



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS
MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

“CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y
MOLECULAR EN PACIENTES CON
NEUTROPENIA CONGÉNITA GRAVE TIPO 4”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN:
GENÉTICA MÉDICA

PRESENTA:

DRA. LARISSA LÓPEZ RODRÍGUEZ

TUTOR DE TESIS

DR. OSVALDO MÁXIMO MUTCHINICK BARINGOLTZ

ASESOR TÉCNICO

Q.F.B. YEVGENIYA SVYRYD



CIUDAD DE MÉXICO

FEBRERO 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mis padres por enseñarme a siempre superarme.

“En arte, la tesis debe transformarse en idea espontánea, en sentimiento”

-Konstantin Stanislavski

AGRADECIMIENTOS

Agradezco enormemente a mi familia por ser el pilar más grande para alcanzar este logro; por soportar todas esas noches de desesperación y desánimo. El camino fue largo y en ocasiones complicado, pero gracias a ustedes siempre vi la luz al final del camino.

A Sebas, por ser el mejor escucha, por permitirme desahogarme y por dar consejos llenos de empatía y nobleza.

A mi segunda hermana, Lilian, sin ti este camino se hubiera hecho eterno; gracias por todas esas tardes de consuelo y de múltiples risas para aliviar el trabajo y el estrés. Compartir este camino contigo, ha sido un gran honor.

Pame, gracias por tu apoyo incondicional y por tu enorme capacidad de flebotomista. Serás una excelente genetista, te deseo lo mejor en este camino que empieza, que nada te perturbe y nunca pierdas tu esencia.

A mis compañeros de residencia les agradezco por permitirme formar parte de un equipo tan dedicado. Gracias por todo, Tam, Gaby y Luis.

Yev, sin ti este trabajo no hubiera sido posible. Gracias por no solo ser una asesora técnica, sino, una guía. Todas tus enseñanzas las llevaré siempre conmigo.

Por último, a mi tutor, Dr. Mutchinick, principalmente gracias por haberme recibido en su departamento y por darme la oportunidad de desarrollarme en el mejor instituto. Gracias por ser un mentor e inspirarme a ser mejor día con día.

RESUMEN

Introducción: la neutropenia congénita grave tipo 4 (NCGT4) es un trastorno de la granulopoyesis con herencia autosómica recesiva; debido a mutaciones en el gen *G6PC3*, el cual codifica para la subunidad catalítica de la proteína glucosa 6 fosfatasa 3 (o G6Pasa-β). Se estima una prevalencia de 1 en cada 10,000,000 de habitantes. Hasta un 90% de los casos se presentan de forma sindrómica, asociados a manifestaciones extrahematológicas, principalmente: presencia de un patrón venoso superficial prominente, seguido de anomalías cardiovasculares como defectos del septum atrial; y anomalías urogenitales. El 10% restante de los casos se presentan de forma aislada. Para el diagnóstico molecular, la técnica de primera elección es la secuenciación directa del gen *G6PC3*; observándose la mayoría de las mutaciones se observan en los exones 1 y 6. Hasta la fecha se han descrito más de 105 pacientes.

Objetivos: definir el espectro sintomático multisistémico extrahematológico que caracteriza a la NCGT4, que justifique la búsqueda de mutaciones en el gen *G6PC3* y permita la confirmación diagnóstica.

Materiales y métodos: se revisaron expedientes en el INCMNSZ desde enero 2000 hasta diciembre 2020 para neutropenia (CIE-10:D70). Se agruparon en dos: sindrómicos con manifestaciones extrahematológicas y neutropenia aislada. Se excluyeron los casos de neutropenia secundaria. Con consentimiento informado de los pacientes se realizó genealogía de un mínimo de 3 generaciones, historia clínica y exploración física. La secuenciación del gen *G6PC3* se realizó por Sanger. En los casos negativos para variantes en este gen, se realizó secuenciación en el gen *ELANE*.

Resultados: se obtuvo una muestra de 20 pacientes: 10 sindrómicos, con una mediana de edad de 38.5 años y 10 aislados con mediana de 40 años. Ambos grupos con distribución hombre-mujer de 1:4 y una mediana de edad al diagnóstico de 32 años. La manifestación más común fue el patrón venoso superficial prominente, seguido de alteraciones cardiovasculares y urogenitales. En tres casos, se identificó una variante patogénica, dos de ellos homocigotos para la variante .210delC, y un caso heterocigoto compuesto para la variante c.210delC y c.199:218+1del. Los tres presentaron grados variables de neutropenia con linfocitopenia constante y dos trombocitopenia intermitente. En los tres pacientes se identificó un patrón venoso superficial prominente y defecto del septum atrial.

Conclusiones. Este trabajo es el primer estudio que analiza la presencia de mutaciones en el *G6PC3* en una cohorte de pacientes mexicanos con neutropenia sindrómica. La variante c.210delC fue la más frecuentemente observada.

Palabras claves: Neutropenia, NCGT4, gen *G6PC3*.

ABSTRACT

Introduction: Severe congenital neutropenia type 4 (SCN4) is a disorder of granulopoiesis with autosomal recessive inheritance due to mutations in the gene *G6PC3*. This gene encodes the catalytic subunit of the glucose-6-phosphatase 3 (G6Pase- β). It has an estimated prevalence of one per-10,000,000 inhabitants. More than 90% of patients will present as a syndromic form, with nonhematological aberrations, characterized by an increased visibility of superficial veins, cardiovascular anomalies, such as atrial septal defects and urogenital abnormalities. The remaining 10% will present as an isolated form without nonhematological aberrations. Molecular diagnosis is achieved via direct sequencing of the *G6PC3* gene; most pathogenic variants are found on exons 1 and 6. To date, more than 105 patients have been described.

Objectives: the main goal is to characterize the nonhematological aberrations seen in SCN4, allowing for the search of variants on the *G6PC3* gene and enabling molecular confirmation.

Material and methods: medical records of patients with neutropenia (CIE-10:D70) from January 2000 to December 2020 were examined. Patients were sorted into two groups, the syndromic and isolated neutropenia. A three-generation pedigree was drawn, medical history obtained, and physical examination was undertaken with informed consent. *G6PC3* sequence analysis was done via the Sanger method. Negative cases underwent sequence analysis for the *ELANE* gene.

Results: a total of twenty patients were recruited; in the syndromic group (10), medium age was 38.5 years, and 40 years in the isolated group (10). Both groups showed a male to female distribution of 1:4 and median age at diagnosis of 32 years. The most common feature was increased visibility of superficial veins, followed by cardiovascular and urogenital defects. In three patients, a pathogenic variant was identified, two were homozygous for the c.210delC variant, and one patient was a compound heterozygous for the c.210delC and the c.199:218+1del variants. All three presented with variable degrees of neutropenia and constant lymphocytopenia; in two of them, intermittent thrombocytopenia was confirmed. Further, increased visibility of superficial veins and atrial septal defects was found in all three patients.

Conclusions: this is the first study to investigate the presence of pathogenic variants on the *G6PC3* gene in a cohort of Mexican patients with syndromic neutropenia. The pathogenic variant c.210delC was the main variant identified.

Keywords: neutropenia, SCN4, *G6PC3* gene.

ABREVIATURAS

ADN – Ácido Desoxirribonucleico.

ADNg – Ácido Desoxirribonucleico genómico.

AR – Autosómica Recesiva.

ARNm – Ácido Ribonucleico mensajero.

CAN – Cuenta Absoluta de Neutrófilos.

CIA – Comunicación Interauricular

CIE-10 – Clasificación internacional de enfermedades 10.

RE – Retículo endoplásmico.

DSA – Defecto del Septum Atrial

EII – Enfermedad Inflamatoria Intestinal.

ERAD – Sistema de degradación de proteínas asociados al RE (por sus siglas en inglés).

FSCNR – Registro Frances de Neutropenia Crónica Grave (por sus siglas en inglés).

G6P – Glucosa-6-Fosfato (Por sus siglas en inglés).

G6PC3 – Glucosa 6 Fosfatasa 3 Subunidad catalítica.

G6Pasa- β – Glucosa 6 Fosfatasa Beta.

G-CSF – Factor Estimulador de Colonias Granulocíticas (por sus siglas en inglés).

G-CSFR – Receptor del Factor Estimulador de Colonias Granulocíticas (por sus siglas en inglés).

GSD1b – Glucogenosis tipo 1b.

INCMNSZ – Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

IGRP – Glucosa-6-fosfatasa específica de islotes pancreáticos (por sus siglas en inglés).

ISCNR – Registro Internacional de Neutropenia Crónica Grave (por sus siglas en inglés).

MLPA – Amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples (por sus siglas en inglés).

MO – Médula Ósea

NCG – Neutropenia Congénita Grave.

NCGT4 – Neutropenia Congénita Grave Tipo 4.

PVSP – Patrón Venoso Superficial Prominente

RVU – Reflujo vesicoureteral.

rG-CSF – Factor Estimulador de Colonias Granulocíticas Recombinante (por sus siglas en inglés).

TCPH – Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.

UE – Unión Europea.

UPR – Respuesta de proteínas mal plegadas (por sus siglas en inglés).

VL – Vasculitis leucocitoclástica

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Mutaciones Fundadoras. [Obtenido de Banka et.al,2013]	19
Tabla 2. Diagnóstico Diferencial con Trastornos Multisistémicos.....	26
Tabla 3. Descripción clínica pacientes Vélez-Tirado et al, 2020.	28
Tabla 4. Características de los oligonucleótidos utilizados en el análisis del gen G6PC3. 35	
Tabla 5. Características de los oligonucleótidos utilizados en el análisis del gen ELANE. 37	
Tabla 6. Definición operacional y clasificación de variables.....	38
Tabla 7. Representación de pacientes con antecedentes heredofamiliares positivos.....	47
Tabla 8. Diagnóstico hematológico correspondiente a los 20 casos	48
Tabla 9. Manifestaciones extrahematológicas en grupo sindrómicos (NCG-S).....	50
Tabla 10. Manifestaciones hematológicas en pacientes con diagnóstico confirmado de Neutropenia Congénita Grave Tipo 4.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del cromosoma 17 y localización del gen G6PC3. [Modificada de Wikipedia]	16
Figura 2. Estructura cristalográfica de la proteína G6Pasa-β. UnitProtKb-Q9BUM1 [Modificada de G6PC3_HUMAN].....	17
Figura 3. Topología de la proteína G6Pasa-β. Aminoácidos estrictamente conservados (negro) parcialmente conservados (gris). [Obtenido de Guionie et al. 2003].	17
Figura 4. Metabolismo de Glucosa-6-Fosfato en Neutrófilos. [Modificada de Chou et. al, 2010].....	18
Figura 5. Mutaciones en el gen G6PC3. Cada mutación está representada una vez por familia detectada. Triángulos invertidos – mutaciones sentido erróneo. Flechas – mutación sitio de splicing. Estrellas- cambios en el marco de lectura.[Modificada de Banka et. al, 2013].....	18
Figura 6. Algoritmo de abordaje en pacientes con sospecha de NCGT4	34
Figura 7. Origen geográfico de los pacientes, grupo sindrómico y aislado.....	46
Figura 8. Gráfica representativa de Cuenta Absoluta de Neutrófilos en grupo "sindrómico"	49
Figura 9. Representación gráfica del gen G6PC3 y localización de las mutaciones identificadas en los pacientes con Neutropenia Congénita Grave Tipo 4	51
Figura 10. Electroferogramas de secuencia de referencia del gen G6PC3 y variantes patogénicas identificadas.....	52
Figura 11. Representación gráfica de cuentas absolutas de neutrófilos en casos con diagnóstico confirmado de Neutropenia Congénita Grave Tipo 4.....	53
Figura 12. Genealogía correspondiente al caso NCG-S-07.....	54
Figura 13. Mapa representativo del Estado de México, origen familiar de pacientes mexicanos reportados	55
Figura 14. Representación gráfica de exones involucrados en NCGT4.....	58
Figura 15. Plásmido VIII digerido, su peso molecular y concentración de cada fragmento.	75

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Patrón venoso superficial prominente. [Tomado de Vélez-Tirado et.al., 2020]	20
Ilustración 2. Características fenotípicas gastrointestinales. A) Imagen de colonoscopia que evidencia ulceración profunda. B) RM mostrando dilatación proximal a la lesión observada en A. C) Biopsia con tinción hematoxilina y eosina con infiltrado inflamatorio [Modificada de Bolton et al, 2020].....	21

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	II
RESUMEN	III
ABSTRACT	IV
ABREVIATURAS	V
ÍNDICE DE TABLAS	VII
ÍNDICE DE FÍGURAS	VIII
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	VIII
ÍNDICE	IX
1. MARCO TEÓRICO	13
1.1. Antecedentes históricos	13
1.2. Definición	15
1.3. Epidemiología	15
1.4. Gen <i>G6PC3</i> , glucosa-6-fosfatasa beta, funciones y vías de regulación	16
1.4.1. Características generales del gen <i>G6PC3</i>	16
1.4.2. Características de la proteína G6Pasa- β	16
1.4.3. Participación en la homeostasis de glucosa	17
1.4.4. Mutaciones en el gen <i>G6PC3</i>	18
1.4.2.1. Mutaciones fundadoras	19
1.5. Características clínicas de NCGT4	19
1.5.1. Descripción general	19
1.5.2. Alteraciones hematológicas	19
1.5.3. Malformaciones cardíacas	20
1.5.4. Patrón venoso superficial prominente	20
1.5.5. Alteraciones urogenitales	20
1.5.6. Alteraciones endocrinológicas	21
1.5.7. Enfermedad inflamatoria intestinal (EII)	21
1.5.8. Otras manifestaciones clínicas	22
1.6. Diagnóstico molecular de NCGT4	22
1.6.1. Confirmación del diagnóstico clínico en pacientes	22
1.6.2. Análisis genético en los familiares	22
1.6.3. Asesoramiento genético para entidad autosómica recesiva (AR)	23
1.7. Seguimiento y tratamiento de los pacientes con NCGT4 confirmado	23
1.7.1. Factor estimulador de colonias granulocíticas recombinante (rG-CSF)	23
1.7.1.1. Embarazo	24
1.7.1.2. Efectos adversos	24

1.7.1.3.	Progresión a leucemia	25
1.7.2.	Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH)	25
1.8.	Diagnósticos diferenciales	25
1.9.	Pronóstico	27
1.10.	NCGT4 en la población mexicana	28
2.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	30
3.	HIPÓTESIS.....	31
4.	OBJETIVOS	31
4.1.	Objetivo general	31
4.2.	Objetivos específicos.....	31
5.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	32
5.1.	Diseño general	32
5.2.	Criterios de selección	32
5.2.1.	Criterios de inclusión:	32
5.2.2.	Criterios de exclusión:	32
5.2.3.	Criterios de eliminación:	32
5.3.	Búsqueda e identificación de pacientes candidatos	33
5.4.	Estructura de la base de datos	33
5.5.	Reclutamiento de los pacientes	33
5.6.	Diagnóstico molecular	34
5.7.	Procedimientos de laboratorio y técnicas.....	34
5.7.1.	Extracción del ADN de leucocitos de sangre periférica.....	34
5.7.2.	Amplificación de los fragmentos del gen G6PC3	34
5.7.3.	Evaluación y purificación de los fragmentos amplificados.....	35
5.7.4.	Secuenciación directa del gen G6PC3.....	35
5.7.5.	Purificación de los productos de la reacción de secuencia.	36
5.7.6.	Análisis de los productos de la reacción de secuencia mediante electroforesis capilar	36
5.7.7.	Análisis de secuenciación del gen <i>ELANE</i>	36
5.8.	Análisis estadístico	37
6.	RESULTADOS	46
6.1.	Descripción de la muestra	46
6.1.1.	Características Demográficas de los 20 casos estudiados	46
6.1.2.	Antecedentes heredofamiliares	47
6.1.3.	Características Clínicas	47
6.1.3.1.	Hematológicas.....	47
6.1.3.2.	Manifestaciones Extrahematológicas.....	50

6.2.	Descripción de las mutaciones identificadas.....	51
6.3.	Descripción clínica de los casos confirmados.....	52
6.4.	Estudio de extensión a familiares.....	54
6.5.	Análisis del gen <i>ELANE</i>	54
7.	DISCUSIÓN.....	55
8.	CONCLUSIONES.....	60
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	61
10.	ANEXOS.....	67
10.1.	Anexo A1. Cuestionario “Historia clínica y familiar NCGT4”.....	67
10.2.	Anexo A2. Símbolos estandarizados por la Sociedad Nacional de Asesores Genéticos.....	72
10.3.	Anexo A3. Técnica de toma de muestra de sangre periférica.....	73
10.4.	Anexo A4. Procedimiento de separación de productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa.....	74
10.5.	Anexo A5. Purificación de los productos de reacción de secuencia usando columnas de sílica.....	75

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes históricos

En 1956 Rolf Kostmann, distinguido pediatra sueco, fue quien describió por primera vez un caso correspondiente a neutropenia congénita grave (NCG) en un paciente de 2 meses de edad con fiebre elevada, otitis media, mastoiditis y múltiples forúnculos de diferentes tamaños; el frotis de sangre periférica demostró la presencia de agranulocitosis.^{1,2} La paciente era originaria de una pequeña comunidad llamada Dirivaara en Suecia; donde la enfermedad era altamente frecuente, siendo conocida como “Forúnculos de Dirivaara”.³ Kostmann consideró de que se trataba de una entidad genética con un modo de herencia autosómica recesiva.³ Atribuyéndose el defecto a una insuficiencia primaria de la médula ósea.²

La descripción original de NCG precedió a la identificación de la citocina mieloide específica durante aproximadamente 20 años. Treinta años después se aisló el factor estimulador de colonias granulocíticas y su receptor, G-CSF y G-CSFR, respectivamente. Esto permitió hipotetizar que el origen de la neutropenia provenía de una expresión anormal o falla en la respuesta al G-CSF, sin embargo, no se identificaron mutaciones en estos genes.² El ADN codificante del G-CSF fue aislado de manera independiente por dos laboratorios en 1986.^{4,5}

Horwitz y colaboradores, en 1999, identifican mutaciones en el gen de la elastasa neutrofílica (*ELANE*) como causales de casi la totalidad de casos con neutropenia cíclica.⁶ Posteriormente Dale y col., identifican que dicho gen, a su vez se puede encontrar mutado en hasta un 60% de casos de NCG.⁷ Más tarde, en el 2004, el equipo de Horwitz postularon que la neutropenia observada es el resultado de las alteraciones en el traslado y la localización intracelular de *ELANE*.¹ En paralelo, Köllner y col, proponen una segunda hipótesis que describe el rol de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, por sus siglas en inglés) en la generación de neutropenia.⁸ Este sistema se activa en presencia de proteínas mal plegadas, en este caso *ELANE*, en el retículo endoplásmico (ER), generando una disminución de síntesis proteica, incremento de chaperonas y activación del sistema de degradación de proteínas asociado al RE (ERAD, por sus siglas en inglés)

Ambos mecanismos propuestos se consideran eventos intracelulares independientes de las funciones de *ELANE*, por lo cual la haploinsuficiencia en sí de la proteína podría no ser la causa de la neutropenia. En años posteriores, se identificaron al menos 10 individuos con delección de la región subtelomérica del brazo corto del cromosoma 19 que incluye el gen *ELANE*. Es interesante que ninguno de estos individuos presentó evidencia de disminución en la cuenta de neutrófilos.⁹

Si bien *ELANE* es uno de los genes más frecuentemente involucrados en NCG, aún queda un 40% de individuos en los que la patología no está asociada a mutaciones de este gen. Continuando la búsqueda de los factores genéticos, en el 2007, Christoph Klein y colaboradores identifican al gen causal de la NCG con herencia autosómica recesiva, conocida como Enfermedad de Kostmann.¹⁰ Estos estudios demuestran mutación en el gen *HAX1*, el cual codifica para una proteína mitocondrial con expresión ubicua, hipotetizando que su pérdida lleva a la liberación de citocromo c y otras proteínas pro-apoptóticas hacia el citoplasma.²

Un par de años después, en el 2009, la revista *The New England Journal of Medicine* publica un artículo sobre un síndrome con neutropenia congénita y mutación en el gen *G6PC3*.¹¹ En este, Boztug y colaboradores, realizaron genotipificación con marcadores microsatelitales por secuenciación de genoma completo en una familia con NCG, identificando al gen *G6PC3* como candidato, posteriormente mediante secuenciación Sanger se corroboraron mutaciones.¹¹

Cabe destacar, que previo a éste, se realizaron una serie de trabajos sobre las proteínas de la familia de glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa). Durante estudios destinados a caracterizar mejor la cinética de la glucosa-6-fosfatasa se identificó una secuencia nueva de cDNA que codifica para una G6Pasa específica para islotes (IGRP, también conocida como G6PC2), pero solo con un 50% de homología en secuencia de aminoácidos a la G6Pasa hepática.^{12,13} Sin embargo, su sobreexpresión en tejidos *in vitro* no aumentaba la hidrólisis de glucosa 6 fosfato (G6P), sugiriendo la existencia de alguna otra enzima de apoyo.^{12,14} Estudios con la finalidad de indagar a mayor profundidad, se identificó el cDNA y la secuencia del gen para la proteína relacionada con la subunidad catalítica G6Pasa (UGRP); el tercer miembro de la familia de G6Pasas y con la expresión ubicua entre los tejidos.¹⁵ En el mismo estudio el gen fue identificado y mapeado al cromosoma 17q21.

