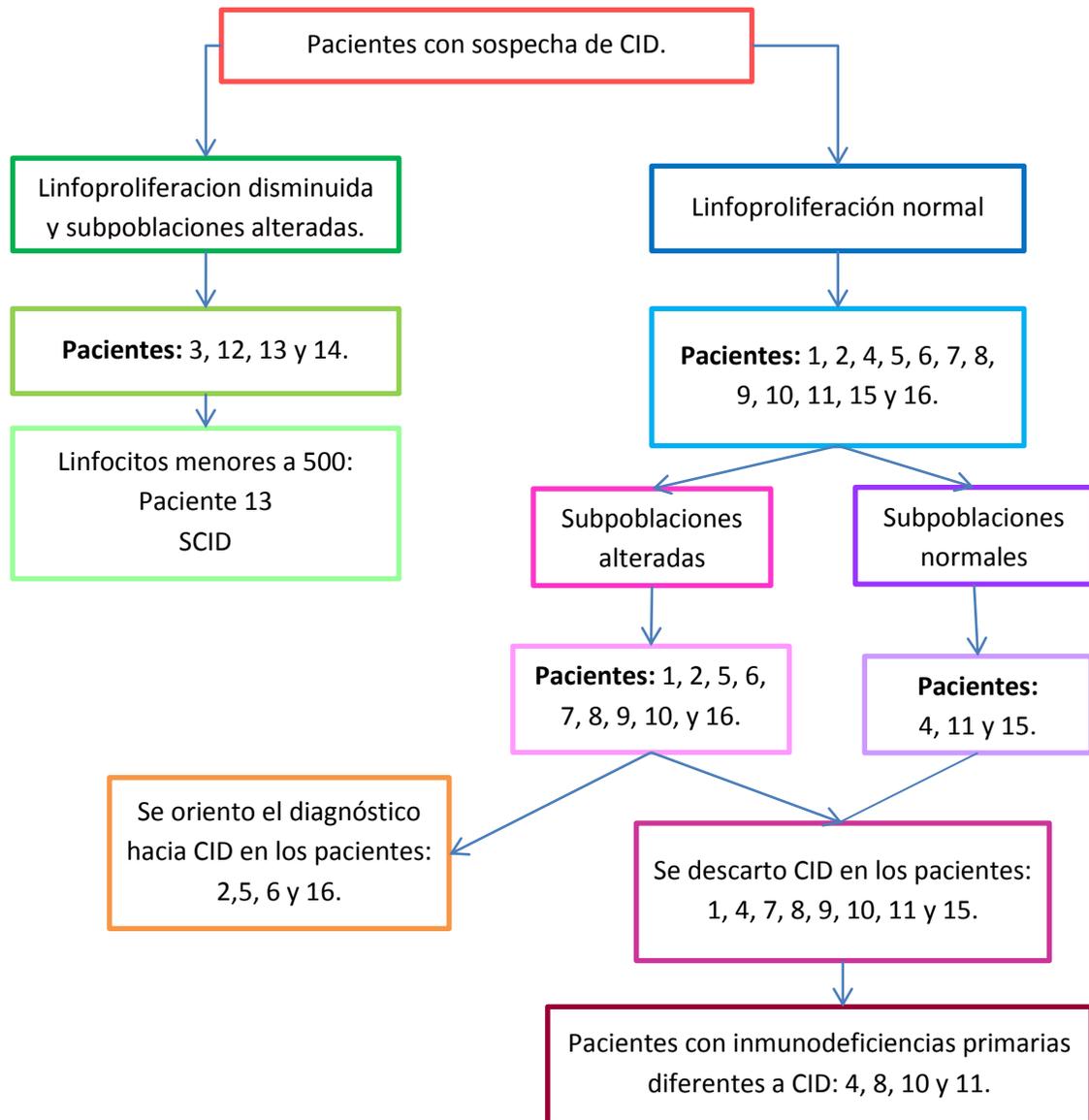


Figura 20. Diagrama de la organización del análisis según datos de laboratorio.

6.3 Correlación de historias clínicas con datos de laboratorio

6.3.1 Pacientes con linfoproliferación y subpoblaciones alteradas

Paciente número 13, femenino de año y medio, sus padres son primos hermanos y habitan en una comunidad endogámica, quien presenta infecciones recurrentes desde los 3 meses de edad. Su inmunofenotipo es $T^- B^+ NK^-$ y presenta IgE baja. La linfoproliferación se encuentra disminuida con los estímulos PHA (57 %) y Anti- $CD3^+$ (68 %).

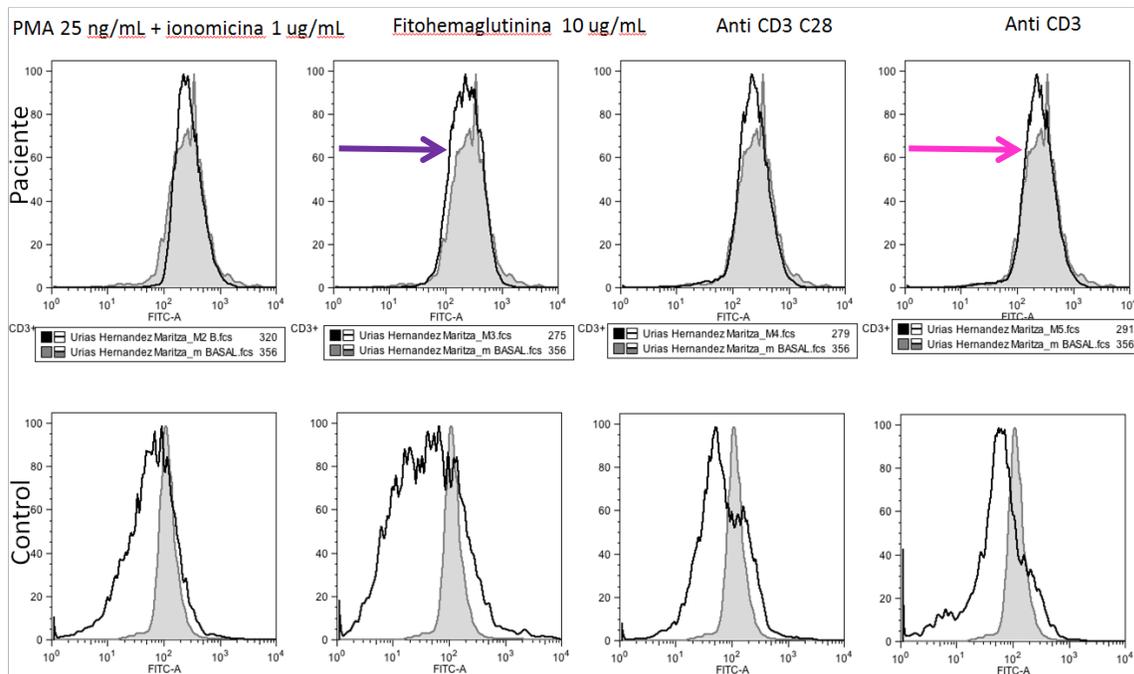


Figura 21. Histograma del estudio de linfoproliferación. En gris sólido se observa la muestra sin estimular y en línea negra la respuesta a los estímulos. Se observa disminución con PHA (flecha morada) y con Anti- $CD3^+$ (flecha rosa).

Los LT del paciente fueron 211 células/ μ L, por lo tanto se trata de SCID $T^- B^+ NK^-$, se incluyó en el protocolo dado que se referían 900 linfocitos/ μ L en biometría realizada en el Hospital Infantil de Chihuahua.

El paciente número 3 masculino de 8 meses producto de la segunda gesta, prematuro de 32 semanas, con antecedentes familiares de un hermano mayor que fallece a los 4 meses por neumonía y choque cardiogénico. Este paciente presenta dismorfias óseas (Figuras 23, 24 y 25), ganglios linfáticos y amígdalas hipoplásicas, infecciones de repetición, linfopenia y disminución de $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ y $CD19^+$, así como baja concentración de IgM.

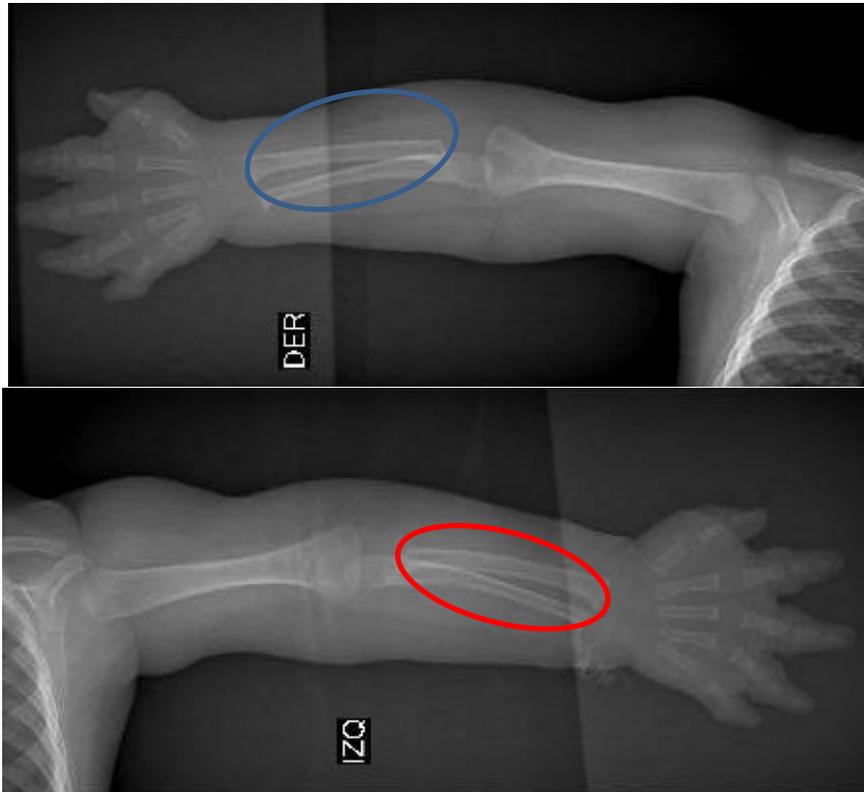


Figura 22. Radiografía que muestra hipoplasia radio bilateral (en azul). Mano zamba cubital bilateral (rojo). Ausencia de la falange media de los dedos en ambas manos.

