

## **I. DATOS GENERALES**

Universidad Autónoma Metropolitana

Médico Pasante del Servicio Social: Danna Alexandra Alvirde Ayala

Matrícula: 2132031524

Asesor interno: Raúl Enrique Castañeda Castaneira

## **II. LUGAR Y PERÍODO DE REALIZACIÓN**

Lugar de realización del servicio social: Instituto Nacional de Pediatría.

Periodo en que se realizo el servicio social: 01 febrero 2019 a 31 enero 2020

## **III. UNIDAD, DIVISIÓN Y LICENCIATURA**

Unidad: Xochimilco.

División: ciencias biológicas y de la salud.

Licenciatura Medicina.

## **IV. NOMBRE DEL PROYECTO**

DETECCION DE PORTADORAS EN FAMILIARES DE PACIENTES CON ENFERMEDAD GRANULOMATOSA CRONICA POR TECNICA DE 1,2,3 DIHIDRORODAMINA

## **V. NOMBRE DEL ASESOR DEL PROYECTO**

Lizabeth Blancas Galicia.

## **VI. INTRODUCCIÓN**

La capacidad de los fagocitos para generar radicales libres de oxígeno (RLO) es una parte esencial de los mecanismos de defensa contra infecciones en los humanos. La producción de RLO en el estallido respiratorio es mediada por la enzima multicomponente NADPH oxidasa. <sup>1</sup> La importancia de la funcionalidad intacta del complejo de la NADPH oxidasa se demuestra la enfermedad granulomatosa crónica (EGC). <sup>2,3</sup>

La EGC es una inmunodeficiencia primaria (IDP), se caracteriza por un defecto de fagocitosis, específicamente en el complejo enzimático de la NADPH oxidasa. A nivel internacional se reporta una incidencia de 1 en 250,000 recién nacidos vivos. <sup>4</sup> En

México se desconoce su frecuencia, sin embargo en el último año en la Unidad de Investigación de Inmunodeficiencias se registraron ocho casos nuevos en varones.

Las infecciones y lesiones granulomatosas son las manifestaciones más habituales. El pulmón, piel, ganglios linfáticos e hígado son los sitios más frecuentes de localización de las infecciones. Los granulomas causan síntomas obstructivos en el tracto gastrointestinal y urinario.<sup>5,6</sup>

La EGC confiere predisposición a enfermedades causadas por bacterias, hongos y micobacterias de baja virulencia, como las de la vacuna de BCG.<sup>7</sup>

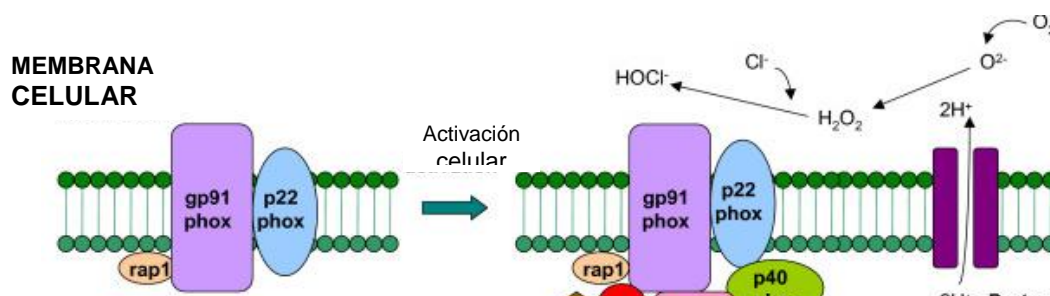
Al igual que otras IDP, los pacientes con EGC, tienen un mayor riesgo de presentar fenómenos autoinmunes.<sup>4,5</sup>

### NADPH oxidasa

La NADPH oxidasa está constituida por seis subunidades: una cadena  $\beta$  glucosilada de 91 kDa (gp91phox), una cadena no glucosilada de 22 kDa (p22phox), y las proteínas p47phox, p67phox, p40phox y p21rac. Estas proteínas se encuentran agrupadas en el complejo citocromo b558 (gp91phox + p22phox), asociadas con la membrana citoplásmica de los gránulos de los fagocitos, y como proteínas citosólicas (p47phox, p67phox, p40phox y p21rac) en sus formas inactivas (figura 1).<sup>8,9</sup>

### Estallido respiratorio o generación de radicales libres

Durante el proceso de la fagocitosis se lleva a cabo la activación de la NADPH oxidasa, el proceso inicia con la señalización intracelular río abajo. Los componentes citosólicos p47phox y p67phox se fosforilan y sufren cambios conformacionales que favorecen su unión al citocromo b558 y p40phox. La enzima activa transfiere electrones a moléculas de oxígeno ( $O_2$ ), forma así aniones superóxido, ( $O_2^-$ ), los cuales son convertidos espontáneamente o catalizados por la superóxido dismutasa a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), que es sustrato de la mieloperoxidasa para la conversión interna de microbicidas intermedios (hipoclorito) que junto con las enzimas lisosomales destruyen proteínas, polisacáridos, lípidos, ADN y ARN de los microorganismos fagocitados (figura 1).<sup>8,10</sup>



**Figura 1.** Se muestra la NADPH oxidasa en reposo: p40 phox, p67phox y p47phox se encuentran en el citosol (izq) y activada: p40 phox, p67phox y p47phox se encuentran asociados a gp91phox y p22phox (der).