Es notorio que a pesar de pertenecer a la misma familia, este gen es de menor tamaño y contiene un exón adicional como resultado de una separación de un exón por inserción de un intrón.¹⁵ Posteriormente, Guionie y col. (2003), continuando los estudios de la cinética de la nueva enzima observaron que, en comparación con su homóloga hepática, la UGRP tiene la capacidad de metabolizar otros sustratos además del G6P. A partir de esta publicación la proteína fue renombrada como G6PC3.¹⁶

A diferencia de las mutaciones causales en *ELANE*, el mecanismo por el cual las mutaciones en *G6PC3* causan la neutropenia, si bien no está del todo descrito, parece involucrar las funciones metabólicas de la G6PC3, alterando la homeostasis de la glucosa intracelular y llevando al neutrófilo a la apoptosis, como lo postularon Boztug y col. en su reporte.¹¹

Jun y col. (2010) precisaron que la disfunción celular en neutrófilos deficientes de la G6PC3 se debe a la falta de reciclaje de la glucosa entre el retículo endoplásmico y

el citoplasma.¹⁷ En un estudio reciente, McKinney y col. (2020), extendieron el estudio del metabolismo de los neutrófilos humanos afectados, demostrando que la deficiencia de la G6PC3 da lugar a alteraciones en la glucólisis, la glutaminólisis, la vía hexosa monofosfato (HMS) y las vías de oxido-reducción.¹⁸

1.2. Definición

Se define como **neutropenia** a la reducción en la cuenta absoluta de neutrófilos (CAN) en la circulación sanguínea. Durante la infancia temprana (2-12 meses) se considera neutropenia con niveles de CAN por debajo de 2000 células/mm³, mientras que en mayores de 1 año es por debajo de 1500 células/mm³.¹⁹ Se considera como neutropenia grave cuando se encuentra un CAN por debajo de 500 células/mm³ y se convierte en crónica si dura más de tres meses,²⁰ pudiendo ser *intermitente* (periodos de normalización espontáneos) o permanente (presente en todos los análisis).¹⁹ Del mismo modo, se dice que es “central” si se evidencia deficiencia en las etapas de maduración tardía (<10% de neutrófilos maduros) o “periférica” si la médula ósea (MO) esta normal.¹⁹

La **NCG** comprende un grupo de errores hereditarios de la hematopoyesis, que se caracterizan por una alteración en la diferenciación de los granulocitos neutrofilicos.²¹ De manera general el termino NCG excluye neutropenias secundarias, por leucemia, mielodisplasia, enfermedad autoinmune sistémica o por causas infecciosas.²² Para la clasificación de la NCG no existe un criterio consenso, por lo que el factor más importante es el genotipo, dado que el fenotipo representa un continuo de síntomas que se sobrelapan.¹⁹

La **neutropenia congénita grave tipo 4** (NCGT4; SCN4, OMIM 612541) es un trastorno de granulopoyesis con herencia autosómica recesiva; dado por mutaciones en el gen *G6PC3*, el cual codifica para la subunidad catalítica de la proteína glucosa 6 fosfatasa 3 (o G6Pasa-β).²³ Se caracteriza por neutropenia congénita grave, infecciones bacterianas recurrentes, patrón venoso superficial prominente, incidencia elevada de defectos cardiacos congénitos y anomalías urogenitales; además, en gran proporción de los pacientes se observa trombocitopenia intermitente.²⁴

1.3. Epidemiología

Hasta la fecha no se cuenta con un abordaje homogéneo para un registro de neutropenia congénita.²⁵ En 1993, se creó tanto el Registro Frances de Neutropenia Crónica Grave (FSCNR, por sus siglas en inglés) como el Registro Internacional para Neutropenia Crónica Grave (ISCNR, por sus siglas en inglés).^{25,26} El ISCNR incluye pacientes de Australia, América del Norte, y varios países de la Unión Europea (UE), con excepción de Francia.²⁶ Además, el registro de pacientes por país es heterogéneo, ya que en algunos, se incluyen en registros para fallas medulares y/o inmunodeficiencias.^{27,28}

De acuerdo con un estimado basado en población del FSCNR se obtuvo una prevalencia de 174 casos por 10 millones de habitantes, es decir, 1:57,471 individuos; para el total de neutropenia congénita. Considerando únicamente el caso por déficit de G6PC3, se consideró una prevalencia de 1 en 10 millones de habitantes; ambos estimados fueron obtenidos al considerar una expectativa de vida de 50 años.²⁹

1.4. Gen *G6PC3*, glucosa-6-fosfatasa beta, funciones y vías de regulación

1.4.1. Características generales del gen *G6PC3*

El gen *G6PC3*, se localiza en el brazo largo del cromosoma 17 (Figura 1), en la región q21;¹⁵ está conformado por 6 exones que codifican para una proteína llamada glucosa-6-fosfatasa 3 (*G6PC3*) o glucosa-6-fosfatasa beta (*G6Pasa-β*).³⁰ Es una proteína de 346 aminoácidos con un peso molecular de 38.7 kD.³¹

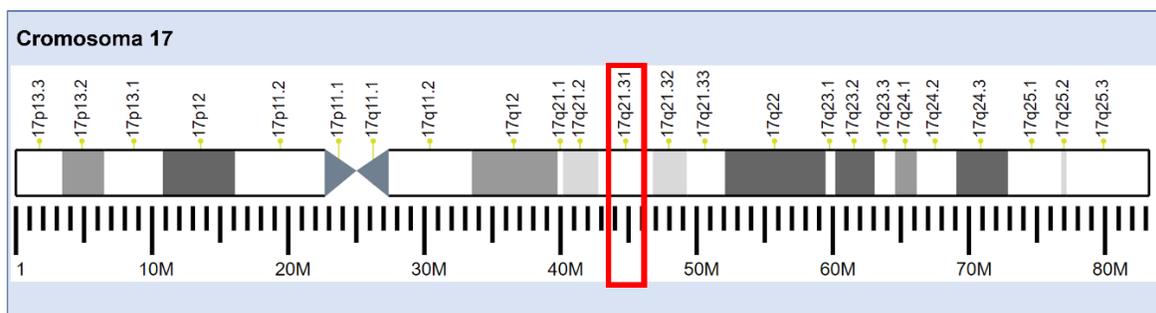


Figura 1. Estructura del cromosoma 17 y localización del gen *G6PC3*. [Modificada de Wikipedia]

1.4.2. Características de la proteína *G6Pasa-β*

La glucosa-6-fosfatasa cataliza el paso final de gluconeogénesis y glucogenólisis, lo que la vuelve una enzima clave en la homeostasis de glucosa.³² La familia de glucosa-6-fosfatasa está compuesta por tres proteínas: *G6Pasa-α*, *G6Pasa-β* (o *G6PC3*) y una proteína relacionada a *G6Pasa* específica de islotes pancreáticos.³³ La *G6Pasa-α*, el prototipo de esta familia, es una proteína de 357 aminoácidos con nueve dominios transmembrana, asociada al RE, con expresión principalmente en tejidos gluconeogénicos, es decir, en hígado, riñón e intestino.³²

La proteína *G6Pasa-β* tiene una expresión ubicua y muestra semejanza estructural con la *G6Pasa-α*, a pesar de esto, comparten únicamente el 36% de homología en aminoácidos.^{30,33} Se encuentra anclada al RE por nueve hélices transmembrana, en una conformación que mantiene el sitio activo dentro del lumen

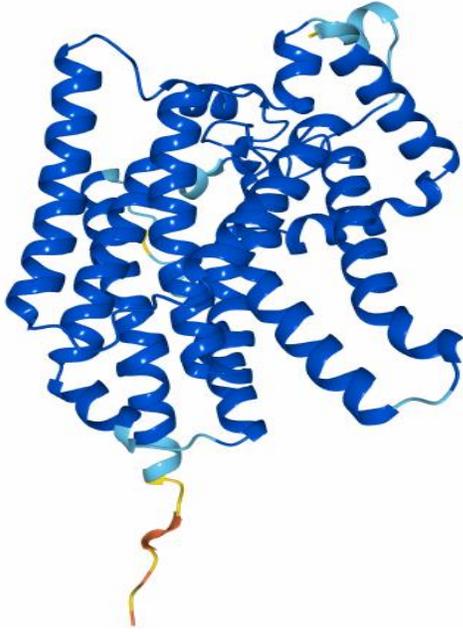


Figura 2. Estructura cristalográfica de la proteína G6Pase-β. UnitProtKb-Q9BUM1 [Modificada de G6PC3_HUMAN]

del RE.²⁴ A diferencia de otras proteínas transmembrana del RE, la G6Pase-β no contiene una señal de retención de dos residuos de lisina (KK) en su extremo C-terminal (Figura 3).¹⁶

El centro activo de la G6Pase-β está compuesto por Arg79, His114 y His167; asimismo, el marcaje del sitio activo ha establecido que la His167 funciona como el nucleófilo que une covalentemente al fosfato unido a glucosa para formar el intermediario fosfatidil- G6Pase-β durante catálisis.³⁰

1.4.3. Participación en la homeostasis de glucosa

La glucosa se forma mediante precursores glucogénicos tanto en hígado y en menor medida en el riñón. A través de la gluconeogénesis y la glucogenólisis se puede formar glucosa-6-fosfato (G6P), la cual se hidroliza mediante las G6Pasas, previo a su liberación en el torrente sanguíneo como glucosa.³⁴ La homeostasis de glucosa interprandial se mantiene a través del complejo transportador de glucosa-6-fosfato anclado a RE/G6Pase-α (Complejo G6PT/ G6Pase-α).³⁰

En el caso de los neutrófilos, esta homeostasis se alcanza alternando a la G6Pase-α por la G6Pase-β.³⁰, esta enzima se encarga de catalizar el paso final de la glucogenólisis, es decir, la hidrólisis de glucosa-6-fosfato en el RE.²⁴ La glucosa

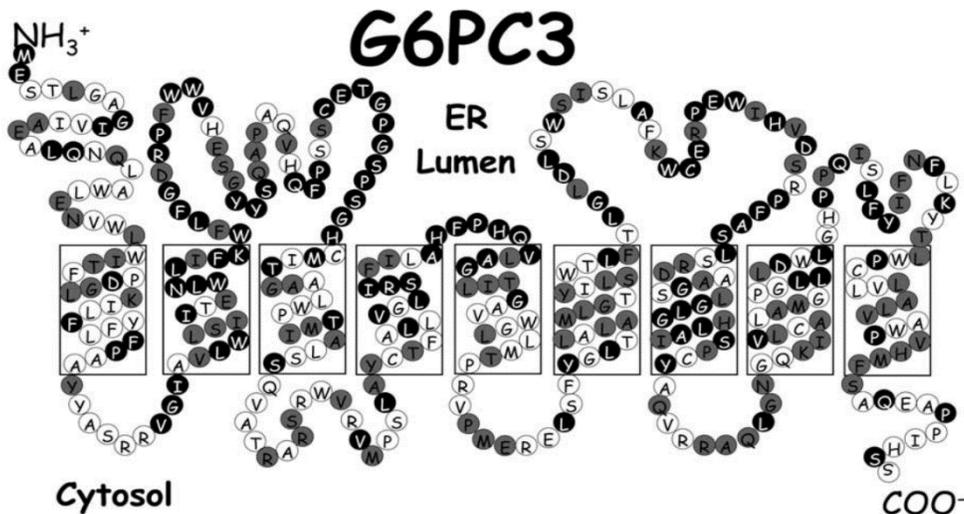


Figura 3. Topología de la proteína G6Pase-β. Aminoácidos estrictamente conservados (negro) parcialmente conservados (gris). [Obtenido de Guionie et al. 2003].

es transportada al citoplasma del neutrófilo principalmente por el transportador GLUT1; esta glucosa es metabolizada a través de la Hexocinasa en G6P.³⁰ La G6P puede participar tanto en glucólisis, en la vía de la pentosa fosfato o en la síntesis de glucógeno, o puede ser transportado al interior del RE por el transportador de glucosa-6-fosfato (G6PT); una vez dentro del RE la G6Pasa-β la hidroliza, la glucosa resultante es transportada de regreso al citoplasma para reingresar en cualquiera de las vías citoplasmáticas previamente mencionadas (Figura 4).³⁰

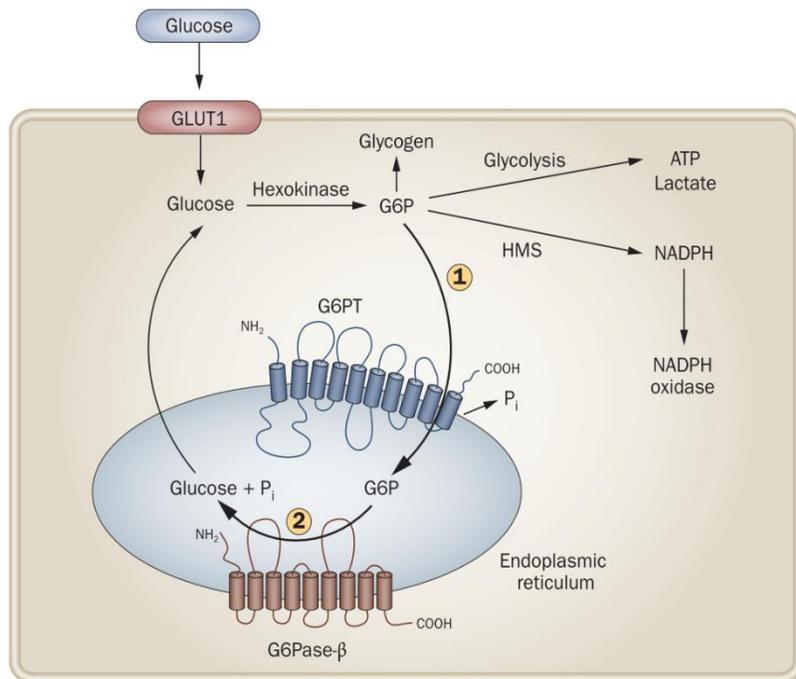


Figura 4. Metabolismo de Glucosa-6-Fosfato en Neutrófilos. [Modificada de Chou et. al, 2010]

1.4.4. Mutaciones en el gen *G6PC3*

En una revisión de 57 casos se identificó que el 45% corresponden a mutaciones de sentido erróneo. Estas mutaciones de sentido erróneo han sido identificadas en todo el largo del gen, sin embargo, hasta la fecha no se ha descrito mutación en el

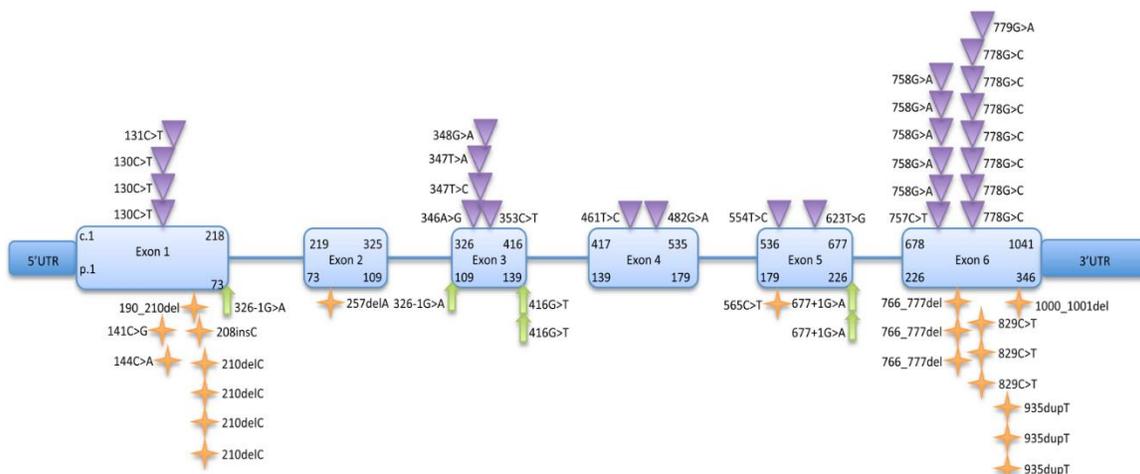


Figura 5. Mutaciones en el gen *G6PC3*. Cada mutación está representada una vez por familia detectada. Triángulos invertidos – mutaciones sentido erróneo. Flechas – mutación sitio de splicing. Estrellas- cambios en el marco de lectura.[Modificada de Banka et. al, 2013].

exón 2.²⁴ En el exón 6 se han descrito la mayor proporción de mutaciones de sentido erróneo. El resto de alelos mutados se encuentran distribuidos en variantes sin sentido, alteración en el marco de lectura ya sea por delección o inserción, y mutaciones en el sitio de corte y empalme (Figura 5).²⁴

1.4.2.1. Mutaciones fundadoras

Hasta la fecha ciertas mutaciones han sido identificadas con mayor frecuencia en determinados grupos étnicos. Ejemplos de estas mutaciones se enlistan en la tabla 1.²⁴ Se conoce como efecto fundador a la prevalencia elevada de un trastorno genético en una población aislada o innata, dado que varios miembros de la misma son derivados de un ancestro en común que porta una mutación causante de enfermedad.³⁵

Tabla 1. Mutaciones Fundadoras. [Obtenido de Banka et.al,2013]

Mutación	Grupo étnico/Acestría
p.P44S	Pakistán
p.R253H	Oriente Medio
p.G250R	Blanco Europeo
p.G277X	Europa
p.N313fs	Persas
p.I70fsX46	Hispanos

1.5. Características clínicas de NCGT4

1.5.1. Descripción general

La NCGT4 o déficit de G6PC3 se caracteriza por neutropenia congénita grave, infecciones bacterianas recurrentes, en una gran proporción de los pacientes trombocitopenia intermitente, patrón venoso superficial prominente y una alta incidencia de defectos cardiacos congénitos y anomalías urogenitales.²⁴ Se ha reportado que el 75.5% de pacientes se presentan de forma sindrómica.³⁶

1.5.2. Alteraciones hematológicas

El fenotipo hematológico es altamente variable, sin embargo, neutropenia grave en sangre periférica está presente en todos los pacientes.²⁴ Por lo general, este dato se observa en los primeros meses de vida con infecciones bacterianas recurrentes²⁴; sin embargo, se ha descrito un individuo con inicio en adolescencia tardía³⁷. Las infecciones más comunes son aquellas que involucran pulmón, oído, vía urinaria, piel y como consecuencia, sepsis. Aquellos pacientes que no reciben tratamiento permanecen susceptibles a infecciones bacterianas.²⁴

Del mismo modo, se ha descrito que alrededor de dos tercios de pacientes presentan trombocitopenia intermitente; hasta la fecha no se ha reportado

consecuencia clínica de este dato.²⁴ Se han documentado casos con linfopenia persistente y grave, asociada a hipoplasia del timo.^{38,39}

1.5.3. Malformaciones cardíacas

Las anomalías cardíacas congénitas se han descrito hasta en un 77.1% de pacientes, siendo la manifestación extrahematológica más frecuente.²⁴ Dentro de estas, hasta un 55.3% de pacientes presenta defectos del septum atrial, enfermedad valvular (22.3%) y persistencia del conducto arterioso [PCA] (10.6%).³⁶ Respecto a la enfermedad valvular, esta puede tratarse de insuficiencia mitral y/o tricuspídea, aorta bivalva y estenosis de la válvula pulmonar.⁴⁰⁻⁴⁵ Del mismo modo, se han descrito casos con aneurisma coronario, hipoplasia del ventrículo izquierdo y Wolf-Parkinson White.^{42,46,47}

1.5.4. Patrón venoso superficial prominente

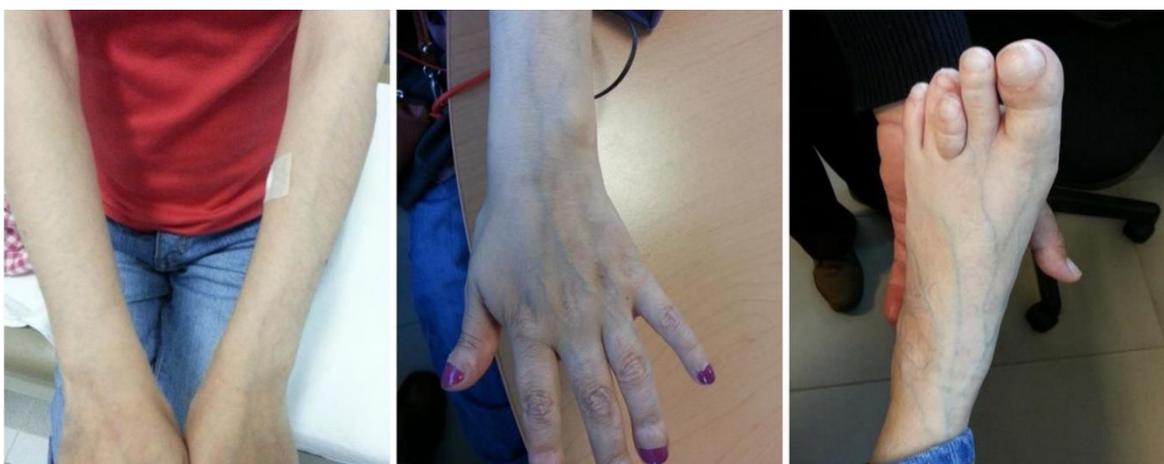


Ilustración 1. Patrón venoso superficial prominente. [Tomado de Vélez-Tirado et.al., 2020]

El patrón venoso superficial prominente representa la característica clínica no hematológica más fácilmente reconocible.²⁴ Distintas revisiones en la literatura han identificado que este dato se observa entre un 61.7% y un 66.6% de los pacientes.^{24,36} Banka y colaboradores, reportan que estas alteraciones son menos evidentes durante la infancia, y gradualmente se acentúan con la edad adulta, aumentando la probabilidad de venas varicosas y úlceras.⁴¹ (Ilustración 1)