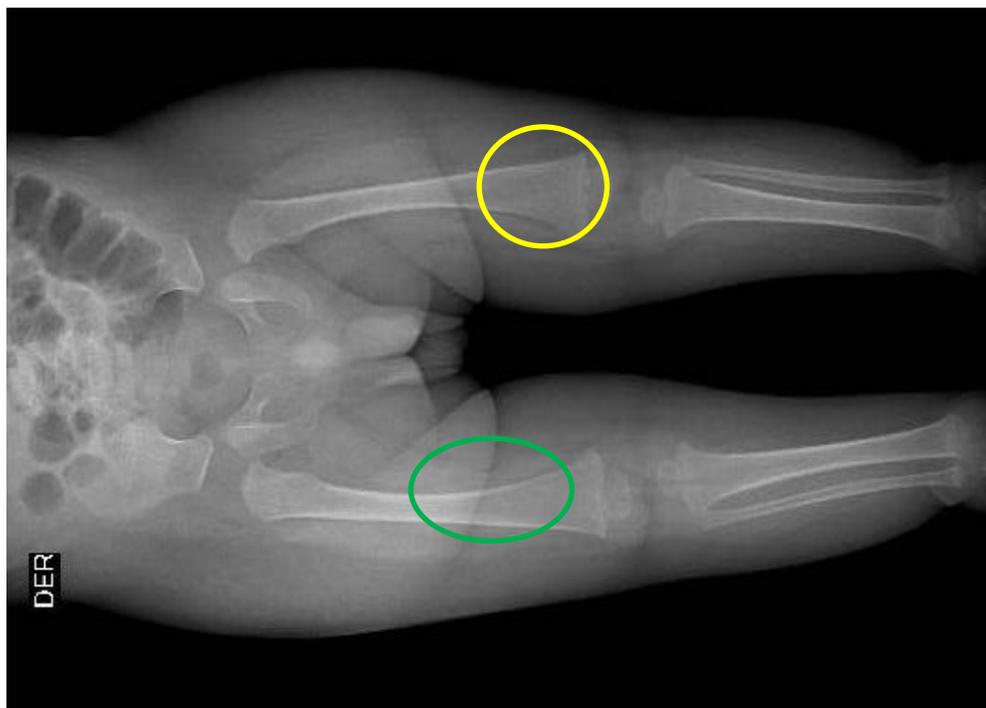


Figura 23. Radiografía donde se observa Metástasis ensanchada (verde), Epifisis de femúr hipoplasica bilatera (amarillo).



Imagen 24. Radiografía donde se observa Sindactilia.

El estudio de linfoproliferación mostró disminución en la respuesta, pero no ausente a PHA.

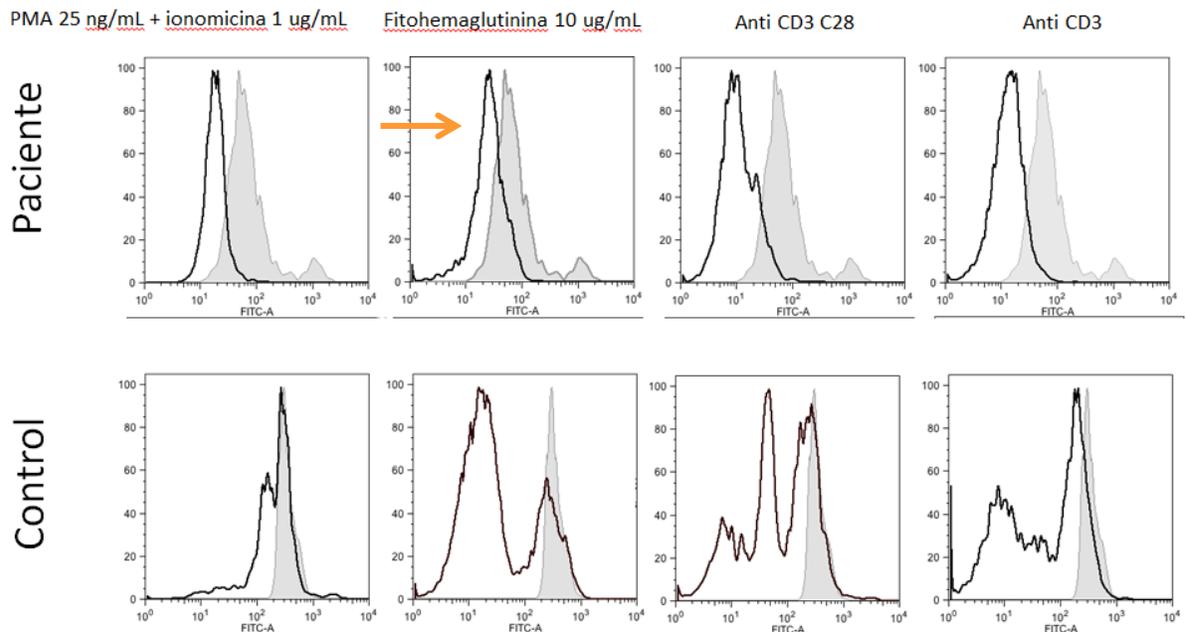


Figura 25. Histograma del estudio de linfoproliferación. En gris solido se observa la muestra sin estimular y en línea negra la respuesta a los estímulos. Se observa disminución de PHA (Flecha naranja).

Con la información recabada se tiene la sospecha diagnóstica de Displasia inmuno-ósea Schimke (SIOD) este es un trastorno multisistémico autosómico recesivo causada por mutaciones bialélicas en SMARCAL1, esta codifica una proteína homóloga a la sacarosa no fermentadora tipo 2, proteínas de remodelación de cromatina; funciona como una helicasa de recocido de DNA (Kshamta, 2009).

Los hallazgos típicos de SIOD son displasia espondiloepifisiaria con crecimiento desproporcionado y facies típica, síndrome nefrótico con glomeruloesclerosis focal y segmentaria (GSF) e insuficiencia renal progresiva, linfopenia recurrente, inmunodeficiencia de células T, y presencia de nevus. Otras características incluyen el hipotiroidismo, isquemia cerebral episódica y falla de médula ósea. El fenotipo SIOD puede variar de una variante severa con aparición en el útero a una forma más leve con inicio más tardío (Santangelo, 2014).

Los hallazgos radiográficos, que aparecen con frecuencia dependen de la edad, comúnmente incluyen vértebras aplanadas (platispondilia) y epífisis femorales displásicas. La inmunodeficiencia y la función tímica en pacientes SIOD no se entienden claramente, pero se ha encontrado disminución en los TRECs e inmunodeficiencia de células T, que surgen de la pérdida de la función de la enzima SMARCAL1 que resulta en defectos en la proliferación celular (Lev, 2009).

Se sugiere realizar diagnóstico diferencial con deficiencia de PGM3.

Paciente número 12 masculino de 14 años con deficiencia de anticuerpos específica a antígenos polisacáridos de neumococo post vacuna, infecciones recurrentes y esplenomegalia, se realizó la tinción de CD4⁺ y CD8⁺ por separado y se observó disminución de la respuesta a PHA en los linfocitos CD4⁺ y en las subpoblaciones identifico el inmunofenotipo T^BNK⁺.

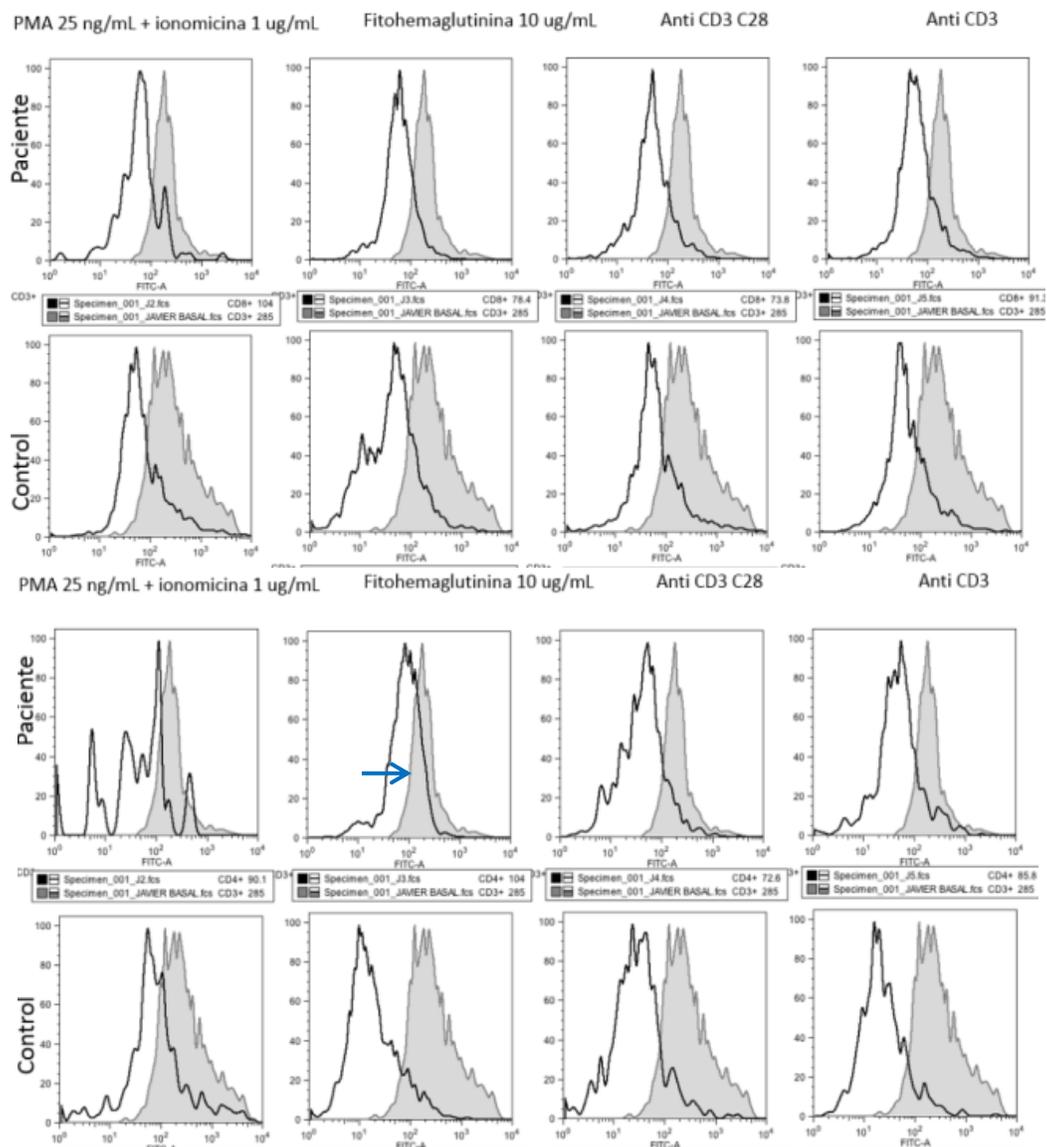


Figura 26. Histograma del estudio de linfoproliferación. En gris sólido se observa la muestra sin estimular y en línea negra tras 5 días con el estímulo. Arriba los linfocitos CD3⁺CD8⁺ y abajo los linfocitos CD3⁺CD4⁺, estos últimos se encuentran disminuidos tras ser estimulados con PHA (flecha azul).

