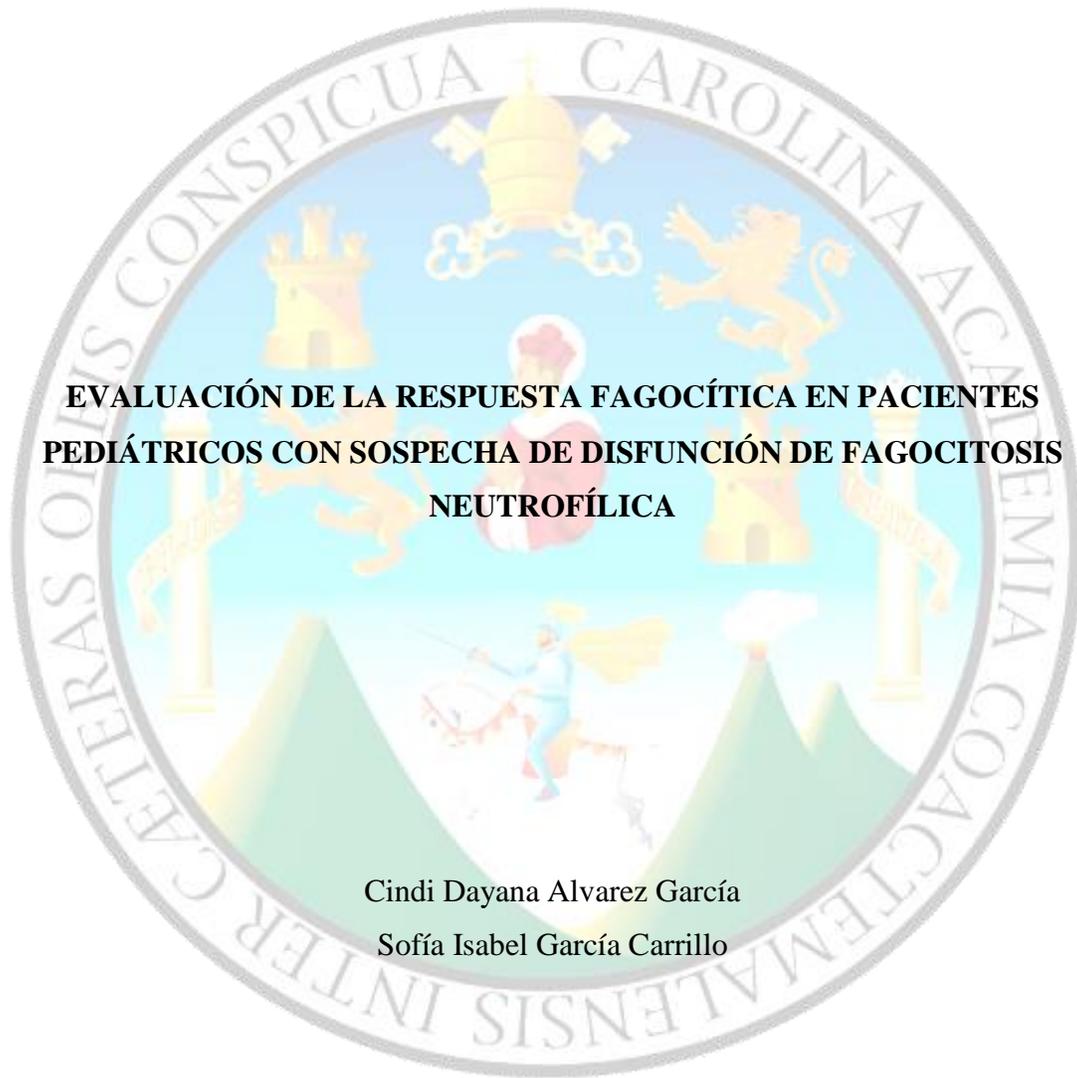


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



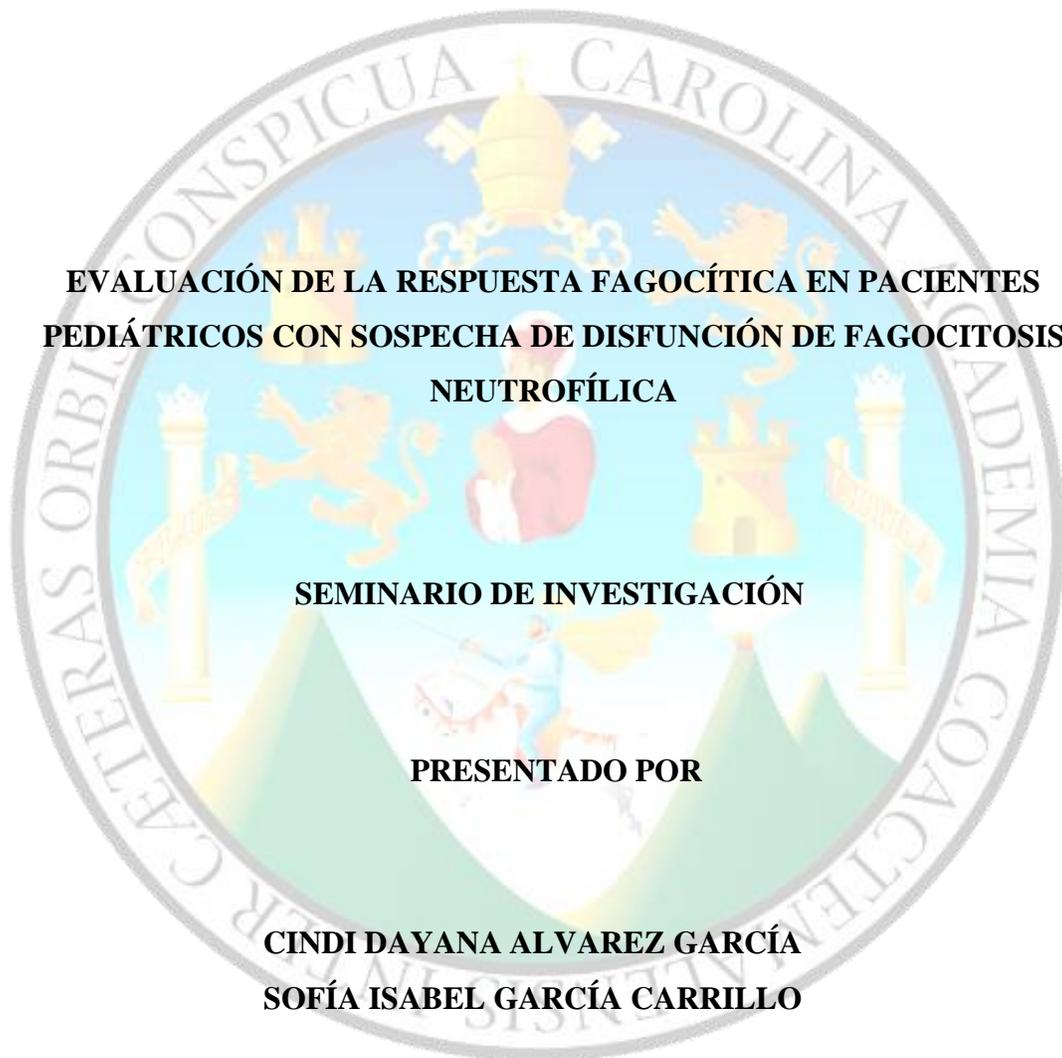
**EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA FAGOCÍTICA EN PACIENTES
PEDIÁTRICOS CON SOSPECHA DE DISFUNCIÓN DE FAGOCITOSIS
NEUTROFÍLICA**

Cindi Dayana Alvarez García
Sofía Isabel García Carrillo

Químicas Biólogas

Guatemala, abril 2022

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**



**EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA FAGOCÍTICA EN PACIENTES
PEDIÁTRICOS CON SOSPECHA DE DISFUNCIÓN DE FAGOCITOSIS
NEUTROFÍLICA**

SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN

PRESENTADO POR

**CINDI DAYANA ALVAREZ GARCÍA
SOFÍA ISABEL GARCÍA CARRILLO**

**PARA OPTAR AL TÍTULO DE
QUÍMICAS BIÓLOGAS**

GUATEMALA, ABRIL 2022

JUNTA DIRECTIVA

M. A. Pablo Ernesto Oliva Soto

Licenciada Miriam Roxana Marroquín Leiva

Doctor Juan Francisco Pérez Sabino

Doctor Roberto Enrique flores Arzú

Licenciado Carlos Manuel Maldonado Aguilera

Bachiller Carmen Amalia Rodríguez Ortiz

Bachiller Paola Margarita Gaitán Valladares

Decano

Secretaria

Vocal Primero

Vocal Segundo

Vocal Tercero

Vocal Cuarto

Vocal Quinto

ÍNDICE

I. RESUMEN	1
II. ÁMBITO DE INVESTIGACIÓN	2
III. ANTECEDENTES	3
A. SISTEMA INMUNOLÓGICO	3
B. INMUNIDAD INNATA	3
C. INMUNIDAD ADQUIRIDA	4
D. FAGOCITOSIS	6
1. Etapas de la fagocitosis	6
2. Células fagocíticas	9
E. PRUEBAS PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD FAGOCÍTICA	13
1. Reducción de nitroazul de tetrazolio (NBT)	13
2. Emisión de quimioluminiscencia	13
3. Tinciones histoquímicas o inmunoquímicas	14
F. DEFECTOS EN LA FAGOCITOSIS	15
1. Enfermedad granulomatosa crónica	15
2. Déficit de las moléculas de adhesión	19
3. Síndrome de Chediak-Higashi	20
4. Déficit de Mieloperoxidasa	22
5. Deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa	23
IV. JUSTIFICACIÓN	25
V. OBJETIVOS	26
VI. HIPÓTESIS	27
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	28
VIII. RESULTADOS	33
IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	37
X. CONCLUSIONES	41
XI. RECOMENDACIONES	42
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
XIII. ANEXOS	48

Anexo 1. Etapas de la fagocitosis	48
Anexo 2. Carta de consentimiento informado	49
Anexo 3. Ficha epidemiológica	51

I. RESUMEN

La función fagocítica neutrofílica se basa en uno de los mecanismos más importantes de defensa contra infecciones en los humanos. Los microorganismos fagocitados se destruyen mediante radicales libres de oxígeno formados por actividad catalítica del complejo enzimático nicotiamida-adenina dinucleotido fosfato (NADPH) oxidasa. Este complejo enzimático puede tener mutaciones en los genes que codifican las subunidades proteicas, provocando así una deficiencia en el estallido respiratorio y por tanto el padecimiento de algún tipo de inmunodeficiencia.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la respuesta fagocítica a través de la prueba de reducción de azul de tetrazolium (NBT) en pacientes pediátricos que tuvieran sospecha de deficiencia en la fagocitosis neutrofílica. Se contó con la participación de 14 pacientes pediátricos, comprendidos en el rango de edad de 0 a 17 años. En relación con la positividad observada por la prueba de NBT el grupo etario mayormente afectado fue el de 6 a 10 años con un total de 3 casos seguido del grupo etario de 0 a 5 años con 2 casos.

Entre las características sociodemográficas se observa que cuatro de los resultados positivos fueron pacientes masculinos (80%), siendo dos de estos casos procedentes del departamento de Sacatepéquez. El 71.43% de los pacientes presentaron de 1 a 3 infecciones en los últimos 6 meses, los motivos de consulta más frecuentes fueron las infecciones de tipo pulmonar, micóticas y de oído con un 35.71%, seguido de los abscesos (28.57%). En cuanto a los síntomas la mayoría presentaba fiebre (42.86%) seguido por el dolor de cabeza (28.57%).

