Prevalencia de las alteraciones de la capacidad oxidativa en pacientes venezolanos con sospecha de errores innatos de la inmunidad

Soriuska Mayora[1], Eduar S. García[1], Alejandra Teran[1], Maria F. Hernandez[1], Wendy Martínez[1], Inirida Belisario[1], Daniela Morao[2,3], Joselit Torres[2], Reinaldo Reyna[3], Francis Crespo[1,4], Alexis García[1], Mercedes Zabaleta[1].

[1]Universidad Central de Venezuela, Instituto de inmunología Dr. Instituto de Inmunología "Dr. Nicolás Bianco Colmenares". [2] Hospital "Dr.José María Vargas". [3] Hospital Militar "Dr. Carlos Arvelo". [4]Hospital de Niños "Dr. José Manuel de los Ríos"

1er Premio Trabajos Libres Congreso Venezolano de Bioanálisis 2025

Recibido para publicación 30 enero 2026. Aceptado: 25 febrero 2026

RESUMEN:

El ensayo de capacidad oxidativa mediante citometría de flujo es un método sensible que evalúa la funcionalidad de los polimorfonucleares. Se basa en cuantificar la oxidación de compuestos fluorescentes, posterior al estallido respiratorio que se produce al tratar a los neutrófilos con agentes estimulantes, que evidencia que la producción de especies reactivas de oxígeno es una respuesta gradual y proporcional al estímulo recibido. El presente estudio evaluó la prevalencia de alteraciones en la capacidad oxidativa de polimorfonucleares mediante citometría de flujo en 65 pacientes venezolanos con sospecha clínica de inmunodeficiencias primarias, que acudieron al Instituto de Inmunología "Dr. Nicolás E. Bianco C" entre noviembre de 2024 y mayo de 2025. Utilizando el ensayo de diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) estimulado con PMA, se determinó que, aunque el 56,9% de los sujetos mantenía una función normal, un significativo 43,1% presentaba anomalías funcionales. De estos, el 30,8% mostró una respuesta disminuida, mientras que un 12,3% evidenció una afección severa. La muestra fue predominantemente pediátrica (78,46%) con una edad media de 13 años, sin diferencias estadísticas significativas según el sexo. Estos resultados subrayan la importancia de la citometría de flujo como herramienta diagnóstica de referencia en el entorno hospitalario venezolano y concluyen que existe una prevalencia relevante de defectos oxidativos en la población estudiada, aspecto que enfatiza la necesidad de fortalecer los protocolos de detección temprana y los registros epidemiológicos nacionales para mitigar el subdiagnóstico y mejorar el pronóstico clínico de estos pacientes en el país.

Palabras clave: Citometría de flujo, Estallido respiratorio, Neutrófilos, Enfermedades de inmunodeficiencia primaria.

Prevalence of oxidative capacity alterations in venezuelan patients with suspected inborn errors of immunity.

ABSTRACT

The oxidative capacity assay by flow cytometry is a sensitive method that evaluates the functionality of polymorphonuclear cells. It is based on quantifying the oxidation of fluorescent compounds following the respiratory burst that occurs when neutrophils are treated with stimulating agents, demonstrating that the production of reactive oxygen species is a gradual response proportional to the stimulus received. The present study evaluated the prevalence of alterations in the oxidative capacity of polymorphonuclear cells via flow cytometry in 65 Venezuelan patients with clinical suspicion of primary immunodeficiencies, who attended the 'Dr. Nicolás E. Bianco C' Institute of Immunology between November 2024 and May 2025. Assessed via phorbol myristate acetate (PMA)-stimulated dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) assay, results indicated that while 56.9% of subjects exhibited normal neutrophil function, a significant 43.1% presented oxidative burst anomalies. Of these, 30.8% showed a diminished response, while 12.3% evidenced severe impairment. The sample was predominantly pediatric (78.46%) with a mean age of 13 years, with no statistically significant differences according to sex. These results underscore the importance of flow cytometry as a gold-standard diagnostic tool in the Venezuelan hospital setting and conclude that there is a relevant prevalence of oxidative defects in the studied population, highlighting the need to strengthen early detection protocols and national epidemiological registries to mitigate underdiagnosis and improve the clinical prognosis of these patients in the country

Keywords: Flow cytometry, Respiratory burst, Neutrophils, Primary immunodeficiency diseases.

Correos de contacto: Soriuska Mayora, soriuskamayora@gmail.com

Introducción

Errores innatos de la inmunidad (EII), antes conocidos como inmunodeficiencias primarias, son un grupo heterogéneo de trastornos causados por defectos genéticos en el sistema inmunológico. Las personas con alguno de estos trastornos están predispuestas a una mayor tasa y gravedad de infecciones, alergias, autoinmunidad y neoplasias malignas (1,2). En los países subdesarrollados, la prevalencia de éstas es baja debido a que es subdiagnosticada, a causa de la limitada conciencia sobre la magnitud del problema y la falta de disponibilidad de métodos diagnósticos. Sin embargo, existen más de 400 trastornos identificables y clasificados por la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (IUIS) según los fenotipos clínicos e inmunológicos (1).

