

Capacitación en Hospitales de México para el diagnóstico de enfermedad granulomatosa crónica por la técnica de 1-2-3 dihidrorodamina

Sara Espinosa Padilla,* Mara Noemí Guzmán Martínez,* Edna Venegas Montoya,* Nancy Jiménez Polvo,* Edgar Alejandro Medina Torres,* Nora Hilda Segura Méndez,† Ricardo Romero Valdiviezo,‡ Tamara Satines Boone,§ María Guadalupe Santiago Mauricio,§ Adriana Alcántara Salinas,|| Caritina Sánchez Peña,¶ Beatriz Llamas Guillen,** Carlos Mojica Cardoso,** Federico Saracho Weber,‡‡ Liliana Margarita González Duque,§§ José Martín Terrazas Luna,§§ Eloísa Beatriz Ochoa Portillo,§§ Enrique Guevara Macías,‡‡ Georgina Hernández Flores,|||| Alejandro Bravo Cuellar,|||| Pablo César Ortiz Lazareno,|||| Carlos Torres Lozano,¶¶ Ileana Madrigal Beas,¶¶ Miguel Téllez Coss,|||| Fabiola Martín Amaya,|||| Ana Rocío Moran Mendoza,¶¶ Deyanira López Lara,*** Enrique López Valentín,*** Antonio Sandoval Cabrera,*** Mariana Nava Elizondo,*** Francisco Espinosa Rosales,* Lizbeth Blancas Galicia*

RESUMEN

La enfermedad granulomatosa crónica (EGC) es una inmunodeficiencia primaria (IDP) en la cual existe una incapacidad de los fagocitos para producir radicales libres. Hay diversas técnicas de tamizaje, una de las más sensibles y específicas, ya descrita en la literatura, es la técnica 1-2-3 dihidrorodamina (DHR). Previo a nuestro estudio y hasta donde es de nuestro conocimiento, esta última técnica no se realizaba como prueba de tamizaje para EGC en México. El objetivo de este trabajo fue implementar la DHR para el diagnóstico de EGC en diferentes hospitales de México. Se invitó a profesionales de la salud de diferentes centros hospitalarios pediátricos, que diagnostican y tratan inmunodeficiencias primarias en México a participar en la capacitación de la DHR, considerando que contaran con la infraestructura adecuada. Se capacitaron 28 profesionales de ocho hospitales. Actualmente todos los centros están procesando muestras con la DHR en posibles casos de EGC. Tres de los ocho centros ya

* Instituto Nacional de Pediatría.

† Unidad Médica de Alta Especialidad Centro Médico Nacional Siglo XXI.

§ Unidad Médica de Alta Especialidad 25 Monterrey, Nuevo León.

|| Hospital Militar de Especialidades de la Mujer y Neonatología.

¶ Hospital Central Militar.

** Hospital del Niño y el Adolescente del Niño Morelense.

‡‡ Hospital Infantil de Especialidades del Estado de Chihuahua.

§§ Centro Estatal de Trasfusión Sanguínea de Chihuahua.

|||| Centro de Investigación Biomédica de Occidente.

¶¶ Centro Médico de Occidente Hospital de Especialidades.

*** Hospital para el Niño de Toluca.

tienen casos positivos de pacientes y portadoras de EGC. Existen IDP que no son detectadas aun con la sospecha clínica, debido a que no hay acceso a pruebas diagnósticas, a pesar de que en un hospital se cuente con el equipo y el personal competente. Nuestro modelo de trabajo es un ejemplo de cómo se pueden mejorar el diagnóstico y tratamiento de las IDP al capacitar al personal con nuevas pruebas.

Palabras clave: Enfermedad granulomatosa crónica, dihidrorodamina, inmunodeficiencias primarias, prueba de tamizaje, nitroazul de tetrazolio.

ABSTRACT

Chronic granulomatous disease (CGD) is a primary immunodeficiency (PID) in which there is an inability of phagocytes to produce free radicals. There are several screening techniques, one of the most sensitive and specific, already described in the literature is the 1,2-dihydrorhodamine (DHR) technique. Prior to our study and to our knowledge this last technique was not performed as a screening test for CGD in Mexico. The objective of this work was to implement the DHR for the diagnosis of CGD in different hospitals in Mexico. Health professionals from different pediatric hospitals, who diagnose and treat primary immunodeficiencies in Mexico were invited to participate in DHR technique training, considering that they had the appropriate infrastructure. 28 professionals from eight hospitals were trained. Currently all training centers are processing samples from CGD possible cases with DHR. Three of the eight centers already have positive cases of CGD patients and female carriers. There are PID that are not yet detected even the clinical suspicion, because there is not access to diagnostic tests, despite having a competent hospital staff and equipment. Our work model is an example of how the diagnosis and treatment of PIDs can be improved.