Paciente número 14 masculino de 13 años, quien desde los 7 años de edad presenta infecciones de repetición, presenta dermatosis por verrugas y se aisló VPH de estas, tras sospecha de ID se le administra gamaglobulina IV y se ve mejoría. Al realizarle las subpoblaciones se encontró la relación CD4⁺/CD8⁺ invertida.

En la linfoproliferación se observó, disminución en la respuesta a PHA (65 %) y Anti-CD3 (53 %).

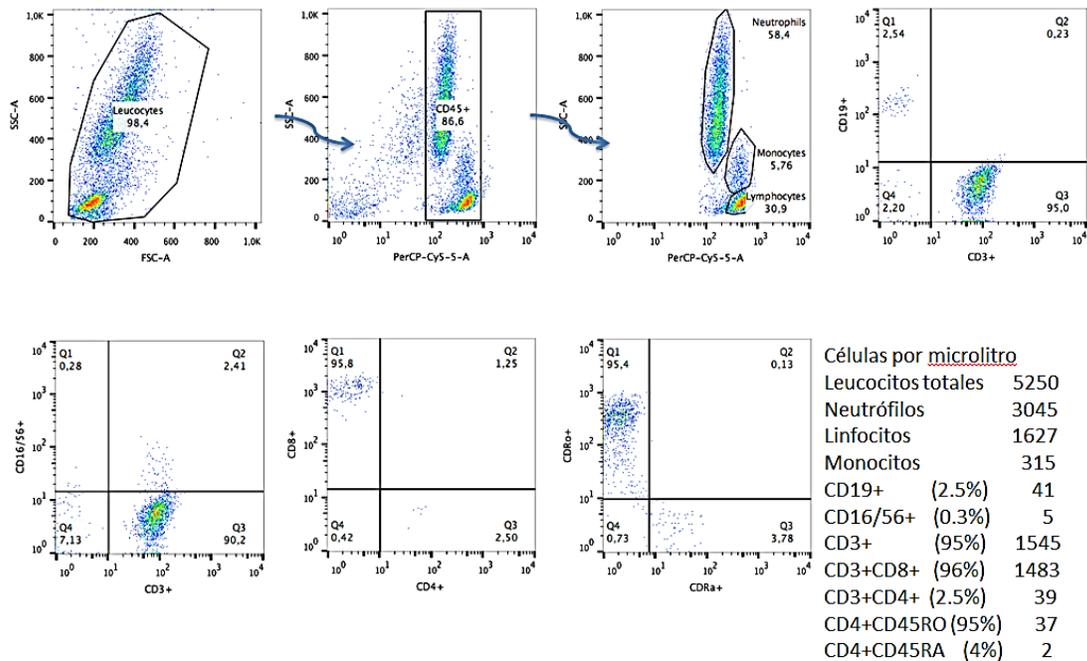


Figura 27. Subpoblaciones linfocitarias que muestran inmunofenotipo T^BNK⁺.

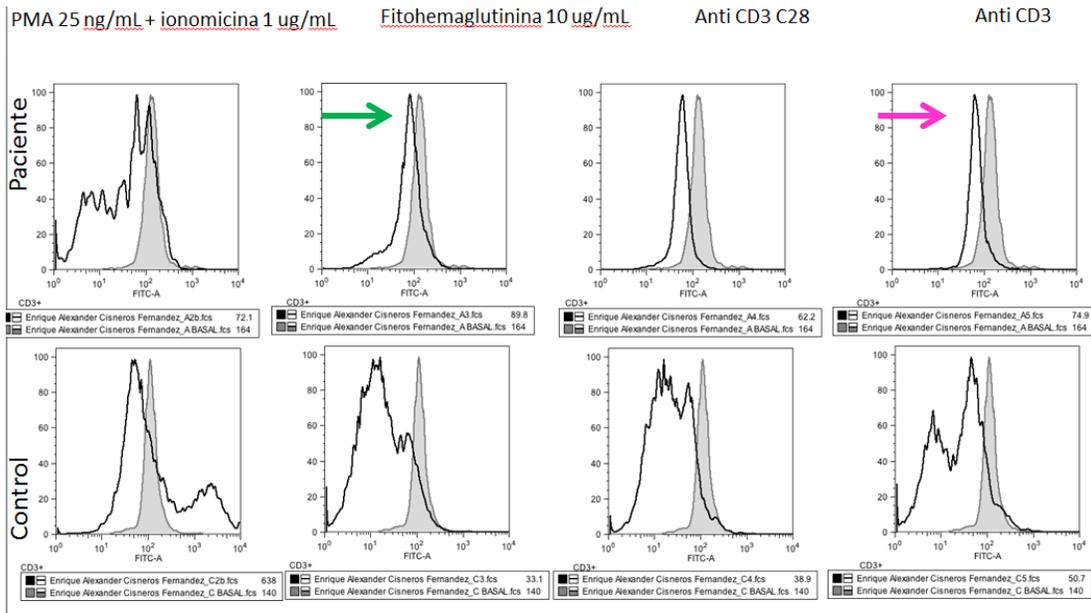


Figura 28. Histograma del estudio de linfoproliferación. Se observa la disminución en PHA (fecha verde) y en Anti-CD3⁺ (flecha rosa).

Basándonos en estos resultados, se propone diagnóstico de deficiencia de DOCK8, esta es autosómica recesiva, DOCK8 es un miembro de la superfamilia Dock180 de intercambio

de nucleótidos de guanina, aunque puede detectarse en varios tejidos, los niveles más altos de expresión se han demostrado en LT y B.

Las manifestaciones clínicas de pacientes con esta deficiencia son, eczema en > 90 % de los pacientes, relacionado con alergias, los pacientes están en muy alto riesgo de contraer infecciones virales cutáneas y mucosas, incluyendo infección recurrente por herpes simple, molusco contagioso y las verrugas. Se han observado dismorfismos faciales y retención de los dientes. Tienen un mayor riesgo de tumores malignos, incluyendo carcinoma de células escamosas (a menudo asociado con infección por VPH), linfoma y leiomiomas. Presentan niveles de IgE en suero marcadamente elevada, eosinofilia y linfopenia en un grado variable, en algunos casos afectan células CD4⁺ y CD8⁺ y en otros casos hay predominio de linfocitos CD4⁺, con una disminución marcada células CCR7⁺ y CD45RA⁺. Las células de pacientes con deficiencia de DOCK8 no logran proliferar en respuesta a la estimulación CD3/CD28, y este defecto no se corrige por adición exógena de IL2, sin embargo, algunos estudios han documentado la proliferación normal de la totalidad o de sólo los linfocitos CD4⁺ (Notarangelo, 2014).

6.3.2 Pacientes con subpoblaciones alteradas y linfoproliferación normal

El paciente número 5 masculino de 1 año, quien a presentado numerosas infecciones y un número bajo de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺, sus niveles de IgA e IgG están por debajo del valor de referencia, durante su hospitalización se aislaron 8 agentes infecciosos diferentes, por lo cual se sospecha de deficiencia de MHC-II, la literatura reporta que la linfoproliferación en niños con esta deficiencia es mayor al 50 % en relación con el control.

La deficiencia de MHC-II, es una enfermedad autosómica recesiva denominada comúnmente como síndrome de linfocito desnudo tipo II, en esta el locus del gen MHC-II es normal, pero existen mutaciones en los genes que codifican la transcripción de factores necesarios para su expresión. La falta de este, da como resultado la maduración defectuosa y la activación de los LT CD4⁺, que a su vez conduce a la maduración y activación defectuosa de los linfocitos B, y por lo tanto, presenta susceptibilidad a infecciones así como a hipogammaglobulinemia y la falta de respuesta antígeno-específico (Kallen, 2015).

