



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI  
HOSPITAL DE PEDIATRIA

“Comportamiento de clonas de linfocitos T a nivel periférico en pacientes pediátricos con encefalitis de Rasmussen posterior a tratamiento quirúrgico”

TESIS

PARA OBTENER DIPLOMA EN ESPECIALIDAD DE NEUROLOGIA PEDIATRICA

**PRESENTA**

Dra. Nancy Ivette Hernández Migueles. Médico Investigador

Servicio Neurología Pediátrica

Correo electrónico: [nancicilina@hotmail.com](mailto:nancicilina@hotmail.com)

Tel: 56276900. Ext. 22361

**TUTORES**

Dr. Darío Rayo Mares. Médico Neurólogo pediatra

Servicio de Neurología Pediátrica

Correo electrónico: [dariorayoneuro@yahoo.com.mx](mailto:dariorayoneuro@yahoo.com.mx)

Tel: 56276900. Ext. 22361

Dra. Rocío Herrera .Márquez

Área de Educación e investigación en salud

Correo electrónico: [rocio.herrmar@gmail.com](mailto:rocio.herrmar@gmail.com)

Tel: 56276900. Ext. 22306

Dra. Sandra Orozco Suárez

Unidad de Investigación en Enfermedades Neurológicas del Hospital Especialidades CMN SXXI.

Correo electrónico: [sorozco5@hotmail.com](mailto:sorozco5@hotmail.com)

Tel: 55780240



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



Acta de Examen de Tesis

“Comportamiento de clonas de linfocitos T a nivel periférico en pacientes pediátricos con encefalitis de Rasmussen posterior a tratamiento quirúrgico”

\_\_\_\_\_  
Dra. Ana Carolina Sepúlveda Vildosola  
Dirección de Educación e Investigación en Salud. Sinodal

\_\_\_\_\_  
Dr. Gerardo Sánchez Vaca  
Jefe Neurología Pediátrica. Sinodal

\_\_\_\_\_  
Dr. Luis Arenas Aguayo  
Neurólogo. Sinodal

\_\_\_\_\_  
Dr. Francisco Aguilar Rebolledo  
Neurólogo. Sinodal

## **INDICE**

Resumen. ....	4
Marco Teórico.....	6
Planteamiento del Problema.....	10
Justificación.....	11
Objetivos: general y específicos.....	12
Material y Métodos.....	13
Aspectos éticos.....	17
Factibilidad y Recursos.....	18
Resultados. ....	19
Discusión.....	30
Conclusión.....	34
Anexos.....	35
Cronograma de actividades.....	40
Referencias bibliográficas.....	41



## “Comportamiento de clonas de linfocitos T a nivel periférico en pacientes pediátricos con encefalitis de Rasmussen posterior a tratamiento quirúrgico”

Alumna: Nancy Ivette Hernandez Migueles

Tutores: Dr Darío Rayo Mares MBNP

Dra Rocío Herrera Márquez

Dra Sandra Orozco Suárez

**Antecedentes:** La encefalitis de Rasmussen es un padecimiento crónico, progresivo que se caracteriza por una epilepsia parcial motora, hemiparesia y deterioro cognitivo que llega a ser refractaria (persistencia de eventos epilépticos a pesar de tener tratamiento con fármacos a dosis y apego adecuados) a tratamiento. Presentando en IRM atrofia unihemisférica, alteraciones del núcleo caudado y zonas hiperintensas en T2 y/o Flair. Con una base inmunológica que se caracteriza a nivel histopatológico por infiltrado linfocitario y nódulos microgliales. Se ha identificado la presencia de autoanticuerpos antiGluR3 en algunos pacientes, sin embargo con el avance en los estudios el papel de la inmunidad celular sobre todo de la población de células T, ha tomado vital importancia como coparticipes en la perpetuación del daño a nivel neuronal y su participación en el desarrollo de la epileptogénesis, así como de su persistencia a nivel periférico aun en pacientes sometidos a tratamiento quirúrgico.

**Objetivo:** Describir el comportamiento de los niveles de linfocitos T medidos por citometría de flujo a nivel periférico en pacientes con diagnóstico de encefalitis de Rasmussen que hayan sido sometidos a tratamiento quirúrgico.

**Material y Métodos:** Estudio transversal de 7 pacientes; midiendo los niveles de subpoblaciones de linfocitos T (CD4, CD8) mediante citometria de flujo en sangre

periférica en los pacientes pediátricos con encefalitis de Rasmussen, Se utilizo un análisis descriptivo, utilizando medidas de tendencia central para las variables cualitativas así como la prueba paramétrica de correlación de Pearson para establecer la asociación entre los niveles de linfocitos Tcd4+ a nivel periférico y los diferentes parámetros clínicos de estos pacientes (Escala de Engel, numero de fármacos por mes y numero de crisis por mes), así como la prueba de Wilcoxon para el análisis de comportamiento clonas de linfocitos T CD4+ pre y posquirúrgicas.

**Resultados:** Se encontraron alteraciones en la inmunidad celular referidas fundamentalmente al aumento significativo de las células CD4+, principalmente las CD4+ activadas sobre CD8+, excepto en 2 pacientes. Al realizar la prueba de correlación de Pearson entre niveles de linfocitos T CD4+/ Escala de Engel, número de crisis por mes y número de fármacos se encontró una correlación positiva en los 3 casos, con una *r* de 0.60, 0.20 y 0.56 respectivamente. Se realizó la prueba Wilcoxon obteniendo un valor de  $p < 0.03$  lo que traduce significancia estadística.

**Conclusiones:** Existe una elevada respuesta inmune desde la etapa prequirúrgica de la enfermedad a nivel periférico, la cual disminuye de forma importante en el postquirúrgico que se correlaciona con mejoría clínica, sin embargo se mantiene elevada en algunos pacientes no controlados en Escala de Engel IV. Las principales poblaciones celulares que persisten elevadas a nivel periférico en el 71% de nuestros pacientes correspondieron a CD4+ activadas y en menor proporción las células CD8+.

## Marco Teórico

La encefalitis de Rasmussen es un padecimiento neurológico crónico, muy raro que se presenta con mayor frecuencia en la infancia, se caracteriza por el inicio de crisis en pacientes con historia de desarrollo previamente sano, con una edad promedio de 3-10 años, con máxima incidencia en la edad escolar aproximadamente 6 años. Las manifestaciones clínicas se han dividido en 3 fases: la inicial que en ocasiones no se evidencia en todos los pacientes conocida como “*prodrómica*” con duración de 7-12m con presencia de epilepsia parcial motora de inicio distal en extremidades en ocasiones a nivel facial que varían en frecuencia; la 2ª fase “*aguda*” con duración aproximada de 8 meses donde se intensifica la gravedad y el número de crisis llegando hasta una epilepsia parcial continua, incluso presentando otros tipos de crisis como tónico-clónico generalizadas 42%, parciales complejas 19% (evidenciando nuevas áreas de reclutamiento epileptogénico), en esta fase también se establecen otros déficits como hemiparesia, hemianopsia, disartria, disfasia, alteración cognitiva progresiva llegando incluso al retraso mental; la 3ª fase *residual* o de “estabilidad” el déficit ya está establecido las crisis son menos frecuentes que en la fase aguda sin embargo persisten con frecuencia elevada. El diagnóstico es clínico y con criterios de gabinete como: en la resonancia magnética suele mostrar áreas de hiperintensidad cortical en T2/Flair, atrofia del hemisferio afectado, alteración del núcleo caudado, especialmente en fases avanzadas de la enfermedad. El electroencefalograma revela un ritmo de base anormal con actividad paroxística focal o generalizada.<sup>1</sup>

Las características neuropatológicas de la encefalitis de Rasmussen son además de la inflamación crónica (células linfocíticas) perivascular focal y leptomeníngea, pérdida neuronal, astrogliosis, activación de la microglia, nódulos microgliales, atrofia cortical focal y en algunos casos cambios espongiiformes degenerativos<sup>2</sup>

Inicialmente se dio a conocer la sospecha sobre el origen de la etiología viral de este padecimiento, asociando la fisiopatología a una infección por virus neurotrópicos (CMV, VEB, Flavivirus) esto, debido a la reacción inmune encontrada en las necropsias manifestada por elevada respuesta linfocítica y nódulos microgliales. El hallazgo de estas lesiones inflamatorias en la biopsia cerebral sugiere que este tipo de epilepsia es el

resultado de una encefalitis crónica, es por esto que solo en algunos pacientes se ha visto el beneficio transitorio de la terapia inmunomoduladora y en el resto de pacientes la epilepsia que presentan llega a ser refractaria al tratamiento donde la hemisferectomía ha mostrado mayor beneficio para el control de sus crisis.<sup>3</sup>

Hacia la década de los 90s se da paso a la hipótesis autoinmune al detectarse anticuerpos contra receptores de glutamato (subunidad GluR3, una de las subunidades del ácido alfa amino-3-hidroxi-5 metil 4 isoxalepropionico –AMPA-), así como Anticuerpos anti-GAD (antidescarboxilasa) del ácido glutámico, sin embargo ambos no son específicos de esta enfermedad ya que también se han detectado en otros tipos de epilepsia como la epilepsia catastrófica infantil, ambos son capaces de activar la vía clásica del complemento, provocando citólisis neuronal y epileptogénesis; en algunos pacientes el tratamiento con plasmaféresis puede lograr disminuir la progresión de la enfermedad de manera transitoria.<sup>3</sup>

