

Enfermedad granulomatosa crónica. Diagnóstico mediante el ensayo de dihidrorodamina

Chronic granulomatous disease. Diagnosis by the dihydrorhodamine assay

Diana Sanabria^a, Vivian Giménez^a, Celia Martínez de Cuéllar^b, Mercedes Carpinelli^a, Sara Benegas^a, Santiago Insaurralde^c

^aDepartamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción, Paraguay

^bCentro Nacional de Inmunodeficiencias Primarias, Instituto de Medicina Tropical, Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Asunción, Paraguay

^cLaboratorio de Análisis Clínicos, Hospital General de Barrio Obrero, Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, Paraguay

Recibido: 19 de noviembre de 2018; Aceptado: 2 de septiembre de 2019

¿Qué se sabe del tema que trata este estudio?

La información sobre el tema investigado es amplia; diagnósticos de EGC por el ensayo DHR se reportan desde dos décadas atrás, así como detección de portadoras y patrones de herencia, no obstante, en Paraguay es la primera vez que se obtiene este tipo de información.

¿Qué aporta este estudio a lo ya conocido?

El estudio refuerza la información existente sobre casos de EGC, portadoras y patrones de herencia por el ensayo DHR. La información es relevante para países de la región que aún no trabajan con esta técnica y para nuestro país donde la implementamos recientemente mediante este estudio.

Resumen

Introducción: La enfermedad granulomatosa crónica (EGC) se caracteriza por una alteración de la función oxidativa de neutrófilos, presentando herencia ligada al cromosoma X (EGC LX) y autosómica recesiva (EGC AR). El ensayo de dihidrorodamina (DHR) es utilizado para el diagnóstico y detección de portadoras, además proporciona información sobre patrones de herencia. **Objetivo:** Detectar casos de EGC en niños con infecciones recurrentes y evaluar a sus familiares femeninos mediante el ensayo de DHR, para identificar portadoras y obtener información acerca de posibles patrones de herencia. **Pacientes y Método:** Fueron incluidos 107 pacientes (<18 años de edad) con sospecha clínica de EGC como neumonías, linfadenopatías y abscesos, remitidos por médicos de hospitales públicos, del 2014 al 2017. Además, se incluyeron seis mujeres, familiares de los niños con EGC. A las muestras de los pacientes se aplicó el ensayo DHR, expresando los resultados como índice de estimulación de neutrófilos (IE). **Resultados:** La mediana de edad de los pacientes fue de 3 años y 62/107 fueron varones. El IE promedio fue $39,7 \pm 13,8$ y 101/107 niños exhibieron un cambio completo de fluorescencia de DHR. En 2/107 niños no se observó dicho cambio (IE = 1,0), lo cual indica posible EGC LX, y un tercer niño mostró un leve cambio (IE = 4,8), compatible con EGC AR. En 5/6 mujeres se encontró un patrón bimodal, indicando un estado de portadora. **Conclusiones:** Fueron detectados tres casos de EGC y cinco portadoras mediante el ensayo de DHR, realizado por primera vez en Paraguay. También se obtuvo información sobre los posibles patrones de herencia, EGC LX en dos familias y un caso probable de EGC AR.

Palabras clave:

Enfermedad Granulomatosa Crónica; Enfermedad Granulomatosa Crónica ligada al X; 123-dihidrorodamina; Paraguay

Correspondencia:
Diana Sanabria
dianas54@hotmail.com

Abstract

Introduction: Chronic granulomatous disease (CGD) is characterized by an alteration of the neutrophil oxidative function. Its inheritance patterns are linked to the X chromosome (X-linked CGD) and autosomal recessive (AR CGD). The dihydrorhodamine (DHR) assay is used for the diagnosis and detection of carriers and provides information on inheritance patterns. **Objective:** To detect CGD cases in children with recurrent infections and to evaluate their female relatives through the DHR assay to identify carriers and obtain information about possible inheritance patterns. **Patients and Method:** 107 patients (<18 years of age) with clinical suspicion of CGD such as pneumonia, lymphadenopathies, and abscesses were included, referred by physicians from public hospitals between 2014 and 2017. Six female relatives of children with CGD were also included. The DHR assay was performed on all patient samples and the results were expressed as neutrophils stimulation index (SI). **Results:** The median age of patients was 3 years and 62/107 of them were male. The average SI was 39.7 ± 13.8 and a complete shift of DHR was found in 101/107 children. In 2/107 children, no DHR shift was observed (SI=1.0) indicating possible X-linked CGD, and a third child showed a slight DHR shift (SI=4.8) compatible with AR CGD. 5/6 female relatives presented a bimodal pattern, showing a carrier status. **Conclusions:** Three cases of CGD and five female carriers were detected through the DHR assay, being the first time that this technique was used in Paraguay. Information on the most likely inheritance patterns, two X-linked CGD, and one AR CGD case was also obtained.

