

Metabolismo oxidativo y aspectos fisiológicos importantes del proceso fagocítico

Esperanza Duarte Escalante, María Estela León Islas,
María Lucía Taylor, Facultad de Medicina, UNAM

Resumen

La presente monografía está dirigida a la presentación breve y concisa de los principales eventos fisiológicos de la célula fagocítica relacionados con el metabolismo oxidativo y algunos cambios que tienen lugar en el fagocito durante la etapa de estimulación para promover el procesamiento de una partícula o de un agente patógeno.

Summary

The present monograph is focussed to a brief and concise presentation of the most important physiological aspects of phagocytic cells related to the oxidative metabolism and some of the changes that occur in the phagocyte during its stimulation stage to promote particle or pathogen processing.

Se sabe que las infecciones producidas por parásitos intracelulares estimulan, en sujetos susceptibles, una respuesta inmune preferentemente celular. Esta respuesta, dada por la participación de diferentes subpoblaciones de linfocitos T con distintas funciones, está caracterizada por una amplia variedad de actividades biológicas, dirigidas por mediadores denominados linfocinas, que ejercen su acción principal sobre los macrófagos.

Ya que siendo el macrófago el que determina el destino final de la infección por un parásito intracelular y siendo la fagocitosis la actividad más relevante en el binomio macrófago/parásito, es conveniente destacar algunos conceptos del proceso fagocítico.

Se utiliza el término genérico endocitosis para definir el

proceso por el cual algunas células son capaces de ingerir macromoléculas o partículas, las cuales son encerradas en una porción de la membrana plasmática e invaginadas, con posterior formación de una vesícula intracelular que contiene el material ingerido (fig. 1)².

Dos términos se han distinguido para caracterizar la actividad de ingestión, según los tamaños de la vesícula formada y del material a ser ingerido. El primero es la pinocitosis, que involucra la ingestión de líquidos o moléculas solubles de tamaño menor a $0.5 \mu\text{m}$, por vía de pequeñas vesículas. El segundo es la fagocitosis que involucra la ingestión de partículas mayores de $0.5 \mu\text{m}$, como microorganismos o células dañadas, por medio de la formación de vesículas grandes llamadas vacuolas. Sin

