

**Avances en el diagnóstico de la enfermedad granulomatosa crónica:
primer estudio familiar en Cuba**

Advances in the diagnosis of chronic granulomatous disease: the first family
study in Cuba

Gabriela Díaz Domínguez^{1*} <http://orcid.org/0000-0002-7060-7364>

Imilla Casado Hernández¹ <http://orcid.org/0000-0003-0432-7943>

Vianed Marsán Suárez¹ <http://orcid.org/0000-0001-5659-8214>

Consuelo M. Macías Abraham¹ <http://orcid.org/0000-0001-5484-096X>

¹Instituto de Hematología e Inmunología. La Habana, Cuba.

*Autor para la correspondencia: rchematologia@infomed.sld.cu

RESUMEN

Introducción: La enfermedad granulomatosa crónica es una inmunodeficiencia primaria causada por mutaciones en la enzima NADPH oxidasa. Esta compromete la producción de especies reactivas del oxígeno, que son importantes contra patógenos. La prueba de la oxidación de la dihidrorodamina es un método eficaz para diagnosticar la enfermedad.

Objetivo: Demostrar la utilidad de la prueba de la oxidación de la dihidrorodamina y del patrón de herencia en la confirmación del diagnóstico de la enfermedad granulomatosa crónica de un paciente.

Métodos: Estudio de caso de una familia con diagnóstico de enfermedad granulomatosa crónica. Se tomó muestra de sangre periférica para citometría de flujo a tres individuos. Se realizó la prueba de la oxidación de la dihidrorodamina bajo estímulo con acetato de forbolmiristato y se evaluaron las subpoblaciones linfocitarias. Las muestras se leyeron en un citómetro GALLIOS, Beckman Coulter. Los datos obtenidos se analizaron en el programa informático Kaluza.

Resultados: El paciente masculino tuvo un valor de oxidación de la dihidrorodamina positiva de 0,87 %, que confirmó un patrón de herencia ligado al cromosoma X; mientras

que la madre y hermana gemela portadoras tuvieron valores de 46,76 % y 37,32 %, respectivamente. Se encontraron alteraciones en las subpoblaciones linfocitarias.

Conclusiones: La prueba de la oxidación de la dihidrorodamina es un método muy efectivo, rápido y sencillo que confirma el diagnóstico de la enfermedad granulomatosa crónica y determina el patrón de herencia y fenotipo de la enfermedad. Además, permite identificar a las mujeres portadoras según la distribución de los neutrófilos normales y los que tienen el gen CYBB mutado.

Palabras clave: enfermedad granulomatosa crónica; prueba de oxidación de la dihidrorodamina; citometría de flujo.

ABSTRACT

Introduction: Chronic granulomatous disease is a primary immunodeficiency caused by mutations in the NADPH oxidase enzymes. This compromises the production of oxygen reactive species, which are important against pathogens. The dihydrorhodamine oxidation test is an effective method for diagnosing the disease.

Objective: To demonstrate the usefulness of the dihydrorhodamine oxidation test and the inheritance pattern in confirming the diagnosis of chronic granulomatous disease in a patient.

Methods: A case study of a family with a diagnosis of chronic granulomatous disease. A peripheral blood sample was taken from three individuals and by flow cytometry. The dihydrorhodamine oxidation test was performed under stimulation with phorbolmyristate acetate, and lymphocyte subpopulations were evaluated. The samples were read on a GALLIOS, Beckman Coulter cytometer. The data obtained were analyzed using the computer program Kaluza.

Results: The male patient had a positive dihydrorhodamine oxidation value of 0.87%, which confirmed an inheritance pattern linked to the X chromosome; while the carrier mother and twin sister had values of 46.76% and 37.32%, respectively. Alterations were found in the lymphocyte subpopulations.

Conclusions: The dihydrorhodamine oxidation test is a very effective, fast and simple method that confirms the diagnosis of chronic granulomatous disease and determines the inheritance pattern and phenotype of the disease. In addition, it allows the identification of female carriers according to the distribution of normal neutrophils and those with the CYBB mutation.

Keywords: chronic granulomatous disease; dihydrorhodamine oxidation test; flow cytometry.

Recibido: 02/08/19

Aceptado: 05/12/19

Introducción

La enfermedad granulomatosa crónica (EGC) es un trastorno congénito del sistema inmune innato. Esta inmunodeficiencia primaria es causada por mutaciones en cualquiera de las cinco subunidades catalíticas del complejo enzimático nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato-oxidasa (NADPH), la glicoproteína gp91^{phox} y las proteínas p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} y p40^{phox}. Dicha enzima es responsable del proceso bioquímico conocido como estallido respiratorio y está presente en las células fagocíticas, tales como: macrófagos, neutrófilos-granulocitos, monocitos y eosinófilos.⁽¹⁾ A causa de estas mutaciones, los pacientes con EGC tienen una producción deficiente de especies reactivas del oxígeno (ROS), las cuales activan el mecanismo de la fagocitosis y son esenciales contra bacterias y hongos patógenos comunes que pueden llevar a una muerte prematura del paciente.⁽²⁾

La enfermedad afecta a 1 por cada 200 000 o 250 000 nacidos vivos, sin preferencia étnica. Aunque se ha encontrado una mayor incidencia en culturas donde la consanguinidad es más común. Se caracteriza por la aparición de infecciones graves y recurrentes, producidas principalmente por microorganismos tales como: *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia*, *Serratia marcescens*, *Nocardia sp.*, y *Aspergillus s.*, entre otros.⁽³⁾ También, son comunes los procesos inflamatorios por desregulación del sistema inmunitario y la autoinmunidad.⁽⁴⁾

Las extremas reacciones inflamatorias pueden provocar la formación de los granulomas, característicos de esta inmunodeficiencia. Sin embargo, son las infecciones, especialmente aquellas causadas por hongos, las causas más comunes de muerte en los pacientes con EGC. Por lo tanto, el diagnóstico diferencial de los trastornos inflamatorios crónicos es de vital importancia.⁽¹⁾ En Cuba, el diagnóstico de la EGC se ha realizado mediante el método clínico en pacientes que presentan infecciones frecuentes asociadas a granulomas y la prueba de reducción de azul de tetrazolio (NBT),⁽⁵⁾ que permite evaluar colorimétricamente la

capacidad de los leucocitos de reducir un colorante. A pesar de que esta prueba sigue siendo muy útil para determinar la funcionalidad de los neutrófilos, presenta algunas limitantes:

1. La subjetividad y experiencia del observador en el microscopio óptico.
2. Es un método que no permite discriminar la variante autosómica recesiva de la enfermedad, así como a las mujeres portadoras, cuando se trata de la variante ligada al cromosoma X.⁽³⁾

En los últimos años se demuestra la importancia de la técnica de la oxidación de la dihidrorodamina (DHR) por citometría de flujo (CMF) en el diagnóstico de la EGC. La DHR es un compuesto permeable a la membrana de la célula, la cual es oxidada a rodamina 123 por los peroxinitritos formados como resultado de la activación del sistema NADPH oxidasa en fagocitos.⁽⁶⁾ Es una prueba sencilla, sensible, de bajo costo y que presenta varias ventajas con respecto al NBT, como la de evaluar un mayor número de células y determinar el patrón de herencia en el paciente afectado.⁽⁷⁾

El objetivo de este estudio fue demostrar la utilidad de la prueba de la oxidación de la dihidrorodamina en la confirmación del diagnóstico de la enfermedad granulomatosa crónica y del patrón de herencia de un paciente previamente diagnosticado por la prueba de NBT, así como del estado de portador de la madre y hermana gemela, respectivamente.

Métodos

Las muestras de los tres sujetos del estudio se obtuvieron a partir de una extracción de sangre periférica (SP) en tubos con EDTA. La prueba de la oxidación de la DHR se desarrolló por la técnica de CMF. Paralelamente, se realizó la prueba en una muestra control normal, obtenida en el banco de sangre del Instituto de Hematología e Inmunología. Todas las muestras fueron procesadas y analizadas en el laboratorio de inmunología de dicha institución.

La prueba de la DHR se le realizó a un paciente masculino de 22 años de edad con diagnóstico clínico de EGC, que fue confirmado en el 2010 mediante el método de NBT y actualmente se encuentra sin tratamiento. Adicionalmente, se estudió a la hermana gemela y la madre del paciente para determinar el patrón de herencia de la enfermedad. Se

evaluaron, además, las subpoblaciones linfocitarias T CD3+/CD4+, TCD3+/CD8+, B CD19+ y células asesinas naturales de los tres individuos por CMF.

Para la realización de la prueba se utilizaron los siguientes reactivos: tampón salino de fosfato + suero fetal bovino (PBS FBS), 1,2,3 dihidrorodamina (1 mM), dimetilsulfóxido (DMSO), acetato de forbolmiristato (PMA) diluido (80 µg/mL). El resto de los reactivos utilizados, se prepararon en el laboratorio de Inmunología con calidad analítica.

Técnicas y procedimientos de laboratorio

Se realizó la prueba con la 1,2,3 DHR mediante la técnica establecida internacionalmente.⁽⁸⁾ Luego de lisar los eritrocitos (de 500 µL de sangre) con una solución tamponada de cloruro de amonio, la muestra de cada individuo y del control sano, se dividió en dos tubos: uno para las células sin estímulo y el otro para las células estimuladas con PMA (SIGMA). Después de lavar los leucocitos con FBS (GIBCO, Grand Island, NY), estos fueron expuestos a la DHR (Invitrogen, Eugene, OR) a 37 °C durante 15 min. Posteriormente, las células se incubaron en presencia o no de PMA a 37 °C durante 15 min e inmediatamente, fueron analizadas en el citómetro, ya que in vitro, a tiempos mayores de incubación, las células polimorfonucleares sin estímulo tienden a presentar actividad en el estallido respiratorio.

La lectura de las muestras se realizó en un citómetro *GALLIOS, Beckman Coulter*. Se colectaron todas las células y se analizaron 10 000 células, en la región de los neutrófilos-granulocitos (seleccionados por los parámetros de tamaño (FSC) y complejidad interna (SSC). Los datos obtenidos se analizaron con el empleo del programa informático Kaluza, versión 1.2.

Los valores obtenidos en la prueba de la DHR y las subpoblaciones linfocitarias se expresaron como porcentaje de células DHR positivas (% DHR+) y porcentaje de células pertenecientes a cada subpoblación linfocitaria. El rango de valores normales que se utilizó en el estudio de las subpoblaciones fue el mismo para todos los pacientes, el cual se correspondió con los valores normales para el grupo de edad ≥ 16 años y que se indican posteriormente.

Resultados

A partir de la prueba de la DHR se obtuvieron los patrones de herencia de la EGC mediante histogramas, tanto del paciente diagnosticado por NBT como de la madre y hermana gemela del mismo. Adicionalmente, se analizó el porcentaje de las células que se activaron ante el estímulo con PMA.

En la figura 1 se muestran los histogramas obtenidos del análisis de la muestra utilizada como control normal en este estudio.

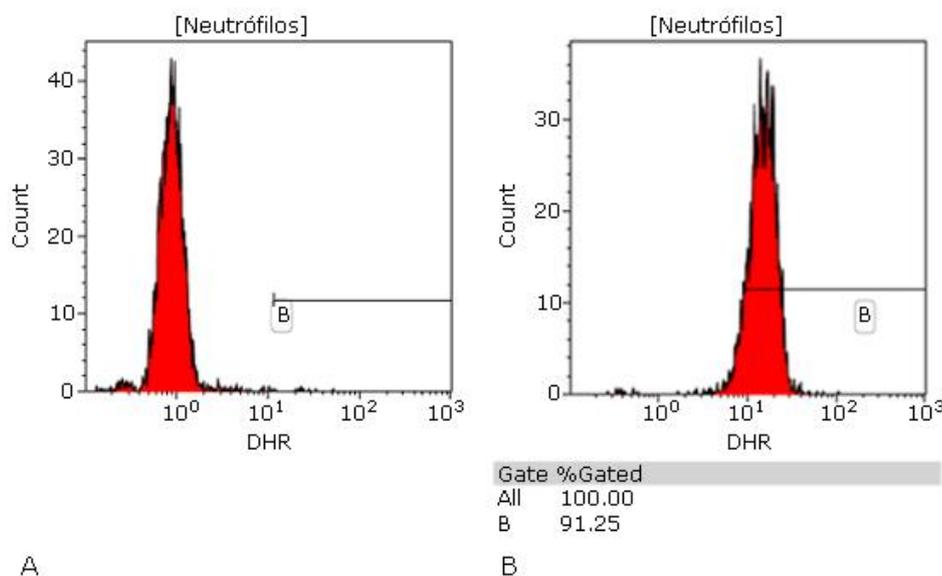


Fig.1 - Representación en histogramas de los neutrófilos en una muestra control normal en estado basal (A) y estimulados con PMA (B). El porcentaje de células estimuladas se corresponde con el valor dado por la barra de corte denominada B.

Como se muestra en la figura 1B, el 91,25 % de los neutrófilos en la muestra control se activaron cuando fueron expuestos ante el estímulo con PMA en presencia de la DHR. Mientras que la señal de fluorescencia de las células en estado basal permaneció inalterable. Sobre la base de este resultado se evaluaron y compararon los patrones en los histogramas obtenidos del estudio familiar. En la figura 2 se observan los gráficos correspondientes a un paciente diagnosticado con EGC hace 9 años por la técnica colorimétrica del NBT en el laboratorio de inmunología.

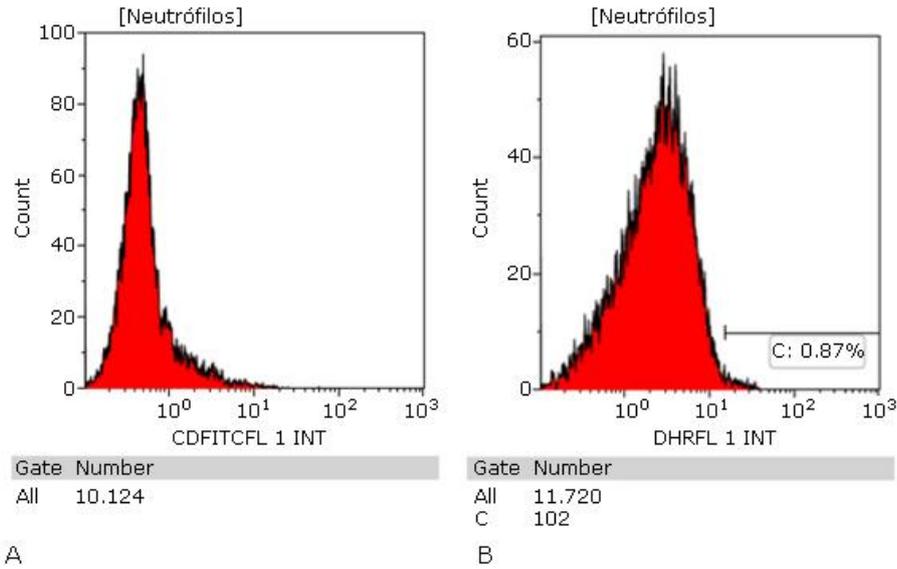


Fig. 2 - Representación en histogramas de los neutrófilos de un paciente con EGC en estado basal (A) y estimulados con PMA (B). El porcentaje y número de células estimuladas se corresponden con el valor dado por la barra de corte denominada C.

Como se aprecia en la figura 2A, las células en estado basal del paciente tienen un comportamiento similar a las del control normal. Cuando fueron estimuladas con el PMA, solo se activaron 0,87 % del total de células granulocíticas (Fig. 1B).

Para confirmar la sospecha de que el patrón de herencia de la enfermedad en este paciente estaba ligado al cromosoma X se realizó el estudio en la madre y la hermana gemela. Los resultados se muestran en la figura 3, donde 3A y 3C corresponden a las células basales de la madre y la hermana, respectivamente. De igual manera, los histogramas B y D representan el % DHR+ de los granulocitos-neutrófilos estimulados.

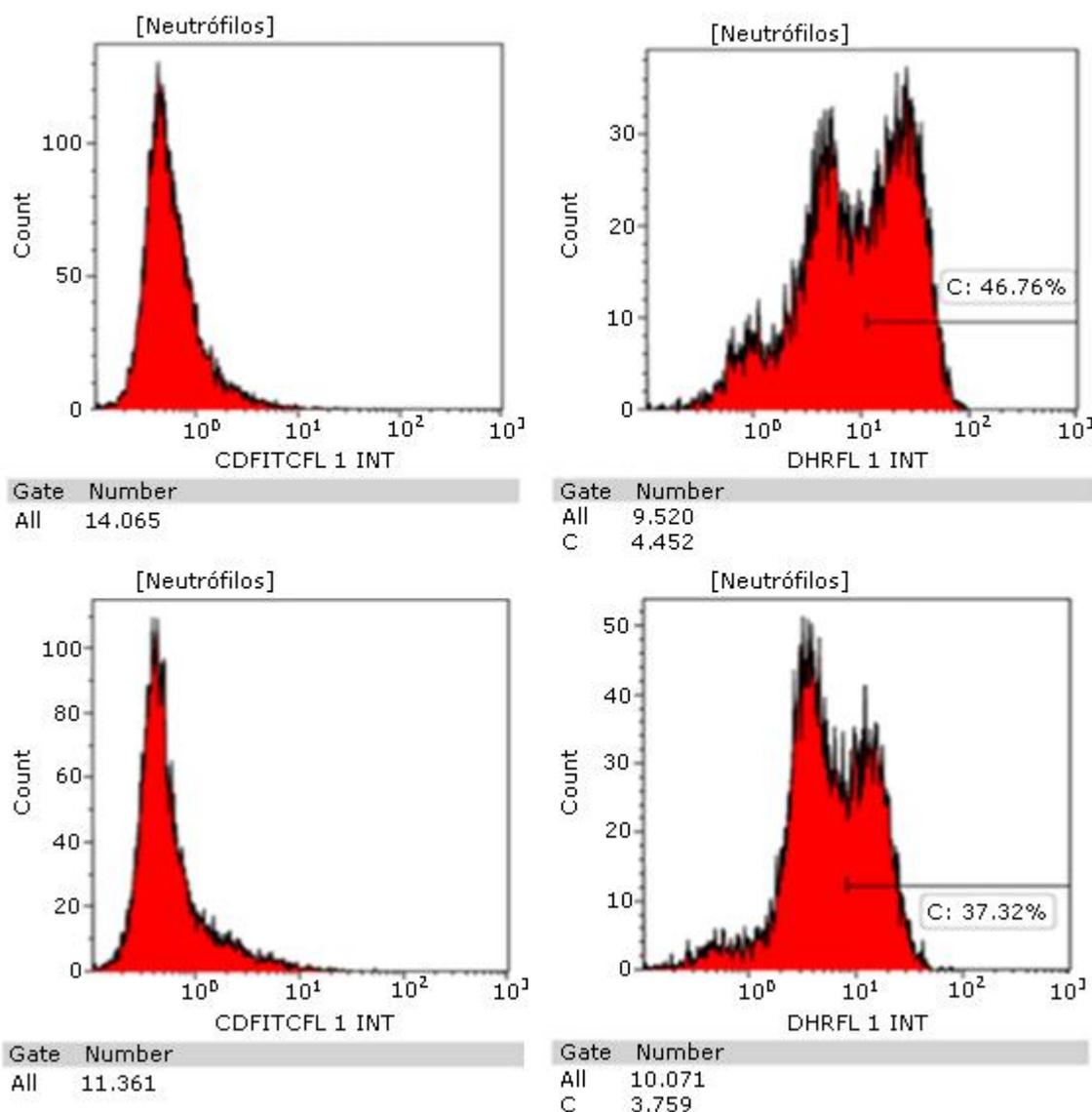


Fig. 3 - Representación en histogramas correspondientes al porcentaje de activación de los neutrófilos de la madre y hermana gemela del paciente, ambas portadoras de la enfermedad. Células en estado basal (A y C) y estimuladas con PMA (B y D). El % de células DHR+ y número de neutrófilos estimulados se corresponden con el valor dado por la barra de corte denominada C.

Cuando se evaluó la capacidad de activación de los neutrófilos, previa estimulación con PMA en la muestra de la madre, se obtuvo que 46,76 % de las células fagocíticas fueron capaces de producir el estallido respiratorio; lo cual representa aproximadamente la mitad del % DHR+ de las células obtenidas con respecto al control normal. Por otra parte, la prueba de la DHR que se le realizó a la hermana gemela dio como resultado que solo 37,32 % del total de neutrófilos se activaron para la producción de ROS. En ambos casos se observó, además, la presencia de una señal de fluorescencia intermedia entre la línea basal

y la señal de células activadas, que corresponde con la condición de mujeres portadoras de la enfermedad.

El estudio de las subpoblaciones linfocitarias de los tres individuos se resume en la siguiente tabla.

Tabla - Subpoblaciones linfocitarias T, B y células asesinas naturales

Subpoblaciones linfocitarias	Paciente con EGC (%)	Madre portadora (%)	Hermana gemela portadora (%)	Rango de referencia (%)
CD3+/CD4+	18,00	17,24	16,88	28-57
CD3+/CD8+	20,04	41,28	24,48	10-39
CD19+	69,93	7,57	4,87	6-19
Células asesinas naturales	43,66	1,40	10,52	7-31

Las células T CD3+/CD4+ o auxiliaadoras se encontraron disminuidas en los tres individuos, con respecto al rango de valores normales. Las células T CD3+/CD8+ o citotóxicas estuvieron dentro del rango de referencia. Solo la madre tuvo un ligero incremento por encima del límite superior de la normalidad. Por otra parte, cuando se evaluó la población de células B CD19+ en el paciente con EGC, se encontró que 69,93 % de los linfocitos correspondían a esta población. El valor obtenido en este caso se encontró aumentado con respecto al intervalo de referencia. La misma población en el estudio de la hermana gemela se encontró ligeramente disminuida con un valor de 4,87 % del total de linfocitos. Las CAN se encontraron aumentadas (43,66 %) en el paciente con EGC, disminuidas (1,40 %) en la madre y normales (10,52 %) en la hermana gemela con respecto al rango de valores de referencia.

Discusión

La EGC es una de las inmunodeficiencias primarias que aparecen en la infancia mejor caracterizada clínicamente. Afecta más a los varones que a las hembras, en una proporción 2:1, debido al modo predominante de la transmisión genética. La causa más común de la EGC es un defecto en el gen CYBB que codifica la glicoproteína gp91^{phox}. La EGC que se relaciona con defectos en este gen es hereditaria y ligada al cromosoma X de forma recesiva

y constituye aproximadamente el 70 % de todos los casos.⁽⁹⁾ Por esta razón el diagnóstico rápido y certero es de vital importancia.

Las manifestaciones clínicas de los pacientes con EGC ligada a X (EGC-X) son heterogéneas. Las más comunes son las infecciones bacterianas y fúngicas en pulmones y piel. También, son frecuentes abscesos hepáticos y granulomas, linfadenopatías, osteomielitis y afectaciones gastrointestinales.^(10,11) Algunas de ellas son graves y pueden dar al traste con la vida de los pacientes.

Es importante considerar que los pacientes con EGC-X son dos veces más susceptibles de desarrollar procesos inflamatorios que aquellos que presentan la variante autosómica recesiva. Por lo que determinar el patrón de herencia constituye un factor fundamental en el pronóstico y manejo de estos.⁽¹²⁾

El NBT es la técnica que se ha utilizado en Cuba como método diagnóstico ante la sospecha de EGC. Sin embargo, esta es una prueba que evalúa la capacidad de reducción del nitroazul de tetrazolio en un número limitado de neutrófilos. Adicionalmente, puede presentar resultados falsos negativos en los pacientes con la variante autosómica recesiva y no permite determinar el estado de portadora de las mujeres. No obstante, puede tener utilidad como prueba de cribado o de rutina ya que la técnica es sencilla y con un costo muy bajo.⁽⁶⁾

Con el advenimiento de la CMF, el NBT se ha reemplazado por ensayos que son más rápidos, sensibles, multiparamétricos y que además, permiten el estudio de las subpoblaciones celulares dentro de una única y pequeña muestra de sangre periférica.⁽¹³⁾

En la actualidad, la prueba de oxidación de la DHR constituye el método estándar para el diagnóstico fiable de la EGC. Este ensayo utiliza un colorante sensible al peróxido de hidrógeno, 1,2,3 DHR para evaluar el estallido respiratorio en neutrófilos y otras células fagocíticas. La activación de estas células se determina por el aumento de la fluorescencia celular cuando se oxida el colorante a rodamina 123. La prueba de la DHR es un método sencillo y sensible e identifica cualquier actividad oxidasa mínima.⁽¹⁴⁾

En la presente investigación se observó que % DHR+ en el control normal resultó menor que el informado en la literatura.⁽¹⁵⁾ Resultaría importante y necesaria la realización de la prueba en un número mayor de controles normales para establecer un rango de valores de referencia que se corresponda con las características de nuestra población.

Cuando se compararon los histogramas (Fig. 2) de las células en estado basal y las estimuladas en el paciente EGC con respecto al control, se comprobó que no hubo estimulación de los neutrófilos cuando fueron expuestos al PMA. Este patrón de oxidación

de la DHR en estas células se corresponde con un fenotipo de EGC-X, tal como se describe en la literatura.^(16,17)

Los varones con una mutación en CYBB o mutaciones bialélicas en cualquiera de los cuatro genes, que conjuntamente codifican las cinco subunidades de complejo NADPH oxidasa, presentan manifestaciones clínicas de EGC. En el caso de las mujeres portadoras de una sola mutación en CYBB tienen disminución en la actividad de la enzima en una porción de los fagocitos entre 20 y 80 % del total, como resultado de una variación en la inactivación del cromosoma X que posee la mutación en CYBB.⁽⁹⁾

Los resultados de la prueba de la DHR realizada a la madre y hermana gemela del paciente EGC-X confirmaron su estado de portadoras. Como se observó en la figura 3 B y D, los histogramas que representan las células estimuladas de ambas presentan dos señales que corresponden con las dos poblaciones de neutrófilos: los activados y los que tienen la mutación en el gen CYBB. El valor de DHR+ en la madre fue 46,76 %, el cual se corresponde con la media de 46 % y la mediana de 47 % obtenida por *Marciano* y colaboradores⁽¹⁵⁾ El valor de DHR+ de la hermana gemela (Fig. 3D) fue de 37,32 %; este valor fue menor que el determinado para la madre. Resultados similares fueron obtenidos por *Rawat* y colaboradores.⁽¹⁸⁾

El riesgo de infecciones es alto para aquellas portadoras con % DHR+ más bajos y este aumenta a medida que el porcentaje DHR+ disminuye hasta menos de 40. El incremento en la susceptibilidad de presentar complicaciones autoinmunes e inflamatorias no está relacionado con el porcentaje de DHR+, pero parece estar asociado con el estado de portadora *per se*.⁽¹⁵⁾ Esto sugiere que las manifestaciones de autoinmunidad e inflamación de las mujeres portadoras pudiera estar relacionado con su condición de portadoras en sí y no con la cantidad total de anión superóxido producido. En este caso, al momento del estudio, la madre y hermana gemela no presentaron manifestaciones clínicas que pudieran asociarse a la enfermedad. Sin embargo, son tratadas en consulta por la susceptibilidad que presentan a las infecciones y procesos inflamatorios y autoinmunes.

Las mujeres portadoras de mutaciones en el gen CYBB usualmente no presentan manifestaciones clínicas, ya que poseen células fagocíticas suficientes que expresan el gen sin mutaciones. Por lo tanto, tienen una adecuada producción de ROS contra las infecciones típicas de la EGC. Algunas portadoras, sin embargo, presentan una inactivación no aleatoria de uno de los cromosomas X y el que expresa el gen salvaje es silenciado. Esto conduce a una marcada reducción de la actividad oxidasa con la consiguiente aparición de manifestaciones clínicas como infecciones graves y procesos inflamatorios. La inactivación

del cromosoma X puede ser progresiva y portadoras previamente asintomáticas pueden desarrollar manifestaciones de EGC en etapas tardías de la vida.⁽¹⁹⁾

Por otra parte, del estudio de las subpoblaciones linfocitarias en esta familia se observaron resultados muy interesantes. Las células T CD3+/CD4+ en el paciente EGC-X estuvieron disminuidas, mientras que las poblaciones de linfocitos B y CAN aumentadas. Las alteraciones en estas últimas pudieran estar dadas por los efectos inmunomoduladores del INF- γ , tratamiento al cual se ha sometido el paciente desde el primer diagnóstico en el 2010. En la literatura revisada no se encontraron evidencias de alteraciones de este tipo en otros pacientes con el mismo diagnóstico,⁽²⁰⁾ pero sería importante realizar una investigación minuciosa para comprender las implicaciones de este comportamiento.

Las alteraciones fundamentales que se encontraron en la madre y hermana gemela fueron la disminución de los porcentajes de las células T CD3+/CD4+ en ambas mujeres y de las CAN y los linfocitos B, respectivamente. Estos resultados son similares a los referidos por *Giardino* y colaboradores.⁽²¹⁾

La determinación del estado de portadora es importante, porque además de advertir a las pacientes sobre el riesgo de tener descendencia masculina, se les transmite información sobre la posibilidad de contraer infecciones y presentar otras manifestaciones de tipo autoinmunes e inflamatorias.

A partir de los resultados de este trabajo se puede concluir que la prueba de la DHR es un método muy efectivo, rápido y sencillo que confirma el diagnóstico de la EGC y determina el patrón de herencia y el fenotipo de la enfermedad en los pacientes afectados, lo cual es de vital importancia en el tratamiento y manejo de estos. Además, permite identificar a las mujeres portadoras según la distribución de los neutrófilos normales y de aquellos que tienen el CYBB mutado.

Agradecimientos

El colectivo de autores de este trabajo le agradece a la Dra. Yenisey Triana Marrero y a la Lic. Lourdes E. Palma Salgado su colaboración en la realización de este trabajo.

Referencias bibliográficas

1. Kutluğ Ş, Şensoy G, Birinci A, Saraymen B, Yavuz Köker M, Yıldırım A. Seven chronic granulomatous disease cases in a single-center experience and a review of the literature. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2018;36:35-41. doi:10.12932/AP0859
2. Medrano A, Morales AE, Valencia R, Hernández DR. Enfermedad granulomatosa crónica. *Med Int Méx.* 2017;33(3):407-14.
3. YuJE, Azar AE, Chong HJ, Jongco AM, Prince BT. Considerations in the Diagnosis of Chronic Granulomatous Disease. *J Pediatric Infect Dis Soc.* 2018;7(S1):S6-11.
4. Arnold DE, Heimall JR. A Review of Chronic Granulomatous Disease. *Adv Ther.* 2017;34:2543-57. doi 10.1007/s12325-017-0636-2.
5. Marsán V, del Valle LO, Macías C, Palma L, García I, Sánchez M. *et al.* Enfermedad Granulomatosa Crónica. *Revista Cubana de Hematología e Inmunología y Hemoter.* 2014;30(3):1-6.
6. Rojas JL, Álvarez JA, Montoya JD, Trujillos CM. Validación de la técnica de dihidrorodamina 123 para el diagnóstico de la enfermedad granulomatosa crónica en Colombia. *Inmunología.* 2014;33(3):71-80.
7. 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.
8. 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.
9. Rider NL, Jameson MB y Creech CB. Chronic Granulomatous Disease: Epidemiology, Pathophysiology, and Genetic Basis of Disease. *J Pediatric Infect Dis Soc.* 2018;7(S1):S2-5.
10. Marciano BE, Spalding C, Fitzgerald A, Mann D, Brown T, Osgood S, *et al.* Common Severe Infections in Chronic Granulomatous Disease. *Rev Infect Dis.* 2015;60(8):1176-83.
11. Khangura SK, Kamal N, Ho N, Quezado M, Zhao X, Marciano B. Gastrointestinal Features of Chronic Granulomatous Disease Found During Endoscopy. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2016;14(3):395-402.e5. doi:10.1016/j.cgh.2015.10.030.

12. Magnani A, Brosselin P, Beaut J, de Vergnes N, Mouy R, Debre M. *et al.* Inflammatory manifestations in a single-center cohort of patients with chronic granulomatous disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;134(3):655-62.
13. Holland SM. Chronic Granulomatous Disease. *Hematol Oncol Clin N Am.* 2013;27:89-99.
14. Delmonte OM y Fleisher TA. Flow cytometry: Surface markers and beyond. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;143(2):528-37.
15. Marciano BE, Zerbe CS, Falcone L, Ding Li, DeRavin SS, Daub J. X-linked carriers of chronic granulomatous disease: Illness, lyonization, and stability. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;141(1):365-71.
16. Fleisher TA, Madkaikar M y Rosenzweig SD. Application of Flow Cytometry in the Evaluation of Primary Immunodeficiencies. *Indian J Pediatr.* 2016;83(5):444-9. doi:10.1007/s12098-015-2011-0
17. Abraham RS, Aubert G. Flow Cytometry, a Versatile Tool for Diagnosis and Monitoring of Primary Immunodeficiencies. *Clin Vaccine Immunol.* 2016;23(4):254-71. doi:10.1128/CVI.00001-16
18. Vignesh P, Sharma M, Paliana RK, Shandilya JK, Anit K, Rawat A. Myriad Faces of Chronic Granulomatous Disease: All in an Indian Family with Novel CYBB Defect. *J Clin Immunol.* 2019Aug;39(6):611-615. doi: 10.1007/s10875-019-00661-0.
19. Henrickson SE, Jongco AM, Thomsen KF, Garabedian EK, Thomsen IP. Noninfectious Manifestations and Complications of Chronic Granulomatous Disease. *J Pediatric Infect Dis Soc.* 2018;7(S1):S18-24. DOI: 10.1093/jpids/piy014
20. Espinoza G, Butte K, Palma V, Norambuena X, Quezada A. Enfermedad granulomatosa crónica: tres casos clínicos con diferentes formas de presentación. *Rev Chil Pediatr.* 2015;86(2):112-6.
21. Giardino G, Pia M, Delmonte O, Migliavacca M, Palterer B, Loffredo L. NADPH Oxidase Deficiency: A Multisystem Approach. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;ID4590127:1-23.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Contribuciones de los autores

- Gabriela Díaz Domínguez: Concepción del artículo, revisión de la literatura científica, ejecución de las técnicas de laboratorio, análisis e interpretación de resultados, la redacción del manuscrito, la revisión crítica de su contenido y la aprobación de la versión final que va a publicarse.
- Imilla Casado Hernández: Hizo aportes importantes a la concepción del artículo, revisión crítica de su contenido, colaboró en el desarrollo de las técnicas de laboratorio empleadas, en el análisis e interpretación de resultados y aprobación final de la versión que va a publicarse
- Vianed Marsán Suárez: Hizo aportes a la concepción del artículo, revisión crítica de su contenido, aportó los datos de las historias clínicas, en el análisis e interpretación de resultados y aprobación final de la versión que va a publicarse
- Consuelo Macías Abraham: Hizo aportaciones importantes a la conceptualización y diseño de esta investigación, revisión crítica de su contenido y aprobación final de la versión que va a publicarse.