

## **I.- Datos generales.**

Universidad Autónoma Metropolitana

Medico pasante del Servicio Social: Ricardo Rioja Valencia

Matrícula: 2133064483

## **II.- Lugar de realización del servicio social:**

Instituto Nacional de Pediatría.

Periodo en que se realizo el servicio social: 01/02/2019-31/01/2020

## **III.- Unidad, División y Licenciatura.**

Xochimilco, ciencias biológicas y de la salud, Medicina.

## **IV.- Nombre del proyecto.**

Determinación de mutaciones en los genes de la NADPH oxidasa de pacientes mexicanos con enfermedad granulomatosa crónica del instituto nacional de pediatría.

## **V.- Asesores.**

Asesor del proyecto: Lizbeth Blancas Galicia.

Asesor interno: Raúl Enrique Castañeda Castaneira.

## VI.- Introducción.

### DEFINICIÓN ENFERMEDAD GRANULOMATOSA CRÓNICA.

La enfermedad granulomatosa crónica (EGC) es una entidad nosológica genéticamente heterogénea, caracterizada por infecciones severas y recurrentes causadas por bacterias y hongos, además de una falta de regulación en la respuesta inflamatoria.<sup>1</sup> Fue descrita en 1954 y 1957, sin embargo fue bien caracterizada hasta 1959, inicialmente se pensó que tenía un patrón de transmisión hereditaria recesiva ligada al X (RLX) y por tanto los varones eran los únicos afectados pero la detección de niñas afectadas condujo en 1968 a la descripción de la forma autosómica recesiva (AR).<sup>2</sup>

### CUADRO CLÍNICO

*Manifestaciones infecciosas.* La EGC se presenta desde la infancia hasta la edad adulta sin embargo la mayoría de los pacientes se diagnostican en la etapa preescolar.<sup>3</sup>

Los sitios más frecuentes de infección son pulmón, piel, nódulos linfáticos e hígado. Otras menos frecuentes son osteomielitis y abscesos perianales.<sup>4</sup> Las infecciones pulmonares se manifiestan como neumonía, linfadenopatía hilar, empiema y absceso pulmonar. Los agentes infecciosos más frecuentes reportados en Norteamérica son *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia*, *Serratia marcescens*, *Nocardia* y *Aspergillus*.<sup>3</sup> Sin embargo en otros sitios geográficos se reportan *Salmonella*, *Bacilo de Calmette-Guerin* (BCG) y tuberculosis.<sup>2</sup> Los abscesos hepáticos en los pacientes con EGC son diferentes a aquellos que presentan los individuos inmunocompetentes, están formados por estructuras fibróticas y material caseoso con microabscesos satélites infectados con estafilococos y generalmente requieren escisión quirúrgica para su erradicación eficaz.<sup>5</sup> La sepsis no es común pero cuando se presenta es secundaria a *Burkholderia cepacia*, *Serratia marcescens* y *Chromobacterium violaceum*. En la EGC las infecciones por bacterias y *Nocardia* son sintomáticas y asociadas a una velocidad de sedimentación globular elevada, leucocitosis y fiebre. Al contrario, las

infecciones fúngicas son mucho menos sintomáticas en cuestión de fiebre y cuenta leucocitaria.<sup>6</sup> Las infecciones por *S. marcescens* y *Nocardia* tienden a metastatizar a múltiples sitios, en particular a hueso; además de ser necrotizantes y por tanto asociadas a destrucción tisular extensa sino son tratadas de forma inmediata y agresiva.

Las infecciones por hongos son una causa de mortalidad en los pacientes con EGC.<sup>3</sup> Con el advenimiento de la profilaxis con itraconazol y de nuevos agentes para el tratamiento de infecciones por hongos filamentosos, como *Aspergillus*, se ha reducido de forma importante la mortalidad por infecciones fúngicas en la EGC. La afección a hueso ocurre de forma característica, pero no exclusiva, por contigüidad de los pulmones a las costillas o columna vertebral. *Aspergillus nidulans* causa con mayor frecuencia osteomielitis en comparación con *Aspergillus fumigatus* u otros hongos.<sup>7</sup> En los pacientes con EGC se ha descrito una respuesta inflamatoria excesiva en los pulmones ante una infección por *Aspergillus*. Dos días después de la exposición a la inhalación de esporas o hifas (composta, abono, hojas secas húmedas) los pacientes presentan fiebre y disnea; las radiografías muestran infiltrado intersticial difuso; la biopsia muestra inflamación aguda con necrosis y hongos.<sup>2</sup>

Se han descrito ciertos microorganismos que producen infección casi exclusivamente en pacientes con EGC, por lo que el aislamiento en un proceso infeccioso debe orientar a la sospecha diagnóstica de EGC. Entre ellos están *Aspergillus nidulans*, *Chromobacterium violaceum*, *Granulibacter bethesdensis*, y *Penicillium piceum*.<sup>8</sup>

Las infecciones localizadas por BCG se observan en pacientes con EGC, sin embargo estas raras veces se diseminan. También se ha descrito que los pacientes con EGC son más susceptibles a padecer tuberculosis que la población en general; dicho fenómeno es más evidente en áreas endémicas con tuberculosis.<sup>9</sup>

*Manifestaciones no infecciosas.* Los pacientes con EGC tienen una desregulación de la respuesta inflamatoria, esto lleva a que presenten una inflamación excesiva que se manifiesta clínicamente como una formación excesiva de granulomas, esta característica fenotípica le da el nombre a la enfermedad. En algunos casos las manifestaciones inflamatorias de EGC son la primera manifestación clínica.<sup>10</sup> La formación de granulomas puede afectar a varios órganos, sin embargo los tractos gastrointestinal y genitourinario son los más afectados. El involucro de granulomas en esófago, yeyuno, íleo, ciego, recto y región perirectal puede semejar clínicamente a la enfermedad de Crohn.<sup>2</sup> Se ha descrito que los pacientes con EGC recesiva ligada al X presentan mayor enfermedad inflamatoria intestinal en comparación con los pacientes con EGC autosómica recesiva (43% vs 11%). El síntoma más frecuente es el dolor abdominal; saciedad temprana, distensión abdominal después de comer, vomito matutino, dolor abdominal difuso crónico. Dentro de la afección urinaria se puede presentar granulomas en la vejiga, obstrucción ureteral e infección de vías urinarias. Otra complicación inflamatoria que presentan los pacientes con EGC es la dehiscencia tardía de heridas quirúrgicas sin infección.<sup>1, 10, 11</sup>

Las enfermedades autoinmunes son más frecuentes en la EGC. Tanto los pacientes con EGC, como las portadoras de EGC recesiva ligada al X, tienen mayor riesgo de padecer lupus eritematoso sistémico y lupus discoide en comparación a la población general. Otras enfermedades reportadas en los pacientes con EGC son sarcoidosis, purpura trombocitopénica idiopática, artritis reumatoide juvenil y síndrome antifosfolípido.<sup>3</sup>

A diferencia de las inmunodeficiencias que afectan al linfocito, los pacientes con EGC no tienen mayor riesgo de desarrollar neoplasia.<sup>12</sup>

## *DIAGNÓSTICO*

El diagnóstico de EGC se establece a través de demostrar ausencia de producción de radicales libres en los neutrófilos activados. Sin embargo en pocos casos con EGC con mutación en *CYBB* existe actividad residual de la NADPH oxidasa entre