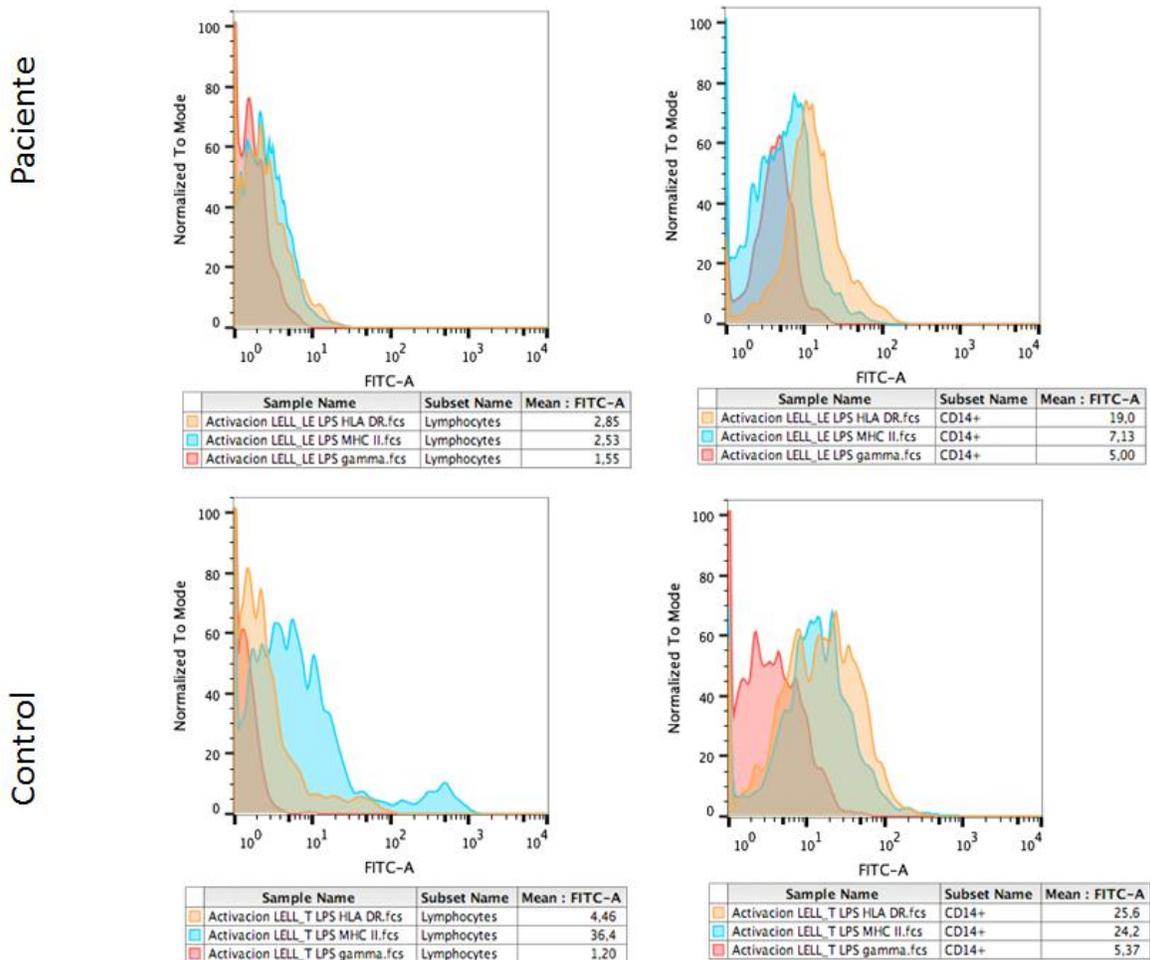


Figura 29. Expresión de MHC-II en PBMC activadas con 100 ng/mL de LPS durante 24 horas. En rojo se observa el control de isotipo, en naranja la expresión de HLA-DR y en azul la expresión de MHC-II, al compararla con la del control esta reducida notablemente.

El paciente número 16 femenino de 9 meses presenta datos clínico compatibles con deficiencia de ZAP70, una forma autosómica recesiva de CID que se caracteriza por la presencia de LT CD4⁺ y una profunda linfopenia de T CD8⁺, que conduce al fenotipo CD4⁺ CD8^{low} B⁺ NK⁺ CID con o sin la desregulación inmune (Hauck, 2015).

La deficiencia de ZAP70 se describió en 1988, por Roifman y colaboradores, ellos la describieron en indios menonitas, con depleción selectiva de linfocitos CD8⁺ tanto en la periferia como en la médula y timo. Los linfocitos B no se ven afectados, y los niveles de inmunoglobulina en suero son normales.

Esta se debe a mutaciones en el gen que codifica la proteína tirosin kinasa ZAP70 localizado en el cromosoma 2, esta proteína está asociada a la cadena zeta (ζ) del complejo TCR/CD3 lo que provoca una señalización defectuosa mediada por el complejo TCR, también comprometer la selección positiva de $CD8^+$, lo que causa la deficiencia severa de linfocitos circulantes.

Los LT $CD4^+$ se generan y se exportan a la periferia; sin embargo, la respuesta proliferativa a la estimulación a través del TCR es disminuida y se han detectado niveles bajos de TRECs en sangre periférica (Notarangelo, 2010).

Clínicamente se presentan con linfoma, enfermedad granulomatosa y lesiones psoriásicas en la piel, existen mutaciones hipomorficas que afectan de forma diferente la supresión y la función de los LT y por lo tanto resulta en un fenotipo clínico diferente.

La función de ZAP70 intacta no sólo permite la generación y función LT eficientes, también mantener la homeostasis inmune y evitar la desregulación inmune. Los mecanismos por los que mutaciones en ZAP70 pueden causar desregulación inmune puede incluir anomalías en la selección negativa intratímica de clones autorreactivos y / o alteración de la función de las células Treg (Notarangelo, 2014).

Para aportar más datos y realizar un mejor diagnóstico se realizaron las siguientes pruebas:

- a. Diagnóstico diferencial de deficiencia de MHC-1, ya que esta mutación causa deficiencia de linfocitos $CD8^+$.
- b. Tinción intracelular de ZAP70, para apoyar el diagnóstico de deficiencia de esta proteína.

Los resultados de estas pruebas se muestran en las figuras 30 y 31.

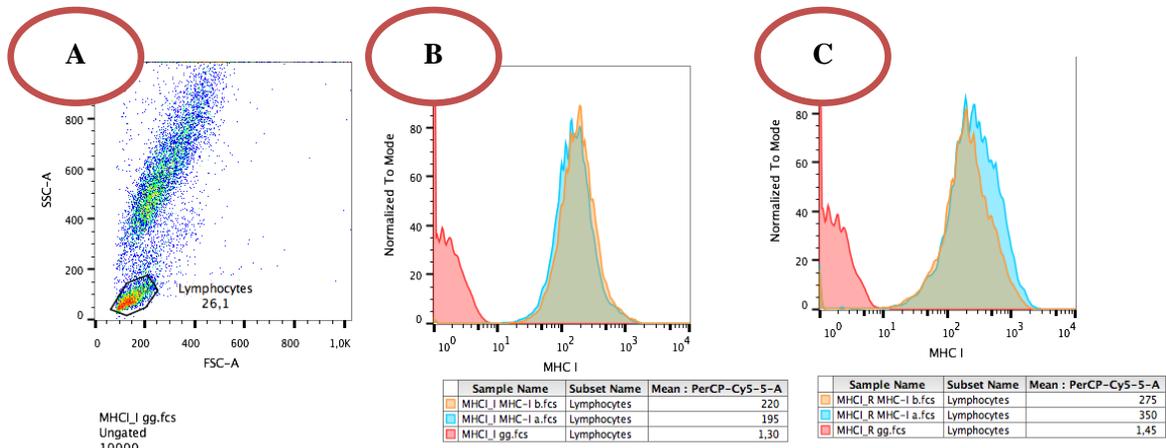


Figura 30. Histograma de la Tinción intracelular de ZAP70. A) Selección de linfocitos. B) Control sano; C) Paciente. En rojo el control de isotipo, en azul y amarillo la expresión de MHC-I. En este histograma se muestra que la paciente expresa MHC-I en linfocitos, por lo tanto se descarta esta hipótesis diagnóstica.

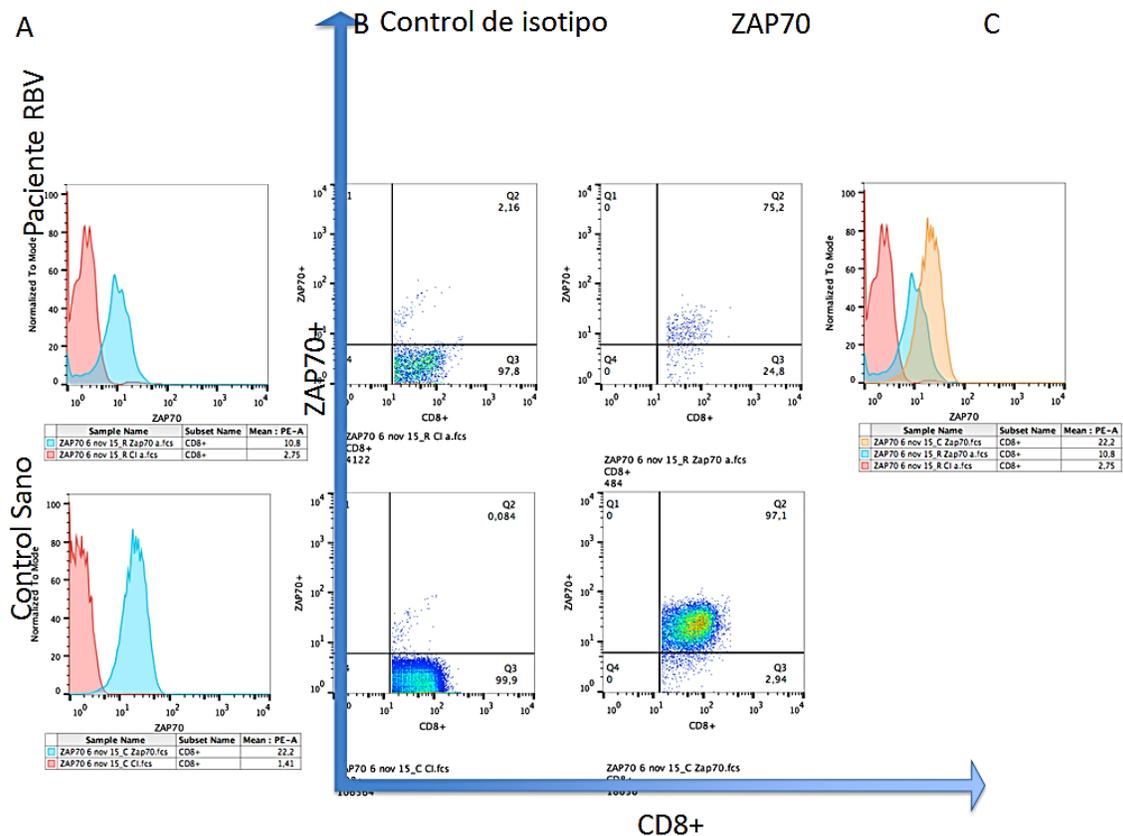


Figura 31. Tinción de ZAP70. A) Histograma donde se muestra la intensidad media de fluorescencia. B) Dot plot donde se muestra la expresión de ZAP70 en células CD8⁺. C) Overlay de histograma que muestra control de isotipo en rojo, ZAP70 del paciente en azul y dos controles sanos en amarillo.