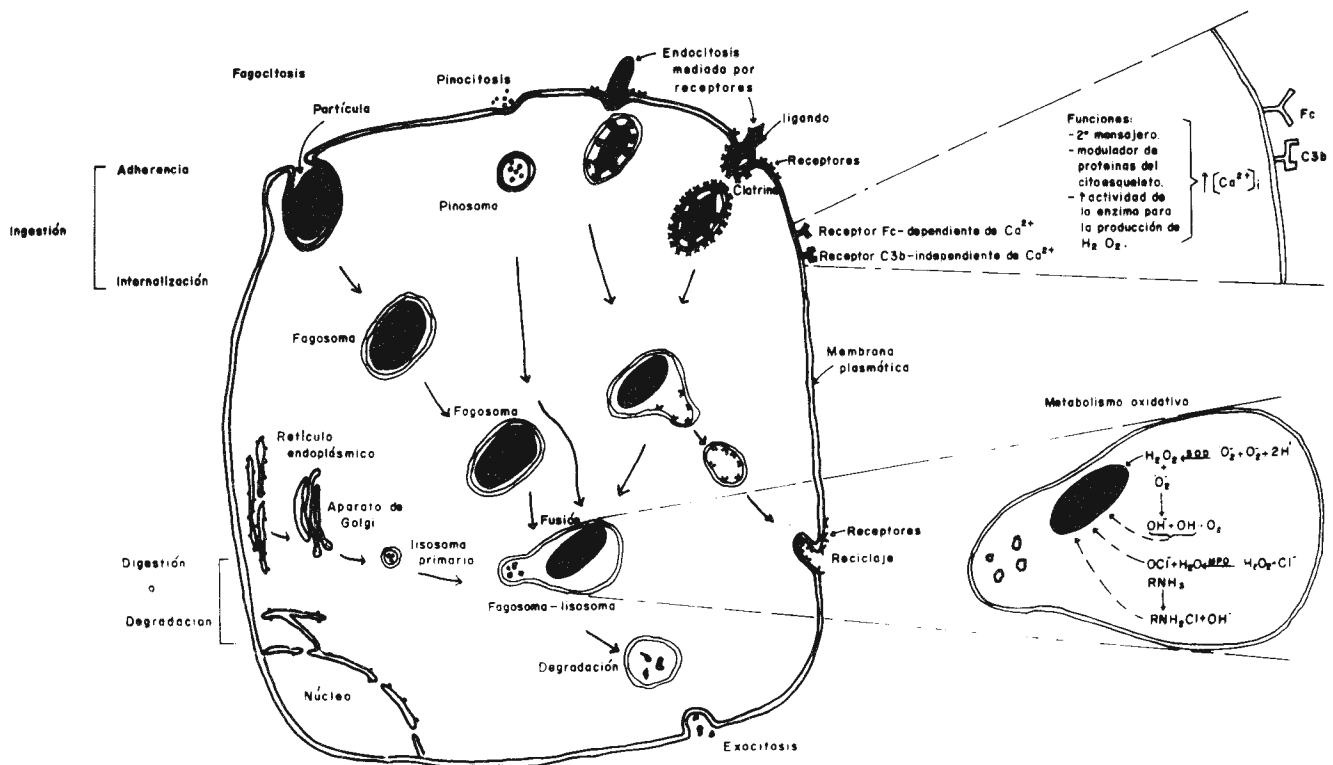


Figura 1. Representación esquemática de los principales eventos que ocurren durante el proceso fagocítico. () aumento; ([Ca²⁺]_i) concentración de calcio intracelular; (MPO) mieloperoxidasa; (SOD) superóxido dismutasa; (OH⁻) ión hidroxilo; (O₂⁻) radical superóxido; (OH·) radical hidroxilo; (OC1⁻) ión hipoclorito; (RNH₂Cl) cloraminas.

embargo, el tamaño preciso del material, que define la utilización de ambos términos, no está bien caracterizado y, además, varía con el tipo de célula fagocítica. Los macrófagos poseen una enorme capacidad para ingerir moléculas tanto solubles como partículas que varían enormemente en su tamaño, incluyendo partículas menores de 0.1 μ m, o moléculas solubles las cuales se ingieren a través de receptores, mientras que los polimorfonucleares (PMN) presentan una menor capacidad de ingestión relacionada con el tamaño del material ingerido²⁷. Sin embargo, el término fagocitosis sigue siendo empleado por varios autores para denominar al fenómeno mediante el cual una partícula es ingerida, digerida y finalmente sus productos de la digestión, exocitados. Existe la tendencia para denominar fagocitosis a la etapa de ingestión, también llamada internalización, separando los eventos posteriores del procesamiento del material fagocitado en las etapas subsecuentes de fusión fagosoma-lisosoma, digestión y exocitosis (fig. 1).

El término endocitosis también ha sido empleado en diferentes circunstancias y muchos especialistas lo utilizan para definir la ingestión de moléculas solubles a través de receptores específicos y se denomina "endocito-

sis mediada por receptores"²⁰, que corresponde al término usado por otros autores de "pinocitosis mediada por receptores"²⁷. Se han descrito algunas diferencias en los eventos involucrados en los mecanismos: endocitosis mediada por receptor, pinocitosis, fagocitosis. Por ejemplo, algunos agentes que interfieren en la fosforilación oxidativa y en la respiración deprimen la pinocitosis pero no la fagocitosis. Asimismo, el fluoruro, el iodoacetato y la 2-desoxiglucosa inhiben la fagocitosis y no la pinocitosis^{18 19 27}.