II. ÁMBITO DE INVESTIGACIÓN

La morbilidad en Guatemala es un aspecto a considerar, debido a que la mayoría de los casos reportados se deben a infecciones respiratorias agudas, seguida de la parasitosis intestinal. La alta frecuencia de estas enfermedades ocurre en niños menores de 5 años que tienen una alta exposición a distintos ambientes durante la infancia. El sistema inmunológico es fundamental para la protección contra enfermedades, debido a que su principal función es reconocer y reaccionar contra agentes extraños. Las infecciones respiratorias agudas recurrentes pueden ser causadas por las inmunodeficiencias, primarias o genéticas y secundarias o adquiridas, por lo que un diagnóstico precoz tiene gran importancia, ya que se basa en la prevención de daños crónicos y que alguna entidad, como la enfermedad granulomatosa crónica que se caracteriza por infecciones bacterianas y micóticas a repetición, debido a defectos en el proceso fagocítico, se trate como una emergencia médica.

Por tanto, la evaluación *in vitro* de la respuesta fagocítica puede contribuir a un diagnóstico más certero para los pacientes que presentan infecciones recurrentes, severas o que se sospeche de inmunodeficiencias fagocíticas; esto a su vez puede conducir a medidas profilácticas y terapéuticas oportunas y eficientes, mejorando la calidad de vida para el paciente; además, de reducir costos de hospitalización a largo plazo.

Para la evaluación de la respuesta fagocítica neutrofílica se utilizó el método de reducción de Nitroazul de Tetrazolio (NBT), que ha sido estandarizado e implementado en la Unidad de Investigación en Inmunología y Hematología que funciona en el Departamento de Citohistología (UDIHEMA). El objetivo principal de esta investigación fue evaluar la respuesta fagocítica en pacientes pediátricos con sospecha de deficiencia en la fagocitosis neutrofílica.

III. ANTECEDENTES

A. SISTEMA INMUNOLÓGICO

1. DEFINICIÓN

El sistema inmune es un sistema de defensa versátil, que ha evolucionado para proteger de microorganismos patógenos invasores y células cancerígenas. Es capaz de generar una gran variedad de células y moléculas capaces de reconocer y eliminar específicamente a diferentes agresores (Kindt, Goldsby & Osborne, 2007).

El proceso de una infección ocasiona una cascada de interacciones entre el organismo infeccioso y el hospedero: entrada, invasión y colonización de los tejidos, escape de los mecanismos de defensa del huésped, daño a los tejidos infectados y finalmente, pérdida de las funciones normales del hospedero infectado (Osorio y Yoc, 2018).

Una vez que se reconoce un organismo extraño, el sistema inmunitario recluta una variedad de células y moléculas para montar una respuesta apropiada, llamada respuesta efectora, para eliminar o neutralizar el organismo. De esta manera, el sistema puede convertir el evento de reconocimiento inicial en una variedad de respuestas efectoras, cada una de ellas única y adecuada para eliminar un tipo particular de patógeno. (Kindt et al., 2007).

B. INMUNIDAD INNATA

Se compone de todos aquellos mecanismos que están presentes al nacer, siendo la primera línea contra los microorganismos invasivos. Se caracterizan por estar presente de por vida, no es específica, carece de memoria y no cambia de intensidad con la exposición (Tórtora, 2007; Rojas, 2006).

Se puede considerar que la inmunidad innata comprende cuatro tipos de barreras defensivas: la anatómica, fisiológica, fagocítica e inflamatoria. La barrera anatómica está

formada por la piel y las mucosas, cuya función es retardar la entrada de los microorganismos; la barrera fisiológica esta mediada por la temperatura, el bajo pH y los mediadores químicos que van a provocar la inhibición del crecimiento de ciertos patógenos. La barrera fagocítica/endocítica está formada por varias células que se internalizan y descomponen en macromoléculas extrañas. Las células especializadas como los monocitos, neutrófilos, macrófagos tisulares internalizan, digieren y eliminan a microorganismos completos. Por último, la barrera inflamatoria es causada por el daño tisular y la infección que inducen una fuga de líquido vascular, que contiene proteínas séricas con actividad antibacteriana y la entrada de células fagocíticas (Gallastegui, Bernárdez, Dávila y Leboreiro, s.f.).

C. INMUNIDAD ADQUIRIDA

La inmunidad adquirida es capaz de reconocer y eliminar selectivamente microorganismos y moléculas extrañas. Las respuestas inmunitarias adaptativas no son las mismas en todos los miembros de una especie, sino que son reacciones a desafíos antigénicos específicos. La inmunidad adquirida se diferencia de la inmunidad innata por las siguientes características: requiere contacto previo con el agente (sensibilización), es pequeño el número de célula con especificidad para algún patógeno individual, el mecanismo de defensa se incrementa tras exposiciones repetidas a la misma molécula o agente, cada molécula o agente extraño es reconocido por diferentes células, la respuesta es lenta pero muy eficaz y selectiva (Kindt et al., 2007).

La inmunidad específica tiene dos componentes fundamentales: la humoral que describe la inmunidad creada por lo anticuerpos a través de los linfocitos B diferenciados: IgA (secretora y sérica), IgD, IgE, IgG e IgM y la celular que es adoptada por los linfocitos T, quienes a través de unión con sus receptores determinan la proliferación de ciertos tipos de células y producción de citocinas entre ellos los linfocitos T citotóxicos y los linfocitos T de ayuda (Helper) (Díaz, s.f.).

La inmunidad humoral está representada por la síntesis de inmunoglobulinas por los linfocitos B, los cuales para producir las mismas se transforman y diferencian en células plasmáticas. Estas células se activan por la interacción con los linfocitos T y el antígeno. La primera respuesta ante un antígeno es la producción de IgM (respuesta primaria) y posteriormente la de IgG (respuesta secundaria). Una diferencia fundamental entre el reconocimiento de antígeno por las inmunoglobulinas y por los receptores de células T (TCR), es que las inmunoglobulinas pueden reconocer estructuras tridimensionales complejas, mientras que los TCR reconocen solo epítopos de péptidos lineales cortos (Collado, Porras y Gómez, 2008).

La inmunidad celular es adoptada por los linfocitos T, que se diferencian en el timo. Los linfocitos no diferenciados entran a la corteza del timo donde ellas proliferan y expresan moléculas transmembrana llamadas cluster de diferenciación (CD), entre ellas CD3, TCR, CD4 y CD8. La mayor parte de estas células mueren en el timo, pero una pequeña parte pierde alguno de los marcadores CD4 o CD8. Las células CD4-, CD8+ o CD4+, CD8- son seleccionadas por una interacción con el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I con las células CD4-, CD8+ o MCH clase II con las células CD4+, CD8- del estroma tímico, para dejar este órgano y entrar a la circulación sistémica. Las células maduras que son CD4+ son células de cooperación; aquellas que son CD8+ son citotóxicas/supresoras (Abbas, Lichtman y Pillai, 2015).

Los linfocitos T son células especializadas que después de ser estimuladas por las CPA y ser activadas, responden a los nuevos antígenos mediante la producción o expresión de citoquinas en sus membranas celulares que amplifican o regulan algunos procesos de la respuesta inmune. Además de las funciones efectoras, estas citoquinas toman parte en efectos claves para la proliferación de las células NK, monocitos, linfocitos B y la proliferación de los linfocitos T (Rabinovich, 2004).

D. FAGOCITOSIS

La fagocitosis es un proceso de eventos en secuencia que consisten en englobar partículas o microorganismos, por medio de células especializadas, llamadas fagocitos, para ubicarlas dentro de su citoplasma en vacuolas llamadas fagosomas con el fin de eliminarlos; este proceso junto con la pinocitosis constituye un tipo de endocitosis (Owen, Punt, & Stanford, 2013; Navarrete, Pinilla, Muñoz y Ruíz, 2012; Rugeles, Patiño y Montoya, 2009).

Además, es un componente celular de la inmunidad innata por lo cual tiene función de protección no específica contra agentes infecciosos, moléculas extrañas, entre otros; fue descrito en 1882 por Ellie Metchnikoff (Navarrete et al., 2012).

Las células que pueden llevar a cabo la fagocitosis o fagocitos generalmente son tipos de leucocitos o derivan de ellos y se puede mencionar a los macrófagos, células dendríticas, polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos, basófilos) y mastocitos. A pesar de que pueden haber diferencias entre las células fagocíticas, el proceso de la fagocitosis incluye una serie de etapas que son comunes para muchas de ellas, éstas son la quimiotaxis, la adhesión, la endocitosis (optimiza la opsonización de las partículas), y cambios tanto físicos como bioquímicos intracelulares, los cuales confieren a las células la capacidad de endocitar, matar y digerir a los microorganismos; entre los que se encuentran la formación del fagolisosoma y formación de metabolitos reactivos de oxígeno (Navarrete et al., 2012; Owen et al., 2013).

1. Etapas de la fagocitosis

La fagocitosis consta de ocho etapas (anexo 1), cada una con una función definida para llevar a cabo dicho proceso, estas son:

a. Activación

La activación de las células inmunes se lleva a cabo por los mediadores de la inflamación; la activación de dichas células estimula la producción de receptores

glicoproteicos sobre la membrana citoplasmática de los fagocitos, aumentando su capacidad para adherirse a superficies y reconocer objetos extraños como las bacterias y otros microorganismos. En esta etapa también sucede el llamado “estallido respiratorio”, en el que se producen oxidantes letales, debido a la modificación de su metabolismo de glucólisis anaeróbica a respiración aeróbica. Los productos bacterianos, fragmentos del complemento, leucotrienos y prostaglandinas, son algunos de los mediadores de la inflamación que tienen la capacidad de producir la activación (Rojas y Arce, 2003).

b. Quimiotaxis

Este proceso es el desplazamiento de los fagocitos, los cuales siguen un gradiente químico hacia donde se encuentra una mayor concentración de mediadores de la inflamación, la quimiotaxis se realiza de una forma rápida y eficaz, provocando la acumulación de gran cantidad de fagocitos en el lugar de la infección (Ingraham e Ingraham, 2008).

c. Reconocimiento y adherencia

Esto consiste, tal como dice su nombre en el reconocimiento y adherencia de los fagocitos activados y acumulados en el lugar de la infección, a una amplia variedad de células bacterianas a través de los receptores glicoproteicos, los cuales se encuentran en la membrana celular de las células fagocíticas (Ingraham e Ingraham, 2008).

Dicha unión puede verse afectada si la bacteria posee una cápsula, como es el caso por ejemplo de *Streptococcus pneumoniae*, quien posee una cápsula polisacáridica protectora; o en el caso de que las bacterias posean proteínas especiales como ocurre con la proteína M de *S. pyogenes*; estos mecanismos generan una mayor capacidad del microorganismo para provocar infección (Robonovich, 2004).