### **Defectos moleculares y sus patrones de transmisión hereditaria**

La EGC se origina por una alteración funcional en una de las subunidades de la NADPH oxidasa debido a una mutación en los genes que las codifican. Los tipos de herencia que se ha identificado son Recesiva Ligada al X (RLX) y Autosómica Recesiva (AR). Hasta el momento se ha identificado en el patrón de herencia RLX la mutación en el gen *CYBB* que codifica para la glicoproteína gp91phox con una frecuencia de 65-70% de los casos; y dentro de las autosómicas recesivas mutaciones en los genes *CYBA* que codifica para la proteína p22phox (frecuencia del 5%); *NCF1* que codifica para la proteína p47phox (frecuencia 25%); el *NCF2* que codifica para la proteína p67phox y *NCF4* que codifica para p40phox.<sup>10-13</sup>

### **Evaluación del estallido respiratorio en neutrófilos humanos**

Diversas pruebas funcionales en los neutrófilos han sido propuestas para el tamizaje de casos con sospecha EGC, todos tienen como fundamento la medición de la producción de RLO ante un estímulo en células *in vitro*. Entre ellas están la reducción de citocromo C, la quimioluminiscencia, la reducción de nitroazul de tetrazolio (NBT), o la técnica de 1,2,3 dihidrorodamina (DHR)<sup>14</sup>

### **Reducción de NBT**

La reducción de NBT, es el método que se utiliza con mayor frecuencia para tamizaje de EGC en diferentes centros hospitalarios a nivel internacional. Normalmente los neutrófilos estimulados *in vitro* con forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) producen RLO que al reaccionar con NBT lo reducen a formazán. La reacción se hace evidente con un

cambio de color de amarillo pálido a azul que se puede cuantificar de dos formas (figura 2):

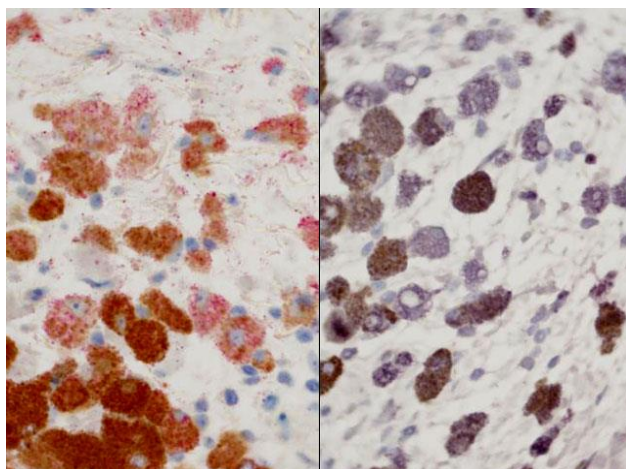
- 1) Con un espectrofotómetro. La ventaja es que la cuantificación es objetiva, la desventaja es que técnicamente es complicada, se requiere separar los neutrófilos de la sangre total.
- 2) De forma visual con un microscopio. La ventaja es que se requiere una mínima cantidad de sangre total. La desventaja es que tiene una menor sensibilidad debido a que la cuantificación del cambio colorimétrico depende de la percepción subjetiva del observador.<sup>15, 16</sup>

La ausencia de un cambio colorimétrico refleja una falta de producción de los RLO (EGC).

### **Reducción de citocromo c**

Esta técnica cuantifica la producción de aniones superóxido ( $O_2^-$ ). Los neutrófilos se separan de la sangre total, se estimulan e incuban con PMA y citocromo c. Cuando los aniones superóxido son producidos de forma normal por el neutrófilo interactúan con el citocromo c para producir ferrocitocromo c; la reacción se hace evidente a través de un cambio colorimétrico que se cuantifica con un espectrofotómetro. En ausencia de un sistema NADPH oxidasa funcional no se observa cambio.<sup>17, 18</sup>

Su sensibilidad para la medición de aniones superóxido es mayor que la reducción de NBT, sin embargo con esta técnica no es posible detectar el estado de portadora de EGC RLX.<sup>17</sup>



a)

b)

**Figura 2.** Reducción de nitroazul de tetrazolio en los neutrófilos. En la imagen de la izquierda (a) se observa el color amarillo del NBT, al reducirse cambia a un color azul (b).

### **Quimioluminiscencia**

La medición cuantitativa del estallido respiratorio mediante la quimioluminiscencia es complicada y laboriosa, se requiere separar los leucocitos de la sangre total, el reactivo que usa es el luminol. Este es excitado por los RLO cuando están presentes.<sup>16</sup>

### **Pruebas fluorescentes**

Las pruebas fluorescentes se realizan por citometría de flujo, miden la actividad funcional de miles de neutrófilos en un punto determinado en el tiempo. Los neutrófilos *in vitro* se ponen en contacto con PMA, se agrega un compuesto no fluorescente que al interactuar con los RLO se transforma en un compuesto fluorescente cuya emisión es medida a través de un citómetro flujo.

