

Anal. Real Acad. Nac. Farm., 2005, 71: 365-386

————— *Revisión* —————

Estallido respiratorio de los fagocitos

MARÍA CASCALES ANGOSTO

Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

RESUMEN

El estallido respiratorio de los fagocitos, producido por la NADPH-oxidasa, complejo enzimático que cataliza la formación de radical superóxido, constituye una de las fuentes endógenas más importantes de especies reactivas del oxígeno en el organismo. Este sistema comprende un complejo flavocitocromo b558 unido a membrana, y factores citosólicos p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} y la pequeña GTPasa Rac2, que se trastocan a la membrana plasmática donde experimentan un proceso de ensamblaje que conforma el sistema enzimático activo. El conocimiento de las interacciones proteína-proteína que permiten el ensamblaje y el mecanismo de acción enzimático, ha permitido detectar los cambios que transcurren en el estado activo. La importancia de la NADPH oxidasa se muestra en la enfermedad granulomatosa crónica, patología transmitida por herencia, en la cual un componente de la NADPH oxidasa está ausente o defectivo. Tales individuos padecen infecciones recurrentes crónicas y severas debido a la incapacidad de sus neutrófilos para destruir microbios.

Palabras clave: NADPH oxidasa.—Neutrófilos.—Flavocitocromo b558.—Enfermedad granulomatosa crónica.

ABSTRACT

The phagocyte respiratory burst produced by the NADPH oxidase, enzyme complex which catalyzes the production of superoxide radical, is one of the main endogenous sources of reactive oxygen species in the body. NADPH oxidase consists of a membrane-bound flavocytochrome b_{558} complex, and cytosolic factors p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} and the small GTPase Rac, which translocate to the membrane to assemble the active complex following cell activation. A great deal of current

research involves understanding the protein protein interactions involved in the assembly and enzyme mechanism and how these change with the activation state. The importance of the NADPH oxidase is illustrated by the inherited condition Chronic Granulomatous Disease in which a component of the respiratory burst oxidase is absent or defective. Affected individuals suffer from recurrent, chronic and severe infections due to the inability of their neutrophils to kill microbes.

Key words. NADPH oxidase.—Neutrophils.—Flavocytochrome b558.—Chronic granulomatous disease.

INTRODUCCIÓN

La actividad de la NADPH-oxidasas fagocítica constituye una de las fuentes endógenas más importantes de especies reactivas del oxígeno en el organismo. Este sistema enzimático está constituido por varias proteínas distribuidas entre el citoplasma y la membrana plasmática. Durante la activación leucocitaria, los componentes ubicados en el citosol tienen que emigrar a la membrana plasmática, que es donde se verifica el ensamblaje del complejo funcional que conforma el sistema enzimático activo [1]

Los leucocitos polimorfonucleares (PMN), son movilizados a los sitios de inflamación donde destruyen a los agentes invasores, mediante la liberación de radical superóxido, especies reactivas del oxígeno derivadas y enzimas proteolíticas. Un defecto en la función de estas células constituye una grave amenaza para la vida. Tal es el caso de la enfermedad granulomatosa crónica, en la que los PMN no pueden producir especies reactivas de oxígeno y las personas afectadas padecen infecciones graves. Por otro lado, las especies reactivas de oxígeno, liberadas por los PMN, pueden en ocasiones, provocar daño a los tejidos vecinos, como se ha descrito en varias enfermedades.

La NADPH-oxidasas cataliza la transferencia de un electrón desde el NADPH hacia el O_2 con la formación de radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). El $O_2^{\cdot-}$ se convierte rápidamente en peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo y ácido hipocloroso. Estos, junto a los derivados reactivos del nitrógeno y a los enzimas proteolíticos de los gránulos, constituyen el mecanismo fundamental de defensa de los PMN [1, 2, 3] La NADPH oxidasa fagocítica origina el radical superóxido, esencial para la defensa antimicrobiana. Los linfocitos B y ciertas células no fagocíticas expresan también este enzima.

SISTEMA DE LA NADPH OXIDASA FAGOCÍTICA

La presencia de oxígeno es un requisito vital para la destrucción y digestión de los agentes patógenos por los fagocitos, pero no es necesaria para la fagocitosis misma. Cantidades considerables de oxígeno se consumen en el estallido respiratorio (*respiratory burst*), proceso que ha fascinado a los científicos desde hace casi cincuenta años.

En 1959 Sbarra y Karnosky [4], cuando se encontraban investigando la fagocitosis del bacilo de la tuberculosis por neutrófilos, detectaron un súbito incremento en el consumo de oxígeno por estas células, el cual era resistente a inhibidores de la cadena mitocondrial, tales como la azida sódica y el cianuro. Observaron que este consumo de oxígeno no coincidía con la respiración mitocondrial y pensaron que debería encontrarse involucrado en algún otro proceso diferente al de la producción de energía, el cual era requerido para destruir microorganismos y era suministrado por la glucólisis. El sustrato natural de esta oxidasa fue un tema de considerable especulación y por fin se descubrió que era el equivalente reductor NADPH, cuyo suministro se debía a la oxidación de la glucosa por el ciclo de las pentosa fosfatos. Estos autores denominaron a este sistema “NADPH oxidasa”.

Los PMN adquieren la capacidad de producir especies activas de oxígeno (ROS) cuando experimentan la activación. Este fenómeno se caracteriza por el aumento súbito del consumo de oxígeno (O_2), antes citado, no asociado al transporte electrónico mitocondrial, catalizado por el sistema NADPH oxidasa y denominado “*estallido respiratorio*”. La producción “explosiva” de radical superóxido en respuesta a estímulos externos es una propiedad característica de los fagocitos profesionales. Esta producción es utilizada por las células para destruir bacterias y es también componente importante de la respuesta inflamatoria.

Los fagocitos polimorfonucleares (PMN) o neutrófilos juegan un papel esencial en la defensa innata del organismo frente a agentes patógenos y actúan como mediadores primarios de la respuesta inflamatoria. Para defender al organismo, los neutrófilos utilizan una amplia variedad de productos microbicidas, tales como oxidantes, péptidos, enzimas líticos, etc. La generación de oxidantes microbici-

das por los neutrófilos se debe al complejo multiproteico NADPH oxidasa, antes mencionado, responsable de la transferencia de electrones desde el NADPH al O_2 , con la simultánea producción de radical superóxido. Durante la activación de la oxidasa, diversas proteínas citosólicas se traslocan a la membrana plasmática que rodea al fagosoma, donde se ensamblan a otro complejo unido a membrana el flavocitocromo b558. Este proceso se encuentra estrictamente regulado e implica fosforilaciones, traslocación y múltiples cambios conformacionales.

