



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

“Actividad residual de la NADPH oxidasa y enfermedad por micobacterias en pacientes con enfermedad granulomatosa crónica”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:

Karla Ximena León Lara

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Lizbeth Blancas Galicia
Instituto Nacional de Pediatría

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Isabel Medina Vera
Instituto Nacional de Pediatría

Dra. Martha Guevara Cruz
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y
Nutrición Salvador Zubirán

Ciudad de México, OCTUBRE 2020



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.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi tutora, Dra. Lizbeth Blancas Galicia por su apoyo para la realización de este trabajo y darme la oportunidad de formar parte su equipo.

A mi comité tutorial, Dra. Isabel Medina Vera y Dra. Martha Guevara Cruz, por el tiempo dedicado en este proyecto.

Agradezco a los pacientes y sus familias, sin ellos este trabajo no sería posible.

Este proyecto recibió financiamiento de la Fundación Mexicana para niñas y niños con inmunodeficiencias A.C.

La sustentante, Karla Ximena León Lara, recibe beca CONACYT para estudios de maestría con CVU # 967544.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	2
ÍNDICE DE TABLAS	3
ÍNDICE DE FIGURAS	4
ABREVIATURAS.....	5
I. RESUMEN ESTRUCTURADO.....	7
II. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	9
III. ANTECEDENTES.....	10
a. Epidemiología de la EGC.....	10
b. Inmunopatología de la EGC	11
c. Medición de la actividad funcional de la NADPH oxidasa	13
d. Enfermedad por micobacterias en pacientes con EGC.....	14
e. Mecanismos de control de micobacterias por células huésped	19
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
V. JUSTIFICACIÓN.....	22
VI. HIPÓTESIS	22
VII. OBJETIVOS	22
VIII. MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
IX. DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO	26
X. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	27
XI. CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	28
XII. RESULTADOS.....	29
XIII. DISCUSIÓN	39
XIV. SESGOS POTENCIALES Y LIMITANTES	44
XV. CONCLUSIONES.....	44
XVI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	45
XVII. ANEXOS	50

ÍNDICE DE TABLAS

Número	Título de tablas	Página
Tabla 1	Pacientes con enfermedad granulomatosa crónica y enfermedad por micobacterias.	18
Tabla 2	Clasificación del grado de acuerdo según Landis y Koch.	27
Tabla 3	Análisis de concordancia por correlación intra-clase/ inter-clase.	29
Tabla 4	Genotipo e índice de estimulación en neutrófilos de 54 pacientes con enfermedad granulomatosa crónica.	31
Tabla 5	Tratamiento antibiótico y evolución de enfermedad por BCG-itis (localizada o regional) en pacientes con enfermedad granulomatosa crónica.	34
Tabla 6	Tratamiento antibiótico y evolución de enfermedad por BCG-osis (diseminada) en pacientes con enfermedad granulomatosa crónica.	35
Tabla 7	Tratamiento antibiótico para enfermedad por tuberculosis en pacientes con enfermedad granulomatosa crónica.	36
Tabla 8	Comparación del índice de estimulación de 62 pacientes con enfermedad granulomatosa crónica de acuerdo al estado de enfermedad por micobacterias.	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Número	Título de la figura	Página
Figura 1	Sistema de la NADPH oxidasa en las células del sistema inmune.	12
Figura 2	Flujograma del estudio.	26
Figura 3	Índice estimulación por tipo de célula.	30
Figura 4	Curvas ROC para enfermedad por micobacterias.	38
Figura 5	Grafica de regiones con base a tamaño y granularidad.	54
Figura 6	Selección de las diferentes regiones dependiendo a tamaño y granularidad.	54
Figura 7	Histogramas de la florescencia emitida por neutrófilos en cada condición en sujeto sano.	55

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AR	Autosómica recesiva
BCG	Bacillus de Calmette y Guérin
EGC	Enfermedad granulomatosa crónica
ENR	Especies de nitrógeno reactivo
Eros	Esencial para especies reactivas de oxígeno, de sus siglas en inglés <i>essential for reactive oxygen species</i>
1,2,3	1-2-3 dihidrorrodamina
DHR	
.FCS	Extensión de archivos de citometría de flujo, de sus siglas en inglés <i>flow cytometry standard</i>
FSC-A	Área de dispersión frontal, de sus siglas en inglés <i>forward scatter area</i>
GTP	Guanosina-5'-trifosfato
H₂O₂	Peróxido de hidrogeno
HOCl⁻	Ion de hipoclorito
IC95%	Intervalo de confianza al 95%
IE	Índice estimulación
IFM	Intensidad de fluorescencia media
IFN-γ	Interferón gamma
INP	Instituto Nacional de Pediatría
IL	Interleucina
iONS	Enzima óxido nítrico sintetasa inducible, de sus siglas en inglés <i>inducible nitric oxide synthase</i>
KXLL	Karla Ximena León Lara
LASID	Sociedad Latinoamericana de Inmunodeficiencias, de sus siglas en inglés <i>Latin American Society for Immunodeficiencies</i>
LBG	Lizbeth Blancas Galicia
LX	Ligada al X
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa, de sus siglas en inglés <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase</i>
NIH	Institutos Nacionales de Salud, de sus siglas en inglés <i>National Institutes of Health</i>
NBT	Nitroazul de tetrazolio, de sus siglas en inglés <i>nitroblue tetrazolium</i>
O₂⁻	Superóxido
OH⁻	Radical hidroxilo
PBS1X	Tampón fosfato salino, de sus siglas en inglés <i>phosphate buffered saline</i>

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, de sus siglas en inglés <i>polymerase chain reaction</i>
PE-A	Área de ficoeritrina, de sus siglas en inglés <i>phycoerythrin área</i>
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato, de sus siglas en inglés <i>phorbol myristate acetate</i>
ROC	Característica Operativa del Receptor, de sus siglas en inglés <i>receiver operating characteristic</i>
ROS	Especies reactivas de oxígeno, de sus siglas en inglés <i>reactive oxygen species</i>
SOD	Superóxido dismutasa
SSC-A	Área de dispersión lateral, de sus siglas en inglés <i>side scatter área</i>
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa, de sus siglas en inglés <i>tumor necrosis factor</i>

I. RESUMEN ESTRUCTURADO

Antecedentes: La enfermedad granulomatosa crónica (EGC) se caracteriza por un defecto funcional en el complejo enzimático NADPH oxidasa, por lo que presentan una alteración en la capacidad de producir especies reactivas de oxígeno (ROS). Aunque todos los pacientes con EGC tienen afectada alguna subunidad de la NADPH oxidasa, la actividad residual de esta enzima es variable entre ellos. En pacientes con EGC, la actividad de la enzima puede influir en el riesgo de enfermedad por micobacterias. Las micobacterias son un patógeno importante causante de enfermedad en pacientes con EGC en países donde la tuberculosis es endémica y donde se aplica la vacuna de BCG de manera rutinaria.

Objetivo: Asociar la actividad residual de la NADPH oxidasa y la enfermedad por micobacterias en pacientes con EGC.

Métodos: Estudio observacional, analítico, transversal, ambispectivo. Se aplicaron los criterios de selección a los pacientes con EGC registrados en la Unidad de Investigación en Inmunodeficiencias del 2013 al 2019. Se determinó la actividad residual de la NADPH oxidasa a través del cálculo del índice de estimulación (IE) a partir de los archivos de citometría de flujo con 1,2,3 dihidrorrodamina y se asoció con las infecciones por micobacterias registradas en el expediente clínico hasta el momento.

Análisis estadístico: La diferencia en el IE entre los grupos con y sin enfermedad por micobacterias se determinó con U de Mann-Whitney. Los valores del IE se dicotomizaron tomando el punto de corte obtenido mediante la estadística J de Youden, junto con el análisis de Característica Operativa del Receptor para enfermedad por micobacterias. Los valores de IE se dicotomizaron de acuerdo con el punto de corte obtenido, para el cálculo de la razón de momios con un intervalo de confianza del 95% (IC del 95%). El valor de $p < 0.05$ se consideró significativo.

Resultados: Se incluyeron 62 pacientes con diagnóstico de EGC, 52 (84%) hombres. La mediana de IE al diagnóstico en neutrófilos fue de 1.39 (0.4-7.2), en

linfocitos de 1.32 (0.52-4.59) y en monocitos de 1.21 (0.2-5.26). Se diagnosticó enfermedad por micobacterias en 47 (76%) de los pacientes incluidos. Se observó un IE más bajo en las tres líneas celulares entre los pacientes con enfermedad por micobacterias en comparación con los que no la presentaron: IE en neutrófilos 1.34 [0.4 - 5] *versus* 1.87 [0.88 - 7.2] $p = 0.01$; IE en linfocitos 1.21 [0.5 - 3.1] *versus* 1.73 [1.04 - 4.59] $p = 0.008$; IE en monocitos 1.14 [0.2 - 5.2] *versus* 1.44 [0.8 - 4.6] $p = 0.026$. Un IE en neutrófilos y linfocitos ≤ 1.5 se asoció con el mayor riesgo de enfermedad por micobacterias (neutrófilos OR 5.87 [IC95% 1.6 - 21] $p = 0.0005$; linfocitos OR 5.00 [IC95% 1.3 - 18] $p = 0.01$). Un IS en monocitos ≤ 1.8 presentó un OR de 5.00 [IC95% 1.37-18] $p = 0.01$.

Conclusiones: Se observó una menor producción de ROS, medida por el IE, en neutrófilos, linfocitos y monocitos de pacientes con EGC que presentaron enfermedad por micobacterias en comparación con los que no lo presentaron. Los pacientes con EGC con un valor de IE ≤ 1.5 en neutrófilos y linfocitos ó ≤ 1.8 en monocitos tuvieron el mayor riesgo de enfermedad por micobacterias. Por lo que la actividad residual de la NADPH oxidasa es un parámetro importante asociado con la enfermedad por micobacterias en pacientes con EGC.

II. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe asociación entre la actividad residual de la NADPH oxidasa y la enfermedad por micobacterias en pacientes con enfermedad granulomatosa crónica?

III. ANTECEDENTES

La enfermedad granulomatosa crónica (EGC) es un error innato de la inmunidad con un patrón de herencia ligada al X (LX) o autosómica recesiva (AR). Es causada por un deterioro funcional del complejo enzimático nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH de sus siglas en inglés *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase*). El complejo NADPH oxidasa se compone de proteínas citosólicas y de membrana que se unen posterior a la activación celular durante la fagocitosis para producir superóxido (1,2). A partir del superóxido se generan otras especies reactivas de oxígeno (ROS, de sus siglas en inglés *reactive oxygen species*), los cuales son esenciales para la eliminación de bacterias y hongos. Las ROS también están implicados en la regulación de diferentes vías de la inflamación (3). Las mutaciones o variantes patogénicas en cualquiera de los genes que codifican para las cinco subunidades estructurales de la NADPH oxidasa, gp91^{phox}, p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} y la proteína chaperona Eros (de sus siglas en inglés *essential for reactive oxygen species*) dan como resultado una producción defectuosa de ROS y el síndrome de la EGC (1,4,5). La enfermedad se caracteriza por infecciones graves y recurrentes, autoinmunidad y un estado inflamatorio que resulta en la formación de granulomas (1,2).

a. Epidemiología de la EGC

A nivel mundial se estima que la EGC tiene una incidencia de 1 en 120 000 a 300 000 recién nacidos vivos, sin embargo, esta incidencia varía dependiendo de la región (6,7). Las cohortes más grandes reportadas hasta la fecha son de Europa con 429 pacientes (6) y de Estados Unidos con 368 pacientes (7), esta última describió una incidencia de 1 en 200,000 recién nacidos vivos. En América Latina se han publicado dos cohortes de pacientes con EGC, en donde se incluyeron 2 (8) y 11 (9) pacientes mexicanos. Conti *et al.* describieron las características de 16 mexicanos con micobacterias (10). En México, la única cohorte reportada cuenta con 93 pacientes diagnosticados con la enfermedad (11).

En general, el diagnóstico de EGC se realiza en los primeros 5 años de vida, aunque puede variar dependiendo del tipo de herencia. En las formas LX la edad promedio al diagnóstico es de 3 años y en las AR de 11 años (9,12). En general, el

tipo de herencia LX es el más frecuente con un 65-70% (6,7,13), sin embargo, en regiones del mundo con tasas altas de consanguinidad, como en los países árabes, Israel y la India, el tipo de herencia más frecuente es la EGC AR, representando alrededor del 62% de los casos (14–16).

b. Inmunopatología de la EGC

La EGC es causada por variantes patogénicas en los genes que codifican las proteínas *phox*, subunidades del complejo enzimático NADPH oxidasa. El defecto en la proteína gp91^{phox}, codificado por el gen *CYBB*, se hereda de forma LX, mientras que los defectos en las proteínas p22^{phox}, codificado por el gen *CYBA*, p47^{phox} por el gen *NCF1*, p67^{phox} por el gen *NCF2*, p40^{phox} por el gen *NCF4* y Eros por el gen *CYBC1* se heredan de forma AR (1,4,17). El complejo enzimático NADPH oxidasa se expresa en fagocitos tales como neutrófilos, monocitos y macrófagos (18). También se expresa, aunque en menor medida, en otras células como células dendríticas, eosinófilos, linfocitos B y T (19). La expresión de las subunidades de la NADPH oxidasa y su actividad enzimática es mayor en los neutrófilos (17,19,20). La NADPH oxidasa está implicada en la erradicación de ciertos agentes infecciosos, en la digestión de antígenos proteicos y en procesos celulares regulados por ROS que modulan la inflamación (19,21).

Las subunidades que forman el complejo enzimático NADPH oxidasa incluyen el flavocitocromo b 558, un heterodímero compuesto por gp91^{phox} (NOX2) y p22^{phox}, el cual está localizado en las membranas citoplasmáticas y del fagosoma. Además de cuatro proteínas citosólicas que se desplazan del citosol hacia la membrana durante la activación celular: p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} y Eros, junto con la forma de Rac unida a GTP. La fosforilación de p47^{phox} y la formación de Rac-GTP son dos eventos clave en el ensamblaje del complejo en la membrana. La subunidad p67^{phox} es un cofactor catalítico involucrado en la transferencia inicial de electrones desde la NADPH al flavocitocromo b 558, mientras que las otras subunidades cumplen varios roles en la regulación del ensamblaje y la actividad del complejo NADPH oxidasa (4,19,20,22). La proteína transmembranal Eros codificada por el gen *CYBC1* actúa como una enzima chaperona en el proceso de dimerización de gp91^{phox} y p22^{phox}, que son el centro catalizador de la enzima. En individuos con deficiencia de esta

proteína, la producción residual de ROS es baja (pero no ausente), similar a lo que ocurre en EGC por deficiencia de $p47^{phox}$ (5,23).

El papel de estas enzimas es transferir electrones del NADPH citoplasmático al oxígeno extracelular o del fagolisosoma, esta reacción resulta en la formación de superóxido (O_2^-) (17,19) (**Figura 1**). El O_2^- es un compuesto antimicrobiano relativamente débil y tiene una vida media muy corta, sin embargo, el O_2^- sirve como precursor de otros ROS potentes por acción de la superóxido dismutasa (SOD), como peróxido de hidrogeno (H_2O_2), ion de hipoclorito ($HOCl^-$) y radicales hidroxilo (OH^-) que son cruciales para eliminar diferentes especies de bacterias y hongos, mediante la desnaturalización de su ácido desoxirribonucleico (ADN) y proteínas (21,24). La mayor actividad catalítica de los fagocitos se atribuye a la capacidad para producir grandes cantidades de ROS por este complejo multimérico con funciones microbicidas e inmunorreguladoras (3,24). La cantidad de ROS producidos por la NADPH oxidasa posterior a un estímulo es independiente de la edad del paciente y se mantiene estable a lo largo de la vida (25,26)

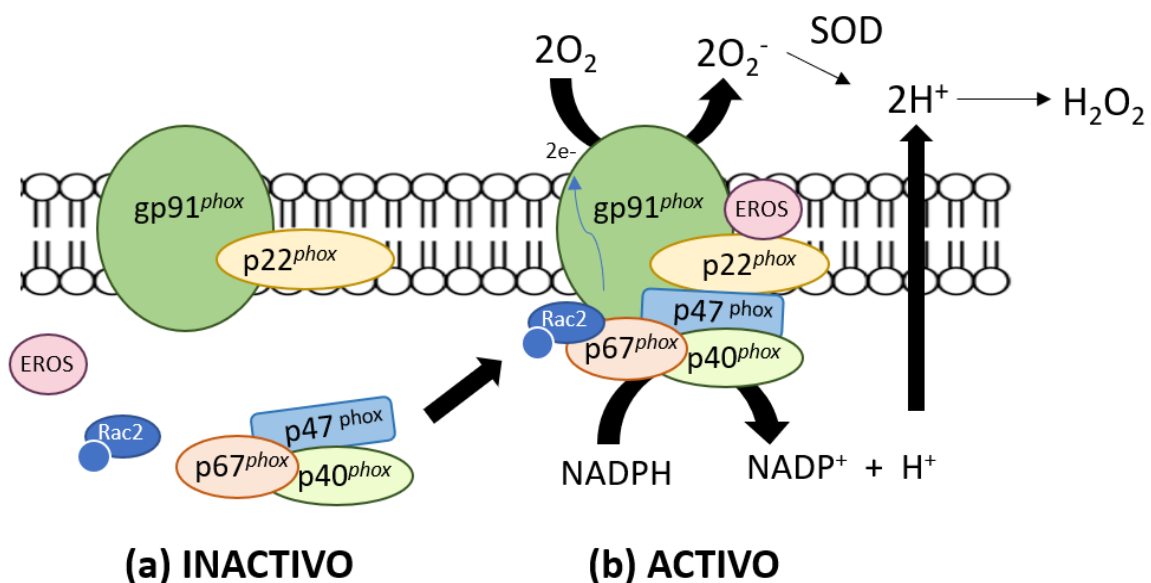


Figura 1. Sistema de la NADPH oxidasa en las células del sistema inmune. a) En reposo las subunidades de membrana y citosólicas están disgregadas. b) En estado activo tras el estímulo, las diferentes subunidades se acoplan, los electrones se transfieren a través de la subunidad catalítica $gp91^{phox}$ al oxígeno extracelular, lo que conduce a la formación de anión superóxido (O_2^-) y por acción de la superóxido dismutasa (SOD) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Adaptado de “Phagocyte NADPH oxidase and specific immunity” (p. 636), por Cachat J, et al., 2015, Clin Sci (Lond), 128(10) (19).

Las variantes patogénicas en los genes *CYBB*, *CYBA*, *NCF1* y *NCF2* resultan en la disminución o ausencia de ROS y dan como consecuencia la patología denominada EGC clásica. La EGC clásica se caracteriza por infecciones recurrentes y graves por bacterias y hongos, además de manifestaciones asociadas a una inflamación aberrante (16,17). En el 2009 se describió el primer caso de deficiencia de $p40^{phox}$ causado por variantes patogénicas en el gen *NCF4* (27), diez años después se reportó una cohorte de 24 pacientes con esta deficiencia, con manifestaciones predominantemente inflamatorias o autoinmunes (28). En el 2018 se describieron por primera vez pacientes con deficiencia en la proteína Eros, lo cual se debe a variantes patogénicas en el gen *CYBC1* (23,29). Al igual que los pacientes con deficiencia de $p40^{phox}$ los pacientes con deficiencia de Eros, presentan producción residual de ROS y las manifestaciones inflamatorias predominaron sobre las infecciosas, por lo que a estas formas de EGC se les denominan “no clásicas” (28).

c. Medición de la actividad funcional de la NADPH oxidasa

Para medir la actividad funcional de la NADPH oxidasa se han desarrollado diferentes métodos que miden la producción de ROS intracelular o en el espacio extracelular. Algunas pruebas como la quimioluminiscencia y la reducción del citocromo c, requieren el aislamiento de células fagocíticas y, por lo tanto, mayor cantidad de sangre y de procedimientos más complejos para la medición de ROS y diagnóstico de EGC. Estos ensayos permiten monitorear la producción y liberación de aniones O_2^- extracelulares utilizando equipos fotométricos o luminométricos (30). Otra técnica para evaluar la liberación de aniones O_2^- es el ensayo con nitroazul de tetrazolio (NBT de sus siglas en inglés *nitroblue tetrazolium*). La prueba consiste en exponer a los neutrófilos al colorante NBT y a un estímulo que active el neutrófilo, como el forbol 12-miristato 13-acetato (PMA de sus siglas en inglés *phorbol myristate acetate*). En las células activadas el O_2^- reduce el colorante amarillo soluble NBT a formazán de color azul, por tanto, el cambio de color indica producción de O_2^- (31). Esta prueba se puede realizar en sangre total o neutrófilos purificados durante las primeras 48 horas de la toma. Puede haber falsos negativos para el diagnóstico de EGC, principalmente en aquellos pacientes que presentan

producción residual de ROS, debido a que evalúa un número limitado de células y no permite la cuantificación de ROS (22).

Los ensayos basados en citometría de flujo tienen la ventaja de que se pueden evaluar decenas de miles de células en un período de tiempo muy corto utilizando pequeños volúmenes de sangre (32). Además, disminuyen la probabilidad de artefactos que modifiquen la función de la enzima causados por los procedimientos de purificación de neutrófilos ya que la producción de ROS se puede medir también en sangre total (32). Mediante esta técnica los neutrófilos *in vitro* se ponen en contacto con un estímulo de la NADPH oxidasa como el PMA, se agrega un compuesto no fluorescente que al interactuar con los ROS producidos se transforma en un compuesto fluorescente y la emisión de fluorescencia se mide a través de un citómetro de flujo. Los fluorocromos que han sido utilizados son 1-2-3 dihidrorrodamina (1,2,3 DHR), 2,7 diclorohidrofluoresceína, 6G dihidrorrodamina entre otros (33). La 1,2,3 DHR es el fluorocromo más sensible para la detección de ROS (33). Durante el estallido respiratorio la 1,2,3 DHR reacciona con el H₂O₂ para formar 1,2,3 rodamina, que es una molécula fluorescente, lo que permite la medición de la intensidad de fluorescencia media (IFM) (32). En sujetos sanos posterior a un estímulo se puede cuantificar en el citómetro un incremento en la IFM, en pacientes con EGC no hay incremento en la IFM o este es mínimo. En mujeres portadoras de variantes patogénicas en el gen ligado al X, hay subpoblaciones de neutrófilos con menor IFM (22).

d. Enfermedad por micobacterias en pacientes con EGC

En Europa y Estados Unidos las micobacterias no son un agente frecuente causante de enfermedad en pacientes con EGC e incluso no se consideran como parte del cuadro clínico típico de la EGC (6,7,12,13). La enfermedad por micobacterias es más frecuente en pacientes con EGC provenientes de países donde la tuberculosis es endémica y donde la vacuna Bacillus de Calmette-Guérin (BCG) se administra de manera rutinaria (**Tabla 1**) (9,34–36). En países en desarrollo, como Turquía (37), Omán (38), Irán (35) o países latinoamericanos (9,11) *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium tuberculosis* son patógenos importantes en pacientes con EGC. Esto podría apoyar a la noción de que la tuberculosis tiene tanto

base infecciosa como genética, además de que el complejo NADPH oxidasa pudiera jugar un rol importante en la protección contra micobacterias (10).

La enfermedad por micobacterias en pacientes con EGC es causada principalmente por el BCG y *M. tuberculosis*. La proporción de pacientes con EGC que presentan una complicación por BCG varía en relación al esquema de vacunación de cada país, aunque también se podría deber a la genética de las distintas poblaciones (39). Las complicaciones por BCG se han identificado como el primer signo clínico de EGC, en países donde la vacunación con BCG es obligatoria (9). En una revisión de la literatura realizada por Deffert *et al.* se informaron 297 casos de infecciones por micobacterias en pacientes con EGC. La infección por *M. bovis* BCG se reportó en 220 (74%) pacientes con EGC, la mayoría fueron infecciones locales o regionales, las infecciones sistémicas por BCG se presentaron en 31 casos (39).

Conti *et al.* analizaron una cohorte de 71 pacientes con EGC y enfermedad por micobacterias, procedentes de 20 países de 4 continentes (América, Europa, África, Asia), 31 (44%) pacientes incluidos fueron de América Latina. Setenta (98%) pacientes recibieron la vacuna BCG, de los cuales 53 (76%) presentaron alguna reacción adversa a la vacuna, de las cuales 33 (63%) fueron localizadas y 20 (37%) diseminadas, el diagnóstico se realizó con una media de 9 meses de edad. La reacción adversa a BCG fue el primer signo de la EGC en 39 (55%) de los 53 niños. Las complicaciones por BCG fueron identificadas como la causa más frecuente de los primeros signos clínicos, en países donde los que la vacunación con BCG es obligatoria (10).

En Europa, donde no se aplica la vacuna de BCG de manera rutinaria, 34 de 429 (8%) pacientes presentaron una complicación localizada por BCG, sin asociación entre esta complicación y el tipo de herencia (6). El 65% de los pacientes fueron de Francia (6), en donde la vacunación universal obligatoria con BCG fue reemplazada en el 2007 por la recomendación de vacunar a los niños con mayor riesgo de tuberculosis (40), lo que sugiere que la exposición a la vacuna fue la causa de esta alta proporción de casos. En Asia, en las cohortes de Irán y Turquía se encontró complicación localizada por BCG en el 55.9% (35) y 25% (37). En China

de 169 pacientes con EGC en 130 (77%) se corroboró la vacunación con BCG, de los cuales 60 (46%) tuvieron enfermedad probable y 17 (13%) enfermedad definitiva por BCG (34).

En América Latina el reporte de la Sociedad Latinoamericana de Inmunodeficiencias (LASID, de sus siglas en inglés *Latin American Society for Immunodeficiencies*), de una cohorte de 71 pacientes latinoamericanos con EGC, 66 (93%) recibieron vacuna de BCG, de los cuales 21 (30%) presentaron alguna reacción adversa a la vacuna, con mayor prevalencia en los pacientes con *CYBB* (85.7%) comparado con *NCF1* (14.3%) ($p=0.003$). El 30% de los pacientes presentó diseminación de *M. bovis* BCG lo que provocó a una condición clínica grave, en ellos el diagnóstico fue confirmado por cultivo (9).

En México la vacunación con BCG se introdujo en 1925 y desde 1949 se produjo a gran escala para ser utilizada en la población mexicana (41). En 1973 inició el Programa Nacional de Inmunizaciones, en la que se incluía la vacunación con BCG en el país (42). Actualmente la vacuna se aplica de manera rutinaria en el primer año de vida, idealmente al nacimiento. Se han administrado diferentes cepas de esta vacuna en México, cada una con un diferente grado de atenuación y por tanto diferente reactogenicidad. En el 2005 la cepa Danesa 1331 fue sustituida por la cepa Tokio 172 en el esquema nacional de vacunación por su menor capacidad de producir efectos adversos locales y sistémicos (42). La incidencia de infección diseminada reportada con la cepa Tokio 172 es de 0.9 en un millón de dosis aplicadas (43). En México, de 93 pacientes con EGC 88 (95%) recibieron la vacuna BCG y 54 (58%) reportaron alguna reacción adversa a la vacuna. De los pacientes con enfermedad por BCG, 28 (52%) presentaron reacción local y 26 (48%) infección diseminada. La enfermedad por BCG fue la primera manifestación clínica en 27 (29%) de los pacientes incluidos (11).

Respecto a la enfermedad por *M. tuberculosis*, esta bacteria no había sido reconocida como un patógeno importante en la EGC hasta la última década, en donde se han reportado más cohortes de EGC en regiones endémicas de tuberculosis. Conti *et al.* reportaron tuberculosis en 31 (44%) de 71 pacientes con EGC de 20 países, de los cuales 13 (18%) tuvieron también una reacción adversa a

BCG. Los sitios más frecuentemente afectados por *M. tuberculosis* fueron los pulmones en 19 pacientes, los ganglios linfáticos en 8 pacientes, el hueso y las meninges en un paciente cada uno (10). En Irán (35), Turquía (14) y Hong Kong (36), se diagnosticó tuberculosis en el 19%, 42% y 41% de los pacientes con EGC, respectivamente. En Irán, *M. tuberculosis* fue el principal agente bacteriano causante de neumonías, con 15 casos reportados (35). En China en una cohorte de 17 pacientes con EGC se observó una incidencia de tuberculosis 10 veces mayor en pacientes con EGC en comparación con la población general, además los pacientes con EGC presentaron cuadros más graves y con más complicaciones, lo que sugiere un daño en la inmunidad contra el bacilo de la tuberculosis (36).

En estos países la proporción de pacientes con EGC y tuberculosis se podría deber a la alta exposición a *M. tuberculosis*, asociada a una falla en la respuesta inmune contra la bacteria pacientes con EGC (44). En las cohortes más grandes de pacientes con EGC de Estados Unidos y Europa no se documentó un incremento en la frecuencia de tuberculosis en pacientes con EGC, encontrándose entre el 1-2% de los aislamientos (6,7,13), debido probablemente a la baja endemicidad de la bacteria en esas áreas.

También se han reportado infecciones causadas por micobacterias atípicas como *Mycobacterium flavescens* (45), *M. avium* (46) y *M. fortuitum* (47). En la cohorte de Estados Unidos se reportó infección por micobacterias atípicas en 5 de 290 aislamientos (2%) (7).

Tabla 1. Pacientes con enfermedad granulomatosa crónica y enfermedad por micobacterias.

Autor, año	País/ continente	Muestra	Vacuna BCG No. (%)^a	Enfermedad BCG No. (%)^a	Tuberculosis No. (%)^a
Blancas-Galicia <i>et al.</i> , 2020 ⁽¹¹⁾	México	93	88 (95%)	54 (58%)	26 (28%)
Kutukculer <i>et al.</i> , 2018 ⁽¹⁴⁾	Turquía	24	NR	7 (29%)	10 (42%)
Fatahhi <i>et al.</i> , 2011 ⁽³⁵⁾	Iran	93	82 (88%)	NR (56%)	18 (19%)
Zhou <i>et al.</i> , 2018 ⁽³⁴⁾	China	169	130 (77%)	77 (45%)	NR
van den Berg <i>et al.</i> ⁽⁶⁾	Europa	429	NR	34 (8%)	8 (2%)

BCG, Bacillus de Calmette y Guérin; No. número de pacientes; % porcentaje; NR, no referido.

a. Los porcentajes se calcularon en relación al total de pacientes incluidos en el estudio.

e. Mecanismos de control de micobacterias por células huésped

Durante la infección por micobacterias, la interacción entre el huésped y el patógeno es clave para determinar la evolución, desde la eliminación de las micobacterias por el sistema inmunológico, infección latente o infección clínicamente evidente (48).

La observación de la alta proporción de complicaciones de BCG y tuberculosis en pacientes con EGC refleja la importancia biológica de la NADPH oxidasa en la defensa inmunitaria contra las micobacterias (39). Los mecanismos exactos para el control por el sistema inmune de la infección por micobacterias no están completamente aclarados. Estudios demuestran que las micobacterias inducen la activación de la NADPH oxidasa y la producción de ROS, sobretodo en macrófagos (39,49–51). Variantes patogénicas en la línea germinal de *CYBB* pueden ocasionar deterioro en la actividad de la NADPH oxidasa selectivamente en macrófagos, lo que se ha visto incrementa la susceptibilidad a enfermarse por micobacterias (18). Se propone que los ROS pueden actuar como efectores directos ejerciendo su acción bactericida principalmente por oxidación directa de elementos micobacterianos como ADN, proteínas y lípidos. Las especies de nitrógeno reactivo (ENR) y los ROS pueden reaccionar juntos para formar moléculas oxidativas, ej. peroxinitrito. Sin embargo, basado en estudios *in vitro* de micobacterias y modelos animales, parece que las ENR, secretados por la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS de sus siglas en inglés *inducible nitric oxide synthase*) en el fagolisosoma tras la activación de macrófagos, tienen un efecto bactericida directo más potente que los ROS (49,51,52). El ADN de *M. tuberculosis* parece ser altamente resistente al estrés oxidativo, requiriéndose niveles muy elevados de radicales libres para causar la muerte bacteriana (52,53). La enzima KatG catalasa-peroxidasa micobacteriana es la responsable de catabolizar los ROS generados por la NADPH oxidasa (53).

El papel de los ROS producidos por la NADPH oxidasa frente a las micobacterias parece ser más complejo. Además del efecto directo bactericida de los ROS, que puede no ser el mecanismo principal que justifique la susceptibilidad a infección por micobacterias en pacientes con EGC, los ROS actúan como

moduladores de moléculas de señalización la autofagia, la producción de citocinas y la formación de granulomas, todos procesos importantes en la defensa del huésped contra las micobacterias, como se describe a continuación (39).

La autofagia es un proceso intracelular ubicuo mediante el cual se capturan y destruyen diversas cargas citoplasmáticas para reponer los aminoácidos y las fuentes de energía durante estrés metabólico. Tiene un papel en la limitación de la infección por microorganismos intracelulares, incluidas las micobacterias, y además aumenta la presentación cruzada de antígenos (54). Durante la infección micobacteriana, la autofagia permite la maduración del fagosoma lo que media el aclaramiento de las micobacterias. La generación de ROS por la NADPH oxidasa parece estar implicada en la activación de la autofagia, mediante el reclutamiento de proteínas de autofagia en el fagolisosoma, lo que es fundamental para la respuesta contra micobacterias (55,56).

Por otro lado, varias citocinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), el interferón gamma (IFN- γ) y la interleucina 12 (IL-12) han sido implicados en la defensa del huésped a micobacterias, y conforme la infección progresa, la respuesta proinflamatoria que inicialmente es muy intensa se regula por mediadores supresores que la equilibran (48). La alteración en la producción de ROS por la NADPH oxidasa puede estar implicada en el incremento de la susceptibilidad a enfermedad por micobacterias en pacientes con EGC debido al papel regulador de los ROS como segundos mensajeros en la liberación de citocinas (3,19). En ratones con alteración funcional en la NADPH oxidasa fagocitaria, y por tanto producción nula de ROS, se ha demostrado una producción masiva de citocinas proinflamatorias en respuesta a infección sistémica por BCG y una mayor gravedad de la infección (39). Por lo que es posible que una sobreproducción de las citocinas contribuya a la respuesta ineficiente en EGC a la infección por micobacterias, más que en su control (48).

La formación de granulomas son parte del proceso de la respuesta inmune contra micobacterias, estos previenen la diseminación de la infección. Este mecanismo de contención no necesariamente asegura la eliminación de las micobacterias ya que pueden sobrevivir dentro de los granulomas durante décadas

(48). La formación de granulomas implica una interacción entre varios tipos celulares y la liberación de diversas citocinas y quimiocinas. En modelos murinos con EGC e infección por BCG se observó la formación de granulomas más grandes, pero mal estructurados, con mayor infiltrado de neutrófilos los cuales fueron incapaces de contener las micobacterias (39). Un estudio sugiere que los macrófagos M2 tienen un papel importante en el desarrollo de granulomas inducidos por BCG y determinan el potencial antibacteriano y destructivo de los granulomas (57). La producción de ROS es crítica para la diferenciación de macrófagos M1 a M2; si se encuentra disminuida la producción de O_2^- consecuentemente se bloquea la diferenciación de macrófagos M2 (58). Por lo tanto, los ROS producidos por la NADPH oxidasa, desempeñan un papel importante en formación de granulomas para la contención de la infección por micobacterias, incluido la adecuada estructuración del granuloma a través de la modulación de liberación de quimiocinas y citocinas dependientes de ROS (39,48), y la determinación de los subtipos de macrófagos (58).

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los pacientes con EGC tienen 10 veces más incidencia de tuberculosis que la población general (36). Además, se reporta enfermedad por micobacterias en el 19-56% de los pacientes con EGC de regiones endémicas incluido México, de los cuales del 10-30% presentan enfermedad diseminada (11,35,36). La alta incidencia de complicaciones por micobacterias en pacientes con EGC refleja la importancia biológica de la NADPH oxidasa en la defensa inmunitaria contra este patógeno. Existe poca información sobre las características de la enfermedad por micobacterias en EGC, ya que no había sido reconocido como un patógeno importante en este grupo de pacientes. Aunque la función de la NADPH la oxidasa está alterada en todos los pacientes con EGC, la variabilidad entre los pacientes en la producción residual de ROS puede influir en los diferentes fenotipos clínicos, entre ellos el tipo de infección. Hasta el momento la asociación de la actividad residual de la NADPH oxidasa y la enfermedad por micobacterias está basado en estudios *in vitro* y modelos animales.

V. JUSTIFICACIÓN

Los datos sobre el comportamiento de la enfermedad por micobacterias proporcionarán información adicional al espectro clínico de los pacientes con EGC. La asociación con la actividad residual de la NADPH oxidasa con la enfermedad por micobacterias permitirá conocer si es un parámetro que influye en este tipo de infecciones en pacientes con EGC. Además, permitirá categorizar a los pacientes con EGC en subgrupos con diferente probabilidad de enfermedad por micobacterias, como un paso para dirigir esfuerzos en profilaxis y tratamiento, sobre todo en aquellos pacientes con alto riesgo de infección.

VI. HIPÓTESIS

La menor actividad residual de la NADPH oxidasa se asocia a un mayor riesgo de enfermedad por micobacterias en pacientes con EGC.

VII. OBJETIVOS

a. Objetivo general: Asociar la actividad residual de la NADPH oxidasa y la enfermedad por micobacterias en pacientes con enfermedad granulomatosa crónica.

b. Objetivos específicos

1. Determinar la actividad residual de la NADPH oxidasa a través del índice de estimulación en neutrófilos, monocitos y linfocitos.
2. Comparar la actividad de la NADPH oxidasa en pacientes con enfermedad por micobacterias y sin enfermedad por micobacterias.
3. Describir las manifestaciones clínicas, tratamiento y evolución de los pacientes con enfermedad por micobacterias.

VIII. MATERIAL Y MÉTODOS

a. Diseño del estudio: Estudio observacional, analítico, transversal, ambispectivo.

- **Población objetivo:** Pacientes con EGC.

- **Población elegible:** Atendidos en la Unidad de Investigación en Inmunodeficiencias del INP del 2013 al 2019.

b. Criterios de selección

- **Criterios de inclusión**

- Pacientes en los que se haya realizado la técnica 1,2,3 DHR por citometría de flujo como parte del abordaje diagnóstico de la EGC.
- Diagnóstico confirmado de EGC a través de la detección de la variante patogénica en el gen blanco y/o detección de la subunidad alterada a través de la determinación de la expresión de la proteína.
- Pacientes menores de 18 años, de género femenino o masculino.

- **Criterios de exclusión**

- Expediente clínico no accesible en el archivo clínico del INP.
- Pacientes sin archivos de citometría de flujo (.FCS de sus siglas en ingles *flow cytometry standard*) disponibles.

- **Variables del estudio**

En el **Anexo 1**, se encuentran las variables a analizar en el estudio. A continuación, se describen las definiciones operacionales de las variables:

- **Índice de estimulación (IE):** Cociente entre el IFM de región de neutrófilos, monocitos y linfocitos del tubo con estímulo entre el IFM de la región de neutrófilos, monocitos y linfocitos del tubo sin estímulo (59).

IFM de la región blanco del tubo con estímulo

IFM de la región blanco del tubo sin estímulo

- **Enfermedad por BCG:** Se utilizaron los criterios descritos por Conti *et al.* para la clasificación de la enfermedad por BCG (10):

- 1) **Enfermedad localizada por BCG (BCG-itis local):** absceso o ulceración grave en el lugar de la inyección.

- 2) **Enfermedad regional por BCG (BCG-itis regional):** involucro de ganglios linfáticos regionales en las áreas axilar, supraclavicular y cervical ipsilateral, incluyendo crecimiento, supuración y/o formación de fístulas.
 - 3) **Enfermedad diseminada por BCG (BCG-osis):** síntomas sistémicos, como fiebre, pérdida de peso o retraso en el crecimiento, y al menos dos áreas de compromiso más allá del sitio de la vacunación con BCG, como ganglios linfáticos, piel, tejidos blandos, pulmones, bazo, hígado o huesos.
- **Infección por *M. tuberculosis*:** Para la clasificación tuberculosis en niños se utilizarán las categorías del consenso de los Institutos Nacionales de la Salud de Estados Unidos actualizada en 2015, las cuales se describen a continuación (60):
 - 1) **Confirmada:** al menos un signo o síntoma sugestivo y confirmación bacteriológica (cultivo o PCR por Xpert® MTB/RIF).
 - 2) **No confirmada:** No tener confirmación bacteriológica, con dos de los siguientes criterios:
 - (I) Signos o síntomas sugestivos:
 - Tos persistente >2 semanas,
 - Pérdida >5% peso en 3 meses previos,
 - Retraso en el crecimiento (percentil <3 en 3 meses previos),
 - Fiebre (>38°C) persistente (>1semana),
 - Letargo persistente, inexplicable o juego reducido (>1semana)
 - (II) Datos radiológicos compatibles,
 - (III) Exposición cercana a *M. tuberculosis* o evidencia inmunológica de infección por *M. tuberculosis* con prueba cutánea de tuberculina o IFN- γ positivo,
 - (IV) Respuesta clínica al tratamiento de tuberculosis (sin tiempo de duración especificada).

- **Desenlace de la enfermedad por micobacterias**

- 1) **Recuperado:** Remisión de las manifestaciones clínicas posterior al término del tratamiento, sin requerir reinicio del tratamiento antibiótico en consultas subsecuentes (al menos dos meses después).
- 2) **Recaída:** Requerir reiniciar esquema antibiótico para micobacterias a criterio del médico tratante posterior a un mes de haber terminado el primer esquema de tratamiento.
- 3) **Recurrencia:** Presencia de sintomatología repetida con periodos de remisión de al menos 4 semanas entre ellos.

- **Muestreo y tamaño de muestra**

Para el cálculo de tamaño de muestra se utilizó la siguiente fórmula:

$$n = \frac{\left[z_{1-\alpha/2} \sqrt{2P(1-P)} + z_{1-\beta} \sqrt{P_1(1-P_1) + P_2(1-P_2)} \right]^2}{(P_1 - P_2)^2}$$

Frecuencia de exposición entre los controles: 0.5

Frecuencia de exposición entre los casos: 0.81

Razón de momios previsto: 4.45

Nivel de seguridad: 95% = 1.96

Poder estadístico: 80% = 0.84

$P = (p_1 + p_2) / 2 = 0.65$

$$n = \frac{\left[1.96 \sqrt{2 \times 0.65 \times (1-0.65)} + 0.84 \sqrt{0.81 \times (1-0.81) + 0.5 \times (1-0.5)} \right]^2}{(0.81-0.5)^2} = 36 \times 2 = \mathbf{72}$$

Debido a que no hay estudios disponibles de la asociación entre actividad residual de la NADPH y enfermedad por micobacterias, para el cálculo del tamaño de muestra se tomó la información de Kuhns, *et al.* (25) quienes evaluaron la actividad residual del NADPH oxidasa con mortalidad, siendo las infecciones la principal causa de muerte en pacientes con EGC (12).

IX. DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO

Se recabó la información de los pacientes que cumplieron los criterios de selección en la hoja de recolección de datos (**Anexo 2**). Las variables clínicas (género, edad, subunidad afectada, genotipo, estado de vacunación por BCG, enfermedad por micobacterias) se obtuvieron del expediente clínico físico y electrónico. El tipo de herencia se determinó a través de la subunidad de la NADPH oxidasa afectada y/o la variante patogénica en el gen blanco, que fueron detectados al diagnóstico y documentados en el expediente clínico. La actividad de la NADPH oxidasa se determinó calculando el índice de estimulación (IE) a partir de los archivos de citometría de flujo (.FCS) de la técnica 1,2,3 DHR realizada como parte del abordaje diagnóstico de rutina de cada paciente. En el **Anexo 3** se describe la técnica 1,2,3 DHR. El IE se calculó por la alumna sustentante KXLL, previo a conocer la condición de enfermedad por micobacterias de cada paciente. En el **Anexo 4** se describe la metodología que se llevó a cabo para calcular el IE.

La secuencia de trabajo se realizó siguiendo el flujograma de la **Figura 2**.

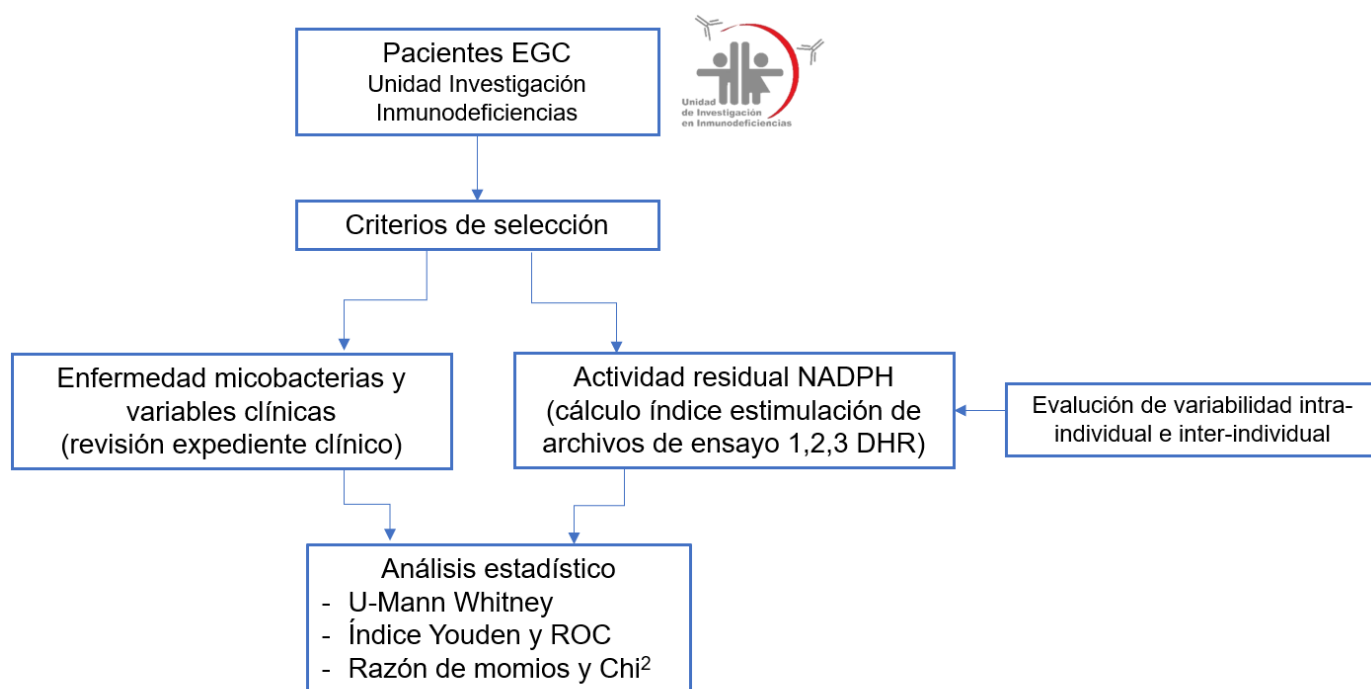


Figura 2. Flujograma del estudio. Los pacientes con diagnóstico previo de enfermedad granulomatosa crónica de la Unidad de Investigación en Inmunodeficiencias que cumplieron los criterios de selección fueron incluidos. Se recabó información del expediente clínico sobre la presencia de enfermedad por micobacterias. La actividad residual de la NADPH oxidasa se determinó mediante el cálculo del índice de estimulación de los archivos de citometría de flujo de la técnica 1,2,3 DHR realizada al diagnóstico.

X. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La normalidad de las variables se determinó mediante la prueba estadística de Kolmogorov-Smirnov. El análisis descriptivo de las variables cuantitativas continuas (edad, índice de estimulación) se expresó como medianas y mínimos-máximos. Las variables categóricas (género, tipo de herencia, subunidad, genotipo, enfermedad por micobacterias) se expresaron como frecuencias y porcentajes.

Se evaluó la variabilidad inter-individual e intra-individual del cálculo del índice de estimulación con el coeficiente de correlación intraclase y su intervalo de confianza al 95% (IC95%), se tomó el grado de acuerdo según Landis y Koch (61) (**Tabla 2**).

Tabla 2. Clasificación del grado de acuerdo según Landis y Koch.

Valor	Grado de acuerdo
0	Pobre
0.1 – 0.2	Leve
0.21 – 0.4	Regular
0.41 – 0.6	Moderado
0.61 – 0.8	Buena
0.81 – 1	Muy buena

Recuperado de "Clinical biostatistics" (p. 115), por Kramer MS, et al., 1981, Clin Pharmacol Ther, 29 (1) (61).

El índice de estimulación se comparó entre los tres grupos celulares con Kruskal-Wallis. El índice de estimulación se comparó entre grupos por genotipo y por estado de enfermedad por micobacterias con U-Mann Whitney. Los valores del índice de estimulación se dicotomizaron tomando el punto de corte obtenido mediante la estadística J de Youden, junto con el análisis de Característica Operativa del Receptor (ROC, de siglas en inglés *Receiver Operating Characteristic*) para enfermedad por micobacterias. A partir del índice de estimulación dicotomizado se calculó la razón de momios con un intervalo de confianza al 95% como medida de asociación entre actividad residual de la NADPH oxidasa y la enfermedad por micobacterias. Los datos se analizaron con el paquete estadístico IBM SPSS Statistics (versión 25 Inc., Chicago, IL). El valor de $p < 0.05$ se consideró como significativo.

XI. CONSIDERACIONES ÉTICAS

El estudio fue evaluado y aprobado por el Comité de Investigación del INP, se le asignó el número de registro 031/2019. El comité esta registrado oficialmente en la Oficina de Protección de la Investigación Humana del NIH (de sus siglas en inglés, *National Institutes of Health*) [http// ohrp.cit.nih.gov/search/search.aspx](http://ohrp.cit.nih.gov/search/search.aspx) con el número IRB00008064.

El estudio se basó en la búsqueda de información documental retrospectiva y en el análisis informático de archivos de citometría de flujo que fueron generados como parte del abordaje diagnóstico en los pacientes, por lo que se consideró sin riesgo para el paciente. Los procedimientos descritos se realizaron en concordancia con los principios y las directrices vigentes establecidas en la Ley General de Salud y en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de prestación de Servicios de Atención Médica. Se llevaron a cabo los siguientes mecanismos de seguridad para la obtención de los datos:

1. Se protegió la intimidad de los individuos y la confidencialidad de la información del paciente, mediante la asignación de un código para cada paciente, que únicamente se conocen por la investigadora principal LBG y la alumna sustentante KXLL.
2. Los datos y resultados encontrados se reportaron con exactitud, sin evidenciar la identidad de los pacientes.
3. Toda información ha sido registrada y almacenada de forma que permita su verificación e interpretación exactas.

XII. RESULTADOS

Se incluyeron un total de 62 pacientes con EGC para el análisis, 52 (84%) hombres y 10 (16%) mujeres, de 57 familias no relacionadas. La mediana de edad en el momento del diagnóstico fue de dos años (1 mes - 12 años). En 43 (69%) pacientes, el diagnóstico se realizó antes de los cinco años de edad. De los pacientes incluidos, 33 (77%) presentaron herencia LX y 9 (21%) AR. La mediana de edad en la última visita de seguimiento fue de seis años (10 meses - 18 años).

La distribución según el patrón de herencia en los pacientes fue la siguiente, LX en 43 (69%), AR en 18 (29%) y en un paciente (2%) no se determinó. La expresión de las proteínas del complejo de la NADPH oxidasa estuvo disponible en 60 (97%) pacientes y fue la siguiente, gp91^{phox} en 42 (70%), p67^{phox} en 7 (12%), p47^{phox} en 7 (12%) y p22^{phox} en 4 (6%) casos. El genotipo estaba disponible en 54 (87%) pacientes, de los cuales se detectaron variantes patogénicas en el gen *CYBB* en 38 (70%), en *NCF1* en 7 (13%), en *NCF2* en 5 (9%) y en *CYBA* en 4 (8%) casos.

Para el cálculo del IE de cada uno de los grupos celulares se obtuvo un grado de acuerdo inter-individual entre el investigador principal (estandar de referencia) y la alumna sustentante clasificado como muy bueno, según la clasificación Landis y Koch (61). También se obtuvo un grado de acuerdo clasificado como muy bueno intra-individual (**Tabla 3**).

Tabla 3. Análisis de concordancia por correlación intraclass/ interclass

	α -Cronbach	IC 95%	Valor <i>p</i>
Concordancia inter-individual (estándar de referencia)			
IE de neutrófilos	0.998	0.994 – 0.999	<0.0001
IE de monocitos	0.954	0.884 – 0.982	<0.0001
IE de linfocitos	0.984	0.960 – 0.994	<0.0001
Concordancia intra-individual			
IE en neutrófilos	0.999	0.997-0.999	<0.0001
IE en monocitos	0.985	0.962 – 0.994	<0.0001
IE en linfocitos	0.966	0.914 – 0.987	<0.0001

IE, índice estimulación

De los 62 pacientes incluidos, la mediana del IE al diagnóstico en neutrófilos fue de 1.39 (0.4-7.2), en linfocitos de 1.32 (0.52-4.59) y en monocitos de 1.21 (0.2-5.26), sin diferencia estadística en el IE entre los tres grupos celulares ($p = 0.13$) (Figura 3).

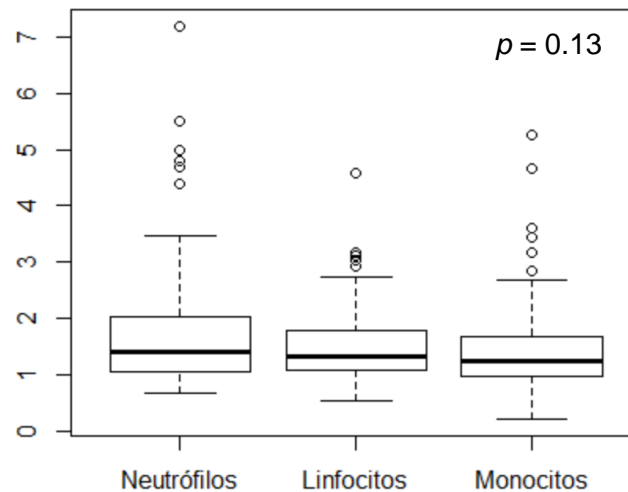


Figura 3. Índice estimulación por tipo de célula. Gráfica de cajas y bigotes con los valores de índice de estimulación calculados en los 62 pacientes con enfermedad granulomatosa crónica en neutrófilos, linfocitos y monocitos. Valor de p con Kruskal-Wallis.

La mediana de IE en neutrófilos de los pacientes con variantes patogénicas en el gen *CYBB* fue de 1.37 (0.79 - 7.2), mientras que la mediana de IE en neutrófilos de los pacientes con variantes patogénicas en los genes recesivos (*NCF1*, *NCF2*, *CYBA*) fue de 1.49 (0.66 - 5). No hubo diferencia estadística en los valores de SI entre pacientes con variantes patogénicas en el gen *CYBB* y todos los genes recesivos ($p = 0.71$) (Tabla 4).

Tabla 4. Genotipo e índice de estimulación en neutrófilos de 54 pacientes con enfermedad granulomatosa crónica.

Tipo de variantes patogénicas en los genes blanco	n (%)	Mediana del índice de estimulación (min. - máx.)
CYBB	38 (70)	1.37 (0.79 – 7.2)
Con sentido erróneo	9	2.01 (0.92 – 4.70)
Delección pequeña	9	1.16 (0.79 – 1.96)
Sin sentido	8	1.96 (0.92 – 7.2)
Delección grande	5	1.05 (0.98 – 1.43)
En sitio de empalme	3	0.95 (0.82 – 1.38)
Otras variantes ^a	4	1.98 (1.23 – 4.4)
NCF1	7 (13)	1.52 (1.29 – 1.87)
Delección pequeña	7	1.52 (1.29 – 1.87)
NCF2	5 (9)	1.49 (0.88 – 1.8)
Delección pequeña + sin sentido o con sentido erróneo	2	1.18 (0.88 – 1.49)
Delección pequeña	1	1.52
Sin sentido	1	1.08
Con sentido erróneo	1	1.80
CYBA	4 (8)	2.08 (0.66 – 5)
Delección pequeña	2	3.84 (2.68 – 5)
Con sentido erróneo	1	0.66
En sitio de empalme	1	1.49

a. Otras variantes patogénicas: inserción pequeña (n=1), delección/ inserción pequeña esencial (n=1), sinónima (n=1) y en sitio promotor (n=1).