Para los casos en los cuales las bacterias poseen cápsulas o proteínas, el reconocimiento y adherencia es más eficiente si se encuentran presentes las llamadas opsoninas, que son moléculas de unión; esto da lugar al denominado proceso de

opsonización, en la cual una parte de la molécula de opsonina se une a la pared de la bacteria y la otra al receptor presente en el fagocito, facilitando el proceso de fagocitosis; las opsoninas de mayor importancia son el complemento y los anticuerpos (Rojas y Arce, 2003).

d. Ingestión

Luego de la adhesión, el fagocito extiende pseudópodos los cuales ayudan englobar las bacterias. Al encontrarse los extremos de los pseudópodos, se fusionan para formar un fagosoma el cual contiene a la bacteria; esta estructura ingresa a la célula al separarse de la membrana celular (Rojas, 2006).

e. Formación de fagosoma

El fagosoma es formado luego de la unión de las proyecciones citoplasmáticas o pseudópodos alrededor de la molécula extraña (Stevens y Lowe, 2001).

f. Formación de fagolisosoma

El fagosoma se une a los lisosomas celulares, formando el fagolisosoma. El movimiento de los gránulos lisosomales es controlado por los microtúbulos de la célula, provocando su unión con la membrana del fagosoma, para posteriormente liberar las enzimas (Spicer, 2009).

g. Muerte

Las sustancias bactericidas presentes en el lisosoma, como la lisozima, ácido láctico, entre otras enzimas y agentes oxidantes, provocan la muerte de la bacteria, al actuar en conjunto esto ocurre en un lapso de 30 minutos o menos. A pesar de ser la fagocitosis un proceso muy eficaz, algunos microorganismos han desarrollado mecanismos que les permiten sobrevivir

e incluso multiplicarse en el interior de los fagocitos, como por ejemplo *Mycobacterium tuberculosis* (Abbas et al., 2015).

h. Eliminación

Luego de matar y digerir a la bacteria el fagolisosoma se fusiona nuevamente con la membrana plasmática de la célula fagocítica, para expulsar aquellos residuos que no pudieron ser digeridos (Ingraham e Ingraham, 2008).

2. Células fagocíticas

a. Macrófagos

Son células fagocíticas que captan microorganismos y otras partículas del medio extracelular, componen el 2-8% de los leucocitos, son agranulares y miden un diámetro entre 25 a 50 μ m; poseen un núcleo grande, único y central. Se forman en la médula ósea, pasan a la sangre donde son llamados monocitos y permanecen máximo 72 horas (Pérez, s.f.).

Algunas de las funciones principales de los macrófagos son captar y degradar a los microorganismos patógenos que ingresan al organismo, secretan moléculas que amplifican la respuesta inmunitaria específica, controlan la inflamación y ayudan en la restauración de tejido dañado al eliminar el tejido muerto (Rojas y Arce, 2003).

Los macrófagos inmaduros son llamados monocitos y están presentes en el torrente sanguíneo, maduran al diseminarse a los diferentes tejidos y órganos, donde además reciben un nombre específico: en el hígado células de Kupfer, bazo y ganglios linfáticos histiocitos sinusales, sistema nervioso células macrogliales y macrófagos células alveolares. Todas estas células constituyen el sistema fagocítico mononuclear antiguamente llamado sistema reticuloendotelial (Kumar, Abbs, Fausto y Mitchell, 2008).

b. Neutrófilos

Los neutrófilos junto a los basófilos y eosinófilos constituyen la serie granulocítica y son leucocitos polimorfonucleares (PMN), grupo celular con núcleos multilobulados y abundantes gránulos citoplasmáticos de tinción característica; representan 50-70% de leucocitos en sangre. Se consideran como la primera línea de defensa ante infecciones bacterianas y fúngicas (Diz, Ocampo y Fernández, 2002; Barbieri, Flores, y Vignoletti, 2005).

Estos tienen su origen en la médula ósea a partir de células madre mieloides, la producción de los granulocitos pasa por dos fases bien diferenciadas: una mitótica y otra no mitótica, cada una dura una semana aproximadamente. El desarrollo morfológico se acompaña de cambios en las propiedades físicas de la célula, aparición de antígenos de superficie y maduración específica; por día se estima una producción de 10^{11} células constituyendo un rango de referencia en plasma de 5000 a 11000 células por mL (Eberl y Davey, s.f.; Alkouwatli et al, 2005).

La función principal de los neutrófilos es la destrucción de moléculas o materiales ajenos al organismo, principalmente microorganismos como bacterias y hongos, además secretan moléculas a la matriz extracelular que actúan como agentes quimiotácticos que atraen a otras células, neutrófilos, macrófagos u otros agentes inflamatorios (Barbieri et al., 2005).

i. Tipos de gránulos

Existen dos tipos de gránulos en los neutrófilos: los peroxidasa positivos o primarios que contienen lisosomas que poseen en su interior hidrolasas, proteasas, mieloperoxidasa, proteínas catiónicas, defensinas, lisozima y mucopolisacárido. Los gránulos peroxidasa negativos o secundarios contienen lactoferrina, lisozima y proteína transportadora de vitamina B12. En la superficie de esta célula se han identificado receptores específicos para

moléculas humorales como IgA, IgG, C3b y varios factores quimiotácticos (Alkouwatli, Leiva, Ruiz y Jiménez, 2005).

c. Eosinófilos

Los eosinófilos son, al igual que los neutrófilos, células granulocíticas y PMN, poseen un núcleo bilobulado, citoplasma con múltiples gránulos que poseen una zona central densa constituida por una proteína básica que se tiñe con eosina y muchas enzimas líticas, que incorporan la fosfatasa ácida, la peroxidasa y las proteasas. Estas células tienen un tamaño promedio de 12-17 μ m de diámetro (Ingraham e Ingraham, 2008).

Una persona tiene aproximadamente 200 eosinófilos por cada microlitro de sangre, 5% del total de leucocitos; estos se originan en la médula ósea y su diferenciación está dirigida por el factor de células troncales, IL-3, IL-4 y factor de estimulación de colonias granulocito-macrófago; la diferenciación terminal y liberación al torrente sanguíneo es llevada a cabo por CCL11 e IL-5 (Brito et al., 2003)

Los eosinófilos actúan en defensa frente a parásitos helmínticos, respuestas alérgicas al ser células efectoras de hipersensibilidad inmediata e inflamación de tejidos; dichas funciones se llevan a cabo por medio de la liberación de los gránulos específicos (Bellanti, 2008)

d. Células dendríticas

Estas son células conocidas por su capacidad de presentar antígeno, poseen una morfología característica formando en su membrana velos, pseudópodos o dendritas; cuentan con organelas relacionadas a procesamiento antigénico como lisosomas, endosomas y los gránulos de Bierbeck (Vázquez, Sureda y Rebollo, 2012).

Las células precursoras de las células dendríticas migran desde la médula ósea hasta el torrente sanguíneo, a partir de ahí se dirige a cualquier tejido no linfóide, donde residen

como células inmaduras, y encuentran su ambiente mediante procesos de endocitosis, macropinocitosis y fagocitosis. Las células dendríticas plasmocitoides y mieloides expresan un conjunto de moléculas necesarias para la estimulación de los linfocitos T vírgenes (González, Castro, Vera, Tamez, Rodríguez y Rivera, 2008).

Son las células presentadoras de antígeno (CPA) más potentes, se caracterizan por captar el antígeno, procesarlo y presentarlo a las células T, se diferencian en la expresión de marcadores superficiales, localización, funciones inmunológicas especializadas, rutas de señalización y estímulo para su generación. En el desarrollo de la respuesta inmunitaria adaptativa el fenotipo y la función de estas células tienen un papel clave en la iniciación de tolerancia, memoria y diferenciación de fenotipos Th1, Th2 y Th17 (Roghianian, s.f.).

e. Mastocitos

Los mastocitos son células residentes de los tejidos, que poseen un papel importante en las reacciones inflamatorias. Los mastocitos se encuentran en los lugares que sirven como barreras entre los tejidos y el exterior, como la mucosa intestinal, pulmonar, la piel e incluso rodeando los vasos sanguíneos. Los mastocitos son originados en la médula ósea para luego ser liberados al torrente sanguíneo como progenitores y no completan su maduración hasta ser reclutados en los tejidos donde se podrán diferenciar (Weller, s.f.).

Los mastocitos secretan citocinas: IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, el factor de necrosis tumoral alfa (FNT α), heparina e histamina. Los mastocitos localizados en piel, sistema digestivo y terminales nerviosas son considerados como la primera línea de defensa contra bacterias y parásitos, por medio de la fagocitosis y la quimiotaxis (Navia y Vásquez, 2011).

E. PRUEBAS PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD FAGOCÍTICA

1. Reducción de nitroazul de tetrazolio (NBT)

El nitroazul de tetrazolio es una sustancia incolora que posee un color azul-negro cuando es reducido, debido a la gran avidez de los iones de hidrógeno que se encuentran en el interior de los leucocitos durante el proceso de fagocitosis (Restrepo, Agudelo, Molina y Aristizabal, 2007).

En 1967 se demostró que una pequeña proporción de PMN reducen *in vitro* espontáneamente el NBT, formando en su interior un precipitado insoluble de formazan, esto debido al estímulo de la fagocitosis. La reducción del colorante dentro del neutrófilo depende de la cantidad de la presencia y actividad de la enzima NADPH oxidasa, por la vía hexosa monofosfato que se estimula durante la fagocitosis. La reducción del NBT se encuentra elevada en los neutrófilos de la sangre periférica en presencia de infecciones bacterianas, demostrando que es una prueba de diagnóstico rápido para infecciones y evaluación de la fagocitosis (Restrepo et al., 2007).

2. Emisión de quimioluminiscencia

La quimioluminiscencia se define como la producción química de luz. Ciertas sustancias tienen la propiedad de emitir luz cuando absorben energía de la reacción oxidativa de su propia molécula, son colocadas en estado de excitación electrónica. La emisión de luz se producirá al volver a su estado basal, con lo que la energía química absorbida se cederá en forma de fotones fácilmente cuantificables. La producción de luz de los compuestos quimioluminiscentes son destruidos en el proceso, mientras que los fluorescentes no (Bagazgoitia, García y Diéguez, 1997).

La molécula quimioluminiscente más estudiada y utilizada como marcador de diversos inmunoanálisis ha sido el luminol y sus derivados: isoluminol y aminobutil etil isoluminol (ABEI). La exposición de PMN hacia el antígeno genera una estimulación del

metabolismo oxidativo, que resulta en producción de radicales libres, esto es detectado por medio de un contador de centelleo o en un luminómetro, la luz quimioluminiscente emitida durante la reacción de los radicales con otras moléculas. La señal quimioluminiscente se amplifica con la adición de luminol al medio de la reacción, oxidándose, emitiendo fotones lo que provoca que el rendimiento cuántico de la reacción aumente (García, 2000).

3. Tinciones histoquímicas o inmunoquímicas

a. Peroxidasa leucocitaria

Para evidenciar la existencia de esta enzima, se basa en la acción oxidante de la misma sobre el sustrato bencidina en presencia de peróxido de hidrógeno. El resultado positivo de la reacción se manifiesta por la aparición de un precipitado amarillento-ocre en el citoplasma. La reacción de la peroxidasa es positiva en las células de serie granulocíticas en todos los estadios de maduración. Es utilizada para diagnóstico de leucemia aguda y se considera positiva si la muestra posee 3% o más peroxidasa en las células blásticas (Universidad Autónoma de Yucatán, s.f.).

b. Tinción Romanowsky

La lactoferrina es considerada un componente específico de los gránulos que se sintetizan en los neutrófilos, por lo que se emplea la tinción de Romanowsky que se basa en una mezcla de azul de metileno y eosina. La tinción permite diferenciar forma, tamaño y contorno de las células sanguíneas. Se caracteriza por teñir los núcleos y los gránulos de los neutrófilos de color púrpura, así como rosa los eritrocitos. Los ácidos nucleicos, proteínas y el citoplasma se tiñen de azul, evidenciando a posibles parásitos (Carr y Rodak, 2010).