Cabe preguntarse ¿de qué manera el estallido respiratorio induce la destrucción de patógenos por células normales?. El producto de la reacción catalizada por la NADPH oxidasa, se identificó al principio como H_2O_2 por su capacidad para oxidar el formato. Posteriormente se demostró por Babior, Kipnes y Curnutte en 1973 [5] que el H_2O_2 procedía de la dismutación del radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Cuando los neutrófilos fagocitan partículas, el anión superóxido se produce en aquella región de la membrana plasmática en contacto directo con la partícula. Después ha de transcurrir un período (fase "lag"), que propociona al fagocito el tiempo requerido para la formación y cierre de una vacuola que limita la salida al exterior de las especies de oxígeno formadas.

Al descubrirse que los radicales libres de oxígeno se producían en grandes cantidades en la vacuola fagocítica (Figura 1), se responsabilizó a estos radicales de la destrucción del microorganismo. Sin embargo, tanto el radical superóxido como el peróxido de hidrógeno son relativamente poco reactivos, de manera que hubo que buscar otras explicaciones.

El contenido de los gránulos citoplasmáticos es también importante. Los citoplastos, cuerpos enucleados sin gránulos, fagocitan las bacterias normalmente y producen un estallido respiratorio normal, pero destruyen las bacterias con poca eficiencia. La mieloperoxidasa, uno de los principales constituyentes de los gránulos, puede utilizar el H_2O_2 para oxidar los haluros y convertirlos en compuestos reactivos tóxicos, como el $OHCl$ y las cloraminas. Sin embargo, en casos de deficiencia en mieloperoxidasa, la destrucción de los microbios no resultaba abiertamente defectuosa, por tanto, tenían que estar necesariamente implicados otros factores en el efecto del esta-

lido respiratorio y en la destrucción de las proteínas de los gránulos. La explicación parece notablemente simple: el bombeo hacia el interior de la vacuola de concentraciones milimolares de electrones, no acompañada de protones, origina el consumo de iones de hidrógeno en el lumen de dicha vacuola, con la consiguiente elevación del pH. El contenido de los gránulos se mantiene en estado inactivo a pH 5.0 y las proteasas neutras se activan cuando se exponen al medio relativamente alcalino de la vacuola [6 - 8].

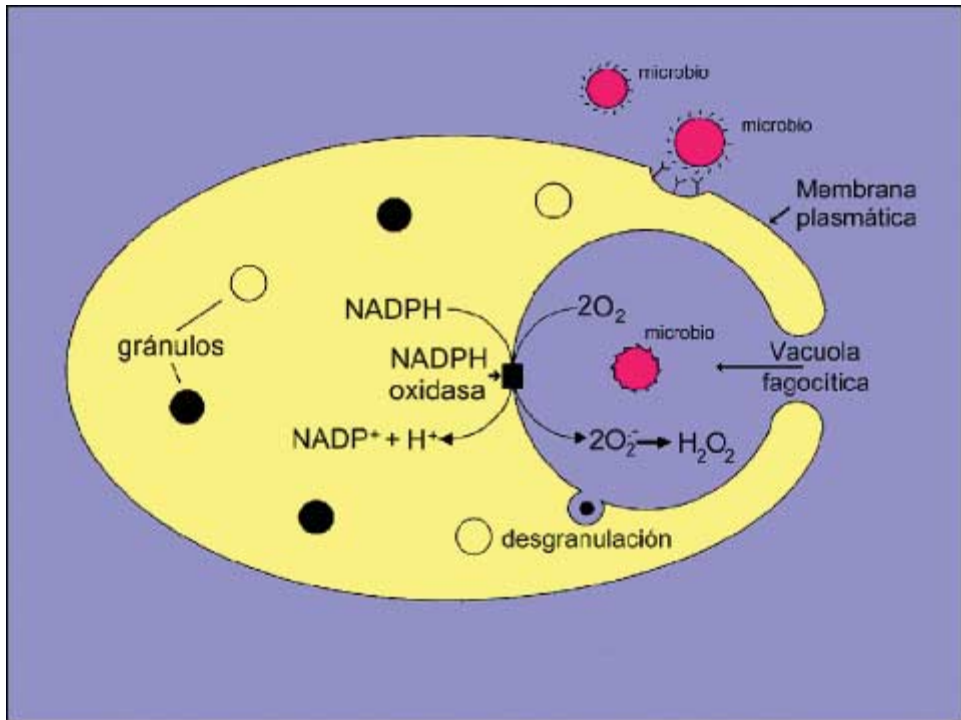


FIGURA 1. Representación esquemática de un fagocito atrapando un microorganismo en la vacuola fagocítica. La NADPH oxidasa se activa selectivamente en la membrana de la vacuola y genera O_2^- y H_2O_2 en el lumen de la vacuola. Otros enzimas se liberan en la vacuola por desgranulación de los gránulos citoplasmáticos [8].

Los fagocitos circulantes (leucocitos polimorfonucleares y monocitos) y los macrófagos de los tejidos, como las células de Kupffer en el hígado y las células de la microglia en cerebro, son capaces de

generar cantidades sustanciales de radical superóxido. Los leucocitos polimorfonucleares (PMN) o neutrófilos, son los más activos en este aspecto, puesto que llegan a producir hasta 100 nmoles de radical superóxido por millón de células, cuando se estimulan con 10 ng del éster de forbol 12 miristato 13 acetato (PMA). La NADPH oxidasa fagocítica es un complejo ligado a membrana, denominado también “oxidasa del estallido respiratorio”, que cataliza la reducción univalente del oxígeno molecular con la consiguiente producción del radical superóxido.

En fagocitos quiescentes (en reposo), la NADPH oxidasa no es activa, pero adquiere actividad catalítica cuando las células se estimulan con agentes apropiados. El estímulo fisiológico de la NADPH oxidasa en fagocitos incluye la fagocitosis de bacterias u otras partículas opsonizadas, complejos inmunes, citoquinas, tales como el factor de necrosis tumoral (TNF), la linfotoxina, el interferón γ , péptidos quimiotácticos como el producto C5a de la rotura del complemento y los péptidos N-formilados derivados de bacterias. Estímulos poderosos no fisiológicos son el PMA, activador de la proteína quinasa C y el agente activador de las proteínas G (AIF $_3$).

La NADPH oxidasa, responsable del estallido respiratorio de los fagocitos, genera el radical superóxido como producto primario, el cual en sí mismo es un oxidante débil. Sin embargo, en una serie de reacciones posteriores, este radical da origen a oxidantes más potentes, tales como:

- **peróxido de hidrógeno** (H_2O_2), vía dismutación espontánea o catalizada enzimáticamente por las superóxido dismutasas;
- **radical hidroxilo** ($\cdot OH$) por reacción del $O_2^{\cdot -}$ con el H_2O_2 , en presencia de hierro bivalente (reacción de Fenton);
- **hipohaluros**, como el ácido hipocloroso ($OHCl$), generado al reaccionar el anión Cl^- con el H_2O_2 , mediante la acción catalítica de la mieloperoxidasa.

