

## Bioquimia

Volumen **29**  
Volume

Número **2**  
Number

Abril- Junio **2004**  
April-June

*Artículo:*

### Fagocitosis: mecanismos y consecuencias Tercera parte

Derechos reservados, Copyright © 2004:  
Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica, AC

Otras secciones de  
este sitio:

-  [Índice de este número](#)
-  [Más revistas](#)
-  [Búsqueda](#)

*Others sections in  
this web site:*

-  [Contents of this number](#)
-  [More journals](#)
-  [Search](#)

# Fagocitosis: mecanismos y consecuencias

## Tercera parte

Oscar Rojas-Espinosa\* Patricia Arce-Paredes\*\*

### RESUMEN

Ellie Metchnikoff, en 1880, descubrió que la función de las células fagocíticas era esencial para la supervivencia de todas las especies del reino animal. En los organismos unicelulares como los protozoarios, la función fagocítica es el único medio por el cual estos organismos adquieren su alimento. La función fagocítica de estas células se mejora a lo largo de la evolución y se mantiene en los animales más evolucionados, aunque aquí la función de los fagocitos deja de ser preponderantemente nutricional para constituirse en un eficiente mecanismo de protección no específico contra agentes infecciosos y de eliminación de células muertas o seniles. Cada etapa del proceso fagocítico (la migración, el reconocimiento de lo que puede y debe ingerirse, la endocitosis y la destrucción de partículas) se descubre cada vez más complicada; día a día se identifican más componentes moleculares y se establecen más interacciones y rutas metabólicas. Aunque el proceso de la fagocitosis no está esclarecido en su totalidad, ahora tenemos una mejor idea de cómo se reconocen las partículas que deben eliminarse y de los mecanismos subsecuentes que llevan a su destrucción. En este artículo, se hace una revisión concisa del proceso de la fagocitosis y se enfatiza su importancia como mecanismo de protección en los vertebrados, señalando, aunque de manera somera, aquellos aspectos que en la actualidad son objeto de mayor estudio, incluyendo estructura celular, la existencia y función de las proteínas de adhesión, los receptores para endocitosis, las proteínas G, las cascadas de señalización, la maduración de los fagosomas, y la generación de los metabolitos tóxicos del oxígeno y el nitrógeno.

**Palabras clave:** Fagocitosis, células fagocíticas, bioquímica, neutrófilos, macrófagos.

### ABSTRACT

*In 1880 Elli Metchnikoff established the phagocytic cells' function as an essential process for the survival of animal species. In the unicellular organisms, such as the protozoa, the phagocytic function is the only means through which these organisms acquire their next meal. The phagocytic function improves through evolution and remains so in the more evolved species, although here the primary function of phagocytes is no longer a nourishment-related activity but it turns into an efficient mechanism of protection against infectious agents and of elimination of senescent or abnormal cells. Every step of the phagocytic process (migration, adhesion, endocytosis and particle destruction) appears each time more complex, and new molecules and mechanisms are continuously discovered. Although the whole phagocytic process is not yet fully understood, now we have a better panorama on the way phagocytic cells recognize those particles that must be eliminated and the mechanisms following thereafter. In this article a concise review is made on the phagocytic process and its importance as a protection mechanism of vertebrates, pointing out those aspects receiving major attention at the present, including cell-structure, adhesion proteins, phagocytosis-endowed receptor molecules, signalling pathways and participant molecules, maturation of phagosomes, and the role of the nitrogen and oxygen-derived intermediaries as potent antimicrobial toxins.*

**Key words:** Phagocytosis, phagocytic cells, biochemistry, neutrophils, macrophages.

\* Doctor en Ciencias, Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional.

\*\* Ingeniero Bioquímico, Departamento de Ingeniería Bioquímica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional.

#### Correspondencia:

Dr. Oscar Rojas-Espinosa,

Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional.

Carpio y Plan de Ayala, Colonia Santo Tomás, 11340 México, D.F., México.

e-mail: rojas\_espinosa@hotmail.com

Financiamiento: Coordinación General de Estudios de Posgrado e Investigación (CGPI) del IPN.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

Recibido: 09-10-2003

Aceptado: 03-12-2003

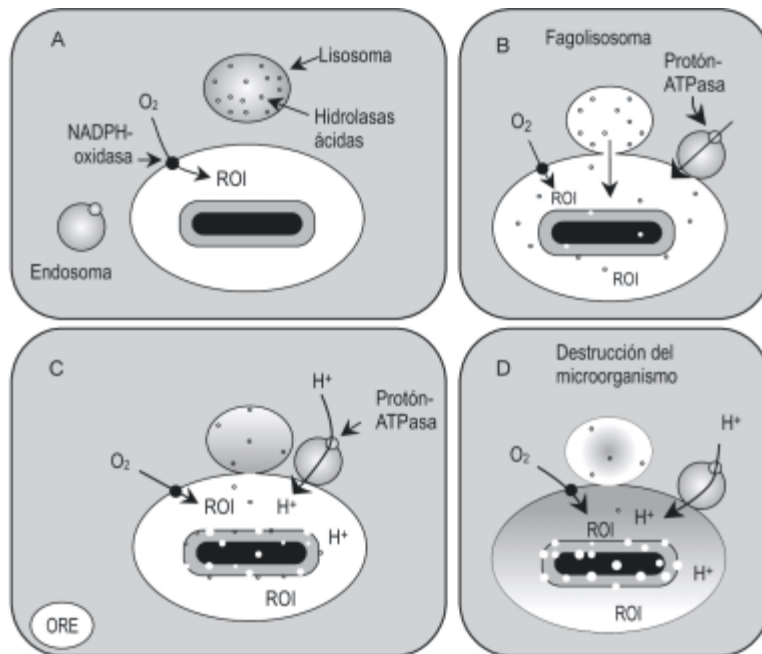
### Eventos no oxidativos de la fagocitosis y actividad microbicida

Desde 1973, Jensen y Bainton<sup>88</sup> demostraron que 10 min después de la endocitosis de levaduras, el pH del fagosoma llega a caer hasta 4.5 en PMN de conejo. En el humano, se ha encontrado que el pH intravacuolar disminuye sólo hasta 6.0-6.5. Aunque estos valores de pH pueden ser bien tolerados por la mayoría de los microorganismos, su efecto bacteriostático está más bien relacionado con la activación de las enzimas que entran al fagosoma; a pH neutro, la mayoría de las enzimas se encuentran como zimógenos inactivos.

En un principio se consideró que la caída en el pH se debía a la acumulación de ácido láctico por aumento en la actividad del ciclo glicolítico, o a la acumulación de ácido carbónico catalizada por la anhidrasa carbónica. Aunque estos mecanismos pueden ser operantes, ahora se sabe que en la acidificación del fagosoma participa principalmente un sistema enzimático de localización endosomal que funciona como una bomba de protones (el sistema de la protón-ATPasa). La protón-ATPasa se incorpora a la membrana de la vacuola digestiva al ocurrir la fusión fago-endosomal. Además de la protón-ATPasa, la membrana de la vacuola digestiva exhibe el marcador lisosomal LAMP-1, cuyo papel biológico no está bien entendido<sup>89</sup> (Figura 13).

### Los gránulos lisosomales

Una vez endocitados, y como consecuencia de la fusión entre fagosomas y los gránulos citoplásmicos, los microorganismos se ponen en contacto con las enzimas hidrolíticas contenidas en los gránulos. Aunque hay varios tipos de gránulos (también llamados lisosomas), aquéllos relacionados con la función hidrolítica-digestiva de las células fagocíticas son los gránulos primarios o azurófilos y los gránulos secundarios o específicos.<sup>90</sup> En 1985, Spitznagel y Shafer<sup>91</sup> hacen un relato histórico sobre los gránulos citoplásmicos y nos cuentan “que fueron descubiertos por Ehrlich en 1879, gracias a su afición por la histoquímica, que después, en 1884, Kanthack y Hardy describen el proceso de la desgranulación y lo relacionan con la actividad antibacteriana de las células fagocíticas; que más tarde, en 1956, Skarnes y Watson extraen de los PMNs de conejo, una proteína catiónica a la que llamaron leucina (leukin), con actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas; que Robineaux en Francia, y Hirsch y Cohn en Estados Unidos, entre 1955 y 1960 redescubren los gránulos, la desgranulación y su relación con la fagocitosis; que más tarde, a partir de 1963, Zeya y Spitznagel aíslan de los gránulos de los PMNs una serie de proteínas catiónicas con actividad bactericida, y que más recientemente, en 1975, Weiss y sus colaboradores extraen de los gránulos una sustancia capaz de incre-



**Figura 13.** Las células fagocíticas destruyen microorganismos a través de mecanismos dependientes e independientes del oxígeno. Los primeros incluyen la participación de los radicales libres del oxígeno (ROI) generados por el sistema de la NADPH-oxidasa al transformar al oxígeno molecular en anión superóxido. Los mecanismos independientes del oxígeno incluyen a hidrolasas lisosomales y a péptidos y proteínas microbicidas. Las hidrolasas lisosomales se activan al acidificarse el medio fagosomal a través de la actividad de una bomba de protones (protón-ATPasa) presente en un tipo de endosomas. La actividad conjunta de los ROI y los componentes lisosomales es la causa de la muerte de los microorganismos ingeridos.

mentar la permeabilidad de la pared de los microorganismos (por esto llamada bactericidal/permeability increasing factor o BPI) y de permitir el paso de materiales tóxicos para los microorganismos". Ahora se sabe de la existencia de otras proteínas microbicidas contenidas también en los lisosomas (*Cuadro IX*).

Los gránulos azurófilos contienen además, lisozima, elastasa, catepsina G, mieloperoxidasa, varias glicosidasas ácidas y otras hidrolasas, mientras que los gránulos secundarios contienen lisozima, lactoferrina y colagenasa<sup>90</sup> (*Cuadro X*). Si bien algunas de las enzimas hidrolíticas, como la lisozima, la elastasa y la catepsina G, pueden participar en la resistencia a la infección por algunos microorganismos,<sup>92</sup> la actividad de la mayoría de ellas está más bien relacionada con los procesos digestivos que siguen a los eventos bactericidas.

### Importancia de los mecanismos microbicidas no oxidativos

La importancia de los mecanismos microbicidas no oxidativos se deduce de casos clínicos como los siguientes, que se empezaron a publicar a principios de los años 1970:

- (a) Spitznagel y cols,<sup>93</sup> describieron el caso de un paciente cuyos leucocitos PMN presentaban una defectuosa actividad bactericida *in vitro* asociada a una marcada deficiencia en lisozima y lactoferrina. El paciente falleció a causa de una infección bacteriana severa.
- (b) Hansen y Andersen<sup>94</sup> comunicaron el caso de un paciente severamente infectado cuyos PMN eran deficientes en lisozima.
- (c) Sly y cols<sup>95</sup> describieron el caso de una deficiencia de beta-glucuronidasa leucocitaria asociada a infecciones bacterianas recurrentes. No se hicieron pruebas funcionales de los PMN.

La lista de reportes de este tipo siguió creciendo y en la actualidad alcanza un volumen considerable.

#### *El Síndrome de Chediak-Higashi*

Los pacientes con esta enfermedad de baja frecuencia muestran albinismo parcial, aumento de susceptibilidad a infecciones, pancitopenia, linfadenopatía y hepato-esplenomegalia en la fase aguda. Los neutrófilos en estos pacientes contienen gránulos anormalmente grandes (gránulos gigantes) e irregulares y los linfocitos pueden presentar cuerpos citoplásmicos de inclusión. Los gránulos anormales también se encuen-

**Cuadro IX. Algunas proteínas microbicidas de los gránulos lisosomales<sup>a,b</sup>**

- 1 Leukina o leuquina (PMN): una proteína catiónica activa sobre bacterias Gram-positivas
- 2 CP (PMN): una serie de 7 proteínas catiónicas
- 3 BPI (PMN): un factor que incrementa la permeabilidad de la pared celular de los microorganismos
- 4 AMP 36.5 kD (PMN): una proteína antimicrobiana activa sobre mutantes de *S. typhimurium* con LPS truncados (colonias rugosas)
- 5 MUMP1-MUMP3 (MFS): una familia de proteínas microbicidas activas sobre microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos

<sup>a</sup>Todos estos factores son proteínas o péptidos catiónicos que interactúan con residuos aniónicos sobre la pared y membrana de los microorganismos, produciendo agujeros a través de los cuales escapan componentes vitales para los mismos y penetran diversos elementos microbicidas.

<sup>b</sup>Basado en la referencia 91

**Cuadro X. Algunos constituyentes de los gránulos lisosomales<sup>a</sup>**

Constituyente	Gránulos azurófilos (primarios)	Gránulos específicos (secundarios)
Hidrolasas ácidas	Catepsina B Catepsina D $\beta$ -glucuronidasa $\alpha$ -Manosidasa Fosfatasa A2	Fosfatasa A2
Proteasas neutras	Elastasa Capesina G Proteinasa 3	Colagenasa, Activador del complemento
Factores microbicidas	Mieloperoxidasa Lisozima Defensinas BPI** Granulicina	Lisozima Lactoferrina

\* Relacionados con actividad microbicida o digestiva

\*\* BPI, bacterial permeability increasing factor

<sup>a</sup> Basado en la referencia 90

tran en los melanocitos, las neuronas, las células de Schwann, los fibroblastos, etc. La enfermedad es autosómica recesiva y su curso puede ser rápido en la infancia o permanecer quiescente por años, antes de presentarse la fase aguda. Los sitios de infección más afectados son los tractos respiratorios superior e inferior y la piel. El *Staphylococcus aureus* es el microorganismo más frecuentemente encontrado, aunque también se encuentran estreptococos y neumococos. En estos pacientes, los niveles de inmunoglobulinas, la hipersensibilidad tardía, la endocitosis por MN y PMN y el metabolismo oxidativo de estas células, son

todos normales, aunque algunos pacientes pueden presentar granulocitopenia, defectos en la quimiotaxis, disminución en la cantidad de mieloperoxidasa en sus neutrófilos, y anomalías en la función de la tubulina leucocitaria susceptibles de corregirse con ácido ascórbico.<sup>96</sup>

**Cambios metabólicos oxidativos relacionados con la función microbicida**

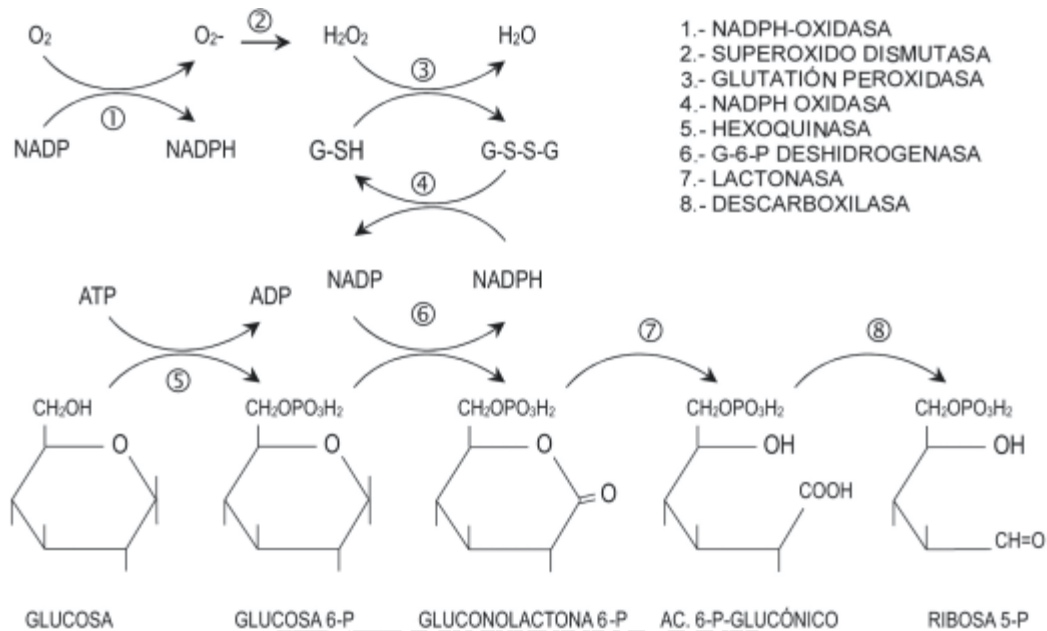
Pocos segundos después del contacto de las células fagocíticas con agentes quimiotácticos y con microorganismos, se detectan en las células alteraciones bioquímicas que indican perturbación de su metabolismo y que incluyen cambios en el potencial eléctrico de la membrana, producción y liberación de AMP cíclico (cAMP), liberación de anión superóxido y más tarde escape de algunas enzimas lisosomales. Algunos de estos cambios bioquímicos están relacionados con el metabolismo del oxígeno y del nitrógeno mientras que otros son de carácter no oxidativo.

Dentro de los cambios oxidativos que acompañan al proceso de la endocitosis se encuentran los incrementos en: (a) el consumo de oxígeno, (b) el consumo de glucosa, (c) la actividad del ciclo de las pentosas o hexosas monofosfato y (d) la produc-

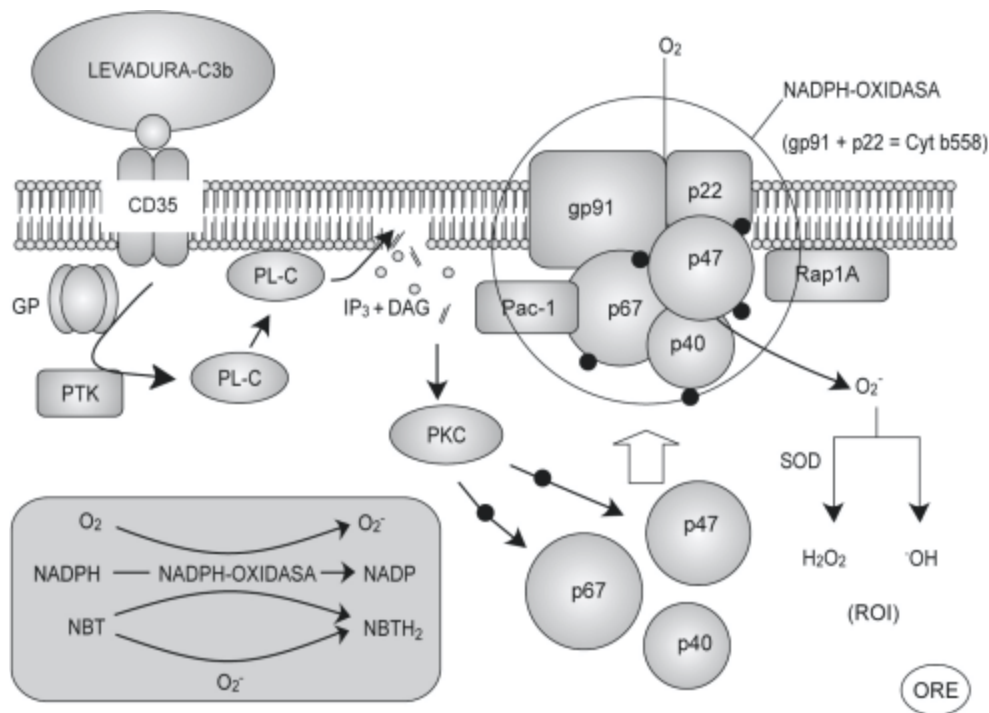
ción de peróxido de hidrógeno y de otros peróxidos. Al conjunto de estos cambios se le llama “estallido respiratorio” (Figura 14). La importancia de estos cambios en la actividad microbicida de los fagocitos se deduce de situaciones clínicas como las siguientes:

*Enfermedad granulomatosa crónica (EGC) ligada al sexo*

Esta enfermedad se caracteriza por la presencia de neutrófilos marcadamente deficientes en su capacidad para destruir algunas especies bacterianas y por la frecuente formación de granulomas en los pacientes. Las manifestaciones clínicas más frecuentes, además de los granulomas, son las neumonías y dermatitis infecciosas causadas por bacterias catalasa positivas y por hongos. Se ha observado que las células ingieren en forma aparentemente normal pero no presentan los cambios en el metabolismo oxidativo que acompañan normalmente a la fagocitosis. La desgranulación lisosomal dentro de las vacuolas fagocíticas es normal o se muestra sólo ligeramente reducida. La deficiente actividad microbicida de los neutrófilos, los eosinófilos, los monocitos, y los macrófagos de los pacientes con este padecimiento, se debe a su falla para responder con los cambios oxidativos que



**Figura 14.** Asociado al proceso de la fagocitosis ocurre en las células el llamado “estallido respiratorio”. Este consiste en el consumo incrementado de oxígeno y glucosa y en la producción de cantidades elevadas de anión superóxido y peróxido de hidrógeno, además de otros cambios relacionados como la activación del sistema de la NADPH-oxidasa y del ciclo de las pentosas. El estallido respiratorio es tan importante para la actividad microbicida de las células que la literatura señala situaciones clínicas asociadas a la ausencia de NADPH-oxidasa (paso 1), a la deficiencia en la glutatión peroxidasa (paso 3) y a la carencia de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (paso 6).



**Figura 15.** Activación del sistema de la NADPH oxidasa. Siguiendo al contacto entre el receptor CD35 y su ligando (C3b), se inicia en la célula una serie de señales en la que participan proteínas G (GTPasas), tirosincinasas y fosfolipasa C, entre otros componentes. Uno de los intermediarios activados, la proteincinasa C (PKT), activa a su vez a varias proteínas citosólicas (p67<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> y p40), que fosforiladas (•) se mueven a la cara interna de la membrana, proceso promovido por Rac-1, donde interaccionan con el citocromo b558 (gp91<sup>phox</sup> + p22<sup>phox</sup>) y también lo activan. El citocromo b558 activado captura oxígeno molecular y lo transforma en anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). El anión superóxido es transformado en peróxido de hidrógeno y luego en radicales hidroxilo, que junto con los “singletes” de oxígeno constituyen la familia de radicales libres del oxígeno (ROI). En la clínica, la prueba del NBT es una medida de la capacidad microbicida de las células fagocíticas y refleja el funcionamiento de esta vía metabólica. El NBT se reduce tanto por el sistema de la NADPH-oxidasa como por el anión superóxido producido (recuadro) (esquema basado en las referencias 98, 99, 106, 107).

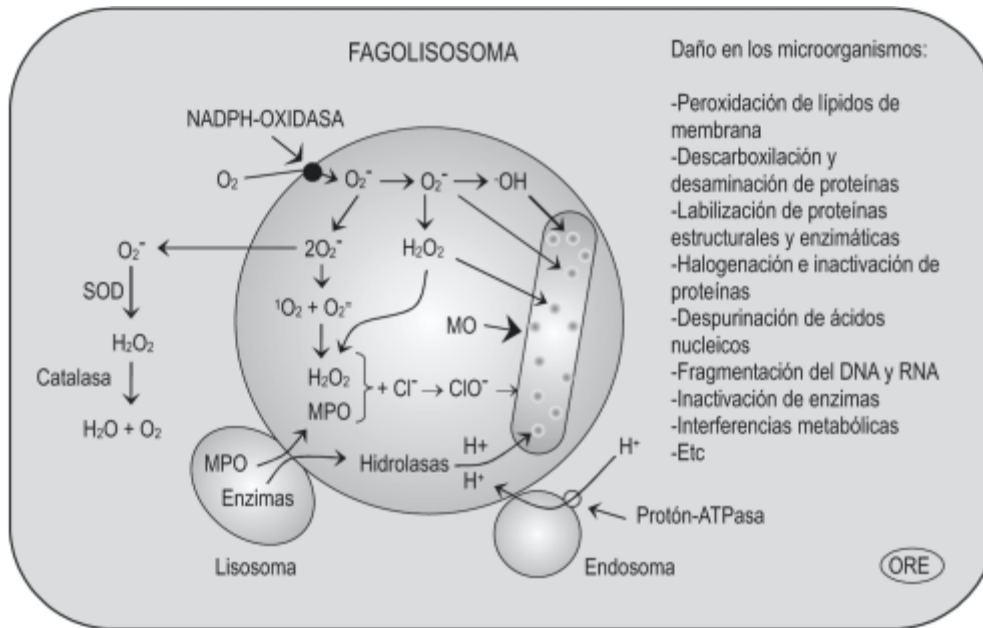
normalmente acompañan a la fagocitosis.<sup>97</sup> El sistema enzimático que cataliza los cambios oxidativos se conoce como *sistema de la NADPH oxidasa* y consiste de cuando menos 4 subunidades: las glicoproteínas gp91<sup>phox</sup> y p22<sup>phox</sup> (las dos subunidades del citocromo b558 membranaral el cual es el acarreador electrónico terminal de la oxidasa), y las glicoproteínas p47<sup>phox</sup> y p67<sup>phox</sup>, los dos componentes citoplásmicos del sistema (Figura 15). La forma ligada al sexo (X) del desorden, la cual corresponde aproximadamente al 60% de los casos, está relacionada con un defecto en el gene que codifica para el componente gp91<sup>phox</sup> del citocromo b558. Sin embargo, la forma autosómica más común de la EGC, responsable de aproximadamente el 30% de los casos, resulta de una falla en la síntesis del componente citoplásmico p47<sup>phox</sup>.<sup>98,99</sup> Los defectos en los otros componentes (p22<sup>phox</sup> y Rac2) son heredados como autosómicos y constituyen el resto de los casos de EGC.

#### *Deficiencia en la glutatión-peroxidasa.*

En mujeres se ha descrito una enfermedad semejante a la EGC. Las células de estas pacientes tienen un defectuoso metabolismo oxidativo y una capacidad bactericida también reducida. El defecto parece deberse a una deficiencia en la peroxidasa del glutatión de los leucocitos.<sup>100</sup> Esto diferencia este síndrome del encontrado en hombres (ligado al X) ya que éstos no presentan tal deficiencia.

#### *Deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.*

Otra deficiencia del metabolismo oxidativo resulta de la carencia de la deshidrogenasa de la glucosa-6-fosfato (G6PDH) leucocitaria.<sup>101,102</sup> Aquí los leucocitos muestran ingestión y desgranulación normales pero tienen un marcado defecto bactericida *in vitro*. Las células deficientes en G6PDH no muestran los cam-

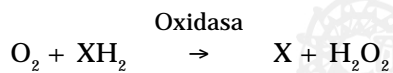


**Figura 16.** La muerte de los microorganismos por las células fagocíticas ocurre por la acción conjunta de los radicales libres del oxígeno (ROI: anión superóxido, radicales hidroxilo, peróxido de hidrógeno), de los radicales libres del nitrógeno (óxido nítrico) (no ilustrado), y de los péptidos y proteínas microbicidas contenidos en los gránulos lisosomales. Las enzimas hidrolíticas juegan un papel decisivo en la digestión de los microorganismos gravemente dañados, aunque algunas enzimas, como la lisozima, muestran un efecto microbicida directo sobre algunos microorganismos, en tanto que otras, como la mieloperoxidasa (MPO), utiliza al peróxido de hidrógeno como sustrato para producir, junto con haluros, compuestos altamente tóxicos (esquema basado en las referencias 109, 110, 116, 119, 130).

bios oxidativos de la fagocitosis. Bellanti y cols,<sup>103</sup> encontraron que la G6PDH en los pacientes con ECG era relativamente inestable y propusieron que esto podría ser la causa de la enfermedad. También se ha sugerido que la inactividad de la enzima podría deberse a la falta de producción de NADP.<sup>104</sup> Es probable que el defecto primario dé como resultado una disminución en los niveles de NADP, y que esto conduzca a una disminución en la actividad de la G6PDH.

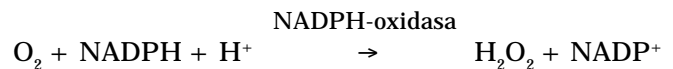
*Origen de los cambios oxidativos*

Durante el proceso de la fagocitosis se activa una oxidasa que cataliza la siguiente reacción general:



Esta reacción explica el aumento en el consumo de oxígeno y la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que ocurren durante la fagocitosis. La estimulación en el ciclo de las hexosas monofosfato (HMP) podría describirse en diver-

sas formas dependiendo de la identidad del sustrato X. Aunque en un principio se propuso que el sustrato podría ser el NADH y la enzima una NADH oxidasa, actualmente hay suficientes evidencias que confirman que la enzima es una NADPH oxidasa y el sustrato el NADPH:<sup>105</sup>



Desde un principio esta proposición tuvo la ventaja de poder definir con una sola reacción los 3 cambios metabólicos observados durante la fagocitosis, ya que esta oxidasa produce directamente un aumento en la concentración de NADP<sup>+</sup>, el sustrato limitante para el ciclo de las HMP. La reacción también explica satisfactoriamente el defecto observado en los pacientes con deficiencia en la G6PDH, ya que se esperaría que estos pacientes tuvieran una falta relativa de NADPH como resultado de la falla en la activación del ciclo de las HMP. Los PMN de los pacientes con ECG carecen de esta actividad enzimática.<sup>106</sup> No obstante, un argumento en contra del papel de esta

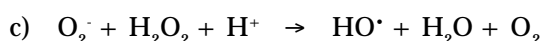
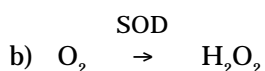
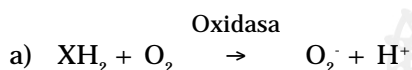
enzima es su parcial sensibilidad a iones  $\text{CN}^-$  ya que el grueso del proceso respiratorio es prácticamente insensible a la inhibición por este compuesto.

#### Reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT)

Durante la fagocitosis también se ha observado un incremento en la capacidad de la célula fagocítica para reducir al nitroazul de tetrazolio (NBT, *nitro blue tetrazolium*).<sup>107,108</sup> La reducción del NBT ocurre cuando, compitiendo con el oxígeno, la molécula es reducida por el sistema de la NADPH-oxidasa hasta su estado de formazan, un producto insoluble de color azul. La reducción del NBT también ocurre por efecto directo del anión superóxido (*Figura 15*). Las células de los pacientes con ECG, o con deficiencia en la G6PDH son incapaces de reducir al colorante tanto en condiciones de reposo como de fagocitosis. El anión superóxido también reduce al grupo hemo del citocromo c ( $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$ ), incrementado su absorción de luz a 550 nm. Esta es la base para la cuantificación bioquímica del anión superóxido.

### ACTIVIDAD MICROBICIDA

Todos los mecanismos anteriores postulan que se produce  $\text{H}_2\text{O}_2$  y que éste es responsable de la actividad microbicida de las células, ya sea por su capacidad bactericida intrínseca o por su interacción con mieloperoxidasa y un haluro (*Figura 16*). El último mecanismo conduce a la iodación de la pared celular microbiana,<sup>109</sup> la producción de aldehídos bactericidas por descarboxilación de aminoácidos o el rompimiento oxidativo de enlaces peptídicos en las proteínas bacterianas.<sup>110</sup> La síntesis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en PMN y fagocitos MN durante la ingestión de partículas no es inhibida por  $\text{CN}^-$ . Esto indica que la oxidasa involucrada no es una hemoproteína. El producto primario de la reducción del oxígeno por la NADPH oxidasa es el anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) el cual puede reducirse de manera espontánea, o por efecto de la superóxido dismutasa (SOD), hasta  $\text{H}_2\text{O}_2$ , o puede reaccionar con el  $\text{H}_2\text{O}_2$  ya formado, para producir radicales hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ) los cuales son todavía más reactivos:



Las evidencias que establecen el papel del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en los mecanismos bactericidas de los fagocitos, derivan de los estudios con células de pacientes con la ECG. Los leucocitos de estos pacientes no pueden matar a la mayoría de las bacterias catalasa positivas, sin embargo matan con facilidad a las bacterias catalasa negativas,<sup>111</sup> quizá porque éstas, al producir peróxido de hidrógeno compensan la deficiencia metabólica de la célula. Las bacterias catalasa positivas quedan confinadas en un fagosoma en donde no se produce peróxido de hidrógeno, al mismo tiempo que las pequeñas cantidades de  $\text{H}_2\text{O}_2$  producido por los microorganismos como desecho metabólico son neutralizados por la catalasa de origen microbiano. Por el contrario, los microorganismos catalasa negativos como los neumococos producen peróxido de hidrógeno que no llega a neutralizarse (por la falta de la enzima) y que por lo tanto se concentra en el fagosoma participando en el suicidio microbiano.

La actividad microbicida del  $\text{H}_2\text{O}_2$  se incrementa notablemente por la mieloperoxidasa (MPO) en presencia de un haluro. La MPO y el haluro, mientras disminuyen la cantidad de  $\text{H}_2\text{O}_2$  presente, incrementan su capacidad para atacar otros sustratos vulnerables que son cruciales para la replicación microbiana (*Figura 16*). La existencia de este mecanismo bactericida en neutrófilos fue descrita por el grupo de Klebanoff,<sup>109</sup> quien demostró que el halógeno se fija covalentemente a proteínas de la partícula ingerida.

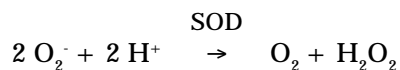
La MPO es llevada al fagosoma por desgranulación mientras que los haluros penetran probablemente por difusión. Tanto el  $\text{Cl}^-$  como el  $\text{I}^-$  intracelulares pueden servir como cofactores para la actividad bactericida del sistema. El  $\text{I}^-$  podría ser captado por los fagocitos a partir de las hormonas tiroideas, e insertado subsecuentemente en las bacterias fagocitadas.<sup>112</sup> En los PMN maduros hay dos tipos diferentes de gránulos, los pequeños son MPO negativos y más abundantes que los mayores, MPO positivos. La cantidad de MPO en los leucocitos PMN es tan grande que puede llegar a constituir hasta el 5% del peso seco celular.<sup>113</sup> Las peroxidases solas en general carecen de efectos antibacterianos pero en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  promueven la formación de intermediarios altamente tóxicos.

También se ha encontrado que la lactoperoxidasa (LPO) inhibe el crecimiento de varios microorganismos cuando se combina con iones tiocianato ( $\text{SCN}^-$ ) y  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Este sistema microbicida parece existir naturalmente en saliva y leche. Los iones tiocianato pueden ser reemplazados por iones yoduro y la LPO por MPO purificada.<sup>114</sup>



La MPO de los leucocitos PMN de cobayos y la LPO de la leche muestran un efecto bactericida sobre *E. coli* cuando se encuentran en presencia de yoduro y  $H_2O_2$ .<sup>109</sup> Las enzimas purificadas pueden sustituirse por la fracción granular de los PMN, el  $H_2O_2$  por un sistema que lo genere (glucosa + glucosa-oxidasa), y el yoduro por tiroxina o por triyodotironina. El efecto bactericida es más grande a valores de pH ácido (pH 5.0). Para máximo efecto bactericida del sistema, la bacteria debe estar presente en la mezcla de reacción durante la oxidación del yoduro; esto sugiere la participación de intermediarios lábiles de oxidación del I más que la participación de productos estables tales como el yodo ( $I_2$ ). La yodinación de la bacteria por el sistema de la MPO-I- $H_2O_2$  se ha demostrado químicamente y por auto-radiografía. La fagocitosis de las bacterias por los leucocitos PMN se asocia con la conversión del yoduro a productos yodinados precipitables con TCA. El yoduro se localiza en el citoplasma de los leucocitos sobre las bacterias ingeridas.

La importancia de este sistema microbicida en neutrófilos es muy evidente en situaciones como la ECG de los niños. Los PMN de estos pacientes no generan  $H_2O_2$  durante la ingestión de partículas y son incapaces de matar a microorganismos catalasa positivos (*S. aureus*, muchas enterobacterias, *C. albicans*, etc.), sin embargo son capaces de matar a microorganismos catalasa negativos (estreptococos o neumococos). De manera congruente, los PMN de pacientes con ECG no producen cantidades detectables de anión superóxido<sup>115</sup> y la inclusión de superóxido dismutasa (SOD) dentro de la vacuola fagocítica conduce a la inhibición de la actividad bactericida de los leucocitos. La SOD es una proteína que contiene  $Cu^{++}$ , usualmente se obtiene de eritrocitos y cataliza la conversión del superóxido a oxígeno y peróxido de hidrógeno:



El superóxido generado *in vitro* puede destruir muchos tipos de bacterias.<sup>116</sup> También se ha demostrado que el citoplasma de los PMN contiene una SOD soluble cuya función podría ser la protección de la célula contra el superóxido que produce.<sup>117</sup> Alternativamente podría funcionar como un mecanismo que asegura la producción de peróxido de hidrógeno.

Durante la fagocitosis también se generan otros metabolitos del oxígeno tales como el "singlete de

oxígeno" ( $^1O_2$ ), cuya relajación hasta su estado basal da como resultado la emisión de energía en forma de quimioluminiscencia (QL). Los PMN de los pacientes con ECG tampoco muestran la QL que se observa en las células normales.<sup>118</sup> La adición de SOD a las células durante la fagocitosis, inhibe muy considerablemente la emisión de QL.



### Protección contra los efectos tóxicos de los metabolitos del oxígeno

Los leucocitos PMN y otras células inflamatorias responden a su estimulación apropiada con la generación, entre muchas otras sustancias, de anión superóxido, parte del cual escapa al medio extracelular. El anión superóxido da origen a las otras especies reactivas del oxígeno entre las que se encuentran el peróxido de hidrógeno, los radicales hidroxilo y las moléculas de "singlete" de oxígeno. Se sabe que estos materiales tóxicos son causa de daño tisular por lesión de las membranas citoplásmicas y de los organelos celulares. Experimentalmente se ha visto que el anión superóxido por sí solo es capaz de depolimerizar al ácido hialurónico, de degradar colágeno, de inactivar enzimas, de oxidar lípidos, de lesionar al DNA, de atacar membranas y de lisar células.<sup>119</sup> Dentro de las células fagocíticas, los radicales libres del oxígeno alteran la integridad de la membrana fagosomal escapando primero al citoplasma y de aquí al exterior de las células. El efecto tóxico de los metabolitos del oxígeno se neutraliza por la superóxido dismutasa (SOD) tisular y celular, por la catalasa, y seguramente por algunos otros mecanismos presentes en los PMN y en los MN y macrófagos (Figura 16).

Las técnicas de medición bioquímica de los metabolitos del oxígeno permiten medir, con un grado variable de eficiencia, solamente la fracción de ellos que logra escapar de las células hacia el medio externo.

### Óxido nítrico (NO)

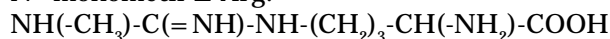
Un novel mecanismo citotóxico de los macrófagos incluye la participación del óxido nítrico. El óxido nítrico se genera a partir del metabolismo de la L-arginina y su producción se regula por efecto de algunas citocinas como el interferón gamma ( $IFN\gamma$ ). La producción de óxido nítrico se puede inducir experimentalmente estimulando a los macrófagos

con diversos materiales, entre ellos los lipopolisacáridos (LPS) de enterobacterias. El sistema de la arginina-óxido nítrico fue descubierto por Hibbs y su grupo<sup>120</sup> cuando demostraron que se requería de L-arginina para que los macrófagos activados pudieran ejercer sus efectos citotóxicos sobre células tumorales. También encontraron que la D-arginina no sustituía a la L-arginina y que la N<sup>G</sup>-monometil-L-arginina era un potente inhibidor competitivo del aminoácido y del sistema citotóxico dependiente del mismo.

L-Arginina:

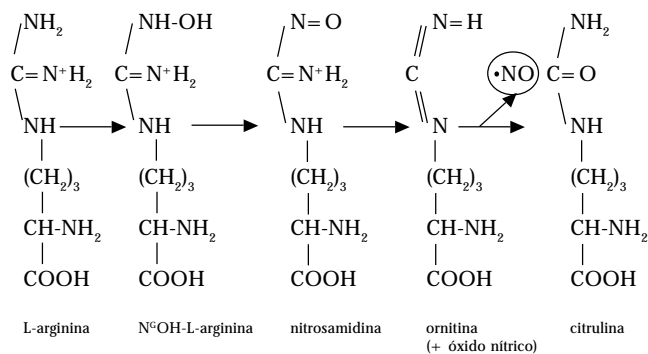


N<sup>G</sup>-monometil-L-Arg:

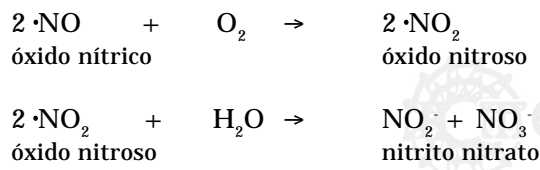


El óxido nítrico (·NO) es un intermediario en la vía de transformación de la L-Arg a citrulina y a los radicales nitrito y nitrato (NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y NO<sub>3</sub><sup>-</sup>).

Un posible mecanismo de reacción para la síntesis de ·NO a partir de la L-Arg es el propuesto por Marletta y cols<sup>121</sup> donde se incluyen los siguientes intermediarios (sólo se hace referencia al grupo guanido de la arginina):



La producción de nitritos y de nitratos a partir del óxido nítrico puede ocurrir de acuerdo a las siguientes reacciones:



Dado su carácter inestable y al igual que los radicales libres del oxígeno, el óxido nítrico interacciona ávidamente con una infinidad de grupos químicos

presentes en muchas moléculas causando en ellas alteraciones estructurales y funcionales, además de rompimientos moleculares. En las células blanco el óxido nítrico inhibe la síntesis de DNA y su actividad respiratoria.

Ahora es bien reconocido el hecho de que el óxido nítrico es el principal agente responsable de la destrucción de microorganismos de vida intracelular (*Leishmania*, *M. tuberculosis*, *Brucella abortus*, etc.).

## EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN FAGOCÍTICA

A la fecha se han escrito varias revisiones sobre los defectos en la función fagocítica y sus consecuencias. Tres publicaciones representativas de ellas son las de Edelson y cols<sup>122</sup> Repo,<sup>123</sup> y Boxer y Morganroth.<sup>117</sup> Sobre la base de la información contenida en éstas y otras publicaciones, Axtell<sup>124</sup> sugiere un procedimiento general para la evaluación de los pacientes en los que se sospecha un desorden en la función fagocítica: La evaluación de un paciente bajo sospecha de presentar deficiencias fagocíticas debe siempre empezar con una biometría hemática ya que la granulocitopenia es probablemente el desorden más frecuente del sistema fagocítico. Sin embargo, no obstante la granulocitopenia, es poco probable que esta condición se encuentre asociada a algún defecto cualitativo en la función de los neutrófilos y por esto se debe investigar la etiología de la granulocitopenia. La presencia de anticuerpos antineutrófilo (ANCA), por ejemplo, puede explicar la neutropenia inducida por drogas, la neutropenia postinfecciosa y la neutropenia autoinmune. La neutrofilia, por otro lado, aunque está frecuentemente asociada con infección aguda, también es un hallazgo común en los casos de deficiencias en las proteínas de adhesión (LAD).

Las anomalías en la función de las células fagocíticas pueden estar relacionadas con defectos en adherencia, locomoción, deformabilidad, reconocimiento, adhesión, ingestión, formación de fagosomas, desgranulación, capacidad para matar microorganismos, o eliminación del material ingerido. Las pruebas estándar de la función fagocítica incluyen las pruebas de reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT) y la emisión de quimioluminescencia.

En la prueba del NBT, los neutrófilos se incuban con el colorante oxidado, se estimulan con éster forfólico (PMA) o con partículas ingeribles y se examinan al microscopio para buscar la presencia o ausencia de formazan azul dentro de las células. Usualmente la totalidad de las células normales son capaces de reducir al NBT mientras que los neutrófi-

los de los pacientes con enfermedad crónica granulomatosa (CGD) no lo hacen o lo hacen limitadamente (0-10% de las células) por mecanismos diferentes a la producción de superóxido. Entre estos extremos pueden encontrarse resultados intermedios en los portadores de un alelo defectuoso (en la CGD ligada al X) o en otras formas menos severas del defecto (CGD no ligada a X). Si se cuenta con un citofluorómetro, el estallido respiratorio se puede medir con un sustrato fluorescente como el diacetato de diclorofluoresceína o la dihidro-rodamina.

El ensayo de quimioluminiscencia (QL) también es útil para medir la respuesta oxidativa de los fagocitos ante una variedad de estímulos solubles y particulados. Este ensayo también detecta anomalías en el metabolismo oxidativo de los leucocitos de los pacientes con CGD y en los casos de deficiencias en lactoferrina y en mieloperoxidasa. En los ensayos de QL se usa un quimioluminómetro, o un contador de centelleo con opción para QL. Durante la fagocitosis las células producen radicales libres del oxígeno (ROI) que a su vez reaccionan con sustratos oxidables presentes en los microorganismos incluyendo lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, produciendo intermediarios inestables que liberan energía lumínica al regresar a su estado basal. También se puede recurrir al empleo de métodos bioquímicos específicos para medir peróxido de hidrógeno y anión superóxido.

Por otro lado, la presencia de gránulos gigantes en los leucocitos de sangre periférica y defectos en la quimiotaxis de estas células, son casi patognomónicos del síndrome de Chediak-Higashi (CHS). En cuanto a deficiencias en los gránulos primarios (azurófilos) y secundarios (específicos), las tinciones histoquímicas o inmunoquímicas para mieloperoxidasa y para lactoferrina, respectivamente, pueden ser de utilidad en el establecimiento del defecto.

En el síndrome de disfunción de la actina los estudios de quimiotaxis y de ingestión de partículas serían las pruebas de rutina recomendadas, aunque la cuantificación bioquímica de la actina-F sería la prueba definitiva.

Finalmente, las enfermedades por deficiencia en las proteínas de adhesión (LAD) se establecen evaluando la expresión de estas proteínas en la superficie de las células utilizando anticuerpos anti-CD11(a, b, c)/CD18 y las técnicas de citofluorometría e inmunoelectrotransferencia. Otras pruebas complementarias, aunque menos rutinarias en la clínica, para evaluar la función de las células fagocíticas incluyen la medición de la capacidad de las células para respon-

der a estímulos fagocíticos o inflamatorios con la expresión de receptores de diverso tipo (FcR, CR1, CR3, TLR, etc.), con la expresión de actividad microbicida o citostática, con la síntesis de citocinas como IL-1, TNF $\alpha$  o IL-6, o con la síntesis y liberación de óxido nítrico, entre otras manifestaciones de la actividad celular.

Por nuestra parte, actualmente estamos preparando "un paquete" de técnicas para evaluar la función fagocítica de manera rápida, práctica y económica.

## RECONOCIMIENTOS

El presente trabajo se preparó tomando como base el artículo "*Bioquímica de la Fagocitosis*" publicado en Bioquímica en 1997;<sup>125</sup> el contenido ha sido actualizado y se han incluido nuevos aspectos, no tratados en la publicación anterior. Agradecemos a la Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica, AC y al editor de la revista bioquímica el permitirnos hacer uso de este material.

Este artículo y las contribuciones de nuestro laboratorio, son un *biprodueto* de las actividades de investigación apoyadas por la Coordinación General de Posgrado e Investigación del IPN, CEGPI (*Proyecto "Participación del sistema iNOS-NO y sus productos (peroxinitritos) en la patología de la lepra murina"*) y por el Sistema Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT (*Proyecto 38441-M "Las citocinas y su relación con la evolución de la lepra en un modelo animal: lepra murina"*). O. Rojas-Espinosa es becario del IPN (COFAA y EDI) y del Sistema Nacional de Investigadores, P. Arce-Paredes es becaria del IPN (COFAA y EDD). La participación de la M en C. Kendy Wek Rodríguez en la elaboración de las preparaciones para citoesqueleto, es ampliamente reconocida.

## REFERENCIAS

1. Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 1999; 170: 593-623.
2. Underhill DM, Ozinsky A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 825-852.
3. Greenberg S, Grinstein S. Phagocytosis and innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2002; 14: 136-145.
4. Bainton DF, Ullot JL, Farquhar MG. The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *J Exp Med* 1971; 134: 907-939.
5. Dransfield I, Buckle AM, Savill JS, McDowall A, Haslett C, Hogg N. Neutrophil apoptosis is associated with a reduction in CD16 (Fc gamma RIII) expression. *J Immunol* 1994; 153: 1254-1263.
6. Gallin JI. Leukocyte adherence-related glycoproteins LFA-1, Mo-1, and p150, 95: A new group of monoclonal antibodies, a

- new disease, and a possible opportunity to understand the molecular basis of leukocyte adherence. *J Infect Dis* 1985; 152: 661-664.
7. Etzioni A. Integrins: The glue of life. *Lancet* 1999; 353: 341-343.
  8. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994; 84: 068-2101.
  9. Frenette PS, Wagner DD. Adhesion molecules-Part II: blood vessels and blood cells. *New Engl J Med* 1996; 335: 43-48.
  10. Rosales C, Brown EJ. Neutrophil receptors and modulation of the immune response. In: *The Neutrophil*. Ed for JS Abramson and JG Wheeler, Oxford University Press, London 1993: 23-62.
  11. Hayward AR, Harvey BA, Leonard J, Greenwood MC, Wood CB, Soothill JF. Delayed separation of the umbilical cord, widespread infections, and defective neutrophil mobility. *Lancet* 1979; 26: 1099-1001.
  12. Abramson JS, Mills EL, Sawyer MK, Regelman WR, Nelson JD, Quie PG. Recurrent infections and delayed separation of the umbilical cord in an infant with abnormal phagocytic cell locomotion and oxidative response during particle phagocytosis. *J Pediatrics* 1982; 99: 887-894.
  13. Arnaout MA, Pitt J, Cohen HJ, Melamed J, Rosen FS, Colten HR. Deficiency of a granulocyte-membrane glycoprotein (gp150) in a boy with recurrent bacterial infections. *New Engl J Med* 1982; 306: 693-699.
  14. Crowley CA, Curnutte JT, Rosin RE, Schwartz J, Gallin JI, Klempner M, et al. An inherited abnormality of neutrophil adhesion. Its genetic transmission and its association with a missing protein. *New Engl J Med* 1980; 302: 1163-1168.
  15. Kohl S, Springer TA, Schmalstieg FC, Loo LS, Anderson DC. Defective natural killer cytotoxicity and polymorphonuclear leukocyte antibody-dependent cellular cytotoxicity in patients with LFA-1/OKM-1 deficiency. *J Immunol* 1984; 133: 2972-2978.
  16. Arnaout MA, Todd RF, Dana N, Melamed J, Schlossman SF, Colten HR. Inhibition of phagocytosis of complement C3- or immunoglobulin-coated particles and of C3bi binding by monoclonal antibodies to a monocyte-granulocyte membrane glycoprotein (Mo1) *J Clin Invest* 1983; 72: 171-179.
  17. Anderson DC, Schmalstieg FC, Finegold MJ, Hughes BJ, Rothlein R, Miller LJ, et al. The severe and moderate phenotypes of heritable Mac-1, LFA-1 deficiency: their quantitative definition and relation to leukocyte dysfunction and clinical features. *J Infect Dis* 1985; 152: 668-689.
  18. Patarroyo M, Beatty PG, Serhan CN, Gahmberg CG. Identification of a cell-surface glycoprotein mediating adhesion in human granulocytes. *Scand J Immunol* 1985; 22: 19-631.
  19. Beller DI, Springer TA, Schreiber RD. Anti-Mac-1 selectively inhibits the mouse and human type three complement receptor. *J Exp Med* 1982; 156: 1000-1009.
  20. Wright SD, Rao PE, Van Voorhis WC, Craigmyle LS, Lida K, Talle MA, et al. Identification of the C3b1 receptor of human monocytes and macrophages by using monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1983; 80: 5699-5703.
  21. Page RC, Sims TJ, Geissler F, Altman LC, Baab DA. Defective neutrophil and monocyte motility in patients with early onset periodontitis. *Infect Immun* 1985; 47: 169-175.
  22. Van Dyke TE, Horoszewics HU, Cianciola LJ, Genco RJ. Neutrophil chemotaxis dysfunction in human periodontitis. *Infect Immun* 1980; 27: 124-132.
  23. Frenette PS, Wagener DD. Adhesion molecules-Part I. *New Engl J Med* 1996; 335: 1526-1529.
  24. Phillips ML, Schwartz BR, Etzioni A, Bayer R, Ochs HD, Paulson JC, et al. Neutrophil adhesion in leukocyte adhesion deficiency syndrome type 2. *J Clin Invest* 1995; 96: 2898-2906.
  25. Marquardt T, Brune T, Luhn K, Zimmer KP, Fabritz L, van der Werft N, et al. Leukocyte adhesion deficiency II syndrome, a generalized defect in fucose metabolism. *J Pediatr* 1999; 134: 681-688.
  26. Marquardt T, Luhn K, Srikrishna G, Freeze HH, Harms E, Westweber D. Correction of leukocyte adhesion deficiency type II with oral fucose. *Blood* 1999; 94: 3976-3985.
  27. Linder ME, Gilman AG. G proteins. *Sci Amer* 1992; 267: 36-43.
  28. Lefkowitz RJ. Clinical implications of basic research. G proteins in medicine. *New Engl J Med* 1995; 332: 186-187.
  29. Birnbaumer L, Birnbaumer M. Signal transduction by G proteins. *J Recept Signal Transduct Res* 1997; 15: 213-252.
  30. Quinn MT, Parkos CA, Walker L, Orkin SH, Dinamer MC, Jesaitis AJ. Association of a ras-related protein with cytochrome b of human neutrophils. *Nature* 1989; 342: 198-200.
  31. Bokoch GM. Signal transduction by GTP binding proteins during leukocyte activation of phagocytic cells. *Curr Top Membr Transp* 1990; 35: 65-111.
  32. Bokoch GM. Regulation of cell function by Rho family GTPases. *Immunol Res* 2000; 21: 139-148.
  33. Aderem A. The Marcks brothers: A family of protein kinase C substrates. *Cell* 1992; 71: 713-716.
  34. Rosen A, Keenan KF, Thelen M, Nairn AC, Aderem A. Activation of PKC results in the displacement of its myristoylated, alanin-rich substrate from punctuate structures in macrophage filopodia. *J Exp Med* 1990; 172: 1211-1215.
  35. Kyat M, Anderson S, Allen LA, Aderem A. MARKS regulates membrane ruffling and cell spreading. *Curr Biol* 1997; 7: 611-614.
  36. Vicente-Manzanares M, Sancho D, Yáñez-Mó, M, Sánchez-Madrid M. The leukocyte cytoskeleton in cell migration and immune interactions. *Internat Rev Cytol* 2002; 216: 233-289.
  37. Olmsted JB, Borisy GG. Microtubules. *Annu Rev Biochem* 1973; 42: 507-540.
  38. Lazarides E, Weber K. Actin antibody: The specific visualization of actin filaments in non-muscle cells. *Proc Nat Acad Sci* 1974; 71: 2268-2272.
  39. Weber K, Groeschel-Stewart U. Antibody to myosin: the specific visualization of myosin-containing filaments in nonmuscle cells. *Proc Natl Acad Sci* 1974; 71: 4561-4564.
  40. Lazarides E. Tropomyosin antibody: the specific localization of tropomyosin in non-muscle cells. *J Cell Biol* 1975; 65: 549-561.
  41. Janmey PA. Mechanical properties of cytoskeletal polymers. *Curr Opin Cell Biol* 1991; 3: 4-11.
  42. Sarndahl E, Lindroth M, Bengtsson T, Farllman M, Gustavsson J, Stendahl O, et al. Association of ligand-receptor complexes with actin filaments in human neutrophils: A possible regulatory role for a G-protein. *J Cell Biol* 1990; 109: 2791-2799.
  43. Southwick FS, Young CL. The actin released from profilin-actin complexes is insufficient to account for the increase in F-actin in chemoattractant-stimulated polymorphonuclear leukocytes. *J Cell Biol* 1990; 110: 1965-1973.
  44. Snyderman R. Regulatory mechanisms of a chemoattractant receptor on human polymorphonuclear leukocytes. *Rev Infect Dis* 1985; 7: 390-394.
  45. Saba TM. Aespecific opsonins. In: *The human system and infectious diseases*. Karger, Basel 1975. pp. 489-504.
  46. Kaplan G. Differences in the mode of phagocytosis with Fc and C3 receptors in macrophages. *Scand J Immunol* 1977; 6: 797-807.

47. Johnson E, Eskeland T. Complement C3b receptor mediated phagocytosis of agarose beads by mouse macrophages. I. Intracellular degradation of agarose-bound C3bi and C3b by lysosomal enzymes. *Scand J Immunol* 1983; 18: 193-200.
48. Johnson E, Gauperaa T, Eskeland T. Fibronectin binds to complement-coated agarose beads and increases their association to mouse macrophages. *Scand J Immunol* 1985; 22: 315-320.
49. Bevilacqua MP, Amrani D, Mosesson MW, Bianco C. Receptors for cold insoluble globulin (plasma fibronectin) on human monocytes. *J Exp Med* 1981; 153: 42-60.
50. Proctor RA. Fibronectin: an enhancer of phagocytic function. *Rev Infect Dis* 1987; 9: 412-419.
51. Wright SD, Silverstein S. Tumor promoting phorbol esters stimulate C3b and C3bi receptor-mediated phagocytosis in cultured human monocytes. *J Exp Med* 1982; 156: 1149-1164.
52. Bianco C, Griffin FM, Silverstein SC. Studies of the macrophage complement receptor. Alterations of receptor function upon macrophage activation. *J Exp Med* 1975; 141: 1278-1282.
53. Wright SD, Craigmyle LS, Silverstein SC. Fibronectin and serum amyloid P component stimulate C3b and C3bi-mediated phagocytosis in cultured human monocytes. *J Exp Med* 1983; 158: 1338-1343.
54. Griffin JA, Griffin FM. Augmentation of macrophage complement receptor function *in vitro*. I. Characterization of the cellular interactions required for the generation of a T-lymphocyte product that enhances macrophage complement receptor function. *J Exp Med* 1979; 150: 653-675.
55. Tulkens P, Schneider YJ, Trouet A. The fate of the plasma membrane during endocytosis. *Biochem Rev* 1977; 5: 1809-1815.
56. Medzhitov R, Janeway CH. Innate immunity. *New Engl J Med* 2000; 343: 338-344.
57. Ravetch JV. Fc receptors: rubor redux. *Cell* 1994; 78: 553-560.
58. Ravetch JV. Fc receptors. *Curr Opin Immunol* 1997; 9: 121-125.
59. Unkeless JC, Jin J. Inhibitory receptors, ITIM sequences and phosphatases. *Curr Opin Immunol* 1997; 9: 338-343.
60. Reth M. Antigen receptor tail clue. *Nature* 1989; 338: 383-384.
61. Strzelecka A, Kwiatkowska K, Sobota A. Tyrosine phosphorylation and Fc gamma receptor-mediated phagocytosis. *FEBS Lett* 1997; 400: 11-14.
62. Greenberg S. Signal transduction of phagocytosis. *Trends Cell Biol* 1995; 5: 93-99.
63. Agarwal A, Salem P, Robbins KC. Involvement of p72syk, a protein-tyrosine kinase in Fc gamma receptor signalling. *J Biol Chem* 1993; 268: 15900-15905.
64. Kiener PA, Rankin BM, Burkhardt AL, Schieven GL, Gilliland LK, Rowley RB, et al. Cross-linking of FcγRI and FcγRII on monocytic cells activates a signal transduction pathway common to both Fc receptors that involves the stimulation of p72 Syk protein tyrosine kinase. *J Biol Chem* 1993; 268: 24442-24448.
65. Ghazizadeh S, Bolen JB, Fleith HB. Tyrosine phosphorylation and association of Syk with FcγRII in monocytic THP-1 cells. *Biochem J* 1995; 74: 669-674.
66. Cox D, Chang P, Kurosaki T, Greenberg S. Sky tyrosine kinase is required for immunoreceptor tyrosine activation motif-dependent actin assembly. *J Biol Chem* 1996; 271: 16597-16602.
67. Greenberg S. Modular components of phagocytosis. *J Leuk Biol* 1999; 66: 712-717.
68. Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 1992; 70: 401-410.
69. Modlin RL, Brightbill HD, Godowski PJ. The Toll of innate immunity on microbial pathogens. *New Engl Med* 1999; 340: 1834-1835.
70. Anderson KV. Toll signalling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 13-19.
71. Jeoung-Sook S, Zhimin G, Soman NA. Involvement of cellular caveolae in bacterial entry into mast cells. *Science* 2000; 289: 785-788.
72. Schlegel A, Lisanti MP. Caveolae and their coat proteins, the caveolins: from electron microscopy novelty to biological launching pad. *J Cell Physiol* 2001; 186: 329-337.
73. Rosenberg CM, Brumell JH, Finlay BB. Microbial pathogenesis: lipid rafts as pathogen portals. *Current Biol* 2000; 10: R823-R825.
74. Swanson JA, Baer SC. Phagocytosis by zippers and triggers. *Trends Cell Biol* 1995; 5: 89-93.
75. Pitt A, Mayorga LS, Stahl PD, Schwartz AL. Alterations in the protein composition of maturing phagosomes. *J Clin Invest* 1992; 90: 1978-1983.
76. Racoosin EL, Swanson JA. Macropinosome maturation and fusion with tubular lysosomes in macrophages. *J Cell Biol* 1993; 121: 1011-1020.
77. Desjardins M, Huber LA, Parton RG, Griffiths G. Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *J Cell Biol* 1994; 124: 677-688.
78. de Chastellier C, Thilo L. Phagosome maturation and fusion with lysosomes in relation to surface property and size of the phagocytic particle. *Eur J Cell Biol* 1997; 74: 49-62.
79. Berthiaume EP, Medina C, Swanson JA. Molecular size-fractionation during endocytosis in macrophages. *J Cell Biol* 1995; 129: 989-998.
80. Desjardins M, Nizala NN, Corsini R, Rondeau C. Maturation of phagosomes is accompanied by changes in their fusion properties and size-selective acquisition of solute materials from endosomes. *J Cell Sci* 1997; 110: 2303-2314.
81. Diakonova M, Gerke V, Ernst J, Liautard JP, van der VG, Griffiths G, et al. Localization of five annexins in J774 macrophages and on isolated phagosomes. *J Cell Sci* 1997; 110: 1199-1213.
82. Pizon V, Desjardins M, Bucci C, Parton RG, Zerial M. Association of rap-1a and rap-1b proteins with late endocytic phagocytic compartments and rap-2a with the Golgi complex. *J Cell Sci* 1994; 107: 1661-1670.
83. Gorrvell JP, Chavrier P, Zerial M, Gruenberg J. Rab5 controls early endosome fusion *in vitro*. *Cell* 1991; 64: 915-925.
84. Feng Y, Press B, Wandinger-Ness A. Rab7: an important regulator of late endocytic membrane traffic. *J Cell Biol* 1995; 131: 1435-1452.
85. Claus V, Jahraus A, Tjelle T, Berg T, Kirschke H, Faulstich H, et al. Lysosomal enzyme trafficking between phagosomes, endosomes and lysosomes in J774 macrophages. Enrichment of cathepsin H in early endosomes. *J Biol Chem* 1998; 273: 9842-9851.
86. Blocker A, Severin FF, Burkhardt JK, Bingham JB, Yu H, Olivo JC, et al. Molecular requirements for bidirectional movement of phagosomes along microtubules. *J Cell Biol* 1997; 137: 113-129.
87. Clague MJ. Molecular aspects of the endocytic pathway. *Biochem J* 1998; 336: 271-282.
88. Jensen MS, Bainton DF. Temporal changes in pH within the phagocytic vacuole of polymorphonuclear neutrophilic leukocytes. *J Cell Biol* 1973; 56: 379-388.

89. Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, Haddix PL, Collins PL, Fok AK, et al. Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* 1994; 263: 678-681.
90. Bainton DF. Neutrophilic granules. *British J Haematol* 1975; 29: 17-22.
91. Spitznagel JK, Shafer WM. Neutrophil killing of bacteria by oxygen-independent mechanisms: A historical summary. *Rev Infect Dis* 1985; 7: 398-403.
92. Tkalecivic J, Novelli M, Phylactides M, Iredale JP, Segal AW, Roes J. Impaired immunity and enhanced resistance to endotoxin in the absence of neutrophil elastase and cathepsin G. *Immunity* 2000; 12: 201-210.
93. Spitznagel JK, Cooper MR, McCall AE. Selective deficiency of granules associated with lysozyme and lactoferrin in human polymorphs (PMN) with reduced microbicidal capacity. *J Clin Invest* 1972; 51: 93-95.
94. Hansen NE, Andersen V. Lysozyme activity in human neutrophilic granulocytes. *British J Haematol* 1973; 24: 613-622.
95. Sly WS, Quinton BA, McAlister WH, Rimoin DL. Beta-glucuronidase deficiency: report of clinical, radiologic and biochemical features of a new mucopolysaccharidosis. *J Pediatr* 1973; 82: 249-257.
96. Sato A. Chediak and Higashi's disease. Probably identity of "a new leukocytal anomaly (Chediak) and congenital gigantism of peroxidase granules (Higashi)" *Tohoku J Exp Med* 1955; 61: 201-210.
97. Dinauer MC, Orkin SH. Chronic granulomatous disease. *Ann Rev Med* 1992; 43: 117-124.
98. Clark RA, Malech HL, Gallin JI, Nunoi H, Volpp BD, Pearson DW, et al. Genetic variants of chronic granulomatous disease: prevalence of deficiencies of two cytosolic components of the NADPH oxidase system. *New Engl J Med* 1989; 321: 647-652.
99. Curnutte JT. Molecular basis of the autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. *Immunodeficiency Rev* 1992; 3: 149-172.
100. Holmes B, Park BH, Malawista SE, Quie PG, Nelson DL, Good RA. Chronic granulomatous disease in females. A deficiency of leukocyte glutathione peroxidase. *New Engl J Med* 1970; 283: 217-221.
101. Cooper MR, De Chatelet LR, McCall CE, LaVia MF, Spurr CL, Bahener RI. Complete deficiency of leukocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase with defective bactericidal activity. *J Clin Invest* 1972; 51: 769-777.
102. Gray GR, Stamatoyannopoulos G, Naiman SC, Kliman MR, Klebanoff SJ, Austin T, et al. Neutrophil dysfunction, chronic granulomatous disease and non-specific haemolytic anaemia caused by complete deficiency of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Lancet* 1973; 2: 530-534.
103. Bellanti JA, Cants BE, Schlegel RJ. Accelerated decay of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in chronic granulomatous disease. *Pediatr Res* 1970; 4: 405-411.
104. Erickson RP, Stites DP, Fudenberg HH, Epstein CJ. Altered levels of glucose-6-phosphate dehydrogenase-stabilizing factors in X-linked chronic granulomatous disease. *J Lab Clin Med* 1972; 80: 644-653.
105. Babior BM. The respiratory burst oxidase. *Hematol Oncol Clin North Amer* 1988; 2: 201-212.
106. Smith RM, Curnutte JT. Molecular basis of chronic granulomatous disease. *Blood* 1991; 77: 673-686.
107. Bahener RL, Nathan DG. Quantitative nitroblue tetrazolium test in chronic granulomatous disease. *New Engl J Med* 1968; 278: 971-976.
108. Ochs HD, Igo R. The NBT slide test: A simple screening method for detecting chronic granulomatous disease and female carriers. *J Pediatr* 1973; 83: 77-80.
109. Klebanoff SJ. Iodination of bacteria: a bactericidal mechanism. *J Exp Med* 1967; 126: 1063-1076.
110. Selvaraj RJ, Paul BB, Strauss RR, Jacobs AA, Sbarra AJ. Oxidative peptide cleavage and decarboxylation by the MPO-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Cl<sup>-</sup> antimicrobial system. *Infect Immun* 1974; 9: 255-260.
111. Lazarus GM, Neu HC. Agents responsible for infection in chronic granulomatous disease of childhood. *J Pediatr* 1975; 86: 415-417.
112. Woeber KA, Ingbar SH. Metabolism of L-thyroxine by phagocytosing human leukocytes. *J Clin Invest* 1973; 52: 1796-1803.
113. Schultz J, Kaminker K. Myeloperoxidase of the leukocyte of normal human blood. I. Contents and localization. *Arch Biochem Biophys* 1962; 96: 465-467.
114. Klebanoff SJ, Clem WH, Luebke RG. The peroxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide antimicrobial system. *Biochim Biophys Acta* 1966; 117: 63-72.
115. Curnutte JT, Whitten DM, Babior BM. Defective superoxide production by granulocytes from patients with chronic granulomatous disease. *New Engl J Med* 1974; 290: 593-597.
116. Gregory EM, Fridovich I. Oxygen toxicity and the superoxide dismutase. *J Bacteriol* 1973; 114: 1193-1197.
117. Boxer LA, Morganroth ML. Neutrophil function disorders. *Dis Mon* 1988; 33: 681-780.
118. Allen RC, Mills EL, McNitt TR, Quie PG. Role of myeloperoxidase and bacterial metabolism in chemiluminescence of granulocytes from patients with chronic granulomatous disease. *J Infect Dis* 1981; 144: 344-348.
119. Del Maestro RF, Thaw HH, Bjork J, Planker M, Arfors KE. Free radicals as mediators of tissue injury. *Acta Physiol Scand* 1980; S492: 43-57.
120. Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z. Macrophage cytotoxicity: Role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 1987; 235: 473-476.
121. Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R, Leaf CD, Wishnok JS. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry* 1988; 27: 8706-8711.
122. Edelson PJ, Stites DP, Gold S, Fudenberg HH. Disorders of neutrophil function. Defects in the early stages of the phagocytic process. *Clin Exp Immunol* 1987; 13: 21-28.
123. Repo H. Defects in phagocytic functions. *Ann Clin Res* 1987; 13: 263-279.
124. Axtell RA. Evaluation of the patient with a possible phagocytic disorder. *Hematol Oncol Clin North Am* 1988; 2: 1-12.
125. Rojas-Espinosa O. Bioquímica de la Fagocitosis. *Bioquímica* 1997; 22: 612-637.