Entre estos trastornos se encuentra la enfermedad granulomatosa crónica (EGC), afección clínica que pertenece al conjunto de EII y que se deriva de mutaciones inactivadoras en NOX2 y sus proteínas auxiliares. Estas proteínas forman la enzima NADPH oxidasa fagocítica que genera superóxido. El superóxido (O_2) y su producto reducido el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), originan varias especies reactivas de oxígeno (ROS) adicionales que, en conjunto, son necesarias para la eliminación adecuada de los patógenos (3). La EGC está causada por defectos en cualquiera de las cinco subunidades de la NADPH oxidasa fagocítica, incluyendo gp91phox (CYBB, ~70 % de los pacientes), $p22^{phox}$ (CYBA, <5 %), $p47^{phox}$ (NCF1, ~25 %), $p67^{phox}$ (NCF2, <5 %)], $p40^{phox}$ y Rac2; en casos raros, una deficiencia grave de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa puede provocar la enfermedad (4,5).

Los pacientes suelen presentar fiebre, malestar general o pérdida de peso. Los abscesos perirrectales también son típicos en pacientes con EGC y pueden persistir durante años a pesar de los tratamientos antimicrobianos agresivos sumados a los cuidados intensivos locales. Debido a esto hay varios patógenos asociados con las infecciones en la EGC; sin embargo, estos granulomas producen lesiones activas que en muchos casos son estériles y no presentan patógenos. Además, las manifestaciones inflamatorias se pueden observar principalmente en infecciones en los tractos gastrointestinal y urogenital, pulmones y ojos. Sumado a esto algunos pacientes pueden padecer de linfohistiocitosis hemofagocítica (HLH) provocada por infecciones, que se presenta como una inflamación hiperactiva patológica (6).

El ensayo de capacidad oxidativa por citometría de flujo evalúa la funcionalidad de los polimorfonucleares, midiendo la oxidación de compuestos fluorescentes tras el estallido respiratorio que se produce al tratar a los neutrófilos con agentes estimulantes, y refleja una respuesta proporcional al estímulo, mediante la cuantificación del superóxido o el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (7,8).

Una de las pruebas diagnósticas actualmente utilizadas es la técnica de oxidación de la 1,2,3-dihidrorrodamina (DHR), para determinar la actividad de una enzima peroxidasa, por ejemplo, MPO o peroxidasa eosinófila, en condiciones estimuladas mediante la medición cuantitativa de la producción de H_2O_2. La DHR se difunde libremente en las células y reacciona con el H_2O_2 reduciéndose a rodamina, que queda atrapada intracelularmente y emite fluorescencia verde, la cual se puede medir en células individuales mediante citometría de flujo (8).

Esta metodología permite identificar tres perfiles de respuesta celular patológica: la deficiencia grave, caracterizada por una ausencia casi total de actividad funcional; la deficiencia hipomórfica o parcial, en la que se observa una intensidad de fluorescencia intermedia en toda la población celular; y el patrón en mosaico, que revela la coexistencia de dos poblaciones diferenciadas, una con función enzimática normal y otra con actividad reducida (8).

Sumado a esto, Brandt y Kesto fueron pioneros en detectar este proceso usando 2,7-diclorofluorescina-diacetato (DCFH2-DA) para medir H_2O_2 en solución acuosa (9), este es un compuesto permeable a las células y no fluorescente; las esterasas intracelulares lo desacetilan a DCFH, el cual queda atrapado y puede ser oxidado a 2,7-diclorofluorescina fluorescente (10). Esta metodología es ampliamente empleada debido a que las sondas fluorogénicas son sensibles a procesos redox, bajo costo, relativa baja toxicidad y fácil aplicación (11).

A pesar de esto existen diversos factores que pueden causar error en la evaluación del estallido respiratorio por este último método, por ejemplo, existen resultados disminuidos asociados con la deficiencia de la mieloperoxidasa (MPO), la cual es clave en los neutrófilos para generar oxidantes muy reactivos. En este proceso, mientras la NADPH oxidasa inicia el estallido generando anión superóxido y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), la MPO cataliza la reacción de

este último con iones cloruro para sintetizar ácido hipocloroso (HOCl), un agente bactericida de alta potencia (12).

Por esta razón, ante una carencia de la enzima, se ve alterada la señal emitida por la 2,7-diclorofluorescina fluorescente, debido a que la misma refleja la suma de múltiples vías de oxidación y depende estrechamente de la MPO para su activación. Así, una falla en la artillería enzimática final puede conducir a una subestimación del potencial oxidativo real de la célula en el entorno clínico (13,14).

El trabajo tuvo como finalidad evaluar la prevalencia de alteraciones en la capacidad oxidativa en un grupo de pacientes venezolanos con sospecha de errores innatos de la inmunidad (EII).

