

1,2,3 dihidrorodamina, una técnica accesible y útil para la detección de pacientes y portadoras de enfermedad granulomatosa crónica. Experiencia en el Instituto Nacional de Pediatría

Lizbeth Blancas-Galicia,* Sara E Espinosa-Padilla,*
Francisco J Espinosa-Rosales*

RESUMEN

La enfermedad granulomatosa crónica cursa con un defecto en la fagocitosis; el defecto está en la falta de producción de radicales libres esenciales para la destrucción de los microorganismos. Existen dos tipos de enfermedad granulomatosa crónica de acuerdo al patrón de herencia, éstos son: recesivo ligado al X y autosómico recesivo. El primero es el más frecuente y grave. Existen diferentes técnicas para el tamizaje de la enfermedad: todas tienen como fundamento medir la producción de radicales libres de oxígeno en neutrófilos. La reducción de nitroazul de tetrazolio y la técnica de 1,2,3 dihidrorodamina son las más usadas. La última tiene la ventaja de que además de servir como prueba de tamizaje es útil para la detección del tipo de patrón de herencia y el quimerismo postrasplante. En este escrito describimos la experiencia del uso de la dihidrorodamina en los pacientes con la enfermedad granulomatosa en el Instituto Nacional de Pediatría en México.

Palabras clave: Enfermedad granulomatosa crónica, 1,2,3 dihidrorodamina y nitroazul de tetrazolio, portadoras de enfermedad granulomatosa crónica.

ABSTRACT

Chronic granulomatous disease is a genetic defect in phagocytosis. There is an absence of reactive oxygen species which are essential for the destruction of microorganisms. There are two types of chronic granulomatous disease according to the inheritance pattern, the X-linked recessive and autosomal recessive; the former is the most frequent and severe. There are different techniques for screening the disease. They are based in measuring the production of reactive oxygen species in neutrophils. The reduction of nitroblue tetrazolium and dihydrorhodamine 1,2,3 technique are widely used. The latter has the advantage that in addition to be useful as a screening test, it is also useful for detecting the pattern of inheritance and post-transplant chimerism. In this paper we describe the experience of using the dihydrorhodamine in chronic granulomatous disease in Mexico.

Key words: Chronic granulomatous disease, dihydrorhodamine 1,2,3 NBT reduction, carriers of chronic granulomatous disease.

* Unidad de Investigación en Inmunodeficiencias. Instituto Nacional de Pediatría.

INTRODUCCIÓN

Los pacientes con enfermedad granulomatosa crónica (EGC) padecen infecciones bacterianas y fúngicas recurrentes. Dos tercios de los casos presentan como primeras manifestaciones, infecciones, obstrucción o sangrado gastrointestinal y falla de medro.¹

La neumonía es la infección más común en todas las edades; los agentes infecciosos más frecuentes son: *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus* sp., *Burkholderia cepacia*, entre otras bacterias entéricas Gram negativas. Otras infecciones que afectan a los pacientes son los abscesos cutáneos, la linfadenitis, los abscesos hepáticos, la osteomielitis y los abscesos perirrectales. En los países en donde se aplica la vacuna de BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) y en donde la tuberculosis es endémica, se reportan infecciones locales o sistémicas por el bacilo de Calmette-Guérin y tuberculosis.^{1,2}

Existen dos patrones de herencia, los cuales son: el recesivo ligado al X (LX) y el autosómico recesivo. La mayoría de los casos se dan en los varones (80%), debido a que el patrón de herencia que predomina es el ligado al X.³

Los pacientes con enfermedad granulomatosa crónica generalmente inician con los síntomas antes de los dos años; sin embargo, aquellos casos con herencia autosómica recesiva pueden debutar en etapas más tardías de la vida.¹

El tratamiento se basa en la erradicación de las infecciones; el drenaje quirúrgico es necesario para la cicatrización de los abscesos de diferentes sitios anatómicos. El tratamiento profiláctico con interferón gamma recombinante, trimetoprim-sulfametoxazol e itraconazol disminuye el riesgo de infecciones y mejora la supervivencia. El único tratamiento curativo es el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.⁴