F. DEFECTOS EN LA FAGOCITOSIS

Las deficiencias del sistema inmune pueden estar causadas debido a una disfunción completa o parcial de algunos órganos linfoides; las cuales se caracterizan porque el paciente presenta deprimidos o ausentes sus mecanismos defensivos específicos. Estas pueden ser clasificadas en congénitas o adquiridas, o bien primarias y secundarias respectivamente; además de acuerdo con la evolución pueden ser permanentes o transitorias.

Los defectos en la función fagocítica constituyen un subgrupo de las llamadas inmunodeficiencias primarias o congénitas, que constituyen un grupo heterogéneo de desórdenes hereditarios que pueden afectar tanto la inmunidad celular como la humoral; en pacientes con funciones normales de las células linfoides (García, 1997).

Los fagocitos, mononucleares y PMN, pueden tener alteradas sus funciones en diversas etapas del proceso fagocítico; por ejemplo:

- Defectos en la movilidad
- Defectos en los receptores específicos de factores quimiotácticos
- Defectos en la fusión y formación de fagosomas
- Defectos en la fusión de gránulos con fagosoma: Degranulación
- Enzimas defectuosas en los gránulos
- Defectos en la formación de agentes oxidantes

(Parslow, Stites, Terr e Imboden, 2002; García, 1997).

1. Enfermedad granulomatosa crónica

a. Inmunopatología

Es un trastorno genético que se caracteriza por la presencia de mutaciones en los genes que codifican las subunidades que conforman la nicotinamida adenina dinucleótido fostato (NADPH) oxidasa. Se caracteriza por una elevada susceptibilidad a infecciones bacterianas y micóticas graves, recurrentes en pacientes de corta edad, además de la

formación de granulomas en distintas partes del cuerpo (Robinson, 2009; Cos, Marsán, Sánchez y Macías, 2004).

Esta enfermedad fue descubierta en 1954 por Janeway, a la cual denominó: “enfermedad granulomatosa fatal de la infancia”, pero desde esa fecha la comprensión de la enfermedad y diagnóstico oportuno han permitido una supervivencia para los pacientes que la padecen (Álvarez, Yamazaki y Espinosa, 2009).

Existe un defecto en el sistema NADPH, el cual juega un papel importante para las células fagocíticas (neutrófilos y monocitos), en el estallido respiratorio que junto a otros radicales y especies reactivas funcionan como agentes microbicidas. Por tanto, a pesar de poder endocitar los microorganismos, son incapaces de destruirlos (Cos et al., 2004)

b. Manifestaciones clínicas

Éstas pueden aparecer desde la etapa lactante o la edad adulta; aunque el 95% de los casos se diagnostican antes de los cinco años. Las principales manifestaciones son debidas a procesos infecciosos repetidos y graves. Entre los microorganismos implicados en la mayoría de las infecciones se encuentran: *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia*, *Serratia marcescens*, *Nocardia* y *Aspergillus* (Álvarez et al., 2009).

Los sitios más frecuentes para estas infecciones son la piel, pulmones, ganglios linfáticos e hígado, generalmente asociados a neumonías. En los niños que presentan la enfermedad ligada al cromosoma X su inicio tiende a ser más temprano, presentando manifestaciones más graves como afección al órgano por granulomas, lo cual implica una morbilidad y mortalidad más elevada (Muñoz, Botello, Casas, Díaz y Ortega, 2015).

Los pacientes con esta enfermedad, presentan como principal causa de muerte las infecciones micóticas, así como una afección ósea debida a la proximidad que tienen los pulmones con las costillas; presentando entre los primeros agentes causales a *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus nidulans*, este último asociado únicamente a la enfermedad

granulomatosa crónica; la mortalidad ha sido demostrada debido a un proceso inflamatorio excesivo, estas observaciones contribuyen al conocimiento acerca del doble papel que desempeña la NADPH oxidasa como un mediador en la respuesta innata y un regulador del proceso inflamatorio (Álvarez et al., 2009).

Además de las manifestaciones pulmonares, también puede haber afección del aparato gastrointestinal y genitourinario, aunque pueden pasarse por alto a lo largo de la evolución de la enfermedad. Las manifestaciones gastrointestinales se presentan por procesos de malabsorción o incluso granulomas a lo largo del tubo gastrointestinal, vómitos matutinos o dolor abdominal leve intermitente, dichas manifestaciones se han reportado hasta en un 32% de los pacientes (Muñoz et al., 2015).

c. Patrones de herencia

El 75% de los casos es heredado de manera recesiva ligado al cromosoma X, debido a defectos de este cromosoma, aunque también pueden ser debido a otros rasgos autosómicos recesivos distintos a los cromosomas X (IPOPI, 2007).

d. Diagnóstico

Es realizado por medio de la prueba cualitativa de la reducción del colorante NBT o la quimioluminiscencia cuantitativa, esta última permite detectar la condición de portador. Para diferenciar si la EGC está ligada al cromosoma X o al defecto autosómico recesivo, se utiliza el ensayo de dihidrorodamina 123 (DHR) (Cos et al., 2004).

e. Tratamiento

Puede iniciarse con administración de antibióticos dirigidos a los organismos más frecuentes, cuando aún no se obtienen resultados; en el pasado se realizaba transfusión de granulocitos cuando la terapia con antibióticos no era efectiva; dicho procedimiento dejó de ser necesario al crearse antibióticos y antimicóticos más potentes (IPOPI, 2007).

Existen pacientes más susceptibles que otros a las infecciones, como es el caso de los niños quienes pueden sufrir infecciones con mayor frecuencia, por lo que es recomendable la profilaxis, por medio de administración continua de antibióticos orales. El antibiótico de mayor eficacia para la prevención de infecciones bacterianas en pacientes con EGC y otras enfermedades, es una combinación de trimetoprima/sulfametoxazol, también llamada cotrimoxazol; dicho medicamento puede reducir hasta un 70% la frecuencia de las enfermedades bacterianas; además este es seguro y eficaz porque proporciona protección a los patógenos más frecuentes, sin tener muchos efectos sobre la microbiota intestinal, por otra parte los microorganismos que afectan al paciente no suelen ser resistentes (Espinoza, Butte, Palma, Normabuena y Quezada, 2015).

Otro tipo de tratamiento que puede ser administrado es el interferón gamma (INF γ), pues se ha comprobado que reduce las enfermedades hasta un 70% o al ocurrir suelen ser menos graves; a pesar de que los pacientes con EGC no carecen de INF γ , este puede aumentar la inmunidad de varias formas compensando de esta manera el déficit en la producción de peróxido de hidrógeno, que provoca la incapacidad de completar la fagocitosis (Álvarez et al., 2009; IPOPI, 2007).

En cuanto a las infecciones fúngicas, se ha demostrado que dosis orales del antimicótico itraconazol, reduce su frecuencia. Así que la profilaxis máxima para los pacientes es el tratamiento con dosis diarias de cotrimoxazol e itraconazol, además de inyecciones con interferón gamma tres veces al día, lo cual puede reducir las infecciones graves hasta una cada cuatro años (Espinoza et al., 2015).

La cura de la mayoría de los defectos relacionados a la fagocitosis se logra a través del trasplante de médula ósea, pero dicho tratamiento no es muy utilizado debido a que muchos pacientes no cuentan con antígeno leucocitario humano (HLA) compatible, además obtienen buenos tratamientos con el método convencional y no quieren atravesar los riesgos que conlleva el trasplante (Muñoz et al., 2015).

f. Pronóstico

La calidad de vida en estos pacientes ha mejorado considerablemente, debido al conocimiento de las anormalidades fagocíticas, además de la administración de las terapias antibióticas de manera adecuada y temprana. La esperanza de vida de muchos niños para llegar a la vida adulta ha aumentado en comparación de hace 20 años; para los pacientes de mayor susceptibilidad pueden ser necesarias hospitalizaciones recurrentes para detectar infecciones y realizar monitoreos más rigurosos. El número de infecciones suele disminuir al llegar a la adolescencia (IPOPI, 2007).

2. Déficit de las moléculas de adhesión

a. Inmunopatología

También llamado déficit de adhesión leucocitaria (LAD), se caracteriza por presentar una deficiencia en la movilidad, adhesión, invasión y endocitosis de los leucocitos en los sitios de infección (Cos et al., 2004).

Tipo 1: Está causado por una alteración en la síntesis de la cadena B, común (CD18) de las llamadas beta 2 integrinas las cuales están presentes en todos los leucocitos. En esta enfermedad los leucocitos pueden expresar solamente un 10% de moléculas en los casos moderados; dicho defecto afecta la movilidad, adherencia y endocitosis de los fagocitos, por lo cual los pacientes presentan infecciones bacterianas severas y leucocitosis importantes (Caragol, Urbano, Gil y Hernández, 1999).

Tipo II: En este tipo el defecto en la adhesión está ligado a las selectinas, debido a la existencia de un defecto en la producción de fucosa a partir de manosa (Caragol et al., 1999).

b. Manifestaciones clínicas

Puede afectar a ambos sexos, retardo en la separación del cordón umbilical, principalmente los pacientes presentan infecciones recurrentes por *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Proteus*, entre otros patógenos. Además, sufren de otitis media, gingivitis, traqueobronquitis, septicemias, vaginitis y neumonías (Rojas y Arce, 2003).

c. Diagnóstico

Se trata en detectar la presencia o no del antígeno CD18 en la membrana de los leucocitos y esto se realiza por citometría de flujo, también puede realizarse el estudio genético, ya que se conoce la localización del gen (Caragol et al., 1999).

d. Tratamiento

Deben tratarse de manera intensiva las infecciones cutáneas con una serie de antibióticos debido a su mala cicatrización; algunos casos utilizan antibióticos de manera profiláctica; disminuyendo así el riesgo de infecciones o bien otros llevan a cabo transfusiones de granulocitos; el trasplante de médula ósea también se ha llevado a cabo en los pacientes con LAD 1, que constituye el único tratamiento curativo (Caragol et al., 1999).

e. Pronóstico

Los pacientes pueden llevar a cabo una vida con normalidad debido a la efectividad que poseen los antibióticos sobre las infecciones; sin embargo, los pacientes que llevan a cabo profilaxis tienden a disminuir aún más su frecuencia de infecciones (Caragol et al., 1999).

3. Síndrome de Chediak-Higashi

a. Inmunopatología

Es una enfermedad rara, autosómica recesiva, caracterizada por presentar una lisis defectuosa de las bacterias fagocitadas, dando paso a una serie de infecciones bacterianas recurrentes, especialmente de tipo bacteriano. Es causado por una mutación en el gen *LYST* (Regulador de tráfico lisosomal: *CHSI*). En esta enfermedad los lisosomas son anormales, debido a ello no pueden fusionarse con los fagosomas y por tanto las bacterias no son lisadas (Fernández, s.f.).

b. Manifestaciones clínicas

Presenta albinismo oculocutáneo y susceptibilidad a las infecciones recidivas tanto respiratorias como de otros tipos; en algunos pacientes, casi el 50%, puede presentar una fase acelerada en la cual hay fiebre, ictericia, hepatoesplenomegalia, adenopatías, cambios neurológicos y otros; lo cual puede llegar a ser mortal en 30 meses (Fernández, s.f.).

c. Diagnóstico

Por medio de frotis sanguíneos puede observarse gránulos gigantes, positivos para la tinción con peroxidasa. La exploración de la quimiotaxis en cámara de Boyden y la ventana cutánea, son algunas de las pruebas inmunológicas utilizadas (Cos et al., 2004).

d. Tratamiento

Trasplante temprano de médula ósea constituye el tratamiento correctivo, aliviando los defectos inmunológicos; pero no corrige ni evita de la anormalidad pigmentaria, ni evita el desarrollo de defectos neurológicos. En fase acelerada se ha utilizado aciclovir, γ -globulina intravenosa en altas dosis, ciclosporina y prednisona para controlarla (Wolff, Goldsmith, Katz, Gilchrest, Paller, Leffell, 2009).

e. Pronóstico

Con un trasplante temprano el paciente puede aliviar los defectos inmunológicos, pero cuando se encuentra en fase acelerada tiende a ser fatal (Wolff et al., 2009).