Nota: Se presentan los valores individuales para describir las respuestas de todos los variables observados.

Enfermedad por *Micobacterium bovis* BCG

La vacuna de BCG se aplicó en 58 (94%) casos del total de pacientes incluidos, siguiendo el esquema nacional de vacunación de México. La vacuna se aplicó dentro de los primeros 30 días de vida en 52 (90%) pacientes, con una mediana de tiempo de aplicación de un día (1-360 días). La cepa Tokio se aplicó en 43 (74%) casos y la Danesa en 15 (26%) casos. Se presentaron reacciones adversas a BCG en 41 (71%) pacientes que recibieron la vacuna, la edad cronológica mediana en la que se reportó la enfermedad fue de 60 días (1 día-3 años). El diagnóstico de enfermedad por BCG se realizó por criterios clínicos en 15 (37%) de los 41 casos reportados. Además de los criterios clínicos, en 22 (54%) casos se mostró evidencia por histopatología de enfermedad micobacteriana (granuloma con necrosis caseosa central, ocho con bacilos ácido alcohol

resistentes). En 7 (17%) casos se detectó material genético micobacteriano por PCR, 5 de ellos identificados con complejo *M. tuberculosis* y 2 como *M. bovis*. La enfermedad por BCG se clasificó como regional en 12 (29%) casos, localizada en 7 (17%) casos, diseminada en 7 (17%) casos, y diseminada con local o regional en 15 (37%). Se administraron antibióticos en 8 (19.5%) pacientes para tratamiento de enfermedad por BCG local o regional (BCG-itis), y 20 (49%) pacientes para tratamiento de enfermedad diseminada por BCG (BCG-osis). Se administraron diferentes combinaciones de antibióticos por periodos de tiempos variables de duración desde 3 a 24 meses. Los antibióticos administrados incluyeron isoniazida, rifampicina, etambutol, claritromicina y quinolonas (levofloxacino o ciprofloxacino). En 10 pacientes con enfermedad localizada o regional por BCG no recibieron tratamiento, y solo un paciente no tratado tuvo episodios repetidos de enfermedad regional (**Tabla 5**). En tres (14%) de 22 pacientes con enfermedad diseminada por BCG se documentó recaída a ganglio por histopatología más de diez meses después de que se completó el primer curso antibacteriano (**Tabla 6**).

Enfermedad por *Micobacterium tuberculosis*

Se diagnosticó enfermedad *M. tuberculosis* en 13 (21%) de los 62 pacientes incluidos, 8 (61%) de ellos eran mayores de seis años cuando se les diagnosticó tuberculosis, la mediana de edad al diagnóstico fue de siete años (2-18 años). Siete pacientes con tuberculosis presentaron el antecedente de reacción adversa a BCG, con una mediana de tiempo de nueve años (4-11 años) antes. La enfermedad por tuberculosis se diagnosticó en dos (15%) casos basado en cuadro clínico compatible, cambios radiológicos y respuesta al tratamiento antituberculosis. Además de los criterios clínicos y radiológicos en siete (54%) casos se observó inflamación granulomatosa y necrosis caseosa en muestras histopatológicas (tres con bacilos ácido alcohol resistentes), en cuatro (31%) casos se detectó el material genético de *M. tuberculosis* por PCR (tres por Xpert® MTB/RIF) y en cuatro (31%) casos tinción Ziehl-Neelsen positiva. El sitio más frecuente de enfermedad por tuberculosis fue el pulmón en ocho (57%) casos, seguido del intestino en tres (21%) casos. Todos los pacientes diagnosticados con tuberculosis recibieron tratamiento antibacteriano durante cuatro a 18 meses. En todos los pacientes se indicó una combinación isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol, solo en algunos se

agregó al esquema claritromicina y/o levofloxacino (**Tabla 7**). Se diagnosticó recaída en tres (23%) de los 13 pacientes con tuberculosis reportados (IE 1.85, 1.8, y 4.4). La recaída se reportó en ganglio, pulmón y sistema nervioso central respectivamente. Se registró una muerte por enfermedad por *M. tuberculosis* diseminada (pulmón, intestino, ganglios, hígado, bazo) complicada con el síndrome de activación macrófago a la edad de dos años sin antecedentes de vacuna BCG y valor IE en neutrófilos de 0.4. Los criterios diagnósticos de síndrome de activación de macrófagos fueron: fiebre, esplenomegalia, anemia (6.5g/dL [12-13.5 g/dL]), trombocitopenia ($97,000\text{mm}^3$ [150,000-450,000 mm^3]), disminución del fibrinógeno (120mg/dL [200-400mg/dL]), elevación de ferritina (1000ng/mL [15-150 ng/mL]) y células hemofagocíticas en aspirado de médula ósea.

Tabla 5. Tratamiento antibiótico y evolución de enfermedad por BCG-itis (localizada o regional) en pacientes con enfermedad granulomatosa crónica.

Medicamentos	No. de pacientes	Extensión o sitio afectado	Meses de tratamiento	Recuperación	Recurrencia
Ninguno	10	Regional (n=4) Local (n=6)	-	n=9	n=1
Resección quirúrgica	1	Regional (n=1)	-	n=1	
H, R, E, Z	2	Regional (n=2)	15, 21	n=2	
H, R, E, CLR	1	Local (n=1)	18	n=1	
H, R, CLR	1	Regional (n=1)	3	n=1	
H, R	3	Regional (n=3)	6,10 y 12	n=3	
R	1	Local (n=1)	3	n=1	

BCG, *Bacillus Calmette–Guérin*; No. número de pacientes, H, isoniazida; R, rifampicina; E, etambutol; CLR, claritromicina; Z, pirazinamida.

Nota: *M. bovis* BCG tiene resistencia intrínseca a la pirazinamida, por lo tanto, no se cuenta como parte del régimen. Fue documentado por razones descriptivas.

Tabla 6. Tratamiento antibiótico y evolución de enfermedad por BCG-osis (diseminada) en pacientes con enfermedad granulomatosa crónica.

Medicamentos	No. de pacientes	Extensión o sitio afectado	Meses de tratamiento	Recuperación	Otro desenlace
Resección quirúrgica	1	Ganglios, hígado (n=2)	-	n=1	Perdida seguimiento (n=1)
H, R, E, Z	9	Ganglios, pulmón e hígado (n=3); ganglios, hígado y bazo (n=2); ganglios y pulmón (n=2); ganglios (n=1); ganglios, pulmón e intestino (n=1) ^a	6, 10, 12 ^a y 18	n=8	Recaída (n=1) ^a
H, R, E, Z, CLR	8	Ganglios, hígado y bazo (n=3); ganglios y pulmón (n=2); ganglios (n=1); ganglios, hígado, bazo y hueso (n= 1); ganglios e intestino (n= 1)	6, 10, 12 y 24	n=7	Muerte por otra causa (n=1)
H, R, E, Z, quinolona	2	Ganglios, pulmón e hígado (n=1); ganglios, hígado y bazo (n=1) ^b	12 y 24 ^b	n=1	Recaída (n=1) ^b
H, R	1	Ganglios (n=1)	6	-	Recaída (n=1)

BCG, *Bacillus Calmette–Guérin*; No. número de pacientes, H, isoniazida; R, rifampicina; E, etambutol; CLR, claritromicina; Z, pirazinamida.

Nota: *M. bovis* BCG tiene resistencia intrínseca a la pirazinamida, por lo tanto, no se cuenta como parte del régimen. Fue documentado por razones descriptivas.

^{a,b} Pacientes con recaída, recurrencia o muerte, el tratamiento fue señalados en su respectiva columna.

Tabla 7. Tratamiento antibiótico para enfermedad por tuberculosis en pacientes con enfermedad granulomatosa crónica.

Medicamentos	No. de pacientes	Extensión o sitio afectado	Meses de tratamiento	Recuperación	Otro desenlace
H, R, E, Z	11	Ganglios ($n=1$) ^a ; ganglios y pulmón ($n=7$) ^b ; ganglios e intestino ($n=1$); ganglios, pulmón y meninges ($n=1$) ^c ; ganglios, pulmón, intestino, hígado y bazo ($n=1$) ^d	4 ^a , 6 ^b , 12 ^c y 18	$n=7$	Recaída ($n=3$) ^{a,b,c} Muerte ($n=1$) ^d
H, R, E, Z, CLR	1	Ganglios y pulmón ($n=1$)	18	$n=1$	-
H, R, E, Z, CLR, levofloxacino	1	Ganglios e intestino ($n=1$)	12	-	Muerte por otra causa ($n=1$)

No. número de pacientes, H, isoniazida; R, rifampicina; E, etambutol; CLR, claritromicina; Z, pirazinamida.

^{a,b,c,d} Pacientes con recaída, recurrencia o muerte, el tratamiento fue señalado en su respectiva columna.

Enfermedad por micobacterias y actividad de la NADPH oxidasa

De los 62 pacientes incluidos, se detectó enfermedad por micobacterias en 47 (76%), tanto por *M. bovis* como por *M. tuberculosis*. Se observó un IE significativamente más bajo en las tres líneas celulares entre los pacientes que presentaron enfermedad por micobacterias en comparación con aquellos que no la presentaron (**Tabla 8**).

Tabla 8. Comparación del índice de estimulación de 62 pacientes con enfermedad granulomatosa crónica de acuerdo al estado de enfermedad por micobacterias.

	Con enfermedad por micobacterias n = 47 (75.8%)	Sin enfermedad por micobacterias n = 15 (24.1%)	Valor p
IE en neutrófilos	1.34 (0.4-5.0)	1.87 (0.88-7.2)	0.019
IE en monocitos	1.14 (0.2-5.26)	1.44 (0.84- 4.65)	0.026
IE en linfocitos	1.21 (0.52-3.17)	1.73 (1.04-4.59)	0.008

IE, Índice estimulación

Valores expresados en mediana (mínimo-máximo); valor de p con U de Mann-Whitney.

El punto de corte de IE de 1.5 en neutrófilos, presentó el valor máximo del índice de Youden (0.41), por lo que fue seleccionado como punto de corte para el diagnóstico de enfermedad micobacterias en este grupo de pacientes, con una sensibilidad de 68% y especificidad 73%. De acuerdo a este punto de corte, el momio de presentar enfermedad por micobacterias fue 5.8 veces mayor en los pacientes con un IE en neutrófilos ≤ 1.5 en comparación a los que presentaron un IE >1.5 . Esta asociación fue estadísticamente significativa; OR 5.87; IC95% 1.6-21 ($p = 0.005$). El valor de IE seleccionado en linfocitos para el diagnóstico por micobacterias fue de 1.5, ya que presentó el valor máximo del índice de Youden (0.40), con una sensibilidad de 73% y especificidad 66% para diagnosticar enfermedad por micobacterias en este grupo de pacientes. Basado en este punto de corte, el momio para enfermar por micobacterias fue 5.83 veces más en pacientes con IE en linfocitos ≤ 1.5 comparado con pacientes con IE en linfocitos >1.5 . Esta asociación fue estadísticamente significativa; OR 5.83, IC95% 1.66-20 ($p = 0.004$). Finalmente, el punto de corte en monocitos seleccionado fue un IE de 1.8, ya que

presentó el mayor índice de Youden (0.33) para el diagnóstico de enfermedad por micobacterias, con una sensibilidad de 86% y especificidad 47% para diagnosticar enfermedad por micobacterias. De acuerdo a este punto de corte, los pacientes con un IE < 1.8 en monocitos presentaron 5 veces más probabilidad de enfermar por micobacterias en comparación con lo que tenían un IE >1.8 en monocitos. Esta asociación fue estadísticamente significativa, OR 5.00; IC95% 1.37-18 ($p = 0.01$).

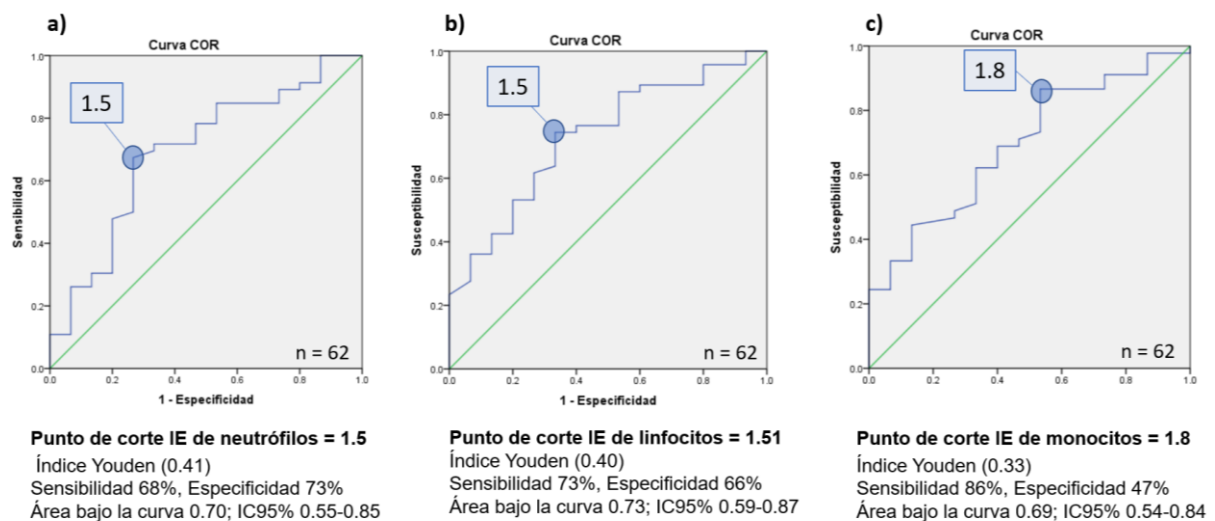


Figura 4. Curvas ROC para enfermedad por micobacterias. Curvas ROC para determinar el punto de corte del índice de estimulación en (a) neutrófilos, (b) linfocitos y (c) monocitos en el que se alcanza la mayor sensibilidad y especificidad asociada a enfermedad por micobacterias en pacientes con enfermedad granulomatosa crónica. IE, índice de estimulación.

XIII. DISCUSIÓN

El presente estudio analiza la asociación entre la función residual de la NADPH oxidasa, medida por el ensayo de 1,2,3 DHR por citometría de flujo, y la presencia de enfermedad por micobacterianas en 62 pacientes con EGC de México. Al igual que en las series de pacientes con EGC de Europa y Estados Unidos, la mayor proporción de pacientes incluidos en el estudio tenían un patrón de herencia LX, por variantes patogénicas en el gen *CYBB*, que resultó en una expresión alterada de la subunidad gp91^{phox} (6,7,13). Variantes patogénicas en el gen *CYBB*, dan como resultado una menor producción de ROS y el fenotipo clásico de EGC (16,17). El tipo de herencia LX se relaciona con que la mayor proporción de los pacientes incluidos fueran del género masculino.

En los pacientes con herencia AR se encontró con mayor frecuencia variantes patogénicas en el gen *NCF1*, al igual que la mayoría de las cohortes de pacientes con EGC, incluidas las de Estados Unidos y Latinoamérica (7,9,13,15,16,35). No se incluyeron pacientes con variantes patogénicas en los genes *NCF4* y *CYBC1*, que codifican para las proteínas p40^{phox} y Eros respectivamente, debido a que para el diagnóstico de los pacientes se utilizó como estímulo de la NADPH oxidasa PMA y para detectar deficiencia de p40^{phox} y Eros se recomienda utilizar estímulos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* o zimosán (17,62). Los pacientes con deficiencia de p40^{phox} y Eros presentan producción residual de ROS y el fenotipo no clásico de la enfermedad, con predominio de las manifestaciones inflamatorias sobre las infecciosas (28,29).

El diagnóstico de EGC en dos terceras partes de los sujetos estudiados fue antes de los cinco años, como se ha reportado en series de pacientes con EGC en Europa, Asia y América, en donde la mayoría de los pacientes se diagnostican en la infancia temprana con una media de dos años de edad (6,7,35,63).

En el cálculo del IE se obtuvo un grado de acuerdo intraclase e interclase calificado como muy bueno, de acuerdo a la clasificación de Landis y Koch, por lo que se procedió al análisis del IE y su asociación con la enfermedad por micobacterias. No se encontraron diferencias significativas en el IE de neutrófilos,

monocitos y linfocitos, lo que nos permite concluir que en pacientes con EGC la alteración funcional de la NADPH oxidasa se presenta en las tres líneas celulares, sin que sea exclusiva de un tipo de célula. Kulkarni, *et al.* describieron en pacientes con EGC de India, que la deficiencia en la subunidad de la NADPH oxidasa causante de la enfermedad se encuentra en neutrófilos y linfocitos B (15). La mediana del IE en el presente estudio fue menor a lo reportado en las cohortes de pacientes de Estados Unidos, China y Egipto, en donde reportaron una mediana de IE de 2.3, 2.7 y 3.1 respectivamente (25,34,64). Sin embargo, coincide con la mediana del IE en neutrófilos reportada en las cohortes de pacientes de India (15,64,65). Diferencias en el IE en cada país pueden ser ocasionados por variantes en la técnica 1,2,3 DHR, como el citómetro que se utiliza o la región seleccionada para determinar el IFM. Aunque también pueden ser consecuencia de la población incluida, es posible que en México se diagnostiquen pacientes con un espectro de enfermedad más grave consecuencia de una menor actividad residual de la NADPH oxidasa y por tanto menor IE.

Se observó una menor producción de ROS, medida por el IE, en neutrófilos, linfocitos y monocitos en los pacientes con EGC incluidos que presentaron enfermedad por micobacterias. Los pacientes con un valor de IE ≤ 1.5 en neutrófilos y linfocitos ó ≤ 1.8 en monocitos tuvieron el mayor riesgo de enfermedad por micobacterias. La asociación entre la actividad residual de la NADPH oxidasa y la enfermedad por BCG fue explorada previamente por Köker *et al.* en Turquía. En donde, no encontraron una diferencia en la aparición de BCG-itis en relación con la producción residual de ROS, sin embargo, no analizaron la asociación entre el IE y otros tipos de enfermedad por micobacterias (37). Otros estudios clínicos que utilizan la actividad de la NADPH oxidasa como factor pronóstico han demostrado que una menor producción de ROS se asocia con una enfermedad más grave y una menor sobrevida. El punto de corte de la producción residual de ROS en neutrófilos para diferenciar a los pacientes con el mayor riesgo de muerte varía según los estudios. Kuhns *et al.* utilizaron un punto de corte de 2.3 con pacientes de Estados Unidos; Li T *et al.* en China utilizaron un punto de corte de 2.79; Köker *et al.* en Turquía consideraron como actividad nula un IE ≤ 1.5 y residual ≥ 3 (25,37,66). Por lo que consideramos importante individualizar el valor de referencia de acuerdo a la

población de estudio, ya que la exposición a patógenos y el diagnóstico puede variar entre países (25,37,66).

En modelos murinos se ha demostrado que la actividad de la NADPH oxidasa es un factor relevante para controlar la infección por *M. bovis* BCG (39,67). Deffert *et al.* observaron que los ratones con producción disminuida o nula de ROS por la NADPH oxidasa de fagocitos mononucleares se asociaron con una infección por BCG más grave (39). Bustamante *et al.* demostraron en pacientes con variantes patogénicas en el gen *CYBB*, que la producción de ROS en los macrófagos del tejido humano es fundamental para esta inmunidad a micobacterias tanto *M. bovis* BCG como *M. tuberculosis* (18). La relación entre *M. tuberculosis* y la funcionalidad de la NADPH oxidasa fagocítica, es contradictoria. Por un lado, la falta de ROS durante la infección por *M. tuberculosis* ha resultado en un aumento significativo en el crecimiento de micobacterias en modelos de ratones (68,69), pero por otro lado, no se ha encontrado una deficiencia en la capacidad de controlar *M. tuberculosis* en fagocitos y ratones deficientes de NADPH oxidasa (70,71). Además de la producción residual de ROS, en el presente estudio observamos que la mayoría de los pacientes desarrollaron la enfermedad por *M. tuberculosis* después de al menos seis años de exposición al patógeno. Esta observación clínica sugiere que el tiempo de exposición a *M. tuberculosis* puede desempeñar un papel importante en la presencia de la enfermedad de tuberculosis en pacientes con EGC, que son susceptibles a la infección por micobacterias.

La variabilidad en la frecuencia de enfermedad por micobacterias en pacientes con EGC entre las distintas regiones y países, sugiere que la exposición al patógeno es un determinante para que estos pacientes genéticamente susceptibles presenten la enfermedad micobacteriana. En países donde la vacuna de BCG se aplica como parte del esquema de inmunización infantil, como en el caso de México, más del 50% de los pacientes pueden presentar enfermedad por la vacuna (11,14,34,35). En los pacientes incluidos se reportó reacción adversa a BCG en el 70% de los pacientes en los primeros tres años de vida, en su mayoría como enfermedad regional o localizada, similar a lo descrito en la revisión de la literatura realizada por Deffert *et al.* (39). Se ha descrito que la enfermedad por BCG pueden ser la primera manifestación clínica en EGC, por lo que este dato clínico puede

ayudar a el diagnóstico temprano de EGC (11). En países donde la tuberculosis es endémica la enfermedad se presenta del 20 al 40% de los pacientes con EGC (11,14,34,35). Por lo que es importante tomar en cuenta las infecciones endémicas de cada país para realizar un abordaje diagnóstico y tratamiento empírico oportuno en pacientes con EGC y sospecha de infección.

El diagnóstico de enfermedad por *M. tuberculosis* o BCG, en más de la tercera parte de los pacientes fue por criterios clínicos, sin diagnóstico microbiológico confirmatorio. La falta de evidencia bacteriológica de la enfermedad por micobacterias, puede ser debida a que la enfermedad en pacientes pediátricos es paucibacilar, lo que limita la sensibilidad del cultivo y de las tinciones (72). En pediatría, el cultivo es positivo en el 20-40% de los pacientes con sospecha de tuberculosis pulmonar y la tinción de Ziehl Nilsen es positiva del 7-20% dependiendo del tipo de muestra (72–75). En caso de sospecha de enfermedad por micobacterias, recomendamos se realice un abordaje, que además incluya además del interrogatorio para la búsqueda del contacto epidemiológico y manifestaciones clínicas compatibles como fiebre prolongada, estudios histopatológicos, radiológicos y bacteriológicos (60). Dentro de los estudios de microbiología a realizar son necesarios los cultivos para micobacterias, tinción de Ziehl-Neelsen, tinción de auramina rodamina, y la búsqueda de material genético de la micobacteria, la cual se puede realizar con el método semiautomatizado Xpert® MTB/RIF (75,76). Con la limitante de que el Xpert® MTB/RIF no diferencia entre las diferentes especies de micobacterias dentro del complejo *M. tuberculosis*, en donde se encuentra *M. bovis* BCG, *M. bovis* y *M. tuberculosis* (76,77). El tipificar el género y especie de micobacteria es útil para determinar la combinación de esquema de tratamiento apropiado.

Existe poca información sobre el tratamiento adecuado para las enfermedades micobacterianas (BCG y tuberculosis) en pacientes con EGC (10,39,78). En general, en niños sin diagnóstico de error innato de la inmunidad las reacciones adversas a BCG se tratan con medicamentos antituberculosos, como isoniazida, rifampicina y etambutol, y algunas veces extirpación quirúrgica de ganglios linfáticos infectados o aspiración con aguja fina (79). Sin embargo, no existe un régimen estándar para el tratamiento de la enfermedad por BCG local, regional o

diseminada en pacientes con EGC (10,67,79). Es importante resaltar que la vacuna BCG se debe evitar en pacientes con diagnóstico de EGC (80). En el presente estudio, el régimen terapéutico utilizado para la enfermedad por BCG fue variable en duración y combinación de los medicamentos utilizados. Se observó recaída en el 14% de los pacientes con EGC y enfermedad diseminada por BCG, a pesar de tratamiento antibiótico dirigido. Por lo que se sugiere un tratamiento antibiótico prolongado para la enfermedad diseminada por BCG en EGC. En algunos casos se ha agregado también tratamiento con IFN- γ (36,66). En el grupo de pacientes incluidos, la probabilidad de recaída de enfermedad localizada o regional por BCG fue baja, el 52% de los pacientes con BCG-itis no recibió tratamiento médico y solo un paciente presentó recurrencia de la enfermedad.

Respecto al tratamiento antimicrobiano para la enfermedad por tuberculosis este fue más uniforme entre los pacientes diagnosticados, sin embargo, se observó recaída en el 23% de los pacientes tratados con tuberculosis. Del mismo modo, Conti *et al.* también informaron recaída en el 16% de los pacientes con EGC y tratamiento para tuberculosis (10). Por lo que, en pacientes con EGC y enfermedad por *M. tuberculosis* se debe considerar la terapia con cuatro medicamentos por un tiempo más prolongado, prefiriendo el tratamiento diario a la terapia intermitente para reducir el riesgo de recaída y farmacoresistencia (67,81).

La infección diseminada por micobacterias se ha reportado como causa de muerte en pacientes con EGC (9,10,66). En el presente estudio, la enfermedad diseminada por *M. tuberculosis* se documentó como la causa de muerte en un paciente complicado con síndrome de activación de macrófaga. El síndrome de activación de macrófaga se ha informado como una complicación poco frecuente en EGC, desencadenado principalmente por infecciones bacterianas y fúngicas que conducen a una respuesta inflamatoria incontrolada (82). Los principales agentes infecciosos identificados como desencadenantes de este síndrome en pacientes con EGC son el complejo *Burkholderia cepacia* y *Leishmania* spp., y más raramente *Salmonella* spp., *Aspergillus* spp, *Candida* spp. (82,83) No se han documentado casos de enfermedad tuberculosa diseminadas como desencadenante de síndrome de activación de macrófagos en EGC.

XIV. SESGOS POTENCIALES Y LIMITANTES

El estudio está sujeto a posible sesgo de información ya que el diagnóstico de enfermedad por micobacterias de los pacientes se realizó de manera retrospectiva de acuerdo a lo reportado en el expediente clínico, las cuales fueron confirmadas en una baja proporción de casos, además de que la edad y por tanto el seguimiento varió entre pacientes. Por lo que los pacientes aquí analizados pueden no representar todo el espectro de pacientes EGC y enfermedad micobacteriana, lo que puede conducir a diferentes valores de índice de estimulación para la asociación.

XV. CONCLUSIONES

- a. La proporción de pacientes con enfermedad por micobacterias fue similar a la reportada en países donde la vacuna de BCG es parte del esquema de inmunizaciones infantil y donde la tuberculosis es endémica.
- b. Se observó una menor producción de ROS, medida por el IE, en neutrófilos, linfocitos y monocitos de pacientes con EGC que presentaron enfermedad por micobacterias en comparación con los que no lo presentaron.
- c. Los pacientes con EGC con un valor de IE ≤ 1.5 en neutrófilos y linfocitos ó ≤ 1.8 en monocitos tuvieron el mayor riesgo de enfermedad por micobacterias.
- d. Además de la exposición al patógeno, la actividad residual de la NADPH oxidasa es un parámetro importante asociado con la enfermedad por micobacterias en pacientes con EGC.

XVI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Arnold DE, Heimall JR. A Review of Chronic Granulomatous Disease. *Advances in Therapy*. 2017.
2. Segal BH, Leto TL, Gallin JI, Malech HL, Holland SM. Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. *Medicine*. 2000.
3. Chelombitko MA. Role of Reactive Oxygen Species in Inflammation: A Minireview. *Moscow University Biological Sciences Bulletin*. 2018.
4. Rider NL, Jameson MB, Creech CB. Chronic granulomatous disease: Epidemiology, pathophysiology, and genetic basis of disease. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2018;
5. Thomas DC, Charbonnier L-M, Schejtman A, Aldhekri H, Coomber EL, Dufficy ER, et al. EROS/CYBC1 mutations: Decreased NADPH oxidase function and chronic granulomatous disease. *J Allergy Clin Immunol [Internet]*. 2019 Feb;143(2):782-785.e1. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674918314234>
6. van den Berg JM, van Koppen E, Åhlin A, Belohradsky BH, Bernatowska E, Corbeel L, et al. Chronic granulomatous disease: The European experience. *PLoS One*. 2009;
7. Winkelstein JA, Marino MC, Johnston RB, Boyle J, Curnutte J, Gallin JI, et al. Chronic granulomatous disease: Report on a national registry of 368 patients. *Medicine (Baltimore)*. 2000;
8. Agudelo-Flórez P, Prando-Andrade CC, López JA, Costa-Carvalho BT, Quezada A, Espinosa FJ, et al. Chronic granulomatous disease in Latin American patients: Clinical spectrum and molecular genetics. *Pediatr Blood Cancer*. 2006;
9. de Oliveira-Junior EB, Zurro NB, Prando C, Cabral-Marques O, Pereira PVS, Schimke LF, et al. Clinical and Genotypic Spectrum of Chronic Granulomatous Disease in 71 Latin American Patients: First Report from the LASID Registry. *Pediatr Blood Cancer*. 2015;
10. Conti F, Lugo-Reyes SO, Blancas Galicia L, He J, Aksu G, Borges de Oliveira E, et al. Mycobacterial disease in patients with chronic granulomatous disease: A retrospective analysis of 71 cases. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;
11. Blancas-Galicia L, Santos-Chávez E, Deswarte C, Mignac Q, Medina-Vera I, León-Lara X, et al. Genetic, Immunological, and Clinical Features of the First Mexican Cohort of Patients with Chronic Granulomatous Disease. *J Clin Immunol*. 2020;
12. Marciano BE, Spalding C, Fitzgerald A, Mann D, Brown T, Osgood S, et al. Common severe infections in chronic granulomatous disease. *Clin Infect Dis*. 2015;
13. B. M, R. R, A. S, C. P, T. B, A. F, et al. Clinical features, long-term follow-up and outcome of a large cohort of patients with Chronic Granulomatous Disease: An Italian multicenter study. *Clin Immunol*. 2008;
14. Kutukculer N, Aykut A, Karaca NE, Durmaz A, Aksu G, Genel F, et al. Chronic granulomatous disease: Two decades of experience from a paediatric immunology unit in a country with high rate of consanguineous marriages. *Scand J Immunol*. 2019;
15. Kulkarni M, Hule G, de Boer M, van Leeuwen K, Kambli P, Aluri J, et al. Approach to Molecular Diagnosis of Chronic Granulomatous Disease (CGD): an Experience from a Large Cohort of 90 Indian Patients. *J Clin Immunol [Internet]*. 2018 Nov 23;38(8):898–916. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10875-018-0567-y>
16. Wolach B, Gavrieli R, de Boer M, van Leeuwen K, Berger-Achituv S, Stauber T, et al. Chronic granulomatous disease: Clinical, functional, molecular, and genetic studies. The Israeli experience with 84 patients. *Am J Hematol*. 2017;
17. Roos D. Chronic granulomatous disease. In: *Methods in Molecular Biology*. 2019.
18. Bustamante J, Arias AA, Vogt G, Picard C, Galicia LB, Prando C, et al. Germline CYBB mutations that selectively affect macrophages in kindreds with X-linked predisposition to tuberculous mycobacterial disease. *Nat Immunol*. 2011;
19. Cachat J, Deffert C, Hugues S, Krause KH. Phagocyte NADPH oxidase and specific immunity. *Clinical Science*. 2015.

20. de Oliveira-Junior EB, Bustamante J, Newburger PE, Condino-Neto A. The human NADPH oxidase: Primary and secondary defects impairing the respiratory burst function and the microbicidal ability of phagocytes. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2011.
21. Buvelot H, Posfay-Barbe KM, Linder P, Schrenzel J, Krause KH. *Staphylococcus aureus*, phagocyte NADPH oxidase and chronic granulomatous disease. *FEMS Microbiol Rev*. 2017;
22. Roos D, de Boer M. Molecular diagnosis of chronic granulomatous disease. *Clin Exp Immunol*. 2014;
23. Arnadóttir GA, Norddahl GL, Gudmundsdóttir S, Agustsdóttir AB, Sigurdsson S, Jensson BO, et al. A homozygous loss-of-function mutation leading to CYBC1 deficiency causes chronic granulomatous disease. *Nat Commun* [Internet]. 2018 Dec 25;9(1):4447. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41467-018-06964-x>
24. Giardino G, Cicalese MP, Delmonte O, Migliavacca M, Palterer B, Loffredo L, et al. NADPH oxidase deficiency: A multisystem approach. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017.
25. Kuhns DB, Alvord WG, Heller T, Feld JJ, Pike KM, Marciano BE, et al. Residual NADPH oxidase and survival in chronic granulomatous disease douglas. *N Engl J Med*. 2010;
26. Lun A, Schmitt M, Renz H. Phagocytosis and oxidative burst: reference values for flow cytometric assays independent of age. *Clin Chem* [Internet]. 2000 Nov;46(11):1836–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11067822>
27. Matute JD, Arias AA, Wright NAM, Wrobel I, Waterhouse CCM, Li XJ, et al. A new genetic subgroup of chronic granulomatous disease with autosomal recessive mutations in p40phox and selective defects in neutrophil NADPH oxidase activity. *Blood* [Internet]. 2009 Oct 8;114(15):3309–15. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/114/15/3309/125110/A-new-genetic-subgroup-of-chronic-granulomatous>
28. Van De Geer A, Nieto-Patlán A, Kuhns DB, Tool ATJ, Arias AA, Bouaziz M, et al. Inherited p40 phox deficiency differs from classic chronic granulomatous disease. *J Clin Invest*. 2018;
29. Thomas DC, Charbonnier L-M, Schejtman A, Aldhekri H, Coomber E, Dufficy ER, et al. EROS is required for phagocyte NADPH oxidase function in humans and its deficiency causes Chronic Granulomatous Disease. *bioRxiv*. 2018;
30. Chen Y, Junger WG. Measurement of Oxidative Burst in Neutrophils. In 2012. p. 115–24. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-527-5_8
31. Levinsky RJ, Harvey BA, Rodeck CH, Soothill JF. Phorbol myristate acetate stimulated NBT test: a simple method suitable for antenatal diagnosis of chronic granulomatous disease. *Clin Exp Immunol*. 1983;
32. Elbim C, Lizard G. Flow cytometric investigation of neutrophil oxidative burst and apoptosis in physiological and pathological situations. *Cytom Part A* [Internet]. 2009 Jun;75A(6):475–81. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cyto.a.20726>
33. 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;
34. 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;
35. Fattahi F, Badalzadeh M, Sedighipour L, Movahedi M, Fazlollahi MR, Mansouri SD, et al. Inheritance pattern and clinical aspects of 93 Iranian patients with chronic granulomatous disease. *J Clin Immunol*. 2011;
36. Lee PPW, Chan KW, Jiang L, Chen T, Li C, Lee TL, et al. Susceptibility to mycobacterial infections in children with x-linked chronic granulomatous disease: A review of 17 patients living in a region endemic for tuberculosis. *Pediatr Infect Dis J*. 2008;

37. M.Y. K, Y. C, K. VL, S.S. K, I. B, M. Y, et al. Clinical, functional, and genetic characterization of chronic granulomatous disease in 89 Turkish patients. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2013.
38. 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;
39. Deffert C, Schächli MG, Pache JC, Cachat J, Vesin D, Bisig R, et al. *Bacillus Calmette-Guerin Infection in NADPH Oxidase Deficiency: Defective Mycobacterial Sequestration and Granuloma Formation*. *PLoS Pathog*. 2014;
40. Van Bui T, Lévy-Bruhl D, Che D, Antoine D, Jarlier V, Robert J. Impact of the BCG vaccination policy on tuberculous meningitis in children under 6 years in metropolitan France between 2000 and 2011. *Eurosurveillance* [Internet]. 2015 Mar 19;20(11):21064. Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=21064>
41. BERLANGA L. [Introduction of BCG vaccination in Mexico]. *Arch Pediatr Urug* [Internet]. 1950 Jul;21(7):563–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14772091>
42. El Programa Nacional de Vacunación: orgullo de México. *Rev la Fac Med*. 2009;
43. Jou R, Huang WL, Su WJ. Tokyo-172 BCG vaccination complications, Taiwan. *Emerging Infectious Diseases*. 2009.
44. Lee W-I, Huang J-L, Yeh K-W, Jaing T-H, Lin T-Y, Huang Y-C, et al. Immune defects in active mycobacterial diseases in patients with primary immunodeficiency diseases (PIDs). *J Formos Med Assoc* [Internet]. 2011 Dec;110(12):750–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092966461100129X>
45. Allen DM, Chng HH. Disseminated *Mycobacterium flavescens* in a probable case of chronic granulomatous disease. *J Infect*. 1993;
46. Ohga S, Ikeuchi K, Kadoya R, Okada K, Miyazaki C, Suita S, et al. Intrapulmonary *Mycobacterium avium* infection as the first manifestation of chronic granulomatous disease. *J Infect*. 1997;
47. Chusid MJ. Chronic granulomatous disease. Diagnosis in a 27-year-old man with *Mycobacterium fortuitum*. *JAMA J Am Med Assoc* [Internet]. 1975 Sep 22;233(12):1295–6. Available from: <http://jama.ama-assn.org/cgi/doi/10.1001/jama.233.12.1295>
48. Sasindran SJ, Torrelles JB. *Mycobacterium Tuberculosis Infection and Inflammation: what is Beneficial for the Host and for the Bacterium?* *Front Microbiol* [Internet]. 2011;2. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2011.00002/abstract>
49. Yang C-S, Shin D-M, Kim K-H, Lee Z-W, Lee C-H, Park SG, et al. NADPH Oxidase 2 Interaction with TLR2 Is Required for Efficient Innate Immune Responses to Mycobacteria via Cathelicidin Expression. *J Immunol*. 2009;
50. Liu W, Peng Y, Yin Y, Zhou Z, Zhou W, Dai Y. The involvement of NADPH oxidase-mediated ROS in cytokine secretion from macrophages induced by *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6. *Inflammation*. 2014;
51. Olive AJ, Smith CM, Kiritsy MC, Sasseti CM. The Phagocyte Oxidase Controls Tolerance to *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *J Immunol* [Internet]. 2018 Sep 15;201(6):1705–16. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1800202>
52. Voskuil MI, Bartek IL, Visconti K, Schoolnik GK. The Response of *Mycobacterium Tuberculosis* to Reactive Oxygen and Nitrogen Species. *Front Microbiol* [Internet]. 2011;2. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2011.00105/abstract>
53. Ng VH, Cox JS, Sousa AO, MacMicking JD, McKinney JD. Role of KatG catalase-peroxidase in mycobacterial pathogenesis: Countering the phagocyte oxidative burst. *Mol Microbiol*. 2004;
54. Jo EK. Autophagy as an innate defense against mycobacteria. *Pathogens and*

- Disease. 2013.
55. Huang J, Brumell JH. NADPH oxidases contribute to autophagy regulation. *Autophagy* [Internet]. 2009 Aug 16;5(6):887–9. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/auto.9125>
 56. Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, Taylor GA, Colombo MI, Deretic V. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell*. 2004;
 57. Arkhipov SA, Shkurupy VA, Akhramenko ES, Solomatina M V., Iljine DA. In Vitro Study of Phenotypical Characteristics of BCG Granuloma Macrophages Over the Course of Granuloma Development. *Bull Exp Biol Med* [Internet]. 2013 Sep 26;155(5):655–8. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10517-013-2218-x>
 58. Xu Q, Choksi S, Qu J, Jang J, Choe M, Banfi B, et al. NADPH oxidases are essential for macrophage differentiation. *J Biol Chem*. 2016;
 59. Vowells SJ, Sekhsaria S, Malech HL, Shalit M, Fleisher TA. Flow cytometric analysis of the granulocyte respiratory burst: a comparison study of fluorescent probes. *J Immunol Methods*. 1995;
 60. Graham SM, Cuevas LE, Jean-Philippe P, Browning R, Casenghi M, Detjen AK, et al. Clinical Case Definitions for Classification of Intrathoracic Tuberculosis in Children: An Update. *Clin Infect Dis*. 2015;
 61. Kramer MS, Feinstein AR. Clinical biostatistics: LIV. The biostatistics of concordance. *Clin Pharmacol Ther* [Internet]. 1981 Jan;29(1):111–23. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1038/clpt.1981.18>
 62. Kuhns DB. Diagnostic Testing for Chronic Granulomatous Disease. In 2019. p. 543–71. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-9424-3_33
 63. Rawat A, Vignesh P, Sharma A, Shandilya JK, Sharma M, Suri D, et al. Infection Profile in Chronic Granulomatous Disease: a 23-Year Experience from a Tertiary Care Center in North India. *J Clin Immunol*. 2017;
 64. Meshaal S, El Hawary R, Abd Elaziz D, Alkady R, Galal N, Boutros J, et al. Chronic granulomatous disease: Review of a cohort of Egyptian patients. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2015;
 65. 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;
 66. Li T, Zhou X, Ling Y, Jiang N, Ai J, Wu J, et al. Genetic and clinical profiles of disseminated bacillus Calmette-Guérin disease and chronic granulomatous disease in China. *Front Immunol*. 2019;
 67. Deffert C, Cachat J, Krause KH. Phagocyte NADPH oxidase, chronic granulomatous disease and mycobacterial infections. *Cellular Microbiology*. 2014.
 68. Adams LB, Dinauer MC, Morgenstern DE, Krahenbuhl JL. Comparison of the roles of reactive oxygen and nitrogen intermediates in the host response to *Mycobacterium tuberculosis* using transgenic mice. *Tuber Lung Dis*. 1997;
 69. Cooper AM, Segal BH, Frank AA, Holland SM, Orme IM. Transient loss of resistance to pulmonary tuberculosis in p47(phox^{-/-}) mice. *Infect Immun*. 2000;
 70. Jones GS, Amirault HJ, Andersen BR. Killing of mycobacterium tuberculosis by neutrophils: A nonoxidative process. *J Infect Dis*. 1990;
 71. Jung YJ, LaCourse R, Ryan L, North RJ. Virulent but not avirulent *Mycobacterium tuberculosis* can evade the growth inhibitory action of a T helper 1-dependent, nitric oxide synthase 2-independent defense in mice. *J Exp Med*. 2002;
 72. Brown M, Varia H, Bassett P, Davidson RN, Wall R, Pasvol G. Prospective study of sputum induction, gastric washing, and bronchoalveolar lavage for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in patients who are unable to expectorate. *Clin Infect Dis*. 2007;
 73. Del Castillo-Barrientos H, Centeno-Luque G, Untiveros-Tello A, Simms B, Lecca L, Nelson AK, et al. Clinical presentation of children with pulmonary tuberculosis: 25 years of experience in Lima, Peru. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2014;