Key words: *Chronic granulomatous disease, dihydrorhodamine, primary immunodeficiencies, screening test, nitroblue tetrazolium.*

INTRODUCCIÓN

Las inmunodeficiencias primarias son un grupo de enfermedades genéticas que predisponen a mayor susceptibilidad a infecciones recurrentes y/o graves. La última clasificación de las inmunodeficiencias primarias engloba a nueve diferentes grupos, entre ellos están los defectos de fagocitosis que incluye la enfermedad granulomatosa crónica (EGC).¹

ENFERMEDAD GRANULOMATOSA CRÓNICA

La EGC se caracteriza clínicamente por una mayor susceptibilidad a padecer infecciones recurrentes y graves por bacterias, hongos y micobacterias, además de un estado de inflamación anormal manifestado por autoinmunidad, granulomas y síndrome hemofagocítico. Dentro de las infecciones más frecuentes están la neumonía, linfadenitis y abscesos en diferentes órganos. Los agentes infecciosos más frecuentes son: *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia*, *Serratia marcescens*, *Aspergillus spp* y *Nocardia spp*.²

En la EGC existe una alteración en el complejo enzimático de la NADPH oxidasa, dicha enzima se encuentra en varias células del sistema inmune como neutrófilos, monocitos y linfocitos B. Cuando estas células reciben un estímulo infeccioso, la enzima localizada en las vesículas fagocíticas se activa y produce superóxido

(O₂⁻), éste por acción de la superóxido dismutasa se transforma en peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Los nuevos radicales libres generados en las vesículas fagocíticas, interactúan con las diferentes moléculas que componen a los agentes infecciosos para su destrucción y erradicación. La importancia de la NADPH oxidasa se hace evidente en la EGC, enfermedad en la cual está ausente (*Figura 1*).³

Existen dos tipos de patrón de herencia de la EGC. El patrón ligado al X (LX) que es el más frecuente, 80% por ciento de los casos en México, tiene afectada la subunidad gp91phox de la NADPH oxidasa (codificada por el gen *CYBB*).⁴ El patrón autosómico recesivo se presenta tanto en mujeres como en hombres, existe una alteración en alguna de las subunidades p22phox, p47phox, p67phox o p40phox.² El tratamiento incluye la profilaxis con antimicrobianos y interferón gamma recombinante; sin embargo, el único tratamiento curativo es el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas, el éxito posterior al trasplante puede ser evaluado a través de la técnica de DHR.⁵

DIAGNÓSTICO DE EGC

El diagnóstico de la EGC se realiza a través de diferentes técnicas que cuantifican los radicales libres de oxígeno, que se generan por la NADPH oxidasa y la superóxido dismutasa. Las técnicas de laboratorio que miden el su-

