



---

---

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
SECRETARIA DE SALUD  
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

***“Descripción de infecciones erradicadas por el sistema inmune humoral en una cohorte de pacientes con perfil de células B con Enfermedad Granulomatosa Crónica”***

TESIS  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**ESPECIALISTA EN  
ALERGIA E INMUNOLOGÍA CLÍNICA PEDIÁTRICA**

PRESENTA:

**DRA. ROSELLA DIANIREZ LEE NG**



TUTORES:  
**DRA LIZBETH BLANCAS GALICIA  
DRA SARA ESPINOSA PADILLA**

CIUDAD DE MÉXICO, ENERO DE 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



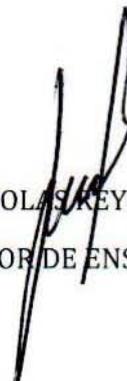
**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**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.

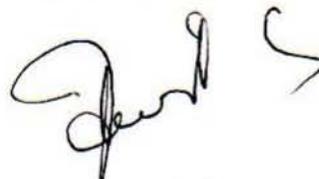
**“Descripción de infecciones erradicadas por el sistema inmune humoral en una cohorte de pacientes con perfil de células B con Enfermedad Granulomatosa Crónica”**



DR JOSÉ NICOLÁS KEYNES MANZUR  
DIRECTOR DE ENSEÑANZA



DR. MANUEL ENRIQUE FLORES LANDERO  
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PRE Y POSGRADO



DR. JOSÉ GUADALUPE HUERTA LÓPEZ  
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE ALERGIA E INMUNOLOGÍA CLÍNICA PEDIÁTRICA



DRA LIZBETH BLANCAS GALICIA  
TUTOR DE TESIS



DRA. SARA ELVA ESPINOSA PADILLA  
CO- TUTOR DE TESIS

# INDICE

1. RESUMEN	1
2. Marco Teórico y Antecedentes.	2
2.1 Introducción	2
2.2 Genes y Tipos de Mutaciones	3
2.3 Patrones de Herencia.	3
2.4 Incidencia	4
2.5 Enfermedad Granulomatosa Crónica y Células B.	6
3. Planteamiento del Problema.	7
4. Justificación.	8
5. Objetivos.	10
5.1 Objetivo General.	10
5.2 Objetivos Específicos.	10
6. Material y Métodos.	10
7. Variables.	11
8. Análisis Estadístico.	12
9. Discusión	13
10. Conclusión	15
11. Anexo	16
12. Bibliografía.	18
13. Cronograma de Actividades.	21

## RESUMEN

La enfermedad granulomatosa crónica (EGC) es una inmunodeficiencia primaria que presenta su defecto en el proceso de fagocitosis. Debido a un defecto a nivel celular en la NADPH oxidasa, la enzima que cataliza la producción de superóxido, las células fagocíticas no son capaces de generar superóxido. El superóxido es una sustancia tóxica en el sistema de estallido respiratorio y juegan un papel importante en la destrucción de los invasores extraños ya que evita que se reproduzcan en el cuerpo y causen enfermedades.

Debido a que las células fagocíticas (i.e neutrófilos y macrófagos) son incapaces de generar el superóxido, estas tienen problemas para destruir los microorganismos que son catalasa positivos. La catalasa es producida por bacterias que metabolizan  $H_2O_2$  y lo vuelven inocuo, de esta manera protegen de los productos generados durante el estallido respiratorio. Sin embargo, los microorganismos que no cuentan con esa enzima producen de manera natural el  $H_2O_2$  y el estallido respiratorio termina su proceso y crea HOCl.

Clínicamente la EGC se presenta mediante infecciones recurrentes ya sea por bacterias y hongos, generando una inflamación no regulada. Esto se debe a que las células fagocíticas son incapaces de generar superóxido u otras especies reactivas de oxígeno y como respuesta las células fagocíticas crean fagosomas intracelulares con los microorganismos no destruidos y esto estimula la formación de granulomas.

La EGC se caracteriza por afectar directamente la inmunidad innata, aunque también se ha encontrado que puede afectar a la inmunidad adaptativa. Se han realizado estudios que muestran que los pacientes con EGC poseen una disminución de células B de memoria, como las células CD27 que expresan los linfocitos B activados. Las causas de esto son aún desconocidas. A la fecha, no existen estudios en la población mexicana que describan si los pacientes con EGC tienen aumento en la susceptibilidad a bacterias encapsuladas.

Realizamos un estudio descriptivo con el propósito de evaluar si existe un aumento de infecciones en pacientes con EGC por bacterias encapsuladas. En nuestra cohorte de pacientes, solo 4 pacientes presentaron infección a estas bacterias. Igualmente, evaluamos que sistemas son los más afectados en nuestra cohorte de pacientes mexicanos y pudimos observar que la mayoría presentó infecciones en los sistemas respiratorio, gastrointestinal y genitourinario, estos síntomas también son reportados con mayor frecuencia en pacientes con EGC en otros países.

Basándonos en los resultados de este estudio descriptivo, nos hace pensar que los pacientes con EGC no presentan susceptibilidad a bacterias encapsuladas.

## MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

### INTRODUCCIÓN

La enfermedad granulomatosa crónica (EGC) es una inmunodeficiencia primaria (IDP) de la fagocitosis. EGC incluyen a un grupo de enfermedades de carácter hereditario que cursan con alteraciones del mecanismo de destrucción (muerte celular) de microorganismos.<sup>1-4</sup>

La ECG es una inmunodeficiencia primaria y presenta su defecto en la fagocitosis. Los macrófagos no son capaces de generar superóxido y esto representa un defecto en su función.<sup>5</sup>

El defecto a nivel celular está en la fosfato-oxidasanicotinamida-adenina-dinucleótido (NADPH) oxidasa, enzima que cataliza la producción de superóxido. El superóxido se utiliza para generar otras sustancias tóxicas, que juegan un papel en matar a los invasores extraños y evitar que se reproduzcan en el cuerpo y causen enfermedades. Estas células desempeñan un papel importante en la respuesta inflamatoria para la destrucción del patógeno que invade el cuerpo y evita lesiones en el mismo.<sup>6</sup>

Debido a que las células fagocíticas son incapaces de generar superóxido u otras especies reactivas de oxígeno, dentro los fagosomas intracelulares con los microorganismos no destruidos se estimula la formación de granulomas.<sup>7</sup>

Cuando ese paso en el sistema de estallido respiratorio es disfuncional, las células fagocíticas (i.e neutrófilos y macrófagos) son incapaces de destruir a microorganismos catalasa positivos. La catalasa es producida por bacterias que metabolizan  $H_2O_2$  y lo vuelven inocuo, de esta manera protegen de los productos generados durante el estallido respiratorio. Sin embargo, los microorganismos que no cuentan con esa enzima producen de manera natural el  $H_2O_2$  y el estallido respiratorio termina su proceso y crea HOCl.<sup>6</sup>

Los gérmenes que con frecuencia se han aislado en las infecciones asociadas EGC son: *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Salmonella* spp, *Serratia* spp., *Nocardia*, *Mycobacterium* spp, *aspergillus* spp, *burkholderia cepacia*.<sup>6,8</sup> No se ha reportado susceptibilidad a bacterias encapsuladas.<sup>9,10</sup>

La superficie bacteriana contiene varias estructuras que activan la respuesta inmune con el propósito de destruir la bacteria. Algunas bacterias poseen cápsulas compuestas de polisacáridos que

enmascaran las estructuras de la superficie celular para que no se active el sistema inmunológico; de esta manera, estas bacterias pueden su destrucción y causar una infección en el huésped. <sup>9</sup>

## GENES Y TIPOS DE MUTACIONES

La EGC es causada por mutaciones en cualquiera de los genes que codifican para las subunidades que conforman la enzima NADPH oxidasa, la glicoproteína gp91phox y las proteínas p22phox, p47phox, p67phox, p40phox y p21rac. <sup>3,6</sup> Los tipos de mutaciones que han sido descritas son deleciones grandes y pequeñas (11%), cambios de marco (24%), mutaciones sin sentido (23%), mutaciones en la región de empalme (17%) y mutaciones en la región reguladora. (2%). <sup>11</sup>

Existen mutaciones en 5 genes CYBA, CYBB, NCF1, NCF2 o NCF4 que pueden causar dan como resultado la producción de proteínas con poca o ninguna función. Estas proteínas producidas a partir de los genes afectados son partes (subunidades) que forman parte del complejo enzimático llamado NADPH oxidasa, y desempeña un papel esencial en el sistema inmunológico. <sup>4,11,12</sup>

Existe un estudios recientes que han descrito la función de una nueva proteína de transmembrana, EROS, y la falta de la misma. Las mutaciones en CYBC1/EROS se describieron como una inmunodeficiencia por la falta de la proteína EROS la cual tiene se piensa que tiene un rol importante en la respuesta inmune. <sup>13</sup>

Si alguna de las subunidades de la NADPH oxidasa no puede ensamblarse o funcionan correctamente resultan en que los macrófagos no pueden matar invasores extraños y la actividad de los neutrófilos no está regulada. La falta de NADPH oxidasa deja vulnerable a los pacientes a muchos tipos de infección e inflamación excesiva. <sup>1,4,11,12</sup>

## PATRONES DE HERENCIA

Cuando la enfermedad granulomatosa crónica es causada por mutaciones en el gen CYBB, la condición se hereda en un patrón recesivo ligado al X. El gen CYBB se encuentra en el cromosoma X, que es uno de los dos cromosomas sexuales. En los hombres (que tienen solo un cromosoma X), una copia alterada del gen en cada célula es suficiente para causar la EGC. En las mujeres (que tienen dos cromosomas X), una mutación tendría que ocurrir en ambas copias del gen para causar el trastorno. Debido a que es poco probable que las mujeres tengan dos copias alteradas de este gen, los hombres se ven afectados por los trastornos recesivos ligados al X con mucha más frecuencia que las mujeres. Una característica de la herencia ligada a X es que los padres no pueden pasar los rasgos ligados a X a sus hijos. En raras ocasiones, las mujeres con una copia alterada del gen CYBB mutado tienen

síntomas leves de enfermedad granulomatosa crónica, como una menor frecuencia de infecciones bacterianas o por hongos.<sup>11,14</sup>

Cuando la enfermedad granulomatosa crónica es causada por mutaciones en los genes CYBA, NCF1, NCF2 o NCF4, la condición se hereda en un patrón autosómico recesivo, lo que significa que ambas copias del gen en cada célula tienen mutaciones. Los padres de un individuo con una condición autosómica recesiva lleva cada uno una copia del gen mutado, pero por lo general no muestran signos y síntomas de la condición. Los hombres y las mujeres se ven afectados por igual en la herencia autosómicas recesivas.<sup>11,14</sup>

## INCIDENCIA

La EGC tiene una incidencia mundial de 1 por cada 250 000 recién nacidos vivos.<sup>3</sup> Más del 60 % de los enfermos presenta una herencia recesiva ligada al X; entre el 30% y el 40% la heredan de forma autosómica recesiva; y en el 10 % existen nuevas mutaciones que se generan en la célula germinal durante la embriogénesis.<sup>1,3,4,15</sup> La Sociedad Latinoamericana de Inmunodeficiencias (LASID) estudió una cohorte de 71 pacientes de cinco países de Latinoamérica, incluido México. La EGC ligada al X estuvo representada con mayor frecuencia (75%), seguida de defectos en p47phox (23%). Lugo S. et al., describió una cohorte de 161 pacientes con inmunodeficiencias primarias, entre ellos 27 pacientes con EGC.<sup>16</sup>

Las primeras manifestaciones clínicas de la EGC pueden aparecer desde la etapa de lactante hasta la edad adulta. Aunque, La mayoría de los se casos presentan en la infancia. Los pacientes son susceptibles a infecciones recurrentes graves causadas por bacterias, hongos y micobacterias. Además, hay formación de granulomas en cualquier parte del organismo. Los pacientes suelen tener supuraciones prolongadas a nivel cutáneo y ganglionar, con resolución lenta y cicatrices residuales.<sup>1,3,15,17</sup>

Las lesiones de la enfermedad granulomatosa crónica muestran una mezcla de inflamación granulomatosa crónica, necrosis y supuración; los órganos afectados con mayor frecuencia son: ganglios linfáticos, piel, pulmones, hígado, aparato digestivo y otros; las lesiones pueden ser grandes y numerosas, lo cual puede ocasionar efecto de masa e incluso obstrucción con la consecuente disfunción de los órganos afectados.<sup>1,18</sup>

El desarrollo de las células B abarca una serie de etapas que comienzan en el tejido linfoide primario (médula fetal), con una posterior maduración funcional en el tejido linfoide secundario (Ganglios

linfáticos y Bazo). El punto final funcional es la producción de anticuerpos por células plasmáticas y células B de memoria.<sup>19-21</sup>

Las células etapas de desarrollo de células B son: (1) Células pro-B: sin expresión de CL (cadenas ligeras) o CP,(cadenas pesadas) (2) célula pre-B: CP (citoplásmica), pero sin expresión de CL, (3) Célula B: expresión de CP y CL. Se pueden distinguir etapas sucesivas del desarrollo de células B por la expresión correlacionada de varios marcadores de superficie celular.<sup>21,22</sup>

Durante el desarrollo de la célula B este tiene que pasar por varios procesos como: (1) Reordenamientos Genéticos Ordenados, (2) Exclusión Alélica y (3) Tolerancia de Células B.<sup>22</sup>

Las células B auto-reactivas se eliminan o inactivan durante su desarrollo. La mayoría de las respuestas de las células B dependen de la ayuda de las células T, por lo que la tolerancia de las células T ayuda a asegurar que no se generen anticuerpos contra uno mismo. La hipermutación somática puede potencialmente generar nuevas especificidades de autoactividad después de que las células B encuentren antígeno.<sup>22</sup>

Las bacterias encapsuladas contienen una capsula compuesta de polisacáridos que las protege de un ataque directo de los macrófagos. El cuerpo responde ante esta infección mediante la secreción de anticuerpos IgG utilizando el sistema de inmunidad adaptativo humoral. La IgG se pega a la superficie de la membrana de la bacteria (opsonización) lo cual ayuda a los macrófagos para destruir estas bacterias.<sup>23,24</sup>

Los macrófagos son células inmunes especializadas en la eliminación de sustancias extracelulares degradadas a través de la fagocitosis. Una citoquina importante producida por los macrófagos es el TNF- $\alpha$ , que induce la vasodilatación y facilita la infiltración de monocitos y linfocitos. Los macrófagos también liberan otras citoquinas proinflamatorias tales como IL-1, IL-6, IL-12 e IL-23. Junto con el TNF- $\alpha$ , estas citoquinas promueven la infiltración de leucocitos y la activación de las células T, al mismo tiempo inhiben las células T reguladoras (Treg) y la apoptosis de las células T. Estos macrófagos activados son importantes en la inflamación mediada por células que se observa en los granulomas, pero también inducen daño al tejido.<sup>24</sup>

El enfoque principal en la inflamación granulomatosa se ha dirigido previamente a la disfunción de macrófagos y células T. Sin embargo, además de los macrófagos y las células T, los infiltrados de células B están presentes en el tejido granulomatoso.<sup>24</sup>

Las células B probablemente son esenciales para el desarrollo de granulomas, como lo indican dos hallazgos: primero, los pacientes con Inmunodeficiencia común variable (ICV) pueden desarrollar granulomas, mientras que los pacientes con agammaglobulinemia ligada al X no lo hacen. ICV y los pacientes con agammaglobulinemia ligada tienen una deficiencia de anticuerpos debido a la disfunción de las células B, pero las células B maduras están completamente ausentes en la agammaglobulinemia ligada al X. En segundo lugar, en un modelo de granulomas en ratones, la ausencia de células T no afectó la capacidad de formación de granulomas, mientras que los granulomas no se formaron en ausencia de células B. <sup>24</sup>

Otro estudio hecho en humanos ha sugerido que la disminución en las células B de memoria es el resultado de una generación dañada de, por ejemplo, la zona marginal esplénica, o de su reclutamiento específico para tejido granulomatoso. El mismo estudio ha encontrado que las complicaciones granulomatosas están asociadas con números más bajos de células B de memoria <sup>24</sup>

Los pacientes con EGC tienen niveles elevados de inmunoglobulina (Ig)s IgM IgG IgA en suero y susceptibilidad a infecciones recurrentes. El aumento de concentraciones de inmunoglobulina refleja la respuesta a la infección crónica. <sup>16</sup>

## ENFERMEDAD GRANULOMATOSA CRÓNICA Y CÉLULAS B

En un artículo Mohsenzadegan M, et al., en este estudio de alteración de las células vírgenes y de células B1a en encontraron mayores niveles de células CD5 positivas. (Células B1a) en pacientes con EGC. Se han identificado las células B-1a (CD5 +) como potenciales contribuyentes a enfermedades como el lupus y el lupus discoide. Los niveles elevados de células B CD5 + en pacientes con EGC puede explicar la mayor frecuencia de enfermedades autoinmunes en estos pacientes y pueden conectar este hallazgo a deficiencia de NADPH oxidasa en las células B de EGC pacientes. <sup>8</sup>

Mantovani L, et al., en un estudio de pacientes con EGC vio niveles significativamente más altos de células B vírgenes (IgD + / CD27-) y células B1a (CD5 +), pero niveles más bajos de células B de memoria (IgD- / CD27 +) en EGC<sup>825</sup>. Sin embargo, a pesar de que hay una disminución de células B de memoria (CD27+) los pacientes con EGC mantiene una respuesta inmunológica humoral intacta. <sup>25</sup> Hay estudios que han visto la correlación entre un sistema defectuoso de NADPH oxidase y la reducción de células B de memoria CD 27+. <sup>26</sup>

Matharu, K. et al., en su estudio confirmó que a pesar de la disminución de células B de memoria circulantes en pacientes con EGC, ellos todavía pueden montar una respuesta inmunológica normal con anticuerpos cuando estos son vacunados con antígenos como la influenza. <sup>27</sup>

Un estudio hecho por S. Moir, et al, encontró que en los pacientes con EGC, las células B de memoria estaban disminuidas, pero no tenían un defecto funcional. Los anticuerpos IgG producidos estaban normales y generaban una buena respuesta ante la influenza. Este sirve como una potencial explicación de que a pesar de que las células B de memoria están disminuidas ellas son capaces de montar una respuesta humoral adecuada y proteger al huésped de infecciones. <sup>25</sup>

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La EGC es una deficiencia genética en la enzima NADPH oxidasa. Se presenta por una alteración en cualquiera de los componentes del sistema de la NADPH oxidasa, como resultado de mutaciones que afectan los genes que codifican para las proteínas de la NADPH oxidasa.

Por lo tanto, aunque los pacientes con EGC tienen un defecto solo en la producción de ROS (especies reactivas del oxígeno), y por tanto su incapacidad para matar eficientemente a ciertos microbios patógenos puede ser un efecto directo e indirecto de esta deficiencia.

Las manifestaciones clínicas de la EGC pueden surgir en cualquier edad, pero con mayor frecuencia en la infancia. Los pacientes con EGC son particularmente susceptibles a *Staphylococcus aureus*, especies de *Aspergillus*, especies de *Nocardia* y una variedad de bacilos entéricos gramnegativos que incluyen *Serratia marcescens*, especies de *Salmonella* y *Burkholderia cepacia*. Muchos de estos organismos contienen catalasa, que evita que los fagocitos EGC utilicen peróxido de hidrógeno generado por microbios para promover la muerte de organismos ingeridos. Otros organismos que muestran un aumento de la virulencia en pacientes con EGC incluyen *Mycobacterium tuberculosis* y *Candida*. Los microorganismos más comúnmente aislados incluyen bacterias especialmente catalasa positiva, como *Staphylococcus aureus* y bacilos gram-negativos, especies de *Nocardia*, hongos como *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cándida glabrata* y *Pseudallescheria boydii*.

Estos pacientes presentan manifestaciones clínicas a neumonía, abscesos (piel, tejido, órganos), adenitis, osteomielitis, Bacteremia / fungemia, Infecciones superficiales de la piel (celulitis / impétigo), especialmente infecciones bacterianas severas o recurrentes son las más frecuentes. La neumonía es la infección pulmonar más común, pero los pacientes también pueden tener abscesos pulmonares, empiema y linfadenopatía hilar. Estos pacientes con EGC frecuentemente tienen abscesos, los sitios más comunes para los abscesos son el perianal y el hígado. Alteración hepática se han observado en un tercio de los pacientes (abscesos hepáticos y la hepatomegalia), gastroenteritis (dolor abdominal, diarrea, colitis, proctitis, estenosis, fístulas y obstrucción) y otitis también son infecciones frecuentes en estos pacientes afectados.

Hasta la fecha no existen estudios en la literatura en donde se evidencie si existe algún tipo de susceptibilidad a bacterias encapsuladas, se conocen que la EGC tiene mayor susceptibilidad a bacterias catalasa negativa. La EGC no tiene alteración en la inmunidad humoral, sin embargo se ha identificado que en estos pacientes se encuentran con células B de memoria disminuidas y con una cantidad de células vírgenes de normal a aumentadas. Estos pacientes tienen una inmunidad humoral adecuada pero subpoblaciones de células B anormales y responden adecuadamente a bacterias encapsuladas, sin embargo existen datos en México que evidencien que tipo de bacterias afectan a estos pacientes, incluyendo las bacterias encapsuladas.

## JUSTIFICACIÓN

La EGC es una deficiencia genética en la enzima NADPH oxidasa. Se presenta por una alteración en cualquiera de los componentes del sistema de la NADPH oxidasa, como resultado de mutaciones que afectan los genes que codifican para las proteínas del la NADPH oxidasa.

Por lo tanto, aunque los pacientes con EGC tienen un defecto solo en la producción de ROS (especies reactivas del oxígeno), y por tanto su incapacidad para matar eficientemente a ciertos microbios patógenos puede ser un efecto directo e indirecto de esta deficiencia.

Las manifestaciones clínicas de la EGC pueden surgir en cualquier edad, pero con mayor frecuencia en la infancia. Los pacientes con EGC son particularmente susceptibles a *Staphylococcus aureus*, especies de *Aspergillus*, especies de *Nocardia* y una variedad de bacilos entéricos gramnegativos que incluyen *Serratia marcescens*, especies de *Salmonella* y *Burkholderia cepacia*. Muchos de estos organismos contienen catalasa, que evita que los fagocitos EGC utilicen peróxido de hidrógeno generado por microbios para promover la muerte de organismos ingeridos. Otros organismos que muestran un aumento de la virulencia en pacientes con EGC incluyen *Mycobacterium tuberculosis* y *Candida*. Los microorganismos más comúnmente aislados incluyen bacterias especialmente catalasa positiva, como *Staphylococcus aureus* y bacilos gram-negativos, especies de *Nocardia*, hongos como *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cándida glabrata* y *Pseudallescheria boydii*

Estos pacientes presentan manifestaciones clínicas a neumonía, abscesos (piel, tejido, órganos), adenitis, osteomielitis, Bacteremia / fungemia, Infecciones superficiales de la piel (celulitis / impétigo), especialmente infecciones bacterianas severas o recurrentes son las más frecuentes. La neumonía es la infección pulmonar más común, pero los pacientes también pueden tener abscesos pulmonares, empiema y linfadenopatía hiliar. Estos pacientes con EGC frecuentemente tienen abscesos, los sitios más comunes para los abscesos son el perianal y el hígado. Alteración hepática se han observado en

un tercio de los pacientes (abscesos hepáticos y la hepatomegalia), gastroenteritis (dolor abdominal, diarrea, colitis, proctitis, estenosis, fístulas y obstrucción) y otitis también son infecciones frecuentes en estos pacientes afectados.

Se evidencio una alteración de las células B periféricas, un nivel significativamente más bajo de células B de memoria y niveles más altos de células B vírgenes en pacientes con EGC. Estos hallazgos sugieren que la deficiencia de los componentes de la NADPH oxidasa puede afectar la diferenciación de las células B vírgenes a las células B de memoria y, especialmente, influye en la expresión de CD27 en las células B de memoria. De hecho, podría haber una deficiencia en la conversión de células B vírgenes a células B de memoria en pacientes con EGC. Con respecto al mecanismo responsable, se ha demostrado que los componentes de la NADPH oxidasa (en su mayoría p47phox) en las células B pueden estar involucrados en un sistema distinto al de la NADPH oxidasa que produce superóxido y desempeñar un papel en el sistema de señalización y activación de algunos factores de transcripción en Células B.

De acuerdo con nuestros hallazgos, Bleesing et al mostraron una profunda reducción en la contribución de las células B CD27 + al compartimiento de células B periféricas en pacientes con EGC y mostraron su correlación con el sistema NADPH oxidasa defectuoso. Se ha reducido el número de células B CD27+.

Se a identificado un subconjunto de células B, definido por la expresión de CD5 (conocida como células B1a15) que podría contribuir a la EGC. Los niveles elevados de células B CD5 + en pacientes con EGC pueden explicar la mayor frecuencia de enfermedades autoinmunes en estos pacientes y pueden relacionar este hallazgo con la deficiencia de NADPH oxidasa en las células B de los pacientes con EGC.

Los pacientes con EGC tienen una inmunidad humoral normal a pesar de tener células B de memoria disminuidas y con células vírgenes aumentadas, además de hipergammaglobulinemia. Los pacientes tienen una susceptibilidad a bacterias catalasa negativas, sin embargo no hay alguna cohorte que afirme que no tienen susceptibilidad a bacterias encapsuladas. El conocer que tipo de bacterias afectan a los pacientes Mexicanos con EGC, incluyendo las bacterias encapsuladas nos orientaría hacia una terapéutica mas especifica para estos pacientes.

La Unidad de Investigación en Inmunodeficiencias es centro de referencia nacional para el diagnóstico y estudio de las inmunodeficiencias primarias, cuenta con investigadores con experiencia y con la infraestructura para desarrollar el proyecto.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Establecer si existe aumento en la susceptibilidad de bacterias encapsuladas que afectan la inmunidad humoral en una cohorte de pacientes con enfermedad granulomatosa crónica con células B de memoria baja.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Calcular el porcentaje de bacterias encapsuladas encontradas en una cohorte de pacientes con perfil de células B bajas con enfermedad granulomatosa crónica.
- Identificar que bacteria encapsulada se encontró con mayor frecuencia en una cohorte de pacientes con perfil de células B bajas con enfermedad granulomatosa crónica.
- Describir las características demográficas de la cohorte de pacientes con perfil de células B bajas con enfermedad granulomatosa crónica

## MATERIAL Y MÉTODOS

La muestra seleccionada se realizó a partir de una base de datos de 35 pacientes que acudieron al Instituto Nacional de Pediatría que presentaron manifestaciones clínicas compatibles con EGC y se les haya realizado el diagnóstico de EGC. A todos los pacientes se le realizó el diagnóstico mediante citometría de flujo mediante la técnica de 123- Dihidrorodamina (DHR) donde se evidenció una oxidación disminuida, además de que los pacientes cuentan con una oxidación disminuida se tomaron en cuenta los pacientes en los que se haya determinado las subpoblaciones de células B .

En los criterios de inclusión se incluyeron ambos géneros masculinos y femenino, la edad se cuantificará en meses cumplidos de edad. Los criterios de exclusión son: que no contemos con todos los datos disponibles que investigaremos, que no deseen participar en el estudio. Estará constituida por todos los pacientes evaluados en el periodo de estudio que cumplan con los criterios de inclusión y exclusión.

Se realizó un estudio descriptivo observacional, los 35 pacientes que presentaron el diagnóstico de EGC y que contaron con células B vírgenes aumentadas y células B de memoria disminuidas. Se revisaron los expedientes clínicos impresos y/o electrónicos de los pacientes atendidos y/o

hospitalizados en el Instituto Nacional de Pediatría que contaron con los criterios de inclusión. Las pruebas estadísticas comprendieron básicamente estadística descriptiva realizado en Microsoft Excel 2016®. En base a los datos de la hoja de Excel se calcularon los porcentajes.

Se describirá la edad y género en la población afectada, cual es la mutación y gen mas frecuente, se realizará un análisis por aparato y sistema para describir cual se encuentra mas afectado por infecciones, además de identificar cuales son los síntomas y signos mas involucrados, se identificará si presentan o no susceptibilidad a bacterias encapsulas y cuáles son las más frecuentes.

## VARIABLES

### Variables Demográficas

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de Variable	Escala de Medición	Unidad de Medición
Edad	Tiempo transcurrido a partir del nacimiento	Meses cumplidos	Cuantitativa	Numerica	Meses
Genero	Género al que pertenece el paciente	Femenino/ Masculino	Cualitativa (Dicotomica)	Nominal	1. Masculino 2. Femenino

### Variables Descriptivas

	Definición Conceptual	Opciones	Categoría 1: Si Categoría 2: No	Cualitativa/Cuantitativa
<b>Agentes Infecciosos</b>	Bacteria que es capaz de producir una enfermedad	S. Pneumoniae S. Pyogenes S. Agalactiae N. Meningitides K. Pneumoniae H. Influenzae Tipo B P. Aeruginosa C. Neoformans Y. Pestis B. Anthracis	Categoría 1: Si Categoría 2: No	Cualitativa

<p><b>Manifestaciones Clínicas</b></p>	<p>Signos y síntomas que se presentan en una enfermedad</p>	<p>Neumonía Abscesos Osteomielitis Convulsiones BCG Otitis media aguda Hematuria Infección de vías urinarias Hepatomegalia Sinusitis Dolor abdominal Meningoencefalitis Hepatomegalia</p>	<p>Categoría 1: Si Categoría 2: No</p>	<p>Cualitativa</p>
--	---	---	--	--------------------

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

### Características de los pacientes

La muestra total de pacientes para este estudio fue de treinta y cinco pacientes. La distribución por género fue de 28 (80%) para pacientes masculinos y 7 (20%) para pacientes femeninos. La mediana de edad fue 89 meses y el rango etario fue de 48 a 156 meses de edad. Tabla 1. Por tipo de herencia, la mutación más frecuente fue CYBB ligada al X (n=23), seguida por autosómica recesiva NCF2 (n=8), CYBA (n=2) y NCF1 (n=2) que se heredan de manera recesiva.

### Frecuencia de afección de acuerdo a Aparatos y Sistemas y Signos y Síntomas.

Se agruparon los síntomas para clasificarlos por aparatos y sistemas para determinar cuál era el más afectado; por orden de afección: respiratorio 30 (86%), gastrointestinal 22 (63%), sistema linfático 20 (57%), genitourinario 14 (40%), sistema nervioso 8 (23%), sistema hematopoyético 6 (17%), aparato otorrinolaringológico 3 (9%), sistema óseo 2 (6%).

Las manifestaciones más frecuentes por orden de frecuencia fueron abscesos 29 (83%), neumonía 29 (83%), linfadenitis 20 (57%), hepatomegalia 18 (51%), BCG (bacilo Calmette-Guérin) 14 (40%), Infección de vías urinarias 13 (37%), diarrea 11 (31%), convulsiones 7 (20%), hematuria 7 (20%), dolor

abdominal 6 (17%), trombocitopenia 5 (14%), sinusitis 5 (14%), adenitis mesentérica 4 (11%), otitis media aguda 3 (8.6%), osteomielitis 2 (6%), anemia hemolítica 1 (3%) y meningocefalitis 1 (3%).

Los pacientes que tuvieron infección por bacterias encapsuladas fueron 4 (11%) y 31 (89%) no presentaron infección por encapsuladas. Los agentes encapsulados más frecuentes fueron *P. Aeruginosa* (n=2), *S. Pneumoniae* (n=1) y por último *K. Pneumoniae* (n=1) Tabla 2 se muestran todas las bacterias halladas

## DISCUSIÓN

La mayoría de los pacientes estudiados presentaron la mutación genética más frecuente la cual es ligada al X recesiva (CYBB) la cual codifica la subunidad gp91phox, esta se presentó en 65% de los pacientes. Muchos países han reportado que esta es la mutación más frecuente. <sup>2,11,28,29</sup>

En la muestra de pacientes que estudiamos pudimos encontrar que los aparatos y sistemas que más se encontraron afectados fueron respiratorio, gastrointestinal y genitourinario. Estos hallazgos son muy similares a lo que otros investigadores han encontrado en sus respectivos estudios. <sup>3,29</sup>

Se ha descrito en muchos artículos que los pacientes con EGC tienen susceptibilidad a las bacterias y hongos que son catalasa positiva. Entre ellos los más frecuentes son *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia*, *Serratia marcescens*, *Nocardia spp.*, *Aspergillus spp*, *BCG*, *Salmonella spp* y *Mycobacterium tuberculosis*. <sup>1,2,15</sup> TABLA 4 Realizamos una búsqueda exhaustiva en buscadores de publicaciones científica y no encontramos estudios que han describan la presencia de bacterias encapsuladas con EGC. <sup>9,10</sup>

La cápsulas de algunas bacterias patógenas de las vías respiratorias, como *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b, *S. pneumoniae* y algunas cápsulas de *K. pneumoniae* pueden disminuir la expresión de citocinas proinflamatorias IL-6 e IL-8 que disminuyen la maduración de las células plasmáticas, la cantidad de anticuerpos y la migración de las células fagocíticas hacia los sitios de infección. Esta alteración en la regulación evita que se de una respuesta inmune no específica y proporciona un mecanismo para evitar la fagocitosis. <sup>9,10</sup>

Los polisacáridos capsulares que rodean las bacterias enmascaran los patrones moleculares asociados a patógenos subyacentes (PAMP), el sistema inmune lo reconoce por Toll-Like-Receptor (TLR). Sin embargo, algunas cápsulas bacterianas interfieren con el reconocimiento de PAMPs por TLRs, disminuyendo la producción de citoquinas. Polisacáridos capsulares de *Enterococcus faecalis*

serotipo C y D disminuye el reconocimiento de ácido lipoteicoico por TLR2, y Salmonella Vi-capsule impide el reconocimiento de TLR4.<sup>9,10</sup>

Algunas bacterias patógenas han desarrollado varias estructuras, como el ácido siálico de la cápsula K1 de E. coli o la hialurónica. ácido de la cápsula de S. pyogenes, que tiene propiedades funcionales idénticas a las del huésped y se une a los inhibidores del complemento capaz de prevenir la activación del complemento.<sup>9,10</sup>

Los resultados de este estudio muestran que los pacientes con enfermedad granulomatosa crónica poseen una buena respuesta a agentes encapsulados. Tan solo 4 pacientes (11%) presentaron infección por agentes encapsulados; mientras tanto 31 pacientes (89%) no presentaron infección por agente encapsulado, y de estos pacientes el K. pneumoniae es el que afecta a los pacientes con inmunidad humoral.<sup>9,10</sup>Tienen cápsula, pero tienen otras formas de producir enfermedad, como toxinas por eso no son exclusivas de alguna condición de IDP.

Muchas de las bacterias que causan enfermedades infecciosas se multiplican en los espacios extracelulares del cuerpo y la mayoría de los patógenos intracelulares se propagan al pesar de una célula a otra a través de los fluidos extracelulares. Los espacios extracelulares están protegidos por la respuesta inmune humoral, en la que los anticuerpos producidos por las células B causan la destrucción de microorganismos extracelulares y evitan la propagación de infecciones intracelulares. La activación de las células B y su diferenciación en células plasmáticas secretoras de anticuerpos es activada por el antígeno y generalmente requiere célula T CD4 de ayuda. Las células TH2 ayudan en la activación de las células B mediante la estimulación co-estimuladora por parte de CD40 y CD40L(CD154), TCR y MHC-2 por parte de la célula B, CD28 y CD80. Las células T tienen un papel en el inicio de la hipermutación somática de los genes y controlan el cambio de isotipo mediante la secreción de interleucinas IL- 4,IL-5,IL-6 y de esta manera ayuda a la célula B para que se active y desarrolle una respuesta inmune adecuada hacia el patógeno.<sup>30-32</sup>

Las células B también tienen TLR un atributo que le ayuda a reconocer patógenos invasores tales como bacterias extracelulares. En el caso de bacterias encapsuladas, las células B utilizan TLR-2 el cual reconoce lipoproteínas y peptidoglicanos que se encuentran en la superficie capsular de la bacteria para desarrollar una respuesta inmune adaptativa.<sup>30-32</sup> La función reducida de la NADPH oxidasa en las células B está asociada a niveles altos de TLR7 y TLR 9 mRNA así como en la hiperactivación de p38MAPK. la estimulación de TLR7 y 9 en células B humanas promueven la producción intracelular de RLO, lo que está ligado a la funcionalidad de NADPH oxidasa.<sup>33</sup>

Los anticuerpos contribuyen en la inmunidad adaptativa de diversas maneras. Para ingresar a las células; los virus y las bacterias intracelulares se unen a moléculas específicas en la superficie de la célula humana. Los anticuerpos que se unen a la superficie del patógeno y neutralizan al patógeno. Los anticuerpos al estar adheridos a los patógenos también previenen que las bacterias liberen toxinas y causa mayor daño a nivel celular. <sup>31</sup>

También, los anticuerpos facilitan la captación del patógeno por las células fagocíticas especializadas para destruir las bacterias ingeridas (macrófagos). Los anticuerpos hacen esto de dos maneras. Primero, los anticuerpos unidos que recubren el patógeno son reconocidos por los receptores Fc en las células fagocíticas que se unen a la región C (constante) del anticuerpo. Este proceso de opsonización sirve para mejorar la fagocitosis. Segundo, otro proceso similar es donde los anticuerpos unidos a la superficie de el patógeno pueden activar a el complemento y esto al final crea poros en la superficie del patógeno promoviendo su destrucción. <sup>31,34</sup>

## CONCLUSIÓN

A pesar de que los pacientes con enfermedad granulomatosa crónica tienen una disminución de células B de memoria, ellos todavía poseen una respuesta inmune humoral efectiva lo cual le permite combatir contra patógenos encapsulados.

Aducimos que la respuesta humoral de estos pacientes permanece intacta. A pesar de que estos pacientes tienen un número disminuido de células B de memoria; los pacientes con EGC tienen niveles normales y aumentados de células B vírgenes. Las células B vírgenes todavía funcionan de manera normal. Esto significa que la respuesta humoral es capaz de responder mediante el proceso de respuesta inmune adaptativa.

## ANEXO

Tabla 1. Características demográficas

Características basales	
n=35	
Genero	
Mujer	7 (20)
Hombre	28 (80)
Edad, meses	89 (48-156)

Los datos están expresados como n (%), y mediana (rango 25-75)

Tabla 2. Agentes infecciosos ( bacterias encapsulada)

Agentes infecciosos	
n=35	
S. Pneumoniae	1 (2.9)
S. Pyogenes	0
S. Agalactiae	0
M. Meningitides	0
K. Pneumoniae	1 (2.9)
H. Influenzae tipo B	0
C. Neoformans	0
P. Aeruginosa	2 (5.7)
Y. Pestis	0
B. Anthracis	0
Otras	0

Los datos están expresados como n (%)

Tabla 3. Bacterias más frecuentes en pacientes con EGC en diferentes países

INDIA	Staphylococcus aureus Aspergillus, Burkholderia cepacia y Candida.
ESPAÑA	Aspergillus sp. (10), Staphylococcus sp. (7), Salmonella sp. (6), Serratia sp. (5) Pseudomonas aeruginosa (4), Klebsiella sp. (4), Proteus sp. (3), Leishmania sp. (2)
CHINA	Staphylococcus aureus (6), Klebsiella pneumonia (4), Moraxella catarrhalis (3), Streptococcus pneumonia (3), Escherichia coli (2), Enterobacter cloacae (1), Haemophilus influenza (1), y Enterobacter aerogenes(1)
USA	Staphylococcal spp (25%), Serratia, Candida, Klebsiella, Aspergillus, Paecilomyces, Nocardia, Salmonella, Burkholderia, Candida, Pseudomonas.
ITALIA	Aspergillus spp (34%), Candida spp, Staphylococcus aureus  Gram negativos: Serratia marcescens Burkolderia cepacia  Mycobacteria, Actinomyces israelii and Peptostreptococcus,
ALEMANIA	Staphylococcus aureus (30%)  Gram negativos Pseudomonas spp (14/151 or 9%), Salmonella species (6%), Klebsiella species (5%), Escherichia coli (5%), Proteus species (2%), and Enterobacter species (2%)
AMERICA LATINA	S. aureus (20.3%), B. cepacia complex, S. marcescens(8.7%), Nocardia, and Aspergillus spp (13%), E. coli (4.3%), Candida spp(8.7%), Klebsiella spp (10.1%). Salmonella spp(7.2%), Nocardia spp (2.9%), BCG (30.4%).

EGIPTO	Staphylococcus aureus (3/8), Aspergillus sp. 3/8 Klebsiella, Pseudomonas aeruginosa, micobacterias atípicas Candida albicans (1).
IRAN	Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Salmonella spp, Shigella Serratia marcescens, Klebsiella  Pseudomonas aerugi- nosa y Bacillus subtilis
JAPÓN	Aspergillus (45/ 174)

## BIBLIOGRAFÍA

1. Holland, S. M. Chronic granulomatous disease. Hematol. Oncol. Clin. North Am. 27, 89–99, viii (2013).
2. Marsán Suárez, V. et al. Enfermedad granulomatosa crónica . Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia 30, 280–287 (2014).
3. Rider, N. L., Jameson, M. B. & Creech, C. B. Chronic Granulomatous Disease: Epidemiology, Pathophysiology, and Genetic Basis of Disease. J. Pediatric Infect. Dis. Soc. 7, S2–S5 (2018).
4. Beghin, A. et al. Chronic Granulomatous Disease in children: a single center experience. Clin. Immunol. 188, 12–19 (2018).
5. Justiz Vaillant, A. A. & Qurie, A. Immunodeficiency. in (2018).
6. Arnold, D. E. & Heimall, J. R. A Review of Chronic Granulomatous Disease. Adv. Ther. 34, 2543–2557 (2017).
7. C. Thomas, D. How the phagocyte NADPH oxidase regulates innate immunity. Free Radical Biology and Medicine 125, (2018).
8. Mohsenzadegan, M. et al. Altered pattern of Naive and memory B cells and B1 cells in patients

- with chronic granulomatous disease. *Iran. J. Allergy. Asthma. Immunol.* 13, 157–165 (2014).
9. Merino, S. & Tomás, J. M. Bacterial Capsules and Evasion of Immune Responses. in *eLS* (American Cancer Society, 2010). doi:10.1002/9780470015902.a0000957.pub3
  10. Comstock, L. E. & Kasper, D. L. Bacterial glycans: key mediators of diverse host immune responses. *Cell* 126, 847–850 (2006).
  11. Rae, J. 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.* 62, 1320–1331 (1998).
  12. Kutukculer, N. et al. Chronic granulomatous disease: two decades of experience from a pediatric immunology unit in a country with high rate of consanguineous marriages. *Scand. J. Immunol.* e12737 (2018). doi:10.1111/sji.12737
  13. Thomas, D. C. et al. EROS/CYBC1 mutations: Decreased NADPH oxidase function and chronic granulomatous disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2018). doi:10.1016/j.jaci.2018.09.019
  14. Boonyawat, B., Suksawat, Y., Pacharn, P., Suwanpakdee, P. & Traivaree, C. X-Linked Chronic Granulomatous Disease: Initial Presentation with Intracranial Hemorrhage from Vitamin K Deficiency in Infant. *Case Rep. Pediatr.* 2018, 7041204 (2018).
  15. Yu, J. E., Azar, A. E., Chong, H. J., Jongco, A. M. 3rd & Prince, B. T. Considerations in the Diagnosis of Chronic Granulomatous Disease. *J. Pediatric Infect. Dis. Soc.* 7, S6–S11 (2018).
  16. Gennery, A. Recent advances in understanding and treating chronic granulomatous disease. *F1000Research* 6, 1427 (2017).
  17. Kulkarni, M., Gupta, M. & Madkaikar, M. Phenotypic Prenatal Diagnosis of Chronic Granulomatous Disease: A Useful Tool in The Absence Of Molecular Diagnosis. *Scand. J. Immunol.* 86, 486–490 (2017).
  18. Henrickson, S. E., Jongco, A. M., Thomsen, K. F., Garabedian, E. K. & Thomsen, I. P. Noninfectious Manifestations and Complications of Chronic Granulomatous Disease. *J. Pediatric Infect. Dis. Soc.* 7, S18–S24 (2018).
  19. Hardy, R. R. & Hayakawa, K. B cell development pathways. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 595–621 (2001).

20. Taher, T. E. et al. Intracellular B Lymphocyte Signalling and the Regulation of Humoral Immunity and Autoimmunity. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 53, 237–264 (2017).
21. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. (Garland Science, 2002).
22. LeBien, T. W. & Tedder, T. F. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 112, 1570 LP-1580 (2008).
23. Gil, O. et al. Granuloma encapsulation is a key factor for containing tuberculosis infection in minipigs. *PLoS One* 5, e10030 (2010).
24. Timmermans, W. M. C., van Laar, J. A. M., van Hagen, P. M. & van Zelm, M. C. Immunopathogenesis of granulomas in chronic autoinflammatory diseases. *Clin. Transl. Immunol.* 5, e118 (2016).
25. Moir, S. et al. Humans with chronic granulomatous disease maintain humoral immunologic memory despite low frequencies of circulating memory B cells. *Blood* 120, 4850–4858 (2012).
26. Bleesing, J. J. et al. Patients with chronic granulomatous disease have a reduced peripheral blood memory B cell compartment. *J. Immunol.* 176, 7096–7103 (2006).
27. Matharu, K. et al. B-cell activating factor (BAFF) is elevated in chronic granulomatous disease. *Clin. Immunol.* 148, 258–264 (2013).
28. Bortoletto, P. et al. Chronic Granulomatous Disease: A Large, Single-center US Experience. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 34, 1110–1114 (2015).
29. Fernando, S. J. A. et al. Preliminary study on chronic granulomatous disease in Sri Lanka. *Allergy Asthma. Clin. Immunol.* 14, 37 (2018).
30. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. *The Immune System in Health and Disease*. (Garland Science, 2001).
31. Shishido, S. N., Varahan, S., Yuan, K., Li, X. & Fleming, S. D. Humoral innate immune response and disease. *Clin. Immunol.* 144, 142–158 (2012).
32. Chaplin, D. D. Overview of the immune response. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S3-23 (2010).
33. McLetchie, S., Volpp, B. D., Dinauer, M. C. & Blum, J. S. Hyper-responsive Toll-like receptor 7

and 9 activation in NADPH oxidase-deficient B lymphoblasts. *Immunology* 146, 595–606 (2015).

34. Noris, M. & Remuzzi, G. Overview of complement activation and regulation. *Semin. Nephrol.* 33, 479–492 (2013).

## CRONOGRAMA

ACTIVIDAD	AGO	SEPT	OCT	DIC	ENERO
DISEÑO DEL PROTOCOLO	X	X			
PRESENTACION DEL PROTOCOLO		X			
EVALUACIÓN DEL PROTOCOLO POR COMITÉ			X		
RECOLECCION DE DATOS				X	
ANALISIS DE DATOS Y PRESENTACION DE RESULTADOS					X