1.5.5. Alteraciones urogenitales

En el 43.8% de pacientes se ha descrito malformación del sistema renal o anomalía genital.²⁴ Estas alteraciones por lo general son más frecuentemente documentadas en varones, siendo criptorquidia la principal, representando hasta el 40.53% de todos los casos reportados en la literatura.³⁶ En una pequeña proporción de estos casos, la presencia de criptorquidia se asocia con defectos de pared como hernia inguinal unilateral o bilateral.^{48,49} Otras anomalías urogenitales son hidronefrosis, mala diferenciación cortico-medular, reflujo vesicoureteral (RVU) y

micropene.^{23,42,48,50} En mujeres se ha descrito, RVU, fístula uracal y displasia genital.²⁴

1.5.6. Alteraciones endocrinológicas

Las alteraciones de este tipo han sido reportadas hasta en el 30% de los pacientes.³⁶ Se ha descrito un fenotipo variable que va desde retraso en crecimiento (12%), pubertad retrasada (6.3%), déficit de hormona de crecimiento (4.3%),³⁶ e hipogonadismo hipogonadotrópico o pobre desarrollo de características sexuales secundarias.^{41,45,46,51}

1.5.7. Enfermedad inflamatoria intestinal (EII)

Vélez-Tirado y colaboradores reportaron que un 10.6% de pacientes presentan colitis tipo enfermedad inflamatoria intestinal.³⁶ Esta patología en el déficit de G6PC3 se asemeja con mayor exactitud a la enfermedad de Crohn,²⁴ sin embargo, difiere de la misma dado que no presenta granuloma y por menor gravedad de inflamación críptica. Del mismo modo, esta EII recuerda al tipo observado en glucogenosis tipo 1b (GSD1b).⁴⁴ Dado que esta manifestación se observa en otras causas de neutropenia, Fernández y colaboradores, sugieren que la misma es secundaria a neutropenia.⁵²

Por lo tanto, la colitis en este grupo de pacientes se atribuye a un defecto de células hematopoyéticas, en lugar de a defectos de epitelio intestinal o células no hematopoyéticas. La actividad antimicrobiana defectuosa por parte de la respuesta inmune innata es uno de los principales mecanismos propuestos. Y se sugiere que esta incapacidad puede originarse de una alteración en la sobrevivencia y función de las células mieloides.⁵³ Las células mieloides G6Pasa- β -deficientes presentan disminución en la producción de superóxidos iónicos, quimiotaxis y fagocitosis.¹⁷

Asimismo, se ha propuesto autoinflamación mediante activación del inflammasoma, a través de neutrófilos G6Pasa- β -deficientes produciendo niveles

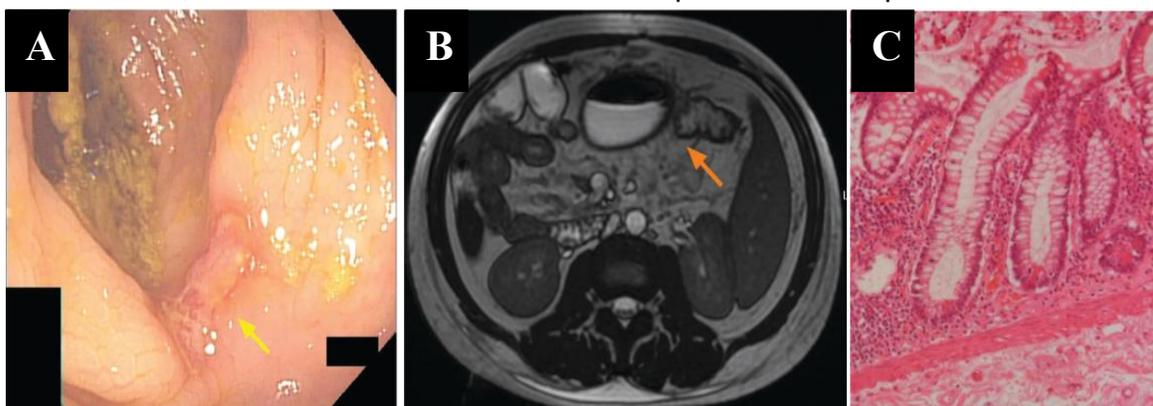


Ilustración 2. Características fenotípicas gastrointestinales. A) Imagen de colonoscopia que evidencia ulceración profunda. B) RM mostrando dilatación proximal a la lesión observada en A. C) Biopsia con tinción hematoxilina y eosina con infiltrado inflamatorio [Modificada de Bolton et al, 2020]

significativamente elevados de citocinas proinflamatorias en respuesta a lipopolisacáridos.⁵⁴ Importante recalcar que dado que la calprotectina fecal es una proteína derivada de neutrófilos no es un marcador confiable en estos pacientes, dado que puede dar falsos negativos.⁵³

1.5.8. Otras manifestaciones clínicas

Se ha observado restricción del crecimiento intrauterino (RCIU), falla de medro y mal desarrollo posnatal; sin embargo, se desconoce si el retraso en el crecimiento posnatal forma parte del fenotipo primario o es secundario a las comorbilidades asociadas.²⁴ Algunos casos han sido descritos con dismorfismo facial menor, principalmente cara triangular, abombamiento frontal, narinas antevertidas puente nasal deprimido, hipoplasia medifacial, labios gruesos, prognatismo, pabellones auriculares prominentes/acopados,^{42,46,55,56} un caso con hipertelorismo y otro con ptosis congénita.^{39,42} Es importante considerar que el fenotipo facial en adultos ha sido poco explorado.²⁴

Anomalías esqueléticas menores y de tegumentos han sido descritas en una baja proporción de pacientes, estas incluyen pectus carinatum, pliegue palmar transversal bilateral, pulgar digitalizado, escoliosis; eritema palmar, pezones invertidos o pequeños.^{39,42,46}

Además, se han descrito características neurológicas y musculares, caracterizado principalmente por microcefalia, hipoacusia neurosensorial, miopatía, miositis y debilidad muscular.^{11,45}

1.6. Diagnóstico molecular de NCGT4

1.6.1. Confirmación del diagnóstico clínico en pacientes

El diagnóstico de déficit de G6Pasa-β se establece en pacientes con NCG y la identificación de variantes patogénicas bialélicas en el gen *G6PC3*.⁵⁷ La técnica de secuenciación detecta hasta un 43% de mutaciones puntuales o pequeñas deleciones/inserciones en pacientes con neutropenia y al menos una característica extrahematológica asociada.⁴⁶ Hasta la fecha no se han reportado casos identificados mediante la técnica de amplificación de sondas dependientes de ligados múltiples (MLPA).⁵⁷

1.6.2. Análisis genético en los familiares

Los progenitores de un individuo afectado generalmente son considerados heterocigotos obligados,⁵⁸ es decir, portadores de una variante patogénica en el gen *G6PC3*.⁵⁹ Los portadores por lo general son asintomáticos y no se encuentran en riesgo de desarrollar la enfermedad.³⁵ Hasta la fecha no se han reportado estudios que analicen las características de los portadores en NCGT4.

1.6.3. Asesoramiento genético para entidad autosómica recesiva (AR)

La gran mayoría de casos de un trastorno autosómico recesivo son descendientes de padres heterocigotos sanos, esto genera recurrencia en la hermandad en algunos casos; sin embargo, en familias pequeñas no siempre se logra observar.⁵⁹ El principal riesgo incrementado es el de recurrencia en la descendencia de los progenitores, siendo de 1 en 4 las probabilidades.⁵⁹ El riesgo de que la enfermedad se repita en hijos del paciente o en medios hermanos, dependerá de la frecuencia de la enfermedad y si existe o no sin embargo, el riesgo preciso dependerá de la frecuencia de heterocigotos en la población.⁵⁹

Al considerar a los progenitores como portadores obligados, los familiares de segundo grado (tíos, medios hermanos, abuelos) tienen un 50% de probabilidad de ser portadores de la variante. Las probabilidades de que uno de los hermanos resulte portador de la variante, será de 2 en 3; esto se da considerando que se elimina la probabilidad correspondiente a un hermano homocigoto, puesto que se comportaría como paciente afectado.⁵⁹

1.7. Seguimiento y tratamiento de los pacientes con NCGT4 confirmado

1.7.1. Factor estimulador de colonias granulocíticas recombinante (rG-CSF)

El factor estimulador de colonias granulocíticas (G-CSF) es una citocina capaz de inducir la producción de neutrófilos maduros al inducir la producción de colonias de granulocitos desde la médula ósea.⁶⁰ El G-CSF media su efecto al unirse a un receptor homodímero único, el G-CSFR; las concentraciones plasmáticas por lo general son indetectables, pero sufren una elevación rápida como respuesta a infecciones y posteriormente regresan a la normalidad.⁶⁰

Los factores de crecimiento hematopoyético comenzaron a ser usados en 1988, demostrando una alta capacidad tanto para corregir la neutropenia como la susceptibilidad a infecciones.¹⁹ El principal rG-CSF es el Filgrastim, este tienen una actividad biológica idéntica al G-CSF endógeno pero difiere en que en su extremo N-terminal contiene un residuo de metionina y no se encuentra glucosilada; principalmente estimula la activación, proliferación y diferenciación de células progenitoras neutrofilicas.⁶¹

Se estima que alrededor del 95% de las NCG se benefician del uso de rG-CSF, disminuyendo la morbilidad y mortalidad,⁶² siendo este la principal línea de tratamiento, para mantener una cuenta absoluta de neutrófilos (CAN) por arriba de 1×10^9 células por litro.²¹ La administración es por vía subcutánea, inicialmente con dosis bajas o moderadas (1-3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ o 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, respectivamente), este manejo

evita los efectos adversos, como pueden ser: dolor óseo, cefalea o mialgias.²¹ La modificación de dosis se hace en intervalos de aproximadamente cada 10-14 días; se considera que un paciente es “no respondedor” con dosis >50µg/kg/día y CAN <0.5x10⁹ células por litro. Del mismo modo, es importante considerar que este tratamiento es profiláctico, sin embargo, en infecciones es recomendable combinarlo con antibióticos.²¹

1.7.1.1. Embarazo

El número de pacientes que alcanzan edad reproductiva continúa en aumento, con base en estudios observacionales la administración de rG-CSF es segura y bien tolerada durante el embarazo.²¹ Se sabe que el rG-CSF cruza la barrera placentaria en varios mamíferos, incluyendo humanos.⁶³ Previamente el embarazo se había considerado de alto riesgo en mujeres con NCG por la susceptibilidad aumentada a infecciones; de acuerdo con un estudio de casos y controles en el que se comparó pacientes embarazadas con uso de G-CSF contra aquellas que no recibieron tratamiento se observó que un 82% (31/38 embarazos) resultaron en recién nacido vivo, con base en este estudio se recomienda continuar tratamiento durante la gestación.⁶⁴

1.7.1.2. Efectos adversos

Los efectos adversos a corto plazo son raros, dado que presenta una tolerabilidad buena o incluso excelente. Tanto las inyecciones intravenosas como subcutáneas pueden generar reacción local inmediata ocasionalmente; la reacción “Flu-like” observada con otras citocinas, es infrecuente.¹⁹ En un 2 al 5% de pacientes se observa dolor óseo, el cual cede rápidamente (dentro de las primeras 24 horas).¹⁹

La tolerabilidad a largo plazo va principalmente ligada a sus efectos proliferativos; a pesar de que principalmente está limitado a línea granulocítica se pueden observar varias anomalías hematológicas. Se ha descrito monocitosis, eosinofilia, en ocasiones se puede observar un incremento en reticulocitos, así como en niveles de hemoglobina.¹⁹ Lo más común es observar trombocitopenia, la cual por lo general es moderada; a su vez la trombocitopenia puede ser secundaria a hiperesplenismo, la cual es una complicación frecuente al inicio del tratamiento.¹⁹ En raras ocasiones se puede presentar ruptura esplénica con requerimiento quirúrgico.⁶³

En el 17% de los casos se ha reportado osteopenia/osteoporosis, ninguno de los pacientes que sufrieron este efecto presentaban síntomas y el diagnóstico se integró únicamente por mediciones en la densidad.^{19,63} Es importante considerar que este hallazgo ha sido identificado de manera basal en los pacientes con NCG, sin embargo, la fisiopatología y su relación con el tratamiento se desconoce.⁶³ En el ensayo clínico Severe Congenital Neutropenia (SCN) se reportó una incidencia de vasculitis cutánea del 3%, estas lesiones estaban limitadas a la piel y hasta en el 50% de estos se comprobó mediante biopsia la presencia de vasculitis

leucocitoclástica (VL).⁶³ De acuerdo con el SCNIR se ha reportado vasculitis en el 4.1% de pacientes, siendo más frecuente en casos de neutropenia idiopática (6%) comparado con NCG y neutropenia cíclica (3% ambos).⁶³

1.7.1.3. Progresión a leucemia

Se estima que hasta el 21% de los pacientes con NCG pueden presentar mielodisplasia o leucemia aguda; sin embargo, el patrón de desarrollo varía entre cada paciente, en general se han presentado varios meses o años después del inicio del tratamiento.^{20,65} Se desconoce si existe una clara relación entre el uso de la terapia rG-CSF o si este incremento se debe a una mayor sobrevida de los pacientes.²⁰

1.7.2. Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH)

El potencial curativo del TCPH en pacientes con neutropenia congénita parece atractivo, sin embargo, se ha reportado que de 136 pacientes con NCG que lo recibieron, la enfermedad aguda injerto contra huésped se presentó en un 21%, mientras que la mortalidad relacionada al trasplante fue del 17%.⁶⁶ Indicaciones validadas para este tratamiento incluyen resistencia a terapia con G-CSF (dosis 50µg/kg/día) y transformación leucémica o mielodisplasia.¹⁹ Asimismo, este se asocia con mejor pronóstico a menor edad.⁶⁶ Bolton y colaboradores reportaron el caso de un paciente masculino que recibió un TCPH a los 18 años, quien presentó una adecuada evolución, y actualmente se encuentra con remisión de EII, siendo este el primer caso en la literatura.⁵³ Dos pacientes con déficit de G6Pasa-β han recibido TCHP para neutropenia refractaria, sin embargo, el desenlace de estos casos se desconoce.^{42,66}

1.8. Diagnósticos diferenciales

La NCG es un grupo genético y heterogéneo de enfermedades. Estas, pueden dividirse en aquellas que presentan predominantemente neutropenia y aquellas con un trastorno multisistémico.²⁴ Dentro de las condiciones con neutropenia como manifestaciones predominante, se encuentran:

- **Neutropenia Congénita Grave Tipo 1 (NCGT1):** trastorno con herencia autosómica dominante (AD), es la principal causa genética de neutropenia congénita. Secundaria a mutaciones en el gen *ELANE*. Esta entidad se caracteriza por fiebre recurrente, inflamación orofaríngea y adenopatías cervicales. Asimismo, se puede presentar con neutropenia cíclica.⁷
- **Neutropenia Congénita Grave Tipo 2 (NCGT2):** trastorno con herencia AD, secundario a mutaciones en el gen *GFI1*, presenta susceptibilidad aumentada a infecciones bacterianas. Mutaciones en este gen a su vez

pueden presentarse como neutropenia crónica no-autoinmune, presentándose como monocitosis en el adulto.⁶⁷

- **Enfermedad de Kostmann (NCGT3):** trastorno con herencia autosómica recesiva (AR), el cual se debe a mutaciones en el gen *HAX1*. Se caracteriza por neutropenia, arresto en la maduración de promielocitos, puede o no presentar crisis epilépticas o trastorno del desarrollo.¹⁰
- **Neutropenia Congénita Grave Tipo 5 (NCGT5):** trastorno con herencia AR, secundario a mutaciones en el gen *VPS45*; presenta neutropenia, disfunción en los neutrófilos, fibrosis de médula ósea (MO) y Nefromegalia como resultado de hematopoyesis renal extramedular.⁶⁸
- **Neutropenia Congénita Grave Ligada al X (XLN):** trastorno secundario a mutaciones en el gen *WAS*, el cual presenta todas las características hematológicas asociadas al síndrome de Wiskott-Aldrich, en ausencia de otros hallazgos clínicos.⁵⁷
- **Neutropenia Congénita Grave Relacionada a *JACGN1* (NCGT6):** trastorno con herencia AR, caracterizado por NCG, arresto de maduración en promielocitos, mala respuesta al tratamiento con factor estimulador de colonias granulocíticas (G-CSF). De manera ocasional se identifican anomalías en hueso, páncreas y/o dientes.⁵⁰

Respecto a aquellas condiciones en las cuales el dato clínico de neutropenia forma parte de un trastorno multisistémico, es importante diferenciarlo de las distintas entidades enlistadas en la Tabla 2.

Tabla 2. Diagnóstico Diferencial con Trastornos Multisistémicos

Entidad sindrómica	Gen	Herencia	Similaridad	Diferencias
Síndrome de Barth	<i>TAFAZZIN</i>	Ligada al X	Neutropenia Manifestaciones cardiacas (cardiomiopatía)	Miopatía esquelética o hipotonía Dismorfias faciales (cara redonda, plenitud facial, mentón prominente, ojos profundos)
Sx de Chediak- Higashi	<i>LYST</i>	AR	Inmunodeficiencia (historia de infecciones de repetición)	Albinismo óculo- cutáneo Tendencia al sangrado

			principalmente bacterias)	
Clericuzio Poiquiloderma con Neutropenia	<i>USB1</i>	AR	Neutropenia crónica no cíclica Bronquiectasias	Rash eccematoso cutáneo Poiquiloderma inflamatorio
Sx Cohen	<i>COH1</i>	AR	Úlceras aftosas Infecciones recurrentes	Hipotonía, microcefalia. Discapacidad intelectual
GSD-1b	<i>G6PC1</i> o <i>SLC37A4</i>	AR	Neutropenia Retraso en la pubertad	Enzimas hepáticas elevadas Tasa de filtrado glomerular baja
Sx Hermansky- Pudlak tipo 2	H.A*	AR	Infecciones recurrentes	Displasia acetabular Albinismo Facies tosca
Sx Shwachman- Diamond	<i>DNAJC21</i> <i>SBDS</i> <i>EFL1</i>	AR	Falla de medro Citopenias multilínea Anomalías óseas	Disfunción pancreática exócrina Malnutrición
Sx Wiskott- Aldrich	<i>WAS</i>	Ligada al X	Trombocitopenia Neutropenia Vasculitis	Hematoquecia Purpura y petequias Eccema Artritis reumatoide Daño renal inmunomediado

*H.A. Heterogeneidad Alélica

1.9. Pronóstico

El pronóstico de la mayoría de los pacientes con NCGT4 por lo general es bueno cuando se encuentran en tratamiento con factor estimulador de colonias granulocíticas (Filgastrim/G-CSF); sin embargo, puede ser fatal en caso de no ser tratado.²⁴ En ausencia de tratamiento, el riesgo de complicaciones de tipo infecciosas es elevado; las infecciones bacterianas además de su potencial letalidad, afectan la calidad de vida.¹⁹

Las infecciones crónicas continúan siendo frecuente, específicamente aquellas estomatológicas con gingivitis dolorosa, asociada a pápulas y parodontopatías.¹⁹ Estas infecciones crónicas son de difícil control incluso con el uso de G-CSF y

recuperación neutrofílica.¹⁹ Hasta la fecha, la máxima sobrevivida reportada ha sido a los 37 años, correspondiente a un paciente masculino que falleció secundario a endocarditis infecciosa.⁵²

1.10. NCGT4 en la población mexicana

En México, Vélez-Tirado y colaboradores describieron en 2020 una serie compuesta por cinco casos con NCGT4. La descripción de estos casos se encuentra en la Tabla 3.

Tabla 3. Descripción clínica pacientes Vélez-Tirado et al, 2020.

Px	Edad Sexo	Descripción clínica	Tx	Variante G6PC3
1	3/12 M	Antecedente de edema y equimosis neonatal, dificultad respiratoria con requerimiento ventilatorio, soplo sistólico de bajo grado, hepatomegalia, criptorquidia, PVSP. Muerte 29 DVEU, sepsis por colitis neutropénica.	G-CSF Trasplante de células hematopoyéticas	c.210delC [p.Ile70fsX46] Sanger
2	15 años F	Antecedente de neumonía, otitis media de repetición e IVA de repetición, EII Crohn, PVSP, braquimetatarso, hipoacusia neurosensorial bilateral, insuficiencia tricuspídea. Lab: anemia, neutropenia intermitente, linfopenia. Muerte 17 años, sepsis abdominal	TMP-SMX Prednisona G-CSF	c.210delC [p.Ile70fsX46] Sanger
3	3/12 F	Sepsis neonatal, fistula recto vaginal, PVSP, hipoacusia neurosensorial bilateral, defecto del septum atrial, atelectasias, bronquiectasias e HAP	G-CSF	c.210delC [p.Ile70fsX46] Exoma
4	9 años M	Inició a los 3m con otitis media supurativa y neumonía. Abscesos orales, digitales y perianales. PVSP y piel redundante. Hernia inguinal izquierda. Foramen oval permeable. Hipertensión portal.	G-CSF	c.481C>T [p.Arg161*] + c.210delC [Ile70fsX46] Sanger

		Lab: trombocitopenia intermitente, linfopenia, hipoplasia mieloide	
5	2 años M	APLV, asma, rinitis, otitis media recurrente, sepsis, IVU de repetición, colitis autoinmune, herpes zoster diseminado. Lab: neutropenia grave, anemia, linfopenia intermitente, trombocitopenia.	G-CSF c.210delC [Ile70fsX46] + c.421del [Trp141GlyfsX2]

**Masculino (M), Femenino (F), PVSP – Patrón venoso superficial prominente, DVEU- días de vida extrauterina, IVU – infecciones de vías urinarias, HAP – hipertensión arterial pulmonar, APV – Alergia a proteína de leche de vaca.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial se conocen más de 7,000 enfermedades “raras”, habiéndose reportado que pacientes con enfermedades raras pasan entre 5-10 años sin tener un diagnóstico clínico y genético definitivo. El grupo de neutropenias congénitas graves (NCG) presenta marcada heterogeneidad genética, lo que dificulta su diagnóstico específico basándose únicamente en las manifestaciones clínicas. A diferencia de otras NCG, el tipo 4 (NCGT4) presenta diversas manifestaciones extrahematológicas multisistémicas asociadas, si bien no se sabe específicamente cuanto de la variabilidad fenotípica es condicionada por la mutación génica presente en el paciente.