En la fagocitosis, conceptualizada como ingestión de partículas, se distinguen dos fases. La primera es la adherencia y comprende una serie de interacciones específicas y no específicas de la partícula, con la superficie externa de la membrana plasmática del fagocito. Es un proceso pasivo de tipo unión receptor-ligando que no requiere energía. La segunda se caracteriza por la internalización de la partícula. Se realiza a través de la fusión de la membrana plasmática de la célula fagocítica que rodea la partícula, con la consecuente formación de la vacuola fagocítica o fagosoma. Este es un proceso activo, dependiente de temperatura y con alto gasto energético¹.

La fase de internalización se realiza a través de recepto-

res, que para los macrófagos se han determinado: 1. Los que participan como posoninas a) receptores para la porción Fc de IgE, IgA, y varias subclases de IgG, siendo estos últimos más importantes, entre los que se encuentran el Fc γ RI (CD64) de alta afinidad, y el Fc γ RII (CDw32), así como el Fc γ RIII (CD16), ambos de baja afinidad^{6 9 11 17}; b) receptores para algunas proteínas del complemento entre los cuales se encuentran CR1 (CD35) para C3b/C4b y CR3 (CD11b) para C3bi¹³. 2. Los que participan en la adhesión entre células, y que pertenecen a la superfamilia de las integrinas o adhesinas, como LFA-1, CR3, p 150.95, fibronectina, laminina, etcétera⁶. 3. Otros receptores que participan en la endocitosis y transporte de partículas o moléculas en las células, siendo éstos, receptores para ligandos como glicoconjugados con residuos terminales de manosa y/o fucosa, β -glucanas, glicoconjugados fucosilados, varias lipoproteínas, transferrina, lactoferrina, α -2-macroglobulinas y otros⁶.

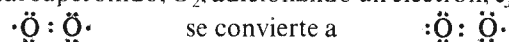
La interacción ligando-receptor se lleva a cabo mediante un mecanismo semejante a una cremallera, en una porción localizada en la membrana citoplasmática, de tal manera que los receptores del macrófago se van uniendo a las moléculas complementarias del ligando (partícula o molécula soluble) hasta rodearla por completo, formándose la vesícula endocítica. Un paso similar entre fagocitosis y endocitosis (pinocitosis), mediada por receptores, es el ensamblaje de una proteína fibrosa de 180 000 daltons llamada clatrina, que junto con un polipéptido pequeño de 35 000 daltons forman una cobertura sobre las vesículas endocíticas^{1 4 8 20 27}. En el caso de pequeñas vesículas endocíticas, la clatrina juega un papel directo en la formación de la vesícula. En el caso de la vesícula fagocítica se planteaba que la clatrina no jugaba un papel importante, sin embargo, Aggeler y Werb¹ han demostrado que la mitad de los fagosomas observados después de un breve período de fagocitosis, presentaban áreas asociadas a la clatrina. Aunque no está muy bien definido el papel de la clatrina en la fagocitosis, se cree que esta proteína participa probablemente en el reciclaje rápido a la membrana plasmática de los receptores involucrados en la internalización de la partícula.

Cuando la partícula ha sido englobada por una porción de la membrana plasmática y se ha formado el fagosoma, ocurre una serie de eventos encaminados a digerirla. Inicialmente se presenta la acidificación del fagosoma¹⁶, posteriormente éste es dirigido al centro de la célula donde se fusiona con lisosomas primarios, iniciándose así el proceso de la digestión (fig. 1).

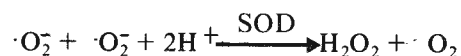
Los mecanismos mediante los cuales los macrófagos digieren y eliminan a las partículas o microorganismos operan de dos maneras separadas durante el proceso fagocítico: una dependiente y otra independiente de oxígeno.

El mecanismo microbicida dependiente del oxígeno parece ser el de mayor importancia en los macrófagos^{3 10 24}. La mayoría de los macrófagos, a excepción de los alveolares, utilizan la glicólisis anaerobia como vía para la obtención de energía. En esta vía los carbohidratos son convertidos a ácido láctico y no hay consumo de oxígeno. Durante y después de la fagocitosis, los fagocitos empiezan a consumir oxígeno cuando cambian su vía de metabolismo de carbohidratos por otra que produce gran cantidad de energía, como es la vía de monofosfato de hexosa. Los fagocitos pueden incrementar casi 100 veces su consumo de oxígeno cuando son estimulados para la fagocitosis. La enzima NADPH-oxidasa, íntimamente relacionada a esta vía, puede estar asociada físicamente con receptores para quimioatrayentes, complejos inmunes, lectinas, o por adyuvantes que estimulan la vía oxidativa del metabolismo del oxígeno de los fagocitos (fig. 1).