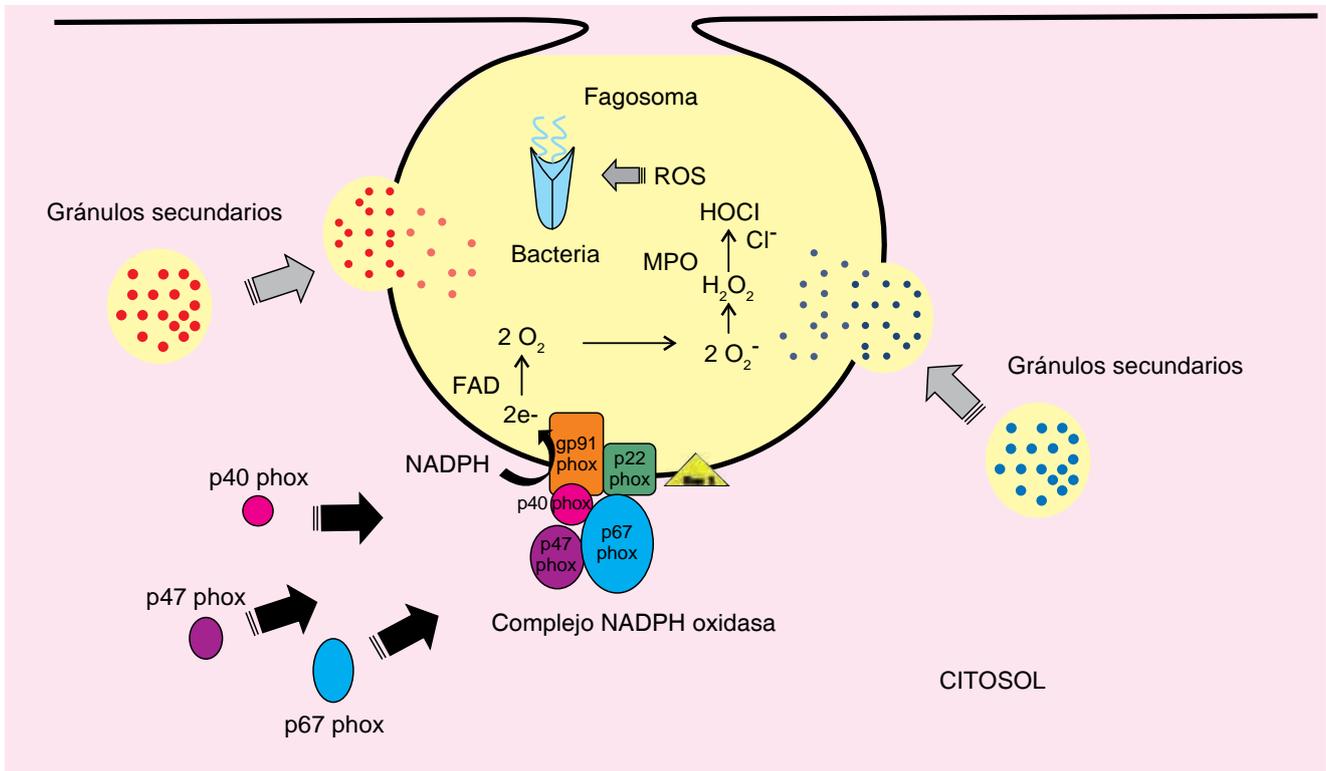


Figura 1. Se muestra complejo enzimático NADPH oxidasa. Está compuesto por las subunidades de membrana gp91phox y p22phox, y las subunidades citosólicas p40phox, p47phox y p67phox. Posterior a un estímulo tanto las subunidades citosólicas como citoplasmáticas se ensamblan para la producción de superóxido. Los 5 genes que codifican cada una de estas proteínas se pueden mutar, dando lugar a falta de erradicación de ciertos microorganismos y falta en la regulación de la respuesta inflamatoria.

peróxido son la reducción de ferrocitocromo C o el nitroazul de tetrazolo (NBT). El peróxido de oxígeno se cuantifica con otras técnicas que utilizan citometría de flujo como 1-2-3 dihidrorodamina, 2,7 diclorohidrofluoresceína o 6G dihidrorodamina.⁶

La NBT se realiza de la siguiente manera, posterior a la estimulación *in vitro* de los neutrófilos en una laminilla, se genera en un individuo inmunocompetente superóxido (O_2^-), éste reacciona con NBT para formar formazan; esta reacción se hace evidente por un cambio de coloración de amarillo a azul en los neutrófilos al microscopio. En la enfermedad granulomatosa crónica hay falta de cambio de color. Una desventaja de la NBT cualitativa es que depende de la experiencia que tenga el observador en identificar el cambio de color, lo cual puede disminuir su sensibilidad y especificidad.⁷

Con el advenimiento de la citometría de flujo, la prueba de NBT ha sido reemplazada por ensayos más rápidos, sensibles y multiparamétricos desde los años 90; un ejemplo sin las pruebas fluorescentes por citometría de flujo que miden la actividad funcional de los neutrófilos.⁸ Los neutrófilos *in vitro* se ponen en contacto con un

estímulo de la NADPH oxidasa como el forbol-12 miristato-13 acetato, se agrega un compuesto no fluorescente que al interactuar con los radicales libres de oxígeno se transforma en un compuesto fluorescente, la emisión de fluorescencia se mide a través de una citometría de flujo. Esto último implica que la técnica sea más objetiva y sensible. Los fluorocromos que han sido utilizados son 1-2-3 dihidrorodamina, 2,7 diclorohidrofluoresceína o 6G dihidrorodamina.⁹

La DHR es un cromógeno permeable a la membrana celular. Durante el estallido respiratorio reacciona con el H_2O_2 (peróxido de hidrógeno) para formar 1,2,3 rodamina, una molécula fluorescente. En un sujeto sano podemos cuantificar en el citómetro un incremento en la intensidad de fluorescencia media (IFM), posterior a un estímulo. Se ha comparado la sensibilidad entre diferentes fluorocromos (DHR, DCF e hidroetidina) para la detección de radicales libres de oxígeno en individuos sanos; se concluyó que la técnica 1,2,3 DHR es el fluorocromo más sensible y es el más utilizado para el diagnóstico de EGC.⁹

Hasta donde es de nuestro conocimiento, la prueba que se utilizaba en diferentes centros hospitalarios de

México para el diagnóstico de EGC, antes del año 2013 era la NBT.

En nuestro país existe un retraso en el diagnóstico en las inmunodeficiencias primarias, incluyendo la EGC. Algunas explicaciones son la falta de conocimiento por parte de los médicos y de acceso a pruebas diagnósticas en hospitales pediátricos.¹⁰ Para mejorar esta problemática a nivel nacional diseñamos y desarrollamos un proyecto de investigación para el estudio molecular de la EGC. Uno de los logros de este proyecto fue demostrar las ventajas de una prueba de tamizaje de esta enfermedad a través de la DHR. El objetivo de este trabajo fue implementar esta técnica de tamizaje (1-2-3 dihidrorodamina), en diferentes hospitales pediátricos que diagnostican y tratan inmunodeficiencias primarias. Nos interesa también que cualquiera que tenga acceso a este escrito pueda reproducir la técnica.