4. Déficit de Mieloperoxidasa

a. Inmunopatología

Es una de las alteraciones más frecuentes en los neutrófilos, esta enzima cataliza la formación de hipoclorito y se encuentra principalmente en los basófilos. La mieloperoxidasa está involucrada en la destrucción de los microorganismos, como bacterias, hongos, virus, glóbulos rojos y células malignas; a pesar de las actividades en las que está implicada la mieloperoxidasa, los pacientes que presentan su deficiencia no presentan un aumento en la frecuencia de infecciones (Diz et al., 2002).

La mieloperoxidasa se encuentra en los gránulos azurófilos de los neutrófilos y lisosomas de los monocitos; proporciona al peróxido producido por los lisosomas una mayor actividad bactericida, al unirse con átomos halogenados, por lo que su deficiencia afecta la vía NADPH (Staines, González, Guidos, Hernández, Espinosa y Espinosa, 2005).

b. Manifestaciones clínicas

Las infecciones presentadas en esta enfermedad son de una frecuencia y gravedad menor, que las presentadas en la EGC. Hay un predominio de infecciones causadas por *Candida* en pacientes con diabetes mellitus; además los pacientes con esta deficiencia pueden presentar aterosclerosis, cáncer de hígado, Alzheimer y enfermedades neurológicas degenerativas; en aquellos pacientes cuya enzima tiene deficiencia total han presentado alta incidencia en tumores malignos (Cos et al., 2004).

c. Diagnóstico

Se puede evaluar las células deficientes en mieloperoxidasa a través de la quimioluminiscencia, colorantes de peroxidasa en frotis sanguíneos (tinción histoquímica) o citometría de flujo (Cos et al., 2004).

d. Tratamiento

Está basado en medidas profilácticas, por medio de la administración de antibióticos, un mejor tratamiento sería la administración de las enzimas deficientes, el cual aún continúa en investigación (Cos et al., 2004).

e. Pronóstico

La mayoría de los pacientes puede ser asintomáticos y llegar a tener una vida normal; únicamente para aquellas personas que tienen otra enfermedad que condicione el sistema inmunológico, por ejemplo, diabetes, pueden presentar infecciones recurrentes y necesitar vigilancia continua (Díaz, Ocampo y Fernández, 2002).

5. Deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa

a. Inmunopatología

Este es un defecto de origen hereditario recesivo, ligado al cromosoma X; la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD) está estrechamente relacionada con la producción de NADPH; por lo que en niños puede haber infecciones recurrentes a causa de la falta de NADPH, al existir una fuerte deficiencia en G6PD, la reducción de NADPH a su vez disminuye la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), afectando la actividad microbicida de los neutrófilos.

b. Manifestaciones clínicas

Esta enfermedad se diferencia de la EGC únicamente porque los síntomas que aparecen en las etapas de vida más avanzada de los pacientes. Otras manifestaciones son: fatiga, dificultad respiratoria, taquicardia, ictericia y agrandamiento del bazo (Cos et al., 2004).

c. Diagnóstico

Se realiza por medio de la medición de la actividad enzimática de la G6PD y su variante es determinada por electroforesis (Cos et al., 2004).

d. Tratamiento

No existe tratamiento curativo, únicamente profiláctico a través de la administración de antibióticos y tratamiento (Staines et al., 2005).

e. Pronóstico

Cuenta con un buen pronóstico, a menos que presente complicaciones como anemia (Staines et al., 2005).

IV. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades de mayor prevalencia en Guatemala son las enfermedades gastrointestinales y las respiratorias, esta última puede complicarse y causar neumonía. Las enfermedades gastrointestinales son la primera causa de morbilidad y las enfermedades respiratorias son la segunda causa de mortalidad. Según el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS), los casos de infecciones respiratorias agudas afectan más a los niños menores de cinco años, con similar frecuencia en ambos sexos. Algunas de estas infecciones respiratorias pueden ser repetitivas, por muchas causas, como pueden ser los defectos en la actividad fagocítica, que constituyen un grupo de inmunodeficiencias primarias (MSPAS, 2017; Guntiñas, 2003)

Para los casos de infecciones recurrentes y/o severas es recomendado evaluar *in vitro* la respuesta fagocítica, lo cual permite establecer un diagnóstico más certero y rápido, esto a su vez ayudará a dar un tratamiento oportuno y adecuado al paciente. Una de las pruebas recomendadas para la evaluación *in vitro* de la respuesta fagocítica es el método de reducción de nitro azul de tetrazolio (NBT), que actualmente no es utilizada en los centros hospitalarios, debido a su alto coste y falta de estandarización.

Recientemente el método de NBT ha sido estandarizado e implementado en la Unidad de Investigación en Inmunología y Hematología (UDIHEMA), pudiendo por tanto ser utilizado en aquellos pacientes con infecciones recurrentes y con granulomas, que asistan a la consulta externa de Alergias e Inmunología, Unidad de Pediatría del Hospital Roosevelt, y crear el primer registro de pacientes pediátricos con disfunción en la actividad fagocítica.

V. OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la respuesta fagocítica en pacientes pediátricos con sospecha de deficiencia en la fagocitosis neutrofilica.

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la respuesta fagocítica de pacientes pediátricos con granulomas e infecciones recurrentes utilizando la reducción de nitroazul de tetrazolio (NBT).
2. Establecer la prevalencia de la disfunción fagocítica en los pacientes evaluados con sospecha de deficiencias en la fagocitosis neutrofilica.
3. Asociar las variables de la ficha epidemiológica con la prevalencia establecida de la disfunción fagocítica.

VI. HIPÓTESIS

En el presente estudio no se plantea hipótesis por ser de tipo descriptivo.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. UNIVERSO Y MUESTRA

1. Universo de trabajo

Población pediátrica que asistió al Hospital Roosevelt.

2. Muestra

Se incluyó a todos los pacientes pediátricos, que oscilaban entre 0 a 17 años, que asistieron a la Consulta Externa de Alergias e Inmunología, Departamento de Pediatría, Hospital Roosevelt durante octubre del 2020 a Abril 2021 con sospecha de disfunción fagocítica neutrofílica.

a. Criterios de inclusión

- Pacientes comprendidos entre las edades de 0 a 17 años.
- Aquellos que padecían de infecciones recurrentes.
- Que hayan asistido al Hospital Roosevelt.
- Que hayan asistido a la Consulta externa de alergias e Inmunología.
- Que hayan firmado el consentimiento informado los padres o tutores.

b. Criterios de exclusión

- Edad mayor a 17 años.
- Pacientes que no hayan asistido a la Consulta externa de alergias e Inmunología.
- Pacientes que no hayan firmado el consentimiento informado los padres o tutores.
- Aquellos cuyos padres o tutores no firmarán el consentimiento informado.

B. RECURSOS

1. Recursos Humanos

a. Seminaristas

- Cindi Dayana Alvarez García
- Sofía Isabel García Carrillo

b. Asesores

- M.A. Isabel Cristina Gaitán Fernández, QB.
- Lic. Pablo Alfonso Tzorín Velásquez, QB.

2. Recursos Institucionales

- Departamento de Citohistología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala
- Consulta Externa de Alergias e Inmunología, Departamento de Pediatría, Hospital Roosevelt

3. Recursos Físicos

a. Equipo

- Cabina de Bioseguridad con flujo laminar
- Centrífuga
- Incubadora a 37°C
- Microscopio

b. Cristalería

- Probeta de 10 mL
- Tubos de ensayo

c. Materiales de Laboratorio

- Aguja de 22 G ½
- Algodón
- Bolsas Negras
- Bolsas Rojas
- Guantes de Latex
- Jeringa de 10 mL
- Láminas portaobjetos
- Marcador indeleble
- Pipeta automática de 5 a 20 uL
- Pipeta automática de 10 a 100 uL
- Pipeta automática de 500 a 1000 uL
- Pipetas Pasteur de 3 mL
- Tubo cónico de centrifugación de 15 mL
- Tubos con anticoagulante de EDTA/K2

d. Reactivos

- Alcohol etílico al 70%
- Tinción de Wright
- Aceite de inmersión
- Suspensión de cepa de *Staphylococcus xylosus* ATCC 29971
- Solución salina 0.85%
- Estándar de McFarland 0.5 de *Escherichia coli* ATCC 25922
- Nitroazul de tetrazolio al 0.15%
- Histopaque® 11-19

C. METODOLOGÍA

Se inició con una reunión con los padres de familia o tutores de los pacientes pediátricos para explicarles la importancia del estudio y la manera en la que se realizaría el

mismo. Se les presentó el consentimiento informado para que los niños pudieran participar en el estudio (anexo 2). Posteriormente se procedió a llenar una ficha con las características demográficas y clínicas de los pacientes con sospecha de disfunción fagocítica neutrofílica (anexo 3).

1. Toma de muestra

Se llevó a cabo la extracción de 8 mL de sangre en tubos con anticoagulante EDTA/K2 por medio de venopunción, utilizando aguja de 22 G ½.

2. Técnica de Ficoll Histopaque 11-19

- Se añadió 3 mL de Histopaque® 11-19 a un tubo cónico de centrifugación de 15 mL.
- Se agregó cuidadosamente al tubo anterior, 6 mL de sangre completa, formando una capa sobre el Histopaque® 11-19 previamente añadido.
- Se centrifugó a 700 rpm durante 50 minutos a temperatura ambiente.
- Se retiró el tubo de la centrífuga cuidadosamente.
- Se separó la capa de granulocitos y se transfirió a un tubo sin anticoagulante. Los granulocitos se encuentran justo en la capa antes del paquete globular.
- Se realizó el lavado de células, adicionando 4 mL de solución salina.
- Se centrifugó por 10 min a 200 rpm.
- Se aspiró el sobrenadante y se descartó.
- Se resuspendió las células suavemente con una Pipeta Pasteur de 3 mL.
- Se repitió el procedimiento 2 veces más, a partir del lavado con solución salina.
- Se resuspendió las células en 4 mL de solución salina.

3. Ensayo de reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT)

- Se preparó una suspensión de Escherichia coli ATCC 25922 equivalente al 0.5 en la escala de McFarland.

- Se mezcló 10 uL de suspensión de *Staphylococcus xylosus* ATCC 29971 y 100 uL de neutrófilos aislados con Histopaque® 11-19.
- Se incubó por 20 min a temperatura ambiente.
- Se adicionó 100 uL de nitroazul de tetrazolio al 0.5%.
- Se incubó por 15 min a 37°C.
- Se realizó frotos de la suspensión por triplicado y un control negativo.
- Se tiñó con coloración de Wright.
- Se observó al microscopio en objetivo 100x y se contó el % de neutrófilos con gránulos.

D. DISEÑO DE ESTUDIO

El presente estudio es descriptivo y prospectivo. Los datos obtenidos se tabularon con el programa Microsoft Excel 2013 y se analizaron con el programa Epi Info versión 7.2.

