

El complejo NADPH-oxidasa en la enfermedad granulomatosa crónica: Descripción preliminar de un foco en Mérida-Venezuela.

Siham Salmen¹, Lisbeth Berrueta¹, Paul Heyworth², Lérica Borges¹, Manuel Hernández¹ y José Muñoz¹.

¹Instituto de Inmunología Clínica, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela y ²Department of Molecular and Experimental Medicine, The Scripps Research Institute, La Jolla, California U.S.A.

Palabras clave: NADPH-oxidasa, EGC, gp91^{phox}, p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}, superóxido, inmunodeficiencia primaria.

Resumen. La Enfermedad Granulomatosa Crónica (EGC), es una inmunodeficiencia primaria caracterizada por una susceptibilidad elevada a sufrir infecciones por ciertos agentes fúngicos y bacterianos, debido a la incapacidad en la activación del estallido respiratorio en los leucocitos fagocíticos. La ausencia de producción de superóxido es secundaria a un defecto en la activación del complejo enzimático NADPH-oxidasa, debido a mutaciones en cualquiera de sus componentes, tanto los que se encuentran en la membrana (gp91^{phox} y p22^{phox}) como los ubicados en el citosol (p47^{phox} y p67^{phox}). Este complejo enzimático debe ensamblarse en la membrana para su activación y debe interactuar con NADPH, para producir superóxido y subsecuentemente otros productos con actividad microbicida. La EGC es una enfermedad hereditaria, de frecuencia variable en el mundo, con dos formas de transmisión, ligada al cromosoma X y autosómica recesiva. Las ligadas al cromosoma X son las más frecuentes y se caracterizan por mutaciones en gp91^{phox}, mientras que las autosómicas se asocian a mutaciones en cualquiera de las otras proteínas del complejo (p47^{phox}, p67^{phox}, p22^{phox}). En este artículo describimos las características moleculares y genéticas del complejo NADPH-oxidasa, sus alteraciones en la EGC y reseñamos brevemente nuestros hallazgos preliminares en dos familias del estado Mérida-Venezuela.

NADPH-oxidase complex in chronic granulomatous disease: Preliminary description of a cluster in Mérida-Venezuela.

Invest Clín 1999; 40(4): 277-300.

Key words: NADPH-oxidase, CGD, gp91^{phox}, p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}, superoxide, primary immunodeficiency.

Abstract. Chronic Granulomatous Disease (CGD) is a primary immunodeficiency characterized by an unusual predisposition to develop bacterial and fungal infections due to a failure of phagocytic leukocytes to generate superoxide, required for the intracellular killing of microorganisms. The lack of superoxide production is secondary to a defect in the NADPH-oxidase enzymatic complex activation, as a result of mutations of any of the components. Both, X-linked and autosomal recessive patterns of inheritance have been demonstrated in this disease, being the X-linked the most frequent and characterized by mutations in gp91^{phox}. Mutations in p47^{phox}, p67^{phox} and p22^{phox} have been shown in the autosomal recessive pattern. The molecular and genetic characteristic of NADPH-oxidase complex and its pathology in CGD are reviewed along with a brief description of the preliminary findings in two families from Mérida, Venezuela.

Recibido: 6-7-99. Aceptado: 22-9-99.

INTRODUCCIÓN

Los polimorfonucleares neutrófilos (PMN) forman parte de los componentes inespecíficos del sistema inmunológico. Estas células están involucradas en las diferentes funciones de la respuesta inmunológica, bien sea como elementos amplificadores, que en asociación con el complemento se encargan de eliminar al antígeno (1-5), o como elementos moduladores del sistema inmunológico (6-10). Estas células tienen un papel fundamental en la defensa contra agentes infecciosos, evidenciado por el hecho de que ciertos defectos en su función, conducen a infecciones severas que ponen en peligro la vida del paciente,

tal es el caso de los portadores de la Enfermedad Granulomatosa Crónica (EGC), una inmunodeficiencia primaria caracterizada por una susceptibilidad elevada a sufrir infecciones por ciertos agentes fúngicos y bacterianos, debido a una incapacidad en la activación del estallido respiratorio en los leucocitos fagocíticos.

La frecuencia de esta enfermedad es variable desde 1/1.000.000 hasta 1/160.000 individuos (1,11,12). En Latinoamérica se han reportado 85 casos de EGC, provenientes principalmente de Brasil con 36 casos, Chile con 13 casos, Argentina con 11 casos, México con 10 casos, Costa Rica con 7 casos, Colombia con 5 casos y Paraguay con 3 casos (13). En Venezuela no se han publicado

datos sobre esta enfermedad, sin embargo, hemos detectado un foco en dos poblaciones del estado Mérida-Venezuela, de pacientes portadores sintomáticos de EGC. En este artículo describimos las características genéticas de estos pacientes y detallamos los hallazgos más recientes sobre el complejo NADPH-oxidasa y sus defectos en la EGC.

1. EL COMPLEJO NADPH-OXIDASA

El complejo NADPH-oxidasa está constituido por un componente proteico distribuido en la membrana y en el citosol, y un componente no proteico constituido por NADPH, FAD y hem (14).

a. Componente proteico de membrana del complejo NADPH-oxidasa o citocromo *b558*

Está constituido por dos proteínas integrales ubicadas en la membrana plasmática, en la membrana de los gránulos específicos y en la de las vesículas secretoras (15), conforman una flavo-hem-proteína denominada citocromo *b558*, por su espectro óptico, también conocida como citocromo *b245*, por su potencial medio de activación. Es un heterodímero compuesto por dos cadenas polipeptídicas de 22 kDa y 91 kDa (16) denominadas subunidad a y subunidad b respectivamente, dispuestas en una relación 1:1 (17). La subunidad a (gen CYBA o citocromo b alfa) es denominada *p22^{phox}* ("p" por proteína y *phox* por oxidasa fagocítica) (12), su estructura primaria

fue caracterizada por primera vez por Parkos en 1988 (18), y la estructura del gen, localización cromosómica e identificación de las mutaciones fueron descritas inicialmente en 1990 (19). Esta proteína contiene dominios similares a las proteínas de unión al hem (20) y dominios hidrofóbicos que le permiten atravesar dos veces la membrana (21). Aunque la función precisa de *p22^{phox}* es desconocida, se cree que estabiliza a *gp91^{phox}* durante el proceso de formación del heterodímero *gp91^{phox}/p22^{phox}*, y actúa como un sitio de anclaje para *p47^{phox}* a través de su dominio C-terminal rico en prolina (151-160) (17).

La subunidad b (gen CYBB o citocromo b beta) denominada *gp91^{phox}* ("gp" por glicoproteína), tiene un peso molecular entre 76-92 kDa, (12), pertenece a la familia de las reductasas (reductasa del nucleótido de flavina) ya que contiene sitios de unión para NADPH y FAD (22). El gen que codifica *gp91^{phox}* fue el primero del complejo en identificarse, fue clonado por Pokora (23). El gen consta de dos secuencias promotoras (CCAAT), en posición -106 y -124 y una caja TATA. A las secuencias CCAAT se unen dos proteínas denominadas: CP1 que favorece la expresión de la proteína (21) y CDP que inhibe la transcripción de este gen (24).

A nivel del extremo N-terminal, *gp91^{phox}* contiene dominios que le permiten: la interacción con *p22^{phox}* y su unión a: la membrana y a los grupos hem y FAD. Contiene otros dominios que le permiten unirse al

NADPH y sólo es accesible cuando interactúa con p67^{phox} lo cual permite la exposición de un dominio de 20 aminoácidos (Asp484-Tre503) (25).

La proteína gp91^{phox} debe asociarse con p22^{phox} para su maduración final (14), es decir la glicosilación con residuos de manosa de un precursor de 65 kDa, a una forma madura glicosilada gp91^{phox}. La expresión de cada cadena es necesaria para la estabilidad de ambas y para la estructuración del citocromo *b* (20) así, la ausencia de una conduce a la pérdida de la otra (26), sin embargo la incorporación de carbohidratos ricos en manosa, no depende del heterodímero. La inhibición de la síntesis del hem inhibe la expresión de p22^{phox} y gp91^{phox} maduro, pero no del precursor inmaduro de gp91^{phox}, lo que sugiere que la estabilidad de ambas proteínas depende tanto de la incorporación del hem como de la formación del dímero. El efecto del hem es post-traducciona ya que el ARNm de ambas proteínas no se altera cuando son expuestos al inhibidor de la síntesis del hem (27).

Cada citocromo *b*₅₅₈ contiene un hem y un dinucleótido de flavinadenina (FAD) (14). El hem se une a residuos de histidina ubicados en la posición 239 y 100-120 de gp91^{phox} y 94 de p22^{phox} (12,17). Aparentemente el FAD establece interacción con la subunidad *b*, las cantidades de FAD en la membrana de los pacientes con EGC ligada al cromosoma X, se encuentran considerablemente disminuidas en comparación

con los neutrófilos normales y con los provenientes de pacientes con EGC autosómica recesiva por defecto de p47^{phox} (14).

b. Componente proteico citosólico del complejo NADPH-oxidasa

La primera demostración de que el componente citosólico era necesario para la activación del complejo NADPH-oxidasa fue hecha a través de experimentos en sistemas libres de células, es decir mediante el uso de membranas celulares y fracción citosólica (28-30), después se estableció la participación de varias proteínas en la conformación del componente citosólico, p47^{phox}, p67^{phox} (31), p40^{phox} (32) y p21rac (33).

Las primeras tres proteínas p47^{phox}, p67^{phox} y p40^{phox}, contienen dominios SH3 (homólogo al dominio 3 de las protein kinasas de la familia src), dos en p67^{phox} y p47^{phox} y uno p40^{phox} y cada una tiene además regiones ricas en prolina (14,21). Una de las funciones de este dominio es mantener la interacción proteína-proteína, incluyendo interacciones con las proteínas asociadas al GTP. Otra de las funciones de estos dominios SH3, es la unión del componente citosólico a la membrana, al citoesqueleto adyacente a la membrana y a otros componentes del complejo NADPH-oxidasa. Las secuencias ricas en prolina presentes en p67^{phox} (227-234), le permiten interactuar con otras proteínas citosólicas que contienen dominios SH3 (14), como por ejemplo proteínas del citoesqueleto celular (17).

Además de las secuencias antes mencionadas, estas proteínas contienen otros dominios que le permiten ejercer otras funciones, por ejemplo contienen dominios relacionados con la fosfolipasa C, espectrina a-no eritrocitaria, actina, proteína activadora de GTPasa p21ras (GAP) (20) y p67^{phox}, tiene un sitio adicional de unión al NADPH (34).

El gen de p47^{phox} (NFC1 o factor citosólico del neutrófilo) fue clonado y secuenciado por Volpp y colaboradores en 1989 (35). Este gen es expresado exclusivamente en las células mielo-monocíticas terminalmente diferenciadas, en menor grado en algunos sub-grupos de células del linaje linfóide y en células B inmortalizadas. La regulación de la expresión del gen no se conoce, pero se expresa constitutivamente en los neutrófilos en reposo y durante la diferenciación celular. Dentro de los factores que regulan su transcripción está el ácido retinoico, que induce su transcripción (14). Es 49% homóloga con la proteína activante de la GTPasa (GAP), lo que refleja su asociación funcional con p21^{ras} GAP (36). A nivel N-terminal tiene un residuo de glicina que provee un posible sitio de miristilación que favorece su traslado a la membrana durante la activación de los PMN (35).

Como consecuencia de la estimulación celular, p47^{phox} es fosforilada en el citosol, luego es trasladada a la membrana, se une al citocromo *b558* y es fosforilada nuevamente (37,38), sin embargo la fosforilación no es un prerrequisito para la activación ni para el traslado del com-

ponente citosólico, ya que el uso del araquidonato en presencia o ausencia de staurosporina (inhibidor de la fosforilación de residuos de serina) puede inducir la activación de la producción de superóxido (21); el traslado de p47^{phox} y p67^{phox} y la producción de superóxido no son afectados por la staurosporina ni por el uso de medios libres de calcio, cuando son activados con fMLP y ConA, por lo que la fosforilación no parece ser la única modificación que promueve el traslado de las proteínas citosólicas (39).

Finalmente p40^{phox}, co-inmunoprecipita con p67^{phox} (40) y tiene homología con p47^{phox}, sin embargo su participación en la activación del complejo NADPH oxidasa, aun no está bien establecida. Esta proteína al interactuar con p47^{phox} a través del dominio SH3 y con p67^{phox} con su extremo C-terminal estabiliza el complejo citosólico de las células en reposo (12) y es probable que actúe como un elemento que disminuye la activación del complejo NADPH-oxidasa (41). Las características de las proteínas que conforman el complejo oxidasa se resumen en la Tabla I.

La activación de este sistema requiere de su asociación con proteínas de unión de GTP (42-44), constituida por dos miembros: p21^{rac1} y p21^{rac2}, la primera se distribuye ampliamente en los tejidos y la segunda está limitada a las células del linaje mieloide (14) y linfóide (17). Recientemente se ha clonado p21^{rac3}, tiene capacidad de unirse a p67^{phox}, pero su función e importancia es desconocida (45).

TABLA I
CARACTERÍSTICAS DE LOS COMPONENTES DEL COMPLEJO NADPH-OXIDASA

		p22 ^{phox}	gp91 ^{phox}	P47 ^{phox}	p67 ^{phox}	P40 ^{phox}
Gen	Locus	CYBA	CYBB	NCF1	NCF2	NCF3
	Loc. Cromosoma	16q24	Xp21.1	7q11.23	1q25	
	Tamaño	8.5 kb	30 kb	18 kb	40 kb	
	Exones	5	13	9	16	
ARNm	Tamaño	0.8 kb	4.7 kb	1.4 kb	2.4 kb	
Proteína	Sinónimos	Cadena liviana del citocromo b (cadena a)	Cadena pesada del citocromo b (cadena b)			
	Aminoácidos	195	570	390	526	
	Predicción del peso molecular	20.9 kDa	65 kDa	44.6 kDa	60.9 kDa	37 kDa
	Peso molecular por SDS-PAGE	22 kDa	76-92 (mancha)	kDa 47 Kda	67 kDa	40 kDa
	pI	10.0	9.7	9.5	5.8	
	Localización en los fagocitos en reposo	Membrana celular, gránulos específicos y vesículas secretorias	Membrana celular, gránulos específicos y vesículas secretorias	Citoplasma	Citoplasma	Citoplasma
	Tejidos específicos	Bajos niveles en todas las células y altos niveles en las células mieloides	Bajos niveles en linfocitos B, altos en las células mieloides	Células mieloides y linfocitos B	Células mieloides y linfocitos B	
	Modificación post-traslacional		Asociación N-glicosilación	Fosforilación durante la activación de la oxidasa	Fosforilación durante la activación de la oxidasa	

Adaptado de 12,25,32.

Cuando los neutrófilos están en reposo todo el contenido de $p40^{phox}$ y $p67^{phox}$ se encuentra asociado con un tercio o la mitad de $p47^{phox}$ celular, formando un complejo de 240 kDa (46) y quizás con otras proteínas adicionales, como elementos del citoesqueleto (47), $p67^{phox}$ y $p40^{phox}$ son las que establecen contacto con el citoesqueleto (17).

c. Activación enzimática del complejo NADPH-oxidasa

La activación del complejo NADPH-oxidasa es regulada en varios niveles, a saber: receptores en la membrana plasmática, que responden a estímulos generados por péptidos N-formilados provenientes de bacterias, C5a, interleukina-8, factor activador de plaquetas, entre otros; así mismo es regulada por receptores asociados a proteínas de unión al GTP, que median la activación del metabolismo de los fosoinositoles, por activación de la fosolipasa A (PLA), PLD y PLC, que genera un incremento rápido del diacilglicerol y calcio, activando finalmente a PKC. Finalmente otro nivel de control, es la disociación física de este complejo en los componentes de membrana y citosólico (17). Subsecuente a la exposición al PMA (sustancia que activa a PKC) se fosforilan varias proteínas presentes en los neutrófilos cuyos pesos moleculares son: 40, 44, 47, 50, 64, 70 y 90 kDa, este fenómeno ocurre a partir de los 5 segundos después del estímulo y continúa aumentando por lo menos hasta los 6 minutos. En los pacientes con EGC, se ha evi-

denciado un aumento en la fosforilación de la proteína de 40 kDa (48). Con la fosforilación de $p47^{phox}$ se produce su traslado a la membrana y se exponen los residuos SH3 que están ocultos en el complejo $p47^{phox}$ - $p67^{phox}$ - $p40^{phox}$ en las células en reposo (12). Este traslado de aproximadamente el 10% del complejo citosólico a la membrana (17) permite: que $gp91^{phox}$ exponga su secuencia (484-503) de unión al NADPH (12), la unión de $p67^{phox}$ al citocromo b_{558} y el flujo de electrones desde el NADPH al FAD, del FAD al hem y por último hasta el O_2 (49,50).

La cantidad del componente citosólico que se une a la fracción de membrana es directamente proporcional al tiempo, debido a que después de la estimulación, estas proteínas son reclutadas continuamente. Este proceso sólo ocurre en las células que tienen citocromo b , no así en las que carecen del mismo, probablemente debido a la falta de una señal adecuada para iniciar el traslado o a la falta de anclaje que conduce su retorno al compartimento citosólico. El traslado de $p67^{phox}$ no ocurre en células defectuosas de $p47^{phox}$, pero $p47^{phox}$ si es trasladada en ausencia de $p67^{phox}$. Una vez trasladadas las proteínas del componente citosólico, el componente de membrana sufre cambios conformacionales que le permiten interactuar con los componentes citosólicos ($p47/p67/p40^{phox}$), exponer sus dominios de unión al NADPH e iniciar el transporte de electrones y donarlos al O_2 molecular (21). De esta

manera se produce el anión superóxido (O_2^-). Este oxígeno con un electrón extra es liberado fuera de la célula y en el interior del fagosoma que contiene al microorganismo ingerido y subsecuentemente convertido en H_2O_2 , ácido hipocloroso y otros productos con actividad microbicida (51).

d. Efecto del superóxido sobre la función celular

En general, los radicales libres inducen modificaciones y daño a los nucleótidos, carbohidratos, lípidos y proteínas, el anión superóxido en particular actúa como intermediario en la actividad de ciertas proteínas reguladoras del crecimiento celular, pertenecientes a la familia *ras*, mediando así en señales intracelulares y produce modificaciones estructurales en ciertas proteínas que actúan como señales nucleares (52). En los neutrófilos de los pacientes con EGC se observa inhibición de la apoptosis tanto espontánea como inducida por anticuerpos dirigidos contra CD95, lo que sugiere que los metabolitos intermediarios reactivos del oxígeno (ROI), también median apoptosis en los neutrófilos (53). Estos trastornos en la apoptosis podrían explicar el desarrollo de enfermedades autoinmunes, que aparecen con frecuencia en los individuos portadores de este defecto.

El conocimiento de los fenómenos moleculares que regulan el ensamblaje del complejo NADPH-oxidasa y la generación subsecuente del anión superóxido son indispensable para el entendimiento de los fenó-

menos patológicos que se presentan en los pacientes con EGC, por tal razón a continuación se detallará los aspectos más resaltantes de las variantes hasta ahora descritas de esta enfermedad.

2. BASES MOLECULARES DE LA ENFERMEDAD GRANULOMATOSA CRÓNICA

Es una inmunodeficiencia primaria, clínicamente caracterizada por presencia de infecciones fúngicas y bacterianas, de difícil manejo y por la formación de granulomas constituidos por células gigantes y macrófagos repletos de lípidos, que predominan en los nódulos linfoides, tejidos subcutáneos, pulmón, hígado y huesos. Se asocia también a manifestaciones gastrointestinales que incluyen diarrea, abscesos y obstrucción intestinal causada por los granulomas (51). Los gérmenes más comunes que infectan a estos pacientes son los gérmenes catalasa positivos (31), ya que esta enzima contribuye a destruir el peróxido de hidrógeno producido por el propio germen y que en condiciones normales se encarga de autodestruirlo. En la Tabla II se describen las infecciones y condiciones crónicas que más comúnmente se asocian con esta enfermedad. Adicionalmente se ha especulado que estos pacientes pueden presentar algunas alteraciones sutiles de la respuesta inmunológica específica tales como disminución del número de linfocitos T $CD4^+/CD29^+$ y $CD8^+/CD11b^+$, tal

TABLA II

INFECCIONES Y CONDICIONES CRÓNICAS QUE SE PRESENTAN EN LA ENFERMEDAD GRANULOMATOSA CRÓNICA

INFECCIONES	% DE EPISODIOS	MICROORGANISMOS INVOLUCRADOS	% DE AISLADOS	CONDICIONES CRÓNICAS ASOCIADAS	% DE CASOS
Neumonía	70-80	<i>Staphylococcus aureus</i>	30-50	Linfadenopatía	98
Linfadenitis	60-80	<i>Aspergillus sp</i>	10-20	Hipergammaglobulinemia	60-90
Infecciones cutáneas/impétigo	60-70	<i>Escherichia coli</i>	5-10	Hepatomegalia	50-90
Hepatitis /absceso perihepático	30-40	<i>Klebsiella sp</i>	5-10	Esplenomegalia	60-80
Osteomielitis	20-30	<i>Salmonella sp</i>	5-10	Anemia crónica	Común
Abscesos perirectal/fistulas	15-30	<i>Pseudomona cepacia y aeruginosa</i>	5-10	Bajo peso	70
Septicemia	10-20	<i>Serratia marcescens</i>	5-10	Diarrea crónica	20-60
Otitis media	20	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	5	Baja estatura	50
Conjuntivitis	15	<i>Streptococcus sp</i>	4	Gingivitis	50
Infecciones entéricas	10	<i>Enterobacter sp</i>	3	Dermatitis	35
Infección del tracto urinario/ pielonefritis	5-15	<i>Proteus sp</i>	3	Hidronefrosis	10-25
Sinusitis	<10	<i>Candida albicans</i>	3	Estomatitis ulcerativa	5-15
Renal/abscesos periférico	<10	<i>Nocardia sp</i>	2	Fibrosis pulmonar	<10
Absceso cerebral	<5	<i>Haemophilus influenzae</i>	1	Esofagitis	<10
Pericarditis	<5	<i>Pneumocystis carinii</i>	<1	Estrechez gástrica antral	<10
Meningitis	<5	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	<1	Ileocolitis granulomatosa	<10
		<i>Chromobacterium violaceum</i>	<1	Corioretinitis	<10
		<i>Francisella philomiragia</i>	<1	Cistitis granulomatosa	<10
		<i>Torulopsis glabrata</i>	<1	Glomerulonefritis	<10
				Lupus eritematoso discoide	<10

Adaptado de 31.

vez debidas a que NADPH-oxidasa pudiera estar involucrada en el procesamiento antigénico (54).

Existen dos formas de herencia de la EGC: ligada al cromosoma X y autosómica recesiva. En las formas asociadas a defectos en el cromosoma X, la media de la edad de inicio es temprana, alrededor de los 4,5 años, mientras que las asociadas a defectos autosómicos recesivos, se presentan más tardíamente con una media de 17,2 años (11), aunque hay reportes de inicio hasta los 60 años (55). Las formas ligadas al cromosoma X son las más frecuentes y se caracterizan por mutaciones en gp91^{phox}, mientras que las formas autosómicas se distinguen por mutaciones en cualquiera de las otras proteínas del complejo (p47^{phox}, p67^{phox}, p22^{phox}) (31). En la Tabla III se muestra la clasificación actual de las diferentes formas de EGC.

a. Mutaciones asociadas a la EGC ligada al cromosoma X

Las mutaciones del gen CYBB ocurren en la mayoría de los casos de EGC. Estas mutaciones son muy heterogéneas, en el 90% de los casos únicas en cada familia descrita (14,31). Se han identificado alrededor de 220 mutaciones causantes de EGC ligada al cromosoma X (17), estas mutaciones se han agrupado arbitrariamente en: acortamientos e inserciones, mutaciones de los sitios de "splicing", mutaciones "missense" y "non-sense". Los acortamientos e inserciones ocurren en el 35% de los casos, el 65% restante corresponden

a substituciones de nucleótidos, que pueden generar mutaciones en el sitio de "splicing" (16%); mutaciones "nonsense" que causan terminación prematura de la síntesis proteica (26%) y mutaciones "missense" que generan substitución de un simple aminoácido (23%) (12).

Existen tres formas fenotípicas de las mutaciones del gen CYBB, X91⁰, X91⁻ y X91⁺. La mutación X91⁰ se caracteriza por una ausencia total de la proteína, así como de la actividad oxidasa. Ocasionalmente se encuentran mutaciones que conducen a la pérdida parcial de la expresión de la proteína y del hem, estos son denominados EGC X91⁻, en estos casos la actividad de oxidasa está disminuida, proporcionalmente a la disminución del contenido del hem. Finalmente existen pocas mutaciones donde la expresión del gp91^{phox} es normal con una ausencia virtualmente total de la actividad de oxidasa, este subtipo es denominado EGC X91⁺ (12). También se ha reportado la presencia de formas polimórficas de gp91^{phox} ejemplificado por substitución al nivel del nucleótido G1102 C, que no conduce a alteración funcional de la proteína (56).

En algunas formas de EGC, los pacientes conservan cierta actividad del complejo NADPH-oxidasa, debido a la presencia de un grupo de neutrófilos y monocitos, entre el 6 al 12%, con capacidad de producir superóxido similar a la de un control normal, esto probablemente se debe a la presencia de dos subpoblaciones diferentes de células fagocíticas,

TABLA III
CLASIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD GRANULOMATOSA CRÓNICA

COMPONENTE AFECTADO	LOCUS	SUBTIPO ^a	FRECUENCIA (% DE TODOS LOS CASOS DE EGC)	ESPECTRO DEL CITOCROMO B (% DEL NORMAL)	COMPONENTE CITOSÓLICO ^b (% DEL NORMAL)			PRODUCCIÓN DE O ₂ (% DEL NORMAL)
					p40	p47	p67	
gp91 ^{phox}	Xp21.1	X91 ⁰	56	0	100	100	100	0
		X91 ⁻	5	3-30	100	100	100	3-30
		X91 ⁺	3	100	100	100	100	0
p22 ^{phox}	16q24	A22 ⁰	6	0	100	100	100	0
		A22 ⁺	1	100	100	100	100	0
p47 ^{phox}	7q11.23	A47 ⁰	23	100	<100	0	<100	0-1
p67 ^{phox}	1q25	A67 ⁰	6	100	10-20	<100	0	0-1

^a Las letras representan el modo de segregación (X) ligada al cromosoma X y (A) autosómica recesiva, el número representa el componente de complejo oxidasa afectado y el símbolo representa el nivel detectado de la proteína (0) indetectable; (-) disminuida y (+) normal. ^b Analizado por inmunotransferencia.

Adaptado de 17.

una de las cuales es competente para producir superóxido, y contribuye a mantener la capacidad residual de estos pacientes (57).

b. Mutaciones autosómicas en el componente de membrana (citocromo *b*₂₄₅ negativo)

Mutaciones de *p22^{phox}*: la primera observación de la ausencia de una banda de 23 kDa en pacientes con X-EGC fue hecha en 1987, lo que sugirió su asociación con el citocromo *b*. Aunque se han descrito pocas mutaciones de este gen (CYBA) las bases moleculares parecen ser tan heterogéneas como las descritas para X91. Los defectos de *p22^{phox}* se presentan como formas autosómicas de EGC denominadas A22 EGC, hasta la fecha se han reportado 10 defectos diferentes en 9 familias (17). Las mutaciones pueden originarse por deleciones, inserciones, mutaciones en el sitio de "splicing" y mutaciones "missense". Algunas mutaciones reportadas consisten en un cambio de histidina 94 arginina, que afecta su unión al hem, asociación con *gp91^{phox}* y la estabilidad de la proteína. Otra mutación detectada es la substitución de prolina en posición 156 por glutamina dentro de la secuencia rica en prolina (58), que bloquea por completo la unión con *p47^{phox}* a través del dominio SH3, esta es la primera mutación que involucra al dominio SH3 y la secuencia rica en prolina en la generación de una enfermedad genética (12,17).

c. Mutaciones autosómicas en el componente citosólico (citocromo *b*₂₄₅ positivo)

Nunoi 1988 y Volpp 1988 fueron quienes por primera vez reportaron la participación del componente citosólico en la EGC (59,60). La primera definición bioquímica fue la demostración de que el defecto autosómico recesivo, se asociaba a la falta de fosforilación de una proteína de 47 kDa, cuando los neutrófilos eran estimulados con PMA (48). Las mutaciones de *p47^{phox}* son conocidas como la forma autosómica más común (20,61) de la EGC denominada A47, mientras que las mutaciones de *p67^{phox}* (A67) son raras y se presentan en 5% de los casos (61).

Mutaciones de *p47^{phox}*: el gen NCF1 que codifica para esta proteína tiene 9 exones, en contraste con la heterogeneidad de *gp91^{phox}* y *p22^{phox}*, sólo se han reportado 4 mutaciones diferentes que conducen a EGC (12). Sin embargo existen alrededor de 60 individuos en el mundo con mutaciones A47⁰ EGC (17). Las mutaciones de este gen ocurren en un solo sitio, al nivel de las bases GTGT ubicadas entre el primer intron y el segundo exon (14,62,63).

Mutaciones de *p67^{phox}*: este gen (NCF2) fue clonado y secuenciado en 1990 (64) y su organización genómica reportada en 1993 (65). Pocas mutaciones se han caracterizado en el gen que codifica para esta proteína. Hasta la fecha se han reportado 11 mutaciones, distribuidas en 12 pacientes con A67 EGC (ver Tabla IV). La mayoría de los pacientes tienen cantidades normales de

TABLA IV
MUTACIONES EN EL GEN QUE CODIFICA P67PHOX

CAMBIO DE NUCLEOTIDO Cdna	MUTACIÓN	CAMBIO DE AMINOÁCIDO	TIPO DE EGC	REFERENCIA
55-63 AAGAAGGAC	Delección	19-21 LisLisAsp	A67 ⁰	17
170-172 AGA o 171-173 GAA o 172-174 AAG	Delección	Del. 58 Lis	A67 ^b	11,69
233 G A	Missense	78 Gli Glu	A67 ⁰	68
5' intron 3 gt gc	Sitio de splicing	Del. Exon 3	A67 ⁰	70
304 C T	Nonsense	102 Arg stop	A67 ⁰	17
5' intron 4 gt at	Sitio de splicing	Del exon 3 y 4; o exon 4, o último nucleotido del exon 4	A67 ⁰	17
AG después 397 A (o 399 G)	Inserción	Cambio del marco de lectura (frameshift)	A67 ⁰	68, *
479 A T y 481 A G	Doble missense	160-161 AspLis ValGlu	A67 ⁰	71
5' intron 9 gt at	Sitio de splicing	Del exon 8 y 9	A67 ⁰	72
1169-1173 CTAAG	Delección	Cambio del marco de lectura (frameshift)	A67 ⁰	17
1183 C T	Missense	395 Arg Trp	A67 ⁰	17

^b Paciente heterocigoto para la mutación con delección de 11-13 kb en el otro alelo. * Noack D, Rae J, Cross AR, Munoz J, Salmen S, Mendoza J, Rossi N, Curnutte JT, Heyworth PG. Autosomal recessive chronic granulomatous disease caused by novel mutations in NCF-2, the gene encoding the p67-phox component of phagocyte NADPH oxidase. Am J Hum Genet (sometido a publicación). Adaptado de 17.

ARNm, pero carecen de la proteína (12). La primera mutación reconocida fue una forma homocigota, caracterizada por la substitución de G233 A en el exon 3, que predice un cambio de glicina78glutamato y causa inestabilidad de p67^{phox} (66). Otra mutación corresponde a la inserción de un dinucleótido AG en la posición 399-401 en el exon 5 que conduce a la terminación prematura de la síntesis de la p67^{phox}, lo que resulta en la formación de un codon de finalización en la posición 433, esta mutación origina el fenotipo A67⁰ (67).

3. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la EGC se basa en la demostración de las características clínicas propias de la enfermedad y la ausencia o disminución de la actividad de oxidasa en los neutrófilos. Existen muchos métodos disponibles para este propósito, entre ellos el ensayo de reducción del nitroazul de tetrazolium (NBT) y métodos que usan la citometría de flujo para determinar la producción de H₂O₂. Otros ensayos incluyen la inmunotransferencia para detectar los componentes citosólicos y de membrana del complejo NADPH, sin embargo debe tenerse en cuenta cuando se ejecutan estas pruebas, que existen formas (0), (-) ó (+) de la enfermedad. Cuando ambas subunidades del complejo de membrana están ausentes está indicada la determinación de la producción de superóxido en las madres, por cuanto podría proporcionar informa-

ción sobre las portadoras del defecto ligadas al cromosoma X. Si este es negativo, está indicado realizar el análisis mutacional de los genes CYBA y CYBB. Cuando ambas subunidades del citocromo b₅₅₈, así como también ambos componentes citosólicos están presentes, los ensayos libres de células distinguirán entre un defecto citosólico y uno de membrana. La detección de portadores con defectos autosómicos es difícil, aunque al parecer la capacidad para producir superóxido en los heterocigotos portadores de A47⁰ y A67⁰ estimulados con PMA, es menor que los controles sanos (12). En la Fig. 1 se muestra un algoritmo para el diagnóstico de EGC.

4. DESCRIPCION PRELIMINAR DE UN FOCO DE EGC EN EL ESTADO MÉRIDA-VENEZUELA

Nosotros hemos demostrado la presencia de una mutación autosómica recesiva en el gen NCF2 que codifica para p67^{phox} y genera alteración en la producción de superóxido, en varios miembros de un grupo familiar procedente de la región de Piñango, Estado Mérida, en los Andes Venezolanos. Los pacientes eran tres varones de 4 años, 10 años y 13 años de edad, provenientes de una misma familia, quienes iniciaron su enfermedad con neumonía e insuficiencia respiratoria, uno de ellos, de 4 años, murió en una población distante, los otros dos ingresaron a la unidad de cuidados intensivos del Hospital Universitario de Los Andes, uno de ellos (10 años de edad), cur-

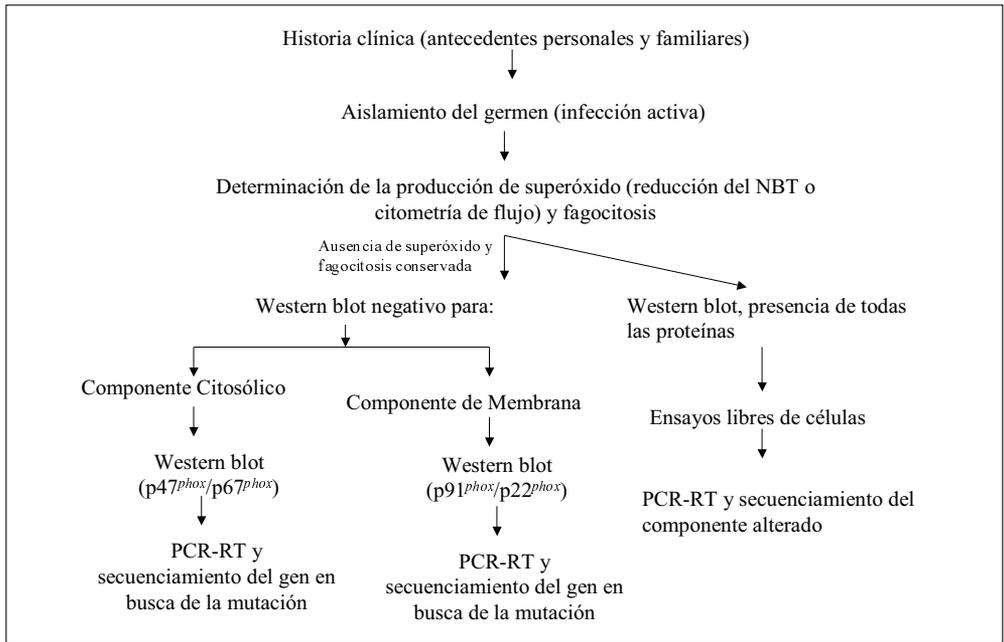
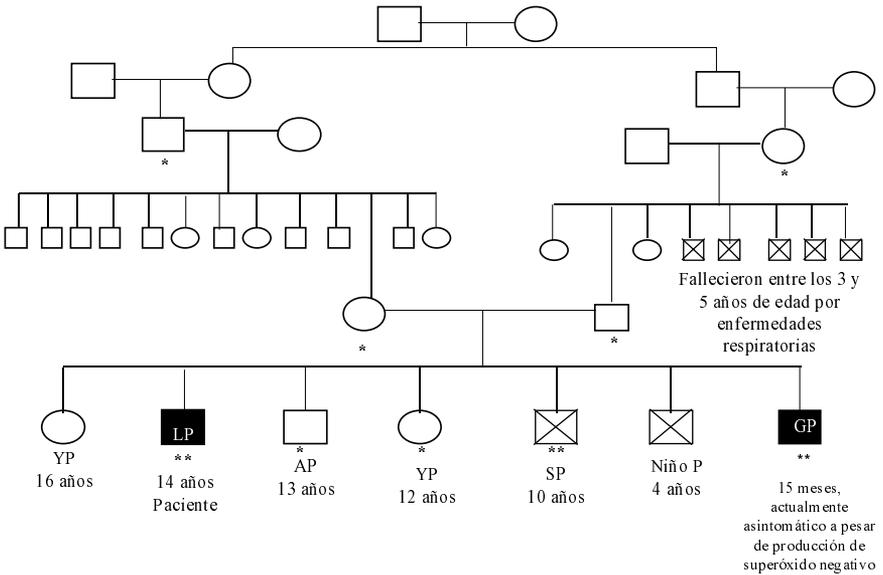


Fig. 1. Algoritmo para el diagnóstico de la EGC.

só además con un absceso tiroideo causado por *Nocardia sp* y falleció por insuficiencia respiratoria. El otro paciente de 14 años sobrevivió. El estudio del árbol genealógico (Fig. 2) reveló la existencia de consanguinidad múltiple con un coeficiente de consanguinidad (F) de 0,012. La producción de superóxido de los PMN del paciente de 10 años fue de 3.2 mUDO/min cuando se estimularon con Immunobeads[®] sensibilizadas con fracción II de Cohn (media activación vía receptores Fcγ) y 2,48 mUDO/min cuando se estimularon con PMA (media activación vía PKC) y los PMN del paciente de 14 años de 3 mUDO/min para ambos estímulos (control 13,8 con Immunobeads[®] y 25,2 con PMA). Estos resultados nos permi-

tieron hacer el diagnóstico de EGC. La evaluación del resto de los miembros de la familia reveló que sólo uno de ellos, no produjo superóxido con PMA. La inmunotransferencia reveló ausencia de reactividad para p67^{phox} y el secuenciamiento del ADN demostró una mutación por substitución de C283 T en el exon 5, lo cual predice un cambio de Alamina por Valina. Tres individuos son homocigotos al defecto, mientras que cuatro miembros de esta familia son portadores heterocigotos del defecto, esta substitución no ha sido reportada hasta ahora en la literatura y se traduce como A67⁰ (68). La ausencia de esta proteína altera el adecuado ensamblaje y activación del complejo NADPH-oxidasa y como consecuencia se perturba el trans-



(*) Heterocigoto para la mutación ; (**) Homocigoto para la mutación

Fig. 2. Arbol genealógico de la familia Pérez-Paredes. Tomado de referencia 68.

porte de electrones hacia el oxígeno libre, evento clave para generar el anión superóxido.

En la otra familia procedente de la población de Lagunillas, Estado Mérida, un paciente masculino de 19 años de edad ingresó a la unidad de cuidados intensivos por bronconeumonía causada por *Mycobacterium sp*, este paciente falleció por insuficiencia respiratoria. El árbol genealógico (Fig. 3) muestra de igual manera consanguinidad múltiple con un valor de F de 0,06. La producción de superóxido del paciente fue de 0, tanto en respuesta a las Immunobeads® como al PMA. La evaluación de los miembros de la familia del paciente, demostró que una de sus hermanas de 11 años, es negativa para la producción de superóxido con la función fagocítica

conservada. Actualmente se están realizando estudios bioquímicos y genéticos de esta familia.

5. PERSPECTIVAS FUTURAS

La disección molecular de los defectos del sistema NADPH-oxidasa ha permitido identificar muchos de los componentes de este complejo, sin embargo existen aun dudas sobre el papel del componente citosólico en la activación del complejo, el papel de los miembros de la familia *rac*, los elementos que regulan la activación de las proteínas del complejo citosólico, las implicaciones que tienen estas proteínas en el desarrollo, funcionamiento y mecanismos de muerte celular, independientemente de su función en la producción de superóxido.

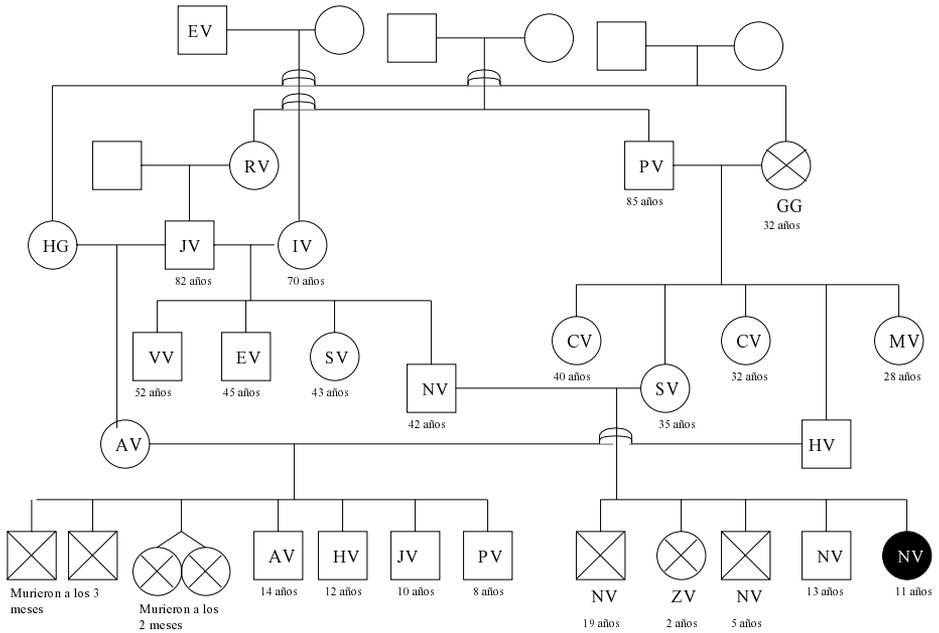


Fig. 3. Arbol genealógico de la familia Varela-Varela.

AGRADECIMIENTO

Este proyecto fue financiado por el CONICIT, código S1-96000327. A los Dres. Aurelio Lopresti y Carmen Amalia Mazzei por el manejo clínico de dos de estos pacientes en la Unidad de cuidados Intensivos del Hospital Universitario de Los Andes, Mérida-Venezuela.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GALLIN J.I.: Immunological diseases. Little Brown and Company, Boston. 1988.
- HELLEWELL P.G., HENSON P.M.: Clinical aspects of immunology. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London. 1993.
- PARSLOW T.G.: Inmunología básica y clínica. Manual Moderno, México D.F. 1996.
- ROITT I., BROSTOFF J., MALE D.: Immunology. Mosby, London, 1996.
- VIRELLA G.: Introduction to medical immunology. Marcel Dekker, Inc. New York. 1993.
- CASSATELLA M.A.: The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. Immunol Today. 1995; 16:21-26.
- FANGER N.A., LIU C., GUYRE P.M., et al. Activation of human T cells by major histocompatibility complex class II expressing neutrophils: proliferation in the presence of superantigen,

- but not tetanus toxoid. *Blood* 1997; 89:4128-4135.
8. GOSSELIN E.J., WARDWELL K., RIGBY W.F.C., GUYRE P.M.: Induction of MHC class II on human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, IFN- and IL-3. *J Immunol* 1993; 151:1482-1490.
 9. ROMANI L., MENCACCI A., CENCI E., DEL SERO G., BISTONI F., PUCETTI P.: An immunoregulatory role for neutrophils in CD4⁺ T helper subset selection in mice with Candidiasis. *J Immunol* 1997; 158: 2356-2362.
 10. SMITH W.B., GUIDA L., SUN Q., KORPELAINEN E.I., VAN DEL HEUVEL C., GILLIS D.: Neutrophils activated by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor express receptors for interleukin-3 which mediate class II expression. *Blood* 199; 86:3938-3944.
 11. AHLIN A., DE BOER M., ROOS D., LEUSEN J., SMITH C.I.E., SUNDIN U., RABBANI H., PALMBLAD J., ELINDER G.: Prevalence, genetics and clinical presentation of chronic granulomatous disease in Sweden. *Acta Paediatr* 1995; 84: 1386-1394.
 12. ROOS D., DE BOER M., KURIBAYASHI F., MEISCHL C., WEENING R.S., SEGAL A.W., ÅHLIN A., NEMET K., HOSSLE J.P., BERNATOWSKA-MATUSZKIEWICZ E., MIDDLETON-PRICE H.: Mutations in the X-linked and autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. *Blood* 1996; 87: 1663-1681.
 13. ZELAZKO M., CARNEIRO-SAMPAIO M., DE LUIGI M.C., DE OLARTE D.G., MADRIGAL O.P., PEREZ R.B., CABELLO A., ROSTAN M.V., SORENSEN R.U.: Primary immunodeficiency diseases in Latin American: first report from eight countries participating in the LAGID. *J Clin Immunol* 1998; 18:161-166.
 14. THRASHER A.J., KEEP N.H., WIENTJES F., SEGAL A.W.: Chronic granulomatous disease. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1227:1-24.
 15. CALAFAT J., KUIJPERS T.W., JANSSEN H., BORREGAARD N., VERHOEVEN A.J., ROOS D.: Evidence for small intracellular vesicles in human blood phagocytes containing cytochrome b₅₅₈ and adhesion molecule CD11b/CD18. *Blood* 1993; 81:3122-3129.
 16. PARKOS C.A., ALLEN R.A., COCHRANE C.G., JESAITIS A.J.: Purified cytochrome b from human granulocyte plasma membrane is comprised of two polypeptides with relative molecular weights of 91,000 and 22,000. *J Clin Invest* 1987; 80: 732-742.
 17. HEYWORTH P.G., CURNUTTE J.T., BADWEY J.A.: Structure and regulation of the NADPH oxidase of phagocytic leukocytes. *Insights from chronic*

- granulomatous disease. En: Molecular and cellular basis of inflammation. Serhan CN, Ward PA (eds) 1999.
18. PARKOS C.A., DINAUER M.C., WALKER L.E., ALLEN R.A., JESAITIS A.J., ORKIN S.H.: Primary structure and unique expression of the 22-kilodalton light chain of human neutrophil cytochrome b. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85:3319-3323.
 19. DINAUER M.C., PIERCE E.A., BRUNS G.A.P., CURNUTTE J.T., ORKIN S.H.: Human neutrophil cytochrome b light chain (p22- *phox*). Gene structure, chromosomal location, and mutations in cytochrome-negative autosomal recessive chronic granulomatous disease. J Clin Invest 1990; 86:1729-1737.
 20. GALLIN J.I., LETO T.L., ROTROSEN D., KWONG C.H., MALECH H.L.: Delineation of the phagocyte NADPH oxidase through studies of chronic granulomatous diseases of childhood. Curr Opin Immunol 1991; 4: 53-56.
 21. HENDERSON L.M., CHAPPELL J.B.: NADPH oxidase of neutrophils. Biochim Biophys Acta 1996; 1273:87-107.
 22. SEGAL A.W., WEST I., WIENTJES F., NUGENT J.H.A., CHAVAN A.J., HALEY B., GARCIA R.C., ROSEN H., SCRACE G.: Cytochrome *b-245* is a flavocytochrome containing FAD and the NADPH-binding site of the microbicidal oxidase of phagocytes. Biochem J 1992; 284:781-788.
 23. ROYER-POKORA B., KUNKEL L.M., MONACO A.P., GOFF S.C., NEW-BURGER P.E., BAEHNER R.L., COLE F.S., CURNUTTE J.T., ORKIN S.H.: Cloning the gene for an inherited human disorder-Chronic granulomatous disease-on the basis of its chromosomal location. Nature 1986; 322:32-38.
 24. SKALNIK D.G., STRAUSS E.C., ORKIN S.H.: CCAAT displacement protein as a repressor of the myelomonocytic-specific gp91-*phox* gene promoter. J Biol Chem 1991; 266:16736-16744.
 25. ROOS D., CURNUTTE J.T., HOSSLE J.P., LAU Y.L., ARIGA T., NUNOI H., DINAUER M.C., GAHR M., SEGAL A.W., NEW-BURGER P.E., GIACCA M., KEEP N.H., VAN ZWIETEN R.: X-CGDbase: a database of X-CGD-causing mutations. Immunol Today 1996; 17:517-512.
 26. PORTER C.D., PARKAR M.H., VERHOEVEN A.J., LEVINSKY R.J., COLLINS M.K.L., KINNON C.: p22*phox*-deficient chronic granulomatous disease: reconstitution by retrovirus-mediated expression and identification of a biosynthetic intermediate of gp91-*phox*. Blood 1994; 84:2767-2775.
 27. YU L., ZHEN L., DINAUER M.C.: Biosynthesis of the phagocyte NADPH oxidase cyto-

- chrome *b558*. Role of heme incorporation and heterodimer formation in maturation and stability of *gp91-phox* and *p22-phox* subunits. *J Biol Chem* 1997; 272:27288-27294.
28. BROMBERG Y., PICK E.: Unsaturated fatty acids stimulate NADPH-dependent superoxide production by cell-free system derived from macrophages. *Cell Immunol* 1984; 88:213-221.
29. CURNUTTE J.T.: Activation of human neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced (triphosphoryridine nucleotide, reduced) oxidase by arachidonic acid in a cell-free system. *J Clin Invest* 1985; 75:1740-1743.
30. MCPHAIL L.C., SHIRLEY P.S., CLAYTON C.C., SNYDERMAN R.: Activation of the respiratory burst enzyme from human neutrophils in a cell-free system. *J Clin Invest* 1985; 75:1735-1739.
31. CURNUTTE J.T.: Chronic granulomatous disease: The solving of a clinical riddle at the molecular level. *Clin Immunol Immunopathol* 1993; 67:S2-S15.
32. WIENTJES F.B., HSUAN J.J., TOTTY N.F., SEGAL A.W.: *p40-phox*, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains. *Biochem J* 1993; 296: 557-561.
33. QUINN M.T., PARKOS C.A., WALKER L., ORKIN S.H., DINAUER M.C., JESAITIS A.J.: Association of a Ras-related protein with cytochrome b of human neutrophils. *Nature* 1989; 342:198-200.
34. SMITH R.M., CONNOR J.A., CHEN M.L., BABIOR B.M.: The cytosolic subunit *p67-phox* contains an NADPH-binding site that participates in catalysis by the leukocyte NADPH oxidase. *J Clin Invest* 1996; 98:977-983.
35. VOLPP B.D., NAUSEEF W.M., DONELSON J.E., MOSER D.R., CLARK R.A.: Cloning of the cDNA and functional expression of the 47-kilodalton cytosolic component of human neutrophil respiratory burst oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:7195-7199.
36. LOMAX K.J., LETO T.L., NUÑO H., GALLIN J.I., MALECH H.L.: Recombinant 47-kilodalton cytosol factor restores NADPH oxidase in chronic granulomatous disease. *Science* 1989; 245: 409-412.
37. HEYWORTH P.G., CURNUTTE J.T., NAUSEEF W.M., VOLPP B.D., PEARSON D.W., ROSEN H., CLARK R.A.: Neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide oxidase assembly. Translocation of *p47-phox* and *p67-phox* requires interaction between *p47-phox* and cytochrome *b558*. *J Clin Invest* 1991; 87:352-356.

38. ROTROSEN D., LETO T.L.: Phosphorylation of neutrophil 47-kDa cytosolic oxidase factor. Translocation to membrane is associated with distinct phosphorylation events. *J Biol Chem* 1990; 265:19910-19915.
39. DUSI S., DELLA BIANCA V., GRZESKOWIAK M., ROSSI F.: Relationship between phosphorylation and translocation to the plasma membrane of p47-*phox* and p67-*phox* and activation of NADPH oxidase in normal and Ca²⁺-depleted human neutrophils. *Biochem J* 1993; 290:173-178.
40. TSUNAWAKI S., MIZUNARI H., NAGATA M., TATSUZAWA O., KURATSUJI T.: A novel cytosolic component, p40phox, of respiratory burst oxidase associates with p67-*phox* and is absent in patients with chronic granulomatous disease who lack p67-*phox*. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 199:1378-1387.
41. SATHYAMOORTHY M., MENDEZ I., ADAMS A.G., LETO T.L.: p40-*phox* down-regulates NADPH oxidase activity through interactions with its SH3 domain. *J Biol Chem* 1997; 272: 9141-9146.
42. ABO A., PICK E., HALL A., TOTTY N., TEAHAN C.G., SEGAL A.W.: Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP binding protein p21^{rac1}. *Nature* 1991; 353: 668-670.
43. BOKOCH G.M., KNAUS U.L.: The role of small GTP-binding proteins in leukocyte function. *Curr Opin Immunol* 1994; 6: 98-105.
44. KNAUS U.G., HEYWORTH P.G., EVANS T., CURNUTTE J.T., BOKOCH G.M.: Regulation of phagocyte oxygen radical production by GTP-binding protein rac2. *Science* 1992; 254:1512-1515.
45. HAATAJA L., GROFFEN J., HEISTERKAMP N.: Characterization of RAC3, a novel member of the Rho family. *J Biol Chem* 1997; 272:20384-20388.
46. PARK J.W., MA M., RUEDI J.M., SMITH R.M., BABIOR B.M.: The cytosolic components of the respiratory burst oxidase exist as a Mr ~240,000 complex that acquires a membrane-binding site during activation of the oxidase in a cell-free system. *J Biol Chem* 1992; 267:17327-17332.
47. CURNUTTE J.T., ERICKSON R.W., DING J., BADWEY J.A.: Reciprocal interactions between protein kinase C and components of the NADPH oxidase complex may regulation superoxide production by neutrophils stimulation with a phorbol ester. *J Biol Chem* 1994; 269:10813-10819.
48. SEGAL A.W., HEYWORTH P.G., COCKROFT S., BARROWMAN M.M.: Stimulated neutrophils from patients with autosomal recessive chronic granulomatous disease fail to phosphory-

- late a Mr-44,000 protein. *Nature* 1985; 316:547-549.
49. CROSS A.R., CURNUTTE J.T.: The cytosolic activating factors p47-*phox* and p67-*phox* have distinct roles in the regulation of electron flow in NADPH oxidase. *J Biol Chem* 1995; 270: 6543-6548.
 50. CROSS A.R., YARCHOVER J.L., CURNUTTE J.Y.: The superoxide-generating system of human neutrophils possesses a novel diaphorase activity. Evidence for distinct regulation of electron flow within NADPH oxidase by p67-*phox* and p47-*phox*. *J Biol Chem* 1994; 269: 21448-21454.
 51. ROOS D.: The genetic basis of chronic granulomatous disease. *Immunol Rev* 1994; 121-157.
 52. IRANI K., XIA Y., ZWEIER J.L., *et al.* Goldschmidt-Clermont P.J. Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science* 1997; 275: 1649-1652.
 53. KASAHARA Y., IWAI K., YACHIE A., OHTA K., KONNO A., SEKI H., MIYAWAKI T., TANIGUCHI N.: Involvement of reactive oxygen intermediates in spontaneous and CD95 (Fas/APO-1)-mediated apoptosis of neutrophils. *Blood* 1997; 89: 1748-1753.
 54. HASUI M., HATTORI K., TANIUCHI S., KOHDERA U., NISHIKAWA A., KINOSHITA Y., KOBAYASHI Y.: Decreased CD4+CD29+ (memory T) cells in patients with chronic granulomatous disease. *J Infect Dis* 1993; 167: 983-985.
 55. SCHAPIRO B.L., NEWBURGER P.E., KLEMPNER M.S., DINAUER M.C.: Chronic granulomatous disease presenting in a 69-year-old man. *N Engl J Med* 1991; 325:1786-1790.
 56. KURIBAYASHI F., DE BOER M., LEUSEN J.H.W., VERHOEVEN A.J., ROOS D.: A novel polymorphism in the coding region of CYBB, the human gp91-*phox* gene. *Hum Genet* 1996; 97:611-613.
 57. WOODMAN R.C., NEWBURGER P.E., ANKLESARIA P., ERICKSON R.W., RAE J., COHEN M.S., CURNUTTE J.T.: A new X-linked variant of chronic granulomatous disease characterized by the existence of a normal clone of respiratory burst-competent phagocytic cells. *Blood* 1995; 85:231-241.
 58. DINAUER M.C., PIERCE E.A., ERICKSON R.W., MUHLEBACH T.J., MESSNER H., ORKIN S.H., SEGER R.A., CURNUTTE J.T.: Point mutation in the cytoplasmic domain of the neutrophil p22-*phox* cytochrome b subunit is associated with a nonfunctional NADPH oxidase and chronic granulomatous disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 11231-11235.
 59. NUNOI H., ROTROSEN D., GALLIN J.I., MALECH H.L.: Two forms of autosomal chronic granulomatous disease lack distinct neutrophil cytosol

- factors. *Science* 1988; 242: 1298-1301.
60. VOLPP B.D., NAUSEEF W.H., CLARK R.A.: Two cytosolic neutrophil oxidase components absent in autosomal chronic granulomatous disease. *Science* 1988; 242: 1295-1297.
61. CLARK R.A., MALECH H.L., GALLIN J.I., NUNOI H., VOLPP B.D., PEARSON D.W., NAUSEEF W.M., CURNUTTE J.T.: Genetic variants of chronic granulomatous disease: prevalence of deficiencies of two cytosolic components of the NADPH oxidase system. *N Engl J Med* 1989; 321:647-652.
62. CASIMIR C.M., BU-GHANIM H.N., RODWAY A.R.F., BENTLEY D.L., ROWE P., SEGAL A.W.: Autosomal recessive chronic granulomatous disease caused by deletion at a dinucleotide repeat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:2753-2757.
63. IWATA M., NUNOI H., YAMAZAKI H., NAKANO T., NIWA H., TSURUTA S., OHGA S., OHMI S., KANEGASAKI S., MATSUDA I.: Homologous dinucleotide (GT or TG) deletion in Japanese patients with chronic granulomatous disease with p47-*phox* deficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 199:1372-1377.
64. LETO T.L., LOMAX K.J., VOLPP B.D., NUNOI H., SECHLER J.M.G., NAUSEEF W.M., CLARK R.A., GALLIN J.I., MALECH H.L.: Cloning of a 67-kD neutrophil oxidase factor with similarity to a noncatalytic region of p60^{c-src}. *Science* 1990; 248: 727-730.
65. KENNEY R.T., MALECH H.L., EPSTEIN N.D., ROBERTS R.L., LETO T.L.: Characterization of the p67-*phox* gene: genomic organization and restriction fragment length polymorphism analysis for prenatal diagnosis in chronic granulomatous disease. *Blood* 1993; 82: 3739-3744.
66. DE BOER M., HILARIUS-STOKMAN P.M., HOSSLE J.P., VERHOEVEN A.J., GRAF N., KENNEY R.T., SEGER R., ROOS D.: Autosomal recessive chronic granulomatous disease with absence of the 67-kD cytosolic NADPH oxidase component: identification of mutation and detection of carriers. *Blood* 1994; 83:531-6.
67. NUNOI H., IWATA M., TATSUZAWA S., ONOE Y., SHIMIZU S., KANEGASAKI S., MATSUDA I.: AG dinucleotide insertion in a patient with chronic granulomatous disease lacking cytosolic 67-kD protein. *Blood* 1995; 86:329-333.
68. SALMEN S., MENDOZA J., ROSSI N., MUÑOZ J.F., LOPRESTI A., MUÑOZ M., RAE J., NOACK D., HEYWORTH P.G., HERNANDEZ M.: Enfermedad granulomatosa crónica: descripción de una familia con un defecto autosómico recesivo. *Acta Cient Ven* 1998; 49(Suppl 2): 260 (Abst).

69. LEUSEN J.H.W., KELIN A., HILARIUS P.M., AHLIN A., PALMBLAD J., SMITH C.I.E., DIEKMANN D., HALL A., VERHOEVEN A.J., ROOS D.: Disturbed interaction of p21^{rac} with mutated p67-*phox* causes chronic granulomatous disease. *J Exp Med* 1996; 184: 1243-1249.
70. TANUGI-CHOLLEY L.C., ISARTEL J-P., LUNARDI J., FREYCON F., MOREL F., VIGNAIS P.V.: A mutation located at the 5' splice junction sequence of intron 3 in the p67-*phox* gene causes the lack of p67-*phox* mRNA in a patient with chronic granulomatous disease. *Blood* 1995; 85:242-249.
71. BONIZZATO A., RUSSO M.P., DONINI M., DUSI S.: Identification of a double mutation (D160V-K161E) in the p67-*phox* gene of a chronic granulomatous disease patient. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 231:861-863.
72. AOSHIMA M., NUNOI H., SHIMAZU M., SHIMIZU S., TATSUZAWA O., KENNEY R.T., KANEGASAKI S.: Two-exon skipping due to a point mutation in p67-*phox*-deficient chronic granulomatous disease. *Blood* 1996; 88:1841-1845.