En la enfermedad granulomatosa crónica (EGC) existe una incapacidad de las células fagocíticas del paciente para matar una amplia gama de patógenos. El defecto radica en la incapacidad de los fagocitos para producir radicales libres de oxígeno (RLO). Los RLO son producidos por la enzima NADPHoxidasa compuesta por cinco subunidades; éstas son: gp1^{phox}, p22^{phox}, p40^{phox}, p47^{phox} y p67^{phox}.⁵

Los radicales libres de oxígeno son el superóxido y el peróxido de oxígeno, pues ambos participan en la destrucción de los microorganismos. El último es catalizado a ácido hipocloroso por la mieloperoxidasa.¹

TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD GRANULOMATOSA CRÓNICA

El diagnóstico de la enfermedad granulomatosa crónica (EGC) se realiza a través de varias técnicas de laboratorio que tienen como fundamento evaluar la función de la NADPHoxidasa a través de la medición de la producción de superóxido y de peróxido de hidrógeno.

Las técnicas que miden el superóxido son: la reducción de ferrocitocromo C, el nitroazul de tetrazolio, el isoluminol y el lucinogenino. El peróxido de oxígeno se cuantifica con 1,2,3 dihidrorodamina (DHR), 10-acetil-3, 7-dihidroxifenoxazina (resorufina) y el 5-amino-2, 3-dihidro-1, 4-talazinadiona (luminol).^{1,6}

TÉCNICA DE NITROAZUL DE TETRAZOLIO

En el ensayo *in vitro* en sangre total el O₂ reacciona con nitroazul de tetrazolio y forma tetrazolio; esta reacción es evidenciada por un cambio de coloración de azul a amarillo, de forma que la ausencia de producción de O₂ por la NADPHoxidasa en la enfermedad granulomatosa crónica (EGC) se manifiesta por la ausencia de cambio en la coloración. Dado que el cambio de coloración es detectado por un observador a través de un microscopio, esta técnica está sujeta a un factor subjetivo, lo cual disminuye tanto su sensibilidad como su especificidad.⁷

TÉCNICA DE 1,2,3 DIHIDRORODAMINA

Las pruebas fluorescentes se realizan por citometría de flujo y miden la actividad funcional de miles de neutrófilos en un punto determinado en el tiempo. Los neutrófilos *in vitro* se ponen en contacto con PMA y se agrega un compuesto no fluorescente que, al interactuar con los radicales libres de oxígeno, se transforma en un compuesto fluorescente cuya emisión es medida a través de un citómetro. Esto último implica que ésta sea una técnica objetiva y más sensible. Los fluorocromos utilizados son la 2'7' diclorofluoresceína (DCF), hidroetidina, 4 carboxidihidotetrametilrosamina y la 1,2,3 dihidrorodamina. La técnica 1,2,3 DHR es un cromógeno permeable a la membrana celular que ingresa a la célula en donde es oxidado por el H₂O₂, el cual es producido durante el estadillo respiratorio para formar así 1,2,3 rodamina (molécula fluorescente). Se ha comparado la sensibilidad entre diferentes fluorocromos (DHR, DCF e hidroetidina) para la detección de radicales libres de oxígeno en individuos sanos; finalmente, se concluyó que la técnica 1,2,3 DHR es el fluorocromo más sensible, además de ser el más utilizado para el diagnóstico de EGC.^{8,9}

TÉCNICA DE DHR COMO PRUEBA DE TAMIZAJE EN CASOS SOSPECHOSOS DE EGC

Nuestra experiencia con el diagnóstico de la enfermedad granulomatosa crónica (EGC) a través de la reducción de nitroazul de tetrazolio (NBT) es la siguiente: hemos observado a un paciente con cuadro clínico sugestivo de EGC con un resultado normal de NBT; sin embargo, debido a la persistencia de un cuadro clínico de EGC se realizó la técnica 1,2,3 dihidrorodamina (DHR) con la que confirmamos EGC (Figura 1). Además, tanto la DHR de