Keywords:

Chronic Granulomatous Disease; X-linked Chronic Granulomatous Disease; dihydrorhodamine-123; Paraguay

Introducción

La enfermedad granulomatosa crónica (EGC) es una patología genética infrecuente con una incidencia aproximada de 1:250.000 nacidos vivos. La EGC es causada por un defecto en el complejo enzimático NADPH oxidasa de las células fagocíticas, principalmente en neutrófilos, lo que resulta en la producción deficiente de especies reactivas del oxígeno (ERO). Este mecanismo es esencial para la eliminación de bacterias y hongos¹. El complejo NADPH oxidasa está compuesto por dos proteínas de la membrana celular, gp91phox y p22phox, codificadas por los genes *CYBB* y *CYBA* respectivamente, además de otros tres componentes citosólicos, p47phox, p67phox y p40phox, codificados por los genes *NCF1*, *NCF2* y *NCF4* respectivamente. Existen dos patrones de herencia de la EGC, uno ligado al cromosoma X (EGC LX) y otro de forma autosómica recesiva (EGC AR). Las mutaciones en el gen *CYBB* causan el patrón ligado al cromosoma X y representan el 70% de los casos. Las mutaciones autosómicas recesivas en el gen *NCF1* (p47phox) se presentan en el 20% de los casos, mientras que las mutaciones en los genes *CYBA* (p22phox) y *NCF2* (p67phox) representan cada uno el 5% de los casos reportados^{2,3}. Generalmente, los niños con EGC LX presentan infecciones más severas, una aparición más temprana de los síntomas y una mortalidad mayor que aquellos con EGC AR^{1,2}.

El diagnóstico de EGC se establece por la ausencia o disminución significativa de la actividad oxidasa de los neutrófilos cuando son estimulados para producir ERO en el proceso denominado “estallido respiratorio”. Las pruebas más utilizadas para evaluar el

estallido respiratorio son la reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT) y la oxidación de la dihidrorodamina (DHR). La reducción del NBT presenta desventajas como la subjetividad y la lectura visual de un número reducido de células, mientras que el ensayo DHR es un test rápido con alta sensibilidad para el diagnóstico de EGC⁴. La dihidrorodamina difunde dentro de la célula a través de la membrana plasmática donde alcanza la mitocondria y es oxidada a rodamina, la cual emite una fluorescencia intensa que se mide por citometría de flujo⁵.

Además, el ensayo DHR aporta información sobre los posibles patrones de herencia de EGC a través de la identificación de portadoras entre familiares femeninos del lado materno de los pacientes afectados. Las portadoras presentan dos poblaciones de fagocitos (patrón bimodal) en la citometría de flujo, una de ellas que no se activa y la otra que lo hace normalmente, en cuyo caso el patrón de herencia podría ser EGC ligada al cromosoma X. Estas mujeres presentan riesgo de desarrollar enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso discoide, infecciones del tipo EGC y/o enfermedad intestinal inflamatoria⁶⁻⁸.

En Paraguay, los reportes sobre EGC son muy limitados^{9,10} y el Centro Nacional de Inmunodeficiencias Primarias (IDPs) en 21 años solo ha registrado ocho casos entre los años 1992 y 2013 (datos no publicados). Estos pacientes fueron diagnosticados con el ensayo de NBT y no existe información sobre el patrón de herencia de EGC que presentaron. Los datos actualmente disponibles en este centro no son suficientes para contactar a dichos pacientes. Por otra parte, suponemos que la sospecha clínica de los médicos es deficiente, lo

que podría deberse a la falta de conocimiento sobre la patología o al hecho de considerarla una enfermedad “muy rara”. Además, en nuestro país, la disponibilidad y el acceso a las pruebas diagnósticas son limitados. Considerando todo lo anterior, suponemos que podría existir un subdiagnóstico y subregistro de EGC en Paraguay. En el año 2013, iniciamos la estandarización e implementación del ensayo DHR en el Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS), el único centro en el país que cuenta con pruebas para la detección de EGC. Esta fue la primera vez que se utilizó esta técnica en Paraguay. El objetivo de este estudio fue detectar casos de EGC en una población infantil con infecciones recurrentes y evaluar a sus familiares femeninos del lado materno utilizando el ensayo DHR, con el fin de identificar a portadoras y obtener información sobre los posibles patrones de herencia de la enfermedad.

Pacientes y Método

Pacientes

Los participantes de este estudio fueron de ambos sexos y menores de 18 años de edad. Entre marzo de 2014 y julio de 2017, los niños con características clínicas sugerentes de EGC fueron derivados por médicos especialistas de diferentes hospitales públicos del país al centro de investigación. También se incluyeron a familiares femeninos del lado materno de los niños diagnosticados con EGC durante el curso de este estudio y se evaluó su estado de portadoras.

Criterios de selección

Se seleccionaron niños con características clínicas sugerentes de EGC con la colaboración de médicos especialistas (pediatras, infectólogos, alergistas e inmunólogos) de cinco hospitales públicos de referencia del país, quienes derivaron pacientes con manifestaciones clínicas (≥ 2 veces al año) tales como neumonía grave y/o recurrente, linfadenopatías, infecciones bacterianas o fúngicas recurrentes en la piel/mucosa, abscesos cutáneos y/o que afecten órganos, fiebre prolongada de origen desconocido y osteomielitis. Se excluyeron niños con enfermedades hematológicas oncológicas así como también pacientes con inmunodeficiencias secundarias por uso de medicamentos y/o infección por VIH. También se incluyeron a familiares femeninos de los niños diagnosticados con EGC durante este estudio. Fueron analizadas las muestras de sus madres, una abuela y dos tías del lado materno, quienes aceptaron participar en este estudio.

Muestras de sangre

Se extrajo 1 ml de sangre por punción venosa y se recolectó en un tubo con EDTA como anticoagu-

lante. En el caso de los pacientes hospitalizados, la muestra se conservó a temperatura ambiente y fue transportada de inmediato al centro de investigación. El ensayo DHR se realizó en un tiempo que no excedió las cuatro horas después de la extracción de sangre.

Evaluación de la función oxidativa de los neutrófilos mediante el ensayo DHR

La evaluación se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Acosta et al.¹¹ incluyendo algunas modificaciones. En resumen, se añadieron 4 ml de solución lisante NH_4Cl 0,83g% a 100 μl de sangre durante 3 minutos, luego se centrifugó a 1200 rpm por 3 minutos y las células se resuspendieron en 1 mL de buffer PBS. Se identificaron dos tubos como E (estimulado) y NE (no estimulado) con 340 μL de suspensión celular cada uno, se añadieron 150 μL de solución DHR (Invitrogen, Oregon, USA) a una concentración final de 87 μM y se incubaron a 37°C durante 5 minutos, luego se agregaron 150 μL de solución PMA 3,54 μM (Phorbol 12-myristate 13-acetate, Sigma-Aldrich, USA) al tubo E y 150 μL de PBS al tubo NE, incubándolos por 15 minutos a 37°C. Posteriormente, se analizaron con el citómetro de flujo FACS Calibur (Beckton Dickinson, San José, CA, USA) utilizando el software CellQuestPro. Los resultados fueron expresados mediante el índice de estimulación (IE) de neutrófilos, cociente entre la intensidad media de fluorescencia (IMF) del tubo E y la IMF del tubo NE.

Consideraciones éticas

Se obtuvo el consentimiento oral y escrito de los padres o tutores de los niños. Los familiares femeninos del lado materno de los niños con EGC también firmaron el consentimiento informado y las portadoras recibieron consejo genético. Todos los datos de los pacientes fueron resguardados con absoluta confidencialidad. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética en la Investigación del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud.

Análisis estadístico

Los datos fueron almacenados en una hoja de cálculo de Microsoft Excel versión 8.0 y se analizaron con el software estadístico Epi Info™ CDC versión 7.2 para Windows. Las variables categóricas fueron descritas como frecuencias absolutas y relativas, mientras que las variables cuantitativas fueron expresadas como medianas y rangos intercuartílicos (RIQ) o promedios y desviaciones estándar (DS) según la distribución de la variable.

Resultados

En el presente estudio se incluyeron 107 pacientes entre 1 mes y 15 años de edad (mediana: 3 años), de los cuales el 58% (62/107) eran de sexo masculino. Las manifestaciones clínicas más frecuentes fueron neumonía 45% (48/107), infecciones cutáneas 18% (19/107), linfadenopatías 13% (14/107) y abscesos 9% (10/107). La edad de inicio de estas manifestaciones clínicas presentó una mediana de 2 años (RIQ: 1 – 6 años). En el 23% (24/107) de los pacientes, se observaron antecedentes familiares relacionados a inmunodeficiencia primaria y/o enfermedad granulomatosa crónica como por ejemplo, al menos un hermano o hermana con infecciones recurrentes (12%) y la muerte de parientes varones menores de dos años de edad (4%). No se observó consanguinidad entre los padres de ningún niño. En cuanto a la función oxidativa de los neutrófilos (estallido respiratorio) evaluada mediante el ensayo de DHR, al considerar la población total, el IE promedio fue de $39,7 \pm 13,8$ (RIQ: 32,0-50,6). Sin embargo, en 3/107 niños se observaron valores de IE tan bajos como 1,0 (pacientes #1 y #2) y 4,8 (paciente #3). La Tabla 1 muestra en detalle las características descritas.

Tabla 1. Caracterización de la población estudiada

Características	Población	Pacientes con		
	total n = 107	#1	#2	#3
Masculino:femenino	62:45	m	m	m
Edad en años; mediana (RIQ)	3 (1-7)	1	1	7
IE por el ensayo DHR; media \pm DS	$39,7 \pm 13,8$	1,0	1,0	4,8
<i>Manifestación clínica; n (%)</i>				
Edad de inicio en años; mediana (RIQ)	2 (1-6)	0,3	0,2	3
Neumonía	48 (45)	+	+	+
Infección de piel	19 (18)	+	-	-
Linfadenopatías	14 (13)	-	+	+
Abscesos (cutáneos y/o de órganos)	10 (9)	+	-	+
Fiebre prolongada de origen desconocido	8 (7)	-	+	-
Osteomielitis	4 (4)	-	-	-
Meningitis	2 (2)	-	-	-
Sepsis	2 (2)	+	-	-
<i>Historia familiar</i>				
Hermano/a con infecciones recurrentes	13 (12)	+	-	-
Familiares femeninos (lado materno) con EA	6 (6)	-	+	-
Muerte de varones menores de 2 años de edad	4 (4)	-	+	-
Caso diagnosticado de IDP en la familia	1 (1)	-	-	-
Consanguinidad entre los padres	0 (0)	-	-	-

%: porcentaje; m: masculino; RIQ: rango intercuartílico; IE: índice de estimulación de neutrófilos; DS: desviación estándar; \geq : igual a o mayor que; (+): característica observada; (-): característica no observada; EA: enfermedad autoinmune; IDP: inmunodeficiencia primaria; , EGC: Enfermedad granulomatosa crónica.

Con respecto a los histogramas de DHR obtenidos por citometría de flujo, los correspondientes a ensayos no estimulados mostraron un pico o señal de fluorescencia basal (línea negra sin relleno en los histogramas de la Figura 1). Al estimular con PMA (curvas con relleno gris en los histogramas de la Figura 1), en los neutrófilos de 101/107 pacientes se observó un desplazamiento completo de la señal de fluorescencia (Figura 1A), lo que indica un estallido respiratorio normal de neutrófilos en estos pacientes. Sin embargo, en 2/107 niños, los pacientes #1 y #2 mencionados anteriormente (ambos niños de un año de edad), no se observó ningún desplazamiento de fluorescencia en el histograma (Figura 1B), resultando en ambos casos un IE de 1,0. Estos hallazgos indican ausencia de estallido respiratorio de neutrófilos. En un tercer paciente (paciente #3, niño de 7 años), se observó un leve desplazamiento de la señal de fluorescencia con un IE de 4,8 (Figura 1C), lo que se interpreta como una producción muy baja de estallido respiratorio de neutrófilos en este paciente.

Se solicitó la recolección de nuevas muestras para los pacientes #1, #2 y #3 y la evaluación de estas segundas muestras dieron los mismos resultados de IE utilizando el ensayo DHR. Al mismo tiempo que las muestras de los pacientes de este estudio fueron procesadas, también se procesó la muestra de un sujeto aparentemente sano con el fin de obtener un control normal de estallido respiratorio de neutrófilos. Todas las muestras de controles sanos mostraron un desplazamiento completo de fluorescencia al estimular los neutrófilos con PMA y sus histogramas fueron similares a lo mostrado en la Figura 1A.

Hasta este punto, describimos un estallido respiratorio de neutrófilos normal observado en 101/107 pacientes y controles sanos, así como también la falta o muy baja producción de estallido respiratorio observado en los pacientes #1, #2 y #3. A diferencia de estos resultados, se observó un patrón inusual de DHR en los histogramas de 3/107 niños. Con respecto al desplazamiento y el ancho de base de la señal de fluorescencia, se encontraron desplazamientos de fluorescencia incompletos o más cortos y picos con una base más amplia en estos pacientes, resultando los siguientes valores de IE: 20,3 (Figura 1D), 17,9 (Figura 1E) y 14,6 (Figura 1F). Estos resultados indican una menor producción de estallido respiratorio de neutrófilos comparado con los controles sanos. Como en los casos anteriores, se solicitó la recolección de nuevas muestras de estos pacientes y la de sus madres para corroborar los resultados, las cuales no fueron recolectadas en el curso de este estudio.

Las madres de los pacientes #1, #2 y #3 fueron evaluadas por el ensayo DHR y en el caso del paciente #2, el ensayo también se efectuó en dos tías y en su abuela,

todas parientes por el lado materno. En los ensayos estimulados de 4/6 de las mujeres evaluadas, incluyendo las madres de los pacientes #1 y #2, una tía y la abuela del paciente #2, se observaron dos picos de fluorescencia (patrón bimodal) que correspondieron a una población de neutrófilos no activados (20-30% con un

IE=1,0-1,7) y otra población de neutrófilos (70-80% con un IE=32,9-38,5) que fue activada normalmente (Figura 1G). La otra tía del paciente #2 también presentó un patrón bimodal pero la población de neutrófilos activados fue de 48% con un IE=34,7 (Figura 1H). Un patrón bimodal en el ensayo DHR indica un estado

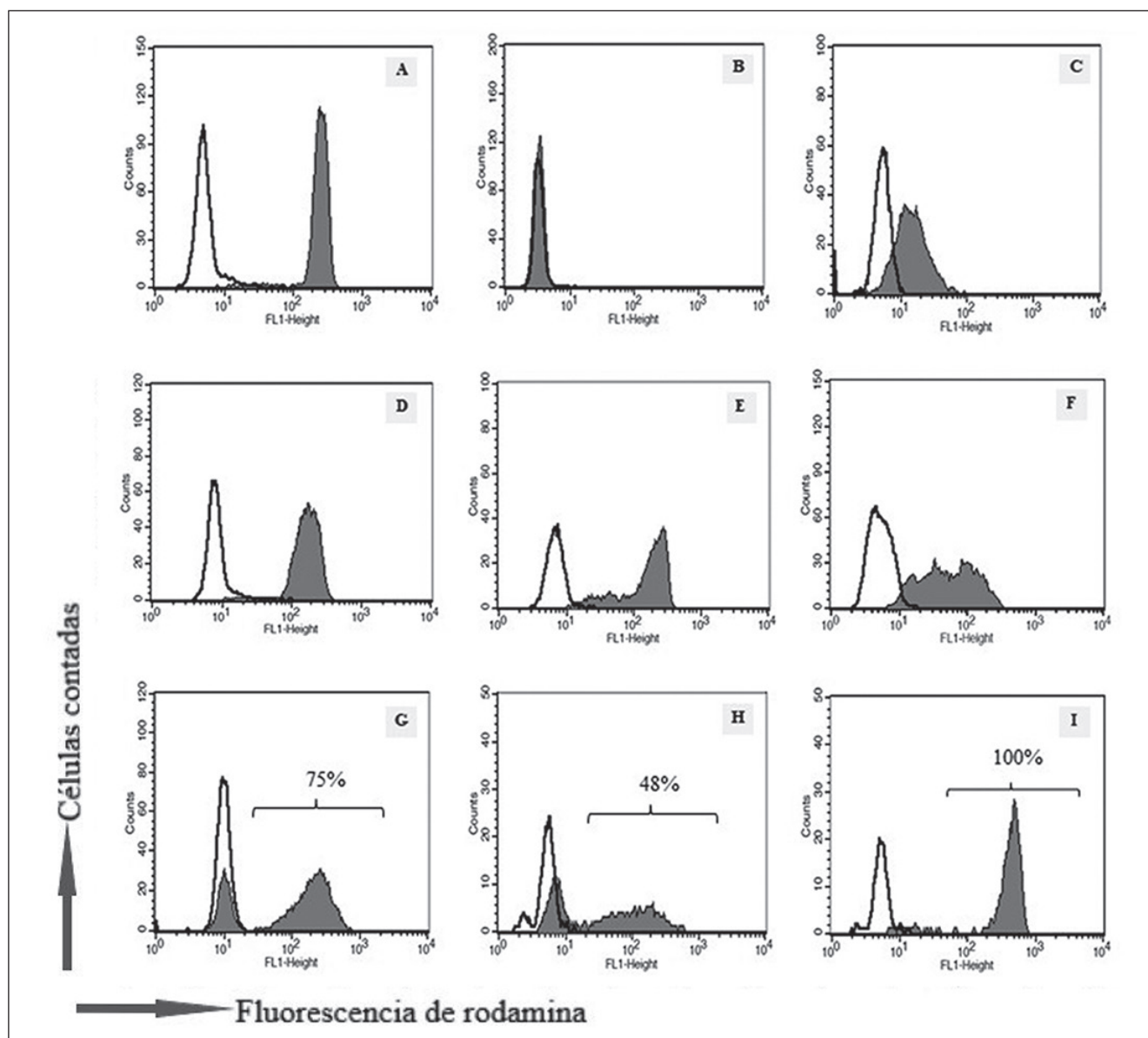


Figura 1. Histogramas de fluorescencia obtenidos en el ensayo DHR por citometría de flujo. A) Desplazamiento completo de fluorescencia por estimulación con PMA observado en 101/107 niños con infecciones recurrentes y controles sanos. B) Señal de fluorescencia no desplazada indicando ausencia de estallido respiratorio de neutrófilos en los pacientes #1 y #2 con EGC LX (IE = 1,0). C) Leve desplazamiento de fluorescencia mostrando un estallido respiratorio de neutrófilos muy disminuido en el paciente #3 con EGC de probable herencia AR (IE = 4,8). D), E) y F) Desplazamientos de fluorescencias menores y picos de bases más anchas en 3/107 pacientes exhibiendo un patrón de DHR inusual, indicando un anormal estallido respiratorio de neutrófilos comparado con los controles sanos (IE = 20,3, 17,9 y 14,6, respectivamente). G) Dos picos de fluorescencia (patrón bimodal) con 75% de neutrófilos activados en 4/6 familiares femeninos de los pacientes #1 y #2, indicando un estado de portadora y patrón de herencia de EGC ligado al X. H) Patrón bimodal con 48% de neutrófilos activados normalmente observado en una de las tías del paciente #2, mostrando también un estado de portadora. I) Ausencia de patrón bimodal y de estado de portadora con un único pico de fluorescencia y 100% de neutrófilos activados en la madre del paciente #3, indicando EGC de probable herencia AR. Ejes y: células contadas; ejes x: fluorescencia de rodamina; Líneas negras sin relleno: señal de fluorescencia basal en los ensayos no estimulados; Curvas con relleno gris: señal de fluorescencia en ensayos estimulados con PMA.

de portadora y el patrón de herencia más probable en estos casos es la EGC ligada al cromosoma X.

En la madre del paciente #3, no se observó un patrón bimodal. El histograma de DHR mostró solo una población de neutrófilos con estimulación normal y un IE=42,3 (Figura 11). Se puede inferir que el patrón más probable sea la EGC AR.

Discusión

La producción de ERO por los fagocitos en el denominado “estallido respiratorio” es un componente esencial de la respuesta inmune innata. Los defectos genéticos en cualquier subunidad proteica del complejo enzimático NADPH oxidasa causan la EGC, que clínicamente se caracteriza por infecciones bacterianas y fúngicas recurrentes e inflamación granulomatosa¹².

En este estudio, las manifestaciones clínicas más frecuentes observadas en la población infantil evaluada fueron neumonía, infecciones cutáneas, linfadenopatías y abscesos. La literatura menciona a la neumonía, la linfadenitis supurativa, los abscesos cutáneos y/o los abscesos en diferentes órganos como manifestaciones clínicas predominantes de EGC^{2,3,13}. Por lo tanto, la sospecha clínica en los pacientes derivados a participar en este estudio concordaba con lo reportado como características clínicas sugerentes de esta patología.

En los pacientes #1, #2 y #3, el diagnóstico de EGC se puede establecer ya que mostraron características que concuerdan con lo reportado para esta patología^{2,3}, como las manifestaciones clínicas, un IE anormal en el ensayo DHR, antecedentes familiares y la temprana edad de inicio de la sintomatología. Por otro lado, en los niños que presentaron características clínicas sugerentes de EGC pero su IE fue normal, se puede descartar el diagnóstico de esta patología. No obstante, sería interesante evaluar en estos pacientes otros componentes del sistema inmune como las subpoblaciones linfocitarias, concentraciones de inmunoglobulinas y proteínas del sistema del complemento con el fin de descartar otras inmunodeficiencias primarias diferentes de la que se analizó en este estudio, especialmente si la sintomatología persiste.

En esta experiencia, la función oxidativa de los neutrófilos se midió a través del ensayo DHR y observamos que el IE promedio en niños con sospecha clínica de EGC pero con función normal de los neutrófilos, presentó buena concordancia con los datos reportados para niños sanos^{11,14}. Estos hallazgos muestran lo que otros autores han propuesto previamente¹⁵⁻¹⁷, la eficacia del ensayo DHR para diferenciar con mucha precisión un caso de EGC de otros no afectados por esta patología, incluso si las manifestaciones clínicas eran compatibles con las presentadas en la EGC.

Generalmente, el diagnóstico de EGC se realiza a

través del ensayo del NBT. Sin embargo, este ensayo presenta desventajas como la subjetividad y actualmente se utiliza más la evaluación de la conversión de dihidrorodamina a rodamina por citometría de flujo. El ensayo DHR proporciona información sobre los patrones de herencia más probables de la EGC, ya que en la mayoría de los casos de EGC ligada al cromosoma X no se observan cambios en la DHR cuando se estimulan los neutrófilos, mientras que en los casos autosómicos recesivos (EGC AR) se observa un ligero desplazamiento de la DHR y un histograma de base amplia^{4,5}. Los pacientes #1 y #2 de este estudio presentaron un histograma sin desplazamiento en el ensayo estimulado y un IE de 1,0, lo que indica EGC ligada al cromosoma X^{4,15,18}. El histograma del paciente #3 mostró un leve desplazamiento de la fluorescencia y un IE de 4,8 lo que es compatible con EGC AR⁴. Vowells et al.^{16,17} encontraron en pacientes con EGC gp91phox y p47phox valores promedio del IE de 1,3 y 13,2 respectivamente. Los valores de IE en los pacientes #1, #2 y #3 de nuestro estudio fueron muy similares a los de estos reportes.

La detección de portadoras utilizando el ensayo DHR indica que el patrón de herencia de EGC podría estar ligado al cromosoma X¹⁵. En relación a la evaluación de parientes mujeres de niños con EGC, observamos que 5/6 de estas mujeres, familiares de los pacientes #1 y #2, mostraron un patrón bimodal en el ensayo DHR, lo que indica un estado de portadora y el patrón de herencia más probable en esta familia es la EGC LX. Este hallazgo coincide con los patrones de DHR observados en estos niños. Este es el patrón de herencia más frecuente en el mundo^{19,20}, es así que diferentes estudios de otros países reportan que aproximadamente 2/3 de los pacientes presentan la forma de EGC ligada al cromosoma X²¹. Sin embargo, en partes del mundo con altas tasas de consanguinidad, la EGC AR es reportada como la forma de EGC más común^{22,23}. Opuesto a lo observado en las parientes de los pacientes #1 y #2, en la madre del paciente #3 se encontró solo una población celular con activación normal. Si la madre no presenta un patrón bimodal, existe más de una posibilidad con respecto al patrón de herencia de EGC en la familia. Una posible explicación es una mutación *de novo* en el gen *CYBB* del paciente, es decir, la mutación se encuentra en el cromosoma X pero no fue heredada de la madre. Otra posibilidad, que podría ser lo más probable, es la existencia de un patrón de herencia autosómico recesivo en la familia²⁴. De hecho, en el paciente #3, el patrón de DHR observado es compatible con EGC AR. Por otra parte, solo una portadora mostró menos de 50% de neutrófilos activados. Es importante conocer este porcentaje de activación ya que las mujeres con menos del 20% de neutrófilos activados normalmente presentan mayor riesgo de padecer infecciones graves²⁵.

También decidimos discutir el caso de los tres niños en los que encontramos un patrón diferente de DHR, específicamente un desplazamiento de fluorescencia menor y un pico con una base más amplia. En estos casos, se debe considerar que está descrita una EGC ligada al cromosoma X atípica, en la cual el patrón de DHR se superpone o incluso presenta un IE mayor al observado en la EGC AR p47phox^{4,26}. Además, la deficiencia completa de mieloperoxidasa²⁷, así como una muestra de sangre que no se conserva y transporta en condiciones óptimas²⁶, podría dar lugar a histogramas con desplazamientos de fluorescencia incompletos. Aún no están disponibles en Paraguay ensayos moleculares que podrían permitir la definición de casos atípicos de EGC LX. Por lo tanto, para tener una interpretación más precisa de los resultados de estos tres pacientes, solicitamos la recolección de nuevas muestras de los niños y sus madres, pero a la fecha no lo hemos conseguido.

Consideramos importante mencionar que estos tres niños (pacientes #1, #2 y #3) fueron derivados a médicos especialistas en IDP para iniciar tratamiento preventivo. Es importante destacar que, una vez que todos los datos de los pacientes han sido evaluados, tanto las características clínicas como los resultados de la función de los neutrófilos medidos con el ensayo DHR, así como también los antecedentes familiares e incluso la presencia de portadoras en la familia, y que estos sean consistentes para establecer el diagnóstico de EGC, el paso siguiente es el inicio inmediato de la terapia oral profiláctica con antibióticos y antifúngicos, considerada actualmente el tratamiento convencional de pacientes afectados por esta patología. En algunos países, se añade el tratamiento con interferón-gamma (IFN- γ), aunque la eficacia de este tratamiento aún no está clara. Hoy en día, el trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas es el único tratamiento curativo y la terapia génica ha sido probada en diferentes centros²⁸. Sin embargo, estos tratamientos aún no están disponibles en Paraguay por lo que recurrimos al uso combinado de trimetoprim-sulfametoxazol e itraconazol, con el fin de reducir la frecuencia y gravedad de las infecciones, lo que mejora significativamente la calidad de vida de los pacientes afectados.

Pretendemos aunar esfuerzos para hacer posible el acceso al trasplante de células madre hematopoyéticas en Paraguay, con el fin de ofrecer la oportunidad de un tratamiento curativo a los pacientes con EGC, especialmente a aquellos con patrón de herencia ligado al cromosoma X que presentan un pronóstico más adverso.

Finalmente, debido a que el pronóstico de la enfermedad depende del patrón de herencia, recalamos la importancia de evaluar a familiares femeninos del lado materno de los niños con EGC con el propósito de detectar el estado de portadora y, por ende, determinar si

se trata de una EGC ligada al cromosoma X o de tipo autosómico recesivo. Se debería ofrecer consejo genético a las portadoras e informales sobre el riesgo que presentan de desarrollar enfermedades autoinmunes. La posibilidad de identificar el patrón de herencia más probable a través de un test que es rápido, sensible y de bajo costo como lo es el ensayo DHR tiene un gran valor en países como Paraguay, donde las técnicas moleculares para confirmar el genotipo de EGC aún no están disponibles. Dada esta situación, destacamos la necesidad de trabajar en la implementación de la técnica molecular para el estudio genético de pacientes con EGC en el futuro, ya que este método es el de referencia (*gold standard*) para el diagnóstico y detección del patrón de herencia en la familia. No obstante, la evaluación clínica objetiva del paciente y la aplicación del ensayo DHR nos permite establecer con muy buena precisión el diagnóstico fenotípico de esta enfermedad, lo cual es crucial que se realice de forma precoz para el enfoque terapéutico inmediato del paciente.

Conclusiones

En conclusión, detectamos tres casos de EGC en una población infantil con infecciones recurrentes y se identificaron cinco portadoras a través del ensayo DHR, siendo la primera vez que se utiliza esta técnica en Paraguay. En este estudio también se obtuvo información sobre el patrón de herencia más probable, dos casos de posible EGC ligada al cromosoma X y un caso probable de EGC AR. Según los registros de diagnósticos, estos tres casos detectados en un periodo de tres años podrían indicar una mejora en el diagnóstico de la EGC en Paraguay.

Responsabilidades Éticas

Protección de personas y animales: Los autores declaran que los procedimientos seguidos se conformaron a las normas éticas del comité de experimentación humana responsable y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki.

Confidencialidad de los datos: Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado: Los autores han obtenido el consentimiento informado de los pacientes y/o sujetos referidos en el artículo. Este documento obra en poder del autor de correspondencia.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Referencias

1. Winkelstein JA, Marino MC, Johnston RB Jr, Boyle J, Curnutte J, Gallin JI, et al. Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. *Medicine (Baltimore)*. 2000;79:155-69.
2. Martire B, Rondelli R, Soresina A, et al. Clinical features, longterm follow-up and outcome of a large cohort of patients with chronic granulomatous disease: an Italian multicenter study. *Clin Immunol Orlando Fla*. 2008;126:155-64.
3. Van den Berg JM, van Koppen E, Ahlin A, et al. Chronic granulomatous disease: the European experience. *PLoS ONE*. 2009;4:e5234.
4. Jirapongsananuruk O, Malech HL, Kuhns DB, Niemela JE, Brown MR, Anderson-Cohen M, et al. Diagnostic paradigm for evaluation of male patients with chronic granulomatous disease, based on the dihydrorhodamine 123 assay. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111:374-9.
5. Elbim C, Lizard G. Flow cytometric investigation of neutrophil oxidative burst and apoptosis in physiological and pathological situations. *Cytometry A*. 2009;75:475-81.
6. Cale CM, Morton ML, Goldblatt D. Cutaneous and other lupus-like symptoms in carriers of X-linked chronic granulomatous disease: incidence and autoimmune serology. *Clin Exp Immunol*. 2007;148(1):79-84.
7. Battersby AC, Cale AM, Goldblatt D, Gennery AR. Clinical manifestations of disease in X-linked carriers of chronic granulomatous disease. *J Clin Immunol*. 2013;33:1276-84.
8. Hauck F, Koletzko S, Walz C, et al. Diagnostic and treatment options for severe IBD in Female X-CGD carriers with non-random X-inactivation. *J Crohns Colitis*. 2016;10(1):112-5.
9. Arbo A, Martínez de Cuellar C, Morán M, Moreno-Azorero R. Enfermedad Granulomatosa Crónica. A propósito del primer caso diagnosticado en el Paraguay. *Pediatr. (Asunción)*. 1992;19(2):6-10.
10. Características clínicas y manifestaciones infecciosas en pacientes con Enfermedad Granulomatosa Crónica (EGC) en Paraguay. Celia Martínez de Cuellar, Dolores Lovera, Sara Amarilla, Luis Gatti, Silvio Apodaca, Diana Sanabria, Antonio Arbo. *Pediatr. (Asunción)*. 2018;45(2):127-34.
11. Acosta C, Cassinerio A, Pereira MI, Mosca L. Determinación de valores de referencia para la técnica de oxidación de la dihidrorodamina 123 por citometría de flujo. *Alerg Immunol Clin*. 2008;26(2-3):70-5.
12. Segal BH, Leto TL, Gallin JI, Malech HL, Holland SM. Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. *Medicine*. 2000; 79(3):170-200.
13. Marciano BE, Spalding C, Fitzgerald A, et al. Common severe infections in chronic granulomatous disease. *Clin Infect Dis*. 2015;60(8):1176-83.
14. Sanabria D, Giménez V, Carpinelli MM, Rolón J. Primera experiencia en Paraguay para determinación de valores de referencia por la técnica de dihidrorodamina (DHR) en la evaluación del estallido respiratorio de neutrófilos en niños sanos. *Pediatr. (Asunción)*. 2016;43(1):33-8.
15. Crockard AD, Thompson JM, Boyd NAM, Haughton DJ, McCluskey DR, Turner CP. Diagnosis and carrier detection of chronic granulomatous disease in five families by flow cytometry. *Int Arch Allergy Immunol*. 1997;114:144-52.
16. Vowells SJ, Sekhsaria S, Malech HL, Shalit M, Fleisher TA. Flow cytometric analysis of the granulocyte respiratory burst: a comparison study of fluorescent probes. *J Immunol Methods*. 1995;178:89-97.
17. Vowells SJ, Fleisher TA, Sekhsaria S, Alling DW, Maguire TE, Malech HL. Genotype-dependent variability in flow cytometric evaluation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase function in patients with chronic granulomatous disease. *J Pediatr*. 1996;128:104-7.
18. Tajik S, Badalzadeh M, Reza Fazlollahi M, Houshmand M, Zandieh F, Khandan S, Pourpak Z. A Novel CYBB Mutation in Chronic Granulomatous Disease in Iran. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2016;15(5): 426-9.
19. Bortoletto P, Lyman K, Camacho A, Fricchione M, Khanolkar A, Katz BZ. Chronic granulomatous disease: a large, single-center US experience. *Pediatr Infect Dis J*. 2015;34:1110-4.
20. Berrón-Ruiz L, Morín-Contreras A, Cano-García V, et al. Detection of inheritance pattern in thirty-three Mexican males with chronic granulomatous disease through 123 dihydrorhodamine assay. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2014;42(6):580-5.
21. De Oliveira-Junior E, Bengala Zurro N, Prando C, MD, Cabral-Marques O, Soeiro Pereira P, Lena-Friederick Schimke, Stefanie Klaver, et al. Clinical and Genotypic Spectrum of Chronic Granulomatous Disease in 71 Latin American Patients: First Report From the LASID Registry. *Pediatr Blood Cancer*. 2015;62:2101-7.
22. Köker MY, Camcioğlu Y, van Leeuwen K, et al. Clinical, functional, and genetic characterization of chronic granulomatous disease in 89 Turkish patients. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132:1156-63.e5.
23. Rawat A, Singh S, Suri D, et al. Chronic granulomatous disease: two decades of experience from a tertiary care Centre in North West India. *J Clin Immunol*. 2014;34:58-67.
24. Anderson-Cohen M, Holland SM, Kuhns DB, Fleisher TA, Ding L, Brenner S, et al. Severe phenotype of chronic granulomatous disease presenting in a female with a de novo mutation in gp91-phox and a non familial, extremely skewed X chromosome inactivation. *Clin Immunol*. 2003;109:308-17.
25. Marciano BE, Zerbe CS, Falcone EL, et al. X-linked carriers of chronic granulomatous disease: Illness, lyonization and stability. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141(1):365-71.
26. Abraham R, Aubert G. Flow Cytometry, a Versatile Tool for Diagnosis and Monitoring of Primary Immunodeficiencies. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2016;23(4):254-71.
27. Milligan KL, Mann D, Rump A, Anderson VL, Hsu AP, Kuhns DB, Zerbe CS, Holland SM. Complete Myeloperoxidase Deficiency: Beware the "False-Positive" Dihydrorhodamine Oxidation. *J Pediatr*. 2016;176:204-6.
28. Arnold DE, Heimall JR. A Review of Chronic Granulomatous Disease. *Adv Ther*. 2017; 34:2543-57.