Materiales y métodos

Se trató de un estudio multicéntrico, observacional, analítico y retrospectivo, con datos recopilados entre noviembre de 2024 y mayo de 2025. La población estuvo conformada por pacientes con sospecha clínica de error innato de la inmunidad sin distinción de edad ni sexo, que acudieron de manera voluntaria al laboratorio del Instituto de Inmunología "Dr. Nicolás E. Bianco C" para la realización del ensayo de capacidad oxidativa o estallido respiratorio por citometría de flujo, a través de la obtención de 4 mL de sangre periférica anticoagulada con EDTA, de los cuales se emplearon 2 mL para un proceso de lisis osmótica mediante la adición de cloruro de amonio (NH_4Cl).

Tras una agitación vigorosa y una serie de ciclos de centrifugación controlada a 4°C con lavados sucesivos en PBS-gelatina, se obtuvo la purificación de la fracción leucocitaria y la eliminación selectiva de plaquetas mediante la reducción gradual de las velocidades de centrifugación. Una vez obtenido el botón celular purificado y ajustado a 1 mL con PBS-gelatina, se procedió a la cuantificación en el analizador hematológico Mindray BC-30, con la finalidad de ajustar la densidad celular a una concentración estandarizada de 2 x 10^6 leucocitos/mL, garantizando así la reproducibilidad de los ensayos posteriores (15,16).

Posteriormente, la suspensión celular se marca con un colorante fluorescente (10 µL DHFH) y se distribuye en alícuotas de 100 µL para evaluar la respuesta bajo condiciones basales y de estimulación con acetato de miristato de forbol (PMA) (Figura 1).

El diseño experimental contempla una cinética de activación a distintos intervalos de tiempo (0, 10 y 20 minutos) en baño de María a 37°C, deteniendo la reacción mediante choque térmico en refrigeración (15,16). Finalmente, tras la adición de 500 µL de buffer de tinción, las muestras se someten a análisis por citometría de flujo en el citómetro de flujo Novocyte Advanteon de la casa comercial Agilentt, donde se aplica una estrategia de selección dirigida específicamente a la población de granulocitos para cuantificar la intensidad de fluorescencia emitida por la sonda derivada de la oxidación de la DCFH-DA; lo cual permite determinar la capacidad del estallido respiratorio celular como se observa en la Figura 1.

Para el análisis de datos se utilizaron métodos de estadística descriptiva y diferencial estableciendo un valor de $p< 0,05$ empleando el *software Graph Pad Prism* Versión 9.

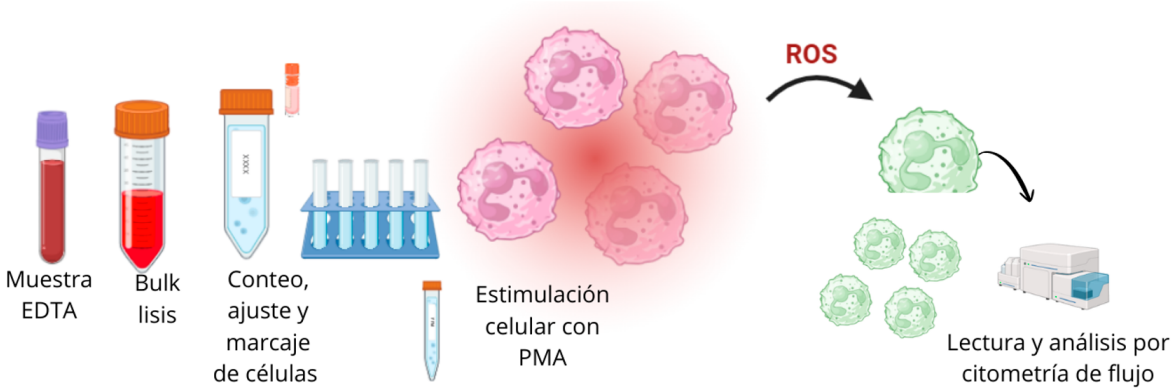


Figura 1. Resumen gráfico del ensayo de capacidad oxidativa por citometría de flujo. Tinción con 2, 7-diclorofluorescina-diacetato (DCFH-DA), estimulación con acetato de forbol miristato (PMA). EDTA: ácido etilendiaminotetraacético; ROS: especies reactivas de oxígeno. (Fuente: Elaboración propia).