De esta manera, la NADPH oxidasa juega un papel crítico en la producción de un grupo complejo de ROS. En los fagocitos, estas especies reactivas van a ser utilizadas como agentes microbicidas, particularmente frente a las bacterias y hongos catalasa positivos.

Los fagocitos cuentan también con otros recursos antimicrobianos oxidativos, como el radical óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) y otros no oxidativos, como proteasas y péptidos bactericidas procedentes de los gránulos.

Por último, la interacción del $\text{NO}\cdot$ con el O_2^- da origen al peroxinitrito ($\text{ONOO}\cdot$), agente que se descompone en radical nitroso y radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), siendo este último mucho más potente que los anteriores [7, 9].

COMPONENTES DEL SISTEMA NADPH OXIDASA

La mayor parte del conocimiento actual de la NADPH oxidasa se ha conseguido estudiando los diferentes subgrupos de la enfermedad granulomatosa crónica (CGD), donde este complejo enzimático es genéticamente defectivo. Analizando los fagocitos de tales pacientes, se han descubierto los componentes clásicos de este sistema. Estos son: la glicoproteína $\text{gp91}^{\text{phox}}$ y los polipéptidos p22^{phox} , p67^{phox} , p47^{phox} y p40^{phox} , todos ellos codificados por el gen *phox* (phagocyte oxidase) en el cromosoma X. El flavocitocromo b558 forma el complejo asociado a membrana, que está formado por una molécula de $\text{gp91}^{\text{phox}}$ y dos moléculas de p22^{phox} . Los polipéptidos p67^{phox} , p47^{phox} y p40^{phox} se encuentran en el citoplasma. Otros dos componentes, relacionados estructuralmente con el producto del oncogen ras, Ras2 y Rap1A, se encuentran también en el citoplasma y participan en la activación de este sistema.

Flavocitocromo b558: Es el componente redox de la NADPH oxidasa, un sistema de transferencia electrónica que genera el radical superóxido. Es un heterodímero que se localiza en la membrana de los gránulos específicos (90 %) y la membrana plasmática (10 %) cuando el PMN está en reposo. Después de la activación, el flavocitocromo b558 emigra desde la membrana de los gránulos específicos hacia la membrana plasmática o la de los fagosomas. Está compuesto por 2 subunidades diferentes: una glicoproteína de 91 kDa ($\text{gp91}^{\text{phox}}$) y otra proteína no glicosilada de 22 kDa (p22^{phox}). La subunidad mayor se sintetiza originalmente como una proteína de 65 kDa, pero la N-glicosilación en los residuos de tres aminoácidos 131, 148 y 239, la hace mostrarse como una banda difusa de 91 kDa

en geles SDS. Contiene una región de homología con la región de unión al NADPH de varias flavoenzimas, incluyendo la citocromo P-450 reductasa y la ferredoxina-NADP⁺ reductasa, y también muestra homología con el sitio de unión al FAD de varias deshidrogenasas flavoproteicas. El complejo flavocitocromo b558 es, por tanto, una flavoproteína que contiene 2 grupos hemo por cada FAD [1, 3], siendo la subunidad gp91^{phox} la que posee los sitios de unión para el FAD y el NADPH [4]. De acuerdo con este modelo, el terminal-N muy hidrofóbico de gp91^{phox} atraviesa la membrana plasmática al menos cinco veces. Esta región es la que contiene los dos grupos hemo, que parecen descansar en una disposición transmembrana.

La subunidad pequeña, p22^{phox}, del flavocitocromo b558, contiene dos secuencias ricas en prolina en la región C-terminal, una de las cuales es similar a la secuencia consenso para la unión de las regiones SH3. Este dominio se une a un dominio SH3 de p47^{phox}. En un modelo estructural, la secuencia contiene también un terminal-N hidrofóbico que cruza la membrana. Esta subunidad posee una sola histidina conservada evolutivamente y este residuo se ha propuesto que coopera con la subunidad gp91^{phox} para formar uno de los sitios de unión a los grupos hemo. Esta disposición coloca el C-terminal rico en prolina, en el lado citosólico de la membrana donde puede interactuar con p47^{phox}. El flavocitocromo b558 se considera el componente central de la NADPH-oxidasa, pues contiene todos los elementos que le permiten transportar los electrones desde el NADPH hasta el O₂ [1, 3, 10].

p47^{phox}: Esta subunidad se localiza en el citosol en forma libre y formando un complejo de 240 kDa con los otros 2 componentes citosólicos: p67^{phox} y p40^{phox}, y es la responsable del transporte del complejo a la membrana durante la activación. Parece ser que p47^{phox} es el primer componente citosólico que interactúa con el flavocitocromo b558 durante el ensamblaje. Posee una región catiónica con múltiples sitios de fosforilación de serína/treonína quinasa, lo que se ha relacionado con su función reguladora. La fosforilación puede alterar la conformación o neutralizar la región catiónica de la proteína para facilitar el ensamblaje [11]. La desfosforilación inactiva al complejo. Esta proteína contiene dos dominios SH3 en la región central de la molécula. El primero de estos dominios se une a la secuencia rica en prolina situada en el C-terminal de p22^{phox}. El

segundo se une a una región rica en prolina, cerca del centro de la molécula de p67^{phox}. Las interacciones SH3 con las regiones ricas en prolina, a pesar de que son importantes, no parecen ser el único determinante de las interacciones proteína-proteína entre los componentes de la NADPH oxidasa [12 - 13].

En respuesta a la estimulación celular, la proteína p47^{phox} se fosforila *in vivo* en múltiples serinas situadas en la región C-terminal. La fosforilación parece ser parte de la señal de activación de la oxidasa, aunque puede estar implicada también la fosforilación de los otros dos componentes (p67^{phox} y p40^{phox}).

La proteína p47^{phox} no es esencial para la función de la NADPH oxidasa *in vitro*, siempre que existan grandes concentraciones de p67^{phox} y de Rac. Funcionalmente, el efecto de p47^{phox} es incrementar unas 100 veces la unión de p67^{phox} y 50 veces la unión de Rac. Así que, p47^{phox} parece ser una proteína adaptadora, y no parece participar directamente en la regulación de la actividad de la NADPH oxidasa. Por tanto, el efecto regulador directo de la actividad oxidasa tiene que estar en Rac o en p67^{phox}.

p67^{phox}: Esta proteína se encuentra en el citosol unida al complejo de 240 kDa cuando el leucocito está en reposo. Comparte la unión al NADPH con gp91^{phox} y contiene una región central rica en prolina, seguida de un dominio SH3, con un segundo SH3 en la región C-terminal. Se desconoce la función del primer SH3. La proteína p67^{phox} se une a la p47^{phox} vía una interacción cola-cola, utilizando el dominio SH3 cercano al C-terminal de p67^{phox} para unirse a la secuencia rica en prolina en el C-terminal de p47^{phox}. Además, el segundo dominio SH3 de p47^{phox} se une a la región rica en prolina de p67^{phox}. La mitad N-terminal de p67^{phox} contiene una región de enlace para Rac, ya que la secuencia de aminoácidos (1-198) de p67^{phox} se une a Rac con la misma afinidad que lo hiciera la secuencia p67^{phox} completa [14].