La NADPH-oxidasa reduce al oxígeno (O_2) del medio a radical superóxido, O_2^- , adicionando un electrón, ejemplo



El anión superóxido lleva una carga negativa y tiene un electrón no apareado que lo vuelve más reactivo. El anión superóxido por sí solo es poco tóxico, pero fácilmente se convierte en otros derivados del oxígeno muy letales. La enzima superóxido dismutasa (SOD) atrapa radicales superóxido y, a través de la adición de protones de hidrógeno, da como resultado peróxido de hidrógeno y oxígeno único (singlete de oxígeno) a través de la reacción:



La posición de los electrones en el peróxido de hidrógeno es H O O H de tal modo que cada átomo de oxígeno tiene una órbita completa de electrones. El oxígeno único tiene el mismo número de electrones que el oxígeno normal, pero los electrones no apareados rotan en direcciones opuestas, uno con relación al otro. El oxígeno único es un estado excitado de oxígeno con alta energía y puede disipar su exceso de energía por cambios térmicos o por la emisión de luz. La liberación de luz es una característica importante de los fagocitos estimulados. El fenómeno, denominado quimioluminiscencia, proviene de las especies excitadas de oxígeno, principalmente del

oxígeno único, el cual se produce en dos formas: Sigma $^1\text{O}_2$ que posee electrones antiparalelos en diferentes órbitas y Delta O_2 donde los electrones antiparalelos se encuentran en la misma órbita. Cuando estas dos formas retornan a su estado energético original, liberan energía en forma de fotones.

Otra forma tóxica de oxígeno es el producido dentro de los fagocitos cuando el H_2O_2 reacciona con los radicales superóxido en presencia de hierro. Los productos son: oxígeno, ión hidroxilo y radical hidroxilo.



El radical hidroxilo es producto de una reducción de electrones de H_2O_2 y es el oxidante más potente que se produce en los sistemas biológicos. Se considera como un participante importante en la muerte intrafagocítica.

En los granulocitos (polimorfonucleares, eosinófilos y basófilos) la toxicidad de los metabolitos reactivos de oxígeno aumenta considerablemente por la reacción catalítica de la enzima mieloperoxidasa (MPO). La MPO cataliza la reacción de H_2O_2 a ión hipoclorito:



El hipoclorito por sí solo es un poderoso agente microbicida. También es precursor de las cloraminas, que son un grupo de halógenos oxidados con acción microbicida y se forman por la reacción de hipoclorito con amonio o aminas.



Aunque los macrófagos no tienen mieloperoxidasa, se cree que la catalasa puede actuar de manera similar y posiblemente éstos utilicen peroxidasa proveniente de granulocitos para intensificar su acción microbicida^{10, 24}.

Los mecanismos independientes de oxígeno han sido menos estudiados, éstos incluyen los bajos valores de pH intravacuolar que se alcanza al acumularse productos del metabolismo de carbohidratos, y la actividad de diversas enzimas hidrolíticas que activan a estos valores de pH bajo, en los lisosomas de las células fagocíticas. El contenido de los lisosomas confiere a las células fagocíticas su capacidad microbicida y digestiva. Parte del contenido de los gránulos lisosomales son: a) enzimas hidrolíticas-fosfatasa ácida, ribonucleasa ácida, desoxirribonucleasa ácida, aril sulfatasa A y B, catepsinas B, C, D y E, colagenasa, β -glucuronidasa, α -L-fucosidasa, α -1, 4-

glucosidasa, α -N-acetilglucosaminidasa, α -N-acetilgalactosaminidasa, hialuronidasa, fosfolipasa, lipasa ácida, β -galactosidasa, α -manosidasa, citocromo C-reductasa y lisozima; b) oxidasas-mieloperoxidasa y otras oxidasas; c) otros constituyentes pirógenos endógenos, activador del plasminógeno, hemolisinas, fagocitinas, proteínas catiónicas, proteínas básicas promotoras del aumento de la permeabilidad vascular, etcétera. Cabe mencionar que este contenido caracteriza fundamentalmente los lisosomas de leucocitos polimorfonucleares²², los macrófagos poseen muchos de éstos y otros componentes.

Además de las actividades realizadas durante el proceso fagocítico y de ser una célula presentadora de antígeno, el macrófago tiene un alto potencial para la secreción de moléculas o productos biológicos como: factores del complemento (C_1 , C_4 , C_2 , C_3 , C_5 , factor B, factor D, properdina, C_3b INA y 1H); inhibidores enzimáticos como la α -2 macroglobulina; metabolitos del ácido araquidónico como prostaglandinas (E_2), leucotrienos (B_4 , C_4 , D_4), tromboxanos, factor inhibidor de plaquetas, además de proteínas con actividades biológicas diversas como interleucina 1, interleucina 6, factor de necrosis tumoral, γ -interferón, fibronectina, etcétera.

A pesar de que se conocen diferentes aspectos del proceso fagocítico, existen aún muchos interrogantes. Se discute, por ejemplo, el papel del calcio libre intracelular (Ca^{2+}) y se piensa que éste actúa como segundo mensajero en las funciones fagocíticas, incluyendo, quimiotaxis²⁶, internalización²⁸ y degranulación²⁵. Varios estímulos de superficie disparan mecanismos en los que participa el calcio. En los mecanismos oxidativos de los fagocitos, se considera que el calcio aumenta la actividad de la enzima responsable de la producción de peróxido de hidrógeno^{23, 29}.

El avance obtenido en la medición del Ca^{2+} libre intracelular por métodos fluorescentes¹² permitió expresar los niveles de éste durante eventos celulares, como la internalización, en distintos tipos de células, sin embargo, los resultados son algunas veces contradictorios.

Parece ser que existe una distribución de calcio libre intracelular que está relacionada con diferentes funciones de las regiones donde se concentra. Se ha visto que hay aumento de calcio libre intracelular en la internalización de partículas y en la locomoción del fagocito. Los cambios de $[\text{Ca}^{2+}]$ ocurren dentro de la célula en las regiones donde se van a llevar a cabo estas funciones importantes²³.

Se ha demostrado que la extensión de neutrófilos humanos está precedida por un aumento en la concentración

de calcio libre intracelular y se ha postulado que éste actúa como un modulador de las funciones del citoesqueleto y de la movilidad de las células¹². Un número importante de proteínas asociadas a actina, que se encuentran en macrófagos y neutrófilos, están regulados por calcio²¹.

El mecanismo por el cual la unión a un receptor es transducida a una señal que genera la formación de pseudópodos del fagocito no se conoce; sin embargo, evidencias bioquímicas postulan que se aumentan los gradientes de iones calcio en el citoplasma periférico, por interacción con proteínas contráctiles, y se inicia el proceso de internalización²¹.

Dos mecanismos receptor-específicos operan en la membrana plasmática del fagocito, uno que reconoce a los fragmentos C₃b/i del complemento y otro, al fragmento Fc de la inmunoglobulina G³⁰. Existen evidencias de que la fagocitosis mediada por estos receptores difiere en el número y naturaleza de las señales intracelulares generadas^{7 32 33}. Lew y cols.¹⁴ han postulado, en neutrófilos humanos, dos mecanismos de fagocitosis, uno dependiente de [Ca²⁺]_i y que modula la fagocitosis disparada por la activación del receptor Fc y el otro independiente de [Ca²⁺]_i debido a la activación de los receptores C₃b/i. Sin embargo, McNeil y cols.¹⁵ no han encontrado que el Ca²⁺

libre intracelular intervenga en la fagocitosis mediada por receptor Fc. Ellos sugieren que el Ca²⁺ no está involucrado en la señal citoplasmática para el fagocito, o bien, que el aumento de [Ca²⁺]_i está confinado a algunas regiones del citoplasma a niveles muy bajos que limitan su detección. Así, por los resultados controvertidos, la participación del calcio en algunas etapas de la fagocitosis queda en entredicho.

Por diferentes medios y estrategias, los parásitos intracelulares han desarrollado mecanismos que les permiten escapar de la destrucción en diferentes etapas del proceso fagocítico, ya sea por: impedir su reconocimiento y adhesión; inhibir la fusión fagosoma-lisosoma; escapar del fagolisosoma; crear resistencia a la acción de enzimas líticas; escapar al efecto letal de las especies oxígeno tóxicas a través de la inhibición de la producción de metabolitos reactivos de oxígeno, de la neutralización de sus efectos tóxicos o de la prevención de la interacción del parásito con los metabolitos tóxicos^{5 31}.

Siendo la fagocitosis un proceso celular altamente especializado y complejo, para entender la relación fagocito/parásito es necesario el esclarecimiento de sus mecanismos más íntimos, razón por la cual esta línea de estudio representa un reto para muchos investigadores.

Referencias

- Aggeler, J. and Werb, Z.: Ultrastructural aspects of phagocytosis by macrophages. Ed. Weissmann, G. *Advance in Inflammation Research*. New York, Raven Press, 35-54, 1984.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J.D.: *Molecular Biology of the Cell*. New York, Garland Publishing-Inc., 302-314, 1983.
- Babior, B.M.: The respiratory burst of phagocytes. *J. Clin. Invest.* 73: 599-601, 1984.
- Dautry-Varsat, A. and Lodish, H.F.: How receptors bring proteins and particles into cells. *Sci. Amer.* 250: 52-58, 1984.
- Densen, P. and Mandell, G.L.: Phagocyte strategy vs microbial tactics. *Serial Feature. Rev. Infect. Dis.* 2: 817-838, 1980.
- Gordon, S., Perry, V.H., Rabinowitz, S., Chung, L.P. and Rosen, H.: Plasma membrane receptors of the mononuclear phagocyte system. *J. Cell. Sci.* 9: 1-26, 1988.
- Hed, J. and Stendahl, O.: Differences in the ingestion mechanisms of IgG and C3b particles in phagocytosis by neutrophils. *Immunology* 94: 727-736, 1982.
- Helenius, A., Mellman, I., Wall, D. and Hubbard, A.: Endosomes. *TIBS* 7: 245-250, 1983.
- Kinet, J.P.: Antibody-cell interactions: Fc receptor. *Cell* 57: 351-354, 1989.
- Klebanoff, S.J.: Cytocidal mechanisms of phagocytic cells. Eds. Fougereau, M. and Dausset, J. *Fourth International Congress of Immunology. Immunology 80. Progress in Immunology IV*. New York, Academic Press, 720-736, 1984.
- Knapp, W., Rieber, P., Dörken, B., Schmidt, R.E., Stein, H. and Borne, A.E.G. Kr.v.d.: Towards a better definition of human leucocyte surface molecules. *Immunol. Today* 10: 253-258, 1989.
- Kruskal, B.A. and Maxfiel, F.R.: Cytosolic free calcium increases before and oscillates during frustrated phagocytosis in macrophages. *J. Cell. Biol.* 105: 2685-2693, 1987.
- Law, S.K.A.: C3 receptors on macrophages. *J. Cell. Sci.* 9: 67-97, 1988.
- Lew, P.D., Andersson, T., Hed, J., Di Virgilio, F., Pozzan, T. and Stendahl, O.: Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent phagocytosis in human neutrophils. *Nature* 315: 509-511, 1985.
- McNeil, P.L., Swanson, J.A., Wright, S.D., Silverstein, S.C. and Taylor, D.L.: Fc-receptor-mediated phagocytosis occurs in macrophages without and increase in average [Ca²⁺]_i. *J. Cell. Biol.* 102: 1586-1592, 1986.
- McNeil, P.L., Tanasugarn, L., Meigs, J.B. and Taylor, D.L.: Acidification of phagosomes is initiated before lysosomal enzyme activity is detected. *J. Cell. Biol.* 97: 692-702, 1983.
- Mellman, I., Koch, T., Healey, G., Hunziker, W., Lewis, V., Plutcher, H. et al.: Structure and function of Fc receptor on macrophages and lymphocytes. *J. Cell. Sci.* 9: 45-65, 1988.
- Mich, J., Ohlbaum, D.J. and Silverstein, S.C.: 2-deoxyglucose selectively inhibits Fc and complement receptor-mediated phagocytosis in mouse peritoneal macrophages. I. Description of the inhibitory effect. *J. Exp. Med.* 144: 1465-1483, 1976.
- Mich, J., Ohlbaum, D.J., Silverstein, S.C.: 2-deoxyglucose selecti-

- vely inhibits Fc and complement receptor-mediated phagocytosis in mouse peritoneal macrophages. II. Dissociation of the inhibitory effects of 2-deoxyglucose on phagocytosis and ATP generation. *J. Exp. Med.* 144: 1484-1493, 1976.
20. Pastan, I. and Willingham, M.C.: Receptor-mediated endocytosis: coated pits, receptosomes and the golgi. *TIBS* 7: 250-254, 1983.
 21. Pollard, T.D. and Cooper, J.A.: Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Annu. Rev. Biochem.* 55: 987-1035, 1986.
 22. Rojas-Espinosa, O.: Participación de las células fagocíticas en la patología de la tuberculosis. *Rev. Fac. Med. Mex.* 11: 505-515, 1982.
 23. Sawyer, D.W., Sullivan J.A. and Mandell, G.L.: Intracellular free calcium localization in neutrophils during phagocytosis. *Science* 230: 663-666, 1985.
 24. Skanene, E. and Gross, P.: Role of macrophage in resistance against infectious diseases. Ed. Herberman, R.B. *Clinics in Immunology and Allergy*. Philadelphia, 539-560, 1983.
 25. Smolen, J.E., Korchak, H.M. and Weissman, G.: The roles of extracellular and intracellular calcium in lysosomal enzyme release and superoxide anion generation by human neutrophils. *Biochim. Biophys. Acta* 677: 512-520, 1981.
 26. Snyderman, R. and Goetzl, E.J.: Molecular and cellular mechanisms of leukocyte chemotaxis. *Science* 213: 830-837, 1981.
 27. Steinman, R.M. and Cohn, Z.A.: The metabolism and physiology of the mononuclear phagocytes. Eds. Zweifach, B.W., Grant, L. and Oustey, M.C. *The Inflammatory Process*, 2nd. ed., New York, Academic Press, 449-510, 1974.
 28. Stossel, T.P.: Quantitative studies of phagocytosis. Kinetic effect of cations and heat-labile opsonin. *J. Cell. Biol.* 58: 346-356, 1973.
 29. Suzuki, H., Pabst, M.J. and Johnston Jr., R.B.: Enhancement by Ca^{2+} of MG^{2+} of catalytic activity of the superoxide producing NADPH-oxidase in membrane fractions of human neutrophils and monocytes. *J. Biol. Chem.* 260: 3635-3639, 1985.
 30. Tsein, R.Y., Pozzan, T. and Rink, T.J.: Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. *J. Cell. Biol.* 94: 325-334, 1982.
 31. Wolf, J.E., Kerchberger, V., Kobayashi, G.S. and Little, J.R.: Modulation of the macrophage oxidative burst by *Histoplasma capsulatum*. *J. Immunol.* 138: 582-586, 1987.
 32. Wright, S.D. and Silverstein, S.C.: Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes *J. Exp. Med.* 158: 2016-2023, 1983.
 33. Yamamoto, K. and Johnston Jr., R.B.: Dissociation of phagocytosis from stimulation of the oxidative metabolic burst in macrophages. *J. Exp. Med.* 159: 405-416, 1984.