1-20%. La prueba más sencilla y económica como prueba de tamizaje es la reducción de nitroazul de tetrazolio (NBT). La prueba consiste en exponer a los neutrófilos a NBT y un estímulo como PMA (phorbol myristate acetate); el colorante amarillo soluble NBT es reducido en las células activadas a formazan (color azul). Esta prueba se puede realizar en sangre total o neutrófilos purificados (preservada < 48 hrs.) y siempre debe realizarse a la par con un control. Otra prueba para cuantificar la producción de radicales libres intracelular es la citometría de flujo (fluorescent-activated cell sorting [FACS]) con fluorocromos como la 1, 2, 3, dihidrorodamina o la 2'7' diacetatodiclofluoresceína, sin embargo una de las desventajas es que requiere sangre fresca y un equipamiento costoso, y que en ocasiones no es accesible. Tanto la prueba de NBT, como el FACS permiten la detección de portadoras de EGC en las familiares femeninas de pacientes con EGC recesiva ligada al X, quienes por el fenómeno de lyonización presentan dos poblaciones de neutrófilos, unos que producen radicales libres y otros que no producen radicales libres. No es posible detectar por estas técnicas a los portadores de EGC autosómica recesiva. La detección de la mutación en los genes candidatos establece el defecto molecular, necesarios para el consejo genético y diagnóstico prenatal.<sup>11, 13, 14</sup>

### *IMPORTANCIA*

La EGC se ha reportado en diferentes áreas del mundo y no se han descrito factores de riesgo que aumenten la probabilidad de padecerla. La incidencia global es de 1:250 000.<sup>15</sup> La consanguinidad como una práctica cultural y religiosa explica sólo en parte las diferencias en la incidencia en diferentes regiones del mundo de la EGC AR.<sup>16, 17</sup> La incidencia en Estados Unidos de Norte América es de 1:200 000; en Israelitas Judíos 1:218 000; en Israelitas Árabes 1: 111 000.<sup>2</sup> La prevalencia ha sido estimada en Japón 1/1 300 000, en Australia 1/1 375 000 y en Suecia 1/450 000.<sup>3</sup>

El pronóstico de los pacientes con EGC ha mejorado desde su primera descripción en 1954 a la fecha. A través de un análisis de Kaplan-Meier, en una serie de 368 pacientes en Estados Unidos de Norte América, durante un seguimiento de 5

años, se estimó una mortalidad de 5% en un año en los pacientes con EGC RLX, y de 2% en un año en aquellos con EGC AR.<sup>3</sup> En un estudio con 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 ECG RLX, la supervivencia a 10 años para el primer grupo fue de 94% y de 86% para el segundo grupo; en un estudio de 23 pacientes con EGC en Japón la supervivencia a 20 años fue de 87%.<sup>15, 18</sup> En México los datos que existen sobre EGC fueron realizados en un estudio retrospectivo en el Instituto Nacional de Pediatría en un periodo entre 1970-2004. Se reportaron 23 pacientes y al momento del estudio 10 habían fallecido, el valor promedio de edad al momento del fallecimiento fue de 3 años con 9 meses (SD±36.8).<sup>19</sup>

### *PATRONES DE HERENCIA*

Existen dos patrones de transmisión hereditaria en la EGC: el recesivo ligado al X, secundario a alteraciones en la glicoproteína gp91<sup>phox</sup> y el autosómico recesivo, secundario a alteraciones en las proteínas p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> y p40<sup>phox</sup>.<sup>20, 21</sup> 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 tipo de patrón de transmisión hereditaria.<sup>3</sup> En otro estudio similar pero con 429 pacientes Europeos se encontró 67% con EGC RLX y 33% con EGC AR. Estos porcentajes pueden variar en países en donde el matrimonio con consanguinidad es una práctica frecuente, como consecuencia la EGC AR es el patrón de transmisión hereditario que predomina.<sup>16, 17, 22-24</sup> En Turquía se ha descrito que 33% del total de los casos con EGC tuvieron el patrón AR, mientras que el resto tuvo el patrón RLX.<sup>14, 22</sup>

El asesoramiento genético basado en el patrón de herencia certero determinado a través del análisis molecular, orienta sobre el riesgo de transmitir la enfermedad del paciente mismo y de sus progenitores en las formas AR y la detección de mujeres portadoras en las formas de transmisión ligadas al X o descartar el estado de portadoras al detectar una mutación de *novo* en el caso índice.

## NADPH OXIDASA

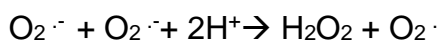
### ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

La NADPH-oxidasa se expresa en los leucocitos, específicamente en neutrófilos, eosinófilos, monocitos, macrófagos, linfocitos T y B; este sistema se ha encontrado también en células endoteliales, mesangiales, epiteliales, del cuerpo lúteo, músculo liso, plaquetas y fibroblastos.<sup>25, 26, 27</sup>

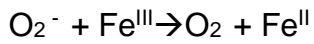
La NADPH oxidasa es un complejo enzimático formado por 6 subunidades, cada una denominada como *phox* (del inglés ***phagocyteoxidase***), y *gp91<sup>phox</sup>*, *p22<sup>phox</sup>*, *p47<sup>phox</sup>*, *p67<sup>phox</sup>*, *p40<sup>phox</sup>* y *Rac2*. Cuando el leucocito está en reposo *gp91<sup>phox</sup>* y *p22<sup>phox</sup>* forman un heterodímero (*flavocitocromo b558*) unido a la membrana plasmática y a la de la vacuola fagocítica y los otros 4 componentes se encuentran en el citosol.<sup>28</sup> La fagocitosis de los microorganismos es un estímulo que lleva a la traslocación de los 4 componentes citosólicos hacia el *flavocitocromo b558* en membrana de la vacuola fagocítica para formar el complejo de la NADPH oxidasa activada (figura 1). El estallido respiratorio es el proceso a través de cual la NADPH oxidasa cataliza la transferencia de un electrón desde NADPH citosólica hacia el O<sub>2</sub> con la formación de un radical superóxido O<sub>2</sub><sup>-</sup>. La reacción se escribe como:



El superóxido daña los tejidos al atacar los componentes lipídicos de la membrana, es inestable y rápidamente (en milisegundos) dismuta para formar peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), el cual no es un radical pero es tóxico para algunos microorganismos a bajas concentraciones. La dismutación se puede escribir como:



El superóxido y el peróxido de hidrógeno en presencia de metales catalíticos de transición reaccionan para formar el radical  $\cdot\text{OH}$  que es muy reactivo y dañino:



El  $\text{O}_2^-$  producido por las células fagocíticas da lugar a un grupo de derivados tóxicos a los cuales se les da el nombre en inglés *reactive oxygen species* (ROS). El  $\text{O}_2^-$  es rápidamente convertido a peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo y ácido hipocloroso.<sup>29</sup>

El superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo son microbicidas. La deficiencia de la NADPH oxidasa en la EGC hace evidente la importancia de la enzima, los pacientes presentan infecciones por hongos y bacterias severas que ponen en peligro la vida del paciente, los microorganismos son fagocitados normalmente pero persisten vivos dentro de la célula.<sup>11</sup>

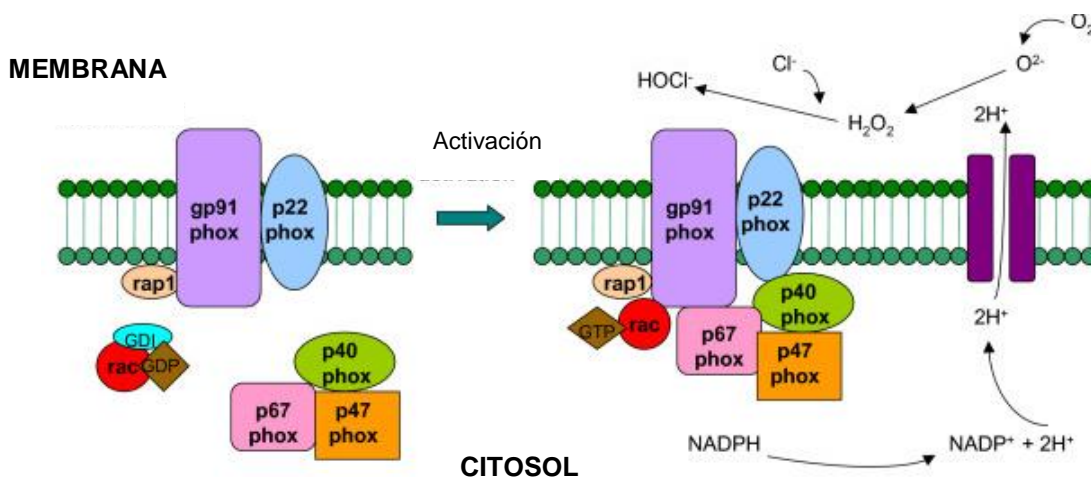


Figura 1. Se muestra la NADPH oxidasa en reposo (izq) y activada (der).



## GENES DE LA NADPH OXIDASA

Cada una de las diferentes subunidades es codificada por un gen diferente, gp91<sup>phox</sup> por *CYBB*, p22<sup>phox</sup> por *CYBA*, p47<sup>phox</sup> por *NCF1*, p67<sup>phox</sup> por *NCF2* y p40<sup>phox</sup> por *NCF4*.

*CYBB* está localizado en el cromosoma X, en la región Xp21.1, tiene un tamaño de 30kb y 13 exones.

*CYBA* está localizado en el cromosoma 16, en la región 16q24, tiene un tamaño de 8.5kb y 6 exones.

*NCF1* está localizado en el cromosoma 7, en la región 7q11.23, tiene un tamaño de 15 kb y 11 exones.

*NCF2* está localizado en el cromosoma 1, en la región q25, tiene un tamaño de 40kb y 16 exones.

*NCF4* está localizado en el cromosoma 22, en la región q13.1, tiene un tamaño de 18kb y 10 exones.<sup>20</sup>

Existen bases de datos que contienen información bioquímica, genética y clínica de la EGC, los cuales están disponibles en <http://www.uta.fi/itm/bioinfo/CYBAbase> (o *NCF1base/*, o *NCF2base/* o *CYBBbase/*). Además la información puede estar disponible en la base de datos HGMD en <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac.search.php>.<sup>20</sup>

## TÉCNICAS EMPLEADAS EN EL ESTUDIO MOLECULAR DE LA EGC

El estudio a nivel molecular de la EGC se basa en la determinación por PCR, RT/PCR y secuenciación automatizada de la mutación en uno de los 5 genes candidatos y de la evaluación de la expresión de la subunidad proteica afectada. Las diferentes publicaciones que han descrito mutaciones en pacientes con EGC describen para la caracterización de las mutaciones responsables la extracción de

ADN genómico de sangre periférica y extracción de ARNm de células mononucleares o linfocitos B inmortalizados por el virus Epstein-Barr (EBV) de los pacientes con EGC.<sup>17</sup> El ARN es convertido a cADN.<sup>30</sup>

La exploración de los genes *CYBB*, *CYBA*, *NCF2*, *NCF1*, *NCF4* (dependiendo del género y la historia familiar del paciente) se realiza por secuenciación directa. Para esto se amplifican, uno a uno, por la técnica de PCR los exones de *CYBB*, *NCF1*, *NCF2*, *CYBA* y las uniones de los exones con los intrones. Después de la purificación de los productos de PCR ambas cadenas son analizadas usando un secuenciador automático de ADN y posteriormente con un programa operativo para el análisis.<sup>14, 24</sup>

La evaluación de la expresión de las subunidades de la NADPH oxidasa es a través de Western blot, para esto se solubilizan las proteínas del neutrófilo con Triton al 1% X100, se separan en un gel de poliacrilamida, son electro transferidos a papel de nitrocelulosa e inmuno detectadas con anticuerpos monoclonales.<sup>17</sup>

#### *MUTACIONES EN LA NADPH OXIDASA*

Tanto la forma recesiva ligada al X como la autosómica recesiva de la EGC son causadas por mutaciones heterogéneas; se han descrito deleciones, mutaciones de corte y empalme (*splicing*), de sentido erróneo, sin sentido o inserciones, en cualquiera de los 5 genes que codifican para las subunidades NADPH oxidasa; los *hot spots* (regiones del ADN en donde se observa mutaciones con gran frecuencia) se han descrito sólo en el gen *NCF1*.<sup>17</sup> Las mutaciones descritas en los cinco genes de la EGC son aproximadamente 410.<sup>20</sup> La diversidad de las mutaciones explica en parte la heterogeneidad clínica y genética de la EGC y sugiere que la incidencia en el mundo es consecuencia de diversos eventos de mutaciones independientes.<sup>31</sup> El estudio molecular, específicamente la determinación de la mutación por RT-PCR y secuenciación automatizada, se ha realizado en diferentes cohortes de pacientes con EGC en diferentes países; los porcentajes del total de pacientes en los que se determinó la mutación son los siguientes: en Italia (76%),<sup>21</sup> Israel (92.2%),<sup>16</sup> España (69%)<sup>32</sup> y Francia (75.5%); a

nivel mundial, en promedio más del 60% de los pacientes reportados tienen la detección de la mutación.<sup>33</sup> En la literatura sólo hay una publicación de casos de EGC con pacientes Latinos, incluye sólo dos casos de pacientes mexicanos.<sup>31</sup>

#### *Mutaciones en la EGC recesiva ligada al X*

Fuera de norte de África y medio oriente, la EGC con modo de transmisión hereditaria recesiva ligada al X (en la nomenclatura internacional, X91CGD [*Chronicgranulomatousdisease*]) es la más común; el gen afectado es *CYBB* (Cytochrome b beta) con número OMIM#306400; OMIM proviene de las siglas en Inglés ***Online Mendelian Inheritance in Man***; es una base de datos que cataloga todas las enfermedades conocidas con un componente genético, y cuando es posible, la asociación a los genes en el genoma humano.<sup>25</sup> Las mutaciones de *novo* se han descrito en el 10% de los pacientes con X91CGD.<sup>34</sup>

La nomenclatura estándar para diferenciar los diferentes fenotipos de X91CGD es X91<sup>0</sup>, X91<sup>-</sup> y X91<sup>+</sup>, en donde el superíndice representa el nivel de expresión de la proteína gp91<sup>phox</sup>, indetectable (0), disminuido (-) o normal (+), determinada por *immunoblot* o análisis espectral; la designación X91<sup>?</sup> indica que la expresión de la proteína no fue determinada.<sup>25</sup>

La mayoría de las mutaciones se manifiestan con una falta de expresión de gp91<sup>phox</sup> debido a la inestabilidad del RNAm o de la proteína defectuosa, así que la función de la NADPH oxidasa es totalmente abolida (X91<sup>0</sup>CGD). En contados casos con mutaciones con sentido erróneo dan por resultado niveles normales o apenas detectables de citocromo b558, sin embargo no son funcionales (X91<sup>-</sup> y X91<sup>+</sup>).<sup>11, 17, 35</sup>

