



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL UNIDAD MÉDICA DE
ALTA ESPECIALIDAD CENTRO MÉDICO NACIONAL “LA RAZA”
HOSPITAL GENERAL DR. GAUDENCIO GONZÁLEZ GARZA.**

**RELACIÓN DEL ÍNDICE OXIDATIVO DE NEUTRÓFILOS CON LA
SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD GRANULOMATOSA CRÓNICA.**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**ESPECIALISTA EN MEDICINA
(PATOLOGÍA CLÍNICA)**

PRESENTA:

DR. EDWIN SAMIR MENDIETA BAUTISTA.

ASESOR:

DRA. LAURA LÓPEZ PELCASTRE.

D. EN C. LAURA ARCELIA MONTIEL CERVANTES.



CD MX, JULIO DE 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS



Dictamen de Aprobado

Comité Local de Investigación en Salud 3501.
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA

Registro COFEPRIS 17 CI 09 002 047
Registro CONBIOÉTICA CONBIOETICA 09 CEI 033 2017121

FECHA Martes, 21 de mayo de 2019

Dra. LAURA ARCELIA MONTIEL CERVANTES

PRESENTE

Tengo el agrado de notificarle, que el protocolo de investigación con título **Relación del índice oxidativo de neutrófilos con la Severidad de la Enfermedad Granulomatosa Crónica** que sometió a consideración para evaluación de este Comité, de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de ética y de investigación, por lo que el dictamen es **APROBADO**.

Número de Registro Institucional
R-2019-3501-069

De acuerdo a la normativa vigente, deberá presentar en junio de cada año un informe de seguimiento técnico acerca del desarrollo del protocolo a su cargo. Este dictamen tiene vigencia de un año, por lo que en caso de ser necesario, requerirá solicitar la reaprobación del Comité de Ética en Investigación, al término de la vigencia del mismo.

ATENTAMENTE

Dr. Ernesto Alonso Ayala López
Presidente del Comité Local de Investigación en Salud No. 3501

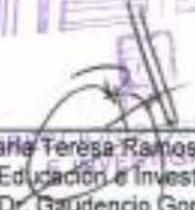
Imprimir

IMSS
SEGURIDAD Y SALUD PARA TODOS



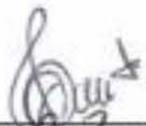
RELACIÓN DEL ÍNDICE OXIDATIVO DE NEUTRÓFILOS CON LA SEVERIDAD
DE LA ENFERMEDAD GRANULOMATOSA CRÓNICA.




Dra. María Teresa Ramos Cervantes.
Directora de Educación e Investigación en Salud.
U.M.A.E Hospital General "Dr. Gaudencio González Garza". C.M.N "La Raza".


Dr. Antonio Quintero Bazaldua.
Profesor Titular de la Especialidad en Patología Clínica.
Jefe de Departamento Clínico, Laboratorio Clínico.
U.M.A.E Hospital General "Dr. Gaudencio González Garza". C.M.N "La Raza".


D. en C. Laura Arcella Montiel Cervantes.
Asesor Investigador Principal
Encargada del Laboratorio de Hematología Especial.
U.M.A.E Hospital de Especialidades "Dr. Antonio Fraga Mouret". C.M.N "La Raza".


Dra. Laura López Pelcastre.
Asesor
Jefa del Departamento de Análisis Clínicos.
U.M.A.E Hospital de Especialidades "Dr. Antonio Fraga Mouret". C.M.N "La Raza".


Dr. Edwin Samir Mendieta Bautista.
Residente de Tercer año de la Especialidad en Patología Clínica.
U.M.A.E Hospital General "Dr. Gaudencio González Garza". C.M.N "La Raza".

Agradecimientos

A la D en C Laura A. Montiel Cervantes por su excelente enseñanza, dedicación, paciencia y por brindarme su apoyo incondicional a lo largo de este proyecto, además por ser una excelente maestra.

A la Dra. Laura López Pelcastre por permitirme desarrollar este proyecto de impacto.

Al Dr. Antonio Quintero Bazaldúa por su apoyo incondicional en tiempos difíciles, por ser un excelente maestro, por sus consejos y por ser parte esencial durante mi formación como médico especialista.

A la Dra. Andrea Flores Preciado, Dra. Ana Karen Luna Vargas y Dra. Gabriela Velázquez Estrada por estos tres años que compartimos juntos en la especialidad, por ofrecerme su apoyo incondicional, sus conocimientos, pero más allá por enseñarme el verdadero sentido de la amistad que logre tener a lo largo de este tiempo y por darme el privilegio de formar parte de sus vidas.

A la Dra. Monserrat Hernández Rosas y a la Dra. Mayte Beltrán Acuña por su invaluable amistad, cariño y apoyo que logre tener a lo largo de estos dos años.

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
RESÚMEN	1
ANTECEDENTES CIENTÍFICOS	2
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	6
JUSTIFICACIÓN	7
OBJETIVOS	7
HIPÓTESIS	7
MATERIAL Y MÉTODOS	8
RESULTADOS	13
DISCUSIÓN	19
CONCLUSIONES	21
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
ANEXOS	25

RESÚMEN

RELACIÓN DEL ÍNDICE OXIDATIVO DE NEUTRÓFILOS CON LA SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD GRANULOMATOSA CRÓNICA.

ANTECEDENTES: Las inmunodeficiencias primarias son un grupo de enfermedades genéticas, se engloban alrededor de 9 tipos diferentes siendo la enfermedad granulomatosa crónica (EGC) una de las más frecuentes, ocasionada por un defecto en la fagocitosis, así como la baja producción de radicales libres de oxígeno como el peróxido de hidrógeno, a partir de complejo NADPH oxidasa, la EGC se caracteriza por la presencia de granulomas, así como infecciones por microorganismos recurrentes. La técnica de cuantificación de 1, 2, 3 DHR por citometría se considera la prueba más sensible y específica para realizar este diagnóstico, en comparación con la de NBT. El índice oxidativo nos da una referencia acerca de la categoría en la cual se podría encontrar el paciente que, con índices menores a 20 los pacientes desarrollan un cuadro clínico franco, mientras que con índices menores a 10 están relacionados con estadios graves o severos.

OBJETIVOS: Conocer la relación del Índice Oxidativo de neutrófilos con la severidad de la Enfermedad Granulomatosa Crónica.

MATERIAL Y METODOS: Se trata de un estudio observacional, ambispectivo, transversal, comparativo, abierto, donde se calculó una población de 36 (18 para cada grupo, controles y pacientes respectivamente) por la fórmula de correlación, aplicando los criterios de inclusión y exclusión, se determinó la IMF de los neutrófilos a través de la técnica de 1, 2, 3 DHR por citometría de flujo (citómetro modelo FACS Canto II, modelo Becton Dickinson ®), calculando el Índice Oxidativo (IO), además de ello se clasificó clínicamente a los pacientes en leve, moderado o severo. Una vez obtenidos los resultados se calcularon las medianas de tendencia central con percentiles 25-75%, se aplicó la prueba de U de Mann Whitney para evaluar ambas poblaciones, además se relacionó la severidad de la enfermedad con el Índice Oxidativo por la correlación de Spearman.

RESULTADOS: En la muestra estudiada (n=18), se presentó más en mujeres en un 61% en comparación con los hombres siendo de 39%, registrándose un caso con criterios de severidad en un paciente de 1 mes de edad (IO=2.1), que por el método estadístico de U de Mann Whitney se calculó una mediana de 1,292 (1,184.87-1,387.04) y 105.80 (23.92-698.09) para sanos y enfermos respectivamente, con una $p < 0.001$. Además de ello se calculó una correlación de Spearman siendo de 0.622, con una $p < 0.005$, ambos resultados estadísticamente significativos.

CONCLUSIÓN: Al comparar las medianas de los grupos controles y de los pacientes se demostró una diferencia estadística significativa, se determinó la correlación entre la severidad EGC y el Índice Oxidativo de neutrófilos < 5 , esto demuestra que entre menor sea el índice oxidativo de los neutrófilos de los pacientes con EGC, mayor será la severidad de la misma.

ANTECEDENTES CIENTÍFICOS

I. Enfermedad Granulomatosa Crónica (EGC)

Las inmunodeficiencias primarias se consideran un grupo de enfermedades genéticas que vuelven susceptible a un individuo a padecer enfermedades recurrentes, la última clasificación engloba alrededor de 9 tipos diferentes siendo la enfermedad granulomatosa crónica (EGC) una de las más frecuentes, debido a un defecto en la fagocitosis. (1)

Caracterizada por defectos en la explosión respiratoria de las células fagocíticas inducida por el sistema de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa de membrana y citoplasmática, constituida por el flavocitocromo b558 compuesto por dos subunidades p22phox y gp91phox, componente principal del sistema de membrana; provocando la activación celular durante la fagocitosis, mediante la fosforilación de las proteínas citoplasmáticas p47phox, p67phox, y p40phox; dicho proceso favorece la unión con el flavocitocromo b558 en la membrana de los fagocitos.

Ocurre así la activación y unión con GTPasas Rac1-Rac2, induciendo la activación de la oxidasa. Activada la enzima, trasfiere electrones al oxígeno molecular, generando anión superóxido que interactúan con potasio y enzimas lisosomales; que en sinergia destruyen proteínas, polisacáridos, lípidos, DNA y RNA de los microorganismos fagocitados, contribuyendo en su eliminación. (2) La importancia de la NADPH oxidasa se hace evidente en la EGC, enfermedad en la cual está ausente (3).

La EGC se caracteriza clínicamente por la presencia de granulomas y síndrome hemofagocítico, además de un estado de inflamación anormal debido a que existe una mayor susceptibilidad a padecer infecciones recurrentes y graves por bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia*, *Serratia marcescens*, por hongos como *Aspergillus* y *Nocardia spp.* Dentro de las infecciones más frecuentes se encuentra la neumonía, linfadenitis y abscesos en diferentes órganos. (4)

El 65% de los defectos genéticos asociados a EGC es de herencia ligada al cromosoma X (XL-EGC), mutando el gen CYBB que codifica para la proteína gp91phox. El 25% presentan mutación en la proteína P47phox de herencia autosómica recesiva (AR-EGC), y solo el 10% presentan deficiencia de las proteínas p67phox, p40phox o p22phox. (5)

II. Epidemiología

La incidencia a nivel mundial es de aproximadamente 1/250 000 individuos. En general, XL-EGC es el tipo más prevalente en China, Japón, Europa, y los Estados Unidos (6). Sin embargo, en regiones donde existen consanguineidad como Turquía, Egipto, Omán e Irán, se informa una mayor tasa de AR-EGC (7). De acuerdo con el estudio que comprende a 17 pacientes en la India, AR-EGC se presentó en el 59% de los casos, mientras que XL-EGC en el 41% [8]. A pesar de los defectos genéticos diferentes, tanto los pacientes XL-EGC como AR-EGC son clínicamente indistinguibles y muestran un patrón similar de anomalías en pruebas

de diagnóstico. Madres portadoras de XL-EGC puede presentar un patrón de mosaico debido a la presencia de defectos heterogéneos en los neutrófilos, mostrando que la explosión respiratoria es normal sugiriendo el defecto en el gen CYBB (9)

El patrón más frecuente en México es XL-EGC, en el 80% (10). El diagnóstico de la EGC se realiza a través de diferentes técnicas que cuantifican los radicales libres de oxígeno, que se generan por la NADPH oxidasa y superóxido dismutasa. Las técnicas de laboratorio que miden el superóxido son la reducción de ferrocitocromo C o el nitroazul de tetrazoilo (NBT). El peróxido de oxígeno se cuantifica con otras técnicas que utilizan citometría de flujo como 1-2-3 dihidrorodamina, 2,7 diclorohidrofluoresceína o 6G dihidrorodamina. Con el advenimiento de la citometría de flujo, la prueba de NBT ha sido reemplazada por ensayos más rápidos y sensibles por citometría de flujo la cual mide la actividad funcional de los neutrófilos (11).

III. Citometría de Flujo por Dihidrorodamina 123 (DHR)

Los neutrófilos in vitro se ponen en contacto con un estímulo de la NADPH oxidasa como el forbol-12 miristato-13 acetato (PMA), agregándose compuesto no fluorescente que interacciona con los radicales libres de oxígeno generando un compuesto fluorescente, la emisión de fluorescencia se mide a través de citometría de flujo. Los fluorocromos utilizados son 1-2-3 dihidrorodamina, 2,7 diclorohidrofluoresceína o 6G Dihidrorodamina.

La DHR es un cromógeno permeable a la membrana celular. Durante el estallido respiratorio reacciona con el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para formar 1, 2, 3 rodamina, molécula fluorescente. Por medio del citómetro se cuantifica el incremento de la **intensidad de fluorescencia media** (IFM), que por definición es la media, o el promedio, de la intensidad de color que emite un fluorocromo por cada célula (12), obteniendo esta media, nos ayuda a determinar el Índice Oxidativo (IO) que éste refleja cuantas veces se incrementó la producción de rodamina posterior al estímulo con PMA, este índice se calcula al dividir el índice medio de fluorescencia del tubo con rodamina más PMA entre el índice medio de fluorescencia del tubo con rodamina sin PMA, por lo tanto un sujeto sano tiene una sola población con un índice de estimulación mayor de 30, mientras que los pacientes con EGC tienen una sola o dos poblaciones con índice de estimulación menor a 5.(13)

Comparando la sensibilidad entre diferentes fluorocromos (DHR, DCF e hidroetidina) para la detección de radicales libres de oxígeno en individuos sanos; se concluyó la 123- DHR es el fluorocromo más sensible y más utilizado para el diagnóstico de EGC de acuerdo con lo descrito por Vowells et al. (14).

En el estudio realizado por Marciano, B. et al, en 162 portadoras de XL-EGC, demostraron que las infecciones están correlacionadas inversamente con el porcentaje de DHR en neutrófilos, siendo clínicamente más evidentes cuando el porcentaje de DHR es menor al 20%, y son más graves a medida que el porcentaje disminuye a menos de 10% Además, en el 78% de las portadoras, mostraron que

el porcentaje de **DHR en valores del 20% al 80%** son un criterio para la inactivación normal o aleatoria del cromosoma X, independiente de la edad. (15)

Berrón-Ruiz, et al, encontraron que el 79% de los 33 pacientes mexicanos con EGC, es ligado a X. Las portadoras de XL-EGC muestran que el porcentaje de DHR en neutrófilos varían en la mayoría de los casos del 20% al 80%. (16).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

La técnica de DHR por citometría de flujo es considerada como un método de cribado que identifica con factibilidad y bajo costo los diferentes fenotipos de la EGC. Sin embargo, es importante establecer en los laboratorios clínicos los parámetros de normalidad en los pacientes con EGC, cuyo propósito radica en la caracterización inicial de esta condición clínica, mediante la evaluación en diferentes tipos celulares considerando la expresividad del defecto.

¿Cuál es la relación del índice oxidativo de neutrófilos con la severidad de la enfermedad granulomatosa crónica?

JUSTIFICACIÓN

La citometría de flujo es una herramienta ampliamente utilizada por laboratorios de diagnóstico clínico, que ha permitido implementar mediante la evaluación de datos diversos enfoques diagnósticos para diversas patologías así la medición de funciones biológicas celulares. El uso de la DHR en la citometría de flujo, pretende establecerse como método de cribado y diagnóstico de EGC, con la finalidad de instaurar oportunamente estrategias terapéuticas.

OBJETIVO GENERAL

Conocer la relación del índice oxidativo de neutrófilos con la severidad de la enfermedad granulomatosa crónica.

HIPOTESIS

HIPÓTESIS ALTERNA.

La relación del índice oxidativo de neutrófilos menor al 80% es inversamente proporcional a la severidad de la enfermedad granulomatosa crónica.

HIPÓTESIS NULA.

La relación del índice oxidativo de neutrófilos menor al 80% es directamente proporcional a la severidad de la enfermedad granulomatosa crónica.

MATERIAL Y METODOS

DISEÑO DE ESTUDIO:

Por el control de maniobra: observacional.

Por la captación de información: ambispectivo.

Por la medición del fenómeno en el tiempo: transversal.

Por la presencia de un grupo control: comparativo.

Por la ceguedad en la aplicación: abierto.

TAMAÑO DE LA MUESTRA.

$$n = \left(\frac{z_{1-\alpha/2} + z_{1-\beta}}{\frac{1}{2} \ln \left(\frac{1+r}{1-r} \right)} \right)^2 + 3$$

Donde:

$\alpha=0.05$

$Z\alpha= 1.96$ cuando se trabaja con un intervalo de confianza del 95%.

$Z\beta= 1.645$

$r= 0.62$

$n = 18$ por grupo

$N = 36$ (Controles+ pacientes)

Población

Población de estudio: 18 pacientes con diagnóstico de Inmunodeficiencia Primaria.

18 controles sanos, pareados por edad, sexo.

Criterios de selección de muestras

Criterios de Inclusión:

Pacientes mayores de 1 año de edad con Diagnóstico Clínico de Inmunodeficiencia Primaria, derechohabientes del IMSS, con NSS vigente.

Criterios de exclusión: Expediente Clínico Incompleto.

Criterios de eliminación: Pacientes con recuento menor a 1000 Neutrófilos/microlitro (μL) para realizar el estudio.

Ubicación Espacio-Temporal

El estudio se llevará a cabo en el laboratorio clínico del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional La Raza, en pacientes con Inmunodeficiencia primaria una vez que haya sido aprobado por el comité de investigación y ética de este hospital.

REACTIVOS.

Para el presente trabajo se empleó PMA (Formol, Miristato, Acetato), DHR (Dihidrorodamina), Solución de Lisis de Glóbulos Rojos 1X, PBS 1X (Solución Amortiguadora de Fosfatos, pH 7.2+-), Formaldehído al 1%.

INSTRUMENTO ANALITICO.

La determinaciones analíticas se realizó en el instrumento Clitómetro de flujo modelo FACS Canto II, modelo Becton Dickinson ®.

PROCEDIMIENTO.

Se procedió a realizar la flebotomía en tubos de plástico con EDTA de la marca Becton Dickinson ®, en aquellos pacientes que cumplían con los criterios de inclusión y con previa firma del consentimiento informado, además se realizó la recolección de las muestras de sangre de pacientes aparentemente sanos, que las mismas fueron pareadas por edad y sexo. Una vez recolectadas las muestras problemas como los controles, se mezclaron para realizar la determinación de neutrófilos/ μL siendo estas mayores a 1,000 neutrófilos/ μL para considerarlas como aceptables. Realizado esto, se rotulan tres tubos de plástico con dimensiones de 13x100 colocando los números 1, 2 y 3 siendo auto fluorescencia (AF), DHR y DHR/PMA respectivamente, que esta serie de tubos serán para cada uno, tanto para el control y la muestra problema, en todos los tubos se colocó 50 μL de sangre entera, posterior a ello se agregó 6 μL de DHR solo en los tubos 2 y 3, se incubaron los tubos 1, 2 y 3 a 37°C en Baño María durante 5 minutos, evitando la exposición a la luz cubriéndolos con papel aluminio (evitar perder la fluorescencia de DHR),

luego se colocó 30 μ L de PMA 1:100 solo en el tubo 3 tanto para el control como para la muestra problema, nuevamente se incubaron los tubos 1, 2 y 3 durante 20 a 30 minutos a 37°C en Baño María, al término se colocó 500 μ L de Solución de Lisis de Glóbulos Rojos 1X en todos los tubos, mismos que se incubaron en refrigeración a 2°C durante 10 minutos, ocurrido esto se mezclaron los tubos en vórtex, se realizó el lavado con 1mL de Solución PBS 1X, se centrifugaron los tubos a 750 RMP durante 5 minutos, repitiendo los lavados por 2 ocasiones, se fijaron las muestras con Formaldehído al 1%, se leyeron en el Clitómetro de flujo modelo FACS Canto II, modelo Becton Dickinson ®, a 50,000 eventos, con previa selección de población de granulocitos, el análisis de las muestras se realizó en el Software FACSDiva®, mismos que arrojaron los histogramas, además del Índice de Fluorescencia Media(IMF) de cada uno de los tubos, por lo que a partir de ello, se realizó el cálculo del índice de oxidación(DHR+PMA/DHR) tanto de la muestra problema como el del control o testigo.

Análisis estadístico

Se realizarán medidas de tendencia central (media o mediana) y de dispersión (desviación estándar o percentiles 25-75%).

Se compararán las medias o medianas de los niveles de índice oxidativo (IO) de los neutrófilos de los donadores clínicamente sanos obtenidos del banco de sangre, de pacientes pediátricos programados a cirugía electiva con los niveles de IO de pacientes con inmunodeficiencia primaria. Se utilizarán la prueba t student o U de Mann Whitney. Se relacionará el nivel de IO de los neutrófilos del paciente con el grado de severidad del padecimiento. (X^2), o Spearman.

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizará el programa SPSS versión 21 considerando una $P < 0.05$ como significativo.

RESULTADOS.

Se analizaron las 36 muestras sanguíneas, de las cuales corresponden a 18 muestras controles, mismas que fueron pareadas por edad y sexo, además de 18 pacientes con los diferentes diagnósticos que se enlistan en la tabla 1, estas mismas se procesaron durante el mes de mayo, de los cuales el 39% corresponden a hombres y el 61% corresponden a mujeres, (ver Fig. 1 y Tabla 2). La edad de los pacientes fue desde 1 mes hasta los 74 años, con una media de 18.76 años (21.61 DE), siendo más frecuente en menores de 1 año, (ver Fig. 2).

Paciente	Edad	Sexo	Diagnóstico Clínico	Severidad EGC	Recuento de Neutrófilos	Autofluorescencia	Rodamina/PMA	Rodamina	Índice de Oxidación
1	12 AÑOS	H	SOSPECHA DEFECTO DE LA FAGOCITOSIS.	Sin EGC	2337	6	9305	11	845.9
2	74 AÑOS	M	SOSPECHA DE DEFECTO DE LA FAGOCITOSIS	Sin EGC	2100	4	9139	10	913.9
3	8 MESES	H	DEFECTO DE LA FAGOCITOSIS	Severo	1698	99.1	15	7	2.1
4	6 AÑOS	M	INMUNODEFICIENCIA NO ESPECIFICADA	Sin EGC	2413	91.7	9910	1	9910
5	8 MESES	M	INMUNODEFICIENCIA NO ESPECIFICADA	Sin EGC	3120	9.6	9222	12	768.5
6	32 AÑOS	H	INMUNODEFICIENCIA NO ESPECIFICADA	Sin EGC	4030	12	5473	11	497.5
7	32 AÑOS	M	INMUNODEFICIENCIA NO ESPECIFICADA	Sin EGC	3200	66	2594	7	370.5
8	9 MESES	M	SOSPECHA DE DEFECTO DE LA FAGOCITOSIS	Sin EGC	1000	77.4	276	12	23
9	8 AÑOS	M	ABSCEOS CEREBRALES RECURRENTES	Sin EGC	3403	98.3	235	7.7	30.5
10	6 AÑOS	H	SOSPECHA DEFECTO DE LA FAGOCITOSIS.	Sin EGC	3400	16.7	429	17.7	24.2
11	12 AÑOS	H	SOSPECHA INMUNODEFICIENCIA PRIMARIA	Sin EGC	2337	255	203062	301	674.6
12	26 AÑOS	M	SOSPECHA INMUNODEFICIENCIA PRIMARIA	Sin EGC	3080	256	202277	7649	26.4
13	42 AÑOS	M	INMUNODEFICIENCIA MIXTA	Sin EGC	5766	265	209043	9984	20.9
14	11 AÑOS	M	INMUNODEFICIENCIA MIXTA	Sin EGC	1260	416	181645	2188	83
15	3 MESES	M	SOSPECHA DE INMUNODEFICIENCIA PRIMARIA	Sin EGC	3193	219	182356	7155	25.4
16	1 MES	M	INMUNODEFICIENCIA PRIMARIA NO ESPECIFICA	Sin EGC	950	478	204706	1592	128.5
17	10 AÑOS	M	INMUNODEFICIENCIA PRIMARIA NO ESPECIFICA	Sin EGC	2480	1358	224037	11384	19.6
18	40 AÑOS	H	SOSPECHA DE INMUNODEFICIENCIA PRIMARIA	Sin EGC	2200	79.9	1446	9	160.6

Tabla 1. Resultados de la población estudiada (n=18) para la determinación de Índice Oxidativo.

Variable	Frecuencia
Sexo	
Mujeres	11 (61%)
Hombres	7 (39%)
Edad	18.76 años (21.61 DE)
Diagnósticos	
Inmunodeficiencia Primaria No especificada	6 (33%)
Sospecha de Inmunodeficiencia Primaria	4 (22%)
Sospecha de defecto de la fagocitosis	4 (22%)
Inmunodeficiencia Mixta	2 (11%)
Defecto de la Fagocitosis/ IDP	1 (6%)
Abscesos Cerebrales Recurrente	1 (6%)

Tabla 2. Resumen de variables demográficas y diagnósticos.

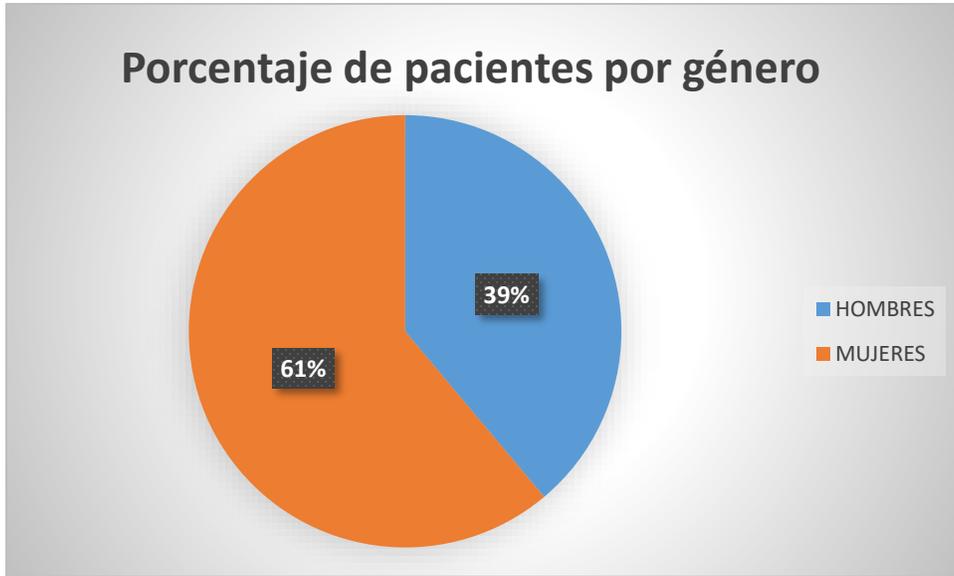


Fig. 1 Distribución de pacientes por género.

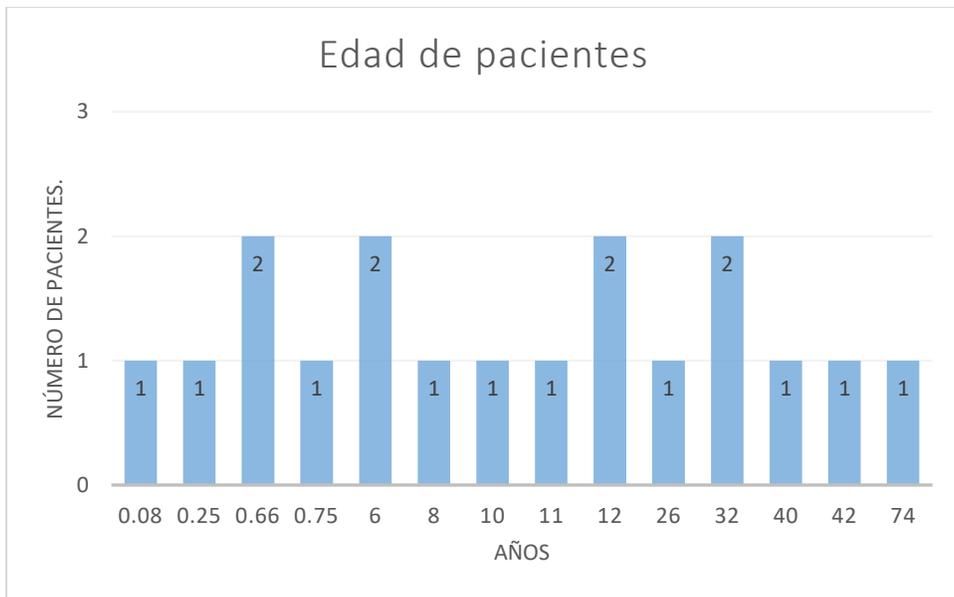


Fig. 2 Distribución de pacientes por edad.

Los diagnósticos más frecuentes fueron Inmunodeficiencia primaria no especificada con una frecuencia de 6 el cual representa el 33% de la muestra, seguidos de sospecha de Inmunodeficiencia Primaria y sospecha de Defecto de la Fagocitosis

cada uno con 4 casos, el cual representa el 22% de la muestra. Mientras que la Inmunodeficiencia Mixta se presentó en 2 casos el cual representa el 11% de la muestra y por último el Absceso Cerebral Recurrente y Defecto de la Fagocitosis con Inmunodeficiencia Primaria (IDP) con un registro de 1 caso por cada diagnóstico, el cual representa el 6% de la muestra, ver Fig.3 y Tabla 2.

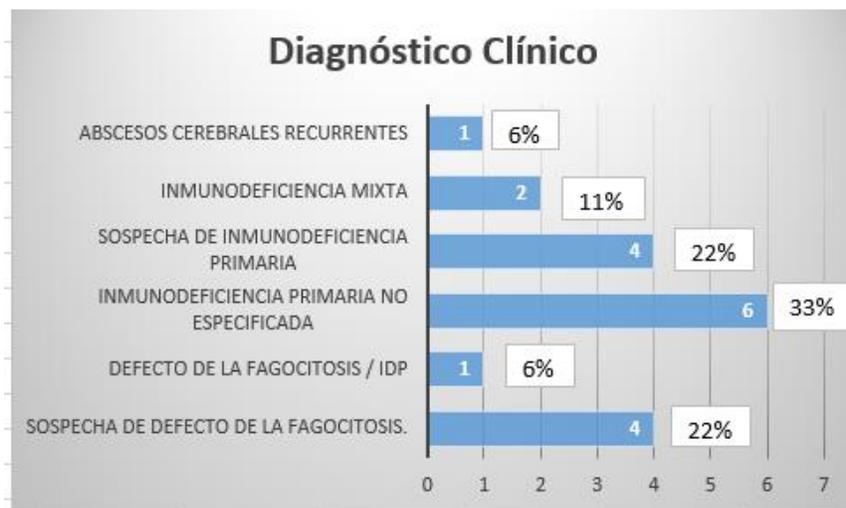


Fig. 3 Gráfico de barras de pacientes por diagnóstico.

En cuanto a la determinación del índice oxidativo de los pacientes, solo se logró determinar con un caso representativo con un IO de 2.1 con diagnóstico de Defecto de la Fagocitosis el cual se encuentra representado en el histograma de la figura número 5, comparándolo con el control que como se representa en la figura número 4.

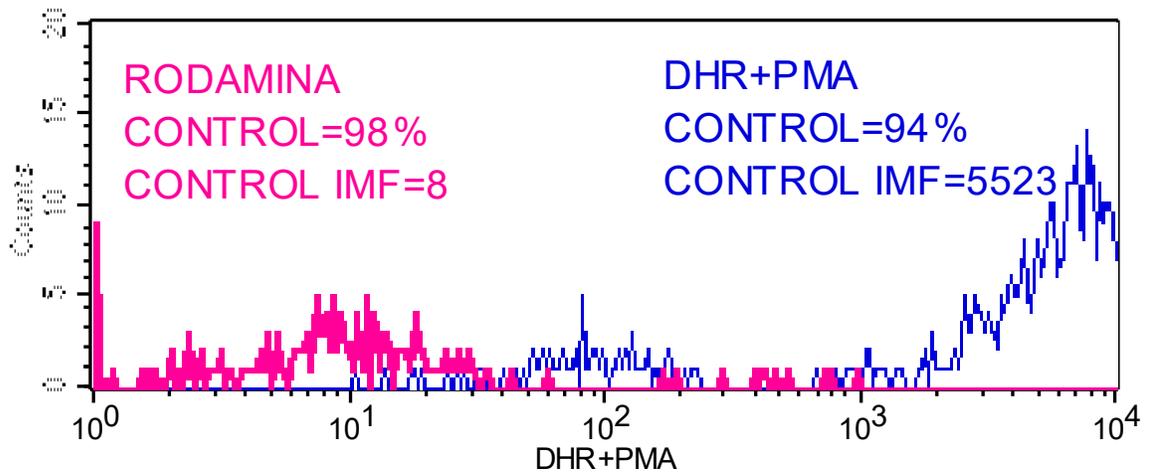


Fig.4 Histograma con determinación de IFM con Rodamina y Rodamina/PMA donde se puede calcular el Índice Oxidativo (IO= 690) en un Control Sano.

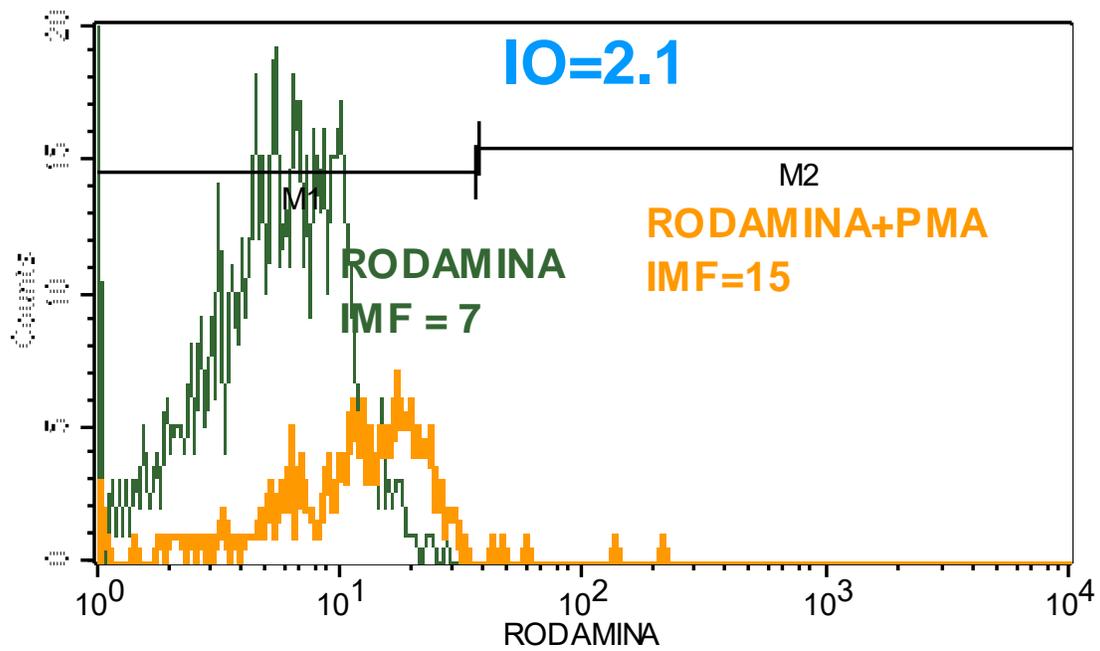


Fig.5 Histograma con determinación de IFM con Rodamina y Rodamina/PMA donde se puede calcular el Índice Oxidativo (IO= 2.1) en un paciente con Enfermedad Granulomatosa Crónica.

Para el análisis estadístico, una vez calculado el Índice oxidativo tanto de las muestras problema, como controles sanos se obtuvieron las medianas de tendencia central (percentiles 25-75%), donde el grupo de controles sano tuvo una mediana de 1292 con un intervalo de 1229.71- 1384 (25-75% respectivamente), mientras que el grupo de las muestras problemas obtuvo una mediana de 105.80 con un intervalo de 24.23 - 674.62 (25-75% respectivamente), analizando los datos de ambas poblaciones podemos interpretar que, dichas muestras tienen una diferencia significativa (1186.2) dado que ambas medianas se encuentran alejadas, siendo la mediana más pequeña la del grupo de los pacientes en comparación del grupo de controles sanos la cual tiene una mediana más alta.

Mientras que en la prueba estadística de U Mann Whitney, el grupo de controles sano obtuvo una mediana de 1292 con un intervalo del 1184.87-1387.04 (25-75%), mientras que el grupo de pacientes tuvo una mediana de 105.80 con un intervalo de 23.92-698.09 (25-75%) Fig. 6, por lo tanto al comparar las medianas de los grupos estudiados, se puede interpretar que la diferencia de medianas obtenidas de ambos grupos es mayor de la esperada, por lo tanto existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$).

RELACION DEL IO: CONTROL vs PACIENTES

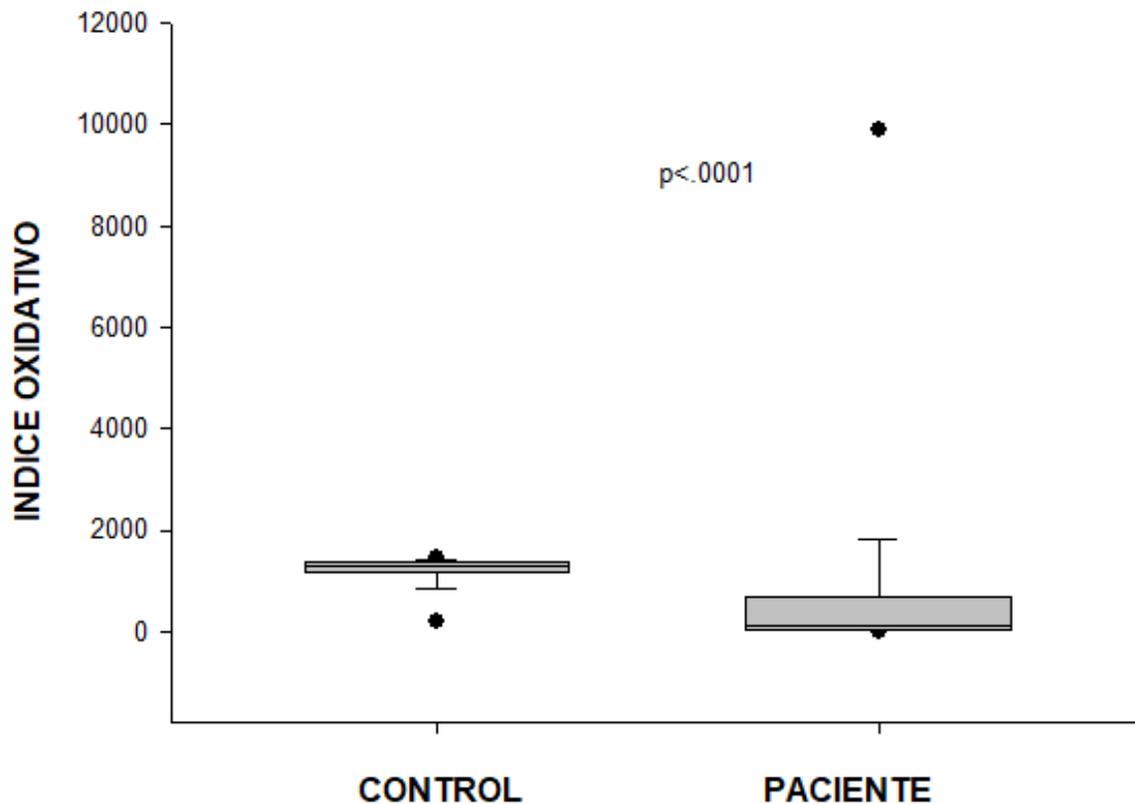


Fig. 6 Grafico del grupo control/paciente con la prueba estadística de U de Mann Whitney.

Una vez analizado tanto el grupo de controles sanos con los pacientes, se relacionó la severidad de la Enfermedad Granulomatosa Crónica de los pacientes, contra el Índice Oxidativo siendo este mismo < 5 , donde en la población estudiada de 18 individuos ($n=18$), solo se encontró un solo paciente con este criterio además de un índice menor a 5 (IO de paciente de 2.1), donde se obtuvo una correlación de Spearman de 0.622, con una $p < 0.005$, por lo que quiere decir que ambas variables con coeficiente de variación positivo y con un valor de $p < 0.05$ tienden a aumentar juntos, por lo tanto existe una relación significativa entre ambas variables comparadas.

DISCUSIÓN.

La Enfermedad Granulomatosa Crónica es una enfermedad, que se caracteriza por la presencia de granulomas, así como infecciones por microorganismos recurrentes tales como *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia*, *Serratia marcescens*, o por hongos como *Aspergillus* y *Nocardia spp* como por ejemplo, ocasionando bacteremias en casos más severos comprometiendo la vida del paciente. Dichas infecciones recurrentes son causadas por el déficit de la fagocitosis así como la baja producción de radicales libres de oxígeno como el peróxido de hidrógeno, a partir de complejo *NADPH oxidasa*. Actualmente la sospecha clínica es fundamental ante la presencia de esta inmunodeficiencia primaria que se presenta más comúnmente a edades tempranas y por familiares consanguíneos, desarrollando cuadros más severos, por tal motivo para el apoyo diagnóstico se emplean varias pruebas de laboratorio, las cuales nos ayudan a diferenciar entre otras inmunodeficiencias primarias ya sean humorales o celulares. Estas pruebas son la reducción de NTB (Nitroazul de Tetrazolo) o por la cuantificación de los radicales libres de los neutrófilos a través de la técnica de 1, 2, 3 DHR por citometría de flujo, que nos permite calcular el índice oxidativo el cual nos da una referencia acerca de la categoría en la cual se podría encontrar el paciente misma que ha sido documentada, mencionando que los índices menores a 20 los pacientes desarrollan un cuadro clínico franco, mientras que con índices menores a 10 están relacionados con estadios graves o severos que, en nuestra población estudiada tomamos un punto de corte de $IO < 5$ por la técnica estandarizada en nuestro país. La técnica de cuantificación de DHR por citometría se considera la prueba más sensible y

específica para realizar este diagnóstico, en comparación con la de NBT. Los datos más recientes documentados acerca de esta enfermedad, mencionan que tienen una incidencia mundial de 1/250,000 habitantes siendo más frecuente esta enfermedad en países como EUA, Japón y Europa, notando que en países como Turquía y Egipto un factor más frecuente es por consanguinidad, sin embargo en México, los últimos estudios realizados se demostró que la enfermedad está ligada al cromosoma X siendo el 79% de los casos reportados, y siendo la mutación del gen CYBB más frecuente, la cual codifica para la proteína gp91phox, y solo el 25% presentan mutación en la proteína P47phox de tipo de herencia autosómica recesiva, desafortunadamente en México no existe suficiente evidencia de casos reportados que, pueden ser secundarios a la baja prevalencia o al poco alcance de las pruebas que se pueden realizar de manera rutinaria, por lo tanto se dificulta realizar la comparación del diagnóstico por medio de la técnica de 1, 2, 3 DHR por citometría de flujo.

En este estudio, de la muestra estudiada (n=18) notamos que se presentó más en mujeres en un 61% en comparación con los hombres siendo de 39%, registrándose un caso con severidad en un solo paciente de 1 mes de edad (IO=2.1), además de ello se compararon las medianas por el método estadístico de U de Mann Whitney, tanto de los controles sanos y de los pacientes, siendo de 1,292 (1,184.87-1,387.04) y 105.80 (23.92-698.09) respectivamente, por lo tanto la diferencia de medianas obtenidas de ambos grupos es mayor de la esperada, pues existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$).

Además de ello se realizó una correlación entre la severidad de EGC y el Índice Oxidativo (siendo este <5), donde se calculó una correlación de Spearman de 0.622, con una $p < 0.005$, esto quiere decir, que existe una relación estadísticamente significativa entre ambas variables comparadas, esto demuestra que entre menor sea el índice oxidativo de los neutrófilos de los pacientes con EGC, mayor será la severidad de la misma, ejemplo de ello es en este caso que se registró durante este trabajo.

CONCLUSIONES.

Al comparar las medias de los grupos controles y de los pacientes se demostró una diferencia estadística significativa, por lo tanto esto evidenció que ambas poblaciones se comportan de una manera diferente, mientras que cuando se determinó la correlación entre la severidad EGC y el Índice Oxidativo de neutrófilos <5 , se demostró una relación estadísticamente significativa, por lo que se acepta la hipótesis y se concluye que existe una estrecha relación, entre estas dos variables antes mencionadas.

La determinación del índice oxidativo de los neutrófilos por la técnica de 1, 2, 3 DHR por citometría de flujo es una herramienta útil, de bajo costo económico, la cual ofrece una buena sensibilidad y especificidad ante el diagnóstico o sospecha de la Enfermedad Granulomatosa Crónica, permitiendo deducir el estadio de la enfermedad a través del índice oxidativo de cada paciente siendo este <5 como severo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

(1) Picard C, Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chatila T, Conley ME et al. Primary immunodeficiency diseases: an update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency 2015. *J Clin Immunol.* 2015; 35: 696-726.

(2) Rojas R.J., Alvarez A.J, Montoya G.J, Trujillo V. C. Validación de la técnica de dihidrorodamina 123 para el diagnóstico de la enfermedad granulomatosa crónica en Colombia. *Inmunología* 2014;33(3):71–80

(3) Vignais PV. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci.* 2002; 59: 1428-1459.

(4) Roos D. Chronic granulomatous disease. *Br Med Bull.* 2016; 118: 50-63.

(5) Matute JD, Arias AA, Wright NA, Wrobel I, Waterhouse CC, LiXJ, 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;114:3309–15

(6) Zhou Q, Hui X, Ying W, Hou J, Wang W, Liu D, et al. A cohort of 169 chronic granulomatous disease patients exposed to BCG vaccination: a retrospective study from a single center in Shanghai, China (2004–2017). *J Clin Immunol*. 2018;38(3):260–72.

(7) Al-Zadjali S, Al-Tamemi S, Elnour I, AlKindi S, Lapoumeroulie C, Al-Maamari S, et al. Clinical and molecular findings of chronic granulomatous disease in Oman: family studies. *Clin Genet*. 2015;87(2):185–9.

(8) Rawat A, Singh S, Suri D, Gupta A, Saikia B, Minz RW, et al. Chronic granulomatous disease: two decades of experience from a tertiary care centre in North West India. *J Clin Immunol*. 2014;34(1):58–67.

(9) Jirapongsananuruk O, Malech HL, Kuhns DB, Niemela JE, Brown MR, Anderson-Cohen M, et al. Diagnostic paradigm for evaluation of male patients with chronic granulomatous disease, based on the dihydrorhodamine 123 assay. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(2):374–9.

(10) Leon LXB GL. Características epidemiológicas, tipo de herencia y manifestaciones infecciosas de pacientes con enfermedad granulomatosa crónica. Tesis (especialidad en pediatría) UNAM Facultad de Medicina. 2017; tesis.unam.mx.

(11) Lun A, Schmitt M, Renz H. Phagocytosis and oxidative burst: reference values for flow cytometric assays independent of age. Clin Chem. 2000; 46: 1836-1839.

(12) Hawley T. S. and Hawley R. G. Flow Cytometry Protocols. Totowa, NJ, 2001: 2; 18-19.

(13) Espinosa PS y cols. Implementación de DHR en México; Capacitación en Hospitales de México para el diagnóstico de enfermedad granulomatosa crónica por la técnica de 1-2-3 dihidrorodamina, Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas, 2017; 26: 76-83.

(14) Walrand S, Valeix S, Rodriguez C, Ligot P, Chassagne J, Vasson MP. Flow cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison of three fluorescent probes. Clin Chim Acta. 2003; 331: 103-110.

(15) Marciano B., Zerbe C., Falcone L., Ding L., Daub J., Kreuzburg s., et al. X-linked carriers of chronic granulomatous disease: Illness, lyonization, and stability. J Allergy Clin Immunol 2018;141:365-71

(16) Berrón R., Morín C., Cano G, Yamazaki N., Gómez T., Vargas C. Canseco R., et al. Detection of inheritance pattern in thirty-three Mexican males with chronic granulomatous disease through 123 dihydrorhodamine assay. Allergol Immunopathol (Madr). 2014; 579: 1-6.

ANEXO I

Hoja de Recolección de Datos

Nombre Completo: _____

Edad: _____ años _____ meses

Género: _____

Lugar de Procedencia _____

Domicilio Actual _____

Número de Seguridad Social: _____

AHF

Inmunodeficiencia Primaria Familiar SI NO

APP

Edad al diagnóstico Clínico _____ años _____ meses

Estudios de Laboratorio y Gabinete

	Determinación	Resultado
Paciente	Cantidad de Neutrófilos/ μ l	
	Índice Oxidativo de Neutrófilos	
Control	Cantidad de Neutrófilos/ μ l	
	Índice Oxidativo de Neutrófilos	

ANEXO II control de calidad. Perlas CST



BD

**BD FACSDiva™
CS&T IVD Beads**

N.º de catálogo	Volumen
656046	Un vial de 3 mL
656047	Tres viales de 3 mL

7/2014 23-13317-02

IVD **CE**

BD, el logotipo de BD y las demás marcas comerciales son propiedad de Becton, Dickinson and Company. © 2014 BD

Apertura del espacio de trabajo de BD Cytometer Setup and Tracking

1. Inicie el citómetro de flujo BD FACSCanto II y el ordenador.
2. Inicie el software BD FACSDiva.
3. Realice el inicio del sistema de fluidos.
4. Seleccione Cytometer (Citómetro) > CST una vez finalizado el proceso de calentamiento del láser.

Se abre el espacio de trabajo BD™ Cytometer Setup and Tracking (CS&T).

5. Realice las tareas de CS&T.

Tabla 3 Tareas realizadas con las BD FACSDiva CS&T IVD beads

Tarea	Cuándo se realiza	Quién la realiza
Importar un archivo de lote de microesferas	Cada vez que se utiliza un nuevo lote de microesferas	Administrador
Definir una línea de base	En la configuración inicial, después de realizar tareas de mantenimiento y siempre que caduca la línea de base	Administrador
Realizar un control de funcionamiento	Diariamente	Cualquier operador
Determinar los valores de LW	Cada 7 días, siempre que se define una nueva línea de base y siempre que se restablecen los valores diana para un nuevo lote de microesferas	Cualquier operador
Restablecer los valores diana	Cada vez que se utiliza un nuevo lote de microesferas	Administrador

1. USO PREVISTO

Las BD FACSDiva™ CS&T IVD beads están diseñadas para el diagnóstico in vitro con citómetros de flujo BD FACSCanto™ II que ejecuten el software BD FACSDiva™. Las BD FACSDiva CS&T IVD beads se utilizan para configurar el citómetro, realizar controles de calidad (CC) diarios de su funcionamiento, y determinar los valores de lavado/lavado (LW).

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Las BD FACSDiva CS&T IVD beads permiten que el software caracterice, realice el seguimiento e informe de las mediciones realizadas por el citómetro de forma automática. Los algoritmos automáticos del software definen los valores de referencia del citómetro. Una vez que se definen los valores diana de la intensidad media de fluorescencia (MFI) basal, las microesferas se utilizan para realizar comprobaciones diarias del funcionamiento. Las BD FACSDiva CS&T IVD beads también se utilizan para restablecer los valores diana de MFI cuando se cambia a un nuevo lote de microesferas.

Además, las BD FACSDiva CS&T IVD beads se usan para determinar manualmente los valores de lisado/lavado (LW). Una vez guardados, los valores de LW se actualizan automáticamente una vez que el usuario realiza la comprobación diaria del funcionamiento del citómetro, basándose en el funcionamiento del instrumento ese día concreto.

3. PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Las BD FACSDiva CS&T IVD beads están conjugadas con fluorocromos que son excitados por los láseres del citómetro. Las microesferas emiten fluorescencia en los detectores usados para los fluorocromos siguientes (consultar Tabla 1).

Tabla 1 Fluorocromos compatibles con las BD FACSDiva CS&T IVD beads

Fluorocromos	Láser de excitación	Rango de emisión (nm)
FITC, PE, PerCP-Cy TM 5.5 ^a , PE-Cy TM 7	Azul	500–800
APC, APC-Cy7 ^b , APC-H7	Rojo	650–800
BD Horizon TM V450, BD Horizon TM V500-C	Violeta	420–700

a. CyTM es una marca comercial de GE Healthcare. Este producto está sujeto a los derechos de propiedad de GE Healthcare y Carnegie Mellon University, y se fabrica y vende bajo licencia de GE Healthcare. La venta de este producto solo está autorizada para diagnóstico in vitro. No se otorga licencia para ningún otro uso. Si necesita alguna licencia adicional para utilizar este producto y no la tiene, devuelva este material sin abrir a BD Biosciences, 2350 Qume Drive, San José, CA 95131, y se le reintegrará el importe desembolsado por el material.

b. APC-Cy7: N.º de patente en EE. UU. 5,714,386

Las BD FACSDiva CS&T IVD beads contienen cantidades iguales de microesferas de poliestireno de intensidad brillante de 3 µm, media de 3 µm y débil de 2 µm. La figuras siguientes muestran las BD FACSDiva CS&T IVD beads analizadas mediante citometría de flujo. Los datos se adquirieron con un citómetro de flujo BD FACSCanto II y el software BD FACSDiva. La excitación con láser tuvo lugar a 488 nm.

Figura 1 Diagrama de puntos que muestra BD FACSDiva CS&T IVD beads

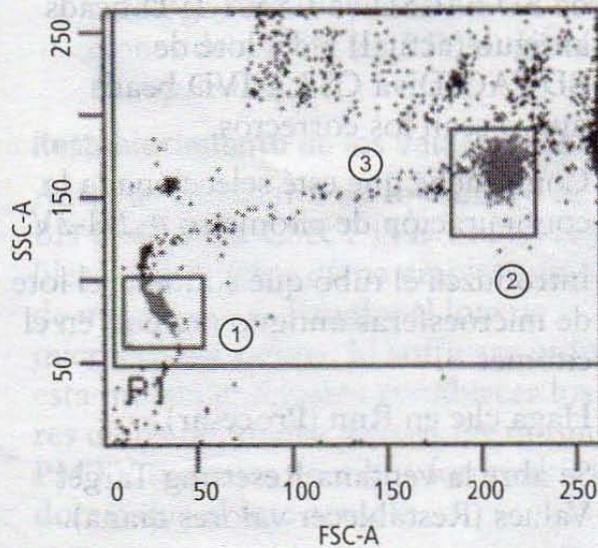
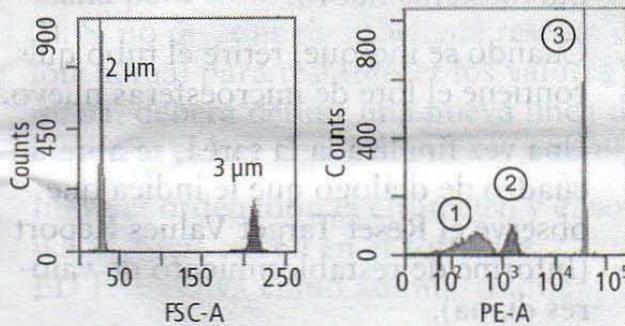


Figura 2 Histogramas que muestran el tamaño de las microesferas y la distinción de las BD FACSDiva CS&T IVD beads



N.º	Descripción
1	Débil
2	Media
3	Brillante

La MFI y el coeficiente de variación robusto (rCV) se miden para cada intensidad de microesfera en todos los detectores de fluorescencia. Los algoritmos del software diferencian la señal de fluorescencia de cada tipo de microesfera según el tamaño y la intensidad de fluorescencia en cada detector. El software emplea entonces estos datos para calcular y documentar una serie de mediciones de configuración,

10. Carta de Consentimiento Informado y anexos.



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN Y
POLITICAS DE SALUD

COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO
(NIÑOS Y PERSONAS CON
DISCAPACIDAD)

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN

Nombre del estudio:	“Relación del índice oxidativo de neutrófilos con la severidad de la enfermedad granulomatosa crónica”.
Patrocinador externo (si aplica):	No Aplica.
Lugar y fecha:	Azcapotzalco, Ciudad de México.
Número de registro:	
Justificación y objetivo del estudio:	Conocer la relación que hay entre la deficiencia de sustancias llamadas enzimas que producen sus glóbulos blancos las cuales ayudan a eliminar a los microorganismos, este problema está presente en una enfermedad llamada “Enfermedad Granulomatosa Crónica,” que mediante una prueba de fluorescencia que se puede realizar en su sangre, se le puede dar a usted un diagnóstico a tiempo.
Procedimientos:	Se tomará una pequeña cantidad de su sangre sin alterar sus resultados de laboratorio programados, para poder saber si las células que defienden a su cuerpo de infecciones, funcionan bien en contra de microorganismos.
Posibles riesgos y molestias:	Moretón en sitio de punción.
Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio:	Saber si usted tiene esta enfermedad para darle un tratamiento a tiempo por su médico especialista, evitando que tenga futuras complicaciones, además de darle consejo genético. La información obtenida será de utilidad para el servicio de Alergia e Inmunología Clínica.
Información sobre resultados y alternativas de tratamiento:	La información de sus resultados serán útiles para saber si sus glóbulos blancos son capaces de eliminar hongos o bacterias; conociendo los resultados de su estudio se podría saber si usted tiene ésta enfermedad y darle un buen tratamiento.
Participación o retiro:	Usted es libre de retirarse del estudio en el momento que usted decida. La atención médica será la misma para usted y su familia.

Privacidad y confidencialidad:

Sus datos personales se guardarán en secreto; no serán dados a conocer su nombre, ni su número de seguridad social.

En caso de colección de material biológico (si aplica):

No autoriza que se tome la muestra.

Si autorizo que se tome la muestra solo para este estudio.

Si autorizo que se tome la muestra para este estudio y estudios futuros.

Disponibilidad de tratamiento médico en
derechohabientes (si aplica):

Beneficios al término del estudio:

Saber si usted tiene esta enfermedad cuando tenga un resultado menor a 5 (Índice de Oxidación), lo cual quiere decir que usted tenga esta enfermedad.

En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a:

Investigador
Responsable:

**Dra. Laura Arcelia Montiel Cervantes. 57245900
Ext 23090**

Colaboradores:

Dr. Edwin Samir Mendieta Bautista. 2461165721

En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a: Comisión de Ética de Investigación de la CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos, Colonia Doctores. México, D.F., CP 06720. Teléfono (55) 56 27 69 00 extensión 21230, Correo electrónico: comision.etica@imss.gob.mx

Nombre y firma del sujeto

Dra. Laura Montiel Cervantes.

Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento

Testigo 1

Testigo 2

Nombre, dirección, relación y firma

Edwin Samir Mendieta Bautista.

Nombre, dirección, relación y firma

Este formato constituye una guía que deberá completarse de acuerdo con las características propias de cada protocolo de investigación, sin omitir información relevante del estudio

Clave: _____