la madre, como la de la abuela tenían un patrón bimodal característico de la forma LX. Otro caso nos fue referido con diagnóstico de EGC por NBT y su cuadro clínico fue de infecciones recurrentes severas que mejoraron con la edad. El propósito inicial fue detectar el estado de portadoras en los familiares femeninos; sin embargo, cuando por protocolo realizamos primero la DHR en el paciente observamos que el estudio fue normal en dos ocasiones: ninguna de las mujeres que se estudiaron fue portadora. Lo anterior confirma lo ya descrito previamente en la literatura, una menor sensibilidad y especificidad de la técnica NBT cualitativa en comparación con la técnica DHR, dado que la DHR requiere un citómetro de flujo y la NBT sólo un microscopio. Esta última es, por tanto, la prueba más accesible para realizarse en los hospitales de atención primaria para tamizaje de EGC.^{8,10}

PATRÓN DE HERENCIA DETECTADO A TRAVÉS DE DHR

Otra de las aplicaciones de la técnica 1,2,3 dihidrorodamina (DHR) en la enfermedad granulomatosa crónica (EGC) es la diferenciación entre la formas recesiva ligada al X o autosómica recesiva. En las formas ligadas al X los varones son los afectados y las mujeres las portadoras. En las formas autosómicas recesivas, las mujeres y los hombres pueden ser afectados y ambos padres son portadores obligados. En las portadoras de EGC-LX, debido al fenómeno de ionización existen dos poblaciones

de neutrófilos, unos con producción de radicales libres y otros sin producción de los mismos.⁹ A través de la DHR podemos observar en el histograma ambas poblaciones y, en el mismo, se observa como patrón bimodal (Figura 2). Si tenemos un varón con EGC por DHR y su madre tiene un patrón bimodal, podemos asegurar que se trata de una EGC LX. Si tenemos un varón con EGC por DHR y su madre no tiene un patrón bimodal, no podemos determinar el patrón de herencia, ya que puede tratarse de EGC-LX *de novo* o una EGC autosómica recesiva. Hemos estudiado a los familiares femeninos de 33 varones con EGC, en 26 familias (78%), detectamos al menos una portadora, con lo cual pudimos concluir que en esas 26 familias, los varones tienen EGC-LX (investigación en proceso de publicación).

Podemos también detectar de forma retrospectiva el tipo de patrón de herencia en las familias que tuvieron algún varón que falleció por EGC a través de la detección de las portadoras y así ofrecer asesoramiento genético.¹¹

Por su parte, una vez que detectamos a una madre portadora es importante invitar al resto de familiares femeninos para detectar otros posibles casos.

ASESORAMIENTO GENÉTICO Y SEGUIMIENTO DE LAS PORTADORAS

Una vez que se detectan las portadoras es importante ofrecerles asesoramiento genético e informarles del mayor riesgo de padecer lupus discoide, además de que