En este estudio se realizó la tinción intracelular de la proteína ZAP70, y se observa que la paciente si expresa la proteína, aunque en una cantidad menor a la del control sano, ya que la intensidad media de fluorescencia del control fue de 22.6 y la de la paciente de 11.9. Esto se puede deber a una mutacion hipomorfica que permite la expresi3n residual de la prote3na.

La linfoproliferaci3n se realizo en linfocitos CD3⁺ CD8⁺ esta arroja valores normales.

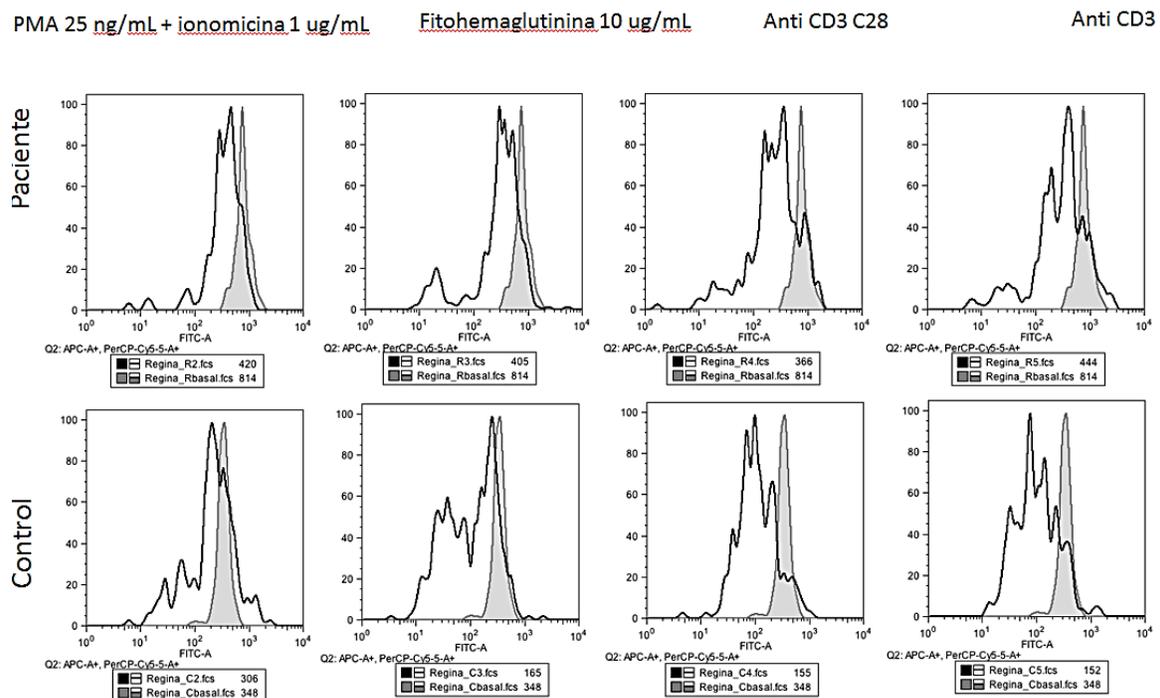
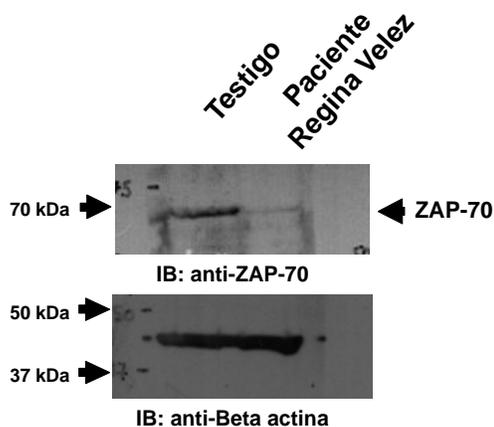


Figura 32. Histograma del estudio de linfoproliferaci3n. En gris solido muestra sin estimular y en l3nea negra muestra estimulada. El resultado normal puede deberse a la expresi3n residual de la prote3na.

Con esta informaci3n el Hospital del ni3o Morelense y la Universidad Aut3noma del Estado de Morelos decidieron realizar un Western Blot, para observar la expresi3n de la prote3na (Figura 33).

El paciente se encuentra actualmente en el protocolo de transplante en el Hospital 20 de Noviembre, el Dr. Mario Cruz realiz3 la secuencia del genoma e identifico dos mutaciones en ZAP70 que no han sido reportadas, tambi3n secuencio a los familiares y por ahora esta

realizando experimentos bioquímicos para determinar el impacto de las mutantes en la vía de señalización del TCR.



Lisados totales obtenidos a partir de Blastos
expandidos con PHA e IL-2 100 U/ml

Figura 33. Western Blot de la proteína ZAP70. A la derecha muestra de la paciente, esta se observa disminuida. Imagen proporcionada por el Dr. Mario Cruz.

Paciente número 2 masculino de 3 meses, producto de la segunda gesta, madre aborta primer producto, el paciente presenta infecciones recurrentes y microcefalia, por lo cual es evaluado como probable CID. Los estudios de laboratorio del paciente arrojan número indetectable de TRECs, inmunofenotipo $T^+B^-NK^+$, la linfoproliferación no es menor al 50 % sin embargo se observa disminuida. Se realizó estudio de fragilidad cromosómica, encontrándose alterado. Siguiendo el algoritmo diagnóstico se sospecha de deficiencia de DNA ligasa IV o deficiencia de Cernunos pero estas mutaciones se buscaron en el DNA del paciente y no fueron encontradas.

Haciendo un análisis en conjunto con su inmunofenotipo y sus características clínicas se orienta el diagnóstico hacia Síndrome de Nijmegen este es causado por un defecto de reparación de DNA y causa esta inmunodeficiencia combinada con características sindrómicas.

Síndrome de Nijmegen (NBS) es un trastorno autosómico recesivo, causado por mutaciones hipomorfas en NBS1 (Nibrin); trastornos de ciclo celular, punto de control y la reparación de la rotura de DNA de doble cadena. Se asocia con diversas características clínicas, principalmente con disfunción inmune celular y humoral, radiosensibilidad, la inestabilidad cromosómica y una predisposición al cáncer.

Se caracteriza por la presencia de rasgos faciales dismórficos que les dan apariencia de “pájaro”, microcefalia y retraso del crecimiento. Mientras que el fenotipo clínico es variables, los niños más afectados tienen infecciones sinopulmonares bacterianas que puede conducir a bronquiectasias.

La hipogammaglobulinemia es común, en particular la deficiencia de IgA e IgG. La linfopenia va de leve a moderada con deteriorado en las respuestas proliferativas a mitógenos *in vitro* y ocasionalmente se han registrado fenómenos autoinmunes (Gennery, 2000).

Paciente número 6, masculino de 1 mes, con linfopenia e inmunofenotipo $T^+B^+NK^+$, los resultados de la linfoproliferación son mayores a 50 %, sin embargo esta se observa disminuida.

Presenta cardiopatía congénita, aplasia de timo e hipocalcemia, por lo cual se orienta el diagnóstico a Síndrome de Di George esta enfermedad esta clasificada como inmunodeficiencia combinada con características sindrómicas, es causado por delección de genes contiguos en el cromosoma 22q11.2 o mutación del gen, TBX1, que codifica un factor de transcripción crítico para el desarrollo de timo y estructuras embrionarias adyacentes (Tasher, 2012).

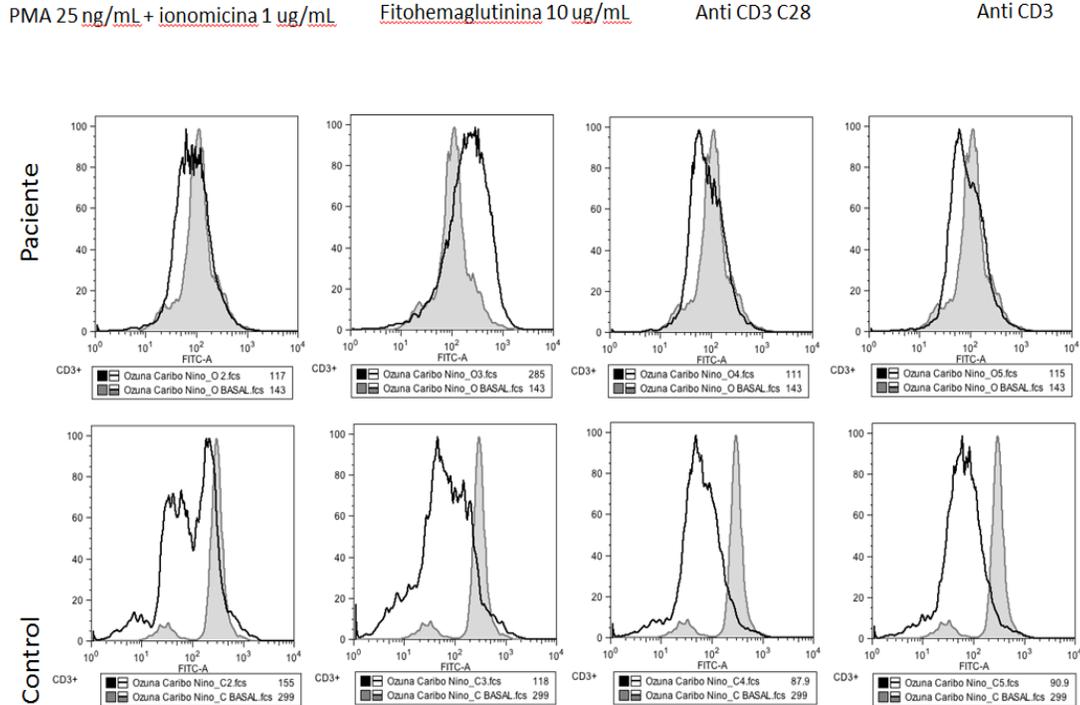


Figura 34. Histograma del estudio de linfoproliferación. En gris solido muestra sin estimular y en línea negra muestra estimulada. Se observa disminución aun que es mayor al 50 %.