Los fluorocromos utilizados son la 2'7' diclorofluoresceína (DCF), hidroetidina, 4 carboxidihidrotetrametilrosamina y la 1,2,3 dihidrorodamina.<sup>19-21</sup> Debido a que la 1,2,3 DHR es un cromógeno permeable a la membrana celular ingresa a la célula, es oxidado

por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido durante el estallido respiratorio para formar así 1,2,3 rodamina (molécula fluorescente).

Walrand S *et al* compararon la sensibilidad entre diferentes fluorocromos (DHR, DCF e hidroetidina) para la detección de RLO en individuos sanos. Concluyeron que la 1, 2, 3 DHR es el fluorocromo más sensible, además de ser el más utilizado para diagnóstico de EGC.<sup>22 23-25 26, 27</sup>

## **EGC RLX**

En la EGC, el patrón de transmisión hereditario más frecuente es el RLX. Este tiene peor pronóstico en comparación con el AR. En un estudio descriptivo realizado en Estados Unidos de Norteamérica en 368 pacientes con EGC se reportó que 70% tuvieron EGC-RLX, 22% EGC-AR y en 8% de los casos no se determinó el patrón de transmisión hereditaria.<sup>4</sup> En otro estudio similar pero con 429 pacientes europeos, se encontró 67% de los casos con EGC-RLX y 33% con EGC-AR. Estos porcentajes pueden variar en países en donde el matrimonio consanguíneo es una práctica cultural, como consecuencia la EGC-AR es el patrón de transmisión hereditario que predomina en estos.<sup>5, 28-30</sup>

La supervivencia de la EGC varía según el patrón de transmisión hereditario. En una serie de 368 pacientes en Estados Unidos de Norte América durante un seguimiento de 5 años se estimó una mortalidad a un año de 5% y 2%, en los pacientes con EGC-RLX y EGC-AR respectivamente.<sup>4</sup> En un estudio de 429 pacientes europeos, al momento del estudio, se describió un promedio de vida de 49.6 años para los pacientes con EGC-AR y de 37.8 años para los pacientes con EGC-RLX, la supervivencia a 10 años para el primer grupo fue de 94% y de 86% para el segundo.<sup>5</sup>

## **Portadoras de EGC-RLX**

En la EGC-RLX los hombres afectados tienen en su único cromosoma X una mutación en el gen *CYBB*. Por otro lado las portadoras tienen dos cromosomas X, uno con la mutación y otro sin mutación en *CYBB*.

La probabilidad de los genotipos en la descendencia de un varón con EGC con una mujer no portadora en cada embarazo se muestran en la tabla 1.

|                                       |                                    |    |
|---------------------------------------|------------------------------------|----|
|                                       | <b>X (gen<br/>CYBB<br/>mutado)</b> | Y  |
| <b>X (gen<br/>CYBB wild<br/>type)</b> | XX                                 | XY |
| <b>X (gen<br/>CYBB wild<br/>type)</b> | XX                                 | XY |

**Tabla 1.** Cuadro de Punnet de los alelos de un varón con EGC-RLX con los alelos de una mujer no portadora. El 100% de sus hijas serán portadoras de EGC.RLX (XX), no habrá varones con EGC (XY).

La probabilidad de los genotipos en la descendencia de una mujer portadora de EGC RLX con un varón sano en cada embarazo se muestra en la tabla 2.

|                                       |                                       |                                       |
|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
|                                       | <b>X (gen<br/>CYBB wild<br/>type)</b> | <b>Y (gen<br/>CYBB<br/>wild type)</b> |
| <b>X (gen<br/>CYBB wild<br/>type)</b> | XX                                    | XY                                    |
| <b>X (gen<br/>CYBB<br/>mutado)</b>    | XX                                    | XY                                    |

**Tabla 2.** Cuadro de Punnet de los alelos de una mujer portadora de EGC-RLX con los alelos un varón sano. La probabilidad de tener hijas no portadoras es 50% y de hijas portadoras 50%; 50% de hijos sanos y 50% hijos con EGC.

### **Mosaicismo en portadoras de EGC-RLX**

Las mujeres portadoras de EGC-RLX son en su mayoría asintomáticas, sólo un pequeño porcentaje presentan lesiones cutáneas, clínica e histológicamente parecidas a las del lupus discoide, estomatitis aftosa recurrente y fotosensibilidad.<sup>10, 31</sup>

Debido al fenómeno de lionización, inactivación aleatoria de uno de los cromosomas X durante la embriogénesis, las portadoras con EGC-RLX tienen dos poblaciones de neutrófilos, una que produce y otra que no produce RLO (mosaicismo). El porcentaje de cada una de las dos poblaciones en cada portadora es variable. Sólo en aquellos casos que presentan menos de 5-10% de neutrófilos normales presentaran susceptibilidad a infecciones.