La caracterización de las mutaciones en el gen *CYBB* se ha realizado en diversos laboratorios de investigación en todo el mundo.<sup>25, 36</sup> La última actualización de las mutaciones X91CGD por Roos y cols. recopila un total de 1267 familias con 1415 pacientes; algo importante es que incluye mutaciones publicadas y no publicadas. En la tabla 1 se muestran las mutaciones que se han descrito hasta el día de hoy: deleciones, inserciones, deleciones/inserciones, de corte y empalme, sin sentido,

sentido erróneo y del promotor. Se han encontrado 681 mutaciones diferentes (en 1415 pacientes de 1267 familias no emparentadas), de éstas, 498(73.1%) son únicas. Los resultados muestran la heterogeneidad de la enfermedad, no sólo clínica y a nivel enzimático, sino también a nivel molecular.<sup>25</sup>

	<b>Familias</b>	<b>Mutaciones</b>	
Deleciones	281(22.2%)	242(35.6%)	
Inserciones	89(7.9%)	54(7.9%)	
Deleciones/Inserciones	19(1.5%)	19(2.8%)	
Corte y empalme	247(19.5%)	120(17.6%)	(2 indefinidas)
Sentido erróneo	246(19.4%)	145(21.3%)	
Sin sentido	377(29.8%)	96(14.1%)	
Mutaciones de promotor	8(0.6%)	5(0.7%)	
	1267 familias no relacionadas con pacientes	681 mutaciones en los pacientes; 498(73.1%) son únicas.	

**Tabla 1** Número de familias con pacientes con EGC ligada al X, número total de pacientes con diferentes mutaciones y número total de mutaciones únicas por familia.

Las deleciones e inserciones están presentes en el 31% de todos los pacientes con EGC ligada al X; las substituciones de un sólo nucleótido en el 69% restante. Esta categoría puede ser subdividida en mutaciones de empalme que llevan a un mal procesamiento del ARN (19%), mutaciones con sentido erróneo que producen la substitución de un solo aminoácido y las mutaciones sin sentido que llevan a una terminación prematura de la proteína.<sup>3, 25</sup>

Existen dos sitios en internet en donde podemos encontrar las mutaciones reportadas, algo importante es que son actualizadas de forma frecuente; la base de datos HGMD en <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac.search.php> y en <http://www.uta.fi/imt/bioinfo/CYBBbase/>.<sup>37</sup>

#### *Mutaciones en la EGC autosómica recesiva*

Las mutaciones en los cuatro genes que codifican para la NADPH oxidasa, p22-*phox*, p47-*phox*, p67-*phox* y p40-*phox*, causan la forma de transmisión autosómica recesiva (AR) de la EGC. A nivel mundial las formas AR son un tercio de todas las formas de EGC reportadas, sin embargo en regiones y países árabes como Jordania, Irán, Israel, Turquía, Túnez, norte de África, Este y Sur de Asia, esta relación es inversa, es decir dos tercios de todas las formas de EGC son autosómicas recesivas.<sup>15-17, 20, 24</sup> La explicación es el mayor número de matrimonios consanguíneos, debido a razones culturales y religiosas.<sup>14, 17</sup>

Para la descripción de los diferentes fenotipos de las formas AR de la EGC existe una nomenclatura internacional, (ej., A22<sup>0</sup>, A22<sup>+</sup>, A67<sup>0</sup>, A67<sup>+</sup>, A67<sup>-</sup>, A47<sup>0</sup>, A40<sup>0</sup> y A40<sup>+</sup>). La primera letra, A, se refiere al modo de transmisión hereditaria (autosómica recesiva), los números indican el componente de *phox* afectado, el símbolo en superíndice indica si la proteína está ausente (<sup>0</sup>), disminuida (<sup>-</sup>) o (<sup>+</sup>) normal según el análisis de inmunoblot. Cuando se desconoce la expresión de la proteína se indica: (?). Los números OMIM para A22, A67, A47, son #233690, #233710, #233700 respectivamente.<sup>20</sup> A continuación se describen de forma individual las mutaciones en cada uno de los genes implicados en las formas autosómicas recesivas.

## **NCF1**

La mutación en el gen de *NCF1* (*neutrophilcytosol factor 1*) más frecuente es una deleción de dos nucleótidos en una repetición en tándem GTGT que corresponden a las primeras 4 bases en del exón 2 del gen *NCF1*. El espectro de las mutaciones diferentes a la deleción GT es tan diverso como en los otros genes afectados en la EGC. Todas las mutaciones en *NCF1* identificadas a la fecha llevan a la ausencia de expresión de la proteína p47<sup>phox</sup>.<sup>11</sup>

De trescientos cincuenta pacientes estudiados en todo el mundo a nivel de ADN, 53 pacientes de 42 familias son homocigotos para la deleción del dinucleotido GT ( $\Delta$ GT) al inicio del exón 2. De las 42 familias, 20 tuvieron pacientes heterocigotos para la deleción GT y una mutación adicional, el resto tuvieron mutaciones diferentes a  $\Delta$ GT en ambos alelos de *NCF1*. La  $\Delta$ GT del alelo de *NCF1* es la mutación más común de EGC en la población. La razón de este predominio es debido a que la mayoría de los sujetos sanos tienen dos pseudogenes ( $\Psi$  *NCF1*), cada uno se co-localiza con el gen funcional en la posición 7q11.23 y portan la  $\Delta$ GT. Los eventos de recombinación entre *NCF1* y los  $\Psi$  *NCF1* conducen a la incorporación  $\Delta$ GT dentro de *NCF1*.<sup>20, 38</sup> La presencia de dos  $\Psi$  *NCF1* complica su exploración; primero se busca en el ADN genómico la deleción del dinucleotido GT (c.75\_76delGT,pTyr26HisfsX26) en el exón 2 del gen *NCF1*; en ausencia de la deleción homocigota, se realiza entonces la secuenciación específica del gen *NCF1* en el ARNm (cADN).

Las mutaciones reportadas hasta la fecha están en la página <http://www.uta.fi/imt/bioinfo/NCF1base/>.<sup>24</sup>

## **NCF2**

La EGC autosómica recesiva con deficiencia de A67<sup>o</sup>CGD (A67<sup>o</sup>CGD [*Chronic Granulomatous Disease*]) es poco frecuente, afecta el 5% de todos los pacientes con EGC en todo el mundo. Fue descrita por primera vez en 1995 por Nunoí.<sup>39</sup> La A67<sup>o</sup>CGD es causada por mutación en el gen *NCF2* (*neutrophilcytosol factor 2*). Las mutaciones en los pacientes con EGC deficientes de p67<sup>phox</sup> son heterogeneas;

no se han reportado *hot spots*.<sup>24</sup> Las mutaciones en A67<sup>o</sup>CGD publicadas y no publicadas están disponibles en la página de Internet <http://www.uta.fi/imt/bioinfo/NCF2base/>. Hasta este año se han descrito 54 diferentes tipos de mutaciones alélicas en 95 pacientes: 14 deleciones (25.9%), 8 sin sentido (14.8%), 11 de corte-empalme (20.4%), 17 con sentido erróneo (31.5%), 4 inserciones (7.4%).<sup>17, 40</sup>

### **CYBA**

Las mutaciones en el gen de *CYBA* (cytochrome b alpha) se han descrito aproximadamente en el 5% de los pacientes con EGC.<sup>17</sup> Sólo existen 7 polimorfismos en la proteína de p22<sup>phox</sup>, así que cambios mínimos en la composición de esta proteína llevan a inestabilidad intrínseca debida a falta de interacción con gp91<sup>phox</sup>.<sup>30</sup> Se han descrito 25 mutaciones en *CYBA* en 46 familias.<sup>17</sup> Estas incluyen deleciones, inserciones, de corte-empalme, sin sentido y sentido erróneo. Las mutaciones reportadas al día de hoy se pueden encontrar en las páginas de Internet <http://www.uta.fi/imt/bioinfo/CYBA>, Human Gene Mutation Data Base, HGMD; <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/all.php>).<sup>20, 30</sup>

### **NCF4**

Matute recientemente describió el primer paciente con EGC con un genotipo heterocigoto compuesto (p.K52Rfsx79) + (p.R105Q) en el gen *NCF4* (*neutrophilcytosol factor4*).<sup>28, 41</sup>

### **POLIMORFISMOS EN LOS GENES DE LA NADPH OXIDASA**

Se han descrito polimorfismos en diferentes genes que codifican para la NADPH oxidasa, se han hecho estudios en diferentes etnias con el fin de saber si éstos alteran la función de la enzima o si son factor de riesgo para enfermedades.<sup>42</sup>

En pacientes con artritis reumatoide algunos polimorfismos en *NCF1* se han asociado a una disminución en la función de la NADPH oxidasa y a una mayor severidad de la enfermedad.<sup>43</sup> Polimorfismos en *CYBA* se han asociado a padecer un mayor riesgo de enfermedad coronaria, sin embargo los resultados son

controversiales.<sup>44</sup>El gen de *CYBB* presenta poca diversidad en comparación con los otros genes localizados en el cromosoma X.<sup>42</sup>

### *SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD*

Existe una gran heterogeneidad en las mutaciones descritas; en pacientes con una misma mutación se ha reportado una amplia variabilidad en el fenotipo clínico, sin embargo los pacientes con patrón de transmisión hereditaria recesiva ligada al X tienen un fenotipo clínico más severo y por tanto la supervivencia y calidad de vida es menor en comparación con aquellos con patrón autosómico recesivo;<sup>3, 37</sup> específicamente en el registro nacional de Estados Unidos de Norte América de EGC con 368 pacientes aquellos con la forma recesiva ligada al X tienen un fenotipo clínico más severo pues presentaron una mortalidad del 21.1% en comparación con la forma autosómica recesiva ( $p < 0.02$ ), además en cuanto a la supervivencia a 5 años fue de 88% contra 77% en la forma recesiva ligada al X y la autosómica recesiva respectivamente.<sup>3</sup>

La mayoría de los pacientes con mutación en *CYBB* no expresan gp91<sup>phox</sup> debido a la inestabilidad del RNAm o de la proteína, sin embargo aquellos pacientes que expresan mínima cantidad de gp91<sup>phox</sup> tiene un fenotipo clínico menos severo; estudios clínicos en pacientes con mutación de *NCF1* muestran que producen una cantidad residual de superóxido y peróxido de hidrógeno comparado con aquellos con mutación en *CYBB*, esta pequeña cantidad explica la diferencia clínica entre la forma autosómica recesiva y la recesiva ligada al X.<sup>11, 35</sup>

## **VII.- Objetivos.**

### **Objetivo general.**

Identificar las mutaciones patogénicas de los genes *CYBB*, *CYBA*, *NCF1*, *NCF2* y *NCF4* responsables de EGC en una muestra de pacientes mexicanos con EGC atendidos en el INP.

### **Objetivos específicos.**



- 1) Describir el espectro de mutaciones patogénicas en los genes *CYBB*, *CYBA*, *NCF1*, *NCF2*, *NCF4* responsables de EGC en una muestra de pacientes mexicanos con EGC atendidos en el INP y definir si ya han sido descritas en la literatura.
- 2) Describir la frecuencia de mutaciones originadas como evento *de novo* en los genes *CYBB* responsables de las formas recesivas ligadas al cromosoma X en una muestra de pacientes mexicanos con EGC atendidos en el INP.
- 3) Describir cual es el gen más frecuente mutado responsable de EGC en una muestra de pacientes mexicanos con EGC atendidos en el INP.
- 4) Brindar asesoramiento genético a las familias incluidas en el estudio.

## **VII.- Metodología utilizada.**

### **Clasificación del estudio.**

Estudio clínico, descriptivo, transversal, observacional, prospectivo.

### **Población objetivo.**

Niños menores de 18 años de cualquier sexo con diagnóstico de EGC basado en el cuadro clínico y la medición de reducción de nitroazul de tetrazolio menor a 1% en una muestra de pacientes mexicanos atendidos en el INP. Además, se incluirá en el estudio al padre y a la madre biológicos del paciente en estudio.

### **Población elegible.**

Niños menores de 18 años de cualquier género con diagnóstico de EGC atendidos actualmente en el Instituto Nacional de Pediatría,

Padre y madre biológicos del paciente, de cualquier edad.

*Criterios de inclusión.*

Pacientes mexicanos menores de 18 años de cualquier género con diagnóstico de EGC confirmado por medición de reducción de nitroazul de tetrazolio menor a 1% y que acudan a la Unidad de Investigación en Inmunodeficiencias Primarias del Instituto Nacional de Pediatría.

Que los padres biológicos acepten que su hijo y ellos participen en el estudio. En el caso que el paciente sea mayor a 8 años, que de su asentimiento; lo anterior quedara respaldado en las cartas de consentimiento y asentimiento con las firmas correspondientes.

#### *Criterios de exclusión.*

Pacientes con enfermedad granulomatosa crónica con mutación determinada previamente.

Pacientes que antes del análisis de su muestra decline su participación.

#### **Variables del estudio.**

Ver Apéndice 0.

#### **Ubicación del estudio.**

El estudio se realizara en la Laboratorio de Biología Molecular y en la Unidad de Investigación de Inmunodeficiencias del Instituto Nacional de Pediatría.

#### **Material y métodos.**

A los padres de los pacientes y a los pacientes que acepten participar en el estudio, se les otorgará un consentimiento y/o asentimiento informado; una vez incluidos en el estudio se les realizara un árbol genealógico por familia (quedara registrado en hoja de captura de árbol genealógico), a través de este se evidenciara, en los casos en los que sea posible, el tipo de patrón de transmisión hereditaria. Después se obtendrá con ayuda de aguja y jeringa una muestra de sangre de 10 ml tanto del paciente como de sus padres.

De la sangre obtenida se obtendrán células mononucleares de sangre periférica (apéndice 1). Se obtendrá ARN y ADN genómico (apéndice 2,3), se sintetizará cADN a partir del ARN (apéndice 4). Se realizará la amplificación de los genes candidatos por PCR en cADN, los productos de PCR se harán correr en geles de agarosa; la banda se cortará y purificará (apéndice 5,6). El orden de la amplificación de los genes blanco será de acuerdo al patrón de herencia sugerido por árbol genealógico. Se realizará secuenciación automatizada directa de los fragmentos obtenidos por PCR y RT-PCR. Se comparará con la secuencia de referencia con el fin de buscar mutaciones patogénicas (Los números OMIM para A22, A67, A47, son #233690, #233710, #233700 respectivamente; *CYBB* con número OMIM#306400).

Una vez localizada la mutación en cDNA se procederá a localizar la mutación en ADN genómico. Esto, con la finalidad de corroborar la existencia de la mutación, ya que el ADNc es un producto sintético, y un cambio encontrado en él podría tratarse de un error de la transcriptasa reversa o de la polimerasa Taq, durante el proceso de RT-PCR. En el caso de algunas mutaciones, como aquellas que afectan los sitios de splicing, o las que se encuentran en regiones no codificantes (promotor, intrones, 3'UTR), la única manera de identificar la mutación es en el ADN genómico, mientras que en el ADN complementario sólo es posible verificar el resultado, en una transcripción anómala ("salteo" o *skipping* de uno o varios exones, por ejemplo). Por esta misma razón, en los casos en que no se encuentre una mutación en el cDNA del gen candidato, a pesar de una sospecha fundada, conviene amplificar y secuenciar los exones con las regiones intrónicas o promotoras en el ADN genómico.