6. 3.3 Pacientes con inmunodeficiencias primarias diferentes a CID

Paciente número 4: masculino de 1 año quien presenta crisis febriles, neumotórax, infarto cerebral en territorio de la arteria cerebral media, Neumonía por VSR y meningitis tuberculosa, por lo cual se sospecho de síndrome de susceptibilidad mendeliana a las infecciones micobacterianas (MSMD, por sus siglas en inglés Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Diseases) esta es una inmunodeficiencia primaria atípica en la que las personas afectadas enferman con más frecuencia por infecciones con BCG (bacilo de Calmette-Guérin, cepa vacunal de *M. bovis*), micobacterias ambientales (normalmente debaja virulencia) y *Salmonella* extraintestinales, sin tener predisposición a desarrollar otras infecciones. Se debe a defectos en la inmunidad mediada por IFN γ , las mutaciones conocidas que causan MSMD abarcan a los genes que controlan la producción de IFN γ (IL12B e IL12RB1) o la respuesta a esa citocina (IFNGR1, IFNGR2 y STAT1), por lo cual recientemente se propuso el término más general e inclusivo de “errores innatos en la inmunidad mediada por IL12/IL23 e IFN γ ” (Pedraza, 2007).

Para confirmar esta sospecha se es necesario secuenciar y encontrar la mutación.

Paciente número 8 masculino de 4 meses con cardiopatía congénita así como sepsis por pseudomonas, citopenia, presenta el inmunofenotipo $T^+B^+NK^-$ y bajas concentraciones de IgM e IgG. La citopenia se corrigió y su evolución fue buena, por lo que el diagnóstico se orientó hacia Hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia es una e inmunodeficiencia primaria, clasificada como deficiencias predominantemente anticuerpos, habitualmente se presenta en menores de cinco años (90 %), del género masculino (60-80 %), con una incidencia global de 1 en 10 000 nacidos vivos, la cual se produce por un defecto en la síntesis de uno o más isotipos de inmunoglobulina durante los primeros años de vida, de carácter autolimitado, transitorio, etiología desconocida, se caracteriza por una disminución de la IgG sérica hacia el cuarto o quinto mes de vida hasta los 18 a 24 meses, con IgA normal o baja y una IgM normal (Bobadilla, 2013). Al paciente se le administrará Gamaglobulina sustituida hasta el año de edad y se retomará el caso.

Paciente número 10 masculino de 15 años, sus padres son primos segundos, el paciente debuta con neumonía a los 5 años y a los 6 años desarrolla verrugas en ambos pies, estas son tratadas sin éxito y aumentan de tamaño hasta abarcar todos los dedos y plantas, a los 14 años refiere se han diseminado a piernas y manos. Actualmente presenta linfopenia y su inmunofenotipo es $T^+B^+NK^+$. Se sospecha de Epidermodisplasia verruciforme esta es una inmunodeficiencia primaria clasificada como defecto de la Inmunidad Innata, se caracteriza por una susceptibilidad inusual a la infección con ciertos tipos de virus del papiloma humano y una propensión a desarrollar tumores malignos de la piel. Se han demostrado defectos parciales en la inmunidad mediada por células en esta enfermedad.

Es un trastorno genético autosómico recesivo del sistema inmunológico que se manifiesta por una mayor susceptibilidad a virus del papiloma humano (VPH) a partir de los primeros años de vida, se debe a mutaciones en el EVER1, EVER2 o genes en el cromosoma 17q25. La mayoría de estos son VPH 5 y 8; raramente se trata de VPH 14, 17, 20 y 47, todos tienen potencial oncogénico.

Las características clínicas son la erupción de máculas, pitiriasis versicolor, pápulas y verrugas planas, que se asocian con un alto riesgo de piel cáncer en áreas expuestas al sol. Las lesiones iniciales a menudo ocurren en infancia. Otras lesiones cutáneas benignas son máculas y placas queratosis seborreica (Patel, 2010).

Se debe realizar un diagnóstico diferencial con otras inmunodeficiencias primarias que provocar susceptibilidad a virus como son: deficiencia de RhoH o de GATA2.

Paciente número 11 femenino de 6 meses, a los 3 meses de edad le realizan enucleación del ojo derecho debido a infección, le realiza laparoscopia e Ileostomía secundaria a perforación intestinal, presentó también úlceras en extremidades inferiores con presencia de conejeras, así como neutropenia persistente. NK y CD45RO elevadas Ig y neutropenia. Se realizaron BH seriadas en doce ocasiones (tabla 7 y figura 35).

Tabla 7. BH seriada de paciente 11. Abreviaturas: Hb Hemoglobina, HCT hematocrito, VCM Volumen corpuscular medio, CHCM Concentración media de hemoglobina.

#	Leucocitos 10 ³ /μL	Neutrófilos 10 ³ /μL	Linfocitos 10 ³ /μL	Monocitos 10 ³ /μL	Eosinófilos 10 ³ /μL	Hb g/dL	HCT %	VCM fL	CHCM pg	Plaquetas 10 ³ /μL
1	5.7	1.0	4.0	0.5	0.1	12.8	38.3	86.6	28.9	489
2	5.3	1.3	3.5	0.4	0.1	12.3	37.6	87.2	28.6	535
3	6.2	1.7	3.6	0.7	0.1	12.8	39.0	87.9	28.8	543
4	7.8	1.3	5.4	0.9	0.1	13.0	39.2	87.5	29.0	432
5	6.9	1.7	4.2	0.9	0.2	12.7	38	87.3	29.2	504
6	6.9	1.6	4.4	0.7	0.1	12.9	37.1	87.1	30.3	494
7	3.8	0.5	2.6	0.7	0.1	12.2	36.8	87.8	29.2	412
8	9.1	1.5	6.9	0.5	0.1	12.9	39.6	89.3	29.0	519
9	7.9	0.9	6.2	7.1	ND	11.9	36.7	90.5	29.5	457
10	10.5	2.1	7.5	0.9	ND	12.0	37.3	90.1	29.1	339
11	5.6	0.6	3.9	0.7	0.4	10.1	32.0	88.9	28.0	457
12	4.9	0.4	3.9	0.3	0.3	10.6	32	87.0	28.8	468

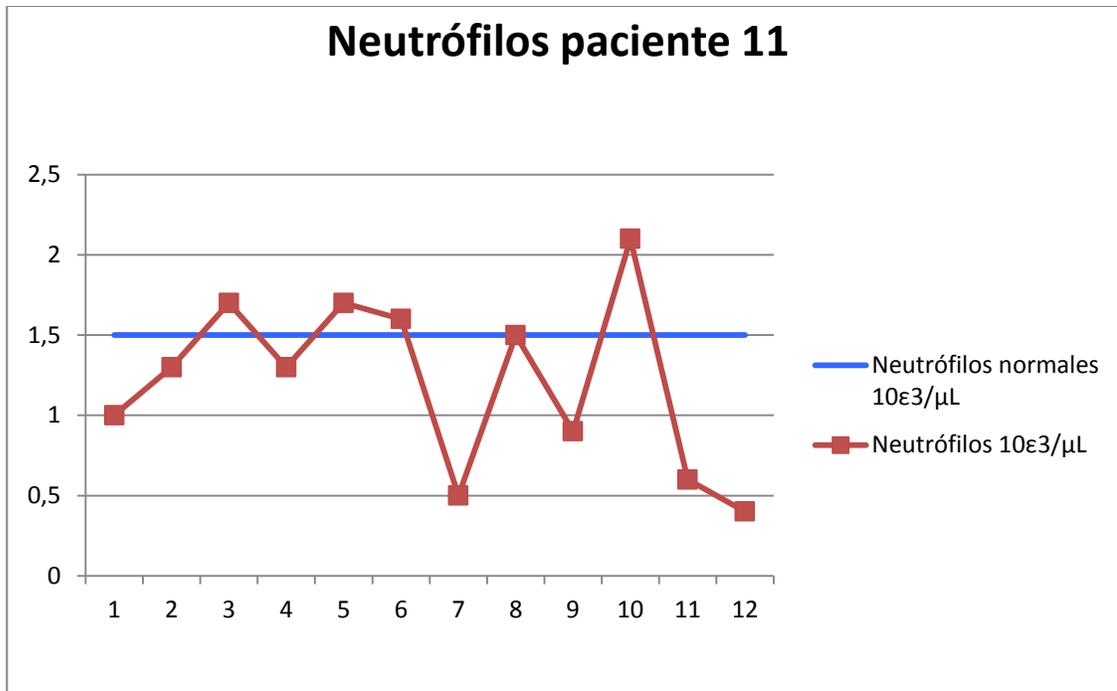


Figura 35. Neutrófilos paciente 11. Se observan las oscilaciones en los neutrófilos del paciente 11.

Su diagnóstico se orienta hacia neutropenia cíclica, es una enfermedad Autosómica Dominante, su base molecular reside en un defecto intrínseco de la granulopoyesis localizado en el cromosoma 19p13.3 donde se encuentra el gen de la proteína elastasa del neutrófilo (ELA2). Estas mutaciones del gen ELA2 inducen una apoptosis intramedular acelerada en estadios muy precoces de maduración del neutrófilo provocando períodos regulares de neutropenia en sangre periférica, aproximadamente cada 21 días. En ocasiones, otras células sanguíneas como las plaquetas o los glóbulos rojos pueden mostrar oscilaciones (Ortiz y Pulley, 2007).

Este trastorno se puede manifestar a cualquier edad, aunque se diagnostica en un 80 % en edad pediátrica. Durante el periodo neutropénico el paciente puede cursar con fiebre, estomatitis, gingivitis, periodontitis, faringitis, lesiones dérmicas tipo pústulas y celulitis. Los cuadros graves se manifiestan con mastoiditis, neumonía, ulceraciones vaginales y rectales (Posada, 2002).

6.3.4 Paciente en los que se descarto el diagnóstico de CID.

Tabla 8. Pacientes en los que se descarta inmunodeficiencia.

Paciente	Diagnóstico
1	Panhipopituitarismo
7	Cardiopatía congénita
9	Leucemia aguda mieloblástica
15	Reflujo vesicoureteral

El **paciente 15** presentó subpoblaciones normales, el **paciente 9** presenta alteraciones en la subpoblaciones debido a su enfermedad. Los **pacientes 1 y 7** mostraron alteraciones debido a procesos infecciosos que cursaron, cuando estos se remitieron las subpoblaciones se normalizaron ya que las enfermedades que padecen no son causadas por defectos en el sistema inmune.