MÉTODOS

Invitamos a médicos que diagnostican y tratan a pacientes con inmunodeficiencias primarias de diferentes hospitales en México, a participar en la capacitación de los químicos en la técnica en sus laboratorios, tomando en cuenta que contarán con un citómetro de flujo y el personal capacitado en su manejo.

Por un lado la capacitación fue sobre las bases teóricas y ventajas de la técnica, el desarrollo del método, incluyendo la lectura de las muestras en el citómetro de flujo, el análisis y la interpretación de los resultados. Por otro lado se dio seguimiento por vía electrónica a los problemas técnicos que pudieran surgir posterior a la capacitación.

REACTIVOS

1) 1-2-3 dihidrorodamina 5 mm de 1 mL DMSO (Life technologies, catálogo D23806). Hacer alícuotas de 2 μ L (500 alícuotas). Almacenar a -20 °C. Usar una alícuota por experimento. No volver a congelar en caso de tener sobrante. 2) Phorbol 12-Myristate 13-acetate 5 mg (PMA; promega, catálogo V117A). Preparación de solución stock: agregar 5 mL de solución DMSO (relación 1 mg/mL). Hacer alícuotas de 2 μ L (2,500 alícuotas) Almacenar -20 °C. 3) BD FACS lysing solution 10 \times 100 mL (BD; catálogo 349202). 4) Tampón fosfato salino o PBS 1X (de sus siglas en inglés *phosphate buffered saline*). 5) Paraformaldehído al 1%.

RECOLECCIÓN DE MUESTRA

Toma y manejo de muestras de sangre de paciente y control: colectar 2 mL de sangre en tubos de heparina sodio o heparina litio, procesar inmediatamente para evitar la autofluorescencia generada en las células

mueras. En caso de tener que procesar las muestras un día después, las muestras deben tomarse en un tubo de ACD (marca BD; *solution A blood collection tubes* catálogo 364606). El control debe ser un sujeto sano masculino, y se debe tomar al mismo tiempo que la muestra del paciente. Cada ensayo debe realizarse imprescindiblemente con un control.

TÉCNICA

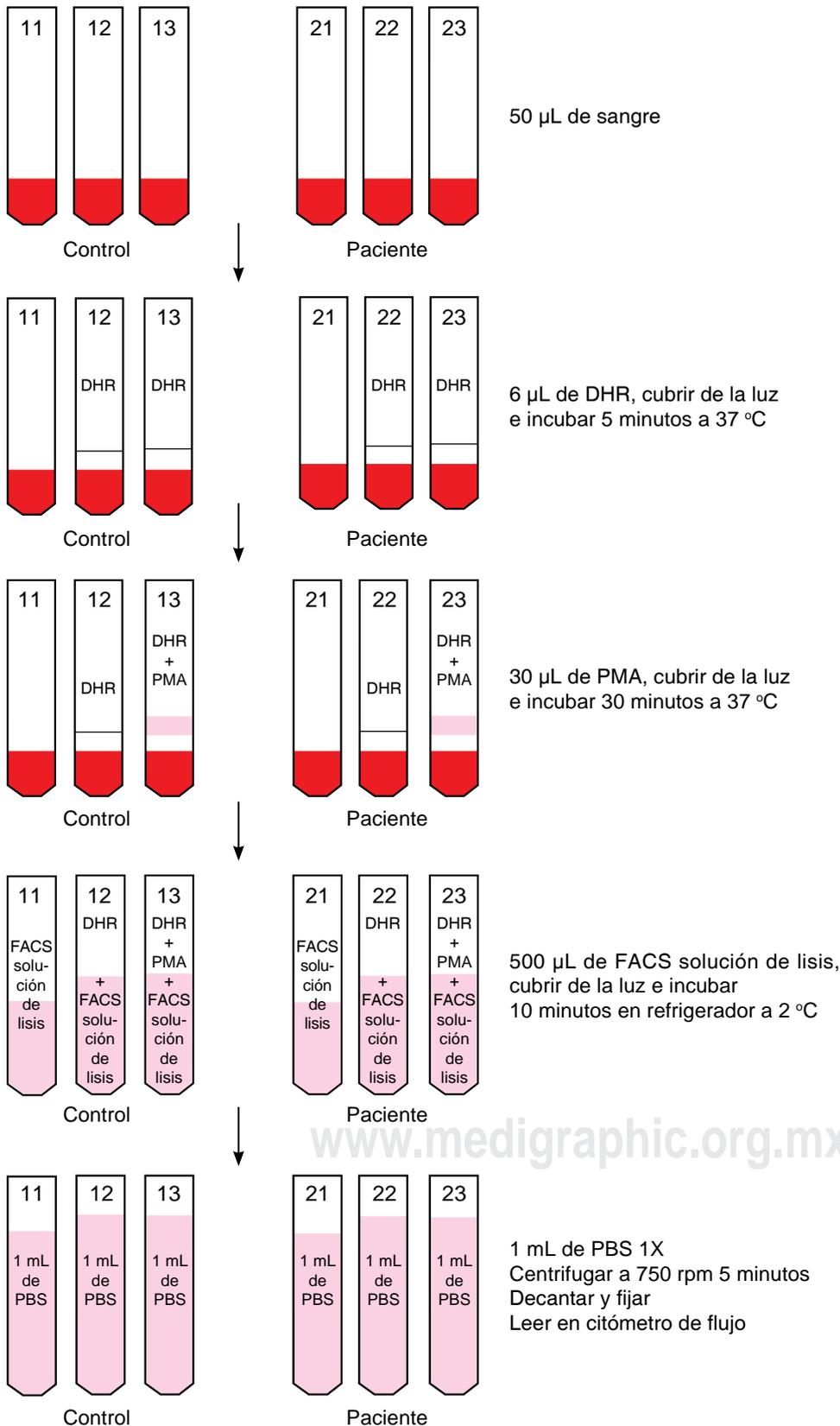
Cada una de las muestras a procesar requerirán tres tubos para citometría. Rotular los tubos como tubo 1, tubo 2, tubo 3 del paciente y del testigo, debido a que cada tubo tendrá diferentes condiciones. A cada uno de los tubos 1, 2 y 3 tanto del paciente como del testigo agregar 50 μ L de sangre. Agregar 6 μ L de la mezcla de DHR a los tubos 2 y 3 tanto del paciente como del control, (preparación: sacar del congelador de -20 °C una alícuota de 2 uL de DHR y agregarle la cantidad de 78 uL de PBS1X, mezclar), incubar los tubos 1, 2 y 3 por cinco minutos a 37 °C, (calor seco, estufa de cultivo o baño María). Después de agregar la DHR hay que evitar exponer a la luz los tubos hasta finalizar la técnica, puede usar papel aluminio. Al término de incubación agregar a los tubos 3 del paciente y del testigo 30 μ L de PMA 1:100, (preparación: sacar del congelador de -20 °C una alícuota de 2 μ L y reconstituir con 198 μ L de PBS al 1X), incubar los tubos 1, 2 y 3 del paciente y del testigo 20-30 minutos a 37 °C. Al término de la incubación agregar 500 uL de solución de lisis de glóbulos rojos 1X (previa dilución, ya que la presentación comercial viene 10X), incubar 10 minutos en refrigerador a 2 °C. Sacar de refrigerador y mezclar (vórtex), lavar dos veces agregando a cada tubo 1 mL de PBS 1X, centrifugar a 750 rpm 5 minutos, al término decantar y fijar con paraformaldehído al 1%. Se procede a leer inmediatamente en el citómetro de flujo (BD ARIA) 20, 000 eventos totales, en canal de FL2 (488nm) (*Figura 2*).