Mediante el ingreso de los pacientes se estimó la frecuencia con un intervalo de confianza del 95%. Los resultados obtenidos se reportaron mediante frecuencias y porcentajes, representados a través de tablas. La asociación de las variables de la ficha epidemiológica se realizó por medio de tablas de contingencia.

VIII. RESULTADOS

El presente estudio contó con la participación de 14 pacientes, niños comprendidos entre la edad de 0 a 17 años, que asistían a la Consulta Externa de Alergias e Inmunología del Departamento de Pediatría, Hospital Roosevelt, y presentaban sospecha de disfunción fagocítica neutrofílica por la presencia de infecciones micóticas, infecciones respiratorias recurrentes y abscesos. Entre las características sociodemográficas se observa que la población mayoritariamente afectada en cuanto a disfunción fagocítica fue el grupo etario de 6 a 10 años con 3 resultados positivos para NBT (60%); de acuerdo con los resultados positivos 4 pacientes fueron masculinos (80%), mostrando un predominio para este género, 2 de los casos captados eran procedentes de Sacatepéquez (40%). (Tabla 1)

Tabla 1. Características sociodemográficas de la población a estudio (N=14)

Característica	Negativos		Positivos	
	N	%	N	%
Género				
Femenino	3	33.33	1	20
Masculino	6	66.67	4	80
Edad				
Menores de 1 año	3	33.33	1	20
1 a 5 años	3	33.33	1	20
6 a 10 años	2	22.22	3	60
Mayores de 10 años	1	11.12		
Residencia				
El Progreso				
Escuintla	1	11.11	1	20
Guatemala	6	66.67		

Petén	1	11.11	1	20
Sacatepéquez			2	40
Santa Rosa			1	20
Suchitepéquez	1	11.11		

*N= Número, %=Porcentaje

Fuente: Ficha epidemiológica.

En la tabla 2, se observa las manifestaciones clínicas de los pacientes incluidos en el estudio mostrando un predominio de pacientes con 1 a 3 infecciones en los últimos 6 meses, siendo de 71.43%, en cuanto a la frecuencia con la que asistían al médico, la mayoría de los pacientes reportaron una frecuencia de asistencia de una vez al mes (28.53%).

Entre los motivos de consulta al médico las infecciones (pulmonares, micóticas y de oído) eran el motivo de consulta principal (35.71%), seguido por los abscesos (28.57%). Por último, la fiebre se encontraba en la mayor parte de los síntomas que reportaron los pacientes incluidos (42.86%) al igual que el dolor de cabeza (28.57%).

Tabla 2. Presentación clínica de los pacientes con sospecha de disfunción fagocítica neutrofílica.

Variable	N	%
Número de infecciones en los últimos 6 meses		
1-3	10	71.43
4 o más	4	28.57
Frecuencia de asistencia el médico		
Internado	2	14.29
Cada semana	3	21.43
Cada mes	4	28.56
Cada 3 meses	2	14.29
Cada 6 meses o más	3	21.43
Motivo de consulta		
Abscesos	4	28.57
Celulitis	3	21.43

Lesiones	2	14.29
Infecciones	5	35.71
Síntomas		
Fiebre	12	42.86
Dolor de cabeza	8	28.57
Mareos	2	7.14
Debilidad	2	7.14
Diarrea	3	10.72
Tos	1	3.57

*N= Número, %=Porcentaje

Fuente: Ficha epidemiológica.

En la tabla 3 se muestra la frecuencia de pacientes con disfunción fagocítica neutrofílica siendo en total 5 pacientes (35.71%) con esta enfermedad, ya que presentaron resultados por debajo del valor de referencia (50%) para la prueba de NBT, lo que evidencia la presencia de esta enfermedad.

Tabla 3. Frecuencia de pacientes con disfunción fagocítica neutrofílica (N=14)

Prueba de NBT	N	%	IC 95%*	Límite inferior	Límite superior
Positivo	5	35.71%	26.05	12.76	64.86
Negativo	9	64.29%	26.05	35.14	87.24

*N= Número, %=Porcentaje, *IC= Intervalo de Confianza

Fuente: Datos experimentales.

Con respecto a los pacientes que presentaron un resultado positivo para la prueba de NBT y por tanto sospecha de disfunción neutrofílica, se hizo un reporte extensivo por cada caso, recopilando la información relevante obtenida en la ficha epidemiológica y las historias clínicas (Tabla 4).

Dentro de los síntomas que presentaron los pacientes se encontraban: fiebre, dolor de cabeza, mareos, debilidad y tos; algunos de ellos presentaban ciertas características clínicas

como: neumonía, abscesos, linfadenopatías y tuberculosis, siendo en algunos casos la causa de la consulta médica.

Tabla 4. Manifestaciones clínicas reportadas en pacientes con resultados positivos para la disfunción fagocítica neutrofílica

Paciente	Síntomas	Características clínicas
1	Fiebre, dolor de cabeza, mareos, debilidad	Absceso cerebral y cardiopatía.
2	Tos, fiebre	Neumonía.
3	Fiebre, dolor de cabeza	Infección pulmonar.
4	Fiebre	Linfadenopatía, anemia, hepatoesplenomegalia, ascitis y tuberculosis.
5	Fiebre, dolor de cabeza	Infección en el oído de 3 meses de repetición, hepatoesplenomegalia, Anemia, Infección pulmonar por <i>Candida</i> sp. y <i>Cryptococcus</i> sp.

Fuente: Ficha epidemiológica.

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El presente estudio fue realizado con el objetivo de evaluar la respuesta fagocítica a través de la prueba de reducción de azul de tetrazolium -NBT- en pacientes pediátricos que tuvieran sospecha de deficiencia en la fagocitosis neutrofílica, ya que en estos casos pueden presentarse infecciones recurrentes, especialmente infecciones respiratorias, las cuales constituyen la segunda causa de mortalidad infantil en Guatemala (MSPAS, 2017; Guntiñas, 2003).

La reducción de NBT a formazan que produce una coloración azul en los neutrófilos indica la capacidad de la enzima Nicotiamida-Adenina Dinucleotido fosfato (NADPH) oxidasa para destruir las bacterias (*Staphylococcus xilosus*), lo que indica un proceso de fagocitosis eficiente; en los pacientes con deficiencia en la actividad fagocítica no se produce la formación de este precipitado insoluble, debido a la incapacidad del neutrófilo para destruir el antígeno, lo cual es un defecto producido por una mutación genética que impide la acción de la enzima.

El grupo etario que presentó mayor número de casos de disfunción fagocítica neutrofílica fue el de 6 a 10 años con tres casos, seguido de dos casos en el grupo de 0 a 5 años; sin embargo, debido al número de positivos (5 casos) no se puede determinar un promedio que sea estadísticamente significativo y que permita inferir una prevalencia real de esta inmunodeficiencia primaria. Hay estudios reportados como el de Sanabria, Giménez, Carpinelli y Martínez en el 2017 donde determinaron una mediana de 4 años que corresponde a niños en el rango de 0 a 16 años. En Bogotá, Colombia, se demostró que el grupo etario más afectado de 75 pacientes menores de 16 años fue el 1 a 5 años con 40%, obteniendo el mismo porcentaje con nuestro estudio del segundo grupo etario más afectado. Estos estudios evidencian que las inmunodeficiencias primarias (IDP) pueden presentarse a cualquier edad, sin embargo, el 40% se manifiesta durante el primer año y el 95% antes de los 16 años (Sanabria, Giménez, Carpinelli y Martínez, 2017; Pedraza, Vargas y Ramírez, 2018).

La mayoría de IDP presentan patrones de herencia ligados al cromosoma X por lo que se observa un predominio de enfermedades en el género masculino como lo demuestra Decampos et al. (2013) en su estudio al presentar pacientes de este género con IDP en el 60% de la población total evaluada, similares resultados obtuvieron Riaño et al. (2018) con un porcentaje de 59.5%. En este estudio los resultados para la prevalencia de género, no se puede inferir por el bajo número de casos positivos. Respecto a la disfunción en la fagocitosis, especialmente en la Enfermedad Granulomatosa Crónica (EGC), que altera la fagocitosis a través de mutaciones del complejo multiproteico NADPH, otros estudios han demostrado un predominio en el género masculino (Decampos et al., 2013; Riaño, Correa, Gallón, Orrego y Franco, 2018; Muñoz et al., 2015).

Para la inclusión de los pacientes en el estudio se tomó en cuenta las manifestaciones clínicas más frecuentes de la EGC, por ejemplo la recurrencia de las infecciones y la frecuencia de asistencia al médico, ya que el padecimiento de infecciones a repetición especialmente en los primeros años de vida es una fuerte sospecha para esta enfermedad como lo indica Muñoz et al. (2015) al describir el caso de un paciente de 12 años quien presentó cinco infecciones antes del año de edad y otro estudio realizado por Maydana et al. (2018) que describen a un varón de un año quien ya ha cursado dos infecciones, en el presente estudio la recurrencia predominante en las infecciones fue de 1 a 3 infecciones en un periodo de 6 meses (71.43%) y para la frecuencia de asistencia al médico fue de cada mes (28.56%) similar a los casos clínicos descritos anteriormente (tabla 2) (Muñoz et al., 2015; Maydana et al., 2018).

Con respecto a los motivos de consulta de los pacientes, se puede concluir que en este estudio fueron las infecciones de tipo pulmonar, micóticas y de oído (35.71%), lo que coincide con el estudio realizado por Maydana et.al. (2018) que indica que los sitios de infección más frecuentes incluyen los pulmones, ganglios linfáticos, la piel, los huesos y el hígado. Estas infecciones se caracterizan por ser de tipo indolente, poco sintomáticas y de difícil curación. El diagnóstico microbiológico es importante para el aislamiento de los agentes infecciosos, la mayoría de las infecciones son causadas por *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Nocardia sp.* y hongos como *Candida sp.* y

Aspergillus sp. (Maydana et. al., 2018; Muñoz, et. al., 2015). En nuestro estudio 2 de los 5 pacientes (35.71%) presentaron infecciones causadas por *Aspergillus sp.* y *Candida sp.* Sin embargo, el segundo motivo de consulta más frecuente fueron los abscesos (28.57%), se conoce que los cuadros clínicos que llevan a la sospecha de EGC incluyen sepsis y abscesos como las más frecuentes, observándose también adenopatías e infecciones respiratorias (Sanabria, Giménez, Carpinelli y Martínez, 2017).

De los 14 pacientes evaluados 5 de ellos presentaron resultado positivo para NBT (35.71%), prueba utilizada para evaluar la capacidad reductiva de los neutrófilos y consiguiente diagnóstico de EGC, en comparación con otros estudios realizados se observa que los trastornos fagocíticos representan una baja frecuencia siendo esta de un 8.6%, con respecto al total de IDP y específicamente la EGC registra una frecuencia de 14.1% en la población mexicana, la diferencia entre los porcentajes expresados y el de nuestro estudio fue por haber utilizado únicamente población infantil y no total (Álvarez, Yamizaki y Espinosa, 2009).

La EGC se caracteriza clínicamente por una mayor susceptibilidad a padecer infecciones recurrentes y graves, por bacterias y hongos. Dentro de las infecciones más frecuentes están las neumonías, linfadenitis y abscesos en diferentes sitios (Espinosa et. al., 2017). Lo cual se puede evidenciar en las características que presentaban los pacientes con resultados positivos a la EGC, 2 de los 5 pacientes (40%) presentaban afecciones de tipo pulmonar (tabla 3). En un estudio realizado en México, se determinó que los pacientes sospechosos de EGC presentaban neumonía en un 56% y abscesos en un 69%, además una revisión de caso realizada por Espinoza et al., en 2015, describe un paciente con EGC quien presentó una serie de neumonías a repetición y Maydana en 2018, describe a un paciente con bronquiolitis y neumonía coincidiendo con el cuadro clínico de la EGC; uno de los pacientes del estudio presentó absceso cerebral y este se ha reportado en otros estudios como el de Zuluaga et al., en 2011, en un paciente menor de un año de edad (Álvarez, Yamazak y Espinosa, 2009; Espinoza et al., 2015; Maydana et al., 2018 Zuluaga et al., 2011).