La magnitud y velocidad de la respuesta post-estímulo permitieron clasificar los resultados mediante la cuantificación del estallido respiratorio. Al comparar la intensidad media de fluorescencia entre sujetos sanos y pacientes (17,18), (Figura 2):

- Normal: se caracteriza por una inducción rápida y robusta de especies reactivas de oxígeno (ROS) tras la estimulación, alcanzando su fase de mayor actividad entre los 10 y 20 minutos. En células competentes, la activación del complejo NADPH oxidasa desencadena un estallido oxidativo abrupto que se manifiesta con picos máximos de oxidación intracelular, seguidos de una fase de actividad transitoria y bien definida (19).
- Disminución: se caracteriza por una cinética de activación ralentizada y una magnitud inferior en comparación con los controles sanos. Durante el intervalo crítico de 10 a 20 minutos, el estallido oxidativo muestra un retraso en su fase de inducción y un pico de emisión significativamente atenuado; no obstante, se observa una producción residual de ROS que puede presentar una tendencia ascendente tardía fuera del rango temporal estándar (20).
- Afección severa: la ausencia de respuesta tras la estimulación se traduce en un perfil cinético prácticamente plano, carente de la fase de inducción rápida y del pico oxidativo característico. Esta estabilidad de la línea basal, o la presencia de un ascenso apenas perceptible, es indicativa de una falla crítica en la integridad estructural o en el mecanismo de activación del complejo NADPH oxidasa (20).

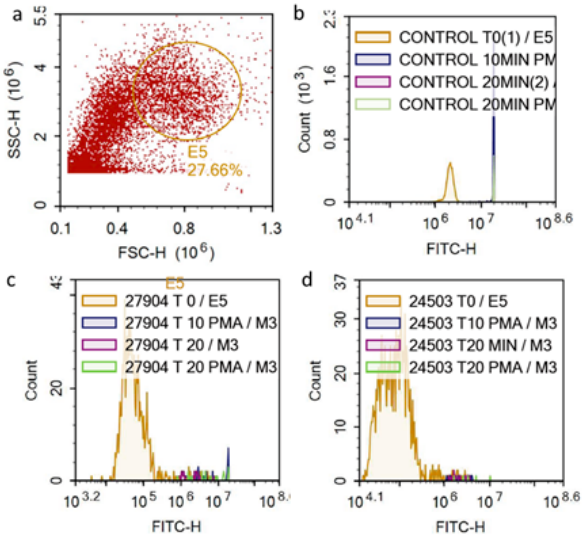


Figura 2. Citometría de flujo para el ensayo de capacidad oxidativa de neutrófilos. (a) Citograma en el que se señala la distribución celular de la muestra y la ventana sobre la población de neutrófilos. (b) Control sano que presenta un aumento de la fluorescencia de DCF (diclorofluoresceína) tras la estimulación. (c) Muestra de poblaciones de neutrófilos normales y anormales tras la estimulación (disminución de la respuesta). (d) Muestra una afectación severa de la explosión oxidativa tras la estimulación. (Fuente: Elaboración propia).

Resultados

Se analizó una muestra constituida por 65 pacientes, en la cual el 50,8% (n=33) correspondía al sexo masculino y el 49,2% (n=32) al sexo femenino, sumado a esto la población de estudio se caracterizó por una procedencia geográfica diversa; sin embargo, se evidenció una marcada centralización en la región norte-central del país (Gráfico 1).

Gráfico 1. Distribución demográfica de acuerdo con la región de procedencia en el país. n=65.



(Fuente: Elaboración propia).

Distrito Capital y el estado Miranda destacan de manera preponderante con 29 y 14 pacientes respectivamente. En conjunto, estas dos entidades representan el 66,2% de la población total evaluada en este estudio. Otros estados con presencia de casos incluyeron Aragua, La Guaira, Bolívar y Guárico, principalmente.

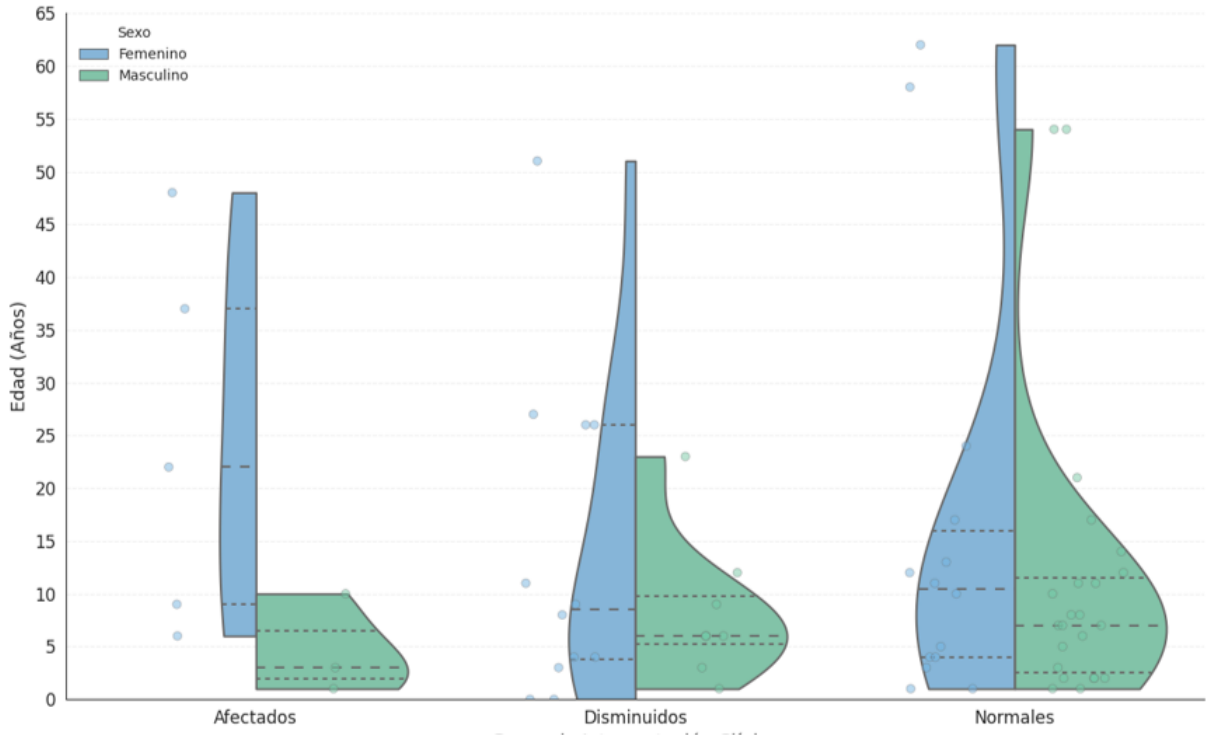
La muestra de estudio posee un rango de edad comprendido entre los 0 y 62 años y una media de 13 años, además de un marcado predominio de pacientes pediátricos (78,4%), los cuales de acuerdo con la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) abarcan infantes en edad preescolar (2 - 5 años) y escolar (6 - 10 años) (21).