El análisis de las muestras se realizó en Software BD FACS DIVA, seleccionamos la región de neutrófilos, FSC contra SSC, (*Figura 3A*) y graficamos un histograma para cálculo de la IFM de FL2 de cada tubo (*Figura 3*).

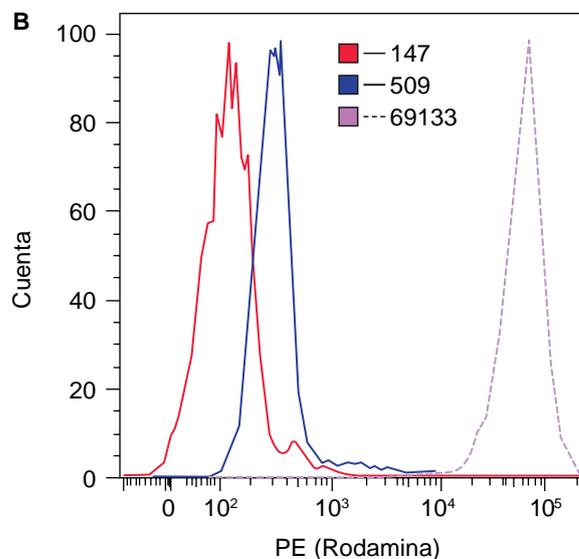
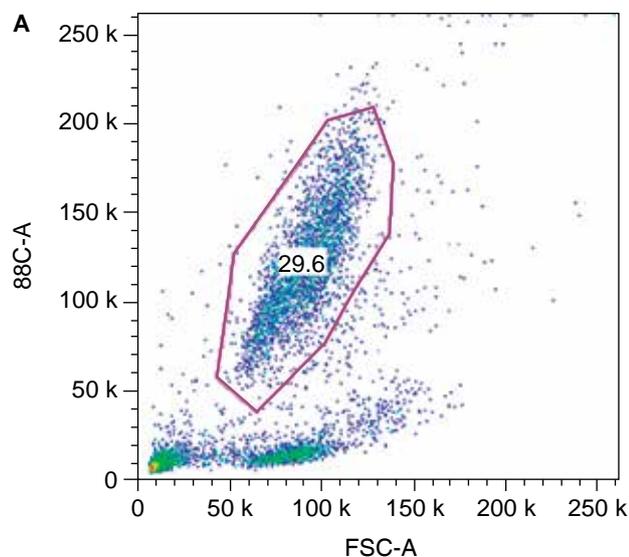
INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Determinar el índice de oxidación o estimulación, el cual refleja cuántas veces se incrementó la producción de rodamina posterior al estímulo. Se calcula de la siguiente manera: dividir el índice medio de fluorescencia del tubo 2 entre el índice medio de fluorescencia del tubo 3.