Entre las manifestaciones clínicas presentadas por los pacientes con EGC en este estudio también se encontraba la tuberculosis, Espinoza et al., (2015) quien indica que las infecciones por micobacterias tienden también a formar parte del cuadro clínico de la EGC (Espinoza et al., 2015).

Sin embargo, no hubo un predominio en cuanto a la frecuencia de las visitas al médico para los pacientes con deficiencia fagocítica neutrofílica, ya que el 40 % (2/5) de los pacientes estaban internados y 40% (2/5) llegaban a consulta cada 3 meses. En cambio, Sanabria, Giménez, Carpinelli y Martínez en 2017, reportaron que en su estudio hubo un predominio de 64% (23/36) de pacientes hospitalizados con respecto a los ambulatorios (Sanabria, Giménez, Carpinelli y Martínez, 2017).

Entre las limitaciones presentadas en este estudio está la cantidad de pacientes evaluados, debido a la situación de la pandemia COVID-19, que provocó una disminución en la cantidad de pacientes que asistían a la Consulta Externa del Hospital Roosevelt, y por esa cantidad tampoco fue posible llevar a cabo las asociaciones de las variables presentes en la ficha epidemiológica con los pacientes que presentaron disfunción fagocítica, otra limitante es la cantidad de muestra que se necesitó para realizar la prueba de NBT, esto debido a que el 57.14% de los pacientes del estudio eran niños menores de 5 años. Por último, la prueba de NBT presenta una sensibilidad que puede ser variable ya que es operador dependiente, lo que significa que está sujeto a la experiencia y práctica del analista, lo cual le permite diferenciar la formación del compuesto coloreado respecto a otros artefactos en el neutrófilo producto de la tinción de Wright.

X. CONCLUSIONES

1. La respuesta fagocítica de los pacientes pediátricos con granulomas e infecciones recurrentes se determinaron utilizando la prueba reducción de nitro azul de tetrazolio que evidencia la disfunción fagocítica del neutrófilo.
2. Se determinó una mayor prevalencia de pacientes con disfunción fagocítica y se encuentra en el rango de edad de 6 a 10 años.
3. No se pudo establecer una asociación entre las variables descritas en la ficha epidemiológica debido al bajo número de casos encontrados en el estudio.

XI. RECOMENDACIONES

1. Implementar programas para búsqueda y registro de pacientes que padecen Inmunodeficiencias Primarias a nivel nacional, con el objetivo de mejorar la calidad de vida de los pacientes que padezcan estas enfermedades.
2. Buscar alternativas metodológicas con mayor sensibilidad, como lo es la prueba de 1,2,3-Dihidrorodamina por medio de citometría de flujo que evalúa la formación de especies reactivas de oxígeno.
3. Fomentar el estudio de otras investigaciones de la disfunción fagocítica neutrofílica tomando en cuenta el conteo de neutrófilos y como criterio de inclusión los 10 signos de alerta de las inmunodeficiencias primarias.
4. Realizar estudios futuros tomando en cuenta otros hospitales de la red nacional para captar mayor cantidad de pacientes con Enfermedad Granulomatosa Crónica y obtener mejores resultados.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A., Lichtman, A. y Pillai, S. (2015). *Inmunología celular molecular*. España: Elsevier.
- Alfaro, A. (2018). *Serie de casos de inmunodeficiencias primarias en adultos diagnosticadas en dos hospitales de nivel terciario de atención de la caja costarricense de seguro social, 2017-2018*. (Tesis de posgrado). Universidad de Costa Rica, Costa Rica.
- Alkouwatli, K., Leiva, M., Ruiz, A. y Jiménez, M. (2005). Técnicas de estudio de fagocitosis *in vivo* y su aplicación en la investigación de la actividad inmunomoduladora de antibióticos. *Ars Pharmaceutica*, 46(1), 43-55.
- Álvarez, A., Yamazaki, M. y Espinosa, S. (2009). Enfermedad granulomatosa crónica. *Revista alergia México*, 56(5), 165-174.
- Bagazgoitia, F., García F. y Diéguez, G. (1997). Bioluminiscencia y quimioluminiscencia: aplicaciones analíticas. *Química clínica*, 6(1), 31-40.
- Barbieri, G., Flores, J. y Vignoletti, F. (2005). El neutrófilo y su importancia en la enfermedad periodontal. *Avances en periodoncia e implantología oral*, 17(1), 85-99.
- Bellanti, J. (2008). *Alergia: Enfermedad multisistémica*. México: Médica Panamericana.
- Brito, F., Yamazaki, M., Espinosa, S., Vázquez, O., Huerta, J. y Berrón, R. (2003). Eosinófilos: Revisión de literatura. *Alergia, asma e inmunología pediátrica*, 12(2), 56-62.
- Caragol, I., Urbano, S., Gil, I. y Hernández, M. (1999). Diagnóstico de los defectos primarios de los fagocitos. *Inmunología*, 18(1), 65-77.
- Carr, J. y Rodak, B. (2010). *Atlas de hematología clínica*. España: Médica Panamericana.
- Collado, V., Porras, R. y Gómez, T. (2008). El Sistema Inmune Innato I: sus mecanismos. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 2(1), 1-16.
- Condino, A. (2013). The relevance of collaborative work: the Latin American Society for Immunodeficiencies (LASID) registry model. *Clinical and Experimental Immunology*. 178(1). DOI:10.1111/cei.12495
- Coria, E., Espinosa, S., Espinosa, F., Vargas, M. y Galicia, L. (2010). Panorama epidemiológico de las inmunodeficiencias primarias en México. *Revista Alergia México*, 57(5), 159-163.

- Cos, Y., Marsán, V., Sánchez, M. y Macías, C. (2004). Enfermedad granulomatosa crónica, Aspectos actuales. *Revista Cubana Hematología*, 20(3), 1-7.
- Cos, Y., Torres, I., Marsán, V. y Macías, A. (2004). Defectos en la fagocitosis. Aspectos clínicos, moleculares y terapéuticos. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 20(1), 61-96.
- Cruz, A. y Camargo, B. (2001). *Glosario de términos en Parasitología y ciencias afines*. México: Plaza y Valdés.
- Decampos, G., Vargas, M., Castrejón, M., Espinosa, S., Galicia, L. y Medina, E. (2013). Registro de inmunodeficiencias primarias en un Centro Médico de Alta Especialidad en México. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas*, 22(1), 8-10.
- Díaz, M. (s.f.). *Inmunidad en el periodo neonatal*. Habana, Cuba, Recuperado de: http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/pediatria/inmunidad_en_el_periodo_neonatal.pdf
- Diz, P., Ocampo, A. y Fernández, J. (2002). Alteraciones cuantitativas y funcionales de los neutrófilos. *Medicina Oral*, 77(3), 206-221.
- Eberl, M. y Davey, D. (s.f.). *Neutrófilos*. Reino Unido: Universidad de Cardiff.
- Espinosa, S., Guzmán, M., Venegas, E., Jiménez, N. y Medina, E. (2017). Capacitación en Hospitales de México para el diagnóstico de enfermedad granulomatosa crónica por la técnica de 1-2-3 dihidrorodamina. *Alergia, Asma e inmunología pediátricas*, 26(3), 76-83.
- Espinoza, G., Butte, K., Palma, V., Norambuena, X. y Quezada, A. (2015). Enfermedad granulomatosa crónica: tres casos clínicos con diferentes formas de presentación. *Revista Chilena de Pediatría*, 86(2), 112-116.
- Fernández, J. (s.f.). *Síndrome de Chédiak-Higashi*. USA: Manuales MSD. Recuperado de: <http://www.msmanuals.com/es/professional/inmunolog>
- Gallastegui, C., Bernárdez, B., Regueira, A., Dávila, C. y Leboeiro, B. (s.f.). *Farmacia Hospitalaria: Inmunología*. Colombia: Médica Panamericana, S. A.
- García, F. (1997). *Fundamentos de Inmunobiología*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.

- García, J. (2000). Caracterización de la respuesta quimioluminiscente de neutrófilos humanos a la hemolisina alfa de *Escherichia coli*. *Revista costarricense de Ciencias Médicas*, 21(2), 2948-2953.
- González, Y., Castro, J., Vera, L., Tamez, S., Rodríguez, C. y Rivera, G. (2008). Las células dendríticas en la inmunopatología de la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. *México patología clínica*, 55(2), 77-78.
- Gutiñas, M. (2003). Inmunodeficiencias en la infancia. *Revista Cubana de Pediatría*, 75(4), 19-61.
- Ingraham, L. e Ingraham, C. (2008). *Introducción a la microbiología*. España: Reverté, S. A.
- International Patient Organisation for Primary Immunodeficiencies. (2007). *Enfermedad Granulomatosa Crónica*. USA: IPOPI.
- Kindt, T., Goldsby, R. & Osborne, B. (2007). *Inmunology of Kuby*. México: McGraw-Hill.
- Kumar, V., Abbs, A., Fausto, N. y Mitchell, R. (2008). *Patología humana*. España: Elsevier.
- Maydana, M., Cabanillas, D., Regairaz, L., Bastons, S., Uriarte, V., García, M., Sosa, M., Vinuesa, M., Palacio, P. y Morales, J. (2018). Enfermedad granulomatosa crónica: infecciones múltiples como forma de presentación. Caso clínico pediátrico. *Argentina pediátrica*, 116(6), 744-748.
- Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. (2017). *Análisis Infecciones Respiratorias semana 13*. Guatemala: MSPAS.
- Muñoz, J., Botello, M., Casas, M., Díaz, D. y Ortega, C. (2015). Enfermedad granulomatosa crónica: reporte de caso. *Elsevier*, 48(3), 80-85.
- Navarrete, J., Pinilla, G., Muñoz, L. y Ruiz, A. (2012). Fagocitosis en neonatos: determinación de valores normales para la micro técnica de fagocitosis y muerte intracelular de *Candida Albicans*. *Ciencias Biomedicas*, 10(17), 1794-1806.
- Navia, C. y Vásquez, J. (2011). *El mastocito: una célula multifuncional*. (Tesis de grado). Universidad del Cauca, Colombia.
- Osorio, A. y Yoc, S. (2018). *Establecimiento de tres ensayos para la evaluación in vitro de la inmunidad celular inespecífica mediada por neutrófilos y células citotóxicas*. (Tesis de grado). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Owen, J., Punt, J. & Stanford, S. (2013). *Kuby Inmunología*. U.S.A.: W. H. Freeman.