En años más recientes se señala el papel de alteraciones a nivel de la barrera hematoencefálica, produciendo extravasación de auto anticuerpos al parénquima cerebral, provocando daño local persistente, siendo este un factor para producir la hiperexcitabilidad que originara los eventos epilépticos.<sup>3</sup>

Hacia el año 2000 se hace énfasis que no en todos los casos se encuentra la presencia de participación del complemento directamente, sin embargo se comienza a demostrar con mayor importancia la participación de la actividad de los linfocitos T citotóxicos sobre neuronas y astrocitos provocando neurodegeneración, alteración de la homeostasis neuronal, cambios en la regulación del GABA, Glutamato de esta manera interviniendo en el proceso de epileptogénesis. Se observa presencia de linfocitos T citotóxicos sobre neuronas y astrocitos; éstas células fueron vistas al polarizarse frente a la membrana neuronal de los astrocitos, infiriendo que en el SNC de pacientes con encefalitis de Rasmussen el tejido afectado contiene poblaciones restringidas de células T que se expandieron a partir de una clona, demostrando así la participación de las células T en la neurodegeneración y pérdida de, lo que demuestra que la inflamación precede a la ocurrencia de los eventos epilépticos y no lo contrario, que los eventos epilépticos inducen inflamación, sin embargo se considera un círculo vicioso que se perpetúa. Siendo también

la pérdida de astrocitos un mecanismo más que contribuye a la epileptogénesis ya que estos son importantes para mantener la homeostasis neuronal. <sup>4</sup>

Previamente se creía que la intensidad de la inflamación estaba representada por la acumulación de células T y proliferación microglial y que había una correlación inversa con la duración de la enfermedad, observando también que distintos estados de inflamación pueden coexistir en el mismo paciente con una distribución multifocal, lo cual es consistente con un proceso inmune progresivo. Se encuentran distintos estudios donde se ha enfocado la importancia de inmunidad celular acerca de esta patología dentro de los cuales encontramos los siguientes resultados:

Hay evidencia de la prominente inmunoreactividad de CD3+ y CD7+ en la mayoría de las células linfoides observadas y la mayoría de estas células T con inmunofenotipo T citotóxico/supresor eran CD8+ evidenciado por inmunoreactividad, lo cual se observó en el estudio de 7 casos con Encefalitis de Rasmussen (Prayson 2002)<sup>5</sup>

Estudio de comportamiento en distintos estadios de la enfermedad de distintas moléculas inmunológicas encontrando que: los niveles de IgG, TNF $\alpha$  se encuentran elevados comparados con sujetos normales; cuenta leucocitaria, IFN $\gamma$ , IL12 y granzyma B, se elevan en la etapa temprana de la enfermedad; células T CD4+, CD3+, CD8+, IgG, granzyma B y TNF $\alpha$  persisten elevadas en todos los estadios de la enfermedad. Esto es muy importante ya que las células TCD8 inducen degeneración neuronal y al mismo tiempo estimulan la secreción de Granzyma B que es un fuerte activador de caspasas (mediador de apoptosis).<sup>6</sup>

La presencia de lesiones inflamatorias activas a nivel de SNC en la enfermedad de Rasmussen que contiene gran número de linfocitos T con reclutamiento temprano, sugiere una respuesta inmune T-dependiente que contribuye al inicio de la evolución de la enfermedad, así la observación de granzyma B que contiene células T CD8+ en estrecha relación con moléculas del MHC clase I aumenta la hipótesis de un ataque neuronal mediado por células T-CD8+ como llave en el mecanismo inmunopatogénico. Aparte de la muerte neuronal, las células CD8+ también pueden responsables de la degeneración de los astrocitos encontrados en las lesiones de esta enfermedad. <sup>7</sup>

Se analizó el comportamiento de células T CD4+, CD8+ y secuencias de expansiones clonales en muestras de biopsia cerebral (CNS) y se comparó con su respuesta celular en sangre periférica, mediante inmunohistoquímica. Se detectaron expansiones oligoclonales de células T en el SNC en todos los pacientes, mismas que no se evidenciaron en el grupo control. Con respecto a las células CD8+ se evidenció una amplia expansión clonal de muchas familias de cadenas beta en todos los pacientes, en contraste con las evidenciadas por células T-CD4+, observando una respuesta gaussiana en los controles sanos.<sup>7</sup> Adicionalmente, se encontró elevación persistente a nivel periférico de clonas de células T-CD8+ en la totalidad de los pacientes de los que se pudieron obtener muestras seriadas, manteniéndose con este comportamiento hasta más casi dos años posterior a evento quirúrgico; se reportó que del 10-45% de las expansiones clonales de las muestras de tejido cerebral de los pacientes con encefalitis de Rasmussen fueron compartidos con los repertorios de células T-CD8+, mientras que no hubo expansiones compartidas con células T-CD4+.<sup>7</sup>

Se cree que la persistencia de las células CD8+ a nivel periférico se debe a que encuentran su antígeno específico durante este tiempo debido a que las células T no son confrontadas con su antígeno por un tiempo; después de su expansión estarán sujetas a los mecanismos de regulación para asegurar la homeostasis principalmente a través de la vía Fas/FasL.<sup>7</sup>

Todo esto confirma nuevamente la existencia de un proceso que consolida y perpetúa las reacciones del proceso inflamatorio a nivel cerebral y exacerbar el daño a nivel cerebral contribuyendo a mayor atrofia, así como al mantenimiento de la fisiopatología que contribuye a la epileptogénesis en el paciente con el subsecuente deterioro de la función cognitiva y mala respuesta a tratamiento.<sup>8</sup>

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Se tiene el conocimiento sobre la etiología autoinmune sobre la encefalitis de Rasmussen, inicialmente sobre la vía clásica del complemento, posteriormente se ha dado énfasis a la coparticipación de los linfocitos T en el proceso de neurodegeneración y epileptogénesis, se han desarrollado diversos estudios inicialmente en líquido cefalorraquídeo, posteriormente en tejido cerebral y a nivel periférico, donde se demostró elevación de clonas de linfocitos T hasta dos años postquirúrgico, se ha visto que estas células son responsables de inducir daño neuronal y participar en la epileptogénesis.

En nuestra población de pacientes con este padecimiento no conocemos si la cirugía reduce la respuesta inmune dada por la medición de clonas de linfocitos que son las principales células que según reportes previos permanecen elevadas hasta 2 años posterior a tratamiento quirúrgico y qué tipo de pacientes lo mantienen, es por eso que deseamos conocer el comportamiento de las mismas en nuestros pacientes.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACION:**

¿Cuál es el comportamiento de las clonas de linfocitos T a nivel periférico en pacientes pediátricos con encefalitis de Rasmussen posterior a tratamiento quirúrgico?

## **JUSTIFICACION**

Se sabe que la Encefalitis de Rasmussen es un padecimiento crónico progresivo que conduce a deterioro cognitivo importante y deficitis que provocan limitaciones en la calidad de vida, con una epilepsia refractaria a tratamiento.

Ha habido avances en el papel que juega la inmunidad sobre la fisiopatogenia acerca de este padecimiento, aun son pocos los estudios sobre el comportamiento de clonas de linfocitos a nivel periférico, en nuestra población no contamos con ninguno hasta el momento, seria de importancia realizarlo ya que nos orientaría a conocer sobre el comportamiento de la inmunidad en el postquirúrgico de esta enfermedad y probablemente podría ayudar a implementar tratamientos inmunomoduladores si estos fueran de utilidad dependiendo del resultado.

## **OBJETIVO GENERAL**

- Se describió el comportamiento de los niveles de linfocitos T por citometría de flujo a nivel periférico en pacientes con diagnóstico de encefalitis de Rasmussen que hayan sido sometidos a tratamiento quirúrgico.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Se evaluaron los niveles de linfocitos T por citometría de flujo, a nivel periférico en pacientes con diagnóstico de encefalitis de Rasmussen que hayan sido sometidos a tratamiento quirúrgico.
- Se describió el número de eventos epilépticos por día en pacientes con diagnóstico de encefalitis de Rasmussen que hayan sido sometidos a tratamiento quirúrgico
- Se describió el número de fármacos antiepilépticos utilizados en cada paciente con diagnóstico de encefalitis de Rasmussen que hayan sido sometidos a tratamiento quirúrgico.
- Se describió la asociación entre los niveles de linfocitos T y el número de eventos epilépticos por día, el número de fármacos y la Escala de Engel en cada paciente con diagnóstico de encefalitis de Rasmussen que hayan sido sometidos a tratamiento quirúrgico.

## **MATERIAL Y METODOS:**

**Diseño:** Transversal, descriptivo.

**Lugar y Fecha:** Se realizó en el consultorio de Neurología del Hospital de Pediatría CMNSXXI y laboratorio clínico.

**Universo de Trabajo:** Pacientes con diagnóstico de encefalitis de Rasmussen atendidos en el Hospital de Pediatría CMN SXXI.

**Tipo de muestreo:** Por conveniencia

## **CRITERIOS**

### Criterios de Inclusión:

- Todos los pacientes con diagnóstico de encefalitis de Rasmussen sometidos a tratamiento quirúrgico y que contaron con toma previa de linfocitos T en sangre periférica.

### Criterios de Exclusión:

- Pacientes que no aceptaron participar en el estudio
- Pacientes que estén recibiendo inmunoterapia, tratamiento con esteroide y o pacientes con presencia de proceso infeccioso al momento de realizar toma de muestra.

Procedimiento:

1. Los pacientes que contaron con los criterios de inclusión se citaron en el consultorio de neurología para toma de muestra en sangre periférica y se realizó la siguiente medición:
2. Citometría de flujo:
  - Se obtuvo 3ml de sangre periférica la cual fue procesada en un citómetro de flujo de acuerdo al protocolo de Kraan et al (2008) el cual se describe brevemente; las muestras se resuspendieron con un amortiguador de fosfato (PBS) y se centrifugaron por 5 minutos a 500g a temperatura ambiente, el sobrenadante se aspira y la muestra se resuspende en 300mcl de PBS, transfiriendo 100mcl de suspensión de células en tubos de polietileno de 12x75mm, añadiendo 5µl de cada anticuerpo (CD4, CD8, CD69, HLA-DR) e incubando por 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad añadiendo 2ml de PBS y mezclando, para remover los eritrocitos al inicio del procedimiento se utiliza una solución que causa lisis (cloruro de amonio).
  - El análisis se llevó a cabo mediante un citómetro FACS scalibur.
  - De esta manera se llevó a cabo la cuantificación de niveles de linfocitos T a nivel periférico.

TABLA DE VARIABLES

Variable	Definición Conceptual	Definición Operacional	Escala	Tipo y Categoría
<b>Encefalitis Rasmussen</b>	<b>de</b> Presencia de epilepsia continua + alteración unihemisférica en IRM y bx cerebral con tejido inflamatorio	Pacientes con dx establecido de Encefalitis de Rasmussen que hayan sido sometidos a tratamiento quirúrgico	Presente o ausente	Cualitativa nominal
<b>Número de eventos epilépticos</b>	<b>de</b> Movimiento corporal producido por estimulación anormal eléctrica cortical	Frecuencia de eventos convulsivos presentados durante el día	Cuantitativa	Cuantitativa continua
<b>Numero de fármacos antiepiléptico</b>	<b>de</b> Sustancia determinada a combatir la aparición de eventos epilépticos	Cantidad de fármacos antiepilépticos que utilizan para el control de la epilepsia	Cuantitativa	Cuantitativa continua
<b>Niveles de linfocitos T a nivel periférico</b>	<b>de</b> Células correspondientes a leucocitos agranulocitos a nivel periférico	Nivel plasmático de subpoblaciones de linfocitos T	Tipo CD4, Tipo CD8, Tipo CD69	Cuantitativa discreta

**Tabla 2.** Escala de Engel modificada

CLASE	SUBTIPOS
<b>Clase I:</b> <b>Libre de crisis</b>	a. Completamente libre de crisis después de la cirugía
	b. Solamente Crisis parciales y/o auras simples no discapacitantes después de la cirugía
	c. Algunas crisis discapacitantes después de la cirugía, pero libre de crisis en por lo menos los 2 últimos años
	d. Crisis generalizadas después del retiro de los FAEs
<b>Clase II:</b> <b>Crisis infrecuentes (casi libre de crisis)</b>	a. Inicialmente libre de crisis discapacitantes pero con crisis de manera infrecuente actualmente
	b. Crisis discapacitantes infrecuentes desde la cirugía
	c. Crisis ocasionales discapacitantes desde la cirugía, pero infrecuentes en los 2 últimos años
	d. Solo crisis nocturnas , que no provocan discapacidad
<b>Clase III:</b> <b>Mejoría significativa</b>	a. Reducción significativa de las crisis
	b. Períodos libres de crisis prolongados que acumulan más de la mitad del tiempo de seguimiento, pero no mayores de 2 años
<b>Clase IV:</b> <b>Sin mejoría significativa</b>	a. Reducción significativa de las crisis (entre 50-90%)
	b. Sin cambios apreciables (menos del 50% de reducción)
	c. Empeoramiento de las crisis

Ya que nuestra población de estudio, cuenta con el antecedente de haber sido sometidos a procedimiento quirúrgico (hemisferectomía) y se sabe el comportamiento clínico actual de todos ellos con lo que respecta a tipo y número de eventos epilépticos se pueden clasificar en base a una clasificación clínica como la Escala de Engel modificada, la cual estadifica clínicamente a pacientes sometidos a cirugía de epilepsia en el seguimiento a través del tiempo, estableciendo su condición actual. Se designa Clase I como la de mayor estabilidad clínica y sin evidencia de crisis epilépticas; a menor estabilidad clínica y mayor presencia de eventos epilépticos progresa la estadificación de la escala hasta la clase IV, que significa sin mejoría clínica ( *Tabla 2*)

### **Análisis:**

Para el análisis de los resultados se empleó estadística descriptiva, estimando medidas de tendencia central (promedio, rangos) para las variables cualitativas y medidas de dispersión (desviaciones estándar) para las variables cuantitativas.

Se utilizó la prueba paramétrica de Correlación de Pearson para establecer la asociación entre la cuantificación de linfocitos T y los parámetros clínicos (Escala de Engel, número de crisis por mes y número de fármacos), prueba de Wilcoxon para analizar las variables cuantitativas entre los niveles de linfocitos T pre y posquirúrgicos.

### **Aspectos Éticos:**

Se consideró un estudio de riesgo mínimo, por lo que se solicitó el consentimiento informado por parte de los padres o tutores de pacientes.

Se solicitó la aprobación del Comité de Investigación para la realización de dicho estudio, además de consentimiento verbal y escrito de los padres.

Se mantuvieron los derechos básicos de los pacientes como autonomía, no maleficencia, beneficencia, en caso de surgir alguna complicación durante la administración del tratamiento se realizaron las correcciones oportunamente.

Los pacientes tendrán derecho a conocer los resultados generados por este estudio en caso de que sean solicitados.

El presente proyecto se ajustó a los preceptos enunciados en la declaración de Helsinki y sus revisiones así como a lo estipulado en la Ley General de Salud en cuanto a la investigación médica en sujetos humanos. Se anexa un instructivo en donde se especifica en lenguaje claro y sencillo los objetivos del proyecto, los beneficios esperados en los datos obtenidos para el diagnóstico oportuno, la manera en que participaron los pacientes, la utilización del material obtenido para cumplir con los objetivos planteados, así como hacer hincapié que en caso de solicitar su separación del estudio, no influirá en la atención médica que sea necesaria. Al final del instructivo se anexó la hoja de consentimiento

informado que incluye un resumen de lo anotado en el instructivo, también en lenguaje claro y sencillo, y un espacio en donde el paciente acepta participar en el proyecto, anotándose nombre y firma (huella digital) del paciente, de un testigo y del investigador responsable.

### **Recursos y factibilidad:**

El proyecto se llevó a cabo en el Hospital de Pediatría CMN SXXI, servicio de Neurología Pediátrica y en laboratorio clínico donde se llevó a cabo la medición de linfocitos T mediante citometría de flujo.

#### *Recursos:*

- Residente de neurología pediátrica quien tomó 3ml de sangre periférica a los pacientes que cumplan con los criterios de inclusión
- Laboratorio clínico donde se llevó a cabo el procesamiento de la muestra en el citómetro de flujo, equipo FACS scalibur.
- Laboratorio donde se realizó el análisis y cuantificación de clonas de linfocitos T a nivel periférico.
- Se utilizaron programas computacionales: Word para realizar el documento completo, captura de datos y análisis en programa Excel para la elaboración de gráficos y presentaciones preliminares, Graph Pad Prism 4 para graficas finales.

## RESULTADOS

Se tiene una población de 8 pacientes en seguimiento en consulta externa, de los cuales se incluyeron siete pacientes constituyendo el 87.5% de la población, todos del género masculino, con un rango de edad de 8 a 17 años de edad, (mediana 15 años), todos los pacientes cuentan con el antecedente de haber sido sometidos a procedimiento de hemisferectomía con un rango de tiempo postquirúrgico de 1.5 hasta 6 años (mediana 4 años) como se observa en la *tabla 1*.

**Tabla 1. Clasificación de sujetos de estudio**

Número de caso	Género	Edad en años	Años postcirugía	Número de crisis/mes	Tipo de evento epiléptico	Escala de Engel	Número de FAE que consume
1	M	9	3.5	12	PS	III a	3
2	M	14	3.5	0	PC	II c	1
3	M	15	4	0	NA	II b	4
4	M	15	5.5	0	NA	I a	1
5	M	16	6	0	NA	I c	3
6	M	17	1.5	450	PC y TG	IV b	4
7	M	8	4.8	0	NA	I a	1

\*PS: parcial simple/ \* PC: parcial complejo / \*TG: tónicas generalizadas / \*NA: no aplica / \*FAE: fármaco antiepiléptico

### - Hallazgos clínicos:

Con respecto a la condición clínica actual de cada uno de los casos encontramos que: en 4 casos (pacientes 3,4,5 y 7) se encuentra estabilidad clínica, es decir, libres de crisis; en el caso número 2 presenta eventos clínicos esporádicos aproximadamente 2 en 6 meses; en el caso número 1 los eventos llegan a ser con mayor frecuencia hasta 12 por mes; sin embargo en el sujeto número 6 los eventos son tan frecuentes como los previos al evento quirúrgico

llegando a una frecuencia de 450 por mes; por lo tanto se encuentra persistencia de eventos epilépticos en el 42% de nuestra población.

De acuerdo al tipo de evento epiléptico que se evidencia en estos pacientes como sabemos los más frecuentes son constituidos por los eventos parciales motores (PS) sin embargo también presentan otro tipo de crisis como son parciales complejas (PC) y tónicas generalizadas (TG), de acuerdo a nuestra población de estudio solo en el 42.8% (3 pacientes) observamos persistencia de eventos epilépticos clínicos actualmente, siendo del tipo Parcial simple en el paciente 1, Parcial complejo en el paciente 2 y de tipo Parcial complejo y Tónico generalizado en el caso número 7 donde se evidencian la mayor frecuencia de eventos con respecto al resto de los casos.

Del total de casos se analizó el número de fármacos antiepilépticos que actualmente utilizan para el control de la epilepsia encontrando que el 57% de los pacientes sometidos al estudio aun se encuentran bajo tratamiento con polifarmacia (más de 2 fármacos), solo en los casos número 2, 4 y 7 se encuentran con monoterapia; los casos 1 y 5 ingieren 3 FAEs y los sujetos 3 y 6 se encuentran con 4 FAEs para su control.

De acuerdo a la clasificación clínica conocida como Escala de Engel modificada a la que se hizo referencia en la *Tabla 2*(pág 15), se encuentra lo siguiente en base a los 7 sujetos de estudio: el 42.8% (3 sujetos) se encuentra en Clase I, de ellos el 66.6% (2 sujetos) Clase Ia y el 33.3% (1 caso) Ic; el 28.5% (2 sujetos ) se encuentra en Clase II, de los cuales el 50% es clase IIb y 50% IIc; el 14.2% (1 caso) se encuentra en Clase IIIa; el restante 14.2% (1 sujeto) se encuentra en clase IVb de la escala de Engel.

## **Resultados citometría de flujo**

Se llevó a cabo la medición por citometría de flujo de clonas de linfocitos T a nivel periférico en pacientes pediátricos con encefalitis de Rasmussen con antecedente de haber sido sometidos a tratamiento quirúrgico con técnica previamente descrita (en apartado de procedimiento) y que tuvieran una medición prequirúrgica de la respuesta inmune lo que ayudo al diagnóstico de este síndrome.

Se muestra una tabla con los datos obtenidos de las citometrías prequirúrgicas y posquirúrgicas de los 7 casos de estudio. (*Tabla 3*)

De acuerdo a ésta, se observa disminución de la celularidad total postquirúrgica en el 90% de los casos; el porcentaje de linfocitos totales solo disminuyó en el 28% de los casos en el control postquirúrgico (casos 3 y 5). *Tabla 3*

En los datos prequirúrgicos: se observa en el 57% (4 casos) una alta prevalencia de la población de células T, así como en el 100% de los casos la presencia de predominio de células CD4+ (cooperadoras) y CD8+ (citotóxicas) activadas, mismas que en el postquirúrgico disminuyen en proporción al total de eventos epilépticos y al total de linfocitos presentes, sin embargo en el caso número 6 donde el descenso fue mínimo cercano al 50% en ambas poblaciones de clonas se observa persistencia elevada de activación de las mismas.

**Tabla 3. Citometrías prequirúrgicas y posquirúrgicas**

	Número total células	Porcentaje de Linfocitos	Porcentaje de células T	Porcentaje de de células CD4+	Porcentaje de células CD4+/HLA <sup>Dr</sup>	Porcentaje de células CD8+	Porcentaje de Células CD8+/ HLA <sup>Dr</sup>
Caso 1 preqx	84210	29.89	34.38	7.63	98.4	7.69	98.4
posqx	50000	37.7	11	78.1	11.1	5.6	7.4
Caso 2 preqx	50000	39.56	14.85	7.74	6.6	8.51	8.5
posqx	10000	40.6	30	55	1	34	3
Caso 3 preqx	50000	42.7	18.2	6.8	14.08	8.2	11.54
posqx	42000	40	30	55	3.8	34	1
Caso 4 preqx	41470	21	19.5	3.9	7.3	3.7	1.5
posqx	38782	28.2	19.4	11.8	0.3	6.4	0.6
Caso 5 preqx	58000	35	59	7.8	5.3	7.5	8.5
posqx	50000	24.9	58	60	1	32	6.3
Caso 6 preqx	71170	18.7	31.56	31.5	49.5	17.8	44.4
posqx	35000	40.7	22	77.7	22	11.6	12.5
Caso 7 preqx	10000	12.27	33.7	33.7	36.28	22.4	18.11
posqx	100000	7.3	13	11.6	4.6	6	3.6

La celularidad con respecto al número de linfocitos totales aún persiste por encima del promedio en 3 casos (*grafico 1.1*) como se observa en control posquirúrgico, los cuales corresponden a los sujetos de estudio 1,3 y 6. En el control prequirúrgico todos los casos tienen población de células T cercanas al promedio las cuales mantienen el mismo comportamiento en el posquirúrgico, excepto en un caso correspondiente al sujeto 5 que se encuentra muy por encima del mismo (*grafico 1.2*).

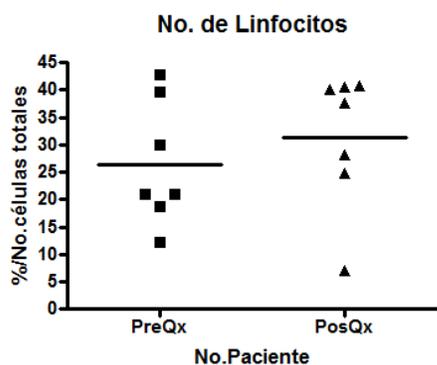


Figura 1.1 . Gráfica de dispersión de datos que muestra % total de linfocitos en pre y posquirúrgico en los 7 casos

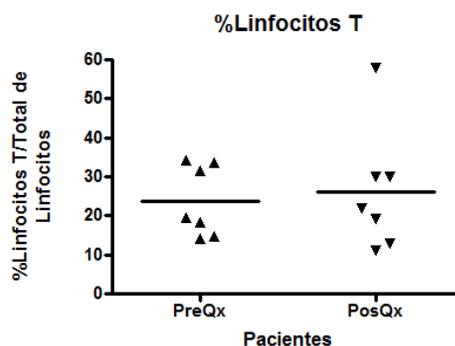


Figura 1.2 . Gráfica de dispersión de datos que muestra % total de linfocitos T en pre y posquirúrgico en los 7 casos

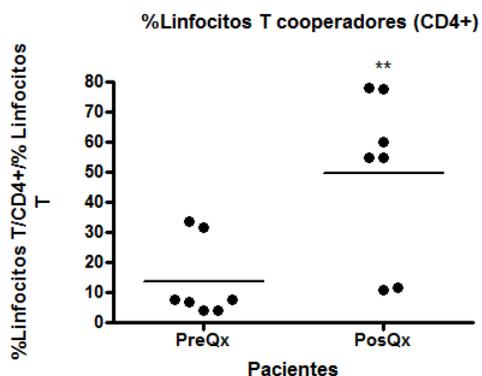


Figura 1.3 . Gráfica de dispersión de datos que muestra % total de linfocitos T CD4+ (cooperadores) en pre y posquirúrgico en los 7 casos

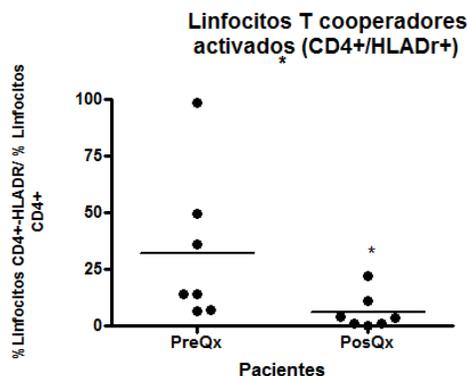


Figura 1.4 Gráfica de dispersión de datos que muestra % total de linfocitos T CD4+ (cooperadores) activados en pre y posquirúrgico en los 7 casos

Del mismo modo se observo una presencia elevada de células T CD4 (cooperadoras) y células T CD4+ activadas en el prequirurgico y una reducción significativa, principalmente en las CD4+ activadas ( $p < 0.05$ ) postcirugia, manteniendo un nivel cercano al promedio de todos los casos, persistiendo por encima de este en un sujeto correspondiente al caso 6. (*grafico 1.3 y 1.4*)

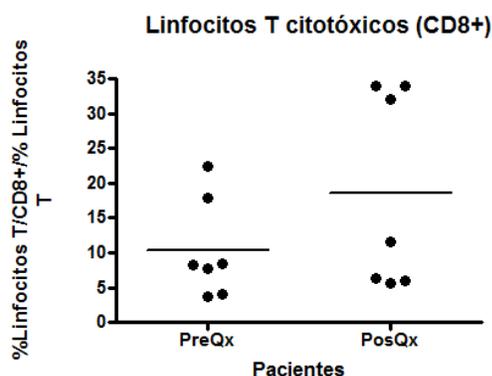


Figura 1.5 . Gráfica de dispersión de datos que muestra % total de linfocitos T CD8+ (citotóxicos) en pre y posquirúrgico en los 7 casos

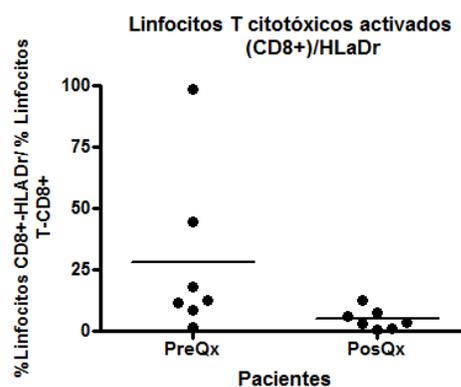


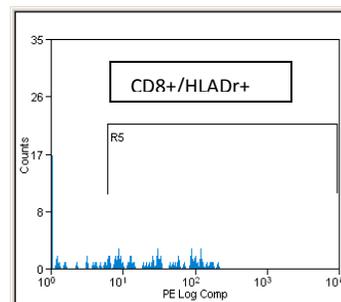
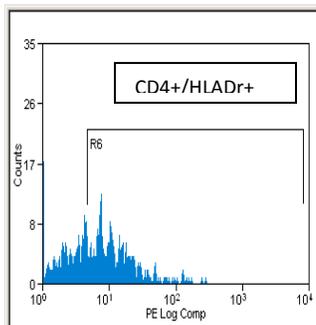
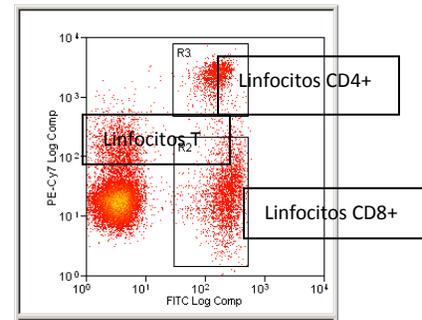
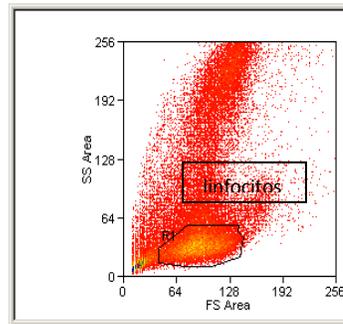
Figura 1.6 . Gráfica de dispersión de datos que muestra % total de linfocitos T CD8+ (citotóxicos) activados en pre y posquirúrgico en los 7 casos

Con respecto a las células T CD8 y T CD8+ activadas se observa en los *gráficos 1.5 y 1.6* que hay disminución en niveles posquirúrgicos principalmente en CD8+ activados manteniéndose todos muy con valores muy cercanos al promedio, en ambos gráficos los 2 casos que coinciden elevados en posquirúrgico son los sujetos que corresponden a los casos 1 y 6.

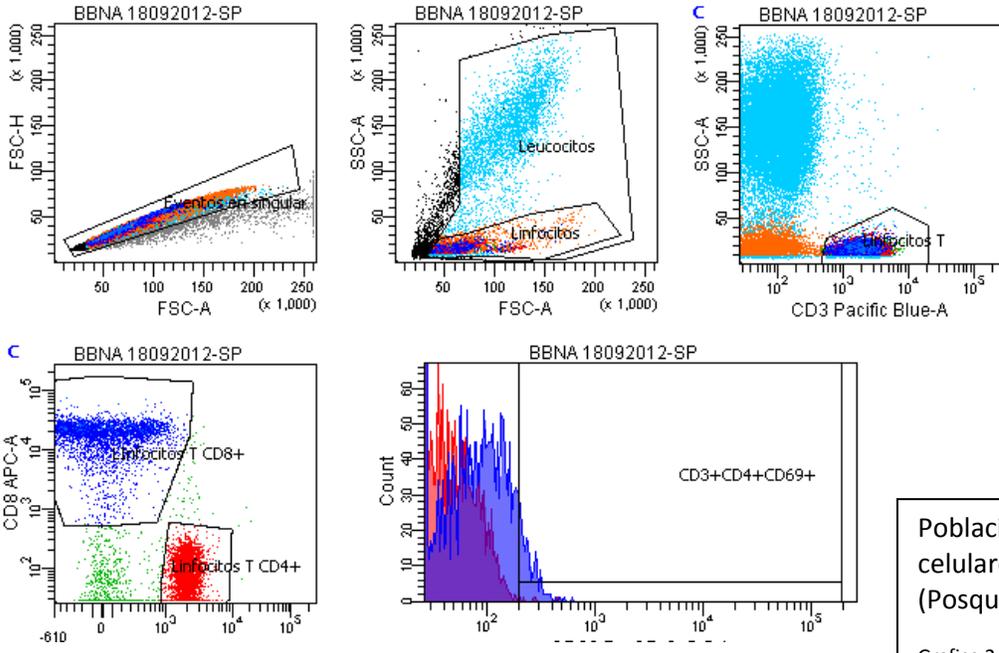
En las siguientes imágenes, se puede observar como varía la población de linfocitos T; se exponen 2 casos con la imagen de citometría de flujo el caso número 2 y el caso numero 6 ya que en el primero, como se mencionó en los hallazgos clínicos es un paciente con 3.5 años de postquirúrgico, con escala de Engel IIc y en control con 1 fármaco y en el segundo caso (caso número 6) es un paciente con 1.5 años de postquirúrgico, escala de Engel IVb y 4 fármacos para su seguimiento.

## Caso número 2 . Figura 2

Poblaciones celulares  
(Prequirúrgica)



En este caso se puede observar en la citometría prequirúrgica un porcentaje elevado de linfocitos que corresponden a la población de células T, así como una alta activación de células CD4 (cooperadoras) y CD8+ (citotóxicas) aproximadamente con un valor de 6.6% y 8.5% que disminuyeron considerablemente en el control postquirúrgico a 3.5 años del procedimiento, a 1% y 3% respectivamente, presentando así una disminución importante de la respuesta inmune inicial, lo que se correlaciona probablemente con la frecuencia actual de eventos referidos y con la monoterapia necesaria para su control.

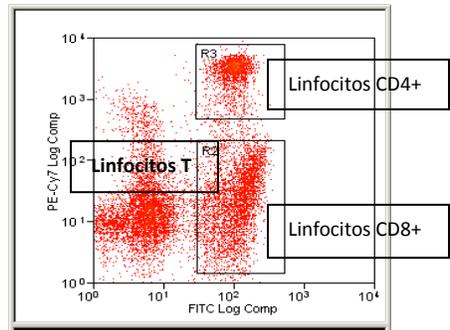
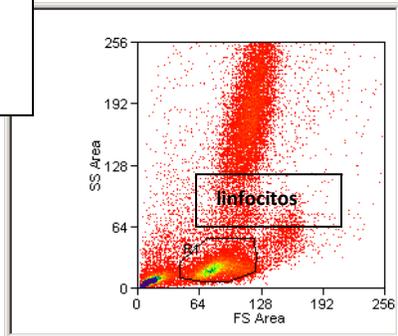


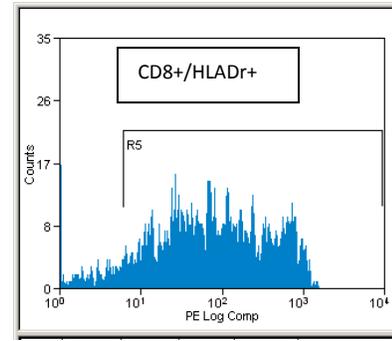
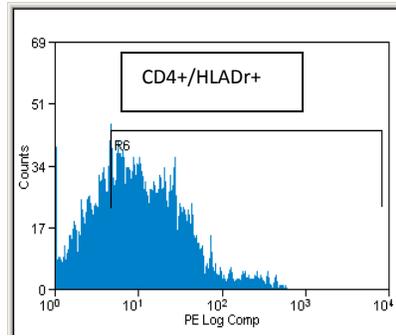
Poblaciones celulares (Posquirúrgica)

Gráfico 2.1

**Caso número 6 Figura 3**

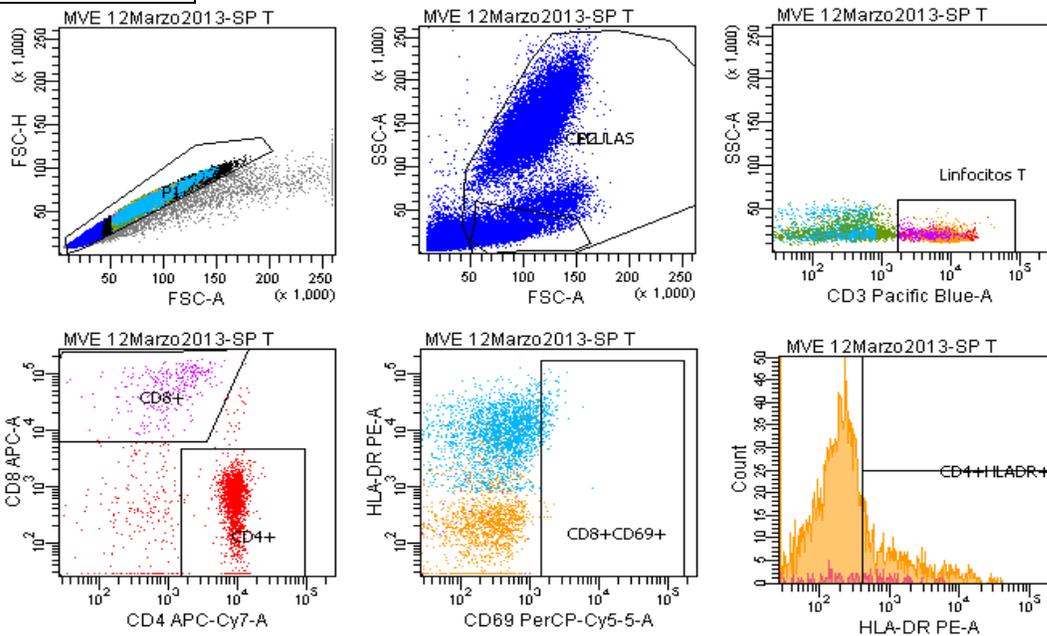
Poblaciones celulares (Prequirúrgica)





Poblaciones celulares  
(Posquirúrgica)

Grafico 3.1



En este caso se observa la persistencia de respuesta inmune significativamente elevada: las células CD4+ incrementaron al doble en el control postquirúrgico, con respecto a las CD4+ (cooperadoras) activadas éstas persisten elevadas en aproximadamente 50%, notando un comportamiento similar en las células CD8+ (citotóxicas) que persisten elevadas 28%, lo que se podría correlacionar con su elevada persistencia de crisis actualmente lo que lo clasifica en escala de Engel IVb, siendo el caso con mayor persistencia de respuesta inmune de todos los sujetos de estudio.

Se realizó la prueba no paramétrica Wilcoxon entre las poblaciones de linfocitos T CD4+ prequirúrgicos y postquirúrgicos de los 7 sujetos de estudio, encontrando un valor de  $p < 0.03$  lo que traduce significancia estadística, es decir que ambas son significativamente diferentes estableciendo que si hubo una reducción significativa de la respuesta inmune posterior a la cirugía.

Se aplicó la prueba paramétrica de Correlación de Pearson para ver la asociación entre la variable niveles de linfocitos T CD4+ (cooperadores, que fueron los que tuvieron diferencias significativas pre y postquirúrgicamente) y distintas variables clínicas como: escala de Engel actual, número de crisis actual y número de fármacos para control de los pacientes estudiados.

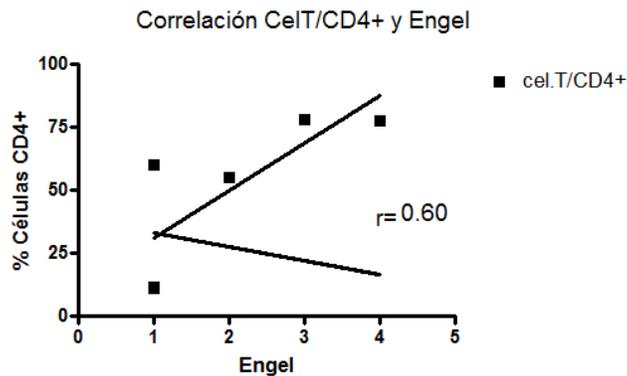


Figura 4 . Gráfica que muestra la relación entre el número de linfocitos T cooperadores (CD4+) y la escala de Engel

r= coeficiente de correlación de Pearson

De acuerdo a la figura 4 “Correlación de Pearson entre células T CD4+/ y Escala de Engel” se obtuvo un coeficiente de correlación de  $r=0.6$  infiriendo una correlación positiva entre ambas variables, estableciendo que a mayor respuesta inmune mayor escala de Engel en el paciente.

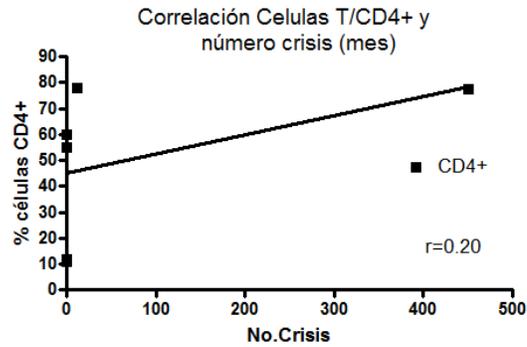


Figura 5 . Gráfica que muestra la relación entre el número de linfocitos T cooperadores (CD4+) y el número de crisis por mes

r= coeficiente de correlación de Pearson

Se realizó la prueba de “Correlación de Pearson entre células T CD4+/ número de crisis por mes” (*figura 5*) donde se obtuvo un coeficiente de correlación  $r=0.20$ , donde se infiere que si guarda relación la presencia de niveles de CD4+ estableciendo el nivel de respuesta inmune con el número de eventos esperados por mes, ya que en los pacientes donde se observa elevada presencia de células CD4+ el numero de crisis asciende paralelamente.

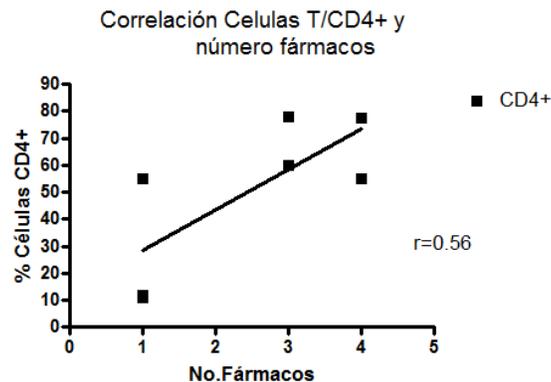


Figura 6 . Gráfica que muestra la relación entre el número de linfocitos T cooperadores (CD4+) y el número de fármacos

r= coeficiente de correlación de Pearson

Al realizar la prueba de “Correlación de Pearson entre niveles de células T CD4+/ número de fármacos” (*figura 6*) se encuentra un coeficiente de correlación  $r= 0.5$  , por lo tanto se establece una correlación positiva entre ambas variables, infiriendo que a mayor respuesta inmune celular se requiere de mayor numero de fármacos para el control del paciente.

## DISCUSION

El diagnóstico de la enfermedad de Rasmussen resulta de criterios clínicos (epilepsia focal que evoluciona a una epilepsia parcial continua), electroencefalográficos (enlentecimiento unihemisférico con o sin actividad epiléptica y/o actividad epiléptica focal) y de neuroimagen (atrofia unihemisférica con hiperintensidad de señal en T2 y Flair y/o hiperintensidad de señal en la cabeza de núcleo caudado ipsilateral); se estableció como una entidad secundaria a un estado de encefalitis crónica en la cual existe deterioro clínico y cognitivo progresivo variando desde meses a años. (1), sabiendo que en ellos el tratamiento más efectivo para la epilepsia que llega a ser refractaria, es la hemisferectomía mismo al que han sido sometidos todos los sujetos de nuestro estudio, donde se ha observado mejoría evidente posterior al procedimiento, encontrando persistencia de eventos en el 42% de nuestros pacientes y solo un paciente en escala de Engel IVb.

A través del tiempo se han dado a conocer distintas etiologías sobre su origen inmunológico y las distintas moléculas involucradas; inicialmente se atribuyó su etiología a un proceso viral que desencadenaba una reacción inmune provocando a nivel perivascular y leptomeníngeo un proceso inflamatorio con predominio de células T con activación de la microglia y astrogliosis reactiva, posteriormente se descubrió la evidencia de anticuerpos contra el receptor de glutamato antiGluR3, causante de activación citotóxica así como la participación de respuesta inmune humoral mediante la participación de la activación del complemento mediante el complejo de ataque a la membrana (MAC).(1)

Se sabe que el papel de la citotoxicidad de las células T, la citotoxicidad mediada por el complemento y los anticuerpos en el proceso patológico de la encefalitis son parte del sistema inmune adaptativo, donde estos mecanismos juegan un papel importante en la degeneración neuronal (provocando también pérdida de astrocitos) con el desencadenamiento secundario del proceso de epileptogénesis y perpetuación de la inflamación.(3)

Así mismo se ha demostrado el incremento en LCR de células T CD4+ mayor al 50% en la mayoría de los pacientes durante todos los estadios de la evolución de la enfermedad; y las

células T CD8+ elevadas mayor al 30% durante todos los estadios del padecimiento, sin embargo los niveles de éstos últimos disminuyeron evolutivamente, así mismo se observó que las células T CD4+ se elevan desde estadios tempranos de la enfermedad, otras células que se encontraron elevadas en el LCR fueron TNF $\alpha$ , IL4 y granzyma B.(6)

En reporte previo, donde se inicio el estudio de clonas de linfocitos T a nivel periférico se corrobora el predominio de linfocitos T CD8+ sobre los linfocitos T CD4+ a nivel periférico en la cohorte mostrada en posquirúrgico hasta 2 años del mismo.(9)

A diferencia de los trabajos previos a los que se han hecho referencia, los resultados obtenidos de pacientes epilépticos con Enfermedad de Rasmussen de nuestra cohorte se observaron alteraciones en la inmunidad celular referidas fundamentalmente al aumento significativo de las células CD4+ principalmente las CD4+ activadas sobre CD8+, excepto en 2 pacientes; nuestro grupo de 7 pacientes tenía antecedente de hemisferectomía con una mediana postcirugía de 4 años, encontrando que desde la etapa prequirúrgica la celularidad correspondiente a linfocitos totales y a linfocitos T es elevada, sin embargo se observó disminución en posquirúrgico principalmente en la población de linfocitos T lo que puede estar en relación con su mejoría clínica posterior a cirugía por la disminución de la respuesta inmune que se obtuvo en la medición.

El mismo comportamiento se observa en lo que corresponde a los niveles de linfocitos T CD4+ y T CD4+ activados, T CD8 y T CD8+ activados pre y posquirúrgicos donde la reducción es mayor en la población activada de ambos, nuevamente con 2 pacientes que permanecen fuera del promedio, siendo de mayor relevancia clínica los linfocitos T CD8+ activados (citotóxicos) donde los 2 pacientes que se encuentran por arriba del promedio persistentemente en casi todos los valores son los que corresponden a los casos 1 y 6 lo que podría hablarnos de persistencia de respuesta inmune elevada que correlaciona con los eventos clínicos descritos ya que en el caso número 1 se encuentra aún con frecuencia media de eventos epilépticos y el caso 6 prácticamente sus crisis no han disminuido respecto previo al evento quirúrgico colocando a ambos en escala de Engel IIIa y IVb respectivamente que son el puntaje más bajo en comparación con el resto del grupo; ya que en el resto de los pacientes los niveles de linfocitos T CD4+ y principalmente los niveles

de linfocitos T CD8+ donde se observa franca disminución en posquirúrgico se puede establecer que haya habido disminución importante de la respuesta inmune inicial, infiriéndose correlación con la estabilidad clínica que muestran pudiendo clasificarlos con una escala de Engel mucho menor como ya se indico previamente habiendo casos que se encuentran libres de crisis epilépticas, evidenciando esta correlación también mediante la prueba de Pearson ya comentada.

Así mismo se podría establecer relación con los resultados mostrados en el estudio donde se midió celularidad en LCR ya que en nuestro estudio aunque la medición se realizó a nivel periférico, se observa como en el primero presencia de elevada celularidad con predominio T CD4+ al inicio o etapas tempranas (en este caso prequirúrgico) y posteriormente con mayor decremento evolutivo de linfocitos T CD8+ (en este caso postquirúrgico).

Al realizar la prueba de Correlación de Pearson con las tres variables clínicas (Linfocitos T CD4+/ Escala de Engel, número de crisis por mes y número de fármacos) respectivamente, se encuentra una correlación positiva en los tres casos siendo más evidente en los parámetros correspondientes a Escala de Engel y número de fármacos para control, probablemente pudiendo inferir que esta respuesta inmune persistentemente elevada en algunos pacientes hace que en ellos, su estabilidad clínica decremente por lo tanto la escala de Engel sea menor, la frecuencia de eventos incremente en ellos y se requiera de un mayor número de fármacos para su control.

Todo esto muestra que la población celular que predomina en la respuesta inmune con lo que respecta a este padecimiento corresponde a clonas de linfocitos predominante T, aunque también se encontraron poblaciones de células B en menor proporción, todo esto demostrado en sangre periférica, procesos que principalmente han sido demostrados previamente a nivel histopatológico o en LCR y en pocos estudios a nivel periférico cabe mencionar que en nuestro país no se cuenta con ningún estudio que haya medido poblaciones linfocitarias periféricas en este padecimiento.

En general en nuestra población de estudio con respecto a la subpoblación de linfocitos T, la que predomina en el posquirúrgico es la de linfocitos T CD4+ (cooperadores) ya que

estos como su nombre lo indica son responsables de establecer y maximizar las capacidades de defensa del sistema inmune, así mismo se encuentran involucrados en la activación y dirección de otras células de respuesta inmune, es decir que por sí mismos no causan daño, sin embargo también es sabido que estas pueden preparar a los linfocitos B para la producción de anticuerpos y de esta manera influir en el daño neuronal mediante la unión de Ag-complemento, provocando la activación de MAC iniciando nuevamente el círculo vicioso: neurodegeneración y epileptogénesis. Por otro lado se piensa que cuando persiste elevada la respuesta mediante la presencia de células T CD8+ (citotóxicos) éstas son responsables de la perpetuación del daño celular al actuar como células presentadoras de antígenos, como se ha evidenciado también su elevada persistente en otros tipos de epilepsias refractarias a tratamiento por ejemplo la epilepsia de lóbulo temporal (10), así como su participación en la estimulación de la secreción de granzima B que es un fuerte activador de caspasas mediador de apoptosis influyendo en el daño neuronal. Sin embargo la persistencia de células CD4+ en el postquirúrgico de nuestros pacientes (principalmente paciente 1 y 6), podría indicar la persistencia de respuesta inmune efecto probablemente secundario a la actividad convulsiva presente. (6) Sin embargo se considera que la presencia de ambos tipos de clonas podría indicar la presencia de enfermedad activa.

Sabemos que dentro de nuestras limitantes que podrían influir en nuestro resultado se encuentran: la variabilidad en la temporalidad postquirúrgica del grupo de estudio, no se obtuvieron muestras seriadas; sin embargo como se ha demostrado aun con esta variación, la enfermedad per se muestra fluctuaciones en las poblaciones celulares a través de su evolución.

## CONCLUSION

- ✓ Existe una elevada respuesta inmune desde la etapa prequirúrgica de la enfermedad a nivel periférico, la cual disminuye de forma importante en el postquirúrgico que se correlaciona con mejoría clínica, sin embargo se mantiene elevada en algunos pacientes no controlados en Escala de Engel IV.
- ✓ Las principales poblaciones celulares que persisten elevadas a nivel periférico en el 71% de nuestros pacientes correspondieron a CD4+ activadas y en menor proporción las células CD8+.

## **Anexo 1**

### **HOJA DE RECOLECCION DE DATOS**

“Comportamiento de clonas de linfocitos T a nivel periférico en pacientes pediátricos con encefalitis de Rasmussen posterior a tratamiento quirúrgico”

---

**Nombre:**

**Edad:**

**Sexo:**      **Masculino**

**Femenino**

**Año de cirugía:**

**Número de crisis por día:**

**Tipo de crisis:**

**Parciales motoras**

**TCG**

**Parciales complejas**

**Atonicas**

**Numero de Fármacos antiepilépticos y dosis ponderada de cada uno**

**Niveles periféricos de linfocitos T:**

**CD4**

**CD8**

---

**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO:**

**Título.** “Comportamiento de clonas de linfocitos T a nivel periférico en pacientes pediátricos con encefalitis de Rasmussen posterior a tratamiento quirúrgico”

**Objetivo.** El estudio en el cual se les está invitando a participar, es para identificar si existe elevación persistente de clonas de linfocitos T en pacientes que ya se sometieron a tratamiento quirúrgico con diagnóstico de Encefalitis con Rasmussen.

**Como participar:** Si Ustedes aceptan a participar junto con su hijo(a) en este estudio, el caso de su hijo será evaluado, por personal especializado y se les tomara una muestra de sangre en una sola ocasión al inicio del proyecto.

**Procedimientos.** Si aceptaron participar se le entregará esta Forma de Consentimiento para que la firme. Si deciden no participar esto no afectara la atención que recibe su hijo(a) en este hospital. En este estudio se les tomará una muestra de sangre de 3 ml (aproximadamente una cucharadita cafetera). Esta muestra de sangre será almacenado y preservado adecuadamente para ser utilizado solamente en este estudio y durante el tiempo que dure el estudio.

**Riesgos del estudio.** El único riesgo es un pequeño hematoma en el sitio de la venopunción y dolor transitorio que se puede controlar con paracetamol.

**Beneficios por participar.** El estudio no conlleva ningún beneficio personal o remuneración económica. El principal beneficio de participar en este estudio es la posibilidad de extender los conocimientos sobre la base inmunológica del padecimiento de su hijo.

**Confidencialidad.** Si Ustedes aceptan participar en este estudio, el expediente médico de su hijo (a) será inspeccionado directamente por los investigadores para saber la evolución de su enfermedad y también puede ser inspeccionado y/o por el Comité Independiente de Ética para verificar que el estudio se está llevando de manera correcta. La información recolectada durante el estudio será almacenada sin incluir su nombre, solo el número de paciente correspondiente al estudio, solo los investigadores y el médico en el estudio, sabrá que la información se relaciona a Ustedes. . El conocimiento que obtendremos de este estudio se compartirá con usted antes de que se haga ampliamente disponible al público. Los resultados del estudio pueden ser publicados en la literatura médica, pero su identidad no será revelada.

**Participación voluntaria/retiro del estudio.** La participación en este proyecto es completamente voluntaria. Si aceptan participar pero en el transcurso del protocolo desean

retirase, no modificará su esquema de tratamiento ni la atención por parte del médico tratante.

La finalidad de solicitar la carta de consentimiento es la de utilizar el material solo en el presente proyecto autorizado por el comité de ética y de los padres del paciente con el compromiso que los resultados obtenidos será en beneficio de los pacientes. Gracias por leer esta información. Por favor pregunte al doctor en el estudio todas las dudas que tenga, para asegurar que entiende completamente los procedimientos que se harán si acepta participar.

**Personal de referencia.** Dr. Darío Rayo Mares, Nancy Ivette Hernandez Migueles  
Servicio de Neurología H. de Pediatría, CMN, Siglo XXI, de 8.00 a las 14.30 hrs. Dra  
Sandra Orozco Unidad de Investigación en Enfermedades Neurológicas HE CMN SXXI.

Sus firmas indican su aceptación para participar voluntariamente en el presente estudio.

Nombre y firma de los participantes.

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de nuestra participación en el estudio.

\_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

Nombre del doctor \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

Nombre del Investigador: Dra. Nancy Ivette Hernandez Migueles

Fecha \_\_\_\_\_

## CARTA DE ASENTIMIENTO INFORMADO.

**Título.** “Comportamiento de clonas de linfocitos T a nivel periférico en pacientes pediátricos con encefalitis de Rasmussen posterior a tratamiento quirúrgico”

Te voy a dar información e invitarte a formar parte de este estudio de investigación. Puedes elegir si participar o no. Hemos discutido esta investigación con tus padres y ellos saben que te estamos preguntando a ti también para tu aceptación. Si vas a participar en la investigación, tus padres también tienen que aceptarlo. Pero si no deseas tomar parte en la investigación no tiene porque hacerlo, aún cuando tus padres lo hayan aceptado.

Puedes discutir cualquier aspecto de este documento con tus padres o amigos o cualquier otro con el que te sientas cómodo. Puedes decidir participar o no después de haberlo discutido. No tienes que decidirlo inmediatamente.

Puede que haya algunas palabras que no entiendas o cosas que quieras que te las explique mejor porque estás interesado o preocupado por ellas. Por favor, puedes pedirme que pare en cualquier momento y me tomaré tiempo para explicártelo.

**¿Por que se está haciendo esta investigación?** Se te está pidiendo que participes en un estudio de Investigación con la finalidad de conocer si algunas células en tu organismo están elevadas aun mucho tiempo después de tu cirugía, para saber si es causa de que sigas con crisis, creemos que este estudio nos ayudará a conocer eso.

**Elección de participantes, ¿Por qué me lo pide a mí?** Estamos pidiéndole a niños de tu edad que tienen la misma enfermedad e igual que tú a quienes no se les ha encontrado la causa de su enfermedad, vamos a investigar porque les está sucediendo esto.

**Si decido participar ¿Qué me va a suceder?** Si aceptas a participar en este estudio, tu enfermedad será valorada por un grupo de doctores especialistas, y después personal especializado te tomara una muestra de sangre en una sola ocasión.

**Que molestias tendré ¿Dolerá?.** La toma de sangre puede doler pero solo un segundo cuando entra la aguja en la superficie de tu piel.

He preguntado al niño/a y entiende las molestias \_\_\_\_\_ (inicial)

**La participación es voluntaria: ¿Tengo que hacer esto?** No tienes porque participar en esta investigación si no lo deseas. Es tu decisión si decides participar o no en la investigación, está bien y no cambiara nada. Este es todavía tu hospital, todo sigue igual que antes. Incluso si dices que “si” ahora, puedes cambiar de idea más tarde y estará bien todavía. He preguntado al niño/a y entiende que la participación es voluntaria \_\_\_\_\_ (inicial)

**Beneficios. ¿Obtengo algo por participar en la investigación?.** No hay beneficios económicos pero esta investigación ayudara a otros niños que tienen esta misma enfermedad.

He preguntado al niño/a y entiende los beneficios \_\_\_\_\_ (inicial)

**Confidencialidad: ¿Van a saber todos acerca de esto?** No diremos a otras personas que estas en ésta investigación y no compartiremos información sobre ti a nadie que no trabaje en el estudio de investigación. Cuando la investigación finalice, se te dirá a ti y a tus padres los resultados. La información sobre ti por la investigación será retirada y nadie sino los investigadores podrán verla. Cualquier información sobre ti tendrá un número en vez de su nombre. Solo los investigadores sabrán cual es su número y se guardará la información con llave. No será compartida ni dada a nadie excepto a tus padres si lo solicitan.

He preguntado al niño/a y entiende la confidencialidad \_\_\_\_\_ (inicial)

**Personal de referencia.** Dr. Darío Rayo Mares, Servicio de Neurología 56276900 ext 21504, Hospital de Pediatría, CMN, Siglo XXI, de 8.00 a las 14.30 hrs. Dra Sandra Orozco Unidad de Investigación en Enfermedades Neurológicas HE CMN SXXI.

Sé que puedo elegir participar en la investigación o no hacerlo. Sé que puedo retirarme cuando quiera. He leído esta información (o se me ha leído la información) y la entiendo. Me han respondido las preguntas y sé que puedo hacer preguntas más tarde si las tengo. Entiendo que cualquier cambio se discutirá conmigo.

Acepto participar en la investigación”. \_\_\_\_\_

O

“Yo no deseo participar en la investigación y no he firmado el asentimiento que sigue”.

\_\_\_\_\_ (iniciales del niño/menor)

Solo si el niño/a asiente:

Nombre del niño/a \_\_\_\_\_

Firma del niño/a: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Día/mes/año

Si es analfabeto:

Nombre del doctor \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

Nombre del Investigador: Dra. Nancy Hernandez Migueles Fecha \_\_\_\_\_

## CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

“Comportamiento de clonas de linfocitos T a nivel periférico en pacientes pediátricos con encefalitis de Rasmussen posterior a tratamiento quirúrgico”

Actividad	Meses					
	Febrero 2013	Marzo 2013	Abril Y Mayo del 2013			Junio del 2013
Diseño y estructuración del protocolo de investigación						
Revisión del protocolo de Investigación y Aprobación por comités Institucionales						
Selección de pacientes y recolección de datos, Análisis estadístico.						
Presentación de trabajo final.						

- 
- <sup>1</sup> Bien C, Granata T, et al. Pathogenesis, diagnosis and treatment and of Rasmussen encephalitis: A European consensus statement. *Brain*. 2005; 128: 454-471.
- <sup>2</sup> Sharma D, Gaikwad S, et al. Neuropathological spectrum of Rasmussen encephalitis. *Neurol India* 2005;53:156-61
- <sup>3</sup> Suárez N, Felgueroso B, et al. Del inicio de una epilepsia parcial continua al diagnóstico y tratamiento del síndrome de Rasmussen. *An Pediatr*. 2012;77(5): 334-338
- <sup>4</sup> Bauer J, Vezzani A. Epileptic Encephalitis: The Role of the Innate and Adaptive Immune System. *Brain Pathology*. 2012; 22: 421-421
- <sup>5</sup> Prayson M, Richard A, et al. Rasmussen Encephalitis. *Am J Clin Pathol*. 2002; 117: 776-782
- <sup>6</sup> Takahashi Y, Mine J, et al. A substantial number of Rasmussen syndrome patients have increased IgG, CD4+ T cells, TNF $\alpha$  and Granzyme B in CSF. *Epilepsy*. 2009; 50 (6): 1419-1431
- <sup>7</sup> Scwab N, Bien C, et al. CD8+ T-cell clones dominate brain infiltrates in Rasmussen encephalitis and persist in the periphery. *Brain*. 2009; 1236-1246
- <sup>8</sup> Engelhardt B. T cell migration into the central nervous system during health and disease: Different molecular keys allow access to different central nervous system compartments. *Clin and Exp Neuroimmunology* 1. 2010; 79-93
- <sup>9</sup> Suidan G, Dickerson J, et al. CD8 T Cell vascular endothelial growth factor expression promotes central nervous system vascular permeability under neuroinflammatory conditions. *J Immunol*. 2010; 15 184 (2): 1031-1040
- <sup>10</sup> Pedre L, Chacon L, et al. Alteraciones inmunológicas en pacientes epilépticos asociadas a la localización del foco epileptogénico. *Rev Neurol*. 2004; 39(2):101-104.
- <sup>11</sup> Owens G, Huynh M, et al. Differential expression of interferon- $\gamma$  and chemokine genes distinguishes Rasmussen encephalitis from cortical dysplasia and provides evidence from an early Th1 immune response. *J Neuroinflammation*. 2013, 10:56
- <sup>12</sup> Bauer J, Bien C. Encephalitis and epilepsy. *Semin Immunopathol*. 2009; 31:537-544