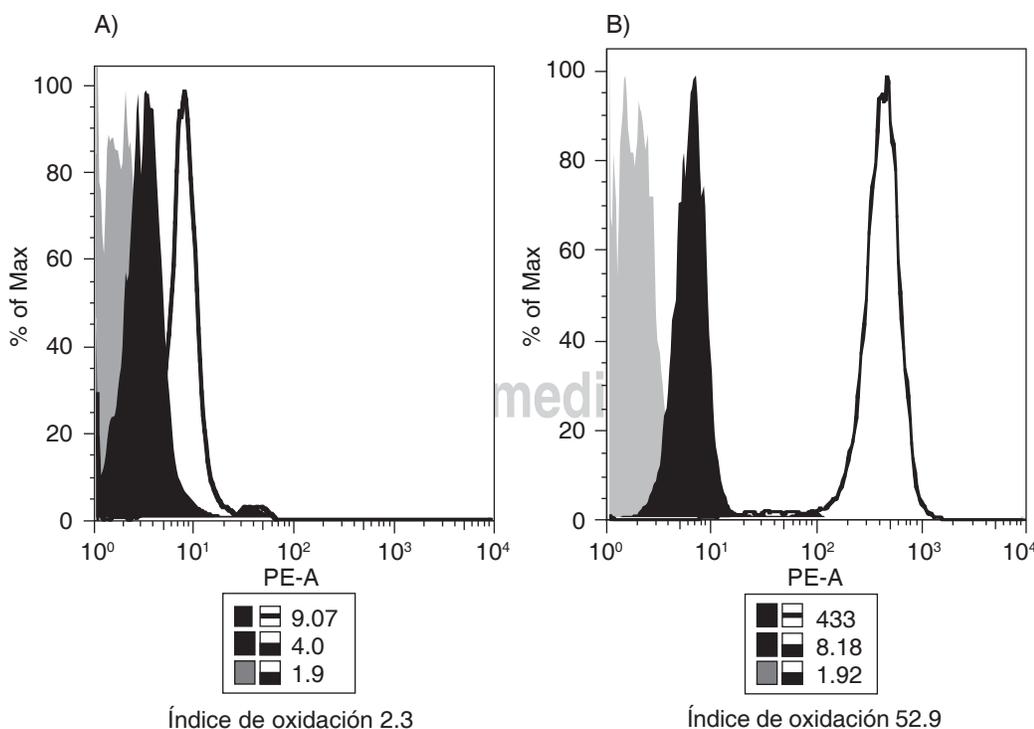
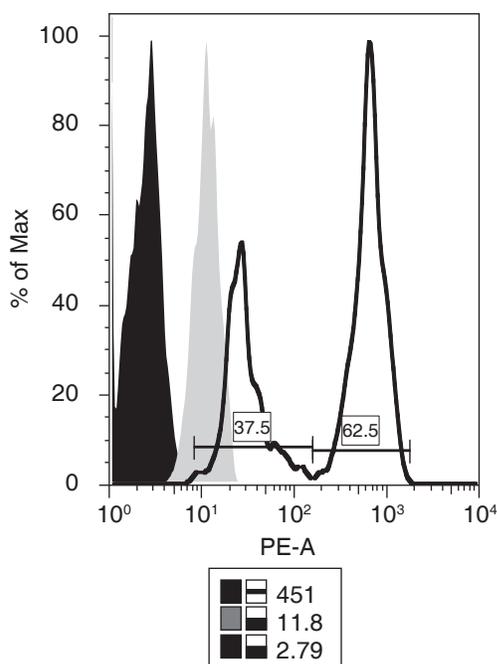


Figura 1.

Histograma de paciente. A) paciente con la enfermedad granulomatosa crónica (EGC): observamos ausencia del incremento de fluorescencia, tan sólo un índice de oxidación de 2.3, cuando lo normal es de 30.

En el histograma del testigo B) podemos observar el incremento de la fluorescencia mayor de 30.



Índice de oxidación de pico 1 de 2.8
Índice de oxidación de pico 2 de 38.2

Figura 2. Observamos el típico patrón bimodal de una portadora. El primer pico con un índice de oxidación bajo (2.8) en el 37.5% de los neutrófilos analizados y el segundo pico con un índice de oxidación normal (38.2) en el 62.5% de los neutrófilos.

se puede revertir la población sana de neutrófilos, de forma que ellas pueden presentar infecciones recurrentes y severas. En caso de que se presente esta situación es importante realizar nuevamente la técnica 1,2,3 dihidrorodamina (DHR) para observar el porcentaje de neutrófilos productores y no productores de H_2O_2 . Nosotros hemos encontrado que en una familia con EGC-LX, el hijo varón tiene EGC, la hermana menor es portadora y la madre tiene EGC por inactivación aleatoria del X, lo que favoreció a la población enferma, de forma que tiene una mínima población de neutrófilos productores de radicales libres e infecciones recurrentes desde los 15 años. Este último punto nos muestra la importancia de realizar, en todo caso sospechoso de EGC, la DHR, tanto en el caso clínico como en el estudio de la madre.¹²

SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD GRANULOMATOSA CRÓNICA A TRAVÉS DE DHR

En los centros hospitalarios en donde se tiene acceso a estudios moleculares para la detección del gen afectado, la técnica 1,2,3 dihidrorodamina (DHR) puede ser útil para detectar la EGC-LX; ésta tiene una mayor mortalidad asociada con infecciones severas como *As-*

pergillus sp. Por esta razón es importante, una vez detectados, considerar el trasplante temprano de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH).