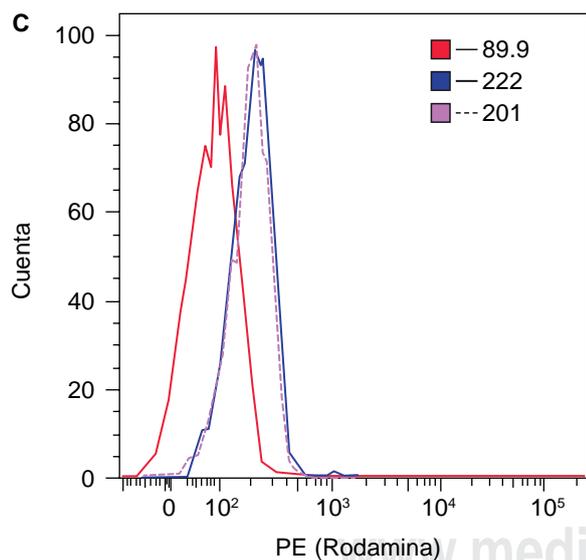
Un sujeto sano tiene una sola población con un índice de estimulación mayor de 30 (*Figura 3B*), los pacientes con EGC tienen una sola población con índice de estimulación menor a 5 (*Figura 3C*). Existen condiciones en las cuales podemos observar un histograma bimodal (*Figura 3D*), este patrón refleja dos diferentes poblacio-

**Figura 2.**

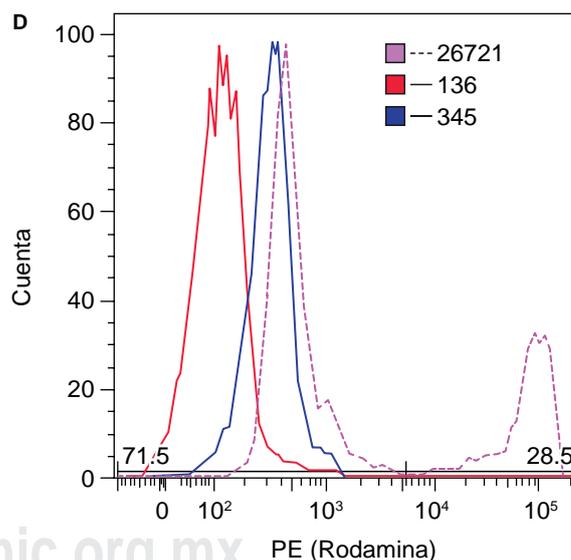
Descripción gráfica de la técnica de 1-2-3 dihidrorodamina.



FSC-A SSC-A subset
Control
Índice de oxidación 135



FSC-A SSC-A subset
Paciente con enfermedad granulomatosa crónica
Índice de oxidación de 1



PE-A SSC-A subset
Mujer portadora de enfermedad granulomatosa crónica ligada al X
Patrón bimodal

Figura 3. A) Mostramos las diferentes regiones en una gráfica de tamaño contra granularidad. Sobre el área de neutrófilos se cuantificó la intensidad de fluorescencia media (IFM). En las siguientes figuras, **B-D)** Mostramos los histogramas midiendo la IFM de la rodamina, a partir de los cuales se calcula el índice de oxidación, **B)** Sujeto sano con un índice de oxidación de 69, **C)** Paciente con enfermedad granulomatosa crónica con un índice de oxidación de 1, **D)** En la madre del paciente observamos un patrón bimodal: el primer pico con un índice de 5.8 y el segundo con 116. Ver resto de explicación en texto.

nes de neutrófilos en cuanto al IMF, es decir una que tiene un índice de estimulación normal y otra anormal.

RESULTADOS

Hasta el momento la capacitación se ha realizado en los siguientes hospitales de México:

- 1) Hospital Central Militar, Ciudad de México.
- 2) Centro Médico Nacional siglo XXI, Ciudad de México.
- 3) Hospital Infantil de Especialidades de Chihuahua, Chihuahua.
- 4) Centro Médico de Occidente, Hospital de especialidades, Jalisco.
- 6) UMAE 25 IMSS, Nuevo León.
- 7) Hospital del niño y el adolescente del niño Morelense. Morelos.
- 8) Hospital para el niño de Toluca. Estado de México.

Visitamos a cada uno de los ocho hospitales, suministramos los reactivos para iniciar la técnica, adaptamos la técnica al equipo con que contaba cada uno de los laboratorios, como placa de calor seco, baño María o estufa de CO₂ para 37 °C y tipo de citómetro de flujo. Entrenamos 28 profesionales de la salud. En cada lugar, el primer día realizamos la técnica en un sujeto sano, y en un segundo día en un sujeto con EGC así como en una mujer portadora de la forma LX. Dimos seguimiento por vía electrónica y telefónica de dudas al personal de ocho de los centros entrenados, incluso en casos dudosos se nos envió la muestra para corroborar el resultado. De estos ocho centros, tres ya tienen casos positivos para EGC y el resto están procesando muestras de posibles casos de EGC.

DISCUSIÓN

En México no existen datos epidemiológicos de la EGC. Un estudio retrospectivo descrito en una tesis del Instituto Nacional de Pediatría mostró que en 30 años, (1970-2004) se diagnosticaron 23 pacientes con EGC.¹¹ Como producto de nuestro proyecto de investigación para la detección de la EGC, nosotros publicamos 33 nuevos casos del 2010 al 2013.¹² Este incremento se explica a la par por una campaña de difusión de las inmunodeficiencias primarias a médicos de primer contacto de todo el país por los médicos de la Unidad de Investigación en Inmunodeficiencias del Instituto Nacional de Pediatría y la Fundación Mexicana para niñas y niños con inmunodeficiencias primarias (fumeni.org.mx).

Está descrito en la literatura que la técnica de DHR es más sensible para el diagnóstico de EGC en comparación con la técnica de NBT. La mayor sensibilidad radica en la objetividad de la prueba, la DHR se basa en medir la intensidad fluorescencia media de la rodamina

en la población de neutrófilos (activados) por citometría de flujo. Por otro lado el resultado de la NBT se basa en medir un cambio de color en neutrófilos a través del microscopio, lo cual está sujeto a la apreciación subjetiva del observador. Por nuestra parte algunos de los casos que estudiamos fueron referidos con un cuadro clínico característico de EGC con una prueba de NBT «normal»; sin embargo, al realizarles la DHR se corroboró claramente el diagnóstico de EGC.⁷

Otra ventaja de la DHR es su rapidez, nosotros la realizamos en dos horas, desde el tiempo de la toma de la muestra hasta el resultado posterior al análisis. Además es relativamente económica, el costo neto de la prueba es de 5 dólares USD.

Como ya se describió arriba, el resultado de la DHR puede dar un histograma con patrón bimodal, puede haber varias situaciones en el cual se presente, como en madres de pacientes con EGC LX. En tal caso el patrón bimodal descubre el estado de portadora de EGC LX y por tanto establece el tipo de herencia en el probando. Esto se explica debido a que las mujeres portadoras tiene dos genes *CYBB*, uno procedente de su madre, y otro procedente del padre, un porcentaje de los neutrófilos expresará el gen de la madre (con la mutación) y otros el gen del padre (normal).¹²

Otra situación clínica y molecular que da origen al patrón bimodal son los pacientes varones con EGC LX mosaicos. Aunque los varones expresan un solo gen *CYBB* en el cromosoma X, estos pacientes sufren una mutación somática en el periodo embrionario, dando lugar a dos poblaciones de neutrófilos: una que produce radicales libres y otra que no.¹³

La EGC LX y autosómica recesiva son enfermedades genéticas. En México el único tratamiento potencialmente curativo es el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH). La técnica de DHR posterior al día 14-20 de la infusión de las células progenitoras hematopoyéticas, nos permite evaluar el porcentaje de células del donador que injertaron en el huésped (quimerismo).⁵ Tiene ventajas sobre otros estudios, (PCR en microsatélites), como son rapidez y menor costo. A través de la citometría de flujo se puede analizar de forma individual a cada uno de los neutrófilos, por tanto calcular qué porcentaje de los neutrófilos son normales (injerto) y anormales (receptor). Pudimos seguir a los pacientes con TCPH a lo largo del tiempo, pudiendo observar injerto exitoso, quimerismo mixto, pérdida del injerto gradual o falla de injerto. Los resultados son base para la toma de decisiones para los médicos trasplantólogos, como elegir una segunda infusión de células progenitoras hematopoyéticas. Está descrito que para que un paciente esté libre de manifestaciones propias de la EGC, debe tener al menos un 10% de neutrófilos sanos (donador). Sin embargo, observamos que con tan sólo un 5% de las células injertadas con índice de oxidación

normal las manifestaciones disminuyen drásticamente y la supervivencia incrementa. A diferencia de la DHR la prueba de NBT no permite detectar lo antes descrito.

La importancia de detectar las portadoras de EGC LX no es sólo para determinar el patrón de herencia en el probando, sino también otorgarles asesoramiento genético e informarles el mayor riesgo que tienen de presentar enfermedades inflamatorias o autoinmunes. Además la posibilidad de que presenten una inactivación del cromosoma X con el gen *CYBB* sano igual o mayor a 90% e inició de infecciones recurrentes.¹⁴

Finalmente podemos encontrar un patrón bimodal en muestras, (varones o mujeres sanos), que son procesadas un día después de la toma, sobre todo si fueron colectadas en tubos de heparina litio o heparina sodio y no en tubos de ACD, esto se debe a que hay muerte celular en un porcentaje de neutrófilos, lo cual se evidencia con menor porcentaje de IFM.

Uno de los objetivos más valiosos de la investigación es poder impactar positivamente en el campo clínico, esto es ejemplificado en nuestro modelo de trabajo. Una de las primeras tareas de nuestro trabajo fue sensibilizar a los médicos de la importancia de implementar esta técnica de tamizaje en su hospital, ellos a su vez gestionaron las rutas para que pudiera ser un hecho la implementación de la nueva técnica.

La capacitación de los diferentes laboratorios fue satisfactoria, y se evidencia con la detección de nuevos casos de EGC y de portadoras de EGC LX.

En México existe una centralización de los servicios médicos de alta especialidad, incluyendo el rubro de las inmunodeficiencias primarias, una estrategia para mejorar el diagnóstico es la transferencia de diferentes técnicas, que se realizan en proyectos de investigación, al área clínica. Existen inmunodeficiencias primarias que no son detectadas debido a que en la localidad no existen las herramientas de laboratorio convenientes, a pesar de que exista el equipo y el personal competente, lo cual es un reto para seguir capacitando a más hospitales de nuestro país.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Fundación Mexicana para niñas y niños con Inmunodeficiencias Primarias A.C. y a CONACYT (SALUD-2012-01-180910) el patrocinio de nuestro proyecto. Agradecemos a Delia López López su asistencia técnica.

Lizbeth Blancas Galicia, Sara Elva Espinosa Padilla y Francisco Espinosa Rosales pertenecen al Sistema Nacional de Investigadores.

BIBLIOGRAFÍA

- Picard C, Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chatila T, Conley ME et al. Primary immunodeficiency diseases: an update on the Classification from the International Union

- of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency 2015. *J Clin Immunol.* 2015; 35: 696-726.
- Roos D. Chronic granulomatous disease. *Br Med Bull.* 2016; 118: 50-63.
- Vignais PV. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci.* 2002; 59: 1428-1459.
- Leon LXB GL. Características epidemiológicas, tipo de herencia y manifestaciones infecciosas de pacientes con enfermedad granulomatosa crónica. Tesis (especialidad en pediatría) UNAM Facultad de Medicina. 2017; tesis.unam.mx.
- Kim HY, Kim HJ, Ki CS, Kim DW, Yoo KH, Kang ES. 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: 288-292.
- Qin Y, Lu M, Gong X. Dihydrorhodamine 123 is superior to 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate and dihydrorhodamine 6G in detecting intracellular hydrogen peroxide in tumor cells. *Cell Biol Int.* 2008; 32: 224-228.
- Roos D, de Boer M. Molecular diagnosis of chronic granulomatous disease. *Clin Exp Immunol.* 2014; 175: 139-49.
- Lun A, Schmitt M, Renz H. Phagocytosis and oxidative burst: reference values for flow cytometric assays independent of age. *Clin Chem.* 2000; 46: 1836-1839.
- Walrand S, Valeix S, Rodriguez C, Ligot P, Chassagne J, Vasson MP. Flow cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison of three fluorescent probes. *Clin Chim Acta.* 2003; 331: 103-110.
- Cambray-Gutiérrez JC, Herrera-Sánchez DA, Blancas-Galicia L, O'Farrill-Romanillos PM. Clinic of humoral primary immunodeficiencies in adults. Experience in a tertiary hospital. *Rev Alerg Mex.* 2016; 63: 334-341.
- Staines BT. Descripción del cuadro clínico y defecto molecular de pacientes con enfermedad granulomatosa crónica en el Instituto Nacional de Pediatría. Tesis (especialidad en alergia e inmunología clínica pediátrica) UNAM Facultad de Medicina. 2005; tesis.unam.mx.
- Berron-Ruiz L, Morin-Contreras A, Cano-García V, Yamazaki-Nakashimada MA, Gómez-Tello H, Vargas-Camaño ME et al. Detection of inheritance pattern in thirty-three Mexican males with chronic granulomatous disease through 123 dihydrorhodamine assay. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2014; 42: 580-585.
- Yamada M, Okura Y, Suzuki Y, Fukumura S, Miyazaki T, Ikeda H et al. Somatic mosaicism in two unrelated patients with X-linked chronic granulomatous disease characterized by the presence of a small population of normal cells. *Gene.* 2012; 497: 110-115.
- Marciano BE, Zerbe CS, Falcone EL, Ding L, DeRavin SS, Daub J et al. X-linked carriers of chronic granulomatous disease: illness, lyonization and stability. *J Allergy Clin Immunol.* 2017; pii: S0091-6749(17)30763-7.

Dirección para correspondencia:
Lizbeth Blancas Galicia
Av. Imán Núm. 1,
Col. Insurgentes-Cuicuilco,
Del. Coyoacán, 04530, Ciudad de México.
Tel. 51719844
E-mail: blancas.lizbeth@gmail.com