No se conoce otra función para p67^{phox} que la de unirse a p47^{phox} y a Rac. En ausencia de p47^{phox}, p67^{phox} no puede ensamblarse con la NADPH oxidasa, lo que demuestra que p47^{phox} ejerce la función adaptadora, antes citada, para la unión de p67^{phox}. Se ha observado que existe una correspondencia de efectos entre p67^{phox} y p47^{phox}, que

indica la existencia de mutuas facilidades para la unión de estos dos componentes citosólicos.

p40^{phox}: Es el tercer componente del complejo citosólico. Se ha descrito de forma reiterada que puede regular negativamente la actividad del complejo [15] y se ha demostrado que en la activación sufre fosforilación que pudiera explicar dicha acción [16] p40^{phox}. Se caracterizó inicialmente como componente del complejo con p67^{phox} y p47^{phox} en el citosol de neutrofilos no activos. Puede interaccionar con el dominio rico en prolina de la región C-terminal de p47^{phox}, aunque no está claro que esto ocurra *in vivo*. Este componente emigra a la membrana celular después de la activación, unida a p47^{phox} y p67^{phox}. En un sistema libre de células p40^{phox} no es esencial para la actividad oxidasa y se ha descrito que inhibe dicha actividad. Puede ser que juegue un papel regulador o que ayude a mantener los factores citosólicos en un estado inactivo [17, 18].

Rac2: Es una proteína de unión al GTP que se encuentra en el citosol durante el reposo, unida a un factor de intercambio de nucleótidos de guanina (Rho-GDI). Con la activación intercambia GDP por GTP, se disocia del factor Rho-GDI y se trasloca a la membrana plasmática simultánea e independientemente del complejo de 240 kDa. Es esencial para la activación del sistema y se cree que está conectada a las vías de señalización tempranas. Desempeña además un importante papel en la quimiotaxis [19].

Rap1A: Es una proteína de la superfamilia Ras de proteínas de unión al GTP. Se asocia estrechamente con el flavocitocromo b558 en el momento de la activación, y a se vez, puede activar la proteína quinasa C y participar así en la regulación del complejo.

Rho-GDI: De la subfamilia Rho a la que pertenece Ras, está implicada en la regulación de una gran cantidad de procesos celulares importantes. La capacidad de Rac para estimular la producción de radical superóxido, se basa en su conversión desde la forma inactiva, unida a GDP, a la forma activa, unida a GTP. La traslocación a la membrana requiere un intercambio entre nucleótidos de guanina, por una proteína asociada a membrana, la GEF (guanin nucleotide exchange factor) acompañado por su liberación desde un complejo citosólico con la GDI (GDP dissociation inhibitor). Una propiedad común de todos los miembros de la subfamilia Rho, es su interacción con el

regulador negativo, la proteína GDI. El papel de Rho-GDI es mantener Rho/Rac en el citosol, distante de sus objetivos en la membrana, enmascarando el grupo geranilo-geranilo y también en un estado inactivo formando complejo con GDP. La asociación de Rac con GDI puede también inhibir la GAP (GTPase activating protein), que estimula la hidrólisis del GTP por Ras. Mediadores lipídicos como los inositol fosfolípidos regulan la actina del citoesqueleto y conducen a la formación de un complejo Rho/Rho-GDI en una conformación parcialmente abierta y ya preactivada [20].

ENSAMBLAJE DEL SISTEMA NADPH-OXIDASA

Tanto en el reposo como durante el ensamblaje se establecen interacciones entre los diferentes componentes del sistema NADPH oxidasa (figura 2). En esto desempeñan un importante papel las interacciones de los dominios SH3. Estas son regiones homólogas a las regiones no catalíticas de la familia Src de tirosina quinasas, que tienen afinidad por los residuos de prolina. Como en varios componentes del sistema existen tantos dominios SH3 como regiones ricas en prolina, esto facilita las interacciones entre las proteínas del complejo citosólico en el reposo y entre éstas y el flavocitocromo b558 en la activación. En estado quiescente la proteína p47^{phox} puede establecer este tipo de interacciones de forma intracatenaria, lo que provoca el secuestro de la región catiónica de la molécula. Durante la activación esta interacción se rompe y permite su unión a las regiones ricas en prolina de p22^{phox} en la membrana. Como las interacciones SH3 son poco específicas, se cree que su función sea alinear a las proteínas para el establecimiento de otras interacciones (no SH3) de mayor especificidad. Estas últimas han sido identificadas, tanto entre los componentes citosólicos, como entre éstos y el flavocitocromo b558. Entre ellas se destacan 3 posibles interacciones entre gp91^{phox} y p47^{phox}. Se supone que uno de estos sitios en gp91^{phox} interacciona con la región catiónica de p47^{phox} cuando esta se encuentra altamente fosforilada.

Basados en las diferentes interacciones identificadas entre los componentes del sistema multienzimático, DeLeo y Quinn [21], han elaborado un modelo que explica la forma y la secuencia en que se

produce el ensamblaje. Este modelo, unido a los resultados de investigaciones recientes, se plantea de forma resumida:

1. En el reposo, el complejo citosólico se mantiene estabilizado a través de diferentes interacciones incluidas las SH3. La región catiónica de $p47^{\text{phox}}$ está secuestrada, lo que impide su interacción con $p22^{\text{phox}}$ en la membrana.

2. En la activación, $p47^{\text{phox}}$ se fosforila y pierde la unión intracatenaria por dominio SH3. Esto expone los dominios SH3 y la región catiónica, lo que facilita su interacción con $p67^{\text{phox}}$. Después el complejo se trasloca a la membrana y se alinea a través de la interacción SH3 entre $p47^{\text{phox}}$ y las regiones ricas en prolina de $p22^{\text{phox}}$ [9]. En este momento la región catiónica de $p47^{\text{phox}}$ se libera de su unión a $p67^{\text{phox}}$ y establece un enlace de alta afinidad con el flavocitocromo

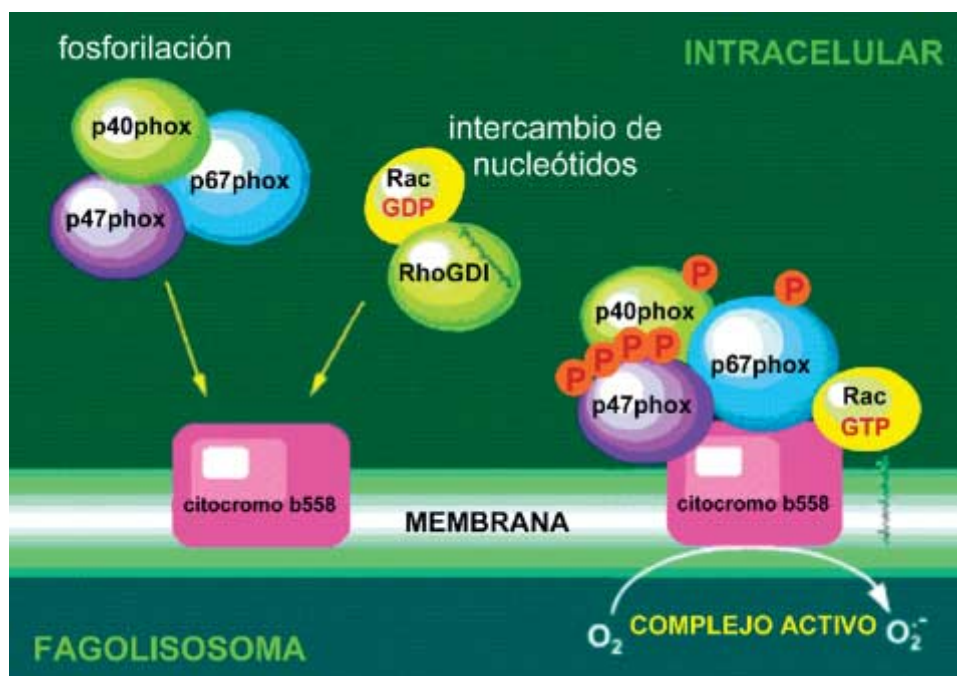


FIGURA 2. Ensamblaje de los componentes de la NADPH oxidasa para formar el complejo activo. A la izquierda se muestran los componentes de la NADPH oxidasa cuando la célula está en reposo. A la derecha se muestra el complejo activo. Para la formación del complejo activo $p47$ ha tenido que sufrir múltiples fosforilaciones en residuos de serina cercanos al C-terminal y Rac ha tenido que realizar intercambio de nucleótidos GDP/GTP.

b558, lo que puede deberse a la mayor fosforilación de p47^{phox} o a la acción de Rac [14, 21].

MECANISMO DE ACCIÓN

La NADPH-oxidasa cataliza la reacción:



Durante la transferencia de electrones, estos pasan desde el NADPH hacia el FAD, de éste a los grupos hemo y de éstos al O₂ [11]. La liberación de protones H⁺ en el compartimento citosólico

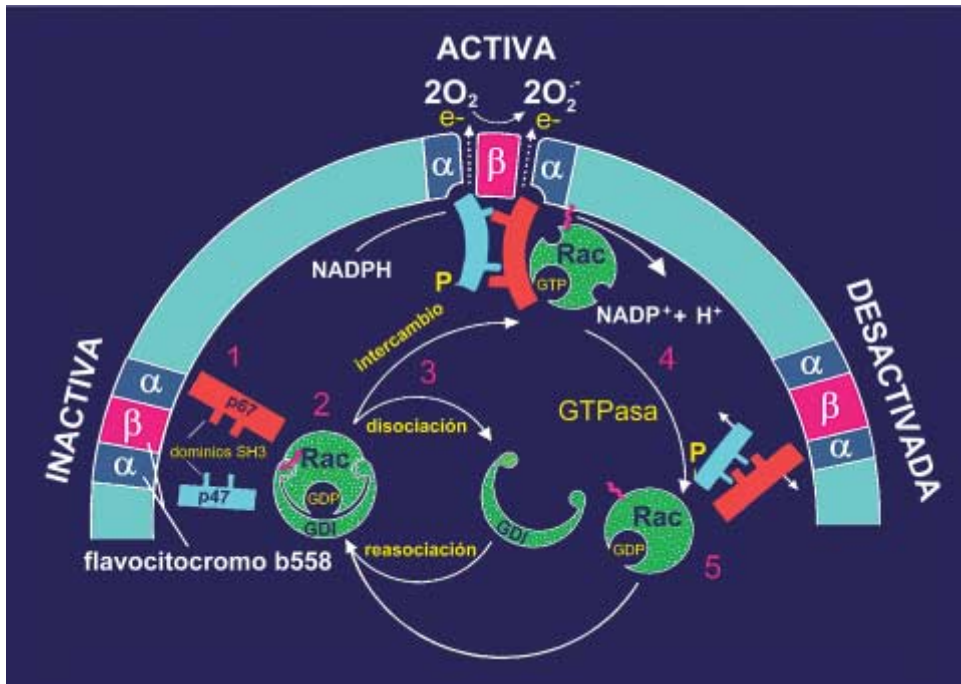


FIGURA 3. Activación y desactivación de la NADPH oxidasa. 1. Reconocimiento de los dominios SH3 de dos de las subunidades citosólicas p67^{phox} y p47^{phox}. 2. Acercamiento del complejo Rac/GDI. 3. Disociación de Rac/GDI, intercambio de nucleótidos, y ensamblaje de las subunidades al citocromo b558 con la consiguiente activación del complejo, formación de radical superóxido y salida de electrones (e⁻) al compartimento fagolisosómico. 4. actividad GTPasa que inactiva Ras. 5. Formación de Rac-GDP y separación del complejo. 6. reasociación Rac-GDP con RhoGDI.

produce una rápida despolarización de la membrana y una acidificación del medio intracelular. Estos cambios son compensados por la existencia de un canal de protones en la propia estructura del sistema enzimático que permite el escape de estos hacia el espacio extracelular fagolisosómico. La proteína que funciona como canal es gp91^{phox}. Se sugiere que el mecanismo de flujo de protones a través de gp91^{phox} puede involucrar un ciclo de protonación/desprotonación de la His-115 en la medida en que ésta se expone alternativamente hacia el lado interior y exterior de la membrana [1, 3, 22] (Figura 3).

Cuando las células se rompen (por sonicación) y se separan por ultracentrifugación las fracciones citosólica y membranal, la NADPH oxidasa puede ser reconstituída, mezclando ambas fracciones y adicionando una sustancia anfifílica, como el dodecil sulfato sódico o el ácido araquidónico. Este tipo de activación de la NADPH oxidasa, en un medio libre de células, ha sido importante para profundizar en los mecanismos bioquímicos de este complejo y de su mecanismo de activación.

ENFERMEDAD GRANULOMATOSA CRÓNICA (CGD): DEFICIENCIA DE NADPH OXIDASA

El ejemplo más dramático que pone de manifiesto la importancia de la NADPH oxidasa es la enfermedad granulomatosa crónica (CGD, **C**hronic **G**ranulomatous **D**isease), caracterizada por la ausencia de esta actividad enzimática, y por tanto del estallido respiratorio de los fagocitos en estos pacientes. Esta enfermedad se manifiesta por una predisposición, severa y prolongada, a infecciones con desenlace fatal. Los organismos responsables incluyen una variedad de bacterias y hongos, entre los cuales algunos, como la *Serratia marsescens*, no es patógeno en individuos normales. Como esta enfermedad es rara, las células de estos enfermos suponen un valioso sistema donde estudiar las propiedades de la NADPH oxidasa. En la actualidad se utilizan ratones Knockout deficientes en los genes *phox* [23].

La enfermedad crónica granulomatosa (CGD) es una inmunodeficiencia primaria rara, donde 2/3 de los casos muestran un patrón

de herencia recesiva ligado al cromosoma X y los casos restantes son autosómicos recesivos. Se refiere a un grupo heterogéneo de enfermedades de carácter hereditario que cursan con alteraciones del mecanismo de destrucción de los microorganismos porque las células fagocíticas son incapaces de generar superóxido y otras especies reactivas de oxígeno en los fagosomas intracelulares, propiciando la formación de granulomas. Los órganos más frecuentemente afectados son: ganglios linfáticos, piel, pulmones, hígado y aparato digestivo. Las lesiones pueden ser grandes y numerosas y causar efecto de masa, obstrucción y disfunción de los órganos afectados. El tratamiento con interferón γ incrementa la capacidad de los neutrófilos para generar superóxido, siendo más efectivo en pacientes con una mutación en la unión intrón exón adyacente al tercer intrón del gen que codifica la proteína gp91^{phox}.

La importancia crítica de la NADPH oxidasa para la defensa antimicrobiana está subrayada en la CGD como una rara patología de inmunodeficiencia primaria. La incidencia de esta enfermedad oscila entre 1/200.000 y 1/1.000.000 afectando sobre todo al sexo masculino. Los síntomas suelen manifestarse alrededor del primer o segundo año de la vida, aunque en casos más leves pueden retrasarse a la adolescencia e incluso mostrarse en la vida adulta. Es transmisible por herencia y se caracteriza por poseer fagocitos deficientes en la producción de radical superóxido. Los pacientes que sufren esta enfermedad viven amenazados durante toda su vida por infecciones recurrentes, debido a su incapacidad para destruir bacterias y hongos catalasa positivos. A pesar del tratamiento con antibióticos, la mayoría de ellos muere de infecciones antes de alcanzar los 40 años. El tratamiento con interferón recombinante parece que está dando buenos resultados para prolongar la vida a estos pacientes. Sin embargo, la mayor esperanza para ellos se cifra en restaurarles la actividad NADPH oxidasa por terapia génica somática.

Las vacuolas fagocíticas en los enfermos CGD son anormalmente pequeñas y los tejidos de estos pacientes están infiltrados de "granulomata" estructura formada por macrófagos y linfocitos. Estas anomalías parece que son consecuencia de la digestión defectuosa de microorganismos endocitados y residuos autólogos, una indigestión que se origina por vacuolas excesivamente ácidas.

Unos 2/3 de los casos de CGD se deben a mutaciones en el gen gp91^{phox}, que se sitúa en el cromosoma X. Una forma rara recesiva autosómica de CGD se debe a defectos en el gen que codifica la subunidad pequeña (p22^{phox}) del flavocitocromo b558. Cualquier defecto en estas dos proteínas influye en la formación del flavocitocromo b558. La formación del heterodímero p22-gp91-p22, parece que es esencial para la estabilidad intracelular de cada subunidad, ya que la deficiencia de una se asocia con la reducción marcada de la concentración de la otra. Dos formas autosómicas recesivas de la CGD están causadas por mutaciones en los genes que codifican las proteínas citoplasmáticas p47^{phox} y p67^{phox}. Estas mutaciones ocasionan defectos en la traslocación de estos dos componentes a la membrana. Existen otras mutaciones que afectan al sitio de enlace del NADPH en el C-terminal de gp91^{phox}. Las mutaciones relacionadas con p21^{Rac} son letales. CGD debida a una mutación en p40^{phox} no ha sido descrita hasta la fecha.

Cada uno de los genes *phox* que codifican los componentes de la NADPH oxidasa se han encontrado mutados en subgrupos de pacientes con CGD. El tratamiento de la enfermedad granulomatosa crónica con trasplante alogénico convencional de células madre hematopoyéticas, comporta un elevado riesgo de muerte y de complicaciones graves. Por ello, investigadores del Instituto Nacional de Alergia e Infecciones, de Bethesda, en Estados Unidos (Horwitz et al 2001) [24], han sugerido la posibilidad de realizar trasplante de células madre sin ablación de la médula ósea del receptor. Los resultados de esta investigación, indican que el acondicionamiento no mieloablativo seguido de un aloinjerto de células madres hematopoyéticas, tratado con una depleción de células T, es una opción posible en los pacientes con enfermedad granulomatosa crónica, y con un familiar donante con idénticos antígenos HLA.

Los pacientes tratados fueron sometidos a un injerto de células madre de la sangre periférica de un hermano con un antígeno idéntico HLA. Según estos autores [24] se utilizó una pauta de acondicionamiento no mieloablativa consistente en ciclofosfamida, fludarabina y globulina antitimocitaria. El aloinjerto fue desprovisto de células T para reducir el riesgo de enfermedad severa contra huésped. Los linfocitos del donante se administraron a intervalos de 30 días después del injerto para facilitar el trasplante.

El diagnóstico de sospecha es clínico, el diagnóstico de confirmación se realiza demostrando el déficit de la capacidad oxidativa de los fagocitos, que se realiza con mayor frecuencia mediante la prueba del azul de tetrazolio, aunque también pueden realizarse otras técnicas como: medición directa de la producción de superóxido, reducción de ferrocitocromo u oxidación de dihidrorodamina con citometría de flujo. El tratamiento de las infecciones agudas debe ser agresivo y con los antibióticos apropiados, determinados mediante antibiograma (resultado del estudio de sensibilidad de un microbio frente a diversos antibióticos). Los abscesos de los ganglios linfáticos del cuello requieren drenaje quirúrgico. Se discute el uso de interferón- γ y de antibióticos preventivos para tratar de disminuir la frecuencia de las infecciones. Aunque el tratamiento antibiótico prolongado ayuda a reducir las infecciones, la severidad de las infecciones recidivantes pulmonares suele provocar la muerte prematura.

La CGD presenta una gran heterogeneidad genética y se han identificado diferentes mutaciones responsables de las formas genéticas de la enfermedad. En el 50-65% de los casos, la mutación afecta al gen que codifica la subunidad gp91^{phox} del complejo enzimático. Esta mutación se hereda como un rasgo recesivo ligado al cromosoma X cuyo gen se localiza en el brazo corto de dicho cromosoma (Xp21-1), que puede estar ausente, truncado o mutado, de tal forma que el DNA no se transcriba o el RNA formado sea inestable. El resto de los casos se deben a mutaciones de los genes que codifican las subunidades p47^{phox}, p67^{phox} y p22^{phox}, localizadas en cromosomas somáticos, que se heredan con un patrón de herencia autosómico recesivo. Las mujeres heterocigotas portadoras de mutaciones gp91^{phox} no tienen riesgo de infecciones graves repetidas, aunque presentan mayor riesgo a padecer lupus discoide o sistémico y afecciones de la cavidad oral tales como estomatitis aftosa y queilitis granulomatosa.

La identificación de mutaciones genéticas responsables de la enfermedad granulomatosa crónica unida a la aplicación de las tecnologías de transferencia genética ha hecho posible la corrección genética de tales patologías. La CGD es el resultado de mutaciones en alguno de los genes que codifican las subunidades esenciales de la NADPH oxidasa del estallido respiratorio. El trasplante alogénico de médula ósea puede curar esta enfermedad, pero la toxicidad re-

lacionada al trasplante y la disponibilidad limitada de donantes apropiados, han restringido su aplicación. Como se conocen los defectos genéticos que causan esta enfermedad y también que es una patología que puede ser tratada por trasplante de médula, la CDG se está considerando una enfermedad prometedora para la terapia génica somática con células madres dirigidas al sistema hematopoyético. Es un hecho reconocido que la actividad NADPH oxidasa puede ser reconstituída por transferencia genética en líneas celulares humanas y de médula CGD, cultivadas *in vitro*. Se han obtenido modelos de CGD en ratones knockout y se han realizado estudios preclínicos sobre estos animales, usando vectores retrovéricos, que han demostrado la reconstitución de la funcionalidad de los neutrófilos normales y un aumento en la resistencia a patógenos tales como *Aspergillus fumigatus*, *Burkholderia cepacia* y *Staphylococcus aureus* [25, 26].

EXCESO DE ACTIVIDAD NADPH OXIDASA

La hiperactividad de la NADPH oxidasa conlleva una exagerada producción de oxidantes, que puede causar un considerable daño tisular. Este daño incluye: deterioro funcional de los linfocitos T, citotoxicidad frente a células endoteliales, lesión directa al DNA de células cercanas y metabolismo oxidativo de agentes químicos, que van a generar compuestos citotóxicos, genotóxicos e inmunogénicos. La hiperactividad NADPH oxidásica fagocítica supone, por tanto, un mecanismo fisiopatológico que se encuentra presente en una gran variedad de estados inflamatorios agudos y crónicos (sepsis bacteriana, síndrome de angustia respiratoria en el adulto, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedades reumáticas y vasculitis de diferentes orígenes).

Se han realizado numerosos intentos para modificar las reacciones inflamatorias, bien con enzimas que metabolicen las ROS (superóxido dismutasa y catalasa) o con agentes atrapadores de dichas especies, manitol, dimetil sulfóxido, N-acetilcisteína, etc), pero han sido solo parcialmente efectivos *in vitro* y en ciertos modelos experimentales de inflamación *in vivo*, y han fracasado como fármacos clínicamente útiles. Sería necesario disponer de inhibidores potentes

de la NADPH oxidasa, que al impedir la formación de radical superóxido, actuaran como agentes antiinflamatorios. Los recientes avances en el conocimiento del sistema NADPH oxidasa a nivel molecular han de poder ayudar a la búsqueda de estos agentes.

NADPH OXIDASA EXPRESADA ECTÓPICAMENTE

La expresión de la NADPH oxidasa en fagocitos se considera una característica funcionalmente relevante. Sin embargo, la generación de radical superóxido y la expresión de los componentes de la NADPH oxidasa (proteínas phox), existen en una serie de células no fagocíticas, tales como en linfocitos B, fibroblastos, células del cuerpo de la carótida, células neuroepiteliales de pulmón embrionario, líneas celulares de hematoma, etc. En todas estas células la NADPH oxidasa es "un enzima en busca de una función". Se ha pensado que participa en la regulación del crecimiento de fibroblastos y en el mecanismo celular que detecta la concentración de oxígeno en el medio e inicia reacciones hormonales o neuronales frente a la hipoxia. De los tipos de células que expresan la NADPH oxidasa, el linfocito B es la que se ha estudiado en profundidad. Una serie de investigaciones revela que las células B poseen un sistema generador de anión superóxido idéntico estructuralmente al de la oxidasa de fagocitos, pero menos activo. Esto se ha demostrado en células B de médula ósea, de amígdalas y en líneas celulares de linfocitos B transformados por el virus de Epstein Barr (EBV) [27]. Exceptuando el activador no fisiológico de la PKC (proteína quinasa C), el PMA (éster de forbol miristato acetato), los únicos estímulos identificados de la oxidasa de células B, han sido el entrecruzamiento de la inmunoglobulina de superficie con los antígenos o anticuerpos nominales y de los antígenos de leucocitos humanos (HLA-DR) con anticuerpos. Por ello, la oxidasa de linfocitos es esencialmente la misma que la de fagocitos, aunque su activación a través de inmunoglobulinas de superficie y HLA-DR sea distinta a la de fagocitos. Consecuentemente, el modelo de oxidasa de los linfocitos B ha llegado a ser un medio fácil para el estudio de la NADPH oxidasa por medios de biología molecular no viables en fagocitos [28, 29]. Recientemente se ha detectado la presencia de una NADPH oxidasa funcional en células del epitelio del cristalino [29]. Numerosas investigaciones se en-

cuentran actualmente profundizando en la la función de esta oxidasa en células no fagocíticas, ya que su implicación en la producción de superóxido las hace relacionarse con procesos patológicos muy diversos, tales como cataratas, enfermedad inflamatoria intestinal, etc. Es un hecho indiscutible que los radicales de oxígeno se encuentran implicados en numerosos procesos patológicos tales como inflamación y lesión tisular, incluyendo el daño producido por la reperfusión, mutagenesis, carcinogénesis y envejecimiento. Por tanto, es de esperar que se consiga alguna sustancia que frene la actividad oxidasa. Un fármaco inhibidor de la NADPH oxidasa sería de gran valor en el tratamiento de una amplia variedad de patologías relacionadas con situaciones inflamatorias crónicas.

AGRADECIMIENTOS

A los Doctores Isabel Sánchez Reus y David Andrés García por su inestimable ayuda en la revisión crítica de este manuscrito.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) BABIOR, B. M. (2000): Phagocytes and oxidative stress *Am J Med* **109**, 33-44.
- (2) BABIOR, B. M.; LAMBETH, J. D.; NAUSEEF, W. (2002): The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys.* **397**, 342-344.
- (3) BABIOR, B. M. (2004): NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol* **16**, 42-47
- (4) SBARRA, A. J.; KARNOVSKY, M. L. (1959): The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* **234**, 1355-1362.
- (5) BABIOR, B. M.; KIPNES, R. S. Y CURNUTTE, J. T. (1973): Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest* **52**, 741-744.
- (6) MALY, F. E. Y SCHÜRER-MALY, C. (1995): How and Why cells make superoxide: The "phagocytic NADPH oxidase. *NIPS* **10**, 233-238
- (7) CASCALES, M. (1999): Inmunosenescencia. En: Estrés Oxidativo, Envejecimiento y Enfermedad. Instituto de España. Madrid, pp 169-192.
- (8) SEGAL, A. W. Y ABO, A. (1993): The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes *TIBS* **18**, 43-47
- (9) PARK, J. B. (2003): Phagocytosis induces superoxide formation and apoptosis in macrophages. *Exp Mol Med* **35**, 325-335
- (10) HENDERSON, L. M. (1998): Role of histidines identified by mutagenesis in the NADPH oxidase-associated H⁺ channel. *J Biol Chem* **273**, 33216-33223.

- (11) MENDEZ, I. DE; HOMAYOUNPOUR, N.; LETO, T. L. (1997): Specificity of p47phox SH3 domain interactions in NADPH oxidase assembly and activation. *Mol Cell Biol* **17**, 2177-2185.
- (12) FREEMAN, J. L. Y LAMBETH, J. D. (1996): NADPH oxidase activity is independent of p47-phox in vitro *J Biol. Chem* **271**, 22578-22585.
- (13) FAUST, L. P.; EL BENNA, J.; BABIOR, B. M.; CHANOCK, S. J. (1995): The phosphorylation targets of p47-phox subunit of the respiratory burst oxidase. Functions of the individual target serines as evaluated by site-directed mutagenesis. *J Clin Invest* **96**, 1499-1505.
- (14) DANG, P. M.; CROSS, A. R.; BABIOR, B. M. (2001): Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase: a direct interaction between p67 phox and cytochrome b558. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**, 3001-3005.
- (15) SATHYAMOORTHY, M.; MENDEZ, I. DE; ADAMS, A. G.; LETO, T. L. (1998). p40(phox): down-regulates NADPH oxidase activity through interactions with its SH3 domain. *J Biol Chem* **272**, 9141-9146.
- (16) CROSS, A. R. (2000): p40phox participates in the activation of NADPH oxidase by increasing the affinity of P47phox for flavocytochrome b558. *Biochem J* **349**, 113-117
- (17) BOUIN, A. P.; GRANDVAUX, N.; VIGNAIS, V.; FUCHS, A. (1998). p40(phox): is phosphorylated on threonine 154 and serine 315 during activation of the phagocyte NADPH oxidase. Implication of a protein kinase c-type kinase in the phosphorylation process. *J Biol Chem* **273**, 30097-30103.
- (18) GRIZOT, S.; GRANDVAUX, N.; FIESCHI, F.; FAURÉ, J.; MASSENET, C.; ANDRIEU, J. P.; FUCHS, A.; VIGNAIS, P. V.; TIMMINS, P.; DAGHER, M. C. Y PEBAY-PEYROULA, E. (2001). Small angle neutron scattering and gel filtration analyses of neutrophil NADPH-oxidase cytosolic factors highlight the role of the C-terminal end of p47phox in the association with p40phox. *Biochemistry* **40**, 3127-3133
- (19) GEIST, M.; DAGHER, M. C.; MOLNAR, G.; HAVASI, A.; FAURÉ, J.; PACLET, M.; MOREL, F. Y LIGETI, E. (2001): Characterisation of Rac GTPase activating protein (Rac-GAP): in human neutrophil granulocytes, *Biochem J* **355**, 851-858.
- (20) FAURÉ, J.; VIGNAIS, P. V.; DAGHER, M. C. (1999): Phosphoinositide-dependent activation of Rho A involves partial opening of the RhoA/Rho-GDI complex. *Eur J Biochem.* **262**, 1-12.
- (21) DELEO, F. R.; QUINN, M. T. (1996): Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. *J Leukocyte Biol* **60**, 677-691
- (22) KOSHKIN, V.; LOTAN, O.; PICK, E. (1997): Electron transfer in the superoxide-generating NADPH oxidase complex reconstituted *in vitro*. *Biochim Biophys Acta* **1319**, 139-146.
- (23) JENDROSSEK, V.; RITZEL, A.; NEUBAUER, B.; HEYDEN, S.; GAHR, M. (1997): An in-frame triplet deletion within the gp91-phox gene in an adult X-linked CGD patient with residual NADPH-oxidase activity. *Eur J Haematol* **58**, 78-85.
- (24) HORWITZ, M. E.; BARRETT, A. J.; BROWN, M. R.; CARTER, C. S.; CHILDS, R.; GALLIN, J. I.; HOLLAND, S. M.; LINTON, G. F.; MILLER, J. A.; LEITMAN, S. F.; READ, E. J.; MALECH, H. L. (2001): Treatment of chronic granulomatous disease with non-meloablative conditioning and a T-cell-depleted hematopoietic allograft. *New Engl J Med* **344**, 926-927

- (25) BARESE, C. N.; GOEBEL, W. S.; DINAUER, M. C. (2004): Gene therapy for chronic granulomatous disease. *Expert Opin Biol Ther.* 4, 1423-34
- (26) GOEBEL, W. S.; DINAUER, M. C. (2003): Gene therapy for chronic granulomatous disease. *Acta Haematol.* **110**, 86-92
- (27) QUINN, M. T. Y GAUSS, K. A. (2004): Structure and regulation of neutrophil respiratory burst oxidase: Comparison with nonphagocyte oxidase. *J Leukocyte* **76**, 760-781.
- (28) MILLER, F. J. JR. Y GRIENDLING, K. K. (2002): Functional evaluation of nonphagocyte NAD(P)H oxidase *Methods Enzymol* **353**, 220-233
- (29) PACLET, M. H.; COLEMAN, A. W.; BURRITT, J. Y MOREL, F. (2001). NADPH oxidase of Epstein-Barr-Virus immortalized B lymphocytes. Effect of cytochrome b558 glycosylation. *Eur J Biochem* **208**, 5197-5208.
- (30) RAO, P. V.; MADDALA, R.; JOHN, F. Y ZIGLER, J. S. JR. (2004): Expression on nonphagocytic NADPH oxidase system in the ocular lens. *Mol Vision* **10**, 112-121