Las mutaciones que se identifiquen en los pacientes, se buscarán en el padre y en la madre. En el caso del gen *CYBB* se determinará si son *de novo* o no, a través del estudio molecular en ADN genómico de la madre. Además todas las mutaciones que describamos se cotejarán con la ya reportadas en las diferentes bases de datos mencionadas previamente.

### **Análisis estadístico.**

En el caso de las variables cualitativas se buscara las frecuencias simples de las variables: sexo, mutación. En el caso de nuestra variable cuantitativa: edad, Se verá su distribución: media, moda, desviación estándar.

### **Tamaño de la muestra.**

Por la naturaleza del estudio el tamaño de la muestra será a conveniencia ya que se incluirán a todos los pacientes diagnosticados con EGC que han sido tratados en el INP en la Unidad de Investigación en Inmunodeficiencias.

### **Ética.**

#### *Consideraciones Éticas*

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, (Titulo 2°, Capítulo III de la Investigación en menores de edad o incapaces, Artículos 34 – 39). Además de que todos los procedimientos se regirán por la Declaración de Helsinki de la WMA y de acuerdo con las Buenas Prácticas Clínicas de la ICH.

### **IX.- Actividades realizadas para el trabajo.**

Realización de DHR, subunidades de la NADPH, extracción y secuenciación de ADN, asesoramiento genético y realización de árbol familiar.

### **X.- Objetivos y metas alcanzadas.**

El objetivo general aun no se cumple debido a que estamos en la espera de la secuenciación de ADN de cada uno de los pacientes.

De los objetivos específicos, el primer objetivo: se encontró la subunidad afectada y gracias a esto sabemos que gen es el que se encuentra afectado; nuestro segundo objetivo se observo que ninguno de los pacientes con deficiencia de Gp91<sup>phox</sup> fueron de novo. El gen más afectado en nuestra población es *CYBB*. A

cada una de las familias a las cuales se les realizó el diagnóstico se les brindó asesoramiento genético.

### **XI.- Resultados y conclusiones.**

En el periodo de febrero 2019 a enero 2020 se estudiaron a 116 personas de las cuales 18 se les realizó diagnóstico de EGC, del 100% de los pacientes con EGC diagnosticados en este periodo el 50% fueron con herencia ligada al X y el otro 50% de herencia autosómico recesivo, con deficiencia de p47<sup>phox</sup> fueron 27.8% con deficiencia de p22<sup>phox</sup> fueron 5.6% ,con deficiencia de p67<sup>phox</sup> fueron 5.6% y con deficiencia de p40<sup>phox</sup> fueron 11%.

Se observó que ninguno de los pacientes con deficiencia de gp91<sup>phox</sup> fueron de novo. El gen más afectado en nuestra población es *CYBB*. Y a cada una de las familias a las cuales se les realizó el diagnóstico se les brindó asesoramiento genético.

### **XII.- Recomendaciones.**

Este protocolo debe continuar porque aun faltan resultados como la secuenciación de cada uno de los pacientes, además al extenderlo se podrá contar con estadísticas de esta enfermedad y probablemente correlación clínica con esta enfermedad.

## **XII.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:**

1. Rosenzweig SD. Inflammatory manifestations in chronic granulomatous disease (CGD). *J Clin Immunol* 2008;28 Suppl 1:S67-S72.
2. Holland SM. Chronic granulomatous disease. *Clin Rev Allergy Immunol* 2010;38(1):3-10.
3. 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.
4. 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.
5. Lublin M, Bartlett DL, Danforth DN et al. Hepatic abscess in patients with chronic granulomatous disease. *Ann Surg* 2002;235(3):383-391.
6. Dorman SE, Guide SV, Conville PS et al. Nocardia infection in chronic granulomatous disease. *Clin Infect Dis* 2002;35(4):390-394.
7. Segal BH, DeCarlo ES, Kwon-Chung KJ, Malech HL, Gallin JI, Holland SM. *Aspergillus nidulans* infection in chronic granulomatous disease. *Medicine (Baltimore)* 1998;77(5):345-354.
8. Greenberg DE, Ding L, Zelazny AM et al. A novel bacterium associated with lymphadenitis in a patient with chronic granulomatous disease. *PLoS Pathog* 2006;2(4):e28.
9. 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.

10. Schappi MG, Jaquet V, Belli DC, Krause KH. Hyperinflammation in chronic granulomatous disease and anti-inflammatory role of the phagocyte NADPH oxidase. *Semin Immunopathol* 2008;30(3):255-271.
11. Stasia MJ, Li XJ. Genetics and immunopathology of chronic granulomatous disease. *Semin Immunopathol* 2008;30(3):209-235.
12. Wolach B, Ash S, Gavrieli R, Stark B, Yaniv I, Roos D. Acute lymphoblastic leukemia in a patient with chronic granulomatous disease and a novel mutation in CYBB: first report. *Am J Hematol* 2005;80(1):50-54.
13. Rosenzweig SD, Holland SM. Phagocyte immunodeficiencies and their infections. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113(4):620-626.
14. Kannengiesser C, Gerard B, El BJ et al. Molecular epidemiology of chronic granulomatous disease in a series of 80 kindreds: identification of 31 novel mutations. *Hum Mutat* 2008;29(9):E132-E149.
15. van den Berg JM, van KE, Ahlin A et al. Chronic granulomatous disease: the European experience. *PLoS One* 2009;4(4):e5234.
16. 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.
17. 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.
18. Kobayashi S, Murayama S, Takanashi S et al. Clinical features and prognoses of 23 patients with chronic granulomatous disease followed for 21 years by a single hospital in Japan. *Eur J Pediatr* 2008;167(12):1389-1394.

19. Staines Boone Tamara. Descripción del cuadro clínico y defecto molecular de pacientes con Enfermedad Granulomatosa Crónica en el Instituto Nacional de Pediatría. UNAM; 2005.
20. Roos D, Kuhns DB, Maddalena A et al. Hematologically important mutations: the autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease (second update). *Blood Cells Mol Dis* 2010;44(4):291-299.
21. Martire B, Rondelli R, Soresina A et al. Clinical features, long-term follow-up and outcome of a large cohort of patients with Chronic Granulomatous Disease: an Italian multicenter study. *Clin Immunol* 2008;126(2):155-164.
22. 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.
23. El KR, Barbouche MR, Elloumi-Zghal H et al. Genetic and mutational heterogeneity of autosomal recessive chronic granulomatous disease in Tunisia. *J Hum Genet* 2006;51(10):887-895.
24. Teimourian S, de BM, Roos D. Molecular Basis of Autosomal Recessive Chronic Granulomatous Disease in Iran. *J Clin Immunol* 2010.
25. Roos D, Kuhns DB, Maddalena A et al. Hematologically important mutations: X-linked chronic granulomatous disease (third update). *Blood Cells Mol Dis* 2010.
26. Meier B, Cross AR, Hancock JT, Kaup FJ, Jones OT. Identification of a superoxide-generating NADPH oxidase system in human fibroblasts. *Biochem J* 1991;275 ( Pt 1):241-245.
27. Jackson SH, Devadas S, Kwon J, Pinto LA, Williams MS. T cells express a phagocyte-type NADPH oxidase that is activated after T cell receptor stimulation. *Nat Immunol* 2004;5(8):818-827.



28. Matute JD, Arias AA, Wright NA et al. A new genetic subgroup of chronic granulomatous disease with autosomal recessive mutations in p40 phox and selective defects in neutrophil NADPH oxidase activity. *Blood* 2009;114(15):3309-3315.
29. Jones OTG, Wood JD. Oxidant Production by Human B Lymphocytes: Detection of Activity and Identification of Components Involved. *Methods* 1996;9(3):619-627.
30. Koker MY, van LK, de BM et al. Six different CYBA mutations including three novel mutations in ten families from Turkey, resulting in autosomal recessive chronic granulomatous disease. *Eur J Clin Invest* 2009;39(4):311-319.
31. Agudelo-Florez P, Prando-Andrade CC, Lopez JA et al. Chronic granulomatous disease in Latin American patients: clinical spectrum and molecular genetics. *Pediatr Blood Cancer* 2006;46(2):243-252.
32. Soler-Palacin P, Margareto C, Llobet P et al. Chronic granulomatous disease in pediatric patients: 25 years of experience. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2007;35(3):83-89.
33. The French national registry of primary immunodeficiency diseases. *Clin Immunol* 2010;135(2):264-272.
34. Chollet-Martin S, Lopez A, Gaud C et al. Severe X-linked chronic granulomatous disease in two unrelated females. *Eur J Pediatr* 2007;166(2):153-159.
35. Weening RS, de BM, Kuijpers TW, Neefjes VM, Hack WW, Roos D. Point mutations in the promoter region of the CYBB gene leading to mild chronic granulomatous disease. *Clin Exp Immunol* 2000;122(3):410-417.

36. Teimourian S, Rezvani Z, Badalzadeh M et al. Molecular diagnosis of X-linked chronic granulomatous disease in Iran. *Int J Hematol* 2008;87(4):398-404.
37. Di MG, Giordani L, Finocchi A et al. Molecular characterization of a large cohort of patients with Chronic Granulomatous Disease and identification of novel CYBB mutations: an Italian multicenter study. *Mol Immunol* 2009;46(10):1935-1941.
38. Roos D, de BM, Koker MY et al. Chronic granulomatous disease caused by mutations other than the common GT deletion in NCF1, the gene encoding the p47phox component of the phagocyte NADPH oxidase. *Hum Mutat* 2006;27(12):1218-1229.
39. Nunoi H, Iwata M, Tatsuzawa S et al. AG dinucleotide insertion in a patient with chronic granulomatous disease lacking cytosolic 67-kD protein. *Blood* 1995;86(1):329-333.
40. Koker MY, Sanal O, van LK et al. Four different NCF2 mutations in six families from Turkey and an overview of NCF2 gene mutations. *Eur J Clin Invest* 2009;39(10):942-951.
41. Matute JD, Arias AA, Dinauer MC, Patino PJ. p40phox: the last NADPH oxidase subunit. *Blood Cells Mol Dis* 2005;35(2):291-302.
42. Tarazona-Santos E, Bernig T, Burdett L et al. CYBB, an NADPH-oxidase gene: restricted diversity in humans and evidence for differential long-term purifying selection on transmembrane and cytosolic domains. *Hum Mutat* 2008;29(5):623-632.
43. Olsson LM, Lindqvist AK, Kallberg H et al. A case-control study of rheumatoid arthritis identifies an associated single nucleotide polymorphism in the NCF4 gene, supporting a role for the NADPH-oxidase complex in autoimmunity. *Arthritis Res Ther* 2007;9(5):R98.

44. Goliash G, Wiesbauer F, Grafl A et al. The effect of p22-PHOX (CYBA) polymorphisms on premature coronary artery disease ( $\leq 40$  years of age). *Thromb Haemost* 2010;105(3).

**Apéndice 0**

VARIABLE	DEFINICION	CATEGORIA	UNIDAD DE MEDICION
<b>Edad</b>	Tiempo transcurrido a partir del nacimiento de un individuo.	Cuantitativa discreta	Meses
<b>Sexo</b>	Condición orgánica que distingue a un varón de una mujer. Conjunto de individuos que tienen un mismo sexo (femenino o masculino)	Cualitativa Nominal dicotómica	Femenino / Masculino

<b>Mutación</b>	Cambio fijo y heredable en la secuencia nucleotídica de ADN de un cromosoma	Cualitativa nominal	1) Presente 2) Ausente
<b>Mutación en <i>CYBB</i></b>	Cambio en la secuencia de nucleótidos en el gen de <i>CYBB</i>	Cualitativa nominal	1) Presente 2) Ausente
<b>Mutación en <i>CYBA</i></b>	Cambio en la secuencia de nucleótidos en el gen de <i>CYBA</i>	Cualitativa nominal	1) Presente 2) Ausente
<b>Mutación en <i>NCF1</i></b>	Cambio en la secuencia de nucleótidos en el gen de <i>NCF1</i>	Cualitativa nominal	1) Ausente 2) Presente
<b>Mutación en <i>NCF2</i></b>	Cambio en la secuencia de nucleótidos en el gen de <i>NCF2</i>	Cualitativa nominal	1) Presente 2) Ausente
<b>Mutación en <i>NCF4</i></b>	Cambio en la secuencia de nucleótidos en el gen de <i>NCF4</i>	Cualitativa nominal	1) Ausente 2) Presente
<b>Mutación de sentido</b>	Cambio de base que condiciona el cambio de aminoácidos	Cualitativa nominal	1) Presente 2) Ausente

<b>erróneo</b>	codificado por el triplete		
<b>Mutación sin sentido</b>	Aparece un triplete de terminación o FIN: CAG(gln)→UAG(FIN)	Cualitativa nominal	1) Presente 2) Ausente
<b>Delección</b>	Pérdida de uno o más nucleótidos en una secuencia de gen	Cualitativa nominal	1) Presente 2) Ausente
<b>Inserción</b>	Dentro de la secuencia del ADN se introducen nucleótidos adicionales.	Cualitativa nominal	1) Presente 2) Ausente
<b>Mutación en sitios de corte y empalme</b>	Mutaciones que interfieren con el splicing del ARN mensajero.	Cualitativa nominal	1) Presente 2) Ausente
<b>Por sustitución de bases</b>	Se producen al cambiar en una posición un par de bases por otro	Cualitativa nominal	1) Presente 2) Ausente

## ***Apéndice 1***

### **OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA**

Procedimiento: Las células se aíslan mediante centrifugación en un gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque, de la siguiente manera.

- Obtener 10 ml. de sangre periférica con una jeringa (previa obtención del consentimiento).
- Se vierte la sangre en un tubo Falcon que contenga 150 microlitros de EDTA.
- Se agrega PBS 1X por las paredes del tubo (para nivelar el pH)
- En un tubo Falcon de 15 ml. con Ficoll-Paque se vierte la mezcla previa (sangre total + PBS 1X) con cuidado por las paredes del tubo.
- Se centrifuga a 2000rpm, 20 minutos, a 17°C
- Se observa un anillo de células mononucleares (color grisáceo) y se toman con cuidado con una pipeta Pasteur y se colocan en un tubo Falcon de 15ml.
- Posteriormente se agrega PBS 1X EN ABUNDANCIA
- Centrifugar a 2000rpm por 5 min a 17°C SIN BRAKE (Primer lavado). Se observa una pastilla de células en el fondo del tubo y el PBS en fase acuosa.
- Se decanta el líquido de un solo golpe y se pone 5ml de PBS 1X y se resuspende la pastilla (SEGUNDO LAVADO)
- Se centrifuga bajo las mismas condiciones.
- Se vuelve a decantar y se resuspenden las células en 1 ml de PBS 1X.
- Se pasa a un tubo Eppendorf por las paredes del tubo (SI NO, LAS CÉLULAS SE PUEDEN ROMPER)

- Finalmente, se cuentan las células en una cámara de Neubauer. (□ 2 microlitros de Azul Triptano x 8 de muestra.) a través de un microscopio óptico.

## ***Apéndice 2***

### **EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO**

Extraer 3 ml de sangre periférica y colocarlos en tubo de 13 x 100 con EDTA al 10%. Posteriormente se transfiere la sangre a tubos de Falcon de 10 ml y se adicionan 3 ml de TTS (tris-tritón-sacarosa)

2. Se centrifuga a 3000 r.p.m. durante 10 min.
3. Se decanta el sobrenadante a un vaso con color (desechar). Este es un punto muy importante puesto que en el fondo queda un botón espeso que no se debe perder al decantar.
4. Agregar al botón 1ml de TTS y transferirlo a un tubo Eppendorf de 1.5 ml, homogeneizar fuerte (con la mano o con un vortex con disco agitador para tubos Eppendorf) hasta disolver el botón y centrifugar a 12 000 r. p. m. Durante dos minutos a 4°C.
5. Decantar el sobrenadante y agregar 1 ml más de TTS y otra vez disolver el botón y centrifugar otros dos minutos a 4°C . (Este paso se tiene que repetir hasta que se obtenga un botón blanco y también el sobrenadante).
6. Una vez que se haya decantado el sobrenadante blanco y da un botón blanquecino se agregan 570 µl de NaCl 5mM y homogeneizar dos minutos (aquí no se decanta) + 30 µl de SDS al 10% y homogeneizar diez minutos + 200µl de NaCl saturado y homogeneizar 15 minutos.
7. Una vez que se haya realizado esta mezcla se centrifuga a 12, 000 r.p.m durante 25 minutos a 4°C. Mientras transcurre este tiempo se puede ir preparando tubos estériles de 13x100 con 2 ml (se puede utilizar tubos Falcon estériles) de etanol absoluto frío, para que una vez que terminen los 25 minutos se vierta el sobrenadante en el etanol absoluto, una vez que esto se haya hecho mezclar

suavemente el tubo que contiene el etanol absoluto y el sobrenadante de lo que se centrifugo y se va a observar la hebra blanquecina de DNA (si aquí no se observa ninguna hebra entonces se perdieron los leucocitos en el primer paso).

8. Después se almacena el tubo que contiene el etanol + el DNA a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por toda la noche.

9. Al día siguiente con una pipeta de  $1000\text{ }\mu\text{l}$  se elimina el etanol en el que estuvo el DNA toda la noche y se agregan otros dos ml de etanol al 70%

10. Después se centrifuga a  $9000\text{ r.p.m}$  durante 10 minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

11. Eliminar el sobrenadante y el tubo Eppendorf con el botón blanco que queda se coloca en un desecador a vacío durante 15 minutos a temperatura ambiente.

12. Finalmente ya que esté perfectamente deshidratado al DNA se agregan de 300 a  $400\text{ }\mu\text{l}$  de agua bidestilada desionizada estéril.



### ***Apéndice 3***

#### **EXTRACCION DE ARN**

Homogenización de la suspensión celular

- Colocar un 1 ml de suspensión celular en un tubo de 1.5 ml de microcentrifugilibre de ARN.
- Centrifugar durante 1 mn para formar un botón.
- Decantar el sobrenadante.
- Agregar un ml de TRizol al tubo.
- Lisar las células pipeteando varias veces.
- Centrifugar a 12000 x g durante 10 minutos a 4 °C.
- Transferir el sobrenadante a un tubo estéril de microcentrifuga.

Fase de separación

- Incubar la muestra por 5 minutos a temperatura ambiente.
- Adicionar 0.2 ml de cloroformo al tubo, agitar vigorosamente la muestra durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar durante 10 minutos a 12000 x g a 4 °C. El ARN formara un botón en el fondo del tubo.

Precipitación de ARN

- Transferir la fase acuosa superior a un tubo
- Agregar alcohol isopropilo para precipitar el RNA para precipitar el ARN.
- Incubar 5-10 minutos a temperatura ambiente
- Centrifugar durante 10 minutos a 12000 x g a 4°C. El ARN formara un botón en el fondo del tubo.

#### Lavado de ARN

- Desechar el sobrenadante
- Lavar el botón con 1 ml de etanol al 75%
- Mezclar la muestra con vortex. El botón de ARN debe flotar
- Centrifugar a 12000 x g 5 minutos a 4°C
- Eliminar etanol, resuspender el botón de ARNt en agua MilliQ
- El ARN debe ser almacenado a -70°C

## **Apéndice 4**

### **Síntesis de cADN**

- La síntesis de DNA complementario se realizará utilizando 1  $\mu$ l RNA total realizando una mezcla de reacción con un volumen final de 20  $\mu$ l:

Oligo (dT) 1 $\mu$ l

dNTPs (10mM) 1 $\mu$ l

RNA 1 $\mu$ l

Agua inyectable c.b.p. 13 $\mu$ l

- Los tubos de reacción se colocarán en el termo ciclador durante 5 minutos y posteriormente se pondrán en hielo para permitir el alineamiento del oligo (dT) con el molde, posteriormente se adicionarán los siguientes reactivos:

Regulador de reacción 5x 4 $\mu$ l

DTT 0.1M 2 $\mu$ l

- Las muestras se introducirán nuevamente al termo ciclador a 42°C durante 2 minutos para adicionar finalmente 200 unidades de transcriptasa reversa. Finalmente las muestras se someterán a un ciclo de 42°C durante 50 minutos y un ciclo de 72°C por 15 minutos más.

## Apéndice 5

### PCR amplificación de genes *CYBB*, *CYBA*, *NCF1*, *NCF2*, *NCF4a* partir de cDNA

- Se diseñaran los diferentes primers para cada uno de los genes involucrados en la EGC (*CYBB*, *CYBA*, *NCF1*, *NCF2*, *NCF4*)
- La amplificación de los diferentes genes se llevará a cabo a partir de las muestras de cDNA, para esto, emplearemos la siguiente mezcla de reacción con un volumen final de 50  $\mu$ l (Invitrogen):

Regulador de reacción 10x		5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> 50mM	1.5 $\mu$ l	
dNTPs 10mM	1 $\mu$ l	
Iniciador 5' 10pmoles/ $\mu$ l	3 $\mu$ l	
Iniciador 3' 10pmoles/ $\mu$ l	3 $\mu$ l	
Taq DNA polimerasa 5U/ $\mu$ l		0.4 $\mu$ l
cDNA molde	2-4 $\mu$ l	
Agua inyectable c.b.p.		50 $\mu$ l

- Las condiciones de la reacción serán las siguientes:

1 ciclo	95°C	5 minutos
35 ciclos	95°C	30 segundos
	Tm	30 segundos
	72°C	1 minuto por cada 1000pb
1 Ciclo	72°C	8 minutos



## ***Apéndice 6***

### **ELECTROFORESIS DE LOS PRODUCTOS DE PCR EN GELES DE AGAROSA**

Los productos de PCR se prepararán con regulador de carga para DNA y se utilizarán 5 µl de cada muestra para correr electroforesis en geles de agarosa al 1% preparados en TAE 1x (Tris-ácido acético-EDTA) y conteniendo de 0.1 a 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. La electroforesis se realizará a 100V durante 45 minutos, para finalmente visualizar los productos amplificados en un transiluminador de luz ultravioleta (Kodak). El tamaño de los amplificados obtenidos se determinará por medio del uso de un marcador de DNA de 50-100 pb (Fermentas).

La banda se cortara y se purificará con el kit Quick de Qiagen de acuerdo a las instrucciones del fabricante para la purificación de los productos de PCR. La muestra purificada se enviara a secuenciar de forma automatizada.