Evaluación de quimerismo en los pacientes que reciben trasplante de células progenitoras hematopoyéticas a través de DHR

En los pacientes que han recibido un TCPH podemos evaluar el quimerismo a través de DHR; esta técnica nos muestra el porcentaje de neutrófilos funcionales en cuanto a la producción de radicales libres.¹³

CONCLUSIÓN

La técnica de 1,2,3 dihidrorodamina en la enfermedad granulomatosa crónica tiene diferentes utilidades. En el marco de tamizaje es una técnica más sensible y específica de la prueba de reducción de nitroazul de tetrazolio, además puede utilizarse para determinar el patrón de herencia en el 78% de los varones, así como determinar las portadoras de EGC-LX y el quimerismo en pacientes que han recibido TCPH. En México, la Unidad de Investigación en Inmunodeficiencias es el primer centro que utiliza la técnica de DHR en los pacientes y portadoras de EGC.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por CONACYT con clave de proyecto SALUD-201201180910 y por la Fundación Mexicana para Niñas y Niños con Inmunodeficiencias A.C. Lizbeth Blancas Galicia pertenece al Sistema Nacional de Investigadores.

BIBLIOGRAFÍA

1. Roos D, de Boer M. Molecular diagnosis of chronic granulomatous disease. *Clin Exp Immunol.* 2013; doi: 10.1111/cei.12202.
2. Bustamante J et al. BCG-osis and tuberculosis in a child with chronic granulomatous disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2007; 120(1): 32-38.
3. Seger RA. Chronic granulomatous disease: recent advances in pathophysiology and treatment. *Neth J Med.* 2010; 68(11): 334-340.
4. van den Berg JM et al. Chronic granulomatous disease: the European experience. *PLoS One.* 2009; 4(4): e5234.
5. Dinauer MC. Chronic granulomatous disease and other disorders of phagocyte function. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2005; 89-95.
6. Roesler J et al. Diagnosis of chronic granulomatous disease and of its mode of inheritance by dihydrorhodamine 123 and flow microcytofluorometry. *Eur J Pediatr.* 1991; 150(3): 161-165.
7. Baehner RL, Boxer LA, Davis J. The biochemical basis of nitroblue tetrazolium reduction in normal human and chronic granulomatous disease polymorphonuclear leukocytes. *Blood.* 1976; 48(2): 309-313.
8. Mauch L et al. Chronic granulomatous disease (CGD) and complete myeloperoxidase deficiency both yield strongly reduced dihydrorhodamine 123 test signals but can be easily

- discerned in routine testing for CGD. *Clin Chem.* 2007; 53(5): 890-896.
9. Emmendorffer A et al. Evaluation of flow cytometric methods for diagnosis of chronic granulomatous disease variants under routine laboratory conditions. *Cytometry.* 1994; 18(3): 147-55.
 10. Yu G et al. Focus on FOCIS: the continuing diagnostic challenge of autosomal recessive chronic granulomatous disease. *Clin Immunol.* 2008; 128(2): 117-126.
 11. Lakshman R et al. Post mortem diagnosis of chronic granulomatous disease: how worth while is it? *J Clin Pathol.* 2005; 58(12): 1339-1341.
 12. Battersby AC et al. Clinical manifestations of disease in x-linked carriers of chronic granulomatous disease. *J Clin Immunol.* 2013.
 13. Kim HY et al. Rapid determination of chimerism status using dihydrorhodamine assay in a patient with X-linked chronic granulomatous disease following hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Lab Med.* 2013; 33(4): 288-292.

Dirección para correspondencia:
Lizbeth Blancas Galicia
Torre de Investigación, piso 9,
Av. Imán Núm. 1,
Col. Insurgentes-Cuicuilco, 12100,
Delegación Coyoacán, México, D.F.
E-mail: blancas.lizbeth@gmail.com