- Parslow, T., Stites, D., Terr, A. e Imboden, J. (2002). *Inmunología básica y clínica*. México: El Manual Moderno.
- Pedraza, A., Vargas, M. y Ramírez, J. (2018). Registro de inmunodeficiencias primarias en niños en un hospital de cuarto nivel. Bogotá, 2010-2016. *Alergia*, 65(4), 42-53. <https://doi.org/10.29262/ram.v65i4.338>
- Pérez, A. (s.f.). *Inmunología Clínica*. España: Díaz de Santos.
- Rabinovich, G. (2004). *Inmunopatología molecular: nuevas fronteras de la medicina: un nexo entre la investigación biomédica y la práctica clínica*. Argentina: Médica Panamericana.
- Restrepo, M., Agudelo, C., Molina, J. y Aristizabal, L. (2007). Aplicación diagnóstica del nitroazul de tetrazolio. *Acta Médica Colombiana*, 2(3), 152-168.
- Riaño, L., Correa, N., Gallón, A., Orrego, J. y Franco, J. (2018). Reporte epidemiológico de inmunodeficiencias primarias en el Centro Jeffrey Modell de Colombia: 1987-2017. *Revista alergia México*, 65(1).
- Robinson, J. M. (2009). Phagocytic leukocytes and reactive oxygen species. *Histochemistry and Cell Biology*, 4(131), 465-469.
- Roghanian, A. (s.f.). *Células dendríticas*. Reino Unido: Universidad de Southampton.
- Rojas, O. (2006). *Inmunología*. México: Medica Panamericana.
- Rojas, O. y Arce, P. (2003). Fagocitosis: mecanismos y consecuencias. *Bioquímica*, 28(4), 19-30.
- Sanabria, D., Giménez, V., Carpinelli, M. y Martínez, C. (2017). Estallido respiratorio de neutrófilos por las técnicas del nitroazul tetrazolio (NBT) y dihidrorodamina (DHR) en niños con sospecha clínica de enfermedad granulomatosa crónica (EGC). *Pediatría La Asunción*, 44 (1), 49-55.
- Spicer, J. (2009). *Microbiología clínica y enfermedades infecciosas*. España: Elsevier.
- Staines, A., González, M., Guidos, H., Hernández, V., Espinosa, F. Espinosa, S. (2005). Inmunodeficiencias por alteraciones en las células fagocitarias: Un desafío para el pediatra. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas*, 14(1), 5-9.
- Stevens, A. y Lowe, J. (2001). *Anatomía Patológica*. España: Harcourt.
- Tortora, G. (2007). *Introducción a la microbiología*. Argentina: Medica Panamericana.

- Universidad Autónoma de Yucatán. (s.f). *Instrucciones para tinciones de la médula ósea*. Recuperado de: <http://www.cir.uady.mx/sgc/documentos/procedimiento3/I-CIRB-AADC-05.pdf>
- Valle, A., Gómez, B. y Lanza, L. (2020). Inmunodeficiencias Primarias: Un reto para la inmunogenética. *Revista Cubana de Reumatología*, 22 (2), 1-28.
- Vázquez, M., Sureda, M. y Rebollo, J. (2012). Células dendríticas I: aspectos básicos de su biología y funciones. *Inmunología*, 31(1), 21-30.
- Wolff, K., Goldsmith, L., Katz, S., Gilchrest, B., Paller, A., Leffell, D. (2009). *Dermatología en medicina general*. Argentina: Médica Panamericana.
- Yañez, L., Lama, P., Rivacoba, C., Zamorano, J. y Marinovic, M. A. (2016). Inmunodeficiencias primarias en niños gravemente enfermos: a propósito de 3 casos clínicos. *Revista Chilena de Pediatría*. 88(1), 1-6. DOI:10.1016/j.rchipe.2016.07.011
- Zuluaga, D., Vargas, G. y Wolff, J. (2011). Enfermedad granulomatosa crónica: a propósito de un caso. *Revista Asociación Colombiana Dermatología*, 1(19), 332-354.

XIII. ANEXOS

Anexo 1. Etapas de la fagocitosis

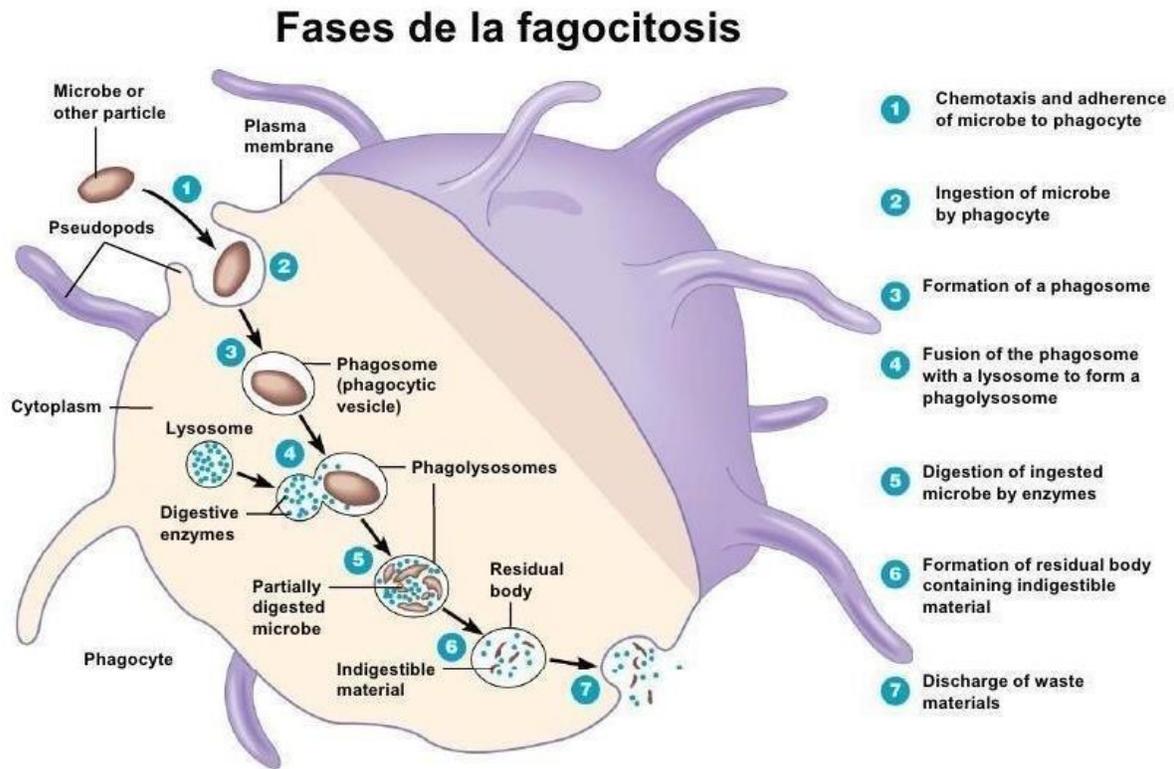


Figura 1: Proceso de fagocitosis. Dicho proceso inicia con la adhesión de la partícula o microorganismo, el cual es llevado al interior por la emisión de pseudópodos y consiguiente formación de fagosoma; este a su vez se fusiona con lisosomas para formar el fagolisosoma, los residuos posteriormente son eliminados al exterior (Cruz y Camargo, 2001).

Anexo 2. Carta de consentimiento informado

Código: _____

CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR

Evaluación de la respuesta fagocítica en pacientes pediátricos con sospecha de disfunción de fagocitosis neutrófila

Somos estudiantes de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, y solicitamos su consentimiento para participar voluntariamente en la presente investigación, cuyo objetivo es evaluar la respuesta fagocítica en pacientes pediátricos con sospecha de disfunción de fagocitosis neutrófila.

Durante dicho estudio se realizarán las siguientes actividades:

Obtención de datos a través de una ficha epidemiológica

Obtención de 8 mL de sangre completa para los análisis correspondientes

Si usted acepta que su hijo(a) participe en el estudio conocerá si su sistema inmunológico tiene alguna deficiencia en cuanto a la actividad fagocítica. Cabe mencionar que no se dará ninguna compensación económica por participar, y los exámenes a realizar no tendrán ningún costo. Este proceso será estrictamente confidencial, por lo que el nombre de su hijo (a) no será utilizado en ningún informe cuando los resultados de la investigación sean publicados. Así mismo está en toda la libertad de no participar o retirarse del estudio en cualquier momento sin ningún problema. Se le entregarán los resultados de forma confidencial. Si usted tiene alguna pregunta o problema no dude en consultar a su médico.

ACEPTACIÓN

Por este medio hago constar que fui informado (a) sobre el proyecto “Evaluación de la respuesta fagocítica en pacientes pediátricos con sospecha de disfunción de fagocitosis

neutrófila”. Asimismo, se me indicó que la participación de mi hijo o hija es voluntaria y que me realizarán una encuesta (ficha epidemiológica) con datos de mi hijo (a) y le extraerán una muestra sanguínea. También me fue comunicado que los exámenes no tendrán ningún costo, y los resultados me los proporcionarán personalmente, siendo confidenciales para el reporte de investigación, por lo que únicamente los responsables del proyecto los conocerán. Además, sé que puedo retirar a mi hijo (a) del estudio en cualquier momento, sin que esto implique repercusiones para mi persona.

Por lo tanto

Yo _____

_____. Con DPI _____ . Autorizo que mi hijo o hija:
_____ de _____ años,
participe en el estudio y se le tome una muestra de sangre.

Fecha: _____

Firma (participante): _____

Teléfono: _____

Anexo 3. Ficha epidemiológica

Ficha Epidemiológica

Código	Fecha	
<input type="text"/>	<input type="text"/>	
Nombre	Apellido	Número de teléfono
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Edad	Género	
<input type="text"/>	<input type="radio"/> Masculino	
Residencia	<input type="radio"/> Femenino	
<input type="text"/>		
¿Cuántas infecciones ha tenido en los últimos 6 meses?		
<input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 3		
<input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 4 o más		
¿Qué tan frecuente asiste al médico?		
<input type="radio"/> Cada semana		
<input type="radio"/> Cada mes		
<input type="radio"/> Cada 3 meses		
<input type="radio"/> Cada 6 meses o mas		
¿Está tomando algún medicamento?		
<input type="radio"/> Sí <input type="radio"/> No		
		¿Cuál?
		<input type="text"/>
¿Qué tan frecuente asiste al médico?		
<input type="radio"/> Cada semana		
<input type="radio"/> Cada mes		
<input type="radio"/> Cada 3 meses		
<input type="radio"/> Cada 6 meses o mas		
¿Está tomando algún medicamento?		
<input type="radio"/> Si <input type="radio"/> No		
		¿Cuál?
		<input type="text"/>
Motivo de consulta		
<input type="text"/>		
¿Padece de alguna enfermedad?		
<input type="radio"/> Sí <input type="radio"/> No		
		¿Cuál?
		<input type="text"/>
Síntomas más frecuentes		
<input type="radio"/> Fiebre		
<input type="radio"/> Dolor de cabeza		
<input type="radio"/> Diarrea		
<input type="radio"/> Mareos		
<input type="radio"/> Tos		
<input type="radio"/> Nauseas		
<input type="radio"/> Debilidad		
<input type="radio"/> Abseso		
<input type="radio"/> Otro		



Cindi Dayana Alvarez García

Estudiante



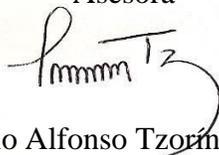
Sofía Isabel García Carrillo

Estudiante



M.A. Isabel Cristina Gaitán Fernández

Asesora



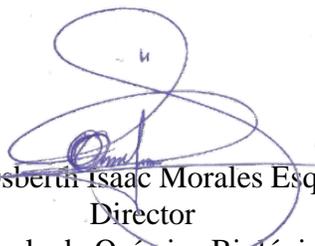
Lic. Pablo Alfonso Tzorn Velásquez

Asesor



MSc. Jorge Rodolfo Pérez Folgar

Revisor



MSc. Osbert Isaac Morales Esquivel

Director

Escuela de Química Biológica



M.A. Pablo Ernesto Oliva Soto

Decano

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia