
La p67-*PHOX* como un elemento esencial del sistema *NADPH* oxidasa de las células fagocíticas

CLAUDIA P. AVENDAÑO, PABLO J. PATIÑO

Las células fagocíticas cumplen un papel fundamental en la defensa innata del huésped contra la invasión de microorganismos. Luego de ser fagocitados, uno de los mecanismos utilizados para destruir dichos microorganismos es la producción de metabolitos intermedios del oxígeno generados a través del sistema *NADPH* oxidasa. Los radicales libres del oxígeno están al mismo tiempo involucrados en el daño tisular, que ocurre en muchas condiciones inflamatorias. La *NADPH* oxidasa es un complejo proteico conformado por varios componentes: gp91-*phox* y p22-*phox*, los cuales forman un heterodímero llamado citocromo b_{558} , que se encuentra en la membrana de las células fagocíticas, y por las proteínas p47-*phox*, p67-*phox* y p40-*phox* que forman un complejo macromolecular localizado en el citoplasma. Durante la activación de las células fagocíticas los componentes citosólicos del sistema se translocan a la membrana y se unen al citocromo b_{558} , conformando así el complejo enzimático activo de la *NADPH* oxidasa cuya importancia biológica se ha evidenciado en las últimas cuatro décadas gracias al estudio de la enfermedad granulomatosa crónica (EGC). Ésta es una inmunodeficiencia primaria caracterizada por infecciones recurrentes y severas. Todos los casos de EGC reportados hasta ahora tienen que ver con

una alteración en los genes que codifican las proteínas gp91-*phox*, p22-*phox*, p67-*phox* y p47-*phox*. La p67-*phox* es uno de los componentes del sistema *NADPH* oxidasa que más ha llamado la atención en los últimos años, pues tiene un papel fundamental en la activación del flujo de electrones desde el citoplasma a la vacuola fagocítica. En este artículo se hace una revisión acerca de lo que hasta ahora se conoce de la estructura y función de la p67-*phox*. Además se revisarán las diversas mutaciones identificadas en su gen, que debido a su alto grado de heterogeneidad son de gran utilidad para el entendimiento de la estructura y función del sistema *NADPH* oxidasa.

PALABRAS CLAVE

CÉLULAS FAGOCÍTICAS

NADPH OXIDASA

ENFERMEDAD GRANULOMATOSA CRÓNICA (EGC)

P67-PHOX

CLAUDIA PATRICIA AVENDAÑO, PABLO J. PATIÑO, Grupo Patogénesis de las Inmunodeficiencias Primarias, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

La fagocitosis es uno de los mecanismos con que cuentan muchos seres vivos para defenderse de organismos presentes en el medio ambiente donde viven. En los organismos multicelulares superiores este mecanismo se ha convertido en una forma especializada de defensa innata contra la agresión por microorganismos infecciosos, esto gracias a la evolución de una población de células que han diseñado toda una serie de mecanismos microbicidas bastante eficientes. En los vertebrados las células fagocíticas son la primera línea de defensa contra la infección por bacterias, hongos, parásitos unicelulares y muchos virus; gracias a ellas podemos sobrevivir en un medio en el que tenemos contacto permanente con microorganismos potencialmente infecciosos. Las células fagocíticas —neutrófilos, eosinófilos, monocitos y macrófagos— presentan una característica muy particular y es que gran parte de su actividad microbicida depende de la producción de moléculas reactivas del oxígeno generadas por un sistema enzimático conocido como oxidasa de las células fagocíticas o NADPH oxidasa (1,2). Los radicales de oxígeno y otros agentes intermediarios que se generan después de iniciada la fagocitosis y activación de estas células, actúan en forma coordinada con otros agentes microbicidas presentes en los lisosomas para destruir aquellos microorganismos o partículas que han sido fagocitados. Sin embargo, debido a esa misma capacidad inespecífica de destrucción, estos agentes reactivos derivados del oxígeno pueden afectar las moléculas propias del hospedero y por lo tanto son responsables, en gran medida, del daño tisular que acompaña a muchas condiciones inflamatorias, especialmente cuando éstas se hacen crónicas (1,2).

La activación de las células fagocíticas se acompaña de un incremento significativo en el consumo de oxígeno, fenómeno que es independiente del metabolismo mitocondrial. Este proceso, identificado desde hace más de 40 años, se conoce como

explosión respiratoria de las células fagocíticas y durante ella los electrones son transferidos del NADPH presente en el citoplasma de las células al oxígeno molecular ubicado en la vacuola fagocítica lo que genera anión superóxido (O_2^-). Este radical de oxígeno es por lo tanto el producto directo de la activación de la NADPH oxidasa. El anión superóxido se convierte rápidamente a peróxido (H_2O_2) a través de una reacción de dismutación, la cual puede ocurrir espontáneamente o ser catalizada por la acción de la enzima superóxido dismutasa. Luego, en una reacción que depende de la mieloperoxidasa (MPO) presente en los gránulos de los fagocitos, el peróxido de hidrógeno, en presencia de cloro, se transforma en ácido hipocloroso (HClO). Durante este mismo fenómeno se producen radicales hidróxilo ($\cdot OH$) a través de la interacción del anión superóxido y el peróxido de hidrógeno (reacción de Haber-Weiss) o por procesos de óxido-reducción de estos mismos agentes en presencia de metales de transición como el hierro y el cobre (reacción de Fenton). El peróxido de hidrógeno, pero en especial el ácido hipocloroso y el radical hidróxilo son fuertes agentes microbicidas, responsables en gran medida de la muerte de los microorganismos en el interior del fagolisosoma y del daño tisular ocasionado durante la activación de las células fagocíticas (1,3,4).

La NADPH oxidasa es un complejo enzimático compuesto por al menos 5 proteínas diferentes que son específicas de este sistema. Dos de estos componentes, una glicoproteína de 91 kDa (*gp91-phox*) y otra de 22 kDa (*p22-phox*), forman un heterodímero llamado flavocitocromo b_{558} (a 558 nm este citocromo tiene su pico α de máxima absorción). Este flavocitocromo es una proteína integral de la membrana de las células fagocíticas y de los fagolisosomas. El flavocitocromo b_{558} contiene dos centros de óxido-reducción en su estructura, los cuales son responsables del transporte de electrones que tiene lugar durante la explosión respiratoria de los fagocitos (3,4). Por otra parte, en el cito-

plasma de las mismas células se encuentran otros 3 constituyentes del sistema: una proteína de 47 kDa (p47-*phox*), una de 67 kDa (p67-*phox*) y otra de 40 kDa (p40-*phox*). Parte de ellas se encuentra formando un complejo macromolecular en el citosol de las células no activadas, que es el responsable de permitir el contacto posterior entre los componentes membranales y citoplasmáticos de la NADPH oxidasa una vez se da este proceso de activación. Aunque el papel exacto de las proteínas citosólicas en el flujo de electrones de esta oxidasa es poco entendido, se conoce que la p47-*phox* y la p67-*phox* son indispensables para la producción de anión superóxido. Después de la activación de las células fagocíticas, la p47-*phox* sufre un proceso de fosforilación que induce cambios conformacionales en el complejo macromolecular citosólico que permiten la interacción de las proteínas que lo conforman a través de dominios que antes no se encontraban disponibles (1,4). Una vez ocurren estos cambios, el complejo conformado por los componentes citosólicos se transloca a la membrana y se une al citocromo b_{558} . Aparentemente, el contacto de la p67-*phox* con el flavocitocromo b_{558} es el que da inicio al flujo de electrones desde la NADPH hasta el primer centro de óxido-reducción ubicado en la gp91-*phox* (4), el cual tiene como aceptor un grupo FAD (de aquí el nombre de flavocitocromo). Luego los electrones pasan a uno de los dos grupos heme ubicados en el mismo flavocitocromo, los cuales finalmente y gracias a su bajo potencial de óxido-reducción ($E_{m_{7,0}} = -245$ mV) ceden los electrones directamente al oxígeno molecular para así generar O_2^- (2,4).

Existe controversia acerca del papel de la p40-*phox* en la activación de la NADPH oxidasa, pues aunque es claro que esta proteína no es esencial para la activación del flujo de electrones (1,4,5), el hecho de que p40-*phox* esté unida en el complejo macromolecular con p67-*phox* y con p47-*phox* y que además se transloque a la membrana durante la activación, sugiere una función moduladora en el sistema. Algunos investigadores han presentado evidencias que muestran un papel regulador negativo

de la p40-*phox* en la NADPH oxidasa (6). En otros experimentos se ha observado que p40-*phox* podría ser una proteína adaptadora (7).

Para la activación de la NADPH oxidasa se requiere además la presencia de otras moléculas que no son exclusivas de este sistema. Una de ellas es la proteína p21*rac* que pertenece a las "proteínas pequeñas unidoras de GTP" que a su vez constituyen la superfamilia del protooncogen *ras*. La fosforilación del GDP unido a la p21*rac*, hace que ésta pueda mediar la activación de la NADPH oxidasa (4). No se conoce exactamente cómo *rac* induce la activación del sistema, pero se ha encontrado que esta proteína interactúa con p67-*phox* y se transloca a la membrana luego de la activación del fagocito (4). Este proceso requiere la presencia del citocromo b_{558} (4,8). Hace poco se demostró que la translocación de p21*rac* depende de la presencia de p67-*phox* (4,9).

El complejo NADPH oxidasa se expresa constitutivamente sólo en células fagocíticas maduras aunque se han observado algunas excepciones (10). El transcrito de la subunidad gp91-*phox* se expresa específicamente en células mieloides, mientras que el RNA mensajero de p22-*phox* se puede encontrar en múltiples tejidos; sin embargo, la proteína no se incorpora a la membrana en ausencia de gp91-*phox*. Algunos estudios muestran que la expresión de p47-*phox* y p67-*phox* está restringida a células fagocíticas y linfocitos B. Observaciones similares fueron reportadas para p40-*phox*. Esta expresión restringida de los componentes del sistema NADPH oxidasa depende de la presencia de una serie de elementos reguladores que actúan sobre estos genes. Se ha demostrado que la regulación transcripcional del gen de la gp91-*phox* depende de elementos presentes en la región proximal de su promotor y a su vez éstos son importantes en la diferenciación terminal de las células mieloides. Algunos de los factores activadores de la transcripción que interactúan con estos elementos son: HAF-1 (*Hematopoietic Associated Fac-*

tor); IRF (IFN-Interferon Regulatory Factor) y BID (Binding Increased During Differentiation); además, se ha encontrado un factor represor de la transcripción conocido como CPD (CCAAT Displacement Protein) (11,12). De otro lado, el factor de transcripción PU.1 es muy importante para la expresión de p47-phox y p40-phox en las células mieloides (10).

En el extremo 5' del gen que codifica para la proteína p67-phox se encontró recientemente una secuencia homóloga a aquella identificada en el gen de la gp91-phox, la cual es el sitio de unión del factor de transcripción HAF-1; sin embargo, no se ha demostrado que esta secuencia cumpla la misma función en la regulación de la p67-phox (13). Por otra parte, la proteína p21rac se encuentra en gran variedad de células, lo cual implica que los mecanismos reguladores de su expresión son diferentes a los usados por los componentes específicos de la NADPH oxidasa (10).

La importancia del sistema NADPH oxidasa para la actividad microbicida de las células fagocíticas se ha evidenciado en las últimas cuatro décadas gracias al estudio de la enfermedad granulomatosa crónica (EGC). Ésta es una inmunodeficiencia primaria caracterizada por infecciones severas y recurrentes causadas por bacterias y hongos que serían poco patógenos en individuos con fagocitos normales. Esto ocurre como consecuencia de la incapacidad de las células fagocíticas de estos pacientes para destruir ciertos microorganismos, principalmente aquéllos que son catalasa positiva (4). Estas células fagocíticas presentan una deficiencia severa de la explosión respiratoria y por lo tanto tienen incapacidad para producir los metabolitos intermediarios del oxígeno originados durante esta respuesta. Todos los casos de EGC reportados hasta el presente ocurren como consecuencia de una alteración en los genes que codifican las proteínas gp91-phox, p22-phox, p47-phox y p67-phox (4,14).

La forma más común de EGC se presenta por una alteración en el gen de la gp91-phox, la cual

tiene una herencia ligada al sexo y representa el 60-65% de los casos de EGC. Las formas autosómicas recesivas de la enfermedad ocurren por alteraciones de la proteína p22-phox, encontradas en el 5-7% de los casos; por mutaciones en el gen que codifica la p47-phox que corresponden al 25-30% de los casos y por defectos en el gen de la p67-phox que son los menos frecuentes y probablemente causan menos del 5% de los casos de EGC reportados (4,15).

A pesar de ser la forma menos frecuente de EGC, el estudio de los pacientes con deficiencia de p67-phox ha llevado a conocer la importancia fundamental de esta proteína en el sistema NADPH oxidasa, así como la estructura molecular de su gen; éste se localiza en el cromosoma 1q25, tiene una extensión aproximada de 40 kb y contiene 16 exones, los cuales codifican para una proteína de 526 aminoácidos y predicen un peso molecular de 60,9 kDa (16,17). Esta proteína posee dos dominios homólogos a la secuencia tipo 3 del oncogén src (SH3) comprendidos entre los residuos 241-295 y 458-517, así como una secuencia rica en prolinas que posiblemente le sirve para interactuar con los dominios SH3 presentes en otras proteínas o con los existentes dentro de sí misma (1). Los estudios demuestran que ambos dominios SH3 de la p67-phox son importantes para permitir la activación de la NADPH oxidasa (18). Además, en las células no activadas, el complejo citosólico constituido por p67-phox, p47-phox y p40-phox, se forma a través de la interacción de los dominios SH3 presentes en ellas (1).

También se ha descrito que cuando se activan las células se presenta un cambio conformacional en dicho complejo multiproteico que permite que la región rica en prolinas de la p67-phox entre en contacto con la región central de la p47-phox que a su vez contiene 2 dominios SH3 (18). Así, la activación de la p67-phox podría producir cambios estructurales que le permitirían estar más disponible para unirse con la p47-phox o para modificar los sitios

de dicha interacción. De esta manera la *p67-phox* podría estar dando inicio y regularía la actividad del sistema NADPH oxidasa (19).

MUTACIONES EN EL GEN DE LA P67-PHOX Y SU RELACIÓN CON LA EGC

La caracterización de las mutaciones de los pacientes con EGC ha sido fundamental para dilucidar la estructura y función de varios de los componentes del sistema NADPH oxidasa. En el caso de la *p67-phox* se ha observado un alto grado de heterogeneidad genética, lo cual será de gran utilidad para el entendimiento de los mecanismos involucrados en la regulación de la expresión y función bioquímica de este sistema.

Aunque son pocos los pacientes deficientes de *p67-phox* que han sido caracterizados en detalle, se han descrito en ellos diversas mutaciones. La primera correspondió a una sustitución homocigótica del nucleótido guanina en la posición 233 por adenina (G233→A) en el exón 3, la cual produjo el cambio del aminoácido glicina por ácido glutámico en la posición 78 de la proteína (Gly78→Glu); esto probablemente conduce a una inestabilidad severa en la *p67-phox*, pues esta proteína no se detectó en células fagocíticas de la paciente afectada (15). La segunda paciente analizada presentó una transición homocigótica del nucleótido timina a citosina en el segundo nucleótido del intrón 3 (IVS 3 +2 T→C); este nucleótido es esencial para el reconocimiento y eliminación del intrón durante el procesamiento del RNA mensajero y su modificación ocasionó una delección del exón 3 en el RNA mensajero de la *p67-phox*. Además, este tipo de mutaciones conduce a una gran inestabilidad del RNA lo que se asoció con una reducción dramática en la cantidad del transcripto de este gen (14). El tercer paciente reportado fue homocigótico para una inserción de los nucleótidos adenina y guanina en la posición 399 del exón 5 (399 ins AG), lo cual introdujo un cam-

bio en el marco del RNA mensajero durante su traducción a proteína lo que condujo a un codón de paro prematuro durante la síntesis de la *p67-phox*, lo que impide que se sintetice una proteína completa y funcional (20). En el cuarto paciente se identificaron dos mutaciones diferentes: en uno de los alelos se encontró una delección del codón GAA en el exón 3, (171 del 3) lo cual predice una pérdida del aminoácido lisina en la posición 58 de la proteína (Del Lys58), mientras que en el otro alelo se demostró una delección de 11-13 Kb lo que originó la pérdida de un gran fragmento del gen de la *p67-phox* (4). El quinto caso fue un paciente homocigótico para la sustitución del nucleótido guanina por adenina en el primer nucleótido del intrón 9 (IVS 9 +1 G→A); este nucleótido, al igual que lo descrito en el segundo caso, mencionado previamente, es esencial para el procesamiento del RNA mensajero y por lo tanto esta mutación condujo a un defecto del transcripto de la *p67-phox* que se manifestó como una delección de los exones 8 y 9 del RNA mensajero (21). Un sexto caso de deficiencia de *p67-phox* reveló dos sustituciones diferentes en el exón 5, las cuales condujeron a los cambios de lisina por ácido glutámico (L160E) y de ácido aspártico por valina (D161V) en las posiciones 160 y 161, respectivamente (22).

Recientemente nuestro grupo ha reportado la caracterización bioquímica y molecular de varios pacientes deficientes en *p67-phox* (23). En el primer caso, la paciente fue homocigótica para la transición del nucleótido de citosina por timina en la posición 304 (C304→T) en el exón 4, lo que condujo a un cambio del aminoácido arginina por un codón de paro prematuro en la posición 102 (R102X); esta mutación predice una drástica reducción en el tamaño de la *p67-phox* pues sólo se sintetiza un péptido de 101 aminoácidos. La segunda paciente, al igual que su hermana, fue homocigótica para una delección de cinco nucleótidos en el extremo 3' del exón 13 (1169 del 5), la cual modifica el marco de lectura produciendo un codón de paro pre-

matureo y un producto carente de los últimos 126 aminoácidos en el extremo carboxiterminal de la p67-*phox*. La misma delección en el exón 13 se encontró en el paciente de la tercera familia. Es interesante anotar que ambas familias son de origen palestino. La paciente en la cuarta familia afectada fue homocigótica para la transición de guanina a adenina en el primer nucleótido del intrón 4 (IVS 4 +1 G→A), lo cual causa un procesamiento anormal del RNA mensajero de la p67-*phox