La identificación de características específicas de la NCGT4 permitirá realizar un diagnóstico oportuno en los pacientes y familiares en riesgo. Esto permitiría prevenir las complicaciones agudas y crónicas generadas tanto por la neutropenia como derivadas de los defectos congénitos asociados, evidentes o no al nacimiento.

3. HIPÓTESIS

La investigación de manifestaciones fenotípicas específicas extrahematológicas multisistémicas (cardiovasculares, urogenitales, intestinales, endócrinas, talla baja y faciales) facilitarán la identificación de un espectro sintomático en los pacientes con neutropenia congénita grave (NCG) que permitirá la sospecha clínica para la búsqueda de mutaciones en el gen *G6PC3*, confirmar la forma de NCGT4, explorar una posible correlación genotipo-fenotipo y realizar el asesoramiento genético apropiado y oportuno, al paciente y su familia.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

- Establecer las características fenotípicas extrahematológicas que sugieran el diagnóstico de Neutropenia Congénita Grave tipo 4 en pacientes adultos del INCMNSZ.

4.2. Objetivos específicos

- Describir, agrupar y clasificar las características clínicas de los pacientes con sospecha clínica de NCGT4 mediante la evaluación clínico genética.
- Determinar el tipo y la frecuencia de mutaciones puntuales en el gen *G6PC3* identificadas mediante la secuenciación directa por el método Sanger.
- Determinar la presencia de un posible efecto fundador en la muestra de familias a ser estudiadas.
- Determinar la presencia de portadores asintomáticos en las familias a través de confirmación diagnóstica mediante secuenciación dirigida a la mutación identificada en los pacientes.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Diseño general

Es un estudio descriptivo, observacional, transversal y retrolectivo en una serie de casos, pacientes del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ).

Tamaño de muestra: de conveniencia.

5.2. Criterios de selección

5.2.1. Criterios de inclusión:

- Individuos de edad mayor o igual a 18 años.
- Pacientes con diagnóstico de neutropenia congénita grave, cíclica o idiopática crónica:
 - Casos sindrómicos: individuos con el diagnóstico de neutropenia y al menos uno de los siguientes signos y síntomas:
 - patrón venoso superficial aumentado
 - malformación cardíaca congénita
 - malformación urogenital congénita
 - enfermedad inflamatoria intestinal
 - talla baja
 - dismorfias faciales
 - Casos aislados: individuos con neutropenia aislada sin la presencia de signos y síntomas de la forma sindrómica
- Pacientes previamente diagnosticados por nuestro grupo con NCGT4 confirmada por la secuenciación del gen *G6PC3* (casos sindrómicos)
- Consentimiento informado para participar en el estudio

5.2.2. Criterios de exclusión:

- Individuos con un único registro del diagnóstico de neutropenia (congénita/cíclica/idiopática) mediante estudios de laboratorio, descartando la neutropenia como un evento recurrente crónico
- Individuos que no acepten participar en el estudio

5.2.3. Criterios de eliminación:

- Pacientes con la sospecha de otro síndrome genético diferente a NCGT4 identificado durante la entrevista clínico-genética y valoración física.

5.3. Búsqueda e identificación de pacientes candidatos

Durante la revisión del expediente electrónico se obtuvieron datos de los pacientes con diagnóstico de CIE-10 correspondiente a neutropenia (D70), valorados en el INCMNSZ en el periodo de enero del 2000 a diciembre 2020. Se revisaron los expedientes físicos para identificar aquellos casos que correspondían a causas primarias de neutropenia y realizar la búsqueda de manifestaciones extrahematológicas agregadas.

5.4. Estructura de la base de datos

Con la información recopilada se creó una base de datos de Excel de todos los pacientes con diagnóstico de neutropenia primaria atendidos en el INCMNSZ desde enero del 2000 a diciembre 2020, se crearon dos hojas, la primera correspondiente a los casos “sindrómicos” y la segunda para los casos “aislados”. Se asignó un código alfanumérico para preservar la confidencialidad del paciente.

La base de datos incluyó: características demográficas de los pacientes como sexo, manifestaciones clínicas, edad de diagnóstico de la primera manifestación, edad actual, antecedentes heredofamiliares de neutropenia, malformación cardiaca, o malformación urogenital; registro de los datos histopatológicos de biopsias de médula ósea, y datos de biometría hemática como conteo de leucocitos, neutrófilos, plaquetas y linfocitos; posteriormente se agregaron los resultados del estudio molecular correspondiente a la secuenciación del gen *G6PC3*.

5.5. Reclutamiento de los pacientes

Los pacientes que cumplían los criterios establecidos fueron invitados a participar en el estudio, mediante llamada telefónica, durante la cual se brindó información sobre el estudio y se resolvieron dudas. Al aceptar, se agendó una cita médica para la valoración clínico-genética. Durante esta, se aplicó un cuestionario desarrollado para el estudio con el fin de estandarizar la entrevista (Anexo A1). Se elaboró una genealogía de tres generaciones o más, en la cual se especificó el origen de los progenitores y apellidos; utilizándose los símbolos estandarizados por la Sociedad Nacional de Asesores Genéticos,⁶⁹ en la cual se especificó el origen geográfico de esta información (Anexo A2). Se realizó una exploración física minuciosa, que incluyó medición de peso y talla, descripción de características físicas, auscultación cardiopulmonar y exploración de genitales.

Aquellos pacientes en quienes se descartó la sospecha de otro síndrome genético, se les ofreció secuenciación completa del gen *G6PC3*.

5.6. Diagnóstico molecular

Se realizó la secuenciación de manera escalonada iniciándose por los exones 1 y 6. En caso de no ser identificada una mutación en estos exones, se procedió a secuenciar los exones 2 al 5 (Figura 6).

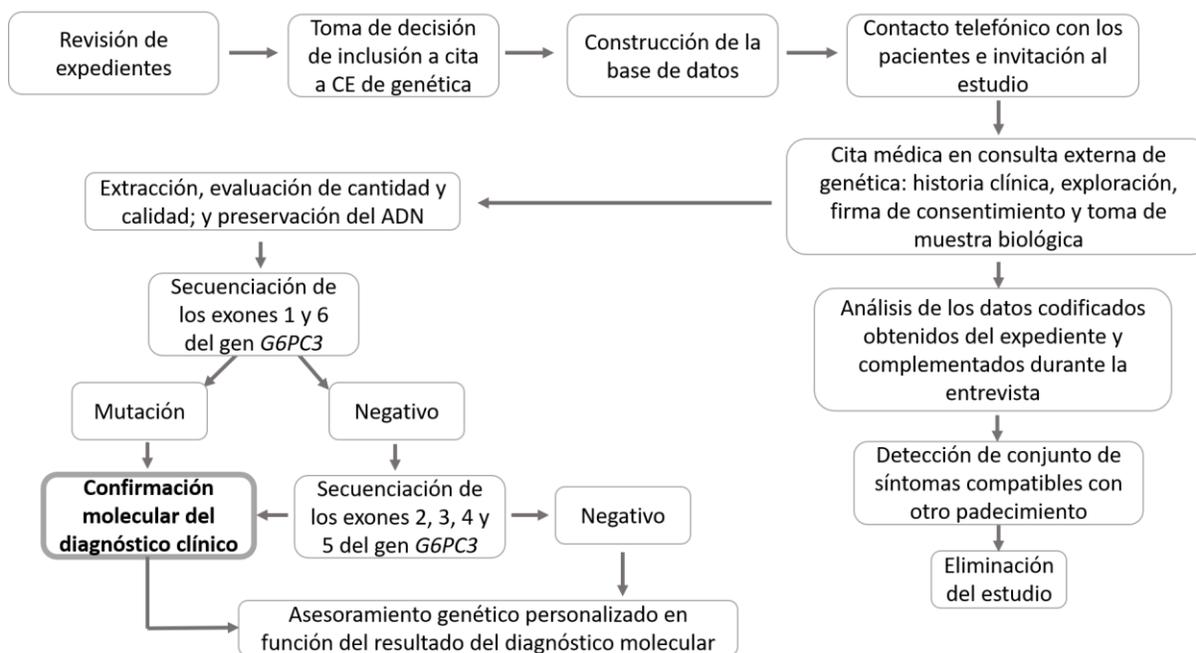


Figura 6. Algoritmo de abordaje en pacientes con sospecha de NCGT4

5.7. Procedimientos de laboratorio y técnicas

5.7.1. Extracción del ADN de leucocitos de sangre periférica

La obtención de sangre periférica se realizó de acuerdo con el protocolo estándar de venopunción (Anexo A3).⁷⁰ Para la extracción de ADN se utilizó el kit comercial de extracción por columna *QIAamp DNA Blood mini Kit* (Qiagen, Cat.:51104) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN genómico se cuantificó por espectrofotometría UV y se preservó a -20°C.

5.7.2. Amplificación de los fragmentos del gen G6PC3

Se realizó la reacción en cadena de polimerasa (PCR) para la amplificación de los exones 1, 2, 3, 4, 5 y 6 del gen *G6PC3*. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados fueron diseñadas usando la herramienta *in silico* "Primer-BLAST"⁷¹ y se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Características de los oligonucleótidos utilizados en el análisis del gen *G6PC3*

EXÓN	PRIMER SENTIDO	PRIMER ANTISENTIDO	Ta	pb
1	5'-ACGTGCCTGCAACAGTGG-3'	5'-GAAGGCCCTTGAGACAGTTG-3'	58.9°C	449
2	5'-TTTGACTTCACCCCTCAGGC-3'	5'-AGTGCCCTCCATAACT-3'	59.4	386
3	5'TTCTCAGCCAAAGGCAG-3'	5'-GTCCATACACAGCTTGGCCT-3'	59.3	355
4	5'GAGCTGGAGTTTTGGGGACC-3'	5'CTCTACAGAAGCTGGGAGCG-3'	61.3	330
5	5'-CTTTGGCAGTGGGAGGATCA-3'	5'-GGCTAGGTGCAGGCCAGATA-3'	60.3	387
6.1	5'-CAAAACAGAACATGGGAGTGG-3'	5'-GGAAAGGAAAGGGAGGCAC-3'	58.3°C	490
6.2	5- CCTCAAGTACACCCTCTGGC-3'	5-AGACTACTGGAGCAGCCTGG-3'	61.3°C	488

Cada reacción de PCR se preparó usando 25 µL de la mezcla comercial de reactivos *HotStarTaq DNA polymerase 1x* (Qiagen, Cat.:203205), 1.5 µL de oligonucleótido sentido 10 µM, 1.5 µL de oligonucleótido antisentido 10 µM y 6 ng/µL de ADN en un volumen total de 50 µL ajustando con agua libre de DNAsas. La amplificación de los fragmentos se realizó en el termociclador *ProFlex PCR System 9700* (Applied Biosystems, ThermoFisher) de acuerdo con el siguiente programa:

1. Desnaturalización inicial: 95°C / 10 min
2. Desnaturalización: 95°C / 30s
3. Alineamiento/hibridación: temperatura variable (ver Tabla 5) / 30 s
4. Extensión/elongación: 72°C / 40 s
5. Repetir los pasos 2-4 durante 34 ciclos más
6. Fase final de extensión: 72°C / 10 min

5.7.3. Evaluación y purificación de los fragmentos amplificados

La longitud y la cantidad de los fragmentos amplificados se evaluaron mediante la separación de electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (Anexo A4). La purificación de los productos de PCR se realizó mediante separación en columna de sílica usando el kit comercial *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen Ct: 28104), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

5.7.4. Secuenciación directa del gen *G6PC3*

Para la secuenciación del gen *G6PC3* se utilizó la mezcla comercial de reactivos *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems™, ThermoFisher Scientific®, Cat.: 4337455). Cada reacción de secuenciación incluyó: 4µL de BigDye™ 2.5x, 1µL de oligonucleótido (sentido o antisentido) 3µM, 4µL de producto amplificado y purificado de PCR, 10µL de agua libre de DNAsas, con un volumen total de 20µL.

La reacción de secuenciación se realizó en el termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems™, ThermoFisher Scientific®), con base en el siguiente programa:

1. Desnaturalización inicial: 96°C / 1 min
2. Desnaturalización: 96°C / 10 s
3. Alineamiento/hibridación: 50°C / 5 s
4. Extensión/elongación: 60°C / 2 min
5. Repetir los pasos 2-4 durante 24 ciclos más
6. 4°C, infinitamente

5.7.5. Purificación de los productos de la reacción de secuencia.

Se realizó la purificación mediante la separación por centrifugación en columna de gel comerciales *Centri-Sep™* (ThermoFisher Scientific®, Cat.: 401762), la descripción completa se desglosa en el Anexo A5.

5.7.6. Análisis de los productos de la reacción de secuencia mediante electroforesis capilar

Los productos de la reacción de secuencia purificados y secos se resuspendieron en 15µL de formamida *HiDi* (ThermoFisher Scientific®, Cat.: 401762), se desnaturalizaron a 95°C durante 5 minutos y se analizaron en el equipo *ABI Prism 3500 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems™, ThermoFisher Scientific®). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la secuencia de referencia del gen *G6PC3* con localización en el segmento NC_000017.11 de la versión GRCh38.p13 del genoma humano.⁷²

5.7.7. Análisis de secuenciación del gen *ELANE*

Adicionalmente, considerando la prevalencia de mutaciones en el gen codificante para la Elastasa Neutrófila (*ELANE*), como la causa genética más común de neutropenia congénita, se realizó el análisis de secuencia de este gen para descartar la presencia de estas en pacientes previamente negativos para mutaciones en *G6PC3*.

Se realizó la PCR de punto final para la amplificación de los exones 1, 2, 3, 4 y 5 del gen *ELANE*. Las secuencias de los oligonucleótidos fueron diseñadas usando la herramienta in silico "Primer-BLAST"⁷¹ y se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Características de los oligonucleótidos utilizados en el análisis del gen ELANE

EXÓN	PRIMER SENTIDO	PRIMER ANTISENTIDO	Ta	pb
1	5'-ATTTGAATGCGATTGTGCATCC-3'	5'-AACAGAACCCGGGACAGAGG-3'	58.2	342
2	5'AGGCTCCTTGGCAGGCACTCAG-3'	5'-GCACACTCCCGGCTACTCACACA-3'	65.6	223
3	5'-CTCGAGCACCTTCGCCCTC-3'	5'-ACCACCCAGCCCACGATG-3'	62.0	375
4	5'-ACCACAGTGGAACCTGAGATGG-3'	5'-CCTCCTAGGGTCTAGCCACGG-3'	63.7	416
5.1	5'-CGACTCTATCATCCAACGCTCC-3'	5'-CCATTTTCAACACCCAATCACA-3'	58.2	205
5.2	5'-CTAGGAGGGACTTCCCAACCC-3'	5'-GAGAATGTTTATTGTGCCAGATGC-3'	61.2	364

El resto del procedimiento de secuenciación del gen *ELANE* se realizó acorde a los incisos 5.7.3 al 5.7.6, previamente descritos para el gen *G6PC3*.

5.8. Análisis estadístico

Serán utilizados métodos de estadística descriptiva como: promedios con desviación estándar o medianas con el rango inter-cuartil para describir variables cuantitativas; y descripción en porcentajes para las variables cualitativas (Tabla 6).

Tabla 6. Definición operacional y clasificación de variables

Variable	Tipo de variable	Definición operacional	Escala de medición	Valores o categorías
Edad	Cuantitativa	Edad documentada en expediente clínico en la barra de datos generales.	Intervalo	Edad en años con número
Sexo	Cualitativa	Sexo documentado en expediente clínico en la barra de datos generales.	Dicotómica	1. Hombre 2. Mujer
Grado de escolaridad	Cualitativa	Grado máximo de estudio documentado en expediente clínico en la barra de datos generales o en la historia clínica.	Ordinal	0. Ninguna 1. Ninguna, pero lee y escribe 2. Primaria, incompleta 3. Primaria, completa 4. 5.Secundaria incompleta o completa, preparatoria incompleta 5. Preparatoria 6. Universidad incompleta 7. Universidad completa
Lugar de Origen	Cualitativa	Lugar de nacimiento registrado documentado en expediente clínico en la barra de datos generales o en la historia clínica	Nominal	Ciudad, Estado
Ocupación	Cualitativa	Ocupación documentada en expediente clínico en la barra de datos generales o en la historia clínica.	Nominal	1. Hogar 2. Proceso de la producción industrial 3. Proceso de la construcción 4. Proceso de la producción agropecuaria 5. Oficinas y administrativo 6. Operaciones de equipo de transporte 7. Vendedores dependientes y agentes de ventas 8. Servicio público y servicios personales 9. Servicio doméstico 10. Fuerza armada 11. Técnicos 12. Trabajadores de la enseñanza 13. Profesionistas 14. Estudiantes 15. Arte, espectáculo y deporte

				16. Otras ocupaciones 17. Desempleado 18. No documentado
Antecedentes heredofamiliares				
Antecedentes heredofamiliares hematológicos	Cualitativa	Presencia o ausencia de antecedente heredofamiliar de trastornos hematológicos en familiares de 1er o de 2do grado.	Nominal	0. Negados 1. Si 1.1. Madre 1.2. Padre 1.3. Hermanos 1.4. Madre + hermanos 1.5. Padre + hermanos 1.6. Familiar 1er grado + familiar 2º grado 1.7. Otra combinación 2. Desconocido 3. No documentado
Antecedentes heredofamiliares cardiológicos	Cualitativa	Presencia o ausencia de antecedente heredofamiliar de cardiopatía o malformación congénita cardíaca en familiares de 1er o de 2do grado.	Nominal	1. Negados 2. Si 2.1. Madre 2.2. Padre 2.3. Hermanos 2.4. Madre + hermanos 2.5. Padre + hermanos 2.6. Familiar 1er grado + familiar 2º grado 2.7. Otra combinación 3. Desconocido 4. No documentado
AHF de malformación urogenital positivos	Cualitativa	Presencia o ausencia de antecedente heredofamiliar de malformación urogenital en familiares de 1er o de 2do grado.	Nominal	0. Negados 1. Si 1.1. Madre 1.2. Padre 1.3. Hermanos 1.4. Madre + hermanos 1.5. Padre + hermanos 1.6. Familiar 1er grado + familiar 2º grado 1.7. Otra combinación 2. Desconocido 3. No documentado

Antecedentes personales no patológicos				
Grupo sanguíneo	Cualitativa	Grupo sanguíneo referido por el paciente durante la consulta o aquel registrado en el expediente.	Nominal	<ol style="list-style-type: none"> 1. Desconocido 2. A+ 3. A- 4. AB+ 5. AB- 6. O+ 7. O-
Exposición a tóxicos	Cualitativa	Presencia o ausencia de exposición a tóxicos a lo largo de su vida, referido por el paciente	Dicotómica	<ol style="list-style-type: none"> 1. No 2. Si
Antecedentes gineco-obstétricos/andrológicos				
Menarca	Cuantitativa	Edad referida por la paciente durante la cual presento primer sangrado menstrual constante	Intervalo	Edad en años con número
Pubarca	Cuantitativa	Edad referida por el paciente durante la cual presento crecimiento de vello púbico	Intervalo	Edad en años con número
Telarca	Cuantitativa	Edad referida por el paciente durante la cual presento crecimiento de desarrollo mamario	Intervalo	Edad en años con número
Métodos anticonceptivos	Cualitativa	Uso o no de métodos anticonceptivos durante un periodo mayor a 6 meses	Dicotómica	<ol style="list-style-type: none"> 1. No 2. Si
Enfermedades de transmisión sexual	Cualitativa	Presencia o ausencia de antecedente de enfermedades de transmisión sexual, referido por el paciente en el interrogatorio dirigido o documentado en el expediente	Nominal	<ol style="list-style-type: none"> 0. Negadas 1. Virus papiloma humano 2. Sífilis 3. VIH 4. Gonorrea 5. Clamidia 6. Hepatitis 7. Clamidia 8. Molusco contagioso 9. ...
Antecedentes personales patológicos				
Alergias	Cualitativa	Presencia o ausencia de alergias a medicamentos	Dicotómica	<ol style="list-style-type: none"> 1. Negadas 2. Presente

Transfusiones	Cualitativa	Presencia o ausencia de antecedentes de transfusiones hematológicas	Nominal	<ul style="list-style-type: none"> 0. Negadas 1. Sangre total 2. Glóbulos rojos 3. Plasma fresco congelado 4. Crioprecipitados 5. Concentrados de factores de coagulación 6. ...
Cirugías	Cualitativa	Presencia o ausencia de cirugías, referidas por el paciente o documentadas en el expediente	Nominal	<ul style="list-style-type: none"> 0. Negadas 1. Corrección de malformación cardiaca 2. Hernioplastía 3. Orquidopexia 4. ...
Tabaquismo	Cualitativa	Antecedente de consumo de tabaco (en los últimos 30 años)	Dicotómica	<ul style="list-style-type: none"> 1. No 2. Si
Otras Drogas	Cualitativa	Antecedente de consumo de cualquier droga	Nominal	<ul style="list-style-type: none"> 1. No 2. Marihuana 3. ...
Antecedentes inmunológicos	Cualitativa		Nominal	<ul style="list-style-type: none"> 0. Negados 1. Infecciones recurrentes <ul style="list-style-type: none"> 1.1. Vías aéreas superiores 1.2. Vías aéreas inferiores 1.3. Bucales 1.4. Gastrointestinales 1.5. Genitales
Comorbilidades cardiacas	Cualitativa	Antecedente de cualquier comorbilidad cardiaca referida por el paciente, familiar o documentadas en el expediente	Nominal	<ul style="list-style-type: none"> 0. Negadas 1. Malformación cardiaca congénita <ul style="list-style-type: none"> 1.1. No especificada 1.2. Comunicación interauricular 1.3. Comunicación interventricular 1.4. Persistencia de conducto arterioso 1.5. Otra 2. Hipertensión pulmonar 3. Estenosis valvular 4. Prolapso valvular 5. Otra

Comorbilidades endocrinológicas	Cualitativa	Antecedente de cualquier comorbilidad endocrinológica referida por el paciente, familiar o documentadas en el expediente	Nominal	<ol style="list-style-type: none"> 1. Negadas 2. Hipotiroidismo <ol style="list-style-type: none"> 2.1. No especificado 2.2. Congénito 2.3. Autoinmune 3. Hipertiroidismo 4. Bocio
Comorbilidades urogenitales	Cualitativa	Antecedente de cualquier comorbilidad urogenital referida por el paciente, familiar o documentadas en el expediente	Nominal	<ol style="list-style-type: none"> 0. Negadas 1. Reflujo vesicoureteral 2. Infecciones de vías urinarias recurrentes 3. Hidronefrosis 4. Doble sistema colector 5. Hipoplasia renal 6. Pobre diferenciación corticomedular
Otras comorbilidades	Cualitativa	Antecedente de cualquier otra comorbilidad referida por el paciente, familiar o documentadas en el expediente	Nominal	<ol style="list-style-type: none"> 1. Negadas 2. Hipoacusia <ol style="list-style-type: none"> 2.1. Congénita 2.2. Adquirida <ol style="list-style-type: none"> 2.2.1. Prelingüal 2.2.2. Postlingüal 3. Enfermedad inflamatoria intestinal <ol style="list-style-type: none"> 3.1. Crohn 3.2. CUCI 3.3. No especificado } 4. Reumatológicas <ol style="list-style-type: none"> 4.1. Artritis idiopática juvenil
Tratamientos	Cualitativa	Antecedente de tratamientos previos o actuales que haya ingerido el paciente	Nominal	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ninguno 2. Filgastrim, continua 3. Filgastrim, suspendido 4.
Parámetros de laboratorio				
Neutropenia	Cualitativa	Clasificación de acuerdo con valor de neutrófilos totales, calculado mediante la fórmula: 10 x glóbulos blancos totales x (% polimorfonucleares + % bandas).	Ordinal	<ol style="list-style-type: none"> 0. Normal 1. Neutropenia leve (1,000-1,500 células/mm³) 2. Neutropenia moderada (500-999 células/ mm³) 3. Neutropenia grave (<500 células/mm³)

Trombocitopenia intermitente	Cualitativa	Se considerará el último valor documentado en notas de hematología Clasificación de acuerdo con valor de plaquetas totales. Se considerará el valor más bajo documentado en su historial electrónico de laboratorio.	Ordinal	0. Normal 1. Trombocitopenia leve (100,000-150,000/microL) 2. Trombocitopenia moderada (50,000-99,000/microL) 3. Trombocitopenia grave (<50,000/microL) 4. Trombocitosis (>450,000/microL)
Linfocitopenia intermitente	Cualitativa	Clasificación de acuerdo con valor número de linfocitos totales, calculado mediante la fórmula: Leucocitos totales x 1000 x %linfocitos Se considerará el valor más bajo documentado en su historial electrónico de laboratorio.	Ordinal	0. Normal (1000-4000 linfocitos/microL) 1. Linfocitopenia (<1000 cells/microL) 2. Linfocitosis (>4000 cells/microL)
Exploración física				
Peso	Cuantitativa	Valor numérico obtenido de peso en báscula calibrada. Valor en kilogramos (kg)	Continua	Resultado en cm
Talla	Cuantitativa	Valor numérico obtenido de talla en metros (mts). Con el individuo de pie, de espaldas a báscula	Continua	Resultado en cm
Perímetro cefálico	Cuantitativa	Valor numérico obtenido de medición de perímetro craneal en centímetros (cm). Se utilizarán como puntos de referencia el punto más prominente del occipucio y la glabella.	Continua	Resultado en cm
Segmento superior	Cuantitativa	Valor numérico obtenido mediante la siguiente fórmula: Talla – segmento inferior	Continua	Resultado en cm
Segmento inferior	Cuantitativa	Valor numérico obtenido de la medición longitudinal desde el piso hasta la sínfisis del pubis, con el individuo de pie, pies juntos y pegados a la pared.	Continua	Resultado en cm
Relación de segmentos	Cuantitativa	Valor numérico obtenido de la relación entre la medición del segmento superior respecto al segmento inferior	Continua	Resultado en cm

Dismorfias faciales	Cualitativa	Presencia o ausencia de dismorfias faciales identificadas en la exploración física. Se permiten combinaciones entre los diferentes hallazgos. Ejemplo: 1+2+5		<ol style="list-style-type: none"> 1. Sin dismorfias faciales 2. Cara triangular 3. Puente nasal deprimido 4. Labios gruesos 5. Prognatismo 6. ...
Integridad palatina	Cualitativa	Presencia o ausencia de alteraciones en el paladar blando y/o duro	Ordinal	<ol style="list-style-type: none"> 1. Integro 2. Paladar hendido submucoso 3. Paladar hendido
Patrón venoso superficial aumentado	Cualitativa	Presencia o ausencia de patrón venoso superficial prominente identificadas en la exploración física	Dicotómica	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ausente 2. Presente
Tanner mamario	Cualitativa	<p>Se otorgará un estadio de la escala de Tanner dependiendo del desarrollo mamario en mujeres, de la siguiente forma</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tanner I (preadolescente) solo la papila elevada por arriba de la pared torácica • Tanner II (Brote mamario) elevación de las mamas y papilas como pequeños montículos e incremento del diámetro de la areola • Tanner III, las mamas y areolas continúan creciendo, no muestran separación del contorno • Tanner IV, la areola y las papilas se elevan por encima del nivel de la mama y forman montículos secundarios con mayor desarrollo del tejido mamario • Tanner V, mamas femeninas maduras. Las papilas se extienden más allá del contorno de las mamas como resultado de la recesión de la areola. 	Ordinal	<ol style="list-style-type: none"> 0. No valorable 1. Tanner I 2. Tanner II 3. Tanner III 4. Tanner IV 5. Tanner V

Hernia inguinal	Cualitativa	Presencia o ausencia de hernia inguinal. Búsqueda dirigida mediante la realización de la maniobra de Edward Wyllys Andrews, que consiste en: Con el paciente de pie o acostado se introduce el dedo gentilmente en el trayecto inguinal, localizar el anillo inguinal superficial, se indica al paciente pujar o toser.	Nominal	0. Ausente 1. Unilateral 2. Bilateral
Genitales	Cualitativa	Descripción fenotípica del aspecto general de los órganos genitales externos	Nominal	1. Acordes a edad y sexo 2. Micropene 3. Hipospadias 4. Ambigüedad genital 5. Criptorquidia 6. Criptorquidia unilateral derecha 7. Criptorquidia unilateral izquierda 8. Criptorquidia bilateral 9. Fístula uracal 10. Displasia genital
Tanner genitales	Cualitativa	Se otorgará un estadio de la escala de Tanner dependiendo del desarrollo genital en varones, de la siguiente forma: <ul style="list-style-type: none"> • Tanner I (preadolescente) testículo, escroto y pene tienen tamaño proporcional a infancia • Tanner II crecimiento escrotal y testicular así como cambio de textura • Tanner II mayor crecimiento del pene, en longitud y circunferencia • Tanner IV desarrollo del glande. Oscurecimiento de piel escrotal • Tanner V genitales adultos 	Nominal	0. No valorable 1. Tanner I 2. Tanner II 3. Tanner III 4. Tanner IV 5. Tanner V
Hiperextensibilidad cutánea	Cualitativa	Presencia o ausencia de cutis laxa. Se evalúa jalando gentilmente en la piel de la cara anterior del antebrazo o en la muñeca hasta que se encuentre con resistencia.	Dicotómica	1. Ausente 2. Presente

6. RESULTADOS

6.1. Descripción de la muestra

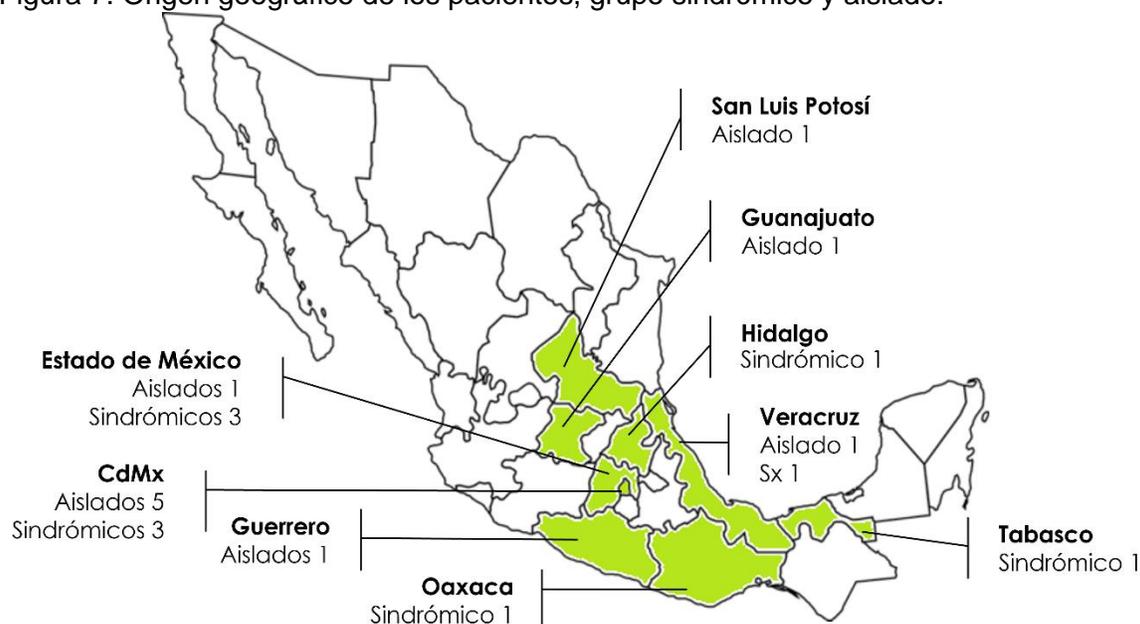
Se incluyeron 10 casos correspondientes al grupo “sindrómico” con sospecha clínica de NCGT4; y 10 casos correspondientes al grupo “aislados”; para la descripción y evaluación de las características demográficas clínicas y de laboratorio. Para mantener el anonimato de los pacientes, se codificaron de la siguiente manera:

- NCG – Neutropenia congénita grave. Representando el protocolo
- “S” o “A” – Representativo del grupo al que pertenece cada paciente. (A-Aislado y S-Sindrómico)
- Numero de dos dígitos iniciando por 01 en orden conforme los pacientes se fueron reclutando.

6.1.1. Características Demográficas de los 20 casos estudiados

Los pacientes eran provenientes de diferentes estados y localidades de la república: Ciudad de México, Estado de México, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo,

Figura 7. Origen geográfico de los pacientes, grupo sindrómico y aislado.



Oaxaca, San Luis Potosí, Tabasco y Veracruz (Fig. 7).

La proporción de sexo en ambos grupos fue de 4 mujeres por cada hombre. La mediana de edad actual en ambos grupos fue similar (Sindrómicos 38.5 años [21-68 años]; Aislados 40 años [25-87 años]); la mediana de edad al diagnóstico en ambos grupos fue de 32 años, sin embargo, en el grupo sindrómico se observó un

rango más amplio (Sindrómicos 1 mes de vida extrauterina [VEU] a 58 años; Aislados 15-80 años).

6.1.2. Antecedentes heredofamiliares

Se elaboró una genealogía de los 20 casos, se describieron datos de consanguinidad; se registraron todas aquellas enfermedades que podrían formar parte del espectro de NCGT4 (Hematológicas, cardíacas, urogenitales, talla baja). En el grupo “sindrómico” 5 fueron caso único, 2 tenían antecedente de un familiar de primer grado con historia de infecciones recurrentes (hija y hermana, respectivamente) y en un caso se reportó antecedente de 2 familiares de primer grado con leucopenia (dos hermanas). Dos casos presentaban antecedente de familiares de segundo grado afectados por infecciones recurrentes y/o datos sugestivos de cardiopatía congénita.

En el grupo “aislado”, 6 fueron caso único, dos casos presentaron 1 familiar de primer grado afectado (hija infecciones recurrentes); un caso presentó dos familiares de primer grado afectados (hijo fiebre recurrente y hermana leucopenia) y un caso presentó antecedente de infecciones recurrentes en familiar de segundo grado (tabla 7).

Tabla 7. Representación de pacientes con antecedentes heredofamiliares positivos

Casos	AHF (+)	Especificación	
NCG-A-01	■	Sobrina con neutropenia	
NCG-S-05	■	Hija infecciones de vías aérea de repetición	
NCG-A-11	■	Hija infecciones de vías aérea de repetición	■ 1er grado
NCG-A-13	■	Hijo fiebre recurrente; hermana leucopenia	■ 2° grado
NCG-S-17	■	Hermana leucopenia	
NCG-A-20	■	Hija infecciones de vías aérea de repetición	
NCG-S-22	■	2 hermanas infecciones de vías aérea de repetición	

6.1.3. Características Clínicas

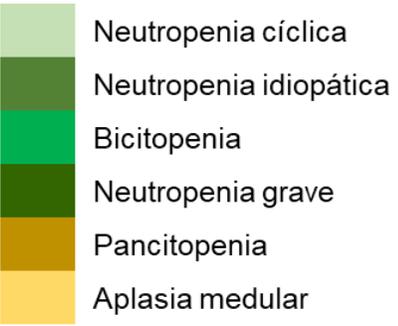
6.1.3.1. Hematológicas

Dentro del grupo “sindrómico”, tres pacientes presentaban diagnóstico de neutropenia cíclica, dos de neutropenia grave, dos casos de neutropenia sin especificación de gravedad; otros diagnósticos hematológicos fueron bicitopenia, pancitopenia y aplasia medular (uno de cada uno, respectivamente) (Tabla 8).

En este grupo se obtuvieron las últimas biometrías hemáticas (BH's) identificadas en el sistema de laboratorio institucional (Labsis), y se registró el número total de leucocitos y el porcentaje de neutrófilos con el fin de obtener una cuenta absoluta de neutrófilos. En 5 casos fue posible obtener datos de 30 BH's, mientras que el paciente con menos datos contaba con solo 3. Estos datos se graficaron para conocer el comportamiento de su neutropenia (Figura 8).

Tabla 8. Diagnóstico hematológico correspondiente a los 20 casos

ALTERACIONES HEMATOLÓGICAS			
Grupo sindrómico		Grupo aislado	
	NCG-S-03	NCG-A-01	
	NCG-S-05	NCG-A-02	
	NCG-S-06	NCG-A-04	
	NCG-S-07	NCG-A-10	
	NCG-A-08	NCG-A-11	
	NCG-S-09	NCG-A-12	
	NCG-S-14	NCG-A-13	
	NCG-S-17	NCG-A-16	
	NCG-S-21	NCG-A-18	
	NCG-S-22	NCG-A-20	



-  Neutropenia cíclica
-  Neutropenia idiopática
-  Bicitopenia
-  Neutropenia grave
-  Pancitopenia
-  Aplasia medular

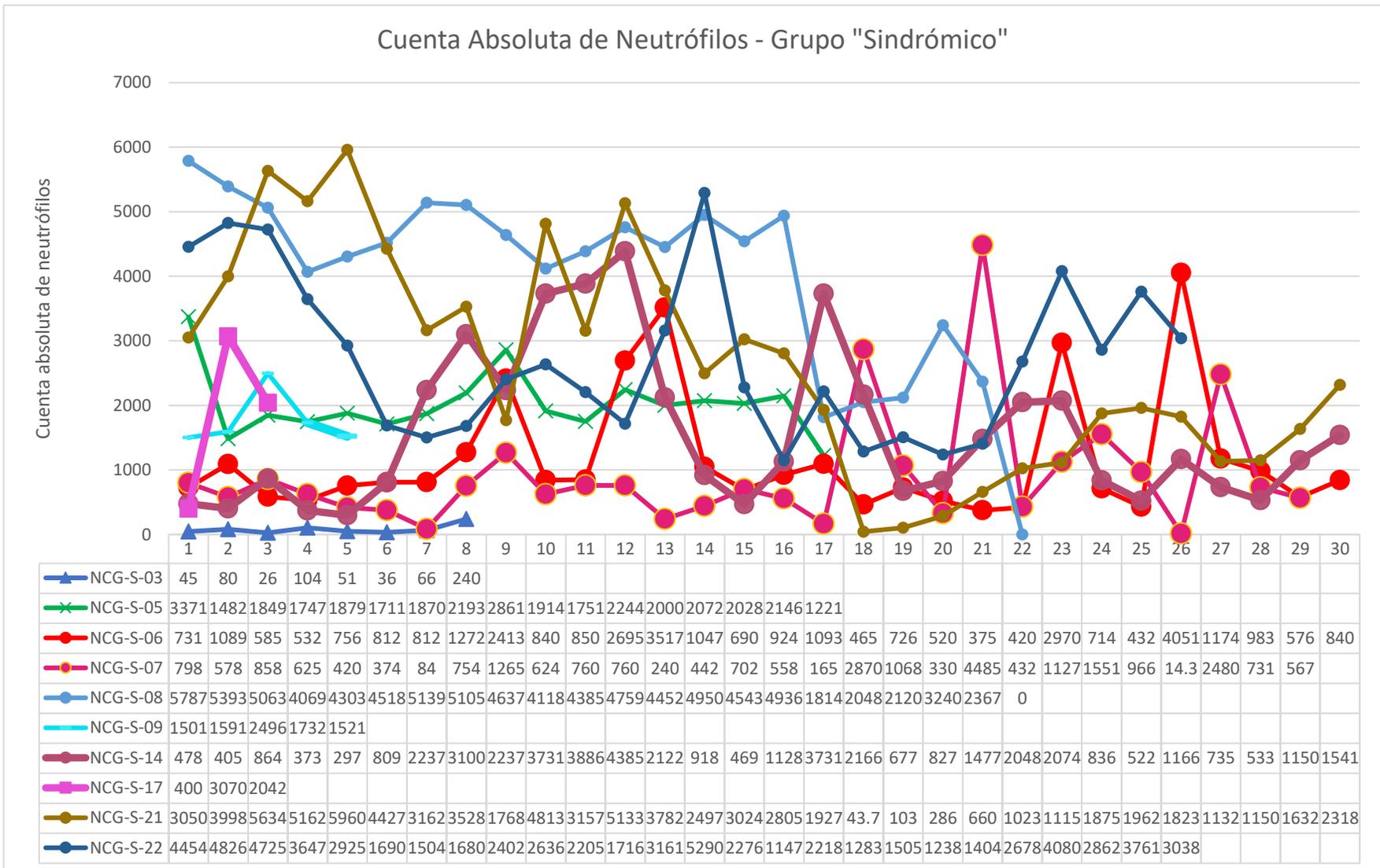


Figura 8. Gráfica representativa de Cuenta Absoluta de Neutrófilos en grupo "sindrómico"

6.1.3.2. Manifestaciones Extrahematológicas

Las características extrahematológicas de cada caso se muestran en la Tabla 9. La manifestación más frecuente fueron alteraciones del sistema vascular periférico (7/10 casos), caracterizado principalmente por presencia de patrón venoso superficial prominente (PVSP) y en una paciente por insuficiencia venosa periférica.

Las alteraciones cardiovasculares a su vez se presentaron con elevada frecuencia en este grupo (7/10 casos), en 4 casos se presentó el antecedente de soplo cardiaco, sin nuevas valoraciones ecocardiográficas. Un caso (NCG-S-14) se presentó inicialmente sin datos cardiológicos, a la exploración física se identificó soplo holosistólico, se complementó estudio con ecocardiograma transtorácico (ECOTT) en donde se documentó comunicación interauricular (CIA) con datos de insuficiencia mitral e insuficiencia aórtica leve. Dos casos (NCG-S-06 y 07) presentaban antecedente de corrección quirúrgica de CIA.

Tabla 9. Manifestaciones extrahematológicas en grupo sindrómicos (NCG-S)

	Cardiovascular	Urogenital	Vascular periférico	Gastrointestinal	Audición	Talla	Mutación
NCG-S-03	■	■	■			1.48*	
NCG-S-05	■	■	■			1.51	
NCG-S-06	■	■	■	■		1.34*	*
NCG-S-07	■	■	■	■		1.62	*
NCG-S-08			■	■	■	1.64	
NCG-S-09			■	■		1.7	
NCG-S-14	■		■	■		1.57	*
NCG-S-17			■			1.68	
NCG-S-21	■	■	■			1.6	
NCG-S-22	■	■	■			1.32	

Cardiovascular

- Soplo cardiaco
- CIA

Urogenital

- Anomalía en sistema reproductor N.E
- Hiperplasia de labios menores
- Criptorquidia bilateral
- Agenesia renal
- Hipoplasia renal

Vascular periférico

- Insuficiencia venosa
- PVSP

Gastrointestinal

- EII Crohn
- Diarrea crónica
- EII CUCI

Audición

- Hipoacusia Neurosensorial

* Pacientes con talla por debajo de la percentil 3 poblacional, * Pacientes con mutación identificada, PVSP patrón venoso superficial prominente, CIA Comunicación interauricular, EII Enfermedad Inflamatoria Intestinal, CUCI colitis ulcerosa crónica inespecífica.