En el presente estudio, se evaluó la respuesta inmune celular de 16 pacientes con sospecha de CID, en el 50 % de estos el diagnóstico se orientó hacia CID, sin embargo solo el 25 % (pacientes 3, 12, 13 y 14) presentó disminución en la linfoproliferación y alteración en las subpoblaciones, el otro 25 % (pacientes 2, 5, 6 y 16) presentaron linfoproliferación mayor al 50 % con respecto al control y subpoblaciones alteradas, en el caso del paciente número 5 con sospecha de deficiencia de MHC-II, está reportado por Rifman (2012) que la linfoproliferación en niños con esta deficiencia es normal.

En el paciente número 16 se sospecha de una mutación hipomorfa que permite la expresión residual de la proteína ZAP70 por lo cual su linfoproliferación es mayor al 50 % y los pacientes 2 y 6 presentan inmunodeficiencias combinadas asociadas a síndromes y no hay estudios que demuestren que no proliferen.

El 25 % (pacientes 4, 8, 10, y 11) de los pacientes se encontró con inmunodeficiencia primaria diferente a CID, estos pacientes mostraron linfoproliferación normal y 2 de ellos subpoblaciones alteradas.

El 25 % (paciente 1, 7, 9 y 15) restante no presento ninguna inmunodeficiencia, su linfoproliferación fue normal y las subpoblaciones se vieron alteradas en 3 pacientes esto debido a procesos infecciosos que cursaron los pacientes.

No todos los pacientes con CID presentan disminución en la linfoproliferación en respuesta a mitógenos, como es el caso de la deficiencia de MHC-II, por lo que el resultado normal de esta no descarta el diagnóstico. Las subpoblaciones alteradas pueden deberse a fuertes procesos infecciosos, por lo tanto tampoco se pueden tomar como una prueba definitiva para orientar el diagnóstico hacia CID. Si se realiza una evaluación completa del paciente incluyendo la historia clínica y las pruebas de laboratorio es posible orientar el diagnóstico de forma acertada hacia CID o bien descartarlo.

A lo largo del estudio se observa que la linfoproliferación fue muy variable ya que no esta disminuida por debajo del 50 % en todos los pacientes con CID, por lo que se sugiere se realice en una cohorte más grande para poder determinar estadísticamente cual es el valor de linfoproliferación normal ideal o bien confirmar que este valor es útil.

Con estos estudios corroboramos la variabilidad con la que se presenta esta enfermedad, motivo por el cual es difícil de diagnosticar, se debe dar seguimiento a las características inmunológicas de los pacientes con sospecha de SCID o CID, para para lograr conocer su comportamiento clínico y en un futuro identificar factores de pronostico.

Se realizó la extracción de DNA de todos los pacientes y se espera se puedan secuenciar para dar un diagnóstico definitivo, ya que las linfoproliferación y las subpoblaciones si ayudan a orientar el diagnóstico, pero no se puede dar un diagnóstico definitivo sin una prueba genética que demuestre la mutación.

El diagnóstico precoz de CID es de suma importancia para la salud y calidad de vida del paciente, ya que al ser detectada de forma temprana tiene mejores pronósticos de trasplante y se puede iniciar tratamiento profiláctico que ayude a disminuir las consecuencias de estas inmunodeficiencias.

7. CONCLUSIONES

La presencia de linfocitos no descarta CID, pero en la mayoría de los casos estos no son funcionales, por lo tanto es necesario evaluar la función de estos mediante el estudio de linfoproliferación *in vitro*.

Con la linfoproliferación *in vitro* con los mitógenos PHA, anti-CD3⁺/anti-CD28 y/o anti-CD3⁺ conocemos si los linfocitos en circulación son funcionales y por lo tanto podemos orientar el diagnóstico de CID.

Las subpoblaciones linfocitarias orientan en el diagnóstico de CID y el fenotipo de esta.

La linfoproliferación no es una prueba definitiva para confirmar el diagnóstico de CID, sin embargo ayuda a orientarlo o bien descartarlo. El corte de 50 % para considerar la linfoproliferación alterada, está basado en la literatura, pero convendría realizar el estudio en una cohorte más grande para determinar el porcentaje ideal.

Con este protocolo se logró orientar el diagnóstico hacia CID en el 50 % de los 16 pacientes y al 25 % se le orientó hacia otro tipo de IDP. Se descartó el diagnóstico en el 25 % de pacientes.

En la práctica diaria la linfoproliferación *in vitro* con los mitógenos PHA, anti-CD3⁺/anti-CD28 y/o anti-CD3⁺ y la determinación de las subpoblaciones son útiles en el diagnóstico de CID, pero no son pruebas suficientes para confirmar este.

APENDICE

Tinción de ZAP70

Se etiquetaron 4 tubos:

Paciente Zap70

Paciente control de isotipo

Testigo Zap70

Testigo control de isotipo,

Se colocaron 1 millón de células mononucleares aisladas por gradiente de densidad sobre Ficoll-Paque y se agregaron 500 μ L de buffer de lisis por tubo, e incubar 10 min a 37 °C. Se lavo con 1 mL de PBS a 524 x g .Se permeabilizaron la células agregando Cytotfix/citoperm e incubar 20 min con hielo, se lavaron 2 veces con Saponina a 754 x g. Se bloquearon con α Block por 30 min y lavar 2 veces con Saponina. Se agrego el Ac correspondiente: anti-ZAP70 (PE) clona 1E7.2 y control de isotipo: BD Simultest™ Control γ 2a clona X39 (FITC) / γ 1 (PE) clona X40 durante 40 min en hielo y oscuridad. Se lavaron 2 veces con Saponina y se fijaron con PBS con paraformaldehído al 1 %. Se leyeron en citómetro facs ARIA.

Tinción MHC-II

Se etiquetaron 3 tubos: $\gamma\gamma$, **MHC-II**, **HLA-DR**.

Se agregaron 30 μ L, de sangre total a cada tubo y 500 μ L de solución de lisis de rojos, se incubaron durante 10 min. Se lavaron con PBS 1x a 524 x g por 5 min. Se bloquearon las células con α Block por 30 min. Se lavaron 2 veces con PBS 1x.

Se agrego el Ac de superficie:

$\gamma\gamma$: BD Simultest™ Control γ 2a clona X39 (FITC) / γ 1 (PE) clona X40,

MHC-II: CD14+ (APC) clona M5E2, MHC-II (FITC) clona M5/114.15.2

HLA-DR: CD14+ (APC) clona M5E2, HLA-DR (FITC) clona G46-6

Se incubarán 40 minutos en oscuridad y se lavaron 3 veces con 1 mL de PBS 1x, se fijaron con PBS con paraformaldehído al 1 % y *se leyeron* en citómetro facs ARIA.

8. REFERENCIAS

- Abbas A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S., Baker, D. L., Baker, A., & Abbas, A.K. (2012). *Inmunología celular y molecular*. Barcelona, España: Elsevier.
- Barrera L.M., Drago, M. E., Pérez, J., Zamora, A. C., Gómez, F., Rosario, T., y Mendoza, F. (2004). Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Rev Inst Na Enf Resp Mex*. 17(1):42-55.
- Bobadilla, P.V., Del Villar, M.A., Hinojosa, M. L., y López, E. (2013). Reporte de un caso de hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia. *Arch Inv Mat Inf*. 5(1):34-40.
- Bousfiha, A., Jeddane, L., Al-Herz, W., Ailal, F. y Casanova, J. (2015). The 2015 IUIS Phenotypic Classification for Primary Immunodeficiencies. *J Clin Immunol*. 35(8):727-738. DOI 10.1007/s10875-015-0198-5
- Canda, A. (2007). Rafts lipídicos e IL-12R: nuevos avances en el control de la actividad proliferativa de IL-12. Universidad de Santiago de Compostela. España.
- Condino-Neto, A., Franco, J. L., Trujillo-Vargas, C., Espinosa-Rosales, F. J., Leiva, L. E., Rodríguez-Quiroz, F., y Sorensen, R. U. (2011). Critical issues and needs in management of primary immunodeficiency diseases in Latin America. *Allergol Immunopathol*. 31(1):45-51. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.aller.2010.09.001>
- Contreras-Verduzco, F., Morales-Vázquez, A., Medina-Torres, E., Espinosa-Padilla. (2014). Diagnóstico oportuno de la inmunodeficiencia combinada grave (SCID) a través del tamiz neonatal. *Alergia, asma e inmunología pediátricas*. 23(2):48-56. Recuperado de: <http://www.medigraphic.com/pdfs/alergia/al-2014/al142d.pdf>
- Crawford, T.Q., Jalbert, E., Ndhlovu, L. C., y Barbour J. D. (2014). Concomitant Evaluation of PMA+Ionomycin-Induced Kinase Phosphorylation and Cytokine Production in T Cell Subsets by FlowCytometry. *International Society for Advancement of Cytometry* 85A, 268-276.
- Coria, E., Padilla, S. E., Rosales, F. E., Eugenia, M., Camaño, V., & Galicia, L. B. (2010). Panorama epidemiológico de las inmunodeficiencias primarias en México. *Revista Alergia México* 57(5):159–163.