En cuanto a la evaluación funcional del estallido respiratorio, más de la mitad de la población (56,9%) mostró una respuesta normal, mientras que el 43,1% presentó algún tipo de alteración, categorizada en dos subgrupos: respuesta disminuida y afectación severa.

Al realizar un análisis más profundo de la distribución demográfica dentro de estos grupos clínicos (Gráfico 2), se evidenció patrones distintivos. Aunque en todas las categorías existió una marcada concentración en el rango pediátrico, los pacientes con capacidad oxidativa alterada mostraron una disparidad notable según el sexo: mientras que en los varones se concentró casi exclusivamente en la infancia, las mujeres presentaron un grupo etario más amplio que se extendió hasta la adultez.

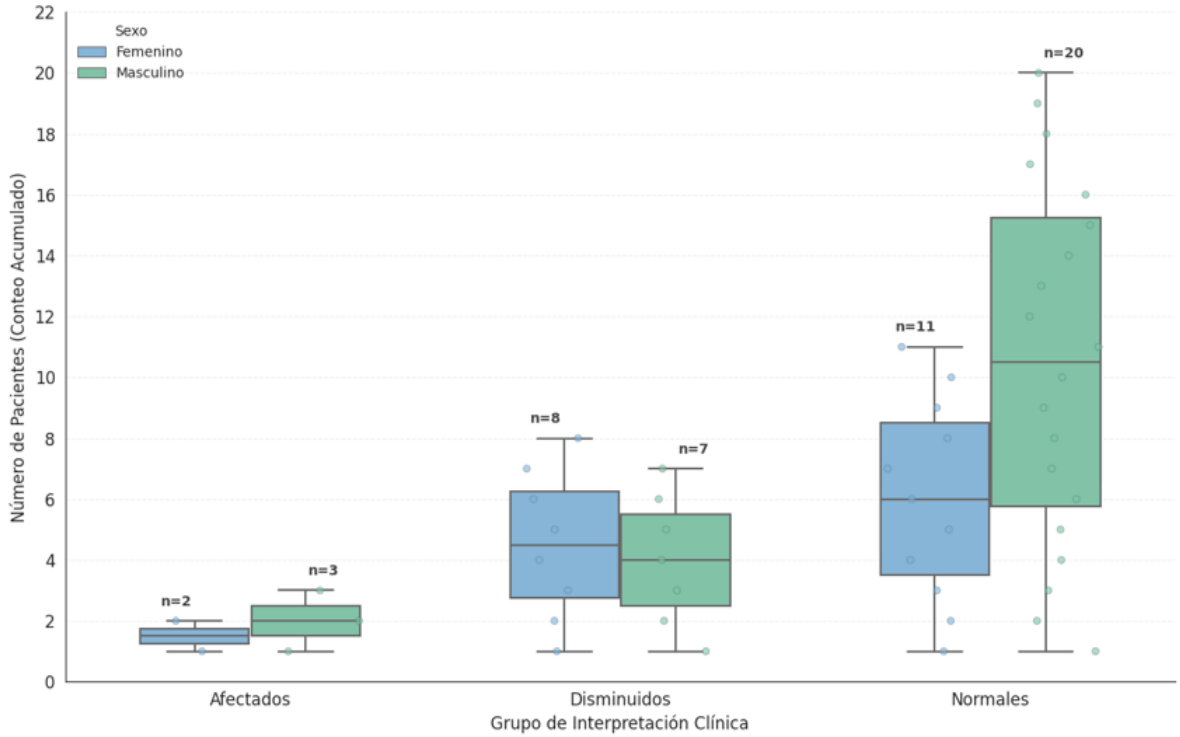
En la subpoblación pediátrica (n=51), no se hallaron diferencias estadísticamente significativas en la clasificación de los resultados según el sexo (p=0,1866). No obstante, al analizar la distribución por grupos en el Gráfico 3, se observaron tendencias específicas: el subgrupo con respuesta disminuida representó el 30,8% de los casos, mostrando un ligero predominio femenino (n=8 frente a n=7 varones). Por otro lado, el grupo con afectación severa fue el más reducido, compuesto mayoritariamente por varones (n=3) en comparación con el sexo femenino (n=2).

Gráfico 2. Distribución de acuerdo con el resultado del ensayo. n=65.



(Fuente: Elaboración propia).

Gráfico 3. Distribución de acuerdo con el sexo y resultado del ensayo en pacientes pediátricos (n=51).



(Fuente: Elaboración propia).

Discusión

La enfermedad granulomatosa crónica es el resultado de la muerte fagocítica errónea causada por defectos genéticos del sistema NADPH oxidasa. Se caracteriza por infecciones bacterianas o fúngicas potencialmente mortales y se asocia con una respuesta inmunitaria desregulada que da lugar a granulomas y manifestaciones inflamatorias como la colitis (14). Se calcula que la prevalencia a nivel mundial es de aproximadamente 1/250.000 individuos, además algunas estimaciones sitúan la incidencia entre 1/12.000 y 1/250.000 recién nacidos vivos (22). A pesar de estos datos, se desconoce la verdadera prevalencia de los errores innatos de la inmunidad en los países latinoamericanos (23).

No obstante, en el país el hallazgo más relevante se registró en el año 1999 en un grupo de pacientes con EGC en el estado Mérida, a través de su identificación y descripción preliminar, resaltando la relevancia del uso de la técnica de citometría de flujo (24).

En este trabajo evaluamos 65 pacientes con sospecha de inmunodeficiencia primaria, siendo el criterio clínico común la presencia de infecciones a repetición, en los cuales el 43,1% de las muestras evaluadas poseen alguna alteración en el resultado obtenido, donde un 30,8% corresponde a un resultado disminuido (Gráfico 2), por lo que los datos obtenidos en esta investigación son similares al grupo de estudio de Jirapongsananuruk *et al.* para el año 2003 (26), sin embargo contrastan con los datos publicados por Köker *et al.* en el 2013 quienes encontraron un 55,0% de pacientes con sospecha de una forma recesiva del defecto asociado con el estallido respiratorio en Turquía, en un grupo de pacientes con una media de edad alrededor de 10 años (27).

Es importante destacar que en el segundo informe del Registro LAGID para América Latina, se ha reportado un total de 98 casos de EGC en 12 países de la región para el año 2007 (25), lo que se correlaciona con el registro de inmunodeficiencias en Latinoamérica hasta el año 2024 (27).

Debido a su abundancia, los neutrófilos se utilizan generalmente para evaluar la producción de ROS. Sin embargo, estas células tienen una vida útil relativamente corta in vitro; por lo tanto, el análisis de su funcionalidad debe tener en cuenta varias limitaciones: el número de células necesarias para el ensayo, el tipo de preparación celular necesaria (neutrófilos aislados frente a sangre completa), el tiempo total de incubación para el ensayo, la complejidad del ensayo y la rapidez

de la recopilación de datos. Dado que los neutrófilos no se pueden almacenar ni congelar y mantener su viabilidad, es necesario aislar paralelamente a la muestra del paciente, una muestra de un sujeto normal para validar los resultados. Además, el aislamiento de los neutrófilos puede llevar entre una y dos horas, lo que limita el tiempo disponible para los ensayos funcionales (4,28,29).

Es importante mencionar que pueden existir otros factores capaces de generar resultados alterados en dicha prueba tales como: infecciones agudas graves, la antibioticoterapia, uso de corticosteroides u otros inmunomoduladores y el hábito tabáquico (22). La información en este estudio destaca por centrarse en una población específica de pacientes que acudieron voluntariamente, lo que permite obtener datos valiosos sobre un grupo con características definidas. Sin embargo, a pesar de que la muestra no representa en su totalidad a la población, sus hallazgos ofrecen una base sólida para futuras investigaciones y para el desarrollo de políticas de salud adaptadas a las necesidades nacionales.

Conclusiones

Los resultados validan la citometría de flujo con la sonda DCFH-DA como una alternativa diagnóstica robusta, accesible y costo-efectiva para identificar defectos en el complejo NADPH oxidasa, MPO y en la enzima G6PD en entornos de recursos limitados, considerando otras posibles causas etiológicas de alteración.

El presente estudio documenta una elevada prevalencia de alteraciones en la capacidad oxidativa (43,1%) en la cohorte analizada, lo que ratifica la pertinencia de los criterios de sospecha clínica de Errores Innatos de la Inmunidad (EII) en el entorno hospitalario venezolano. A pesar de la efectividad técnica demostrada, la edad media de diagnóstico (13 años) y la marcada centralización geográfica de la muestra (66,2% en la región capital) evidencian un retraso clínico y barreras de acceso que comprometen el pronóstico de los pacientes. Es imperativo descentralizar el acceso a estas pruebas funcionales y fortalecer los registros epidemiológicos nacionales para mitigar el subdiagnóstico histórico en el país.

Finalmente, la identificación de pacientes con afectación severa (12,3%) permite la transición hacia un manejo clínico especializado, incluyendo profilaxis dirigida y asesoramiento genético oportuno. Se recomienda la adopción sistemática de la terminología de la IUIS ("errores innatos de la inmunidad") para alinear la práctica clínica nacional con los estándares internacionales vigentes (30).

Agradecimientos

Los autores agradecemos al equipo de trabajo del Instituto de Inmunología "Dr. Nicolás E Bianco C" y a los pacientes por su apoyo y colaboración para el desarrollo de este trabajo.

Declaración financiamiento y conflictos de interés

Los autores reportan ningún conflicto de intereses. Los autores son responsables del contenido y la redacción del documento

Referencias

1. Krishna S, Srinivasan R, Prakash A, Bhattad S, Indumathi CK. Clinical and laboratory profile of children with primary immunodeficiency - Perspective from a developing country. Curr Med Res Pract 2021;11(6):262-268. https://doi.org/10.4103/cmrp.cmrp_74_21
2. Heiba DA. Clinical and epidemiological characteristics of patients with suspected primary immunodeficiency disorders attending Alexandria University Children's Hospital. Int J Contemp Pediatr 2019;6(5):1872-1880. https://doi.org/10.18203/2349-3291.ijcp20193599
3. Roos D. Chronic Granulomatous Disease. Methods Mol Biol 2019;1982:531-542. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9424-3_32.
4. Kuhns DB. Diagnostic Testing for Chronic Granulomatous Disease. Methods Mol Biol 2019;1982:543-571. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9424-3_33.
5. Mortimer PM, Svetitsky S, Thomas DC. Chronic granulomatous disease: lessons in cell biology from monogenic immunodeficiency. Clin Exp Immunol 2025;219(1):uxaf031. https://doi.org/10.1093/cei/uxaf031.
6. Justiz-Vaillant AA, Williams-Persad AF, Arozarena-Fundora R, Gopaul D, Soodeen S, Asin-Milan O, *et al.* Chronic Granulomatous Disease (CGD): Commonly Associated Pathogens, Diagnosis and Treatment. Microorganisms 2023;11(9):2233. https://doi.org/10.3390/microorganisms11092233.
7. O'Donovan CJ, Tan LT, Abidin MAZ, Roderick MR, Grammatikos A, Bernatoniene J. Diagnosis of Chronic Granulomatous Disease: Strengths and Challenges in the Genomic Era. J Clin Med 2024;13(15):4435. https://doi.org/10.3390/jcm13154435.

8. Pérez-Blanco U, Girón JY, Juárez-Vega G, Jiménez M, Sánchez C, Rioja R, *et al.* Estandarización de zimosán opsonizado como estímulo en la técnica de la 1,2,3-dihidrorrodamina para evaluar el estallido respiratorio del neutrófilo. Biomédica 2024;44(Supl 2):198-208. https://doi.org/10.7705/biomedica.7461.
9. Brandt R, Keston AS. Synthesis of diacetyldichlorofluorescin: A stable reagent for fluorometric analysis. Anal Biochem 1965;11(1):6–9. https://doi.org/10.1016/0003-2697(65)90035-7.
10. De Haan LR, Reiniers MJ, Reeskamp LF, Belkouz A, Ao L, Cheng S, *et al.* Experimental Conditions That Influence the Utility of 2'7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate (DCFH2-DA) as a Fluorogenic Biosensor for Mitochondrial Redox Status. Antioxidants 2022;11(8):1424.
11. Reiniers MJ, van Golen RF, Bonnet S, Broekgaarden M, van Gulik TM, Egmond MR, *et al.* Preparation and Practical Applications of 2′,7′-Dichlorodihydrofluorescein in Redox Assays. Anal Chem 2017;89(7):3853-3857. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04623.
12. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. J Leukoc Biol 2005;77(5):598-625. https://doi.org/10.1189/jlb.1204697
13. Lin W, Chen H, Chen X, Guo C. The roles of neutrophil-derived myeloperoxidase (MPO) in diseases: the new progress. Antioxidants (Basel) 2024;13(1):132. https://doi.org/10.3390/antiox13010132.
14. Ruijter N, van der Zee M, Katsumiti A, Boyles M, Cassee FR, Braakhuis H. Improving the dichloro-dihydro-fluorescein (DCFH) assay for the assessment of intracellular reactive oxygen species formation by nanomaterials. NanoImpact 2024;35:100521. https://doi.org/10.1016/j.nanoimpact.2024.100521.
15. Robinson JP, editor. Handbook of flow cytometry methods. New York: Wiley-Liss; 1993.
16. Rosenkranz AR, Schmaldienst S, Stuhlmeier KM, Chen W, Knapp W, Zlabinger GJ. A microplate assay for the detection of oxidative products using 2',7'-dichlorofluorescin-diacetate. J Immunol Methods 1992;156(1):39-45. https://doi.org/10.1016/0022-1759(92)90008-h.
17. Andrés C, De la Lastra J, Juan C, Plou F, Pérez-Lebeña E. The Role of Reactive Species on Innate Immunity. Vaccines (Basel) 2022;10(10):1735. https://doi.org/10.3390/vaccines10101735.
18. Bode K, Hauri-Hohl M, Jaquet V, Weyd H. Unlocking the power of NOX2: A comprehensive review on its role in immune regulation. Redox Biol 2023;64:102795. https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102795.
19. Jobe T, Stephan J, Wells C, De Silva M, Lorkiewicz P, Hill B, *et al.* Phase partitioning of the neutrophil oxidative burst is coordinated by accessory pathways of glucose metabolism and mitochondrial activity. J Biol Chem 2025;301(1):108091. https://doi.org/10.1016/j.jbc.2024.108091.
20. Pleskova S, Erofeev A, Vaneev A, Gorelkin P, Bobyk S, Kolmogorov V, *et al.* ROS Production by a Single Neutrophil Cell and Neutrophil Population upon Bacterial Stimulation. Biomedicines 2023;11(5):1361. https://doi.org/10.3390/biomedicines11051361.
21. De Onis M, Onyango A, Borghi E, Siyam A, Nishida C, Siekmann J. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. Bull World Health Organ 2007;85(9):660-667. https://doi.org/10.2471/blt.07.043497.
22. Cabral-Marques O, Schimke L, de Oliveira E, El Khawanky N, Ramos R, Al-Ramadi B *et al.* Flow cytometry contributions for the diagnosis and immunopathological characterization of primary immunodeficiency diseases with immune dysregulation. Front Immunol 2019;10:2742. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02742.
23. Rojas-Restrepo JL, Álvarez-Álvarez JA, Montoya-Giraldo JD, Trujillo-Vargas CM. Validación de la técnica de dihidrorodamina 123 para el diagnóstico de la enfermedad granulomatosa crónica en Colombia. Inmunologia 2014;33(3):71-80. https://doi.org/10.1016/j.inmuno.2014.03.001.
24. Seminario G, Gonzalez-Serrano ME, Sanchez Aranda C, Sevciovic Grumach A, Rodrigues Silva Segundo G, Regairaz L, *et al.* The Latin American Society for Immunodeficiencies Registry. J Clin Immunol 2024;45(1):28. https://doi.org/10.1007/s10875-024-01822-6.
25. Salmen S, Berrueta L, Heyworth P, Borges L, Hernández M, Muñoz J. El complejo NADPH-oxidasa en la enfermedad granulomatosa crónica: Descripción preliminar de un foco en Mérida-Venezuela. Invest Clin 1999;40(4):277-300.
26. Jirapongsananuruk O, Malech H, Kuhns D, Niemela J, Brown M, Anderson-Cohen M *et al.* Diagnostic paradigm for evaluation of male patients with chronic granulomatous disease, based on the dihydrorhodamine 123 assay. J Allergy Clin Immunol 2003;111(2):374-379. https://doi.org/10.1067/mai.2003.58.
27. Köker M, Camcıoğlu Y, van Leeuwen K, Kılıç S, Barlan I, Yılmaz M *et al.* Clinical, functional, and genetic characterization of chronic granulomatous disease in 89 Turkish patients. J Allergy Clin Immunol 2013;132(5):1156-1163.e5. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.05.039.
28. Leiva LE, Zelazco M, Oleastro M, Carneiro-Sampaio M, Condino-Neto A, Costa-Carvalho BT, *et al.* Primary Immunodeficiency Diseases in Latin America: The Second Report of the LAGID Registry. J Clin Immunol 2007;27(1):1–10. https://doi.org/10.1007/s10875-006-9052-0.
29. Ettel P, Sehgal A, Harrison N, Pickl W, Grabmeier-Pfistershammer K. Glycopeptide antibiotics impair neutrophil effector functions. Int Arch Allergy Immunol 2023;184(9):932-448. https://doi.org/10.1159/000530865.
30. Bousfiha A, Moundir A, Tangye SG, Picard C, Jeddane L, Al-Herz W, *et al.* The 2022 Update of IUIS Phenotypical Classification for Human Inborn Errors of Immunity. J Clin Immunol 2022;42(7):1508-1520. https://doi.org/10.1007/s10875-022-01352-z.