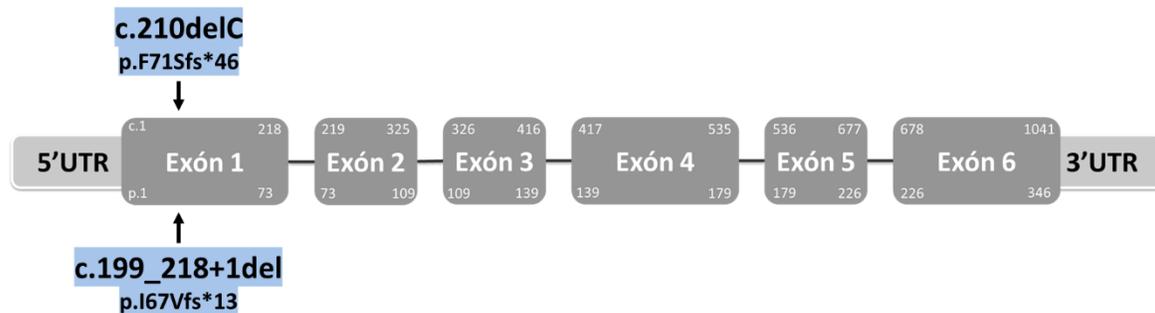
Las manifestaciones urogenitales en este grupo estaban presentes en la mitad de los pacientes (5/10 casos), cada uno de estos pacientes presentó una manifestación diferente; identificando un caso (NCG-S-05) con antecedente de anomalía en sistema reproductor no especificada, un caso (NCG-S-06) con hiperplasia de labios menores, un caso (NCG-S-07) con antecedente de criptorquidia bilateral corregida, otro (NCG-S-21) con agenesia renal y un caso de hipoplasia renal (NCG-S-22).

Dentro de las manifestaciones gastrointestinales (4/10 casos) destaca la presencia de enfermedad inflamatoria intestinal (EII) en 3 casos (NCG-S-06 al 08), en dos de ellos presente como enfermedad tipo Crohn y en uno como colitis ulcerosa crónica inespecífica (CUCl). En el caso NCG-S-14 se identificó diarrea crónica la cual ha sido abordada múltiples veces sin datos que permitan clasificarla dentro de EII. Asimismo, se documentó hipoacusia neurosensorial en un paciente. En dos pacientes (NCG-S-03 y 06) se identificó talla baja, es decir, por debajo de la percentila 3 poblacional.

6.2. Descripción de las mutaciones identificadas

En tres casos (NCG-S-06, 07 y 14) se identificó variante patogénica (tabla 9). Se detectaron dos variantes, ambas localizadas en el exón 1 del gen *G6PC3*. Ambas variantes generan un codón de paro prematuro dando como resultado una proteína trunca; asimismo, ambas se encuentran clasificadas como patogénicas en distintas bases de datos (Figura 9).

Gen *G6PC3* [NM_138387.3]



Variantes Sin Sentido

Figura 9. Representación gráfica del gen *G6PC3* y localización de las mutaciones identificadas en los pacientes con Neutropenia Congénita Grave Tipo 4

Estos tres casos corresponden a dos casos homocigotos para la variante c.210delC (p.F71Sfs*46) [NCG-S-07 y 14], así como un caso heterocigoto compuesto para la variante c.210delC (p.F71Sfs*46) y la variante c.199_218+1del (p.I67Vfs*13) [NCG-S-06]. El análisis de segregación de las variantes fue posible únicamente en dos casos (06 y 07), identificando como portadores de las variantes a ambos progenitores

en los dos casos. Los electroferogramas correspondientes se muestran en la figura 10.

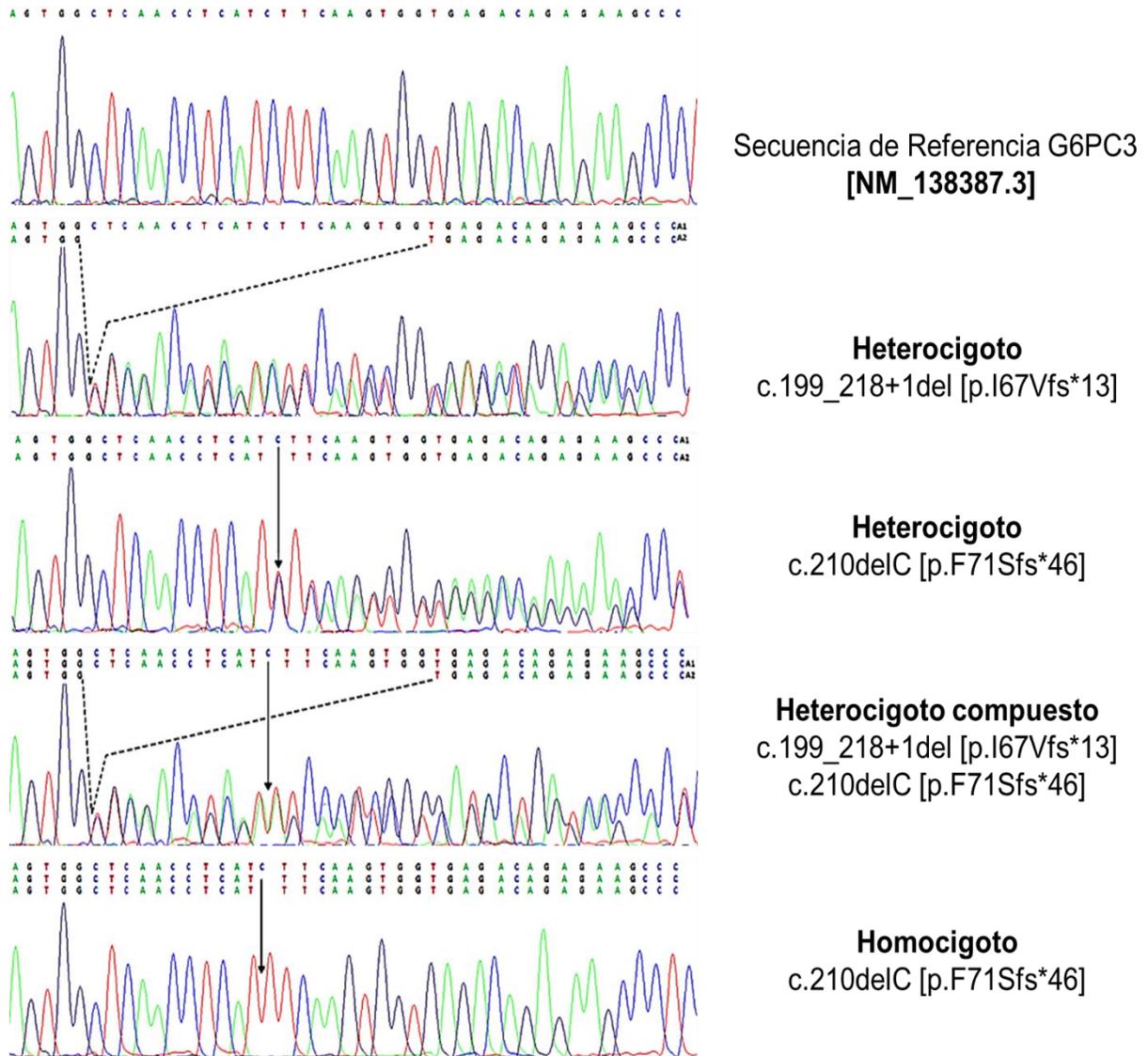


Figura 10. Electroferogramas de secuencia de referencia del gen *G6PC3* y variantes patogénicas identificadas.

6.3. Descripción clínica de los casos confirmados

En los casos positivos (descritos en la sección 6.2) se observó que el diagnóstico hematológico de referencia es variable; el caso NCG-S-06 inicialmente se ingresó con diagnóstico de neutropenia sin especificación de gravedad, sin embargo, durante el transcurso del estudio por normalización en biometría hemática y ausencia de datos infecciosos se descartó. El caso NCG-S-07 cuenta con diagnóstico de neutropenia cíclica desde el 2004 y en tratamiento intermitente con G-CSF, dentro de su historia de infecciones destacan aftas orales recurrentes (estomatitis) y condilomas anales. Por último, el caso NCG-S-14 cuenta con

diagnóstico de pancitopenia desde el 2017, sin tratamiento actual; niega antecedentes infecciosos graves (Tabla 10).

En la figura 11 se observan una gráfica representativa de las cuentas absolutas de neutrófilos de los tres casos, demostrado un patrón de recuperación y recaída; siendo importante recalcar que uno de los casos presenta niveles más bajos. Aunado a esto, en los tres casos se identificó linfocitopenia (<1000 células/ mm³), mientras que en dos casos (NCG-S-07 y 14) se documentó trombocitopenia intermitente

Tabla 10. Manifestaciones hematológicas en pacientes con diagnóstico confirmado de Neutropenia Congénita Grave Tipo 4

Característica	NCG-S-06	NCG-S-07	NCG-S-14
Diagnóstico de referencia	Anemia	Neutropenia cíclica (2004)	Pancitopenia (2017)
Trombocitopenia intermitente (<150,000)	245,000-573,000	17,000*-257,000	91,000*-448,000
Linfocitopenia (<1000 células/ mm ³)	175-825 células/mm ³	171-780 células/mm ³	257-884 células/ mm ³

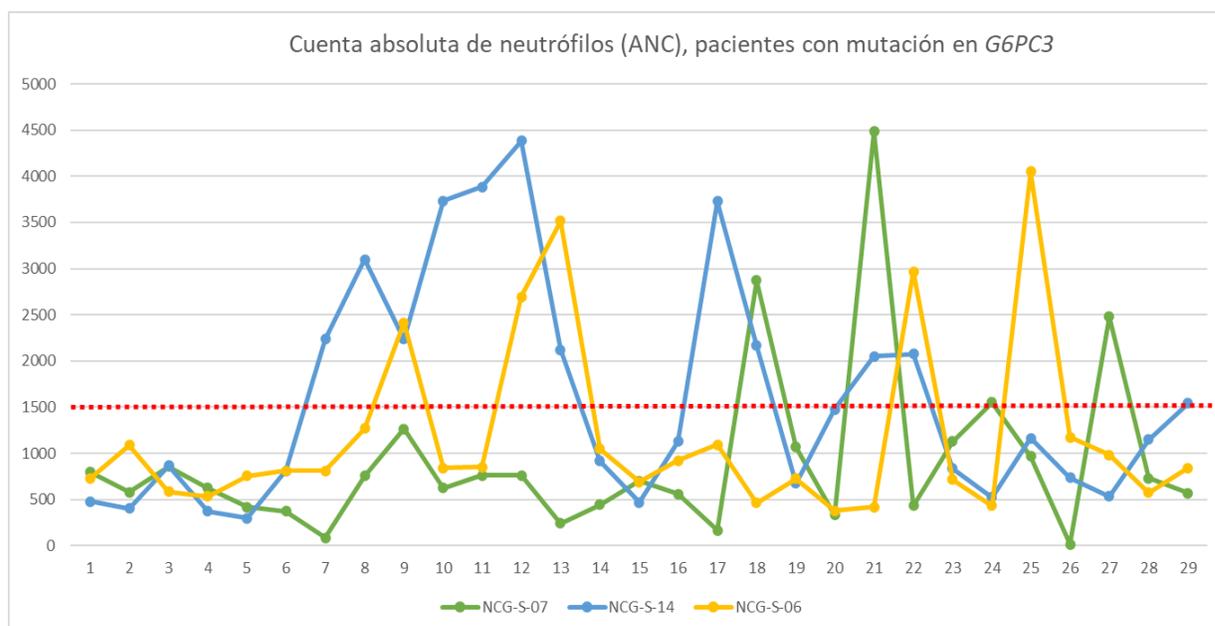


Figura 11. Representación gráfica de cuentas absolutas de neutrófilos en casos con diagnóstico confirmado de Neutropenia Congénita Grave Tipo 4

*Línea punteada roja denota el límite inferior a partir del cual se considera neutropenia

6.4. Estudio de extensión a familiares

Se realizó estudio de extensión en familiares del caso NCG-S-07, la genealogía correspondiente a este caso se muestra en la Figura 12. Se identificaron dos primos hermanos del paciente con datos sugestivos, el primero (individuo IV.4 en la genealogía) corresponde a una femenino con hernia inguinal bilateral recidivante, soplo cardíaco y antecedente de aftas orales recurrentes; el segundo (IV.5), masculino con antecedente de criptorquidia, infecciones recurrentes y talla baja.

Para el estudio molecular se obtuvo muestra de la hermandad con datos sugestivos, sus progenitores y de los abuelos maternos del caso índice (NCG-S-07). Se identificó que ambos casos corresponden a un estado homocigoto de la variante c.210delC [p.F71Sfs*46]; del mismo modo, los progenitores son portadores de dicha variante, así como la abuela materna (Figura 12).

6.5. Análisis del gen *ELANE*

Conociendo la prevalencia de neutropenias que son atribuibles a variantes en el gen *ELANE*, nos propusimos como objetivo secundario estudiar dicho gen con el fin de descartar/corroborar variantes en el mismo.

El análisis de secuenciación se realizó únicamente en aquellos casos que fueron negativos a variantes en el gen *G6PC3*. En ninguno de los dos grupos, “sindrómicos” o “aislados”, se identificaron variantes patogénicas o de significado incierto.

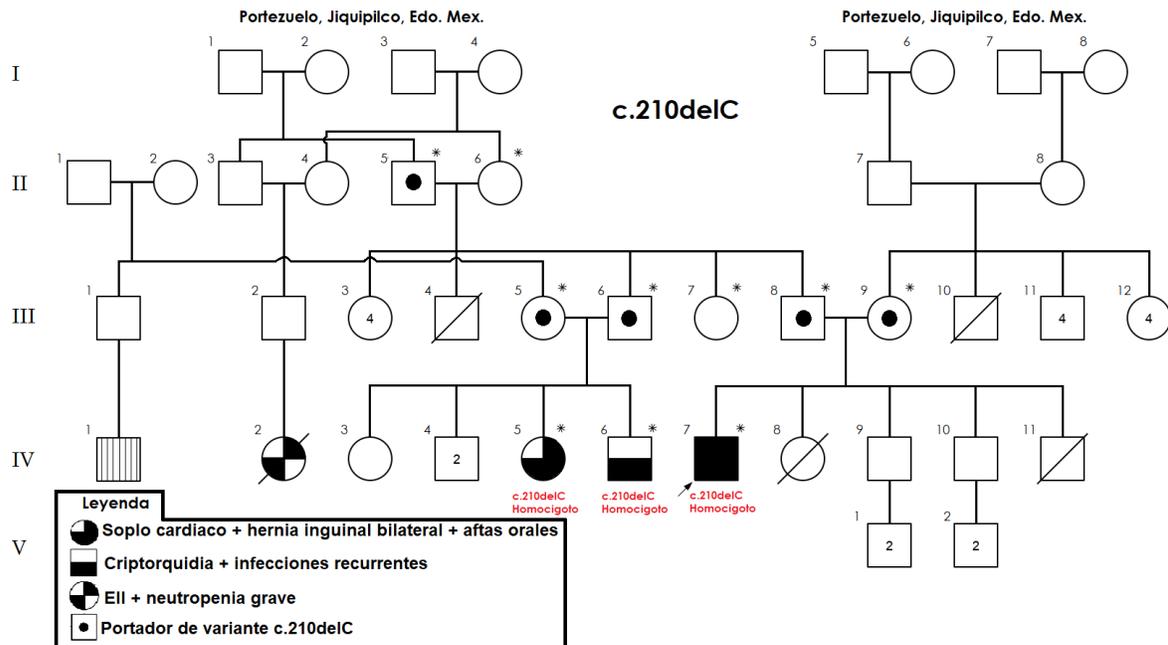


Figura 12. Genealogía correspondiente al caso NCG-S-07
Números romanos identifican generaciones, número arábico enumera miembros familiares. Hombres representados por rectángulo, mujeres por círculo. * Identifica aquellos individuos en los que se realizó búsqueda de la variante. Flecha identifica al probando .

7. DISCUSIÓN

La NCGT4 es una enfermedad de origen genético, multisistémica, con un modo de herencia autosómico recesivo, debida a por mutaciones en estado homocigoto o heterocigoto compuesto del gen *G6PC3*.

Se caracteriza por la presencia de neutropenia, la cual puede ser de tipo crónica o intermitente, presentándose en ocasiones como neutropenia cíclica. Además, se asocia con la presencia de manifestaciones extrahematológicas, principalmente un patrón venoso superficial prominente, alteraciones cardiovasculares y urogenitales. Este estudio pretendió establecer las características extrahematológicas que al asociarse con neutropenia podrían sugerir el diagnóstico de NCGT4 y permitir su subsecuente confirmación molecular.

Los pacientes provenían de diferentes regiones de la república mexicana, sin embargo, se observó que los tres casos con confirmación molecular tienen origen familiar dentro del Estado de México. Este hallazgo es altamente relevante dado que previamente se describieron los primeros pacientes mexicanos con déficit de *G6PC3*; de estos, 3 (3/5) son originarios del Estado de México y portadores de la principal variante patogénica observada en nuestra cohorte (c.210delC).³⁶ En la figura 13 se puede observar un mapa representativo del Estado de México, con el origen familiar de los casos.

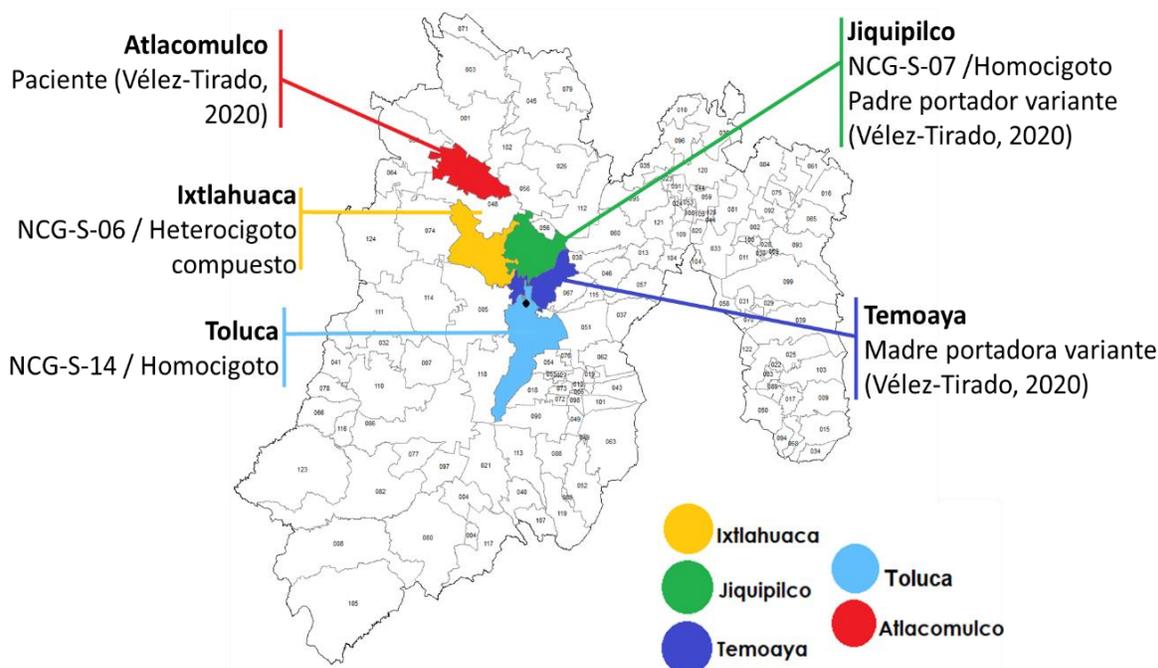


Figura 13. Mapa representativo del Estado de México, origen familiar de pacientes mexicanos reportados

La variante c.210delC tiene una frecuencia alélica menor <0.01 .⁷³ Del mismo modo, solo ha sido descrita en población hispana. Es importante recalcar que dos de los casos descritos en este estudio, compartían el apellido “Piña”. La relevancia está en que el apellido es infrecuente en la población mexicana, y sus orígenes españoles nos orientan a que el mismo, pudo haberse introducido en la población mexicana durante los procesos de colonización. Estos hallazgos, nos hacen considerar la posibilidad de un efecto fundador, el cual sería interesante investigar mediante estudios de genética poblacional, sin embargo, por el momento quedan fuera del objetivo de este estudio.

A pesar de que en la literatura se ha descrito que más de la mitad de los pacientes presentan antecedente de consanguinidad, ninguno de nuestros pacientes lo presentó. Del mismo modo, aproximadamente el 35% de los pacientes corresponden a publicaciones del Medio Oriente.⁴⁹

En nuestro estudio se observó una relación hombre a mujer de 1:2, lo cual difiere de lo previamente reportado en la literatura,²⁴ sin embargo, se trata de una muestra reducida. Al ser una enfermedad autosómica recesiva no se espera observar una tendencia de predominio por sexo, sin embargo, en la literatura se han descrito principalmente casos masculinos.⁷⁴ Este dato en nuestra población podría estar relacionado con que el sexo femenino representa una gran proporción de los pacientes atendidos dentro del INCMNSZ.

Durante el periodo de enero 2000 a diciembre 2020 se obtuvieron 115,197 nuevos registros dentro del INCMNSZ. Estos datos nos permitieron obtener la incidencia de la enfermedad, calculada en 1 por cada 38,400 pacientes. Esta incidencia es superior a lo previamente reportado, donde se considera 1 caso por cada 10 millones de habitantes,²⁹ por lo que es importante considerar la posibilidad de un subdiagnóstico tanto a nivel nacional como mundial.

