



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**UTILIDAD DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO EN EL
DIAGNÓSTICO DE INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGO

P R E S E N T A:

MARIELA TRUJILLO DE LA CRUZ

DIRECTOR: Dra. LAURA BERRÓN RUÍZ

ASESOR: Dr. RUBÉN MARROQUÍN SEGURA



MÉXICO, D.F. JUNIO 2010



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.

DEDICATORIAS

A mis padres

Adolfo y Guadalupe H.

En especial a mi madre le doy las gracias por todo este tiempo lleno de esfuerzos, sacrificios, dedicación, amor, apoyo, y lucha constante para que saliera adelante y llegará este día de culminación y logró. Gracias más, te quiero mucho

A Herón H. Gracias por ser mi compañero y cómplice, por no dejarme caer en los momentos difíciles, por quererme a tú manera, sencillamente te amo y por darme los 2 hermosos hijos que tenemos. **Valentina y Emiliano** gracias a ustedes este trabajo se culmina porque son el motor, la dirección y la luz de mi vida. Los quiero mucho.

A mi hermana Marlet (Boty). Gracias por tú ayuda, apoyo para el cuidado de Vale en los momentos que más los necesitaba y para que este trabajo llegara a su culminación.

A Mamá Mary (Gore). Por cuidarme, educarme y ser una parte importante en mi vida y por ser lo que soy gracias.

Al Dr. Rafael Trujillo. Por darme la oportunidad de trabajar con él, por ser mi ejemplo a seguir, por el apoyo recibido, y por las charlas durante este tiempo.

A los Goros. A toda mi familia que integran (los Goros), por esos ratos de risas, enojos, peleas y por el apoyo brindado en los momentos difíciles y de felicidad durante este tiempo.

A mis tres ángeles

† Aurelio de la Cruz

† José Trujillo

† Guillermo Dávalos (Pachito)

Porque aunque ya no estén físicamente son parte de mi, gracias a ustedes me doy cuenta de lo vulnerable que es la vida, gracias por su ayuda, apoyo, consejos, por ser 3 estrellas que brillan durante la noche y así darme cuenta que no estoy sola.

A mis amigos de la Fac. Geovany, Hilda, Lucia, Erick, Mauricio, Aurora. Por compartir tanto tiempo, por las patoaventuras, confidencias, enojos, apoyo y alegrías que pasamos juntos y por soportarme.

Y a todos aquellos que omití por equivocación y me ayudaron y a los que no creían en mi Gracias.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis.

Dra. Laura Berrón Ruíz, por la dirección y apoyo para la realización de este trabajo, por permitirme trabajar con ella y por confiar en mí.

A mi asesor.

Al Dr. Rubén Marroquín Segura. Por ser mi asesor, guía y por orientarme para el término de este trabajo.

A mis sinodales.

M. en C. Araceli García del Valle. Por las observaciones y valiosos comentarios para la mejoría de este trabajo

Mtra. Yolanda Flores Cabrera. Por su detallada revisión del trabajo que fue importante para la culminación de esté.

Q.F.B. Francisco Javier Parada García. Por las observaciones y sugerencias para el mejoramiento de este trabajo.

Así mismo agradezco a las autoridades del Instituto nacional de pediatría (INP) por el tiempo en el que se realizó este trabajo.

A la Q.F.B. Elizabeth Guzmán, jefa del laboratorio de Inmunología y Alergia. Por permitirme realizar este trabajo así como los comentarios para la mejora de este.

A todos lo que integran el laboratorio de Inmunología y Alergia y anexos. Angelina, Angi, Gaby, Víctor, Don Cesar, Miriam, Silvia, Esther, etc. Por el tiempo compartido durante la estancia, por sus comentarios, enseñanzas, platicas y risas. Gracias

Y por ultimo dado que sin ellos este trabajo no se hubiera realizado, Gracias a todos los niños que participaron en la realización y culminación de este trabajo.

A DIOS, por darme la fortaleza y no desampararme en ningún momento

CONTENIDO

1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Marco Teórico	4
3.1 Agammaglobulinemia de Bruton (LXA)	5
3.2 Síndrome de HIGM	6
3.3 Inmunodeficiencia Común Variable	7
3.4 Inmunodeficiencia Combinada Severa	7
3.5 Wiskott-Aldrich	9
3.6 Ataxia-Telangiectasia	10
3.7 Síndrome de Di-George	10
3.8 Inmunodeficiencias con defectos del eje interleucina-12 (IL-12) e INF- γ	10
3.9 Determinación de citocinas para el apoyo al diagnóstico de inmunodeficiencias primarias	11
3.10 Técnicas de laboratorio que ayudan al diagnóstico de inmunodeficiencias primarias	12
4. Planteamiento del problema	21
5. Objetivos	22
6. Hipótesis	23
7. Diseño de investigación	24
8. Diagrama de flujo	25
9. Material, equipo y reactivos	26

10. Método	27
10.1 Obtención de muestras	27
10.2 Análisis de leucocitos en sangre periférica	27
10.3 Determinación de la expresión de CD40 y CD154 (CD40L)	27
10.4 determinación intracelular de las citocinas IL-2, IL-12, INF- γ y TNF α	28
10.5 Determinación de los receptores de IL-12, INF-g, IL-2	29
10.6 Determinación de subpoblaciones de células B	30
10.7 Adquisición y análisis	30
11. Resultados	31
12. Análisis de resultados	55
13. Conclusiones	58
14. Anexo	
14.1 Abreviaturas	59
14.2 Preparación de reactivos	61
15. Referencias	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig 1. Esquema de Beckman Coulter Gen's	13
Fig 2. Esquema de Nefelómetro BN II	16
Fig 3. Esquema de Citómetro de flujo FACS Calibur	18
Fig 4. Forma esquemática de células teñidas	19
Fig 5. Clasificación de 113 pacientes	31
Fig 5.1. Porcentaje de los 113 pacientes	32
Fig 6. Clasificación de 28 pacientes según su diagnóstico	34
Fig 6.1. Porcentaje de IDP's	35
Fig 7. Análisis de poblaciones celulares en sangre periférica	36
Fig 8. Análisis de poblaciones CD3, CD4, CD8,CD19,CD16+56	39
Fig 9. Análisis de expresión en subpoblaciones de células B	48
Fig 10. Histograma que muestran expresión de CD154	50
Fig 11. Análisis de expresión del receptor de INF γ y del receptor IL-12 en 2 pacientes con IDP's	51
Fig 12. Análisis de expresión de citocinas INF γ y TNF α	53

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Síntomas y signos de alarma de IDP's	4
Cuadro 2. Tipos de infecciones y riesgos en enfermedades por IDP's	5
Cuadro 3. Valores de referencia para biometría hemática	14
Cuadro 4. Cuenta diferencial de BH (valores absolutos)	14
Cuadro 5. Cuenta diferencial de BH (valores relativos)	15
Cuadro 6. Valores de referencia para inmunoglobulinas séricas	17
Cuadro 7. Fluorocromos más utilizados	20
Cuadro 8. Resultados de biometría hemática e Ig's séricas en 28 pacientes con IDP's	33
Cuadro 9. Números absolutos de leucocitos totales, neutrófilos, linfocitos y monocitos de 17 testigos sanos de 1 a 5 años de edad	37
Cuadro 10. Números absolutos de leucocitos totales, neutrófilos, linfocitos y monocitos de 17 testigos sanos de 6 a 10 años de edad	37
Cuadro 11. Números absolutos de leucocitos totales, neutrófilos, linfocitos y monocitos de 30 testigos sanos de 11 a 17 años de edad	37
Cuadro 12. Números absolutos de leucocitos totales, neutrófilos, linfocitos y monocitos de 19 testigos sanos de edad adulta	38
Cuadro 13. Números absolutos de CD3, CD4, CD8, CD19 y CD16+56 en 17 testigos sanos de 1 a 5 años de edad	39
Cuadro 14. Números absolutos de CD3, CD4, CD8, CD19 y CD16+56 en 17 testigos sanos de 6 a 10 años de edad	40
Cuadro 15. Números absolutos de CD3, CD4, CD8, CD19 y CD16+56 en 30 testigos sanos de 11 a 17 años de edad	40

Cuadro 16. Números absolutos de CD3, CD4, CD8, CD19 y CD16+56 en 19 testigos sanos de edad adulta	40
Cuadro 17. Números absolutos de leucocitos totales, neutrófilos, linfocitos, monocitos, CD3, CD4, CD8, CD19 y CD16+56 en 28 pacientes con IDP's	41
Cuadro 18. Análisis de poblaciones leucocitarias en 7 pacientes con LXA	43
Cuadro 19. Análisis de poblaciones leucocitarias en 8 pacientes con A-T	44
Cuadro 20. Análisis de poblaciones leucocitarias en 4 pacientes con IDCS	45
Cuadro 21. Análisis de poblaciones leucocitarias en 5 pacientes con IDCV	46
Cuadro 22. Análisis de poblaciones leucocitarias en 1 paciente con W-A	46
Cuadro 23. Análisis de poblaciones leucocitarias en 1 paciente con Di-George	47
Cuadro 24. Análisis de poblaciones leucocitarias en 2 pacientes con HIGM	47
Cuadro 25. Porcentaje de expresión de células B de memoria en dos pacientes con IDCV	49
Cuadro 26. Porcentaje de expresión de CD154 en 2 pacientes y dos testigos sanos	50
Cuadro 27. Porcentaje de expresión del receptor de INF γ receptor de IL-12 y CD69	52
Cuadro 28. Porcentaje de expresión de las citocinas INF γ y TNF α en 6 pacientes con Sx. Hemofagocítico y 6 testigos sanos	54

1. RESUMEN.

Las inmunodeficiencias se producen cuando uno o más componentes del sistema inmunitario están defectuosos, las inmunodeficiencias primarias son debidas a defectos intrínsecos de las células que integran el sistema inmune como consecuencias de anomalías genéticas. El presente trabajo de investigación, fue llevado a cabo en el Instituto Nacional de Pediatría (INP), se analizaron pacientes con infecciones recurrentes, resistentes al tratamiento o con probable diagnóstico de inmunodeficiencias primarias (IDP's). Las muestras utilizadas son sangre periférica y se procesaron por la técnica de citometría de flujo, ya que tiene como finalidad ayudar a confirmar el diagnóstico por medio con el análisis de poblaciones celulares; se obtuvieron valores de referencia de poblaciones leucocitarias de la población sana y estos valores sirvieron de comparativo en el análisis de las poblaciones leucocitarias de los pacientes con probable IDP's, se determinó la expresión de moléculas coestimuladoras responsables de algunos tipos de IDP's como CD40L, CD19, CD3, CD22, CD27. También se determinó la expresión de algunas citocinas, para analizar la respuesta funcional de pacientes con probable defecto en el eje IL-12 e INF γ y síndrome hemofagocítico.

Se analizaron 113 pacientes, de los cuales hubo 4 defunciones, 65 pacientes que se les descarto IDP's, 28 pacientes con IDP's. A los 2 pacientes con probable deficiencia del eje INF- γ IL-12, expresaron INF- γ , CD119, IL-12, IL-12R como los controles, los 6 pacientes con Sx hemofagocítico expresaron INF- γ e IL-2 como los controles pero existió una sobre expresión de TNF- α .

2. INTRODUCCIÓN

Las inmunodeficiencias se producen cuando uno o más componentes del sistema inmunitario están defectuosos, éstas se clasifican en primarias y secundarias; las inmunodeficiencias secundarias o adquiridas son debidas a factores extrínsecos, como fármacos, radiaciones, desnutrición, infecciones, malformaciones del tracto urinario o del sistema respiratorio; las inmunodeficiencias primarias (IDP's) son debidas a defectos intrínsecos de las células que integran el sistema inmunitario, y en la mayoría de los casos aparecen como consecuencia de anomalías genéticas, pueden deberse a la alteración de un sólo gen, ser poligénicas o pueden representar la interacción de determinadas características genéticas y factores ambientales o infecciosos. Representan un grupo heterogéneo que se caracteriza por la predisposición a enfermedades infecciosas, autoinmunitarias y procesos cancerosos.

El concepto de IDP's y su desarrollo comienza con el descubrimiento de la agammaglobulinemia tipo Bruton en 1952, a partir de entonces se inicia la investigación de estas enfermedades que enseguida se relaciona con las anomalías de la ontogenia del sistema inmunitario, desde 1950 a 1965 se describen las IDP's más características, sin embargo, el número de IDP's ha incrementado con el tiempo, registrándose 34 formas en 1973, 66 en 1989 y cerca de un centenar en la actualidad. La clasificación de las inmunodeficiencias primarias más actualizada está bajo la revisión de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la última clasificación se publicó en 2003 y clasifica a las inmunodeficiencias conocidas en ocho grupos; los desórdenes congénitos de la inmunidad son raros, en la mayoría de los casos se trata de enfermedades hereditarias cuya clasificación se encuentra en una revisión continua a medida que se producen progresos en la inmunología. El diagnóstico de las IDP's está basado principalmente en los datos clínicos y la historia familiar sin embargo con el uso de técnicas como la citometría de flujo que permite el análisis de las poblaciones leucocitarias en donde se puede observar si hay disminución o no se detecta alguna población en particular. El propósito de este trabajo es determinar la utilidad diagnóstica de la citometría de flujo en sangre periférica de pacientes con

probable IDP's , se evaluarán poblaciones leucocitarias CD3, CD4, CD8, CD19, CD 16+56 y CD45 en sangre periférica de pacientes con probable IDP's y población sana, se establecerán valores de referencia de las poblaciones leucocitarias con la población sana, se determinará la expresión de CD154 (CD40L) y CD40 en pacientes con síndrome de HIGM, determinación intracelular de las citocinas $INF\gamma$ y $TNF\alpha$ en pacientes con síndrome hemofagocítico, se determinará intracelularmente las citocinas IL-12, $INF\gamma$ en pacientes para identificar defectos en el eje IL-12 e $INF\gamma$, se determinará la expresión de CD27, CD22 en pacientes con IDCV.

La utilidad de este trabajo es que la citometría de flujo es una herramienta de laboratorio que nos proporciona mucha información acerca de los inmunofenotipos de las poblaciones celulares y da información importante al clínico para que este pueda dar un diagnóstico y a su vez un tratamiento oportuno y por ende el paciente tenga una mejor calidad de vida.

4. MARCO TEÓRICO

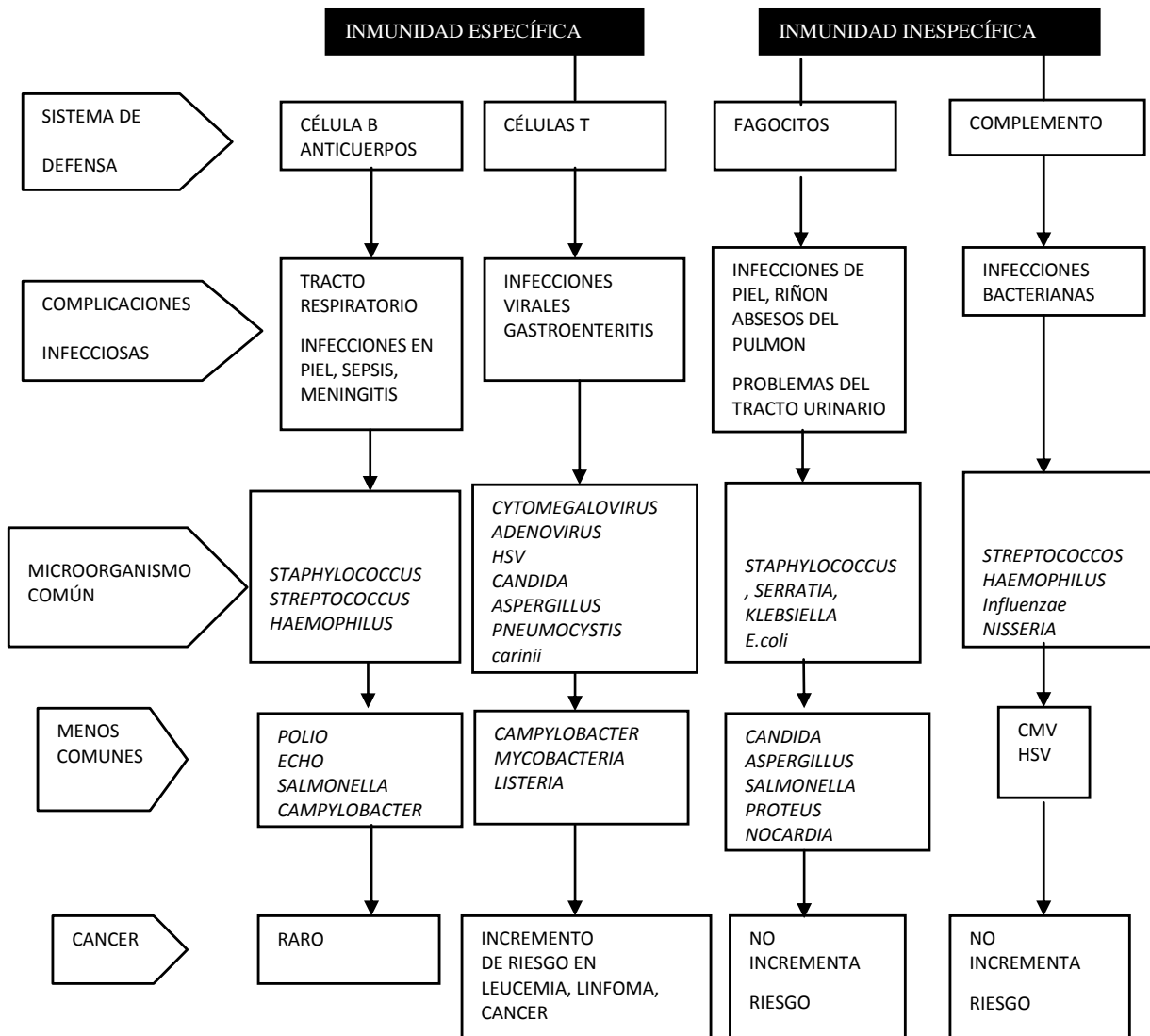
Las inmunodeficiencias primarias se presentan fundamentalmente en forma de infecciones recurrentes, según el tipo de infección puede sospecharse la existencia de la deficiencia inmunitaria; sin embargo las infecciones son sólo un elemento de orientación, ya que existe un buen número de casos intermedios y de formas de difícil definición, la edad de aparición y la gravedad de las infecciones varían según el tipo de deficiencia, se presentan con mayor frecuencia (60%) en lactantes o niños¹. en el cuadro 1 se exponen los síntomas y signos de alarma de una IDP's

Síntomas y signos de alarma de IDP's (Cuadro 1)

Historia médica	Examen físico
8 o más otitis en el año	Retraso de crecimiento
2 o más sinusitis serias en el año	Ausencia de amígdalas o nódulos linfoides
2 o más neumonías en el año	Lesiones cutáneas
2 o más infecciones profundas en el año o de localización no habitual	Telangiectasias, petequias, eccemas severos, etc.
Infecciones recurrentes cutáneas profundas o abscesos en órganos	Ataxia (con telangiectasias)
Necesidad frecuente de usar medicación IV para curar infecciones	Candidiasis bucal después del año
Infecciones por organismos no habituales u oportunistas	Úlceras bucales
Historia familiar de inmunodeficiencias	

El tipo de infección identificado en los pacientes nos da un indicio del tipo de defecto, las infecciones bacterianas recurrentes del sistema respiratorio están asociadas a defectos de células B², por otro lado, pacientes que presentan infecciones con *Pneumocystis carinii* ó microorganismos intracelulares puede tener deficiencias de células T. En el cuadro 2 se muestra con mayor detalle las complicaciones de las inmunodeficiencias primarias según los diferentes sistemas de defensa.³

Cuadro 2. Tipos de infecciones y riesgos en enfermedades por IDP's



3.1 AGAMMAGLOBULINEMIA DE BRUTON

El coronel Ogden C. Bruton 1952, fue un pediatra militar que identificó el primer caso de agammaglobulinemia en un varón de 8 años que desde los 4 años presentaba artritis, otitis y otras infecciones neumocócicas, las manifestaciones clínicas, en los pacientes con agammaglobulinemia ligada al X (LXA), aparecen después del segundo semestre de vida, se encuentran bien hasta esa edad ya que están protegidos por la IgG materna que atraviesa la placenta, después presentan infecciones piógenas, o de curso prolongado como otitis, sinusitis, conjuntivitis, neumonías o piodermitis; los gérmenes

habitualmente implicados son el *Haemophilus influenzae* y el *Streptococcus pneumoniae* y con menor frecuencia el *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*.^(4,5)

Este trastorno se identifica mediante la deficiencia marcada o ausencia absoluta de las cinco clases de inmunoglobulinas séricas, actualmente se sabe que las LXA es producida por mutaciones en el gen Btk, cuyo producto es un tirosina cinasa de Bruton, imprescindible para la ontogenia de las células B, por lo que los linfocitos B quedan arrestados en el estadio pre-B; los pacientes con LXA no expresan células B en sangre periférica, por lo que determinación de esta población por citometría de flujo es importante para orientar el diagnóstico de LXA, las pruebas confirmatorias serían la determinación de la expresión de la proteína Btk, con una tinción intracelular por citometría de flujo y también los estudios moleculares para determinar la mutación.^(6,7)

3.2 SÍNDROME DE HIGM

La inmunodeficiencia con Hiper-IgM (HIGM) se caracteriza por la presencia de valores elevados a normales de IgM (rango desde 150 hasta 1000 mg/dL) acompañados de una deficiencia de IgG e IgA, la enfermedad se presenta con infecciones piógenas recurrentes, incluyendo otitis media, neumonía y septicemia; la neumonía causada por *Pneumocystis carinii* es una infección inicial muy frecuente. Algunos pacientes sufren neutropenia recurrente, anemia hemolítica o anemia aplásica, aquellos que logran sobrevivir a los 20 años de edad suelen desarrollar enfermedad hepática crónica o hematoma⁽⁸⁾. En la mayoría de los casos este trastorno se hereda de un modo ligado al cromosoma X, aunque se han reportado muchos casos de una forma adquirida que afecta ambos sexos. HIGM suele originarse debido a una mutación del gen codificador del ligando de CD40 (CD154) en las células T, el defecto genético en CD154 fue descrito por primera vez en 1993⁽⁹⁾. Los pacientes que tienen esta mutación son referidos como X-HIGM ó HIGM tipo1 aunque la mayoría de los pacientes con Hiper-IgM tienen defectos en el gen CD154, se han reportado formas autosómicas recesivas y autosómicas dominantes de esta enfermedad que indica la presencia de otros defectos genéticos. En todos los casos la enfermedad es autosómica recesiva y se ha diagnosticado con base en la falta de expresión en CD40 en la superficie de células B y

monocitos, los hallazgos clínicos de estos pacientes son idénticos a los reportados en los pacientes con deficiencia de CD154, con infecciones recurrentes debido a bacterias oportunistas.

3.3 INMUNODEFICIENCIA COMÚN VARIABLE

La Inmunodeficiencia común variable (CVID) se describió en 1953, los pacientes con CVID es la formación defectuosa de anticuerpos; los defectos genéticos en CVID no se conocen, aunque se han identificado diversas anormalidades. Los defectos más notorios se encuentran en las células B ya que la diferenciación terminal y la hipermutación somática se encuentran alteradas además de defectos en la señalización y pérdida en el cambio de isotipo⁽¹⁰⁾. Se ha identificado un subgrupo de estos pacientes que tienen una reducción severa de células B de memoria y esta correlaciona con la enfermedad clínica en CVID⁽¹¹⁾.

3.4 INMUNODEFICIENCIA COMBINADA SEVERA.

La inmunodeficiencia combinada severa (IDCS), se debe a defectos del desarrollo linfoide que afectan a las células T solas o en combinación con células B y NK, ésta se caracteriza por un número bajo de linfocitos circulantes, hay incapacidad de inducir inmunoreacciones mediadas por la célula T, no se desarrolla el timo y los pocos linfocitos T circulantes no reaccionan a la estimulación con mitógenos por lo cual no son capaces de proliferar en respuesta a los antígenos; las células mieloides y eritroides son normales en número y función, lo que indica que sólo son deficientes las células linfoides. En la actualidad se conocen por lo menos cinco tipos genéticos de IDCS.⁽¹²⁾

Deficiencia de la cadena gamma común de linfocitos T receptores para factores del crecimiento.

Afecta casi al 45% de todos los casos, esto se debe a una mutación en un gen en el cromosoma X que codifica una cadena compartida por receptores para factores del crecimiento en la superficie de los linfocitos T y linfocitos NK, este componente (γ_c por la cadena gamma común), es necesario para el crecimiento normal y la función de los linfocitos T. Las mutaciones en este gen resultan en recuentos muy bajos de linfocitos T

y linfocitos NK sin embargo el recuento de linfocitos B es normal sin embargo su función es muy pobre. ⁽¹²⁾

Deficiencia de Cinasa Janus 3.

Esta es provocada por una mutación en un gen del cromosoma 19 que codifica una enzima llamada Cinasa Janus3 (JAK 3 por sus siglas en ingles), esta enzima es necesaria para la función de la cadena gamma común γ c. los niños con este tipo de IDCS tienen los mismos tipos de conteo de linfocitos T, B y NK. ⁽¹²⁾

Deficiencia de la cadena alfa del receptor IL-7.

Esta se debe a mutaciones en el gen del cromosoma 5 que codifica un componente de factor de crecimiento de linfocitos T, la cadena alfa del receptor IL-7. Los niños con este tipo de IDCS tienen linfocitos B y NK pero no tienen linfocitos T; por lo que los linfocitos B no producen el efecto debido por la falta de linfocitos T. ⁽¹²⁾

Deficiencia de Adenosina Deaminasa.

Esta es provocada por mutaciones en el gen del cromosoma 20 que codifica una enzima llamada adenosina deaminasa que es esencial para la función metabólica de una variedad de células en el cuerpo, pero esencialmente de los linfocitos T, la ausencia de esta enzima provoca una acumulación de productos tóxicos metabólicos dentro de los linfocitos lo que ocasiona su muerte. Los niños con este tipo de IDCS tienen el menor recuento de linfocitos totales y el recuento de linfocitos T, B y NK son muy bajos. ⁽¹²⁾

Deficiencia de genes Activadores de Recombinasa.

Esta se debe a mutaciones en genes en el cromosoma 11 que codifica enzimas necesarias para el desarrollo de los receptores que reconocen el antígeno de los linfocitos T y B. Estos genes son llamados genes activadores de recombinasa 1 y 2 (RAG 1 y RAG 2). Los niños con este tipo de IDCS carecen de linfocitos T y B pero tienen linfocitos NK. ⁽¹²⁾

3.5 WISKOTT-ALDRICH

El síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) fue descrito por Wiskott en 1937, en dos varones de una misma familia alemana con los datos de púrpura trombocitopénica crónica, eccema e infecciones recurrentes. En 1954, Aldrich, en los EUA reportó una familia con la tríada característica y el rasgo de transmisión ligado al cromosoma X, se trata de una enfermedad poco frecuente con incidencia de 3.5 a 5.2 casos por cada millón de recién nacidos masculinos; es una enfermedad de transmisión recesiva ligada al cromosoma X y está caracterizada por eccema, trombocitopenia y susceptibilidad a las infecciones bacterianas, al comienzo de la enfermedad el recuento de linfocitos es normal y el defecto fundamental es la incapacidad para sintetizar anticuerpos en respuesta a antígenos polisacáridos independientes de los linfocitos T, lo que provoca que los pacientes sean susceptibles a infecciones por bacterias piógenas encapsuladas. A medida que avanza la edad, el número de linfocitos desciende y se agrava la inmunodeficiencia, causando infecciones letales o enfermedad linfoide maligna, al comienzo de la enfermedad el individuo presenta números normales de linfocitos T y B. El W-A se manifiesta por primera vez mediante reacciones defectuosas a los polisacáridos bacterianos, también por las concentraciones disminuidas de IgM, a medida que aumenta la edad del individuo sobrevienen las infecciones bacterianas recurrentes y pérdida gradual de las reacciones humorales y celulares. El gen defectuoso responsable en este síndrome codifica una proteína citoplásmica que sólo se expresa en las células derivadas de la médula ósea que establecen interacciones con moléculas adaptadoras, como Grb-2, y con proteínas G pequeñas de la familia Rho que regulan el citoesqueleto de actina. ⁽¹³⁾

3.6 ATAXIA- TELANGIECTASIA

Es un trastorno autosómico recesivo de la infancia que se reconoció como un síndrome de ruptura cromosómica, caracterizado por ataxia cerebelosa progresiva con degeneración de las células de Purkinje del cerebelo, hipersensibilidad a los rayos X e incidencia de cáncer elevada, el componente vascular de la enfermedad se manifiesta en forma de telangiectasia en la esclerótica, los párpados y los espacios antecubital y poplíteo; ésta anomalía vascular progresiva evoluciona cuando el niño tiene un año y

medio a cinco años de edad, acompañándose de alteraciones progéricas de la piel y el cabello.

Los pacientes presentan infecciones bacterianas respiratorias superiores y bajas y múltiples fenómenos de autoinmunidad, el gen responsable de esta enfermedad se encuentra en el cromosoma 11 y codifica una proteína relacionada con la enzima fosfatidilinositol-3 cinasa, que participa en la activación de los linfocitos T.⁽¹⁴⁾

3.7 SÍNDROME DE DI-GEORGE

Se caracteriza por la aparición de múltiples anomalías en el desarrollo de la tercera y cuarta bolsas faríngeas. Estos pacientes presentan ausencia total de respuestas inmunitarias de tipo celular debida a la hipoplasia o ausencia del timo, tetania (ausencia de paratiroides) y cardiopatías congénitas y malformaciones de los grandes vasos, la ausencia de inmunidad celular se refleja en los bajos recuentos de linfocitos T circulantes y la pobreza de las defensas frente a determinadas infecciones virales y por hongos. Las concentraciones de inmunoglobulinas suelen ser normales, este síndrome no es hereditario sino, aparentemente, secundario a una lesión fetal intrauterina que se produce hacia la octava semana de gestación.⁽¹⁵⁾

3.8 INMUNODEFICIENCIAS CON DEFECTOS DEL EJE INTERLUCINA-12 (IL-12) E INTERFERÓN GAMMA (INF- γ)

La activación y proliferación de células inmunocompetentes es una consecuencia de una respuesta exitosa contra un agente infeccioso, la respuesta inmune a todos los patógenos, es al menos en parte, dependiente de citocinas que regula todas la células del sistema inmune⁽¹⁶⁾ M. tuberculosis no es la excepción, se conoce que la patogénesis de esta enfermedad involucra una importante respuesta inmune celular, en la que el macrófago y el linfocito T cooperan con la activación y señalización de la citocinas INF- γ , la IL-12 y sus respectivos receptores, que van a ser importantes para la eliminación de M. tuberculosis⁽¹⁷⁾. Recientemente, se han descrito defectos que correlacionan con una eliminación ineficiente de las infecciones por micobacteria; en algunos individuos con este problema se han detectado mutaciones en los genes que codifican para la subunidad p40 de la IL-12 (IL-12p40); defectos en la expresión de la

cadena $\beta 1$ del receptor para la IL-12 (IL-12R $\beta 1$); defectos en la expresión del receptor para INF- γ (INF- γ R); o bien, defectos en la vía de señalización a través de STAT-1.⁽¹⁸⁾

3.9 DETERMINACIÓN DE CITOCINAS PARA APOYO AL DIAGNÓSTICO DE IDP's

La respuesta de células mediadas por estimulación es funcionalmente caracterizada con base en los niveles de expresión de algunas citocinas, la expresión de estas en linfocitos activados es usada para detectar inmunodeficiencias primarias; la ventaja es que provee una determinación e identificación rápida de citocinas en subclases de leucocitos. Los ensayos de activación linfocitaria evalúan principalmente la detección directa de expresión de citocinas con anticuerpos anticitocinas monoclonales conjugados en leucocitos activados en cortos periodos (6 horas) con varios estímulos, la estimulación puede ser en células mononucleares, sangre total, nudos linfáticos u otros fluidos biológicos. Los leucocitos no estimulados normalmente no expresan citocinas < 0.05%, en cambio cuando se incuban en presencia de mitógenos hay una producción de citocinas, y la secreción es inhibida con monensin o befeldina A, para que se pueda determinar la expresión de la citocina directamente en la célula^(19,20)

3.10 TÉCNICAS DE LABORATORIO QUE AYUDAN AL DIAGNÓSTICO DE LAS IDP's

Para diagnosticar a un niño con sospecha de inmunodeficiencia primaria es necesario preguntarse si existe una historia familiar de inmunodeficiencias y particularmente si hay varones afectados en la familia, si la clínica se ha iniciado antes de los 6 meses, puede tratarse de una inmunodeficiencia severa que afecta a la inmunidad humoral y celular. Las inmunodeficiencias humorales se inician después de los 6 meses, coincidiendo con la baja de anticuerpos transferidos por la madre; el siguiente paso sería hacer una biometría hemática completa⁽²¹⁾, ya que este tipo de examen permite dar al clínico una mejor visión de cómo se encuentra el paciente ya que este estudio permite valorar tres líneas celulares cada una con funciones diferentes entre sí, pero que son producidas en la médula ósea que son; eritrocitos, leucocitos y plaquetas⁽²²⁾.

La medición de cada uno de los parámetros que conforman la biometría hemática se realiza en equipos automatizados (Coulter), el cual es utilizado para el diagnóstico in vitro en el laboratorio. Proporciona un análisis completo de 5 componentes (Neutrófilos, Linfocitos, Monocitos, Eosinófilos y Basófilos) ⁽²³⁾.

El fundamento de este equipo: cuenta y mide las células detectando y midiendo los cambios en la resistencia eléctrica a medida que la célula, en un líquido conductivo, pasa a través de una pequeña apertura. Las células de la sangre suspendidas en un líquido conductivo (diluyente Isoton) actúan como aisladores eléctricos, la suspensión de células es extraída a través de la apertura por un vacío suave; un flujo de corriente eléctrica se establece entre dos electrodos sumergidos en el baño de conteo, uno se encuentra localizado dentro del armazón de la apertura (llamado electrodo interno), a medida que cada célula pasa a través de la apertura, momentáneamente aumenta la resistencia para el flujo de corriente eléctrica. Esto causa un pulso eléctrico que puede contarse y medirse. El tamaño (amplitud) del pulso eléctrico es proporcional al volumen de la célula ⁽²⁴⁾.



Figura. 1 Esquema de BeckmanCoulter GenS. Equipo para realizar biometría hemática.

La medición de los eritrocitos puede realizarse por medio de impedancia, o por técnicas que dispersen la luz, usando láser LED o tungsteno o una combinación de las dos tecnologías. Las plaquetas pueden contarse y clasificarse por tamaño con impedancia, la dispersión de la luz, o una combinación de las dos ⁽²³⁾; la cuenta total de leucocitos se realizan por métodos automatizados, en los cuales se utiliza un líquido como vehículo para su conteo, ya que este permite el paso de las células a través de la zona de detección, en donde se realiza un análisis multiparámetro en la misma célula combinando las señales de varios sensores; en donde la zona de detección puede ser: óptica, de conductancia, de impedancia o de una combinación de todas; y los sensores colocarse para observar la dispersión frontal de la luz, la dispersión lateral, la dispersión en ángulo estrecho o amplio, la dispersión de la luz polarizada o la fluorescencia ⁽²³⁾. Y la cuenta diferencial de los leucocitos se realiza por medio de un conteo de 100 células teñidas previamente con la tinción de Wright, en donde lo normal sería encontrar neutrófilos de mayor grado de maduración ⁽²²⁾.

A continuación se presentan valores de referencia de la biometría hemática, en los cuadros 3, 4 y 5. ⁽²³⁾

Cuadro 3. Valores de referencia para la biometría

Edad	Eritrocitos X 10 ³ /μL	Hemoglobina g/dL	Hematocrito %	VCM fL	HCM Pg	Plaquetas X 10 ³ /μL	Leucocitos X 10 ³ /μL
1 año	4.10 – 5.0	11.1 – 14.1	36 – 50	80 – 96.1	27.5-33.2	140-400	6.0-17.5
4 años	4.10-5.90	11.2-14.3	36-45	80-90	27.5-33.2	172-450	5.5-15.5
6 años	4.10-5.90	11.4-14.5	36-45	80-90	27.5-33.2	172-450	5.0-14.5
10 años	4.10 – 5.90	M: 11.2-13.6 H: 11.5-14.8	36 – 45	80-90	27.5-33.2	172-450	4.5-13.5
16 años	4.10 – 5.90	M: 10.9-15.7 H: 10.7-13.5	36-45	80 – 90	27.5-33.2	172-450	4.5-11.0

Cuadro 4 Cuenta diferencial (valores absolutos)

Edad	Linfocitos X 10 ³ /μL	Monocitos X 10 ³ /μL	Segmentados X 10 ³ /μL	Bandas X 10 ³ /μL	Eosinófilos X 10 ³ /μL	Basófilos X 10 ³ /μL
1 año	4.0 - 10.5	0.05 - 1.1	1.0 - 8.5	0 – 0.5	0.05 – 0.7	0 – 0.20
4 años	2.0 – 8.0	0 – 0.08	1.5 – 7.5	0 – 1.0	0.02 – 0.65	0 – 0.2
6 años	1.5 – 7.0	0 – 0.08	1.5 – 7.5	0 – 1.0	0.02 – 0.65	0 – 0.2
10 años	1.5 – 6.5	0 – 0.08	1.8 – 7.0	0 – 1.0	0 – 0.60	0 – 0.2
16 años	1.0 – 4.8	0 – 0.08	1.8 – 7.0	0 – 1.0	0 – 0.45	0 – 0.2

Cuadro 5. Cuenta diferencial (valores relativos)

Edad	Linfocitos %	Monocitos %	Segmentados %	Eosinófilos %	Basófilos %
1 año	32.0 – 65.4	6.3 – 12.6	14.7 – 51.6	0 – 4.6	0 – 1
4 años	14.1 – 55.0	4.3 – 8.9	30.3 – 74.3	0 – 4.3	0 – 1
6 años	14.1 – 55.0	4.4 – 8.7	36.3 – 74.3	0 – 5.8	0 – 1
10 años	14.1 – 55.0	4.4 – 8.7	36.3 – 74.3	0 – 5.5	0 – 1
16 años	13.4 – 42.8	4.7 – 9.1	41.2 – 75.5	0 – 5.5	0 – 1.1

En algunos pacientes se puede encontrar una velocidad de sedimentación normal indica que no hay infección bacteriana crónica, si los neutrófilos se encuentran dentro de los valores de referencia, se eliminan las neutropenias congénitas y adquiridas y defectos graves de la quimiotaxis. Si la cuenta de linfocitos es normal, el paciente no debe tener un defecto grave de células T. Sin embargo es importante recordar que las cuentas de linfocitos normales, son muy altas en la infancia. Si la cuenta de plaquetas es normal se excluye el síndrome de Wiscott-Aldrich.⁽²⁵⁾

Por otra parte es importante realizar la determinación de inmunoglobulinas, ya que estas son producidas por células plasmáticas como respuesta inmuno-humoral al contacto del sistema inmunitario con un antígeno, después del contacto inicial, en la respuesta primaria, se forman los anticuerpos de la clase IgM, seguidos por IgG e IgA. La determinación cuantitativa de las inmunoglobulinas por medio de la nefelometría, proporciona el estado actual en el que se encuentra el sistema inmunitario humoral⁽²⁶⁾.

Esta técnica se basa en que las proteínas contenidas en líquidos corporales humanos, forman una reacción inmunoquímica con anticuerpos específicos, inmunocomplejos, los cuales pueden dispersar un rayo de luz incidente, la intensidad de luz dispersada es proporcional a la concentración de la inmunoglobulina correspondiente en la muestra; la valoración se hace por comparación con un estándar de concentración conocida, la dispersión de la luz implica una interacción directa entre la luz y la partícula que golpea. Cuando un haz de luz golpea una partícula, su campo eléctrico mueve los electrones de la partícula en una dirección próxima al núcleo⁽²⁷⁾.

Los nefelómetros constan de una fuente de luz, un filtro de luz incidente, un dispositivo de sujeción de la muestra y un detector en ángulo fijo, para evitar la transmisión directa de la luz. Con la finalidad de que los filtros para las luces incidente y emitida se fijen a la misma longitud de onda⁽²³⁾, la longitud de onda óptima para la dispersión de complejos antígeno-anticuerpo formados en su totalidad se acerca a 460 nm.



Figura. 2. Esquema de nefelómetro BN II. Behring. Equipo para la determinación de inmunoglobulinas.

En el cuadro 6 se presentan los valores de referencia de inmunoglobulinas.

Cuadro6. Valores de referencia de Ig's son ⁽²³⁾:

Edad	IgG (mg/dL)	IgM (mg/dL)	IgA (mg/dL)
12 meses	331 – 1164	40 – 161	13 – 104
24 meses	402 – 1008	45 – 159	13 – 121
36 meses	423 – 1089	44 – 190	21 – 157
4 – 5 años	444 – 1186	40 – 186	24 – 152
6 – 8 años	607 – 1228	45 – 196	32 – 199
9 – 10 años	583 – 1509	49 – 229	44 – 233
11 – 99 años	613 – 1295	53 – 334	69 – 608

Un estudio de proteínas totales con relación albúmina globulina es de mucha utilidad, ya que en las inmunodeficiencias humorales puede demostrarse un nivel bajo en relación con las globulinas, por ejemplo el Síndrome de HiperIgM, deficiencia selectiva de IgA, agammaglobulinemia ligada al X, inmunodeficiencia común variable, etc. ⁽¹⁵⁾. Hay que recordar que debe tomarse el valor de referencia normal de acuerdo a la edad del paciente ya que los valores cambian a diferentes edades.

La citometría de flujo tiene su origen en 1954, cuando Wallace Coulter diseñó un instrumento con el cual era posible contar y medir electrónicamente una célula que se hacía pasar de una en una en un líquido que la conducía, este instrumento se convirtió en el primer analizador de flujo; el desarrollo de esta técnica es sólo comparable con el descubrimiento de los anticuerpos monoclonales o con el desarrollo de las computadoras personales. De aquel diseño de 1954, hoy se cuenta con múltiples instrumentos especializados capaces de medir hasta 13 parámetros en la célula haciendo pasar más de 25,000 de éstas por segundo, el análisis de antígenos de superficie se lleva a cabo actualmente de manera rutinaria en laboratorios clínicos de todo el mundo, las aplicaciones que se han desarrollado en los últimos años, incluyen el diseño de complejos experimentos aplicados a la inmunología, microbiología, análisis clínicos, biología molecular y separación celular por mencionar algunos. ^(29, 30,31)

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular, que simultáneamente mide y analiza características de partículas individuales en suspensión, estas pasan en un chorro de fluido a través de un rayo de luz ⁽³²⁾. Las propiedades que se miden son el tamaño relativo de las partículas, la complejidad relativa o granularidad, y la intensidad de fluorescencia relativa; y esta se utiliza en el recuento de linfocitos, CD3 (Linfocitos T totales), CD4/CD3 (T helper), CD8/CD3 (Linfocito T citotóxico), CD19 (Linfocitos B) y CD16+56 (Células NK).



Figura 3. Representación del citómetro de flujo FACSCalibur BD.

Un citómetro de flujo está constituido por tres sistemas que son ⁽²⁹⁾:

- Sistema de fluidos.- se encarga de transportar las partículas en un chorro hasta el rayo láser para ser analizadas.
- Sistema de óptica.- consta de uno o varios láser para iluminar las partículas en el chorro, un sistema de lentes y filtros para dirigir la luz y coleccionar las señales luminosas.
- Sistema electrónico.- convierte las señales ópticas en señales digitales proporcionales, procesarlas por computadora.

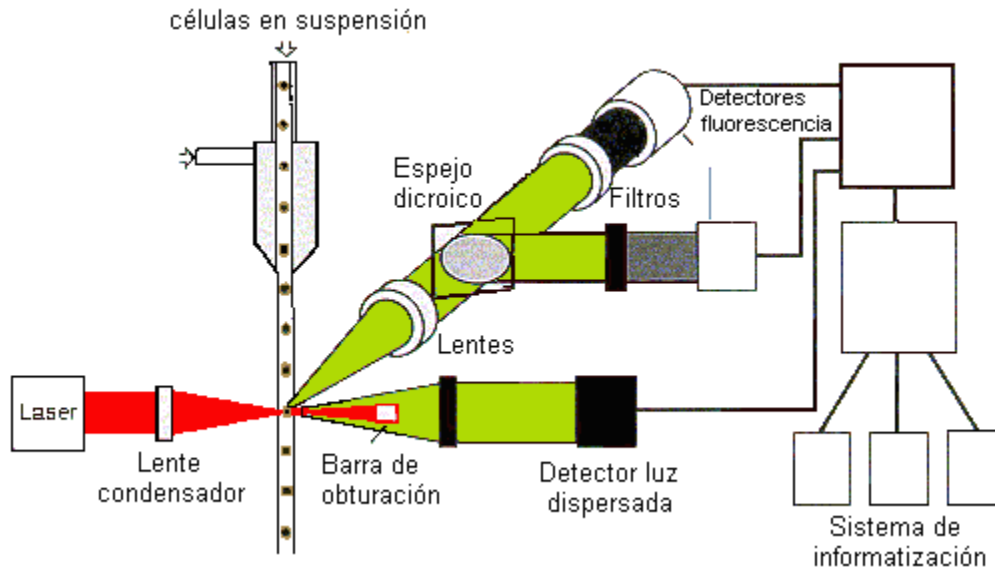


Figura 4. De forma esquemática, las células teñidas entran en la cámara de flujo de una en una y, al pasar por delante de un haz de luz de láser, emiten una luz fluorescente y dispersada, que es separada de acuerdo a su longitud de onda por filtros apropiados y espejos. Estas señales luminosas son recogidas por detectores y la información se integra y analiza adecuadamente por un sistema informático.

El láser más utilizado en la citometría de flujo, es el Ion-argón, la luz de 488nm de longitud de onda (azul), tiene la capacidad de excitar varios de los fluorocromos más utilizados⁽³⁰⁾.

Los fluorocromos son moléculas químicas que absorben luz a una determinada longitud de onda y emiten a otra diferente. En la citometría de flujo los anticuerpos monoclonales están conjugados con diferentes tipos de fluorocromos, siendo la intensidad de fluorescencia detectada por el citómetro y esto siendo directamente proporcional al número de moléculas unidas al antígeno⁽²⁹⁾. En el cuadro 7 se presentan algunos de los fluorocromos más utilizados.

Cuadro. 7 Fluorocromos más utilizados

Nombre	Abreviatura	Long. de onda	Color
Isotiocianato de Fluoresceína	FITC	530 nm	Verde
Ficoeritrina	PE	585 nm	Naranja
Clorofilperhidrina	PerCP	670nm	Rojo
Aloficocianina	APC	661nm	Rojo

El uso de la citometría de flujo para el diagnóstico de IDP, se realiza por medio de anticuerpos monoclonales y la expresión de ciertos marcadores celulares (fenotipos) y la asociación de fenotipos con estado de diferenciación y función ⁽³³⁾. Clínicamente pueden definirse los defectos y definirse las células responsables de las inmunodeficiencias y determinar los efectos y el tratamiento en estos pacientes. Sin embargo debemos de hacer énfasis en las enfermedades de IDP's, en donde se encuentran disminuidas o no son detectables algunas de las poblaciones leucocitarias o proteínas involucradas en los defectos de estas enfermedades, y en donde técnicas como la citometría de flujo son importantes ya que con esta se apoya el diagnóstico clínico del paciente.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cuál es la utilidad diagnóstica de la citometría de flujo para identificar IDP's?

El diagnóstico de las inmunodeficiencias primarias está basado principalmente mediante los datos clínicos y la historia familiar, la utilización de técnicas como la biometría hemática, la nefelometría para la cuantificación de inmunoglobulinas y la citometría de flujo que realiza el análisis de poblaciones leucocitarias en donde se puede observar cuando hay disminución, o no se detecta alguna población en particular. Estos estudios en conjunto proporcionan un mayor panorama del estado en el que se encuentra el paciente, por lo que ayudan a proporcionar la información a tiempo, para que el clínico pueda dar un diagnóstico oportuno y por consiguiente un tratamiento eficaz y a su vez una mejor calidad de vida. La citometría de flujo es una técnica que está empezando a tener gran utilidad en el diagnóstico de IDP's, por esta razón fue importante establecer los valores de referencia de las poblaciones leucocitarias con la población sana, la cual se utilizó como control comparativo en la determinación de estas células .para compararlas con las poblaciones leucocitarias de los pacientes con probable IDP's, ya que este análisis es importante para medir el comportamiento de los leucocitos en sangre periférica en los pacientes y determinar junto con los datos clínicos si el paciente padece una IDP's. Además la determinación de moléculas involucradas en los diferentes fenotipos de IDP's, como CD40L (CD154), CD3, CD19, IL-12, INF γ , etc. Esto nos permitió diagnosticar de manera específica el tipo de IDP's. En México la implementación de la citometría de flujo como un panel de pruebas para IDP's es de gran ayuda para el diagnóstico y el futuro tratamiento para el paciente.

5. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

Determinar la utilidad diagnóstica de la citometría de flujo en pacientes con probable IDP's e identificar los posibles defectos de los pacientes con IDP's.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Evaluar las poblaciones leucocitarias CD3, CD4, CD8, CD19, CD16+56 CD45, mediante el uso de la citometría de flujo en sangre periférica de pacientes con probable inmunodeficiencia primaria y en población sana del Instituto Nacional de Pediatría (INP).
- Establecer Valores de Referencia de las poblaciones leucocitarias, con la población sana y compararlos con los valores de los pacientes con IDP's.
- Determinación de la expresión de CD154 (CD40L) y CD40 en pacientes con IDP's para identificar los síndromes de HIGM.
- Determinación intracelular de las citocinas INF- γ y TNF α en pacientes con IDP's para determinar funcionalidad celular en pacientes con síndrome hemofagocítico.
- Determinación intracelular de las citocinas IL-12, INF- γ en pacientes con IDP's identificar defectos en el eje IL-12 e INF- γ .
- Determinación de la expresión de receptores IL-12, INF-gamma en pacientes con IDP's identificar defectos en el eje IL-12 e INF- γ .
- Determinación de la expresión de CD27, CD22 en pacientes con IDP's establecer subpoblaciones de células B en pacientes con CVID.

6. HIPÓTESIS

Las determinaciones de poblaciones celulares, así como de citocinas, receptores de citocinas y moléculas coestimuladoras por medio de la citometría de flujo, tienen utilidad para el apoyo del diagnóstico de algunas inmunodeficiencias primarias.

7. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

Tipo de estudio: Prospectivo, descriptivo, transversal.

Población: Niños y niñas que se sospeche de diagnóstico de inmunodeficiencia primaria, a partir de recién nacidos hasta 18 años.

Criterios de Inclusión.

- Niños y niñas
- Edad de recién nacidos a 18 años
- Con probable diagnóstico de IDP
- Que cuenten con resultados de biometría hemática, inmunoglobulinas séricas y citometría de flujo.
- Asistan al servicio de Infectología, Neonatología, Inmunología, Urgencias, Medicina Interna y Unidad de Terapia Intensiva del INP.
- En el periodo de enero del 2008 a enero del 2009.
- Firmar carta de consentimiento informado.

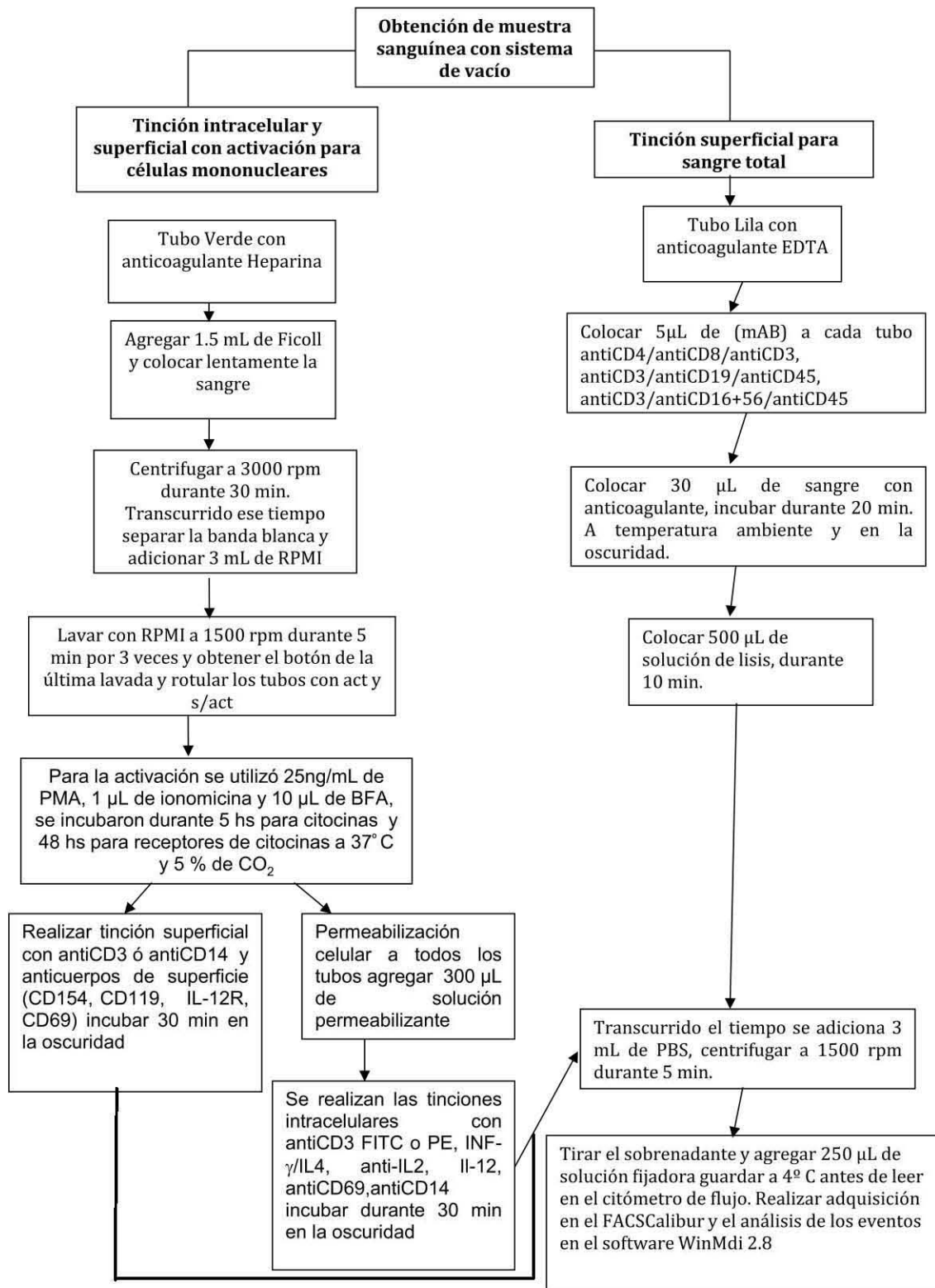
Criterios de Exclusión.

- Que no firmen la carta de consentimiento informado.

Criterios de Eliminación.

- Muestras que no puedan ser procesadas.
- Muestras que no cumplan con los criterios de inclusión
- Aquellos pacientes cuya muestra no permita la realización del estudio.

8. DIAGRAMA DE FLUJO



9. MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS

MATERIAL

- Sangre periférica anticoagulada de pacientes.

EQUIPO

- Agitador Vortex®
- Campana de Extracción
- Centrifuga (Solbat)
- CitómetroFacsCalibur®
- Pipeta automática de 5– 50 μ L
- Pipeta automática de 100-1000 μ L
- Pipetas graduadas de 5 mL
- Pipetas graduadas de 10 mL
- Tubos Falcon®
- Tubos Vacutainer® (con EDTA y Heparina)
- Puntas para pipeta automática de 100 y 1000 μ L
- Cámara de Neubauer

REACTIVOS

- Anticuerpos monoclonales antiCD4 FITC, antiCD8 PE, antiCD3 PerCP; antiCD3 FITC, antiCD19 PE, antiCD45 PerCP y por último antiCD3 FITC, antiCD16+56 PE, antiCD45 PerCP. (BectonDickinson)
- FACS Lysing (solution-Becton Dickinson)
- Solución fijadora (p-formaldehído 1%)
- Ficoll-Hypaque® (Sigma chemical)
- Ionomicina (Sigma chemical)
- Brefeldrina (Sigma chemical)
- Forbolmiristato acetato (PMA)
- Medio RPMI 1640 (GIBCO-BRL)
- Anticuerpos de superficie (CD154, CD119, IL-12R, CD69) (BD)
- AntiCD3 FITC o PE, INF- γ /IL4, anti-IL2, antiCD69, antiCD14 (BD)

10. MÉTODO

10.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Para determinar las diferentes poblaciones de leucocitos se usaron 2 mL de sangre total utilizando EDTA como anticoagulante. Para la tinción intracelular, receptores y subpoblaciones de células B se usaron de 6 a 20 mL de sangre periférica en heparina. Las células mononucleares (PMBC's) son separadas por gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque®-1077 (Sigma) y centrifugación.

10.2 ANÁLISIS DE LEUCOCITOS EN SANGRE PERIFÉRICA

Con sangre periférica se realizaron tinciones para determinar las proporciones de diferentes subpoblaciones leucocitarias, se incubaron durante 20 minutos con las siguientes mezclas de anticuerpos monoclonales (mAB): antiCD45 FITC/antiCD14 PE (BD); antiCD3 FITC/antiCD19 PE/antiCD45 PerCP(BD); antiCD4 FITC/antiCD8 PE/antiCD3 PerCP(BD); antiCD3 FITC/antiCD16+56 PE/antiCD45 PerCP(BD); control de isotipo antiCD45 PerCP/ γ 1 FITC/ γ 1 PE (BD). Las muestras fueron incubadas 20 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Después de la incubación, los eritrocitos fueron lisados con 500 μ L de solución de lisis FACS Lysing(BD), se incubaron durante 10 minutos más y posteriormente se lavaron con PBS conteniendo 1% de PBA. Las células se fijaron con PBS conteniendo 1% de p-formaldehído. La adquisición y análisis esta descrita más adelante.

10.3 DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CD40 Y CD154 (CD40L)

La expresión de CD154 fue evaluada en células T activadas, las PBMCs son cultivadas en una concentración final de 2×10^6 células por mL sobre las condiciones estándar (37°C, 5% CO₂) en medio RPMI 1640 (GIBCO–BRL) suplementado con 10% SFB (PAA; Australia), 1mM L-glutamina, penicilina en 100 unidades/mL y estreptomina a 10 μ g/mL (GIBCO) por 5 horas en presencia de phorbol 12-myristato 13-acetato (PMA, GIBCO–BRL) con una concentración de 10 ng/mL y ionomicina (Sigma) a una concentración 1 μ l/mL. Después teñimos los PBMCs con una mezcla de antiCD3 PerCP(BD), antiCD154 PE (BD) y antiCD69 FITC (BD) se incubaron 20 minutos a

temperatura ambiente en la oscuridad. Después las muestras fueron lavadas con PBS conteniendo 1% de PBA y fijadas con PBS conteniendo 1% de formalina. Para la tinción de CD40 se tiñeron las PBMCs con las siguientes mezclas de antiCD40 PE (BD) y antiCD19 APC (BD) para analizar la expresión en células B, antiCD40 PE(BD) y antiCD14 PerCP (BD) para analizar la expresión en monocitos. Se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad, después las muestras fueron lavadas con PBS conteniendo 1% de PBA y fijadas con PBS conteniendo 1% de formalina. La adquisición y análisis esta descrita más adelante.

10.4 DETERMINACIÓN INTRACELULAR DE LAS CITOCINAS IL-2, IL-12, IFN- γ Y TNF α

La determinación de las citocinas se llevó a cabo mediante tinciones triples de las muestras (sangre total) con o sin estímulo. La estimulación de las muestras se efectuó incubándolas con 25 ng/mL de forbolmiristato acetato (PMA) (Sigma), 1 μ g/mL de ionomicina (Sigma) y 10 μ g/mL de brefeldina A (BFA) (Sigma) por 5 horas a 37°C y 5% de CO₂ en atmósfera húmeda, o con BFA solamente (control de activación). Las alícuotas de estas muestras se sometieron primero a una tinción de superficie, utilizando para ello un anticuerpo monoclonal antiCD3 clorofilperhidrina (PerCP) (BD) o un antiCD14 PerCP (BD) incubando por 15 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad, terminado ese tiempo los eritrocitos se lisaron con una solución de lisis (FACS Lysingsolution-BD) durante 10 minutos en la oscuridad, posteriormente las muestras se centrifugaron a 500 rpm por 5 minutos, los sobrenadantes fueron descartados y las células se sometieron a un proceso de permeabilización con una solución comercial (Permeabilizing solution-BD) por 10 minutos en la oscuridad. Las muestras se centrifugaron y los sobrenadantes se eliminaron. Finalmente se llevó a cabo la tinción intracelular adicionando a las muestras previamente marcadas con el antiCD3 las siguientes mezclas de anticuerpos monoclonales comerciales marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE), IFN- γ FITC/IL-4 PE (BD), antiIL-2 FITC, antiCD69 PE (control de activación); mientras que a las células previamente teñidas con el anticuerpo antiCD14 se les adicionó la mezcla: antiIL-12 (FITC) y antiCD69 (PE) o bien la mezcla antiTNF α y antiHLA-DP+DQ+DR(MCH II) PE,

las muestras se incubaron con estos anticuerpos por 30 minutos en la oscuridad y a temperatura ambiente, una mezcla de γ_{2a} FITC/ γ_1 PE con antiCD3 PerCP o antiCD14 PerCP se utilizó como control de isotipo. A continuación las muestras se lavaron con una solución al 0.1% de albúmina bovina y 0.01% de azida de sodio en regulador de fosfatos (PBA) y se fijaron con p-formaldehído al 1%. Estas células se adquirieron en un citómetro de flujo y su análisis se realizó con el programa CellQuest, estableciendo en ambos casos ventanas en la población CD3⁺ para definir la población de linfocitos, o CD14⁺ para definir la población de monocitos. La adquisición y análisis esta descrita más adelante.

10.5 DETERMINACIÓN DE LOS RECEPTORES DE IL12, INF γ , IL-2

La determinación intracelular de las citocinas se llevo a cabo mediante tinciones triples de las muestras (PBMCs) con o sin estímulo. La estimulación se efectuó incubándolas con 25 ng/mL de forbolmiristrato acetato (PMA) (sigma), 1 μ g/mL de ionomicina (Sigma) ó con 200 ng/mL de lipopolisacárido (LPS) ó 20 μ L de fitohemaglutinina (PHA) respectivamente, por 48 horas a 37° C y 5% de CO₂ en atmósfera húmeda. Alícuotas de estas muestras se sometieron a una tinción de superficie, utilizando para una mezcla de anticuerpos monoclonales antiCD25 (IL-2R) FITC (BD), antiCD12-R β PE (BD) y antiCD3 PerCP ó antiCD69 a las células estimuladas o no estimuladas con PHA ó PMA/Iomomicina; y a las células estimuladas o no con LPS se les adicionó la mezcla de antiCD119 (INF γ R) PE y antiCD14 PerCP o bien antiCD120 (TNF α R) FITC y antiCD14 PerCP. La mezcla de γ FITC/ γ PE se utilizó con un antiCD3 o un anti CD14 como control de isotipo. Se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad. Posteriormente las muestras se lavaron con PBA y se centrifugaron 1500 rpm por 5 minutos, los sobrenadantes fueron descartados y las células se fijaron p-formaldehído. La adquisición y análisis esta descrita más adelante.

10.6 DETERMINACIÓN DE SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS B

La expresión de subpoblaciones de células B se determinó en PBMCs por citometría de flujo, estas son teñidas con una mezcla de antiCD19 APC (BD); antiCD22 PE-Cy5 (BD) y CD27 PE (BD) se incubaron por 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Después las muestras son lavadas con PBS conteniendo 1% de PBA y fijadas con PBS conteniendo 1% de formalina. La adquisición y análisis esta descrita más adelante.

10.7 ADQUISICIÓN Y ANÁLISIS

Se adquirió 10 000 eventos para el análisis en sangre periférica y 100 000 eventos para los análisis en PMBC's en FACScalibur® (BD) y se analizó en el software WinMdi 2.8.

11. RESULTADOS

1.- Análisis de los 113 pacientes a los que se les realizó citometría de flujo

Se analizaron 113 pacientes a los que se les realizó la citometría de flujo. En la figura 5 y 5.1, se representa la clasificación de pacientes según su diagnóstico final en número de casos y porcentaje, El cual nos indico que 28 (24%) fueron diagnosticados con una IDP's, 4 (4%) defunciones, 4 (4%) HIV, 5 (4%) autoinmunidad, 7 (6%) faltan datos y 65 (58%) con inmunodeficiencias secundarias.

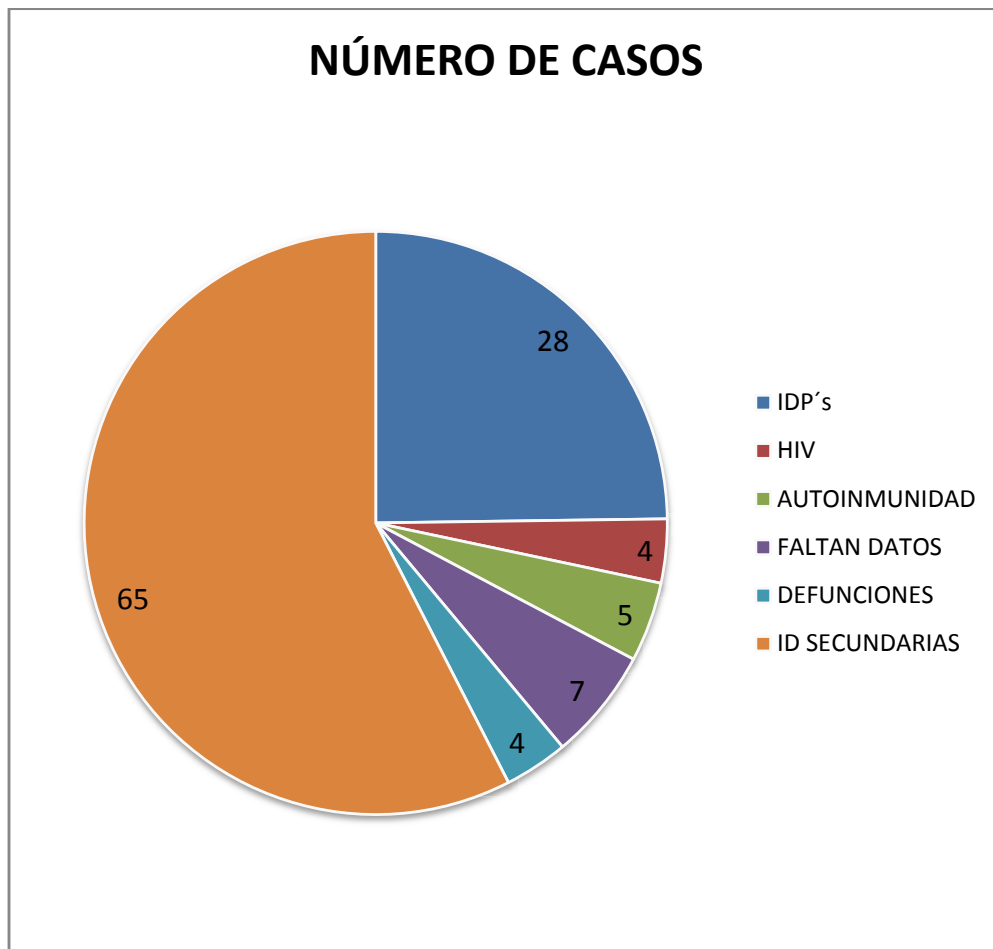


Fig. 5. Número de casos

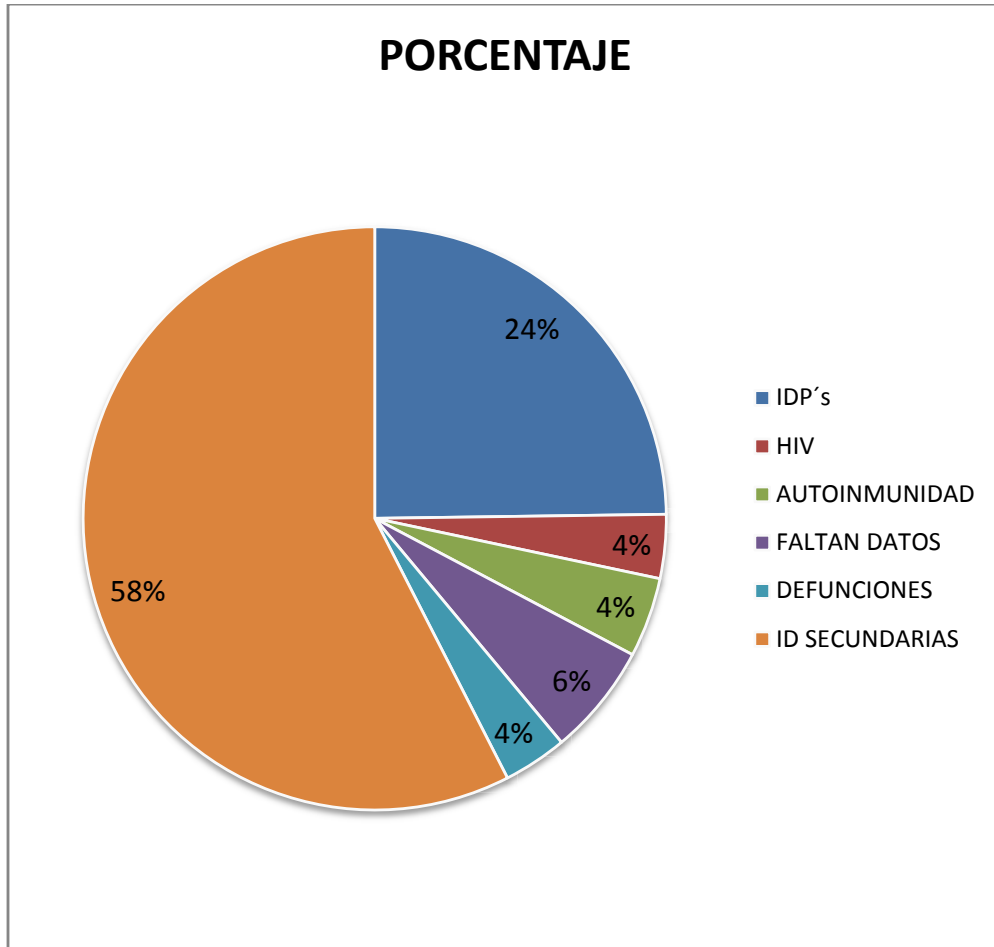


Fig. 5.1. Porcentaje de los 113 pacientes por los hallazgos encontrados.

2.- Datos de la biometría hemática y la concentración de inmunoglobulinas séricas en 28 pacientes con IDP's

A los 113 pacientes se les realizó las pruebas de biometría hemática y concentración de inmunoglobulinas en suero en el cuadro 8 se encuentran los datos de los 28 pacientes con IDP's.

Cuadro8. Resultados de biometría hemática e inmunoglobulinas séricas en 28 pacientes con IDP's

PACIENTES	DX	EDAD	LEUCOCITOS				IgG mg/dl	IgM mg/dL	IgA mg/dL
			TOTALES mm ³	NEUTRÓFILOS mm ³	LINFOCITOS mm ³	MONOCITOS mm ³			
1	LXA	5 a	11000	7711	2079	869	9,3	20,7	<27,5
2	LXA	10 a	11200	8691	1724	705	<15,9	<15,8	<24,4
3	LXA	2 a	5600	2934	2111	442	1720	60	27
4	LXA	5 a	5300	2878	1781	498	716	<15,8	<24,4
5	LXA	1 a	16800	1125,6	11726	2184	494	<4	
6	LXA	15 a	15600	11107	2714	1482	<13	<16.8	<22
7	LXA	3 a	5200	2522	1825	722	901	2.6	0.3
8	A-T	6 a	7400	5394	1199	555	1320	321	0.4
9	A-T	5 a	5300	2671	1701	636	1260	226	<39.9
10	A-T	6 a	11000	8250	1210	1320	716	118	<24.4
11	A-T	3 a	5800	4118	887	632	1080	128	138
12	A-T	6 a	7800	5116	1201	1138	1110	110	<25
13	A-T	11 a	5000	3800	605	495	884	260	219
14	A-T	5 a	5000	3150	1095	335	1840	172	<24.4
15	A-T	14 a	6800	5304	816	680	1150	384	0.3
16	IDCS	7 m	1700	1242	134	323	0.6	1,7	0.8
17	IDCS	10 m	9900	8118	1584	198	835	57,2	<22.5
18	IDCS	10 m	1700	1054	190	430	1130	92,2	33
19	IDCS	10 m	1100	174	469	455	1780	632	132
20	IDCV	11 a	5500	3564	1265	572	418	187	<25
21	IDCV	7 a	8500	2907	4267	960	380	<16	<5.4
22	IDCV	1 a	5300	2999	1537	503	777	121	<70
23	IDCV	1 a	6700	1675	4020	603	734	41	111
24	IDCV	10 a	6000	4836	672	480	150	42	45
25	W-A	5 m	9900	2901	5534	1020	2001	272	109
26	D-G	3 m	6200	5177	471	533	311	18	24
27	HIGM	6 a	4900	1980	2656	122	380	210	81
28	HIGM	8 m	8100	632	6966	366	474	497	24

3.- Clasificación de pacientes con IDP's según su tipo de inmunodeficiencia.

Se clasificaron a los 28 pacientes de acuerdo al tipo de inmunodeficiencia primaria que se les diagnóstico, como se muestra en la figuras 6 y 6.1 en donde se obtuvo que 7 (25%) fueron LXA, 8 (29%) A-T, 4 (14%) IDCS, 5 (15%) CVID, 1 (4%) W-A, 1(4%) Di-George y 2 (7%) HIGM.

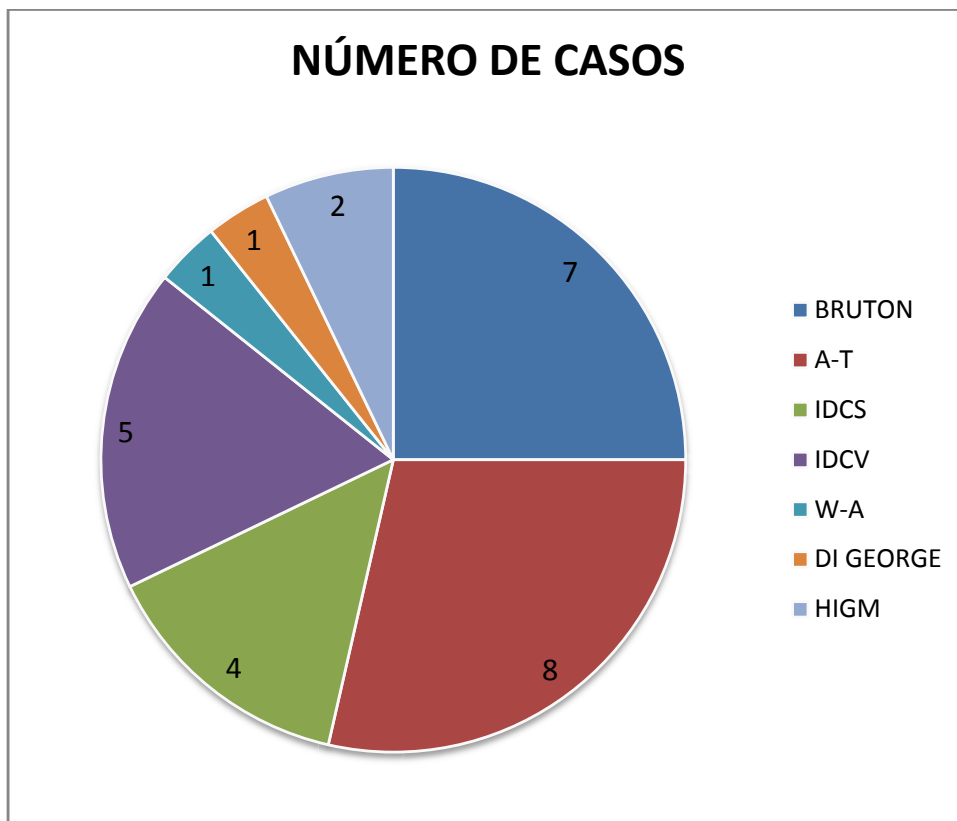


Figura 6. Clasificación de los 28 pacientes según su diagnóstico.

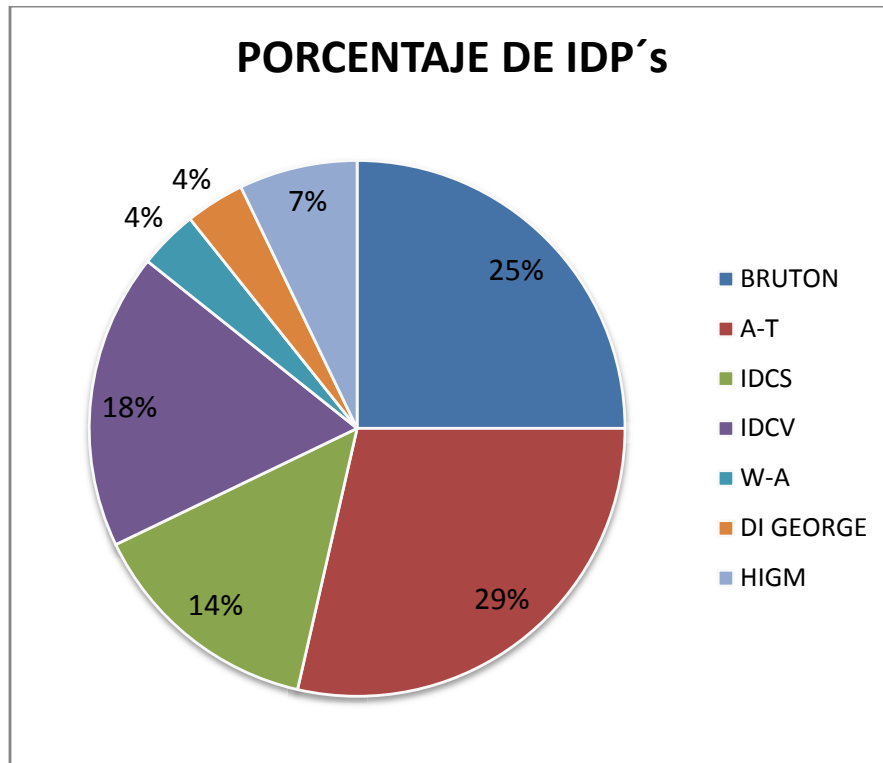


Figura. 6.1. Porcentaje de IDP's

4.- Análisis de poblaciones de leucocitos.

Se determinó la proporción de las poblaciones celulares en sangre periférica, tanto en los pacientes como en testigos sanos, empleando una doble tinción con antiCD45 (FITC) y antiCD14 (PE), como se muestra en la figura 7, se muestran las gráficas de punto CD45 (FITC) vs CD14. Tomada de la población de leucocitos (R2): población de polimorfonucleares (PMN); (R3): población de monocitos; y (R1): población de linfocitos.

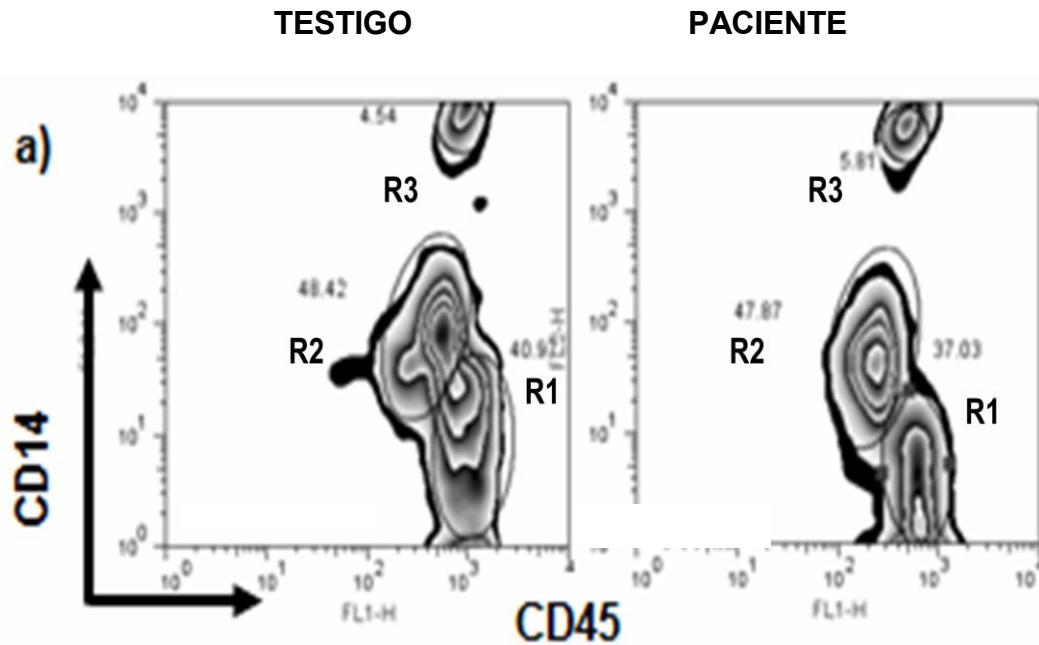


Figura 7. Análisis de las poblaciones celulares en sangre periférica.

Con base en los resultados obtenidos en las gráficas de la figura 7 y con los datos de números de leucocitos por mm³ de sangre determinado en cámara de Neubauer se pudo calcular el número absoluto de cada una de las poblaciones leucocitarias de sangre periférica por medio de la siguiente fórmula:

$$\begin{array}{l}
 \text{Número de} \\
 \text{Linfocitos,} \\
 \text{monocitos o} \\
 \text{polimorfonucleares} \\
 \text{mm}^3
 \end{array}
 =
 \frac{\text{Número de leucocitos mm}^3 \times \text{Porcentaje de linfocitos, monocitos o polimorfonucleares (R1, R2 o R3)}}{100}$$

A los valores absolutos de leucocitos, PMN, linfocitos y monocitos de los testigos sanos de este estudio se les calculó la media y desviación estándar por rango de edad como se muestra en los cuadros 9, 10, 11 y 12.

Cuadro 9. Números absolutos de leucocitos totales, neutrófilos, linfocitos y monocitos de 17 testigos sanos de 1 año a 5 años de edad, representado por media, desviación estándar y rangos menor y mayor.

	Leucocitos			
	Totales mm³	Neutrófilos mm³	Linfocitos mm³	Monocitos mm³
MEDIA	8171	4071	3203	524
DS	2108	1219	1077	171
RANGO MENOR	6063	2852	2126	353
RANGO MAYOR	10278	5290	4280	695

Cuadro 10. Números absolutos de leucocitos totales, neutrófilos, linfocitos y monocitos de 17 testigos sanos de 6 a 10 años de edad, representado por media, desviación estándar y rangos menor y mayor.

	Leucocitos			
	Totales mm³	Neutrófilos mm³	Linfocitos mm³	Monocitos mm³
MEDIA	6929	3561	2778	493
DS	2055	1303	951	146
RANGO MENOR	4874	2258	1827	348
RANGO MAYOR	8985	4864	3730	639

Cuadro 11. Números absolutos de leucocitos totales, neutrófilos, linfocitos y monocitos de 30 testigos sanos de 11 a 17 años de edad, representado por media, desviación estándar y rangos menor y mayor.

	Leucocitos			
	Totales mm³	Neutrófilos mm³	Linfocitos mm³	Monocitos mm³
MEDIA	6603	3431	2446	483
DS	1239	955	572	120
RANGO MENOR	5364	2476	1874	363
RANGO MAYOR	7843	4385	3018	603

Cuadro 12. Números absolutos de leucocitos totales, neutrófilos, linfocitos y monocitos de 19 testigos sanos de edad adulta, representado por media, desviación estándar y rangos menor y mayor.

Leucocitos				
	Totales	Neutrófilos	Linfocitos	Monocitos
	mm³	mm³	mm³	mm³
MEDIA	7089	4231	2234	437
DS	1326	1066	539	138
RANGO MENOR	5763	3165	1695	299
RANGO MAYOR	8416	5297	2773	574

Con los valores absolutos de linfocitos totales se calculó la concentración de CD3, CD4, CD8, CD19 y CD16+56 de los testigos sanos de este estudio figura 8 y se les calculó la media y desviación estándar por rango de edad como se muestra en los cuadros 13, 14, 15 y 16.

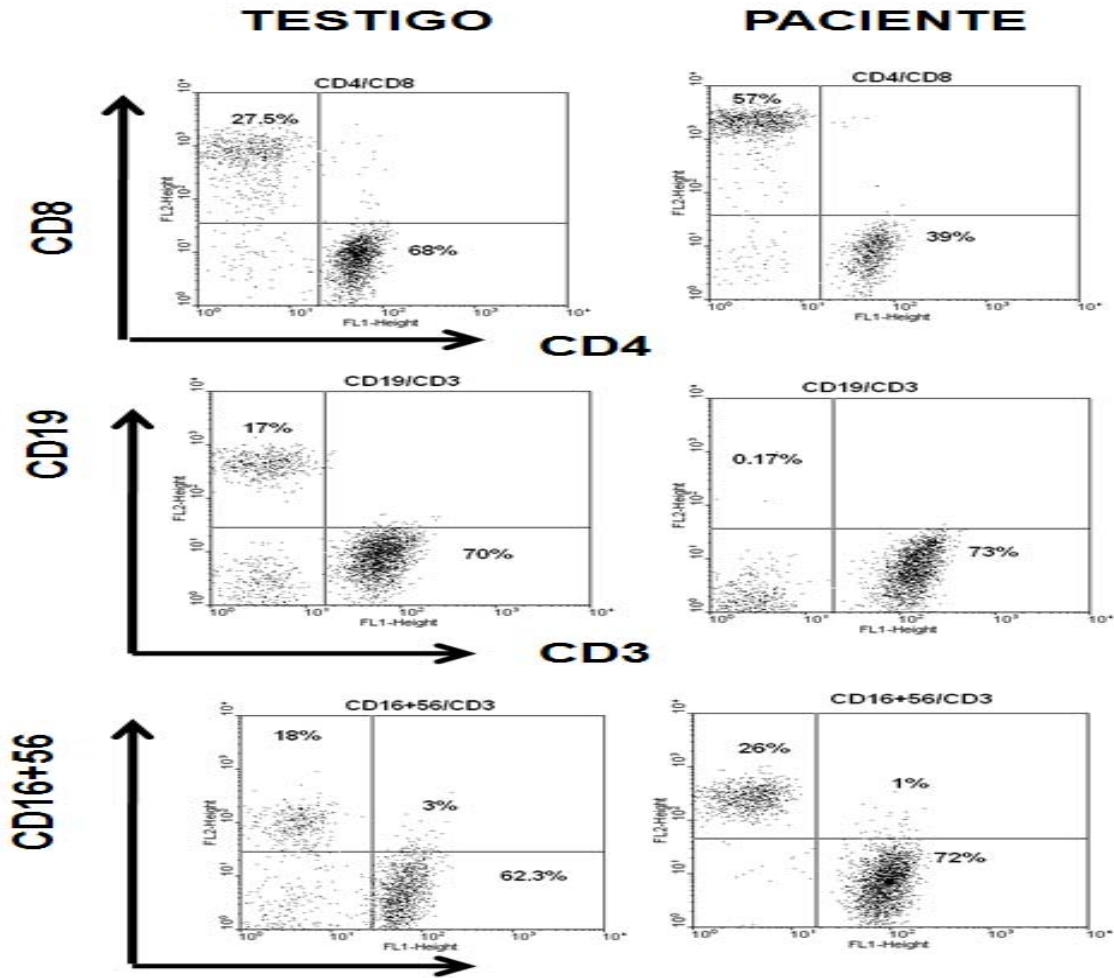


Figura 8.-. Análisis de las poblaciones CD3, CD4, CD8, CD19 y CD16+56.

Cuadro13. Números absolutos de CD3, CD4, CD8, CD19 y CD16+56 en 17 testigos sanos de 1 a 5 años, representado por media, desviación estándar y rangos menor y mayor.

	CD3 mm ³	CD4 mm ³	CD8 mm ³	CD19 mm ³	CD16+56 mm ³
MEDIA	2139	1161	799	466	561
DS	694	483	350	175	370
RANGO MENOR	1445	679	449	291	190
RANGO MAYOR	2833	1644	1149	640	931

Cuadro14. Números absolutos de CD3, CD4, CD8, CD19 y CD16+56 en 17 testigos sanos de 6 a 10 años, representado por media, desviación estándar y rangos menor y mayor.

	CD3 mm³	CD4 mm³	CD8 mm³	CD19 mm³	CD16+56 mm³
MEDIA	1884	1035	713	340	394
DS	510	394	235	180	209
RANGO MENOR	1374	641	478	159	186
RANGO MAYOR	2394	1429	949	520	603

Cuadro15. Números absolutos de CD3, CD4, CD8, CD19 y CD16+56 en 30 testigos sanos de 11 a 17 años, representado por media, desviación estándar y rangos menor y mayor.

	CD3 mm³	CD4 mm³	CD8 mm³	CD19 mm³	CD16+56 mm³
MEDIA	1682	879	695	294	415
DS	507	233	321	130	233
RANGO MAYOR	1175	646	374	163	182
RANGO MENOR	2190	1111	1016	424	648

Cuadro16. Números absolutos de CD3, CD4, CD8, CD19 y CD16+56 en 19 testigos sanos de edad adulta, representado por media, desviación estándar y rangos menor y mayor.

	CD3 mm³	CD4 mm³	CD8 mm³	CD19 mm³	CD16+56 mm³
MEDIA	1602	911	582	221	449
DS	507	319	245	108	167
RANGO MENOR	1095	592	337	113	282
RANGO MAYOR	2110	1230	827	329	615

A continuación se presenta el cuadro 17 en donde se observan los números absolutos de las poblaciones leucocitarias, leucocitos totales, neutrófilos, monocitos y linfocitos de los 28 pacientes con IDP's

Cuadro 17. Números absolutos de leucocitos totales, neutrófilos, linfocitos, monocitos, CD3, CD4, CD8, CD19 y CD16+56 en 28 pacientes con IDP's

PACIENTE	DX	EDAD	LEUCOCITOS								
			TOTALES mm ³	NEUTRÓFILOS mm ³	LINFOCITOS mm ³	MONOCITOS mm ³	CD3 mm ³	CD4 mm ³	CD8 mm ³	CD19 mm ³	CD16+56 mm ³
1	LXA	5 a	11000	7711	2079	869	1871	829	1004	0	210
2	LXA	10 a	11200	8691	1724	705	1336	668	584	0	460
3	LXA	2 a	5600	2934	2111	442	1953	1293	654	4	99
4	LXA	5 a	5300	2878	1781	498	1585	756	767	5	203
5	LXA	1 a	16800	1125,6	11726	2184	11398	6953	4080	117	211
6	LXA	15 a	15600	11107	2714	1482	2388	1576	716	2,7	380
7	LXA	3 a	5200	2522	1825	722	1516	960	488	5	266
8	A-T	6 a	7400	5394	1199	555	361	262	75	75	698
9	A-T	5 a	5300	2671	1701	636	663,5	406	242	248	782
10	A-T	6 a	11000	8250	1210	1320	741	187	505	56	384
11	A-T	3 a	5800	4118	887	632	576	283	230	54	235
12	A-T	6 a	7800	5116	1201	1138	528	242	96	115	520
13	A-T	11 a	5000	3800	605	495	253	151	82	26	337
14	A-T	5 a	5000	3150	1095	335	274	183	63	137	581
15	A-T	14 a	6800	5304	816	680	768	395	311	166	459
16	IDCS	7 m	1700	1242	134	323	0	0	0	3	36
17	IDCS	10 m	9900	8118	1584	198	0	0	0	502	507
18	IDSC	10 m	1700	1054	190	430	135	105	21	22	21
19	IDSC	10 m	1100	174	469	455	344	172	151	18	80
20	IDCV	11 ^a	5500	3564	1265	572	784	248	510	86	384
21	IDCV	7 a	8500	2907	4267	960	2390	1004	1267	1493	175
22	IDCV	1 a	5300	2999	1537	503	890	622	157	209	384
23	IDCV	1 a	6700	1675	4020	603	2882	1928	786	659	370
24	IDCV	10 a	6000	4836	672	480	564	180	366	74	23
25	WA	5 m	9900	2901	5534	1020	3929	1139	2397	265	1782
26	D-G	3 m	6200	5177	471	533	263	166	923	28	141
27	HIGM	6 a	4900	1980	2656	122	2053	1119	719	380	244
28	HIGM	8 m	8100	632	6966	366	5712	3599	1885	474	683

a.- años

m.- meses

5. Comparación de valores absolutos de los 28 pacientes clasificados por su diagnóstico con los valores de referencia.

A los 28 pacientes con IDP's se les clasificó por su tipo de inmunodeficiencia y se les analizó con los valores de referencia obtenidos de las poblaciones leucocitarias de 83 testigos sanos clasificados por edad.

Se clasificaron en dos tonos de gris los datos de los pacientes con respecto a los valores de referencia lo que nos indica el color gris claro son las poblaciones leucocitarias que se encuentran por arriba de los valores de referencia de la población sana y el gris oscuro son los valores que se encuentran por debajo de los valores de referencia como se indica en los cuadros 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24.

Cuadro 18. Análisis de poblaciones leucocitarias en 7 pacientes con LXA

PACIENTE	DX	EDAD	LEUCOCITOS		NEUTRÓFILOS	LINFOCITOS	MONOCITOS	CD4		CD8	CD19	CD16+56
			TOTALES mm3		mm3	mm3	mm3	CD3 mm3	mm3	mm3	mm3	mm3
1	LXA	5 a	11000		7711	2079	869	1871	829	1004	0	210
	valor de referencia		6063-10278		2852-5290	2126-4280	353-695	1445-2833	679-1644	449-1149	291-640	190-931
2	LXA	10 a	11200		8691	1724	705	1336	668	584	0	460
	valor de referencia		4874-8985		2258-4864	1827-3730	348-639	1374-2394	641-1429	478-949	159-520	186-603
3	LXA	2 a	5600		2934	2111	442	1953	1293	654	4	99
	valor de referencia		6063-10278		2852-5290	2126-4280	353-695	1445-2833	679-1644	449-1149	291-640	190-931
4	LXA	5 a	5300		2878	1781	498	1585	756	767	5	203
	valor de referencia		6063-10278		2852-5290	2126-4280	353-695	1445-2833	679-1644	449-1149	291-640	190-931
5	LXA	1 a	16800		1125.6	11726	2184	11398	6953	4080	117	211
	valor de referencia		6063-10278		2852-5290	2126-4280	353-695	1445-2833	679-1644	449-1149	291-640	190-931
6	LXA	15 a	15600		11107	2714	1482	2388	1576	716	2,7	380
	valor de referencia		5364-7843		2476-4385	1874-3018	363-603	1175-2190	646-1111	374-1016	163-424	182-648
7	LXA	3 a	5200		2522	1825	722	1516	960	488	5	266
	valor de referencia		6063-10278		2852-5290	2126-4280	353-695	1445-2833	679-1644	449-1149	291-640	190-931



Pacientes con concentración mayor del valor de referencia



Pacientes con concentración menor del valor de referencia

Cuadro 19. Análisis de poblaciones leucocitarias en 8 pacientes con A-T

LEUCOCITOS											
PACIENTE	DX	EDAD	LEUCOCITOS								
			TOTALES	NEUTRÓFILOS	LINFOCITOS	MONOCITOS	CD3	CD4	CD8	CD19	CD16+56
			mm3	mm3	mm3	mm3	mm3	mm3	mm3	mm3	mm3
8	AT	6 a	7400	5394	1199	555	361	262	75	75	698
valor de referencia			4874-8985	2258-4864	1827-3730	348-639	1374-2394	641-1429	478-949	159-520	186-603
9	AT	5 a	5300	2671	1701	636	663,5	406	242	248	782
valor de referencia			6063-10278	2852-5290	2126-4280	353-695	1445-2833	679-1644	449-1149	291-640	190-931
10	AT	6 a	11000	8250	1210	1320	741	187	505	56	384
valor de referencia			4874-8985	2258-4864	1827-3730	348-639	1374-2394	641-1429	478-949	159-520	186-603
11	AT	3 a	5800	4118	887	632	576	283	230	54	235
valor de referencia			6063-10278	2852-5290	2126-4280	353-695	1445-2833	679-1644	449-1149	291-640	190-931
12	AT	6 a	7800	5116	1201	1138	528	242	96	115	520
valor de referencia			4874-8985	2258-4864	1827-3730	348-639	1374-2394	641-1429	478-949	159-520	186-603
13	AT	11 a	5000	3800	605	495	253	151	82	26	337
valor de referencia			5364-7843	2476-4385	1874-3018	363-603	1175-2190	646-1111	374-1016	163-424	182-648
14	AT	5 a	5000	3150	1095	335	274	183	63	137	581
valor de referencia			6063-10278	2852-5290	2126-4280	353-695	1445-2833	679-1644	449-1149	291-640	190-931
15	AT	14 a	6800	5304	816	680	768	395	311	166	459
valor de referencia			5364-7843	2476-4385	1874-3018	363-603	1175-2190	646-1111	374-1016	163-424	182-648



Pacientes con concentración mayor del valor de referencia



Pacientes con concentración menor del valor de referencia

Cuadro 20. Análisis de poblaciones leucocitarias en 4 pacientes con IDCS

PACIENTE	DX	EDAD	LEUCOCITOS								
			TOTALES mm3	NEUTRÓFILOS mm3	LINFOCITOS mm3	MONOCITOS mm3	CD3 mm3	CD4 mm3	CD8 mm3	CD19 mm3	CD16+56 mm3
16	IDCS	7 m	1700	1242	134	323	0	0	0	3	36
valor de referencia			6063-10278	2852-5290	2126-4280	353-695	1445-2833	679-1644	449-1149	291-640	190-931
17	IDCS	10 m	9900	8118	1584	198	0	0	0	502	507
valor de referencia			6063-10278	2852-5290	2126-4280	353-695	1445-2833	679-1644	449-1149	291-640	190-931
18	IDCS	10 m	1700	1054	190	430	135	105	21	22	21
valor de referencia			6063-10278	2852-5290	2126-4280	353-695	1445-2833	679-1644	449-1149	291-640	190-931
19	IDCS	10 m	1100	174	469	455	344	172	151	18	80
valor de referencia			6063-10278	2852-5290	2126-4280	353-695	1445-2833	679-1644	449-1149	291-640	190-931



Pacientes con concentración mayor del valor de referencia



Pacientes con concentración menor del valor de referencia

Cuadro 21. Análisis de poblaciones leucocitarias en 5 pacientes con CVID

LEUCOCITOS											
PACIENTE	DX	EDAD	TOTALES mm3	NEUTRÓFILOS mm3	LINFOCITOS mm3	MONOCITOS mm3	CD3 mm3	CD4 mm3	CD8 mm3	CD19 mm3	CD16+56 mm3
20	CVID	11 a	5500	3564	1265	572	784	248	510	86	384
valor de referencia			5364-7843	2476-4385	1874-3018	363-603	1175-2190	646-1111	374-1016	163-424	182-648
21	CVID	7 a	8500	2907	4267	960	2390	1004	1267	1493	175
valor de referencia			4874-8985	2258-4864	1827-3730	348-639	1374-2394	641-1429	478-949	159-520	186-603
22	CVID	1 a	5300	2999	1537	503	890	622	157	209	384
valor de referencia			6063-10278	2852-5290	2126-4280	353-695	1445-2833	679-1644	449-1149	291-640	190-931
23	CVID	1 a	6700	1675	4020	603	2882	1928	786	659	370
valor de referencia			6063-10278	2852-5290	2126-4280	353-695	1445-2833	679-1644	449-1149	291-640	190-931
24	CVID	10 a	6000	4836	672	480	564	180	366	74	23
valor de referencia			4874-8985	2258-4864	1827-3730	348-639	1374-2394	641-1429	478-949	159-520	186-603



Pacientes con concentración mayor del valor de referencia



Pacientes con concentración menor del valor de referencia

Cuadro 22. Análisis de poblaciones leucocitarias en un paciente con W-A

LEUCOCITOS											
PACIENTE	DX	EDAD	TOTALES mm3	NEUTRÓFILOS mm3	LINFOCITOS mm3	MONOCITOS mm3	CD3 mm3	CD4 mm3	CD8 mm3	CD19 mm3	CD16+56 mm3
25	W-A	5 m	9900	2901	5534	1020	3929	1139	2397	265	1782
valor de referencia			6063-10278	2852-5290	2126-4280	353-695	1445-2833	679-1644	449-1149	291-640	190-931



Pacientes con concentración mayor del valor de referencia



Pacientes con concentración menor del valor de referencia

Cuadro 23. Análisis de poblaciones leucocitarias en un paciente con DI-GEORGE

PACIENTE	DX	EDAD	LEUCOCITOS		LINFOCITOS	MONOCITOS	CD3	CD4	CD8	CD19	CD16+56
			TOTALES mm3	NEUTRÓFILOS mm3							
26	D-G	3 m	6200	5177	471	533	263	166	923	28	141
valor de referencia			6063-10278	2852-5290	2126-4280	353-695	1445-2833	679-1644	449-1149	291-640	190-931



Pacientes con concentración mayor del valor de referencia



Pacientes con concentración menor del valor de referencia

Cuadro 24. Análisis de poblaciones leucocitarias en dos pacientes con HIGM

PACIENTE	DX	EDAD	LEUCOCITOS		LINFOCITOS	MONOCITOS	CD3	CD4	CD8	CD19	CD16+56
			TOTALES mm3	NEUTRÓFILOS mm3							
27	HIGM	6 a	4900	1980	2656	122	2053	1119	719	380	244
Valor de Referencia			4874-8985	2258-4864	1827-3730	348-639	1374-2394	641-1429	478-949	159-520	186-603
28	HIGM	8 m	8100	632	6966	366	5712	3599	1885	474	683
Valor de Referencia			6063-10278	2852-5290	2126-4280	353-695	1445-2833	679-1644	449-1149	291-640	190-931



Pacientes con concentración mayor del valor de referencia



Pacientes con concentración menor del valor de referencia

6.- Análisis de subpoblaciones de células B

A 2 pacientes con CVID se les realizó el análisis de subpoblaciones de células B con la mezcla de anticuerpos CD19+, CD22+, CD27+ para la células B de memoria como se muestra en la figura 9; Los porcentajes de expresión se muestran en el cuadro 25

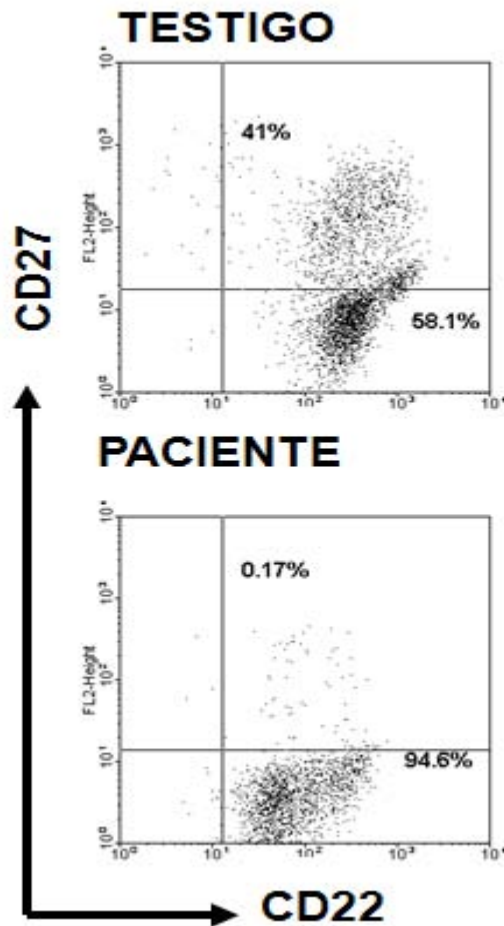


Figura 9. Análisis de expresión en subpoblaciones de células B.

Cuadro 25.- Porcentaje de expresión de células B de memoria en 2 pacientes con CVID

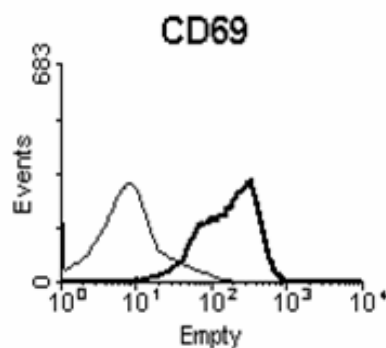
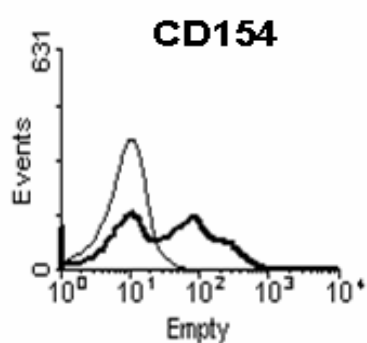
PACIENTE	EDAD	SEXO	CD19 mm3	CD27+, CD22+ %	CD27- CD22+ %
				(Células B de memoria)	(Células B maduras)
1	10	M	83	4	96
2	12	F	315	7	93

* Valor de referencia de células CD27+, CD22+ = 30 a 50%

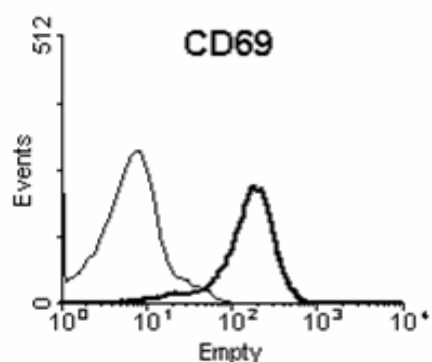
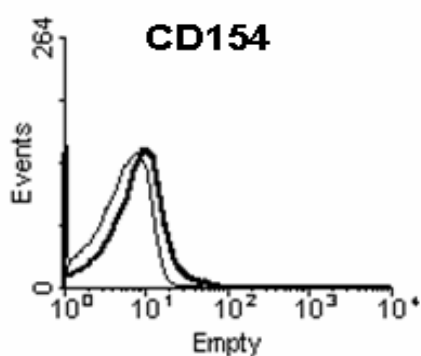
7.- Análisis de la expresión de CD154

La expresión de CD154 y CD69 (control de activación) se determinó en células T activadas CD3+, utilizando CD69 como control de activación, como se muestra en la figura 10. Se analizaron 2 pacientes y 2 controles sanos. Los resultados en porcentaje de los pacientes y controles sanos se describen en el cuadro 26.

Testigo



Paciente



————— **Células T no activadas**

————— **Células T activadas**

Figura 10. Histogramas que muestran la expresión de CD154.

Cuadro 26. Porcentaje de expresión de CD154 en 2 pacientes y 2 testigos sanos.

PACIENTE	EDAD	SEXO	CD154 sin	CD154	CD69 sin	CD69
			activar %	activados %	activar %	activados %
1	6	M	1,3	3,4	0,7	96
2	8	M	0,1	0,2	0,7	96
TESTIGO	EDAD	SEXO	CD154 sin	CD154	CD69 sin	CD69
			activar %	activados %	activar %	activados %
1	25	F	0,1	66	2,5	90
2	30	F	1,4	47	5	90

8.- Análisis de expresión del receptor INF γ y del receptor de IL-12.

Para la expresión del de INF γ se analizó en monocitos CD14+ y para el análisis del receptor de IL-12 se activaron células T CD3 + por 72 horas y luego se tiñeron con anticuerpos monoclonales para el receptor de IL-12 en una región de CD3+ y para el control de activación se utilizó CD69. En la figura 11 se muestra el análisis por citometría de flujo. El porcentaje de expresión de los receptores para INF γ y receptores para IL-12 se muestran en el cuadro 27.

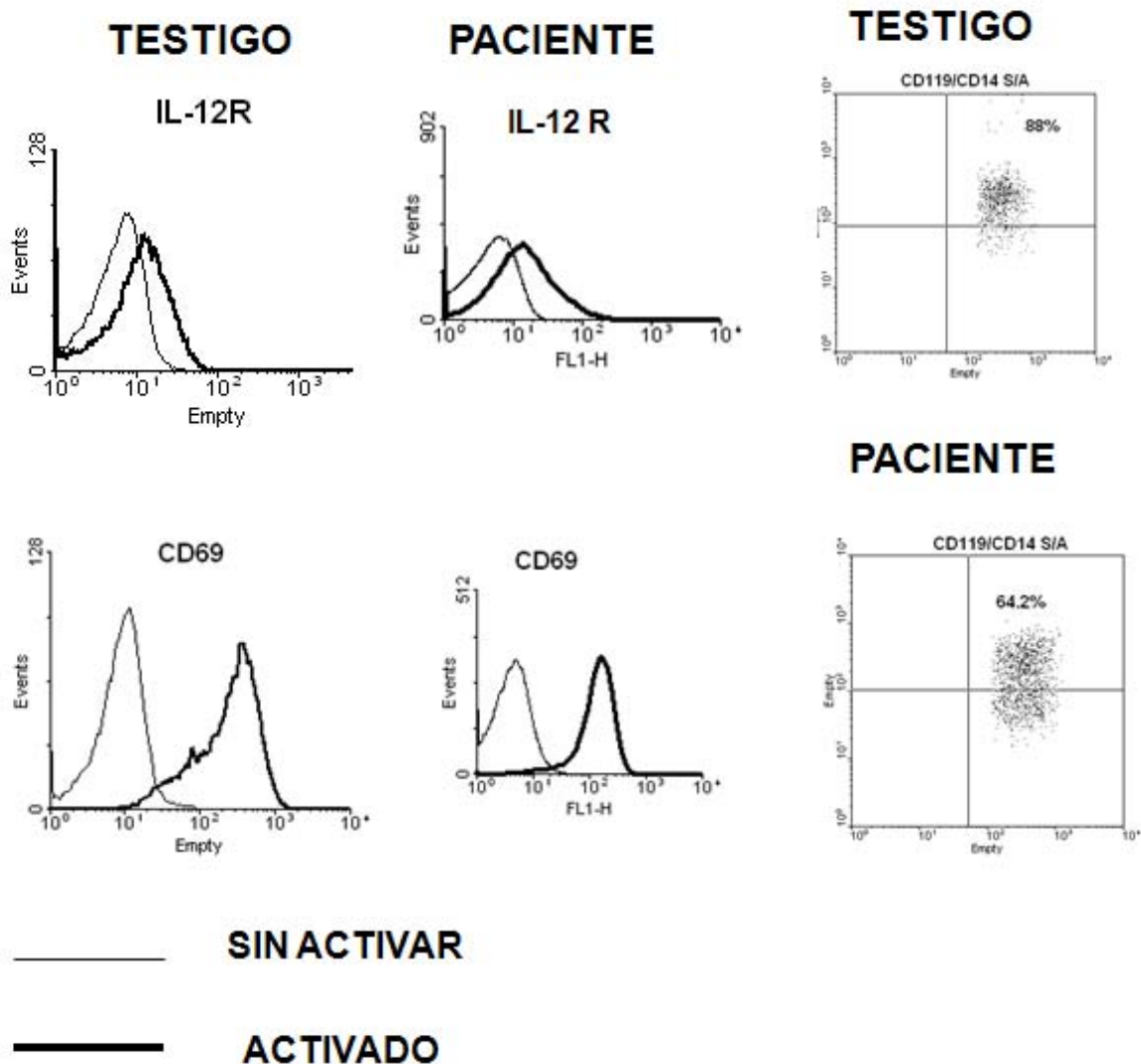


Figura11. Análisis de expresión del receptor de INF gamma y del receptor de IL-12 en dos pacientes con IDP's.

Cuadro 27. Porcentaje de expresión del receptor de INF gamma, receptor de IL-12 y CD69 (control de activación)

PACIENTE	CD69		IL-12R		CD119
	CD69 sin activar %	activado %	sin activar %	activado %	(receptor de INFg) %
1	15	83	5	36	80
2	0,4	31	0,6	6	57

TESTIGO	CD69		IL-12R		CD119
	CD69 sin activar %	activado %	sin activar %	activado %	(receptor de INFg) %
1	11	53	7	53	90
2	0,4	67	0,3	12	75

9.- Análisis de expresión de citocinas INF γ , TNF α en 6 pacientes con síndrome hemofagocítico.

Para el análisis de expresión de las citocinas INF γ y TNF α se realiza una tinción intracelular en células T y monocitos activados por 5 horas usando CD69 como control de activación, como se muestra en la figura 12.

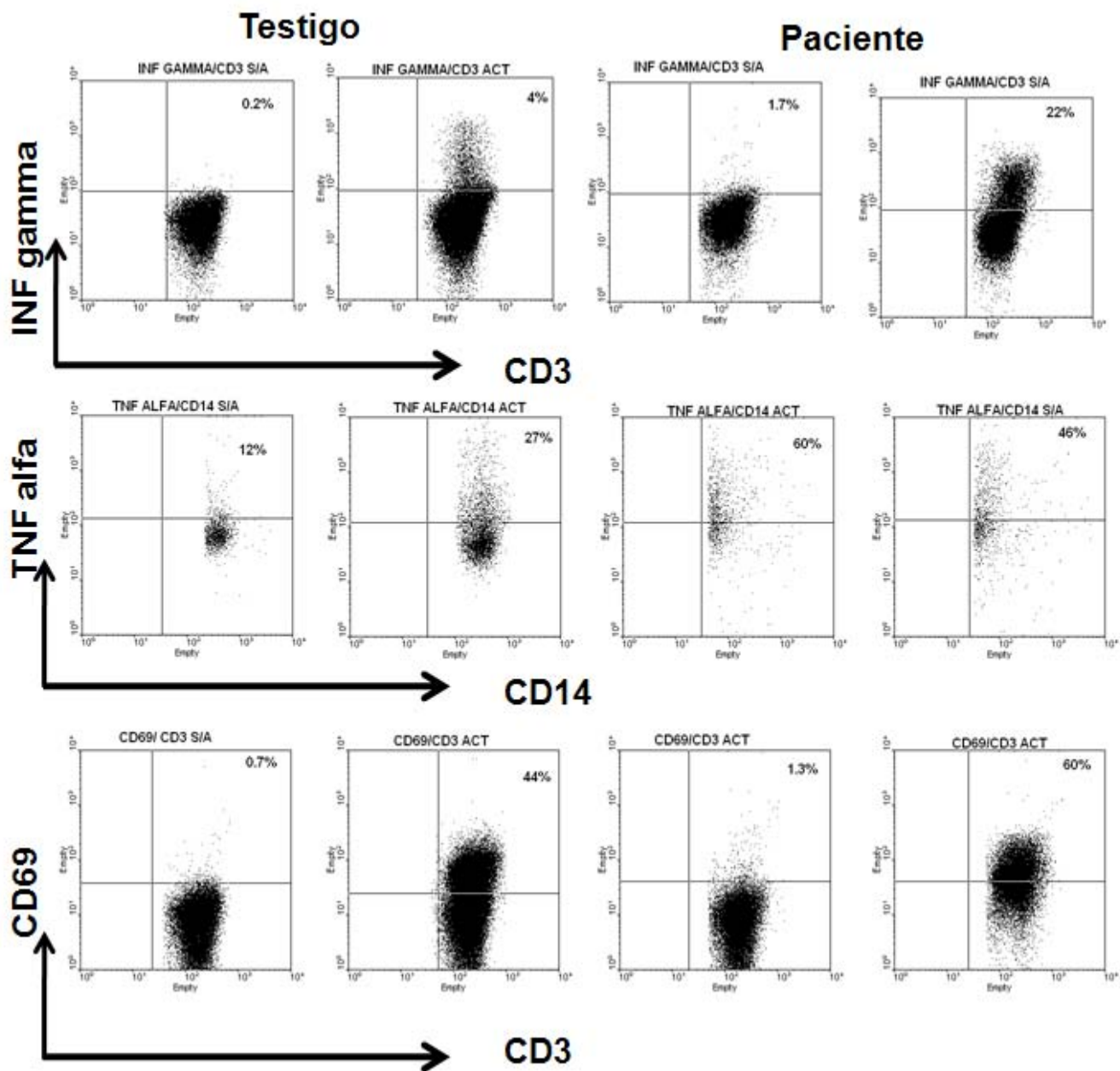


Figura 12. Análisis de expresión de citocinas INF gamma y TNF alfa.

Cuadro 28. Porcentaje de expresión de las citocinas INF gamma y TNF alfa en 6 pacientes con síndrome hemofagocítico y 6 testigos sanos.

PACIENTE	CD69 sin activar %	CD69 activado %	INFγ sin activar %	INFγ activado %	TNFα sin activar %	TNFα activado %
1	20	99	1	42	63	83
2	6	67	0	14	48	77
3	6	84	11	45	48	86
4	3.7	96	0.05	18	18	48
5	0.7	44	0.2	4	7	93
6	18	93	1	6	12	27
TESTIGO						
1	21	99	0	32	36	70
2	1.3	60	1.7	22	46	60
3	6	82	4.6	50	12	50
4	4.4	93	0.2	22	7.4	31
5	9	89	0.5	12	11	40
6	19	90	0.1	14	7.4	31

12. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se estudiaron 113 pacientes de los cuales sólo el 24% se diagnosticó como IDP's, 58% como inmunodeficiencia secundaria y el porcentaje restante fue de otras enfermedades o defunciones (figura 5), de los 28 pacientes con IDP's se clasificaron de acuerdo a su diagnóstico tal como lo presenta la figura 6 y 6.1. Las IDP's más comunes que se presentaron fueron con un 29% la A-T y con 25% la LXA, seguidas de CVID 18% y IDCS con 14% y las IDP's que menos se presentaron fueron la HIGM, W-A y Di George con un 7 y 4% respectivamente. En el cuadro 7 se aprecian los resultados de la biometría hemática e inmunoglobulinas séricas de los 28 pacientes con IDP's que junto con la historia clínica y el análisis de citometría de flujo fueron importante para su diagnóstico.

A los valores absolutos de leucocitos, PMN, linfocitos y monocitos de los testigos sanos de este estudio se les calculó la media y desviación estándar por rango de edad, estos se agruparon en edades de 1 a 5 años, de 6 a 10 años, de 11 a 17 años y el último grupo edad adulta. Estos resultados se compararon con los resultados de los pacientes con IDP's, con respecto a los valores absolutos de linfocitos totales se calculó la concentración de CD3, CD4, CD8, CD19 y CD16+56 de los testigos sanos de este estudio figura 8 y se les calculó la media y desviación estándar por rango de edad tal como se realizó en los valores absolutos de PMN, linfocitos y monocitos agrupados por edades como se muestra en los cuadros 13, 14, 15 y 16 los cuales nos sirvieron de comparativo para los pacientes.

A los 28 pacientes con IDP's se les clasificó por su tipo de inmunodeficiencia y se les analizó con los valores de referencia obtenidos las poblaciones leucocitarias de 83 testigos sanos clasificados por edad. En el cuadro 18. se realizó el análisis de poblaciones leucocitarias en 7 pacientes con LXA se observa que el 100% de los pacientes con LXA, presentan valores inferiores en la población CD19 (linfocitos B) que van de 0-117 /mm³ comparados con los valores de referencia, esto se debe a que se ve afectado el gen que codifica para la tirosina cinasa de Bruton (Btk), esta proteína es

esencial para la supervivencia de la célula B, la progresión del ciclo celular y la proliferación en respuesta a estímulos antigénicos a través de receptores específicos. Además de ser una enfermedad ligada al sexo por lo que todos las pacientes fueron del sexo masculino.

En el cuadro 19 se realizó el análisis de poblaciones leucocitarias en 8 pacientes con A-T, se observa que los 8 pacientes presentan valores inferiores a los del valor de referencia en las poblaciones CD3 (Linfocitos totales), CD4 (Linfocitos T citotóxicos), CD8 (Linfocitos T cooperadores), CD19 (Linfocitos B) y 2 pacientes presentan disminución en CD16+56 (Linfocitos natural killer) esto se debe a que estos pacientes tienen una respuesta muy pobre de anticuerpos. Se ha observado en autopsias realizadas que este tipo de individuos tienen un timo pequeño similar al embrionario.

En el cuadro 20 se realizó el análisis de poblaciones leucocitarias de 4 pacientes con IDCS, se observa que en 2 pacientes no hay presencia de células en CD3, CD4 y CD8 y en los otros 2 pacientes sus valores de las poblaciones leucocitarias se encuentran por debajo de los valores de referencia, esto es porque en pacientes con este tipo de IDP's se combina la ausencia de funciones de linfocitos B y linfocitos T, debido a una mutación en un gen del cromosoma X que codifica una enzima llamada CinasaJanus 3 (Jak 3) cadena compartida por receptores para factores del crecimiento en la superficie de los linfocitos T y linfocitos NK, por lo que la función de los linfocitos B se ve afectada. En pacientes con este tipo de IDP's presentan un promedio de linfocitos de 1,700 por microlitro y muchos por debajo de 1,000.

En el cuadro 21 se realizó el análisis de poblaciones leucocitarias en 5 pacientes con IDCV, se observa que en 3 pacientes con IDCV presentan una disminución en sus poblaciones leucocitarias tanto de células B como en las células T, en este tipo de IDP's se presenta un defecto en la diferenciación de las células productoras de inmunoglobulinas a partir de linfocitos B maduros.

En el cuadro 22 se realizó el análisis de poblaciones leucocitarias en un paciente con W-A, el cual presenta una disminución en CD19 y valores superiores a los de referencia

en CD3, CD8 y CD16+56, esto se debe a que se afectan los linfocitos B y linfocitos T, este síndrome se hereda como un rasgo recesivo ligado al cromosoma X.

En el cuadro 23 se realizó el análisis de poblaciones leucocitarias de un paciente con DI-GEORGE, el cual presenta disminución en todas sus poblaciones esto se debe a que pacientes con este tipo de IDP's no presentan timo o este está en un tamaño menor al normal por lo que las poblaciones leucocitarias se ven afectadas.

En el cuadro 24 se realizó el análisis de poblaciones leucocitarias de 2 pacientes con síndrome HIGM, en el cual uno de ellos presenta valores mayores a los de referencia en las poblaciones CD3, CD4 y CD8.

A 2 pacientes con IDCV se les realizó el análisis de subpoblaciones de células B con la mezcla de anticuerpos CD19+, CD22+, CD27+ para la células B de memoria como se muestra en la figura 9; Los porcentajes de expresión se muestran en el cuadro 25, se puede observar que los dos pacientes presentan valores por debajo de los de referencia en las células B memoria.

Los 2 pacientes con probable deficiencia del eje IFN gamma-IL-12, se observa en la figura 11 y los porcentajes de expresión de IFN γ , CD119, IL-12, IL-12R se presentan en la tabla 27

En los 6 pacientes con síndrome hemofagocítico se observa en la fig. 12 que expresaron INF γ e IL-2 como los controles, sin embargo también se observa que hay una sobre expresión de TNF α como se muestra en el cuadro. 28.

13. CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la citometría de flujo es una herramienta de laboratorio que nos proporciona mucha información acerca de los diferentes inmunofenotipos de las poblaciones celulares y para el diagnóstico de IDP's.
- De los 113 pacientes, las manifestaciones clínicas, los estudios de laboratorio y la determinación de poblaciones leucocitarias por citometría de flujo ayudaron a determinar que 28 pacientes con IDP's de los cuales 7 pacientes con LXA, 8 con A-T, 4 con IDSC, 5 con CVID, 1 W-A, 1 con Di George y 2 con HIGM.
- La citometría de flujo en las IDP's ya diagnosticadas ayuda a determinar la expresión de las moléculas que están involucradas, como en el caso de la HIGM que no expresan CD154 y los IDCV que expresan pocas células B de memoria.
- También es importante la citometría de flujo para los estudios funcionales de las poblaciones leucocitarias, como en el caso del síndrome hemofagocítico ya que expresan un mayor porcentaje de expresión del TNF α en monocitos comparado con los testigos.
- Además de establecer valores de referencia en cuatro grupos de edades que van de 1 a 5 años, de 6 a 10 años, de 11 a 17 años y edad adulta con pacientes sanos y estos nos sirvieron de comparativo para los pacientes con IDP's.

14. ANEXO

14.1 Abreviaturas

APC. Alofocianina

BD. BectonDickinson

BFA. Brefeldrina

BTK. Tirosincinasa de bruton

CD3. Linfocitos T totales

CD4. Linfocitos cooperadores

CD8. Linfocitos citotoxicos

CD19. Linfocitos B

CD16+56. Células NK (natural killer)

CD40. Linajes de células B

CD40L.

CD69. Leucocitos activados, células T, células B, células NK

CD154.

FITC. Isotiocianato de Fluoresceína

HIGM. HiperIgM

HIV. Virus de Inmunodeficiencia Humana

IDP´S. Inmunodeficiencias primarias

IDCS. Inmunodeficiencia combinada severa

IDCV. Inmunodeficiencia común variable

IgA. Inmunoglobulina A

IgG. Inmunoglobulina G

IgM. Inmunoglobulina M

IL12. Macrófagos y células dendríticas

INF γ . Interferon gamma

INP. Instituto Nacional de Pediatría

JAK-3. CinasaJanus 3

LXA. Agammaglobulinemia ligada al cromosoma X

mAB. Anticuerpo monoclonal

MHC. Complejo mayor de histocompatibilidad

NK. Natural Killer

OMS. Organización Mundial de la Salud

PE. Ficoeritrina

PHA. Fitohemaglutinina

PerCP. Clorofilperhidrina

PMA. Forbolmiristato acetato

PMBC's. Célulasmononucleares

PMN. Polimorfonucleares

RAG1. Activadores de Recombinasa 1

RAG2. Activadores de Recombinasa 2

TCR. Receptor de células T

TNF α . Factor de necrosis tumoralalfa

W-A. Wiskott Aldrich

14.2 PREPARACIÓN DE REACTIVOS.

1.- PBS 10x

NaCl	80g
KH ₂ PO ₄	2g
NA ₂ HPO ₄ *12H ₂ O	29g
KCl	2g
Ph	7.4

Aforar a 1 litro con agua destilada y filtrar en membranas de 0.22 µm. Diluir 1:10 antes de comenzar a trabajar.

2. Solución fijadora.

Paraformaldehído al 1% diluido en PBS.

3. PBA (PBS-Azida).

Albúmina	0.5%
Azida de sodio	0.05%

Disolver en PBS 1x.

4. RPMI 1640

Medio	10.4g
Bicarbonato de sodio	2g
Agua	1L

Ajustar pH a 7.2
Filtrar en la campana

15. REFERENCIAS.

1. Roitt I, Delves P. Inmunología Fundamentos, 10ª ed. Buenos Aires Argentina: Panamericana; 2003.
2. Regueiro JR. Inmunología. Biología y patología del sistema inmune. 3ª ed. Madrid España: Médica Panamericana; 2003.
3. Hassner A. Biologic response modifiers in primary immunodeficiency disorders. *Annals of internal medicine*. 1991; 115: 294- 307.
4. Abbas A, & Lichtman A. Inmunología Celular y Molecular, 5ª ed. Madrid España: Elsevier; 2004.
5. Elorz Lambarri J, García Martínez JM, & Bilbao Aburto A. Inmunodeficiencias Primarias. *An. Pediatr*. 2004; 60(Supl.1): 19-23.
6. Kindt J, Goldsby R, Osborne B. Inmunología de Kuby. 6ª ed. Editorial McGraw-Hill. Interamericana; 2007.
7. Bruton O. C. 1952. Agammaglobulinemia. *Pediatrics* 1952; 9:722-728.
8. Carsetti R, Rosado M, Donnanno S, Guazzi V, Soresina A, Meini A, Plebani A, Aiuti F, Quinti I. The loss of IgM memory B cells correlate with clinical disease in common variable immunodeficiency. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2005; Vol. 115, No.2, 412.
9. Levy J, Español-Boren T, Thomas C. 1997. Clinical spectrum of X-linked hyper-IgM syndrome. *J Pediatr*. 2000; 131: 47.
10. Ferrari S, Giliani S, Insalaco A, Al-Ghonaium A, Soresina A, Loubser M, Avanzini M, Marconi M, Badolato R, Ugazio A, Levy Y, Catalan N, Durando A, Tbakhi A, Notarangelo LD, Plebani A. Mutation of CD40 gene cause autosomal recessive form of immunodeficiency with hyper IgM. *PNAS*. 2001; 100: 12614-19
11. Grimbacher B, Hutloff A, Schlesier M, Glocker E, Warnatz K, Dräger R, Eibel H, Fischer B, Schäfer A, Mages H, Kroczeck R, Peter H. Homozygous loss of ICOS is associated with adult onset common variable immunodeficiency. *Nature*. 2003; 4: 261.

12. González H, Amaya C. Evolución clínica en dos pacientes con síndrome de W-A. Gac.Med.Méx.2005; Vol. 141 No.1.
13. Parslow T, Stites D, Terr A, Imboden J. Inmunología básica y clínica, 10ª ed. Editorial. Manual moderno. 2002.
14. <http://www.geneclinics.org/profiles/ataxia-telangiectasia>
15. Fontán Casariego G. Inmunodeficiencias primarias. Clínica y formas variantes. Allergol et Immuno pathol. 2001; 29 (3):101-125.
16. Warnatz K, Denz A, Dräger R, Braun M, Groth CH, Guido W, Hermann E, Schlesier M, Peter H. Severe deficiency of switched memory B cells (CD27 pos IgM neg IgD neg) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease. Blood. 2001; 99: 1544
17. Kroemer G, Moreno de Alborán I, Gonzalo JA, Martínez-A C. Immuno regulation by cytokines. Crit. Rev. Immunol; 1993; 13:163-191.
18. Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. Annu. Rev. Immunol. 2001; 19:93
19. Casanova JL, Ábel L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. Annu. Rev. Immunol.2002; 20:581.
20. Caragol I, Hernández M, Español T. Defectos primarios de la respuesta antibacteriana. Unidad de Inmunología; 2002; Vol. 21: 8-10.
21. Bonilla F. &Geha R. Primary Immunodeficiency Diseases. J Allergy Clin Immunol. 2003; 111:571-81.
22. Almaguer Gaona C. Interpretación clínica de la biometría hemática. Medicina Universitaria. 2003;(5)18:35-40
23. Rangos basados sobre un estudio de Carl R. Jolliff (AAM), Lincoln Clinic, Lincoln, Nebraska. Suplementado con datos de Karen Cost, Ph. D., Norton Children's Hospital, Louisville, Kentucky, July. 1980.
24. Beutler E, Lichtman M, Kipps T, Kaushansky K. Williams Hematology. 7ª th. McGraw Hill Medical. 2005.

25. Green M. Pediatric diagnosis: Interpretation of symptoms and signs, children and adolescents. 5^aed; Philadelphia, W.B. Saun. 1991; 385-392.
26. Valentín R. M. Cómo estudiar un paciente con inmunodeficiencia primaria. Archivos de Alergia e Inmunología Clínica: 2001; 32 suppl. 2: S100-S101.
27. Attaelmannan M, Levinson SS. Understanding and identifying monoclonal gammopathies. Clin Chem. 2000; 46:1230-1238.
28. Cocker J, Burnett D. La ciencia del diagnóstico de laboratorio, 2^a ed. Editorial. Mc Graw Hill. Interamericana; 2007.
29. Robinson JP. Hanbook of flow cytometry methods. New York; Wiley-Liss. 1993.
30. Saphiro HM. Practical flow cytometry. 4thed. New York; Wiley-Liss. 2003.
31. Altman D.G., Bland J.M. Statics Notes: Diagnostic tests 1: sensitivity and specificity. BMJ; 308:1552 [Medline], 1994.
32. Janet K.A. Nicholson, PhD. Use of flow cytometry in the evaluation and diagnosis of primary and secondary immunodeficiency diseases. Arch Pathol Lab Med. 1989; 113:598-605.
33. Conley M. E, Notarangelo LD, Etzioni A. Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. Clin Immunol.1999; 93: 190 – 197
34. Stiehm ER. New and old immunodeficiency. Pediatr Res. 1992; 33(suppl.1):S2-S8.
35. Notarangelo L, Casanova J, Fisher A, Puck J, Rosen F, Seger R &Geha R. Primary immunodeficiency diseases: An update. J Allergy Clin Immunol. 2004; 114: 677-687.
36. Baptista gonzalez H &Alvarez Amaya C., Evolución clínica en dos pacientes con síndrome de Wiskott-Aldrich, Gac Méd Méx, 2005; 114 (1).
37. Bunk R, Dittrich A M, Schulze I, Horn J, Schmolke K, Volk H D, Wahn V, Höflich C. Rapid whole blood flow cytometric test to detect ICOS deficiency in patients with Common Variable Immunodeficiency. Int Arch Allergy Immunol. 2006;Vol 140: 342.
38. Allen RC, Armitage RJ, Conley ME. CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. Science. 1993; 259:990.

39. Maino V, Picker L. Identification of functional subsets by Flow Cytometry: intracellular detection of cytokine expressing. *Cytometry*.1998; 207-215.
40. Rojo A, Videgaray F & Pedroza J, Sepsis severa por neumococo en un paciente con inmunodeficiencia común variable, *Acta medica grupo ángeles*. 2008; Vol. 6
41. Blanco Quiros A, Arranz Sanz E, Agammaglobulinemia de Bruton (1952-2002) Cincuenta años de inmunodeficiencias primarias. *Boletín de la sociedad de pediatría de Asturias*. 2002; Vol.42,No.181