74. González Saldaña N, Macías Parra M, Hernández Porras M, Gutiérrez Castrellón P, Gómez Toscano V, Juárez Olguin H. Pulmonary Tuberculosis: Symptoms, diagnosis and treatment. 19-year experience in a third level pediatric hospital. *BMC Infect Dis*. 2014;
75. Nicol MP, Zar HJ. Advances in the diagnosis of pulmonary tuberculosis in children. *Paediatr Respir Rev* [Internet]. 2020 May; Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1526054220300828>
76. Bates M, Zumla A. The development, evaluation and performance of molecular diagnostics for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2016.
77. Gutierrez C. Benefits and challenges of molecular diagnostics for childhood tuberculosis. In: *International Journal of Mycobacteriology*. 2016.
78. Movahedi M, Aghamohammadi A, Rezaei N, Shahnavaaz N, Jandaghi AB, Farhoudi A, et al. Chronic granulomatous disease: A clinical survey of 41 patients from the Iranian primary immunodeficiency registry. *International Archives of Allergy and Immunology*. 2004.
79. Cuello-García CA, Pérez-Gaxiola G, Jiménez Gutiérrez C. Treating BCG-induced disease in children. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2013.
80. Sobh A, Bonilla FA. Vaccination in Primary Immunodeficiency Disorders. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2016;
81. Nahid P, Dorman SE, Alipanah N, Barry PM, Brozek JL, Cattamanchi A, et al. Official American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guidelines: Treatment of Drug-Susceptible Tuberculosis. *Clinical Infectious Diseases*. 2016.
82. Bode SFN, Ammann S, Al-Herz W, Bataneant M, Dvorak CC, Gehring S, et al. The syndrome of hemophagocytic lymphohistiocytosis in primary immunodeficiencies: Implications for differential diagnosis and pathogenesis. *Haematologica*. 2015;
83. Álvarez-Cardona A, Rodríguez-Lozano AL, Blancas-Galicia L, Rivas-Larrauri FE, Yamazaki-Nakashimada MA. Intravenous immunoglobulin treatment for macrophage activation syndrome complicating chronic granulomatous disease. *J Clin Immunol*. 2012;

XVII. ANEXOS

Anexo 1. Variables del estudio

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDIDA
Género	La totalidad de las características de las estructuras reproductivas y sus funciones	Cualitativa nominal dicotómica	femenino (=1); masculino (=2)
Edad actual	Tiempo transcurrido a partir del nacimiento de un individuo al momento de la recolección de la información	Cuantitativa continua	Meses
Lugar residencia	Estado de la república mexicana donde radica	Cualitativa nominal politómica	Describir
Edad primera manifestación	Tiempo transcurrido a partir del nacimiento de un individuo hasta primer síntoma clínico	Cuantitativa continua	Meses
Primera manifestación micobacterias	Primer síntoma clínico fue relacionado a enfermedad por BCG o por <i>M. tuberculosis</i>	Cualitativa nominal dicotómica	Si (=1); No (=2)
Edad al diagnóstico	Tiempo transcurrido a partir del nacimiento al momento del diagnóstico	Cuantitativa continua	Meses
Vive	Continua con vida al momento de la recolección de los datos	Cualitativa nominal dicotómica	Si (=1); No (=2)
Muerto	Que ya no tiene vida al momento de la recolección de los datos	Cualitativa nominal dicotómica	Si (=1); No (=2)
Edad de muerte	Tiempo transcurrido a partir del nacimiento la muerte	Cuantitativa continua	Meses
Causa de la muerte micobacterias	La pérdida de la vida fue por la invasión de un anfitrión por BCG o <i>M. tuberculosis</i>	Cualitativa nominal dicotómica	Si (=1); No (=2)
Gen con variante patogénica	Cambio en la secuencia de nucleótidos en un gen determinado	Cualitativa nominal politómica	CYBB (=1); CYBA (=2); NCF1 (=3); NCF2 (=4); CYBC1(=5)
Herencia ligada al X	Expresión fenotípica de un alelo relacionado con el alosoma (cromosoma sexual) del individuo.	Cualitativa nominal dicotómica	Si (=1); No (=2)
Herencia autosómica recesiva	Cuando el alelo alterado es recesivo sobre el normal por lo que requiere dos copias del alelo alterado para expresar la enfermedad.	Cualitativa nominal dicotómica	Si (=1); No (=2)
Índice de oxidación o estimulación	Veces se incrementa la producción de rodamina posterior al estímulo.	Cuantitativa continua	Unidades relativas
Aplicación de vacuna BCG	Agente inmunizante activo; cepa atenuada de <i>M. bovis</i> que confiere inmunidad a las infecciones	Cualitativa nominal dicotómica	Si (=1); No (=2)

	micobacterianas.		
Edad de aplicación de BCG	Tiempo transcurrido a partir del nacimiento hasta la aplicación de vacuna BCG	Cuantitativa discreta	Días
Cepa de BCG	Tipo de cepa atenuada de <i>M. bovis</i> utilizada en la vacuna de BCG.	Cualitativa nominal politómica	Tokio (=1); Danesa (=2); Moscú (=3)
Reacción por BCG	Invasión de un anfitrión por multiplicación de la cepa BCG.	Cualitativa nominal dicotómica	Si (=1); No (=2)
Tipo de reacción por BCG	Evento no deseado secundario a la aplicación de vacuna de BCG	Cualitativa nominal dicotómica	Regional (=1); local (=2) BCGosis (=3)
Edad de presentación BCG	Tiempo transcurrido entre la aplicación de BCG y el evento adverso	Cuantitativa discreta	Días
Tratamiento de BCG	Terapéutica empleada	Cualitativa nominal politómica	Describir
Desenlace de BCG	Evolución clínica de la enfermedad	Cualitativa nominal politómica	Resolución (=1); recaída (=2); muerte (=3)
Enfermedad por micobacterias	Cualquiera de las enfermedades infecciosas del hombre y otros animales causadas por especies de micobacterias.	Cualitativa nominal politómica	Confirmada (=1); probable (=2); posible (=3); poco probable (=4); no (=5)
Sitio de infección por micobacteria	Sitio del cuerpo donde se presentó la enfermedad micobacteria	Cualitativa nominal politómica	Ganglio (1); pulmón (2); sistema nervioso central (3); intestino/peritoneo (4); hueso (5); bazo (6); riñón (7); piel (8)
Tratamiento para micobacteria	Terapéutica empleada	Cualitativa nominal politómica	Describir
Desenlace de infección por micobacteria	Evolución clínica de la enfermedad	Cualitativa nominal politómica	Resolución (=1); recaída (=2); muerte (=3)

Anexo 2. Hoja de recolección de datos.

DATOS GENERALES												
#	Apellidos Género F/M		Nombre			Iniciales ()			Expediente			
Fecha nacimiento		/	/	Edad actual	años	meses	Lugar nacimiento		Lugar residencia			
Fecha 1° manif.		/	/	Edad 1°manif	años	meses	1° manifestación micobacterias Si/No					
Fecha diagnóstico		/	/	Edad diagnóstico	años	meses	Tipo herencia: AR / LX		Gen: 1) CYBB 2) CYBA 3) NCF1 4) NCF2 5) CYBC1			
Vive/muerto	Fecha muerte		/	/	Edad muerte		Muerte micobacterias Si/No					
índice de estimulación												
Neutrófilos				Monocitos			Linfocitos					
BCG												
BC G	Si/No	Fecha aplicación		/	/	Edad BCG	días	Cepa				1) Tokio 2) Danesa 3) Moscú
Reacción		Si/No	Tipo reacción		1) Regional 2) Local 3) BCGosis (definitiva, probable, posible)			Edad de presentación		años	meses	
Tratamiento												
Desenlace		1) Resolución 2) Recaída (sitio _____) 3) Muerte										
MICOBACTERIA												
Clasificación		1) Confirmada 2) Probable 3) Posible 4) Poco probable 5) No enfermedad					Edad de presentación		años	meses		
Sitio		1) Ganglio 2) Pulmón 3) SNC 4) Intestino/peritoneo 5) Hueso 6) Bazo 7) Riñón 8) Piel										
Cuadro clínico												
Tratamiento												
Desenlace		1) Resolución 2) Recaída (sitio _____) 3) Muerte										

Anexo 3. Técnica para la realización de 1,2,3, DHR

A continuación, se describe la técnica para realizar la 1,2,3 DHR, la cual se realizó para el diagnóstico de los pacientes con ECG:

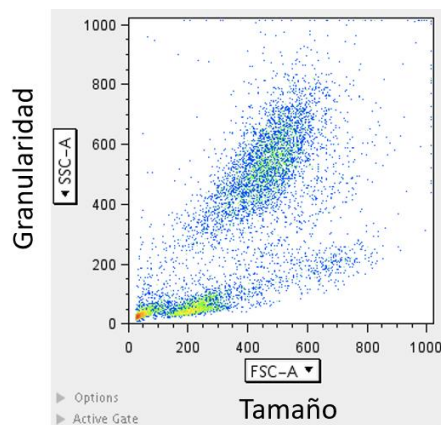
Para este ensayo se utilizaron 150 μL de sangre periférica en un tubo conteniendo 3 mL con ACD o heparina litio o heparina sódica. Se procesaron tres condiciones diferentes. Para cada condición se utilizó un tubo de poliestireno 5 mL de 12x75 mm con fondo redondo. Se colocaron 50 μL de sangre en cada uno de los tubos. Al segundo y al tercer tubo, además de la sangre se agregaron 6 μL de solución de dihidrorrodamina a una concentración 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Life Technologies, OR, E.U.A.), y se incubaron durante 5 min a 37 °C en una estufa de CO₂. Posteriormente solo al tercer tubo con dihidrorrodamina, se le agregaron 30 μL de forbol miristato acetato (PMA, Promega, WI, E.U.A.) a una concentración final 1.6 mM; los tubos se incubaron nuevamente en la estufa de CO₂ a 37° C por 30 min. Para lisar los eritrocitos se agregaron 500 μL solución de lisis (BD) a una dilución de 1:10, se incubaron durante 10 min a 4 °C, posteriormente se lavaron con 1 mL de PBS 1X por dos ocasiones. Se adquirieron 10, 000 eventos totales en el citómetro de flujo FACS ARIA I (BD), utilizando el *software* FACS DIVA (BD). Los archivos .FCS del ensayo de dihidrorrodamina se analizaron con el *software* Flowjo v8.7 (BD); para cada una de las tres condiciones se obtuvo la intensidad de fluorescencia media de la población de neutrófilos seleccionada por tamaño y granularidad. Se calculó el índice de oxidación o estimulación.

Anexo 4. Metodología para el cálculo del índice de estimulación

A continuación, se describe la metodología para el cálculo del índice de estimulación que se realizará a partir de los archivos de citometría de flujo (.FSC) obtenidos de la técnica 1,2,3 DHR.

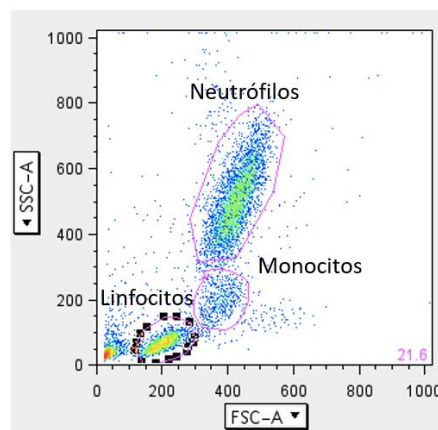
1. Se utilizó el programa FlowJo V8.7 para analizar los archivos .FSC.
2. Se identificó en la gráfica de puntos las diferentes regiones de acuerdo a su tamaño, en dispersión frontal (FSC-A, de sus siglas en inglés *forward scatter*) y granularidad, en dispersión lateral (SSC-A, de sus siglas en inglés *side scatter*) (**Figura 5**).

Figura 5. Gráfica de regiones con base a tamaño y granularidad.



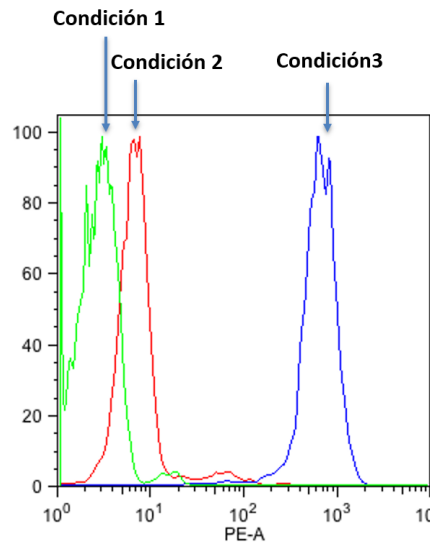
3. Se seleccionó la región de linfocitos, de neutrófilos y de monocitos, con base a FSC-A y SSC-A (**Figura 6**).

Figura 6. Selección de las diferentes regiones dependiendo a tamaño y granularidad.



- De cada región se graficó el histograma de la ficoeritrina (PE-A de sus siglas en inglés *phycoerythrin area*) en cada uno de los archivos de cada una de las tres condiciones (condición 1: sangre total; condición 2: sangre total y 1,2,3 DHR; condición 3: sangre total, 1,2,3 DHR y forbolmiristato) (Figura 7).

Figura 7. Histogramas de la fluorescencia emitida por neutrófilos en cada condición en sujeto sano.



- Se calculó el promedio de IFM de la PE-A en cada una de las condiciones.
- A partir del resultado del IFM de la PE-A en cada una de las condiciones se calculó del índice de estimulación con la fórmula:

$$\frac{\text{IFM de la región blanco del tubo con estímulo}}{\text{IFM de la región blanco del tubo sin estímulo}}$$