De acuerdo con la definición inicial de neutropenia congénita grave esta debe ser constante y presentarse en los primeros meses de vida con infecciones recurrentes,⁷⁵ sin embargo, esta no fue la constante en nuestra cohorte. Ninguno de nuestros pacientes se presentó con infecciones recurrentes o graves durante el periodo prenatal o en la infancia. Del mismo modo, ninguno de los pacientes presentó neutropenia constante, pudiéndose observar en la figura 11 que en los tres casos se presentó de forma intermitente con periodos de recuperación completa.

Estos datos sugieren que el fenotipo hematológico podría ser de menor gravedad, evitando que los pacientes sean considerados para diagnóstico de NCGT4, lo cual apoyaría el subdiagnóstico de la misma. Asimismo, es importante mencionar que tanto en la literatura como en nuestra cohorte se observó la presencia de trombocitopenia intermitente, sin embargo, este dato continúa sin ser considerado como parte importante del fenotipo.

Dentro de las anomalías cardiovasculares, los defectos del septum atrial (DSA) son los que con mayor frecuencia han sido reportados en estos pacientes.³⁶ Los DSA por lo general se presentan de forma asintomática o como un soplo suave, lo que a su vez genera que muchos de estos defectos pasen desapercibidos hasta la edad adulta.⁷⁶ Dos de los casos aquí reportados fueron diagnosticados con comunicación interauricular posterior al inicio del abordaje de anomalías hematológicas. Esto a su vez complica el diagnóstico de NCGT4, dado que en ausencia de DSA la sospecha de esta entidad puede ser menor o incluso nula.

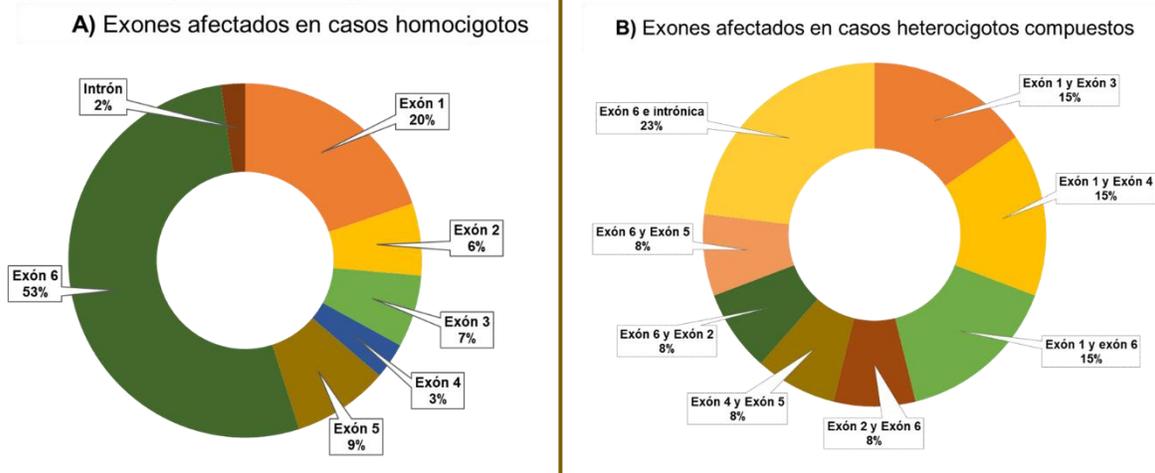
Estudios previos han investigado la presencia de mutaciones en *G6PC3* asociadas a casos de neutropenia congénita (NC) sindrómica, definida como aquella con al menos una manifestación extrahematológica. Boztug y col. (2011) en una cohorte de 31 pacientes con NC sindrómica, identificaron 16 pacientes con variantes patogénicas bialélicas; los autores concluyeron que la característica no hematológica más consistente en el déficit de *G6PC3* es el patrón venoso superficial aumentado, dato consistente con nuestro estudio.⁴⁶

El rendimiento diagnóstico de dicho estudio fue mucho mayor al observado en el nuestro, sin embargo, esto podría deberse a que dicha cohorte además de ser de mayor tamaño estaba conformada por pacientes más jóvenes. Si bien hasta la fecha no se ha reportado una esperanza de vida baja, la presencia de malformaciones congénitas asociadas a infecciones recurrentes podría llevar a desenlaces desfavorables en una gran proporción de pacientes.

Alrededor del 10% de todos los casos de NCGT4 reportados hasta la fecha corresponden a casos no sindrómicos.⁴⁹ Con la intención de identificar alguno de estos casos se integró el grupo aislado, en el cual no se identificaron variantes patogénicas causales en ninguno de los exones de *G6PC3*. Conociendo la elevada prevalencia de variantes en *ELANE* causantes de neutropenia congénita/cíclica, se realizó la secuenciación de este gen, sin identificar variantes patogénicas. Sin embargo, sería interesante investigar su frecuencia en la población mexicana en cohortes más grandes.

Las variantes patogénicas por lo general son más frecuentes en estado homocigoto vs heterocigotos compuestos (Homocigotos 91/105, 86.66%; heterocigoto compuesto 13/105, 12.38%). Del mismo modo, la distribución de variantes a lo largo del gen se encuentra principalmente localizadas en el exón 6, seguido de los exones 1, 5, 2 y 3; y en dos casos variantes intrónicas. En los heterocigotos compuestos, la

Figura 14. Representación gráfica de exones involucrados en NCGT4



combinación más frecuente es la presencia de variantes patogénicas en el exón 6 asociada a variante intrónica, seguido de cualquier otra combinación (Figura 14).

Dentro del grupo aislado se identificó una paciente (NCG-A-10) portadora para la variante c.210delC, se realizó la búsqueda de variantes en el resto de los exones de *G6PC3*, así como variantes en *ELANE*. Este análisis se realizó considerando la descripción de pacientes dobles heterocigotos para ambos genes en los cuales se presentaba un fenotipo de neutropenia cíclica; sin embargo, en la paciente no se identificó otra variante. Este hallazgo recalca aún más la importancia de considerar la tasa de portadores para la variante c.210delC en la población mexicana, así como una mayor descripción del fenotipo en portadores.

Respecto a la correlación genotipo-fenotipo que se consideró como un objetivo secundario del estudio, esta no pudo ser llevada a cabo dada la muestra final que se reclutó para el estudio. Sin embargo, previamente se ha descrito que no existe una clara correlación genotipo-fenotipo.²⁴

El diagnóstico confirmatorio de NCGT4 permite realizar estudios de extensión a familiares en riesgo, permitiendo identificar aquellos casos con manifestaciones que no han recibido una adecuada atención, mejorando el seguimiento, manejo y favoreciendo la prevención de complicaciones. A su vez, la identificación de portadores de las variantes patogénicas permite realizar un asesoramiento genético personalizado.

A pesar de esto, es importante considerar que dado el fenotipo tan amplio que se puede observar en los pacientes, este diagnóstico puede pasar desapercibido en una gran proporción. Esto puede ser secundario a que, al considerarse una enfermedad rara con una prevalencia muy baja, no sea considerada dentro de las principales sospechas diagnósticas. Aunado a esto está la característica del fenotipo hematológico, el cual como pudimos apreciar en este estudio no siempre se comporta de manera grave. Además, en casos donde la anomalía cardiovascular

no ha sido identificada, el caso sea visto como una entidad no sindrómica y se consideren otras opciones diagnósticas antes.

Las limitantes de este estudio fueron, falta de información en expedientes clínicos, interrupción del seguimiento en varios casos. Del mismo modo, es posible que no se hayan captado todos los casos con datos sugestivos, esto estuvo influenciado por temor a la pandemia actual.

8. CONCLUSIONES

Este es el primer estudio en población mexicana que busca identificar pacientes con NCGT4 a partir de una cohorte de pacientes con neutropenia sindrómica. Dentro de los datos demográficos el sexo del paciente no fue relevante para el diagnóstico, sin embargo, el origen familiar en el Estado de México debe considerarse como relevante.

Dentro de las manifestaciones hematológicas, los pacientes con mutación presentan variación en los niveles de CAN, con patrones de recaída y recuperación. En cuanto a las extrahematológicas, se caracteriza principalmente por la presencia de PVSP y anomalía cardiovascular siendo esta principalmente los DSA, específicamente la comunicación interauricular.

Se detectaron dos variantes en el gen *G6PC3*, siendo la principal la variante c.210delC. Esta variante estuvo presente en los 3 casos, los cuales no están relacionados. No se identificaron rearrreglos genómicos grandes.

La NCGT4 es una entidad que representa un reto diagnóstico, que a su vez requiere de un seguimiento oportuno con el fin de prevenir complicaciones asociadas a las anomalías extrahematológicas. Su sospecha diagnóstica es principalmente importante en casos de neutropenia asociada a alguna otra característica extrahematológica, principalmente el PVSP y DSA.

El médico genetista desempeña un papel importante, brindando un adecuado asesoramiento genético tanto para el paciente como para la familia.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Stenhammar L, Strömberg L, Ljunggren CG. Kostmann's disease or severe hereditary neutropenia—the man behind the syndrome. *Ann Hematol.* 2020;99(10):2339-2341. doi:10.1007/s00277-020-04142-y
2. Berliner N. Lessons from congenital neutropenia: 50 years of progress in understanding myelopoiesis. Published online 2008. doi:10.1182/blood
3. Ljunggren CG, Stenhammar L, Strömberg L. Icons in paediatrics: Rolf Kostmann (1909–1982). *Acta Paediatr.* 2017;106(7):1070-1072. doi:10.1111/APA.13871
4. Nagata S, Tsuchiya M, Asano S, et al. Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor. *Nat 1986 3196052.* 1986;319(6052):415-418. doi:10.1038/319415a0
5. Souza LM, Boone TC, Gabrilove J, et al. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: Effects on normal and leukemic myeloid cells. *Science (80-).* 1986;232(4746):61-65. doi:10.1126/science.2420009
6. Horwitz M, Benson KF, Person RE, Aprikyan AG, Dale DC. Mutations in ELA2, encoding neutrophil elastase, define a 21-day biological clock in cyclic haematopoiesis. *Nat Genet.* 1999;23(4):433-436. doi:10.1038/70544
7. Dale DC, Person RE, Bolyard AA, et al. Mutations in the gene encoding neutrophil elastase in congenital and cyclic neutropenia. *Blood.* 2000;96(7):2317-2322. doi:10.1182/blood.v96.7.2317.h8002317_2317_2322
8. Köllner I, Sodeik B, Schreek S, et al. Mutations in neutrophil elastase causing congenital neutropenia lead to cytoplasmic protein accumulation and induction of the unfolded protein response. *Blood.* 2006;108(2):493-500. doi:10.1182/blood-2005-11-4689
9. Horwitz MS, Laurino MY, Keel SB. Normal peripheral blood neutrophil numbers accompanying ELANE whole gene deletion mutation. *Blood Adv.* 2019;3(16):2470. doi:10.1182/BLOODADVANCES.2019000498
10. Klein C, Grudzien M, Appaswamy G, et al. HAX1 deficiency causes autosomal recessive severe congenital neutropenia (Kostmann disease). *Nat Genet 2006 391.* 2006;39(1):86-92. doi:10.1038/NG1940
11. Boztug K, Appaswamy G, Ashikov A, et al. A Syndrome with Congenital Neutropenia and Mutations in G6PC3 . *N Engl J Med.* 2009;360(1):32-43. doi:10.1056/nejmoa0805051
12. Arden SD, Zahn T, Steegers S, et al. Molecular cloning of a pancreatic islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein. *Diabetes.* 1999;48(3):531-542. doi:10.2337/DIABETES.48.3.531
13. Ebert DH, Bischof LJ, Streeper RS, et al. Structure and promoter activity of an islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related gene. *Diabetes.* 1999;48(3):543-551. doi:10.2337/DIABETES.48.3.543
14. Martin CC, Bischof LJ, Bergman B, et al. Cloning and characterization of the human and rat islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein (IGRP) genes. *J Biol*

Chem. 2001;276(27):25197-25207. doi:10.1074/JBC.M101549200

15. Martin CC, Oeser JK, Svitek CA, Hunter SI, Hutton JC, O'Brien RM. Identification and characterization of a human cDNA and gene encoding a ubiquitously expressed glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein. *J Mol Endocrinol.* 2002;29(2):205-222. doi:10.1677/jme.0.0290205
16. Guionie O, Clottes E, Stafford K, Burchell A. Identification and characterisation of a new human glucose-6-phosphatase isoform. *FEBS Lett.* 2003;551(1-3):159-164. doi:10.1016/S0014-5793(03)00903-7
17. Jun HS, Lee YM, Cheung YY, et al. Lack of glucose recycling between endoplasmic reticulum and cytoplasm underlies cellular dysfunction in glucose-6-phosphatase- β -deficient neutrophils in a congenital neutropenia syndrome. *Blood.* 2010;116(15):2783-2792. doi:10.1182/blood-2009-12-258491
18. McKinney C, Ellison M, Briones NJ, et al. Metabolic abnormalities in G6PC3-deficient human neutrophils result in severe functional defects. *Blood Adv.* 2020;4(23):5888-5901. doi:10.1182/bloodadvances.2020002225
19. Donadieu J, Fenneteau O, Beaupain B, Mahlaoui N, Chantelot CB. Congenital neutropenia: Diagnosis, molecular bases and patient management. *Orphanet J Rare Dis.* 2011;6(1):1-28. doi:10.1186/1750-1172-6-26
20. Dale DC, Bolyard AA, Schwinzer B, et al. The Severe Chronic Neutropenia International Registry - 10 Years of Follow-Up. *Blood.* 2004;104(11):1458-1458. doi:10.1182/BLOOD.V104.11.1458.1458
21. Skokowa J, Dale DC, Touw IP, Zeidler C, Welte K. Severe congenital neutropenias. *Nat Rev Dis Prim.* 2017;3. doi:10.1038/nrdp.2017.32
22. Dale DC, Cottle TE, Fier CJ, et al. Severe chronic neutropenia: Treatment and follow-up of patients in the Severe Chronic Neutropenia International Registry. *Am J Hematol.* 2003;72(2):82-93. doi:10.1002/ajh.10255
23. Notarangelo LD, Savoldi G, Cavagnini S, et al. Severe congenital neutropenia due to G6PC3 deficiency: Early and delayed phenotype in two patients with two novel mutations. *Ital J Pediatr.* 2014;40(1):1-6. doi:10.1186/s13052-014-0080-8
24. Banka S, Newman WG. A clinical and molecular review of ubiquitous glucose-6-phosphatase deficiency caused by G6PC3 mutations. *Orphanet J Rare Dis.* 2013;8(1). doi:10.1186/1750-1172-8-84
25. Donadieu J, Beaupain B, Mahlaoui N, Bellanné-Chantelot C. Epidemiology of Congenital Neutropenia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2013;27(1):1-17. doi:10.1016/j.hoc.2012.11.003
26. Dale DC, Bolyard AA, Schwinzer BG, et al. The Severe Chronic Neutropenia International Registry: 10-Year follow-up report. *Support Cancer Ther.* 2006;3(4):220-231. doi:10.3816/SCT.2006.n.020
27. Rezaei N, Aghamohammadi A, Moin M, et al. Frequency and clinical manifestations of patients with primary immunodeficiency disorders in Iran: Update from the Iranian primary immunodeficiency registry. *J Clin Immunol.* 2006;26(6):519-532. doi:10.1007/s10875-006-9047-x

28. Tsangaris E, Klaassen R, Fernandez C V., et al. Genetic analysis of inherited bone marrow failure syndromes from one prospective, comprehensive and population-based cohort and identification of novel mutations. *J Med Genet.* 2011;48(9):618-628. doi:10.1136/jmg.2011.089821
29. Donadieu J, Beaupain B, Lapillonne H, et al. How Many Patients Have Congenital Neutropenia? a Population-Based Estimation from the Nationwide French Severe Chronic Neutropenia Registry. *Blood.* 2020;136(Supplement 1):40-41. doi:10.1182/blood-2020-135912
30. Chou JY, Jun HS, Mansfield BC, Chou JY, Sik Jun H, Mansfield BC. Glycogen storage disease type I and G6Pase- β deficiency: etiology and therapy. Published online 2010. doi:10.1038/nrendo.2010.189
31. Marcolongo P, Fulceri R, Gamberucci A, Czegle I, Banhegyi G, Benedetti A. Multiple roles of glucose-6-phosphatases in pathophysiology: State of the art and future trends. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2013;1830(3):2608-2618. doi:10.1016/j.bbagen.2012.12.013
32. Pan CJ, Lei KJ, Annabi B, Hemrika W, Chou JY. Transmembrane topology of glucose-6-phosphatase. *J Biol Chem.* 1998;273(11):6144-6148. doi:10.1074/JBC.273.11.6144
33. Ghosh A, Shieh JJ, Pan CJ, Chou JY. Histidine 167 Is the Phosphate Acceptor in Glucose-6-phosphatase- β Forming a Phosphohistidine Enzyme Intermediate during Catalysis. *J Biol Chem.* 2004;279(13):12479-12483. doi:10.1074/JBC.M313271200
34. Van Schaftingen E, Gerin I. The glucose-6-phosphatase system. *Biochem J.* 2002;362:513.
35. Arthur ME. Oxford Desk Reference. *Anesth Analg.* 2017;124(4):1362. doi:10.1213/ane.0000000000001891
36. Velez-Tirado N, Antonio M, Enrique Y-N, et al. Severe congenital neutropenia due to G6PC3 deficiency. Case series of five patients and literature review. Published online July 7, 2021. doi:10.21203/RS.3.RS-356870/V2
37. Banka S, Wynn R, Byers H, Arkwright PD, Newman WG. G6PC3 mutations cause non-syndromic severe congenital neutropenia. *Mol Genet Metab.* 2013;108(2):138-141. doi:10.1016/j.ymgme.2012.12.001
38. Banka S, Newman WG, Özgül RK, Dursun A. Mutations in the G6PC3 gene cause Dursun syndrome. *Am J Med Genet Part A.* 2010;152 A(10):2609-2611. doi:10.1002/ajmg.a.33615
39. Dursun A, Ozgul RK, Soydas A, et al. Familial pulmonary arterial hypertension, leucopenia, and atrial septal defect: A probable new familial syndrome with multisystem involvement. *Clin Dysmorphol.* 2009;18(1):19-23. doi:10.1097/MCD.0B013E32831841F7
40. Alangari AA, Alsultan A, Osman ME, Anazi S, Alkuraya FS. A novel homozygous mutation in G6PC3 presenting as cyclic neutropenia and severe congenital neutropenia in the same family. *J Clin Immunol.* 2013;33(8):1403-1406. doi:10.1007/s10875-013-9945-7
41. Banka S, Chervinsky E, Newman WG, et al. Further delineation of the phenotype of severe congenital neutropenia type 4 due to mutations in G6PC3. *Eur J Hum Genet.* 2011;19:18-22. doi:10.1038/ejhg.2010.136
42. Desplantes C, Fremond ML, Beaupain B, et al. Clinical spectrum and long-term follow-up of 14 cases with G6PC3 mutations from the French severe congenital neutropenia registry. *Orphanet J Rare Dis.* 2014;9(1). doi:10.1186/s13023-014-0183-8

43. Kiykim A, Baris S, Karakoc-Aydiner E, et al. G6PC3 deficiency: Primary immune deficiency beyond just neutropenia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2015;37(8):616-622. doi:10.1097/MPH.0000000000000441
44. Bégin P, Patey N, Mueller P, et al. Inflammatory bowel disease and T cell lymphopenia in G6PC3 deficiency. *J Clin Immunol*. 2013;33(3):520-525. doi:10.1007/S10875-012-9833-6
45. Germeshausen M, Zeidler C, Stuhmann M, Lanciotti M, Ballmaier M, Welte K. Digenic mutations in severe congenital neutropenia. *Haematologica*. 2010;95(7):1207-1210. doi:10.3324/haematol.2009.017665
46. Boztug K, Rosenberg PS, Dorda M, et al. Extended spectrum of human glucose-6-phosphatase catalytic subunit 3 deficiency: Novel genotypes and phenotypic variability in severe congenital neutropenia. *J Pediatr*. 2012;160(4):679-683.e2. doi:10.1016/j.jpeds.2011.09.019
47. Xia J, Bolyard AA, Rodger E, et al. Prevalence of mutations in ELANE, GFI1, HAX1, SBDS, WAS and G6PC3 in patients with severe congenital neutropenia. *Br J Haematol*. 2009;147(4):535-542. doi:10.1111/j.1365-2141.2009.07888.x
48. Lebel A, Yacobovich J, Krasnov T, et al. Genetic analysis and clinical picture of severe congenital neutropenia in Israel. *Pediatr Blood Cancer*. 2015;62(1). doi:10.1002/pbc.25251
49. Velez-Tirado N, Antonio M, Enrique Y-N, et al. Severe congenital neutropenia due to G6PC3 deficiency. Case series of ve patients and literature review. doi:10.21203/rs.3.rs-356870/v1
50. Boztug K, Klein C. Genetics and Pathophysiology of Severe Congenital Neutropenia Syndromes Unrelated to Neutrophil Elastase. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2013;27(1):43-60. doi:10.1016/j.hoc.2012.11.004
51. Aytekin C, Germeshausen M, Tuygun N, Dogu F, Ikinogullari A. A novel G6PC3 gene mutation in a patient with severe congenital neutropenia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2013;35(2):2012-2014. doi:10.1097/MPH.0b013e3182679000
52. Fernandez BA, Green JS, Bursey F, et al. *Adult Siblings with Homozygous G6PC3 Mutations Expand Our Understanding of the Severe Congenital Neutropenia Type 4 (SCN4) Phenotype.*; 2012. doi:10.1186/1471-2350-13-111
53. Bolton C, Burch N, Morgan J, et al. Remission of Inflammatory Bowel Disease in Glucose-6-Phosphatase 3 Deficiency by Allogeneic Haematopoietic Stem Cell Transplantation. *J Crohn's Colitis*. 2019;2020:142-147. doi:10.1093/ecco-jcc/jjz112
54. Mistry A, Scambler T, Parry D, et al. Glucose-6-phosphatase catalytic subunit 3 (G6PC3) deficiency associated with autoinflammatory complications. *Front Immunol*. 2017;8(NOV):1485. doi:10.3389/FIMMU.2017.01485/BIBTEX
55. Cetinkaya PG, Cagdas D, Arikoglu T, Gumruk F, Tezcan I. Three patients with glucose-6-phosphatase catalytic subunit 3 deficiency. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2020;33(7):957-961. doi:10.1515/jpem-2019-0541
56. Gatti S, Boztug K, Pedini A, et al. A case of syndromic neutropenia and mutation in G6PC3. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2011;33(2):138-140. doi:10.1097/MPH.0b013e3181f46bf4
57. Banka S. G6PC3 Deficiency - GeneReviews® - NCBI Bookshelf. Accessed March 20, 2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK285321/>

58. Kingston HM. ABC of clinical genetics. Detection of carriers. *Br Med J*. 1989;298(6672):508-511. doi:10.1136/BMJ.298.6672.508
59. Harper PS. *Practical Genetic Counselling*. Septima. Hodder Arnold; 2010.
60. Bendall LJ, Bradstock KF. G-CSF: From granulopoietic stimulant to bone marrow stem cell mobilizing agent. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2014;25(4):355-367. doi:10.1016/J.CYTOGFR.2014.07.011
61. Frampton JE, Lee CR, Faulds D. Filgrastim: A Review of its Pharmacological Properties and Therapeutic Efficacy in Neutropenia. *Drugs*. 1994;48(5):731-760. doi:10.2165/00003495-199448050-00007
62. Vandenberghe P, Beel K. Severe congenital neutropenia, a genetically heterogeneous disease group with an increased risk of AML/MDS. *Pediatr Rep*. 2011;3(2S):21-24. doi:10.4081/pr.2011.s2.e9
63. Cottle TE, Fier CJ, Donadieu J, Kinsey SE. Risk and Benefit of Treatment of Severe Chronic Neutropenia With Granulocyte Colony-Stimulating Factor. Published online 2002. doi:10.1053/shem.2002.31914
64. Zeidler C, Grote UAH, Nickel A, et al. Outcome and management of pregnancies in severe chronic neutropenia patients by the European Branch of the Severe Chronic Neutropenia International Registry. *Haematologica*. 2014;99(8):1395. doi:10.3324/HAEMATOL.2013.099101
65. Rosenberg PS, Alter BP, Bolyard AA, et al. The incidence of leukemia and mortality from sepsis in patients with severe congenital neutropenia receiving long-term G-CSF therapy. *Blood*. 2006;107(12):4628-4635. doi:10.1182/BLOOD-2005-11-4370
66. Fioredda F, Iacobelli S, Van Biezen A, et al. Stem cell transplantation in severe congenital neutropenia: an analysis from the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *Blood*. 2015;126(16):1885-1892. doi:10.1182/BLOOD-2015-02-628859
67. Dufour C. *Severe Congenital Neutropenias Disorders With Marrow Failure*. Elsevier Inc.; 2017. doi:10.1016/B978-0-12-804152-9/00020-8
68. Vilboux T, Lev A, Malicdan MC V., et al. A Congenital Neutrophil Defect Syndrome Associated with Mutations in VPS45 . *N Engl J Med*. 2013;369(1). doi:10.1056/nejmoa1301296
69. Bennett RL, French KS, Resta RG, Doyle DL. standardized human pedigree nomenclature: Update and assessment of the recommendations of the National Society of Genetic Counselors. *J Genet Couns*. 2008;17(5):424-433. doi:10.1007/s10897-008-9169-9
70. Obtención de muestras de sangre por venopunción y preparación de extensiones de sangre a partir de sangre venosa recolectada en tubos con anticoagulante. Accessed January 10, 2022. <https://www.who.int/es/publications/i/item/HTM-GMP-MM-SOP-05b>
71. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012;13(1):134. doi:10.1186/1471-2105-13-134/FIGURES/5
72. GRCh38.p13 - hg38 - Genome - Assembly - NCBI. Accessed January 20, 2022. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000001405.39

73. rs769441127 (DELETION) - Population genetics - Homo_sapiens - Ensembl genome browser 105. Accessed January 25, 2022.
https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=17:44070675-44071675;v=rs769441127;vdb=variation;vf=146982984
74. Velez-Tirado N, Antonio M, Enrique Y-N, et al. Severe congenital neutropenia due to G6PC3 deficiency. Case series of ve patients and literature review. doi:10.21203/rs.3.rs-356870/v1
75. Boxer LA, Newburger PE. A molecular classification of congenital neutropenia syndromes. *Pediatr Blood Cancer*. 2007;49(5):609-614. doi:10.1002/pbc.21282
76. Naik RJ, Shah NC. Teenage heart murmurs. *Pediatr Clin North Am*. 2014;61(1):1-16. doi:10.1016/j.pcl.2013.09.014

10. ANEXOS

10.1. Anexo A1. Cuestionario “Historia clínica y familiar NCGT4”



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



ANEXO 1

Protocolo: “Caracterización Clínica, Molecular y Análisis de Correlación Genotipo-Fenotipo en Pacientes con Neutropenia Congénita Grave Tipo 4”

Título: Cuestionario “Historia clínica y familiar NCGT4”

Fecha de captura: _____

Datos de contacto

Nombre:	Registro:
Sexo fenotípico:	Escolaridad:
Ocupación:	Lugar de nacimiento: (ciudad, Estado)
Teléfonos:	Correos:
Domicilio:	CP:

Antecedentes heredofamiliares

Genealogía (Página 6)

Antecedentes personales no patológicos

Actividad Física: _____
Inmunizaciones:
_____ . Fecha: _____
_____ . Fecha: _____
_____ . Fecha: _____
Grupo Sanguíneo: _____
Tatuajes: _____
Perforaciones: _____
Exposición al humo de leña: _____
Exposición a tóxicos: _____

Antecedentes Gineco-obstétricos *(En caso de varón, dejar vacío)*

Menarquía: _____	Embarazos: _____	Abortos: _____
------------------	------------------	----------------



Enfermedades durante la gestación: _____

Fecha de última regla: _____

Pubarca: _____

Telarca: _____

Características del sangrado menstrual: _____

Inicio de vida sexual: _____

Número de parejas sexuales: _____

Métodos anticonceptivos utilizados: _____

Enfermedades de Transmisión Sexual: _____

Antecedentes andrológicos *(En caso de mujer, dejar vacío)*

Inicio de vida sexual: _____

Número de parejas sexuales: _____

Uso de preservativo: _____

Enfermedades de Transmisión Sexual: _____

Antecedentes personales patológicos

Alergias: _____

Enfermedades de la infancia: _____

Transfusiones: _____

Infecciones recurrentes:

1. _____ ¿Cuándo? _____
2. _____ ¿Cuándo? _____
3. _____ ¿Cuándo? _____
4. _____ ¿Cuándo? _____
5. _____ ¿Cuándo? _____
6. _____ ¿Cuándo? _____

Cirugías:

7. _____ ¿Cuándo? _____
8. _____ ¿Cuándo? _____
9. _____ ¿Cuándo? _____



10. _____ . ¿Cuándo? _____

11. _____ . ¿Cuándo? _____

Hospitalizaciones extra quirúrgicas:

1. _____ . ¿Cuándo? _____

2. _____ . ¿Cuándo? _____

3. _____ . ¿Cuándo? _____

4. _____ . ¿Cuándo? _____

Comorbilidades:

- Cardiacas

1. _____ . ¿Cuándo? _____

2. _____ . ¿Cuándo? _____

- Endocrinológicas

3. _____ . ¿Cuándo? _____

4. _____ . ¿Cuándo? _____

- Urológicas

5. _____ . ¿Cuándo? _____

6. _____ . ¿Cuándo? _____

- Nefrológicas

7. _____ . ¿Cuándo? _____

8. _____ . ¿Cuándo? _____

- Genitales

9. _____ . ¿Cuándo? _____

10. _____ . ¿Cuándo? _____

- Otras

11. _____ . ¿Cuándo? _____

12. _____ . ¿Cuándo? _____

Traumatismos y fracturas: _____

Consumo de tabaco: _____

Consumo de alcohol: _____



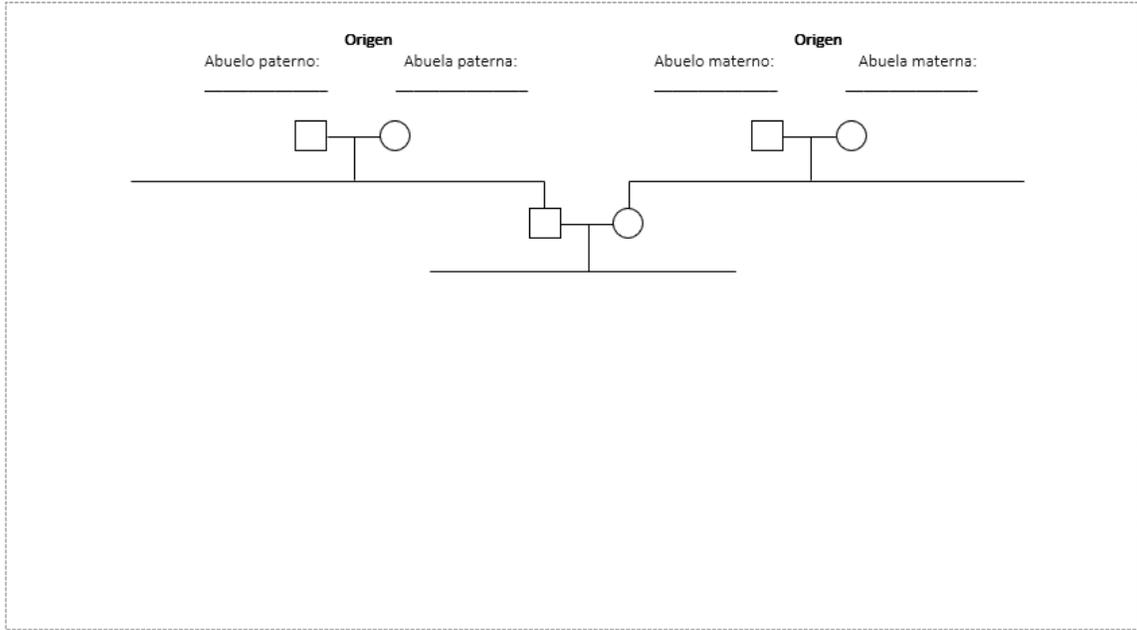
Consumo de drogas de abuso: _____ ¿Cuales?

Tratamientos

1. _____ Inicio/suspensión _____
2. _____ Inicio/suspensión _____
3. _____ Inicio/suspensión _____

Exploración física

<u>Peso:</u>	<u>Segmento superior:</u>
<u>Talla:</u>	<u>Segmento inferior:</u>
<u>PC:</u>	<u>Relación segmentos:</u>
<u>Talla blanco familiar:</u>	
<u>Talla materna (cm) + Talla paterna (cm)</u>	
2	
Varón = TBF + 6.5 cm	
Mujer = TBF - 6.5 cm	
<u>Descripción:</u>	
Facies: Cara triangular <input type="checkbox"/> Puente nasal deprimido <input type="checkbox"/> Labios gruesos <input type="checkbox"/> Prognatismo <input type="checkbox"/>	
Tórax: Pectus carinatum <input type="checkbox"/>	
Abdomen: _____	
Extremidades: _____	
Genitales: _____	
Piel y tegumentos: Patrón venoso superficial prominente <input type="checkbox"/> Cutis laxa <input type="checkbox"/>	



Quien elaboró: _____

10.2. Anexo A2. Símbolos estandarizados por la Sociedad Nacional de Asesores Genéticos

	Hombre	Mujer	N.E	Comentarios
1. Individuos	 b. 1925	 30y	 4 mo	Genero asignado por fenotipo
2. Individuos afectados				Leyenda usada para definir el sombreado. Usar solo si afección clínica
				>2 condiciones, símbolo se puede partir, cada segmento diferente
3. Múltiples individuos				Número de hermanos dentro del símbolo (afectados no agrupar)
4. Múltiples individuos, Numero desconocido				Usar "n" en lugar de "?"
5. Individuos Muertos	 d. 35	 d. 4 mo	 d. 60's	Indicar causa de muerte si se sabe. No usar cruz
6. Consultante				Individuo buscando asesoramiento/estudio genético
7. Probando	 P	 P		Miembro familiar afectado que busca atención
8. Óbitos	 SB 28 wk	 SB 30 wk	 SB 34 wk	Incluir edad gestacional y cariotipo, si se sabe
9. Embarazos	 LMP: 7/1/2007 47,XY,+21	 20 wk 46,XX		Edad gestacional y cariotipo debajo del símbolo.
Embarazos no llevados a término		Afectados	Sanos	
10. Aborto Espontáneo		 17 wks female cystic hygroma	 < 10 wks	Si se sabe SDG/genero escribir debajo
11. Terminación del embarazo		 18 wks 47,XY,+18		No usar otras abreviaciones
12. Embarazo Ectópico			 ECT	Escribir ECT por debajo del símbolo

10.3. Anexo A3. Técnica de toma de muestra de sangre periférica

4.1. Toma de una muestra de sangre por venopunción	4.1. Toma de una muestra de sangre por venopunción
<p>1. Rotule un tubo que contenga EDTA según las instrucciones del DMP-POE-06a (Rotulado de las extensiones de sangre para el diagnóstico microscópico del paludismo).</p>	<p>1. Rotule un tubo que contenga EDTA con el nombre del paciente y la fecha y la hora a la que se toma la muestra. Véase el DMP-POE-06a: Rotulado de las extensiones de sangre para el diagnóstico microscópico del paludismo.</p>
<p>2-3. Coloque un torniquete en el brazo del paciente y busque una vena grande con una movilidad mínima.</p>	<p>2. Coloque un torniquete en el brazo del paciente (por encima del codo) para hacer visibles o palpables las venas. Pídale al paciente que cierre el puño con fuerza para que estas se vuelvan más prominentes.</p>
<p>4-5. Desinfecte la zona con alcohol y deje que se seque al aire.</p>	<p>3. Palpe con el dedo índice para encontrar una vena de calibre suficientemente grande y con una movilidad mínima.</p>
<p>6. Introduzca la aguja (unida a una jeringuilla o a un tubo al vacío) y extraiga la sangre de manera uniforme.</p>	<p>4. Desinfecte la zona con una toallita o un algodón humedecido con alcohol isopropílico o etílico al 70%. No vuelva a tocar la zona que ha limpiado.</p>
<p>7. Suelte el torniquete, extraiga la aguja y con un algodón presione firmemente sobre el lugar de la venopunción.</p>	<p>5. Deje que la zona de la venopunción se seque al aire durante 30 segundos para que la muestra de sangre extraída no se contamine con el alcohol, lo cual podría causar hemólisis.</p>
<p>8. Transfiera la sangre al tubo que contiene EDTA y mezcle ambos despacio invirtiendo el tubo seis veces.</p>	<p>6. Introduzca una aguja de flebotomía estéril y de un solo uso (unida a una jeringuilla o a un tubo al vacío) a lo largo de la vena, con el bisel dirigido hacia arriba. Extraiga de manera uniforme entre ≥ 2 ml y un máximo de 4 ml de sangre. <i>Nota: Los anticoagulantes pueden interferir en la adherencia de la sangre al portaobjetos y en la tinción de Giemsa, sobre todo cuando la proporción entre sangre y anticoagulante no es óptima. Por ello, en un tubo de 5 ml, el volumen de sangre debería superar los 2 ml.</i></p>
	<p>7. Cuando haya recolectado un volumen suficiente de sangre, suelte el torniquete y pídale al paciente que abra el puño. Extraiga la aguja y con un algodón presione firmemente sobre el lugar de la venopunción. Pídale al paciente que siga presionando en ese mismo punto con el brazo en alto hasta que deje de sangrar.</p> <p>8. Transfiera la sangre al tubo que contiene EDTA y mezcle ambos despacio invirtiendo el tubo seis veces. No agite el tubo.</p>

10.4. Anexo A4. Procedimiento de separación de productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa

Preparación del gel de agarosa al 1.5%

1. Preparar un gel de agarosa al 1.5% tamaño de 10x10 cm con 5 mm de grosor y usando un peine de 20x1 mm
2. Volumen de agarosa líquida requerida para ello es de 100 mL. Preparación: pesar 1.5 g de agarosa deshidratada, colocar en un matraz Erlenmeyer y agregar 100 mL del buffer TBE 1x, agitar y calentar en el horno de microondas durante 40 s, sacar, agitar y calentar de nuevo 60 s, repetir estos pasos hasta que la agarosa se hidrate completamente y no se observen partículas suspendidas.
3. Enfriar agarosa a punto de tacto y agregar 0.8 uL de bromuro de etidio. MANTENER PRECAUCIONES. Agitar y verter en la base con el peine. Dejar solidificar.

Electroforesis:

1. Llenar la cámara de electroforesis con el buffer TBE 1x. Sumergir la base con el gel teniendo el cuidado de colocar el lado con los pozos del lado del ánodo.
2. Preparar las muestras para correr: en un microtubo de 0.2 (si son varias muestras se puede usar una tira) poner 10 uL de la muestra de ADN, agregar 3 uL del buffer de carga (5x Green GoTaq Flexi Buffer, Promega).
3. En el primer pozo cargar el marcador de peso molecular, 5 uL. Cargar las muestras en el gel con una micropipeta de 10-20 con punta larga, teniendo el cuidado de no perforar el gel.
4. Conectar la tapa de la base a la fuente de poder. Aplicar una corriente de 90 mV. Observar la frente del corrimiento de las muestras. En cuanto el colorante amarillo llegue al final del gel, observar el gel en el transiluminador UV.
5. Observar la separación de las bandas del marcador de peso molecular y determinar si es necesario correrlo más.
6. Capturar imagen en equipo.

10.5. Anexo A5. Purificación de los productos de reacción de secuencia usando columnas de sílica

Purificación del fragmento amplificado en columna de sílica

Para remover los oligonucleótidos sobrantes, la enzima, las sales y otras impurezas del procedimiento anterior, la mezcla de productos de amplificación se somete a purificación con reactivos y materiales comerciales, que consiste en los siguientes pasos (fig. 8A):

1. Purificar con el Kit **QIAquick** para PCR
2. Si el volumen de la reacción de PCR a purificar supera los 30 uL, transferirlos a un tubo de 0.6 mL identificado de manera correspondiente.
3. Para unir los fragmentos de ADN a la columna, agregar **5** volúmenes de **buffer PB** por **1** volumen de reacción de PCR al tubo de 0.6 mL.
4. Verificar que el color de la mezcla sea amarillo, si es naranja o violeta, agregar 10uL de Acetato de Sodio 3M, pH 5.0.
5. Preparar columna QIAquick en tubos de recolección de 2 mL. Poner la mezcla disuelta, 800 uL máximo por carga y centrifugar a 13 000 rpm/1 min, descartar el eluido. Repetir con el resto de la muestra si hay sobrante usando la misma columna.
6. Regresar la columna al mismo tubo de recolección.
7. Lavar con **750** uL del **Buffer PE**, dejar reposar 2-5 min antes de centrifugar a 13000 rpm/1 min. Descartar el eluido y volver a centrifugar para eliminar el etanol.
8. Colocar la columna en un tubo de 1.5 mL.
9. Eluir el DNA con 30 uL de H₂O libre de DNAsas, dejar reposar 4 min y centrifugar a 13000 rpm/1 min.
10. Estimar la concentración (cantidad) del purificado en gel de agarosa 2% usando 5 uL más 3 uL de buffer de carga y un marcador de peso molecular con cantidades conocidas de ADN por banda.

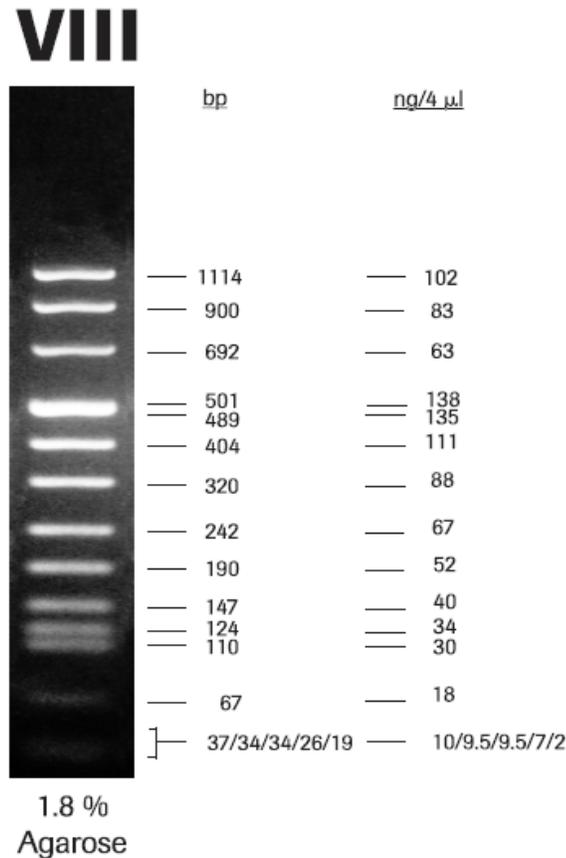


Figura 15. Plásmido VIII digerido, su peso molecular y concentración de cada fragmento.