- De la Hera, A., Fernández-Miguel, G., Calvo-Alcocer, E., & Sanz, E. (2000). El receptor de antígeno en los linfocitos T y las moléculas de histocompatibilidad: parejas inseparables. *Medicine*. 8:1271–1289. Recuperado de: [http://doi.org/10.1016/S0304-5412\(00\)70249-6](http://doi.org/10.1016/S0304-5412(00)70249-6)
- De la Morena, T. M., y Nelson R. P. (2014). Recent Advances in Transplantation for Primary Immune Deficiency Diseases: A Comprehensive Review. *Clinic Rev Allerg Immunol*, 46(2):131–144.
- Felgentreff, K., Perez-Becker, R., Speckmann, C., Schwarz, K., Kalwak, K., Markelj, G., y Avcin, T. (2011). Clinical and immunological manifestations of patients with atypical severe combined immunodeficiency. *Clinical Immunology* 141(1):73–82. DOI:10.1016/j.clim.2011.05.007
- Fernández, C., Hernández, J.D., Silvera, C. (2006). Ctl4-4, una molécula que inhibe la activación de los linfocitos T. *Salud Uninorte*, 22(2):168-181.
- Filipovich, A. H. (2008). Hematopoietic cell transplantation for correction of primary immunodeficiencies. *Bone Marrow Transplantation* 42(Suppl1):S49–S52.
- Fleisher, T. A., Madkaikar, M., y Rosenzweig, S. D. (2016). Application of Flow Cytometry in the Evaluation of Primary Immunodeficiencies. *Indian J Pediatr*. 83(5):444-449. DOI 10.1007/s12098-015-2011-0
- Gennery, A.R., Cant, A. J., y Jeggo P.A. (2000). Immunodeficiency associated with DNA repair defects. *Clin Exp Immunol* 121(1): 1-7.
- Hauck, F., Blumenthal, B., Fuchs, S., Lenoir, C., y Martin, E. (2015). SYK expression endows human ZAP70-deficient CD8 T cells with residual TCR signaling. *Clinical Immunology* 161(2):103–109. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2015.07.002>
- Hernández-blas, M. G., Orozco-martínez, S., Contreras-verduzco, A., Medina-torres, E. A., & Espinosa-padilla, S. (2014). ¿Cuándo sospechar de la inmunodeficiencia combinada grave en niños? *Alergia, asma e inmunología pediátricas* 23(1):20–26.
- Hernández, P., González, O.M., Rodríguez, Y. Ganen F.A. (1999). Estudio de la fitohemaglutinina proveniente del frijol colorado (*Phaseolus vulgaris*). *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* ,15(3):210-214.
- Hunter, K. V; Lücke, T; Spranger, J; y Smithson, S.F. (2009). Schimke immunoosseous dysplasia: defining skeletal features. *Eur J Pediatr* 169(7):801–811. DOI 10.1007/s00431-009-1115-9

- Izquierdo, J., Bonilla, F., y Cañas, C. A., y Tobón, G. (2013). Calcio, canales, señalización intracelular y autoinmunidad. *Reumatol Clin*.10 (1):43–47. Recuperado de : <http://www.reumatologiaclinica.org>
- Kallen, M. E., y Pullarkat, S. T. (2015). Type II Bare Lymphocyte Syndrome: Role of Peripheral Blood Flow Cytometry and Utility of Stem Cell Transplant in Treatment. *J Pediatr Hematol Oncol*. 37(4):e245–e249.
- Kshamta, B.H., Lücke, T., Spranger, J., y Smithson S. F. Schimke immunoosseous dysplasia: defining skeletal features. *Eur J Pediatr* 169:801–811. DOI 10.1007/s00431-009-1115-9
- Kelly, B. T., Tam, J. S., Verbsky, J. W., & Routes, J. M. (2013). Screening for severe combined immunodeficiency in neonates. *Clin Epidemiol*. 16(5):363-369. Recuperado de: <http://doi.org/10.2147/CLEP.S48890>
- Kindt, T. J., Goldsby, R. A., y Osborne, B. (2007). *Imunología de Kuby*. Editor McGraw-Hill Interamericana.
- LASID. (2016). Registro on-line de IDPs. Recuperado de: http://registrolasid.org/estadistica_mensal.html
- Leiva, L. E., Bezrodnik, L., Oleastro, M., Condino-Neto, A., Costa-Carvalho, B. T., Sevciovic A. y Sorensen, R. U. (2011). Primary immunodeficiency diseases in Latin America: Proceedings of the Second Latin American Society for Immunodeficiencies (LASID) Advisory Board. *Allergologia et Immunopathologia*. 39(2):106-110. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.aller.2010.10.007>
- Lev, A., Amariglio, N., Levy, Y., Spirer, Z., Anikster, Y., Rechavi, G., Dekel, B., y Somech, R. (2009). Molecular assessment of thymic capacities in patients with Schimke immuno-osseous displasia. *Clinical Immunology* 133(3):375–381. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2009.08.017>
- Li, Y., y Kurlander R. J. (2010). Comparison of anti-CD3 and anti-CD28-coated beads with soluble anti-CD3 for expanding human T cells: Differing impact on CD8 T cell phenotype and responsiveness to restimulation. *J Transl Med*. 8:104.
- Locke, B. A., Dasu, A., y Verbsky, J. W. (2014). Laboratory Diagnosis of Primary Immunodeficiencies. *Clin Rev Allergy Immunol*, 46(2):154–168. Recuperado de: DOI10.1007/s12016-014-8412-4

- López-Martínez, A., Chávez-Muñoz, C., y Granados, J. (2005). Función biológica del complejo principal de histocompatibilidad. *Rev Invest Clin.* 57(2):132-141.
- Lyons, B. (1999). Divided we stand: Tracking cell proliferation with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Immunol Cell Biol*, 77(6):509–515.
- March, G. A., y Eiros J. M. (2012). Citometría de flujo: fundamento, instrumentación y aplicaciones en microbiología clínica. *Electron J Biomed.* 3:1-8.
- Movafagh, A., Heydary, H., Mortazavi-Tabatabaei, S. A., y Azargashb, E. (2011). The Significance Application of Indigenous Phytohemagglutinin (PHA) Mitogen on Metaphase and Cell Culture Procedure. *Iran J Pharma Res*, 10(4):895-903.
- Notarangelo, L. D. (2010.). Primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol.* 125(Suppl2):S182–S194. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.053>
- Notarangelo, L. D. (2013). Functional T Cell Immunodeficiencies (with T Cells Present). *Annu Rev Immunol.* 31:195-225.. Recuperado de: <http://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095927>
- Notarangelo, L. D. (2014). Combined Immunodeficiencies with Nonfunctional T Lymphocytes. *Adv in Immunol* 121:121-190. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800100-4.00004-0>
- Oliveira, J. B., Notarangelo, L. D., y Fleisher T. A. (2008). Applications of flow cytometry for the study of primary immune deficiencies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 8(6):499–509.
- Patel, T., Morrison, L. K., Rady, P., y Tying, S. (2010). Epidermodysplasia verruciformis and susceptibility to HPV. *Dis Markers.* 29(3-4):199–206. Recuperado de <https://dx.doi.org/10.3233/DMA-2010-0733>
- Pedraza, S., Aldana, R., Herrera, M. T., Torres, M. y Bustamante, J. (2007). Infecciones por Mycobacterium y Salmonella en pacientes con inmunodeficiencias asociadas al circuito IL-12/IL-23-IFN- γ : aspectos biológicos y clínicos. *Enf Inf Microbiol.* 27(3):88-96.
- Picard, C., Al-hertz, W., Bousfiha, A., Casanova, J., & Gaspar, H. B. (2015). Primary Immunodeficiency Diseases: an Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency 2015. *J Clin Immunol.* 35(8):696-726. Recuperado de: <http://doi.org/10.1007/s10875-015-0201-1>

- Pulley, I. E., y Ortiz, F. (2007). Neutropenia crónica en la infancia. Vitae: Academia Biomédica Digital. 31:
- Quah, B. J., y Parish C. R. (2010). The Use of Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE) to Monitor Lymphocyte Proliferation. J Vis Exp. 44:e2259
- Quah, B. J., Warren, H. S., y Parish C. R. (2007). Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. Nat protoc. 2(9):2049-2056.
- Randolph, D. A., Routes, J. M., & Verbsky, J. W. (2016). Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency. Neo Reviews. 14(9):e448-e455. Recuperado de : <http://neoreviews.aappublications.org/>
- Risueño, R. M., y Alarcón, Balbino. (2007). El cambio conformacional en el TCR detecta la fortaleza del ligando en células T maduras y en timocitos. An. R. Acad. Nac. Farm. 73: 27-45. Recuperado de: <http://www.analesranf.com>
- Rivera, C. A., Martínez, M.E., Garza, A. G., Rodríguez, R., González O., y Rangel M. M. (2002). Un caso de neutropenia cíclica. Medicina Universitaria. 4(15):105-107.
- Roifman, C. M., Somech, R., Kavadas, F., Pires, L., Nahum, A., Dalal, I., y Grunebaum, E. (2012). Defining combined immunodeficiency. J Allergy Clin Immunol. 130(1):177–183. Recuperado de:<http://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.04.029>
- Rosenzweig, S. D., y Fleisher, T.A. (2013). Laboratory evaluation for T-cell dysfunction. J Allergy Clin Immunol. 131(2):1-8.
- Ruiz, V., Boffill, M.A., González, O. L., Masjuan, M. y Blanco F. (2005). Efecto inmunomodulador de la fitohemaglutinina de *Phaseolus vulgaris*. Rev Cubana Invest Biomed. 24(1):5-13
- Santangelo, L; Gigante, M; Netti, G. S; Diella, S; y Puteo, F. (2014). A novel SMARCA1 mutation associated with a mild phenotype of Schimke immuno-osseous dysplasia (SIOD). BMC Nephrology 15:41.
- Saavedra, D. (2013). La molécula CD28 y su función en la activación de células T. Revista Cubana de Hematología. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter. 29(4):359-367.
- Sanz, J. M., Martín, M., Reyes, E., y Prieto, A. M. (2013). Células presentadoras de antígeno. Medicine – Programa de Formación Médica Continuada Acreditado. 11(28):1720-1727.

- Tasher, D., y Dalal, L. (2012). The genetic basis of severe combined immunodeficiency and its variants. *Appl Clin Genet.* 5:67–80. <http://dx.doi.org/10.2147/TACG.S18693>
- Van Der Burg, M., & Gennery, A. R. (2011). Educational paper: The expanding clinical and immunological spectrum of severe combined immunodeficiency. *Eur J Pediatr.* 170(5):561-571. Recuperado de: <http://doi.org/10.1007/s00431-011-1452-3>
- Vega Robledo, G. B. (2009.). Complejo mayor de histocompatibilidad. *Rev Fac Med UNAM*, 52(2):86-89.
- Villa, A., Notarangelo, L. D., y Roifman, C. M. (2008). Omenn syndrome: Inflammation in leaky severe combined immunodeficiency. *J Allergy clin immunol*, 122(6):1082-1086.
- Worth, A.J., Booth, C., y Veys, P. (2013). Stem cell transplantation for primary immune Deficiency. *Curr Opin Hematol.* 20(6):501–508.