Existen portadoras con una "inactivación preferencial" del cromosoma X sano (*skewing of X-inactivation*) en la edad adulta, en ellas no hay neutrófilos normales por tanto tienen el fenotipo clínico de EGC.<sup>10, 31-33</sup>

Aproximadamente mas de un tercio de los defectos ligados al X, surgen de nuevas mutaciones en las células germinales y por tanto estas no van a estar presentes en las células somáticas de la madre.<sup>34</sup>

### **Detección de portadoras de EGC-RLX a través del mosaicismo**

La detección del defecto molecular a nivel genético en pacientes y portadoras da el patrón de herencia. Sin embargo no siempre es accesible en todos los centros hospitalarios. Una alternativa rápida y menos costosa es la detección del mosaicismo en la producción de RLO de oxígeno que manifiestan las portadoras de EGC-RLX. Las mujeres con EGC-AR no presentan este fenómeno debido a que los genes afectados se encuentran en los cromosomas autosómicos.

Dentro de las técnicas que cuantifican la producción de radicales libres, sólo la técnica de 1,2,3 DHR y la reducción de NBT, son útiles para detectar el mosaicismo en portadoras de EGC-RLX.

A través de estas técnicas podemos evidenciar dos poblaciones de neutrófilos; según sea la inactivación de uno de los dos cromosomas X será la proporción de neutrófilos positivos o negativos para la producción de RLO.

Hasta el momento no existen estudios que hayan definido la sensibilidad y especificidad de la reducción de NBT y de la técnica de 1,2,3 DHR para la detección del mosaicismo



en la producción de RLO en las portadoras de EGC. La sensibilidad para la detección de los RLO de la técnica 1,2,3 DHR se ha determinado sólo en sujetos sanos. Como ya se menciono previamente la sensibilidad es mayor en la primera.<sup>16, 34, 35</sup>

La técnica de 1,2,3 DHR además de ser más sensible tiene las ventajas que se enumeran en tabla 3.<sup>16, 36, 37</sup> Una desventaja es que requiere un citómetro, el cual no pudiera ser accesible en algunos centros de diagnóstico.

---

**Tabla 3.** Se enumeran las ventajas de la técnica 1,2,3 DHR

---

- Se requieren tan solo 100 microlitros de sangre total para su procesamiento, ideal para lactantes en estudio (hermanas recién nacidas de varón con EGC).
  - El tiempo total del procesamiento es de 60 minutos
  - Se realiza en sangre total sin necesidad de aislar los neutrófilos por gradiente de separación.
  - En caso de pacientes foráneos la muestra se puede enviar por paquetería y procesar un día después, sin que el resultado se vea afectado.
  - La 1,2,3 DHR no es producto tóxico como lo es el NBT.
  - Mide la actividad funcional de miles de neutrófilos en un punto determinado en el tiempo.
- 

### **Patrón de histograma bimodal en las portadoras**

La técnica de 1,2,3 DHR mide la producción de  $H_2O_2$  en las células sin activar y activadas con PMA, el valor se cuantifica en IMF, ésta se grafica como se muestra en

los histogramas en figura 2 en un sujeto femenino sano (a), en un paciente con EGC-RLX (b) y en una portadora de EGC-RLX.

En el histograma de un sujeto sano podemos observar un solo pico de IMF, este representa una población única de neutrófilos.

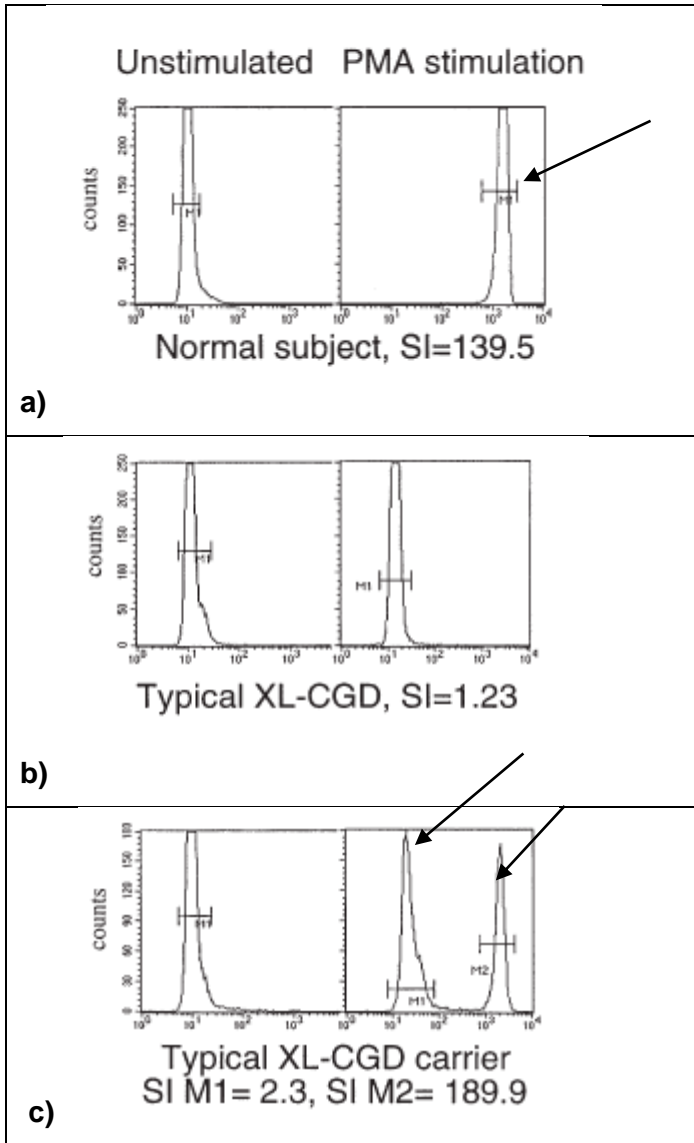
En las portadoras vemos un patrón bimodal, cada pico representa el promedio de IMF de cada población de neutrófilos, no productores de RLO y productores de RLO.

No se ha determinado otra causa de un patrón bimodal (figura 3(c)) que no sea el estado de portadora de EGC-RLX, por lo que el hecho de que este presente tiene una alta sensibilidad. <sup>38, 39</sup>

En enfermedades con patrón de herencia recesivo ligado al X, la obtención de una historia familiar adecuada por medio del árbol genealógico permite detectar la presencia de individuos afectados en una o varias generaciones y de portadora obligada, probable y posible de un gen determinado. En el caso de la enfermedad en estudio, EGC ARLX, una portadora obligada es una mujer que ha tenido dos hijos varones afectados o una mujer con un hijo varón afectado que tengan además antecedentes de otros varones con EGC por vía materna como hermanos, tíos, etc. Una portadora posible es una madre sana clínicamente con un único hijo afectado y sin antecedentes familiares o todas las hijas de una portadora obligada. Una portadora posible es un familiar por parte materna de un afectado diferente a la madre.

Las portadoras obligadas de EGC RLX detectadas a través del árbol genealógico tendrán un patrón bimodal; nos servirán como controles de la técnica en estudio en relación a las portadoras probables y posibles.

Al realizar la técnica de 1,2,3 DHR en la madre, hermanas, abuela, tías y primas maternas del paciente masculino con EGC las posibilidades son las siguientes:



**Figura 3.** Histogramas e intensidad media de inmunofluorescencia (SI) en un sujeto sano (a), en un paciente con EGC RLX (b) y en una portadora de EGC. En el panel izquierdo sin estímulo, en el panel derecho con estímulo (PMA). Observe como un sujeto sano presenta un histograma con un solo pico de SI (a) y una portadora muestra 2 picos de IS, representados en la figura como M1 y M2 (c). Tomado de *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:374-9.

- 1) Que la madre, la abuela materna y algunas de las hermana(s), tía(s) o prima(s) materna(s) tengan un histograma con patrón bimodal (fig.3c) y otras que no lo tengan (fig.3a). Las que presenten un patrón bimodal serán portadoras de EGC-RLX. Las que presenten un patrón de histograma normal no serán portadoras. Además sugiere una mutación en *CYBB*.
- 2) Que la madre y la(s) hermana(s) sean las únicas con un histograma con patrón bimodal (fig.3c); el resto normales (fig.3a). Esto apoya un patrón RLX y sugiere que la mutación surgió en la célula germinal de la madre, siendo ella la primera portadora.

3) Si la madre y el resto de la familia tiene un patrón de histograma normal, es decir que aparezca como no portadora (fig. 3a), existen varias posibilidades:

- a. Que el paciente presente una mutación *de novo* en el gen *CYBB* (RLX), por consecuencia la madre no presente un histograma con patrón bimodal.
- b. Que el paciente presente EGC-AR. Las madres en el patrón AR son heterocigotas para mutaciones de genes localizados en cromosomas autosómicos; no presentan anomalías en el patrón de histograma.
- c. Que la madre presente un mosaísmo gonadal, la mutación está confinada a gónadas en *CYBB* con patrón de herencia ligado al X

Posibilidad 1 y 2: se puede dar un consejo genético de portadora de EGC-RLX. Además una vez que pongamos en marcha la técnica de detección de genes de la NADPH oxidasa en la Unidad de Investigación en Inmunodeficiencias el primer gen que secuenciaremos en el paciente con EGC será *CYBB*.

Posibilidad 3a y 3 b: pueden no se puede llegar a ninguna conclusión en cuanto al patrón de herencia. Su determinación sólo se puede llegar a determinar a través de la secuenciación de genes candidatos.

En una familia con dos varones afectados con EGC y una madre con un patrón de histograma normal sugiere un patrón AR, muy remotamente podría ser una mutación *de novo* en el gen *CYBB* en ambos varones. Igualmente la determinación de EGC-RLX o de EGC-AR solo se puede llegar a obtener a través de la secuenciación de genes candidatos.

Las portadoras de EGC-RLX deben recibir el asesoramiento genético (ver tabla 1), además de informar el mayor riesgo que tienen de presentar lupus discoide, estomatitis aftosa o fotosensibilidad. También se les debe hacer de su conocimiento que el porcentaje de inactivación aleatoria puede cambiar con el tiempo y por tanto llevarlas a que presenten las manifestaciones francas de EGC.

Sabemos que el diagnóstico definitivo es a través de la secuenciación de genes de la NADPH oxidasa, sin embargo este tipo de técnicas lleva un tiempo para realizarse por lo que la técnica de 1,2,3 DHR es una alternativa sensible, rápida, menos costosa y accesible en las potenciales portadoras (mujeres por rama materna familiares de varón afectado con EGC) en edad reproductiva con plan a corto plazo de procrear y embarazadas. Si alguna de estas últimas fuera portadora se le informaría que debe evitar la vacuna de BCG en su hijo recién nacido hasta no haberle descartado EGC.

### **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

La EGC tiene una incidencia estimada de 1 en 250,000 recién nacidos vivos, la EGC-RLX representa un 65 a 70% de todos los casos de EGC. En nuestro laboratorio estamos en el proceso de la implementación del diagnóstico molecular en pacientes y portadores de EGC RLX y AR, sin embargo sabemos que esta prueba lleva tiempo para realizarse. La técnica de 1,2,3 DHR es una alternativa que en algunos casos podría detectar el estado de portador de EGC-RLX en potenciales portadoras con plan a corto plazo de procrear o ya embarazadas. Dentro de las ventajas de la técnica de 1,2,3 DHR son una mayor sensibilidad y rapidez comparada con otros ensayos en la detección de RLO.

A las portadoras de EGC-RLX detectadas se les puede proporcionar asesoramiento genético, dar a conocer medidas profilácticas como evitar vacuna de BCG en sus recién nacidos hasta no haber descartado EGC. Además informar el mayor riesgo que tienen, en comparación a la población general, de padecer de manifestaciones como lupus discoide, estomatitis aftosa y fotosensibilidad.

### **JUSTIFICACION**

La EGC es una IDP con defecto de fagocitosis caracterizado por defecto en el complejo enzimático de la NADPH oxidasa, con una incidencia estimada de 1 en 250,000 recién nacidos vivos. Al menos en el último año de registraron 8 nuevos pacientes masculinos con diagnóstico de EGC en la unidad de investigación de inmunodeficiencias del Instituto Nacional de Pediatría; en ninguno de ellos se conoce el defecto molecular y algunas de las potenciales portadoras ni siquiera saben que pueden serlo.

Al estudiar de forma conjunta a todas las potenciales portadoras de EGC-RLX a través de la técnica de 1,2,3 DHR podremos detectar a las portadoras.

Las mujeres portadoras de EGC-RLX podrán recibir asesoramiento genético, establecer medidas de prevención como evitar vacuna con BCG en sus recién nacidos

hasta no haber descartado EGC, darles a conocer el mayor riesgo que la población general de padecer de manifestaciones autoinmunes.

En aquellas familias con EGC en las que se determine un patrón de hereditario RLX, se iniciaría la secuenciación en el gen *CYBB* y no en *CYBA*, *NCF1*, *NCF2* ni *NCF4* en el varón afectado y en la portadora detectada por DHR, esto contribuiría a ahorrar recursos y tiempo en llegar al resultado.

### **PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN**

1. ¿Cuál será el porcentaje de mujeres portadoras dentro de la familia estudiada?
2. ¿Las portadoras presentan algún tipo de manifestación clínica ya descritas?

## **VII. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Detectar a las portadoras de EGC por medio de la técnica de 1,2,3 DHR

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Determinar la frecuencia de portadoras en familias con EGC
2. Describir las características clínicas de las portadoras de enfermedad granulomatosa crónica.
3. Brindar asesoramiento genético e información de la patología asociada de al estado de portadora.

## **VIII. METODOLOGÍA UTILIZADA**

### **PACIENTES Y MÉTODOS**

A través de la realización de un árbol genealógico de un varón con EGC se detectarían a potenciales portadoras. De aquellas que acepten participar y firmen el consentimiento informado se obtendrá una muestra de 2 ml sangre periférica por punción, usando heparina de litio como anticoagulante. Posteriormente se procederá a realizar la técnica 1,2,3 DHR con citómetro de flujo (ver apéndice I y II).

Los resultados de los patrones de histograma de cada paciente se analizarán. Aquellas mujeres que presenten un patrón bimodal en el histograma de les catalogará como portadoras y se les proporcionará asesoramiento genético.

### **Criterios de inclusión**

Mujeres por rama materna en riesgo de ser portadoras, familiares de pacientes masculinos mexicanos con diagnóstico de EGC, que acepten participar y firmen

el consentimiento informado, que acuden a la Unidad de Investigación en Inmunodeficiencias.

#### **Criterios de exclusión**

Mujeres familiares de pacientes masculinos con EGC autosómica recesiva identificada previamente por diagnóstico molecular.

#### **TAMAÑO DE LA MUESTRA**

Ya que la EGC es una enfermedad rara con una prevalencia de 1:250 000 habitantes, el tamaño de la muestra será a conveniencia, se incluirán todas las potenciales portadoras familiares de los pacientes varones con diagnóstico de EGC, que acepten participar y firmen la carta de consentimiento informado.

#### **CONSIDERACIONES ETICAS**

Todas las actividades relacionadas con este protocolo se regularán con lo establecido en los artículos comprendidos en el Capítulo 1 del Reglamento de la Ley General de Salud publicado en el Diario Oficial del 6 de enero de 1987, además de que todos los procedimientos se registrarán por la Declaración de Helsinki de la WMA y de acuerdo con las Buenas Prácticas Clínicas de la ICH.

El presente estudio se dirigirá en todo momento acorde a las Buenas Prácticas Clínicas haciendo las siguientes consideraciones:

\*El presente estudio no representa riesgos adicionales o diferentes a los inherentes a la enfermedad para los participantes y los resultados beneficiarán a la sociedad.

\*Se obtendrá consentimiento informado de los pacientes y en caso de menores de edad se obtendrá una hoja de asentimiento (ver apéndice V)

\*La información se obtendrá conservando el anonimato de los participantes en todo momento.

\*La información será almacenada durante 2 años de manera que pueda ser consultada y corroborada en cualquier momento.

#### **IX. ACTIVIDADES REALIZADAS**

Se realizo y analizó el árbol genealógico de paciente varones con EGC. Realizamos la prueba de dihidrorrodamina a las posibles portadoras de la enfermedad, estudiamos sus características clínicas y se les dio consejo genético.

## **X. OBJETIVOS Y METAS ALCANZADOS**

**Objetivo general:** Durante el período del 01 febrero 2019 al 31 enero de 2020 por medio de la prueba 1,2,3 DHR nosotros identificamos a 6 portadoras de la enfermedad ligada al X.

### **Objetivos específicos:**

Se detectaron 9 pacientes con EGC durante este período, de ellos 6 tuvieron un defecto en gp91phox, de estos pacientes, 4 tuvieron madres portadoras de la enfermedad ligada al X, el resto de las portadoras son miembros de la familia de uno de los pacientes. Por lo que se asume que al tener un paciente con un defecto en gp91phox se espera que su madre sea portadora con un 66% de probabilidad.

Entre las características clínicas que presentaron nuestras pacientes fueron estomatitis, gingivitis, síntomas gastrointestinales como dolor abdominal, diarrea crónica intermitente no infecciosa y constipación, otras patologías autoinmunes fueron artritis reumatoide, síndrome de Sjogren, artritis idiopática juvenil y anemia hemolítica, entre las complicaciones infecciosas se observaron infecciones genitourinarias y neumonía por *Histoplasma* sp.

Se les dio consejo genético y información sobre las patologías asociadas al estado de portadora a cada una de las pacientes.

## **XI. RESULTADOS Y CONCLUSIONES**

En todo paciente con EGC debe realizarse un árbol genealógico para poder detectar a las portadoras de la enfermedad con el objetivo de dar consejo genético e información sobre los posibles padecimientos asociados a la patología.

## **XII. RECOMENDACIONES**

Se recomienda en próximos estudios realizar un análisis estadístico para asociar las manifestaciones clínicas que presentan las portadoras con su nivel de RLO que poseen.

## **XIII. BIBLIOGRAFIA**

1. Chanock SJ, El BJ, Smith RM, Babior BM. The respiratory burst oxidase. J Biol Chem 1994;269(40):24519-24522.
2. Smith RM, Curnutte JT. Molecular basis of chronic granulomatous disease. Blood 1991;77(4):673-686.
3. Roos D. The genetic basis of chronic granulomatous disease. Immunol Rev 1994;138:121-157.



4. Winkelstein JA, Marino MC, Johnston RB, Jr. et al. Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. *Medicine (Baltimore)* 2000;79(3):155-169.
5. van den Berg JM, van KE, Ahlin A et al. Chronic granulomatous disease: the European experience. *PLoS One* 2009;4(4):e5234.
6. Vieira AP, Vasconcelos J, Fernandes JC et al. Lymphadenopathy after BCG vaccination in a child with chronic granulomatous disease. *Pediatr Dermatol* 2004;21(6):646-651.
7. Bustamante J, Aksu G, Vogt G et al. BCG-osis and tuberculosis in a child with chronic granulomatous disease. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120(1):32-38.
8. Alvarez-Cardona A, Yamazaki-Nakashimada MA, Espinosa-Padilla SE. [Chronic granulomatous disease]. *Rev Alerg Mex* 2009;56(5):165-174.
9. Segal BH, Holland SM. Primary phagocytic disorders of childhood. *Pediatr Clin North Am* 2000;47(6):1311-1338.
10. Holland SM. Chronic granulomatous disease. *Clin Rev Allergy Immunol* 2010;38(1):3-10.
11. Roos D, de BM, Kuribayashi F et al. Mutations in the X-linked and autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. *Blood* 1996;87(5):1663-1681.
12. Ariga T, Furuta H, Cho K, Sakiyama Y. Genetic analysis of 13 families with X-linked chronic granulomatous disease reveals a low proportion of sporadic patients and a high proportion of sporadic carriers. *Pediatr Res* 1998;44(1):85-92.
13. Rae J, Newburger PE, Dinauer MC et al. X-Linked chronic granulomatous disease: mutations in the CYBB gene encoding the gp91-phox component of respiratory-burst oxidase. *Am J Hum Genet* 1998;62(6):1320-1331.
14. Mauch L, Lun A, O'Gorman MR et al. Chronic granulomatous disease (CGD) and complete myeloperoxidase deficiency both yield strongly reduced dihydrorhodamine 123 test signals but can be easily discerned in routine testing for CGD. *Clin Chem* 2007;53(5):890-896.
15. Levinsky RJ, Harvey BA, Rodeck CH, Soothill JF. Phorbol myristate acetate stimulated NBT test: a simple method suitable for antenatal diagnosis of chronic granulomatous disease. *Clin Exp Immunol* 1983;54(2):595-598.
16. Richardson MP, Ayliffe MJ, Helbert M, Davies EG. A simple flow cytometry assay using dihydrorhodamine for the measurement of the neutrophil respiratory burst in whole blood: comparison with the quantitative nitrobluetetrazolium test. *J Immunol Methods* 1998;219(1-2):187-193.
17. Vowells SJ, Fleisher TA, Malech HL. Testing for chronic granulomatous disease. *Lancet* 1996;347(9007):1048-1049.

18. Jones OTG, Wood JD. Oxidant Production by Human B Lymphocytes: Detection of Activity and Identification of Components Involved. *Methods* 1996;9(3):619-627.
19. Qin Y, Lu M, Gong X. Dihydrorhodamine 123 is superior to 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate and dihydrorhodamine 6G in detecting intracellular hydrogen peroxide in tumor cells. *Cell Biol Int* 2008;32(2):224-228.
20. Castillo JL, Venegas O, Pereira P, Ibacache M. Evaluacion del estallido respiratorio en granulocitos de pacientes con alteraciones clínicas de la función fagocítica. *Rev latinoam actual biomed* 2008;2:26-30.
21. Model MA, KuKuruga MA, Todd RF, III. A sensitive flow cytometric method for measuring the oxidative burst. *J Immunol Methods* 1997;202(2):105-111.
22. Walrand S, Valeix S, Rodriguez C, Ligot P, Chassagne J, Vasson MP. Flow cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison of three fluorescent probes. *Clin Chim Acta* 2003;331(1-2):103-110.
23. Koker MY, Sanal O, de BM et al. Skewing of X-chromosome inactivation in three generations of carriers with X-linked chronic granulomatous disease within one family. *Eur J Clin Invest* 2006;36(4):257-264.
24. Emmendorffer A, Hecht M, Lohmann-Matthes ML, Roesler J. A fast and easy method to determine the production of reactive oxygen intermediates by human and murine phagocytes using dihydrorhodamine 123. *J Immunol Methods* 1990;131(2):269-275.
25. Emmendorffer A, Nakamura M, Rothe G, Spiekermann K, Lohmann-Matthes ML, Roesler J. Evaluation of flow cytometric methods for diagnosis of chronic granulomatous disease variants under routine laboratory conditions. *Cytometry* 1994;18(3):147-155.
26. Roesler J, Hecht M, Freihorst J, Lohmann-Matthes ML, Emmendorffer A. Diagnosis of chronic granulomatous disease and of its mode of inheritance by dihydrorhodamine 123 and flow microcytofluorometry. *Eur J Pediatr* 1991;150(3):161-165.
27. Vowells SJ, Sekhsaria S, Malech HL, Shalit M, Fleisher TA. Flow cytometric analysis of the granulocyte respiratory burst: a comparison study of fluorescent probes. *J Immunol Methods* 1995;178(1):89-97.
28. Wolach B, Gavrieli R, de BM et al. Chronic granulomatous disease in Israel: clinical, functional and molecular studies of 38 patients. *Clin Immunol* 2008;129(1):103-114.
29. Bakri FG, Martel C, Khuri-Bulos N et al. First report of clinical, functional, and molecular investigation of chronic granulomatous disease in nine Jordanian families. *J Clin Immunol* 2009;29(2):215-230.

30. Koker MY, Sanal O, de BM et al. Mutations of chronic granulomatous disease in Turkish families. *Eur J Clin Invest* 2007;37(7):589-595.
31. Segal BH, Leto TL, Gallin JI, Malech HL, Holland SM. Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. *Medicine (Baltimore)* 2000;79(3):170-200.
32. Wolach B, Scharf Y, Gavrieli R, de BM, Roos D. Unusual late presentation of X-linked chronic granulomatous disease in an adult female with a somatic mosaic for a novel mutation in CYBB. *Blood* 2005;105(1):61-66.
33. Roesler J. Carriers of X-linked chronic granulomatous disease at risk. *Clin Immunol* 2009;130(2):233.
34. Seger RA. Chronic granulomatous disease: recent advances in pathophysiology and treatment. *Neth J Med* 2010;68(11):334-340.
35. Wu YC, Huang YF, Lin CH, Shieh CC. Detection of defective granulocyte function with flow cytometry in newborn infants. *J Microbiol Immunol Infect* 2005;38(1):17-24.
36. Vowells SJ, Fleisher TA, Malech HL. Testing for chronic granulomatous disease. *Lancet* 1996;347(9007):1048-1049.
37. Stasia MJ, Li XJ. Genetics and immunopathology of chronic granulomatous disease. *Semin Immunopathol* 2008;30(3):209-235.
38. Jirapongsananuruk O, Malech HL, Kuhns DB et al. Diagnostic paradigm for evaluation of male patients with chronic granulomatous disease, based on the dihydrorhodamine 123 assay. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111(2):374-379.
39. Stasia MJ, Cathebras P, Lutz MF, Durieu I. [Chronic-granulomatous disease]. *Rev Med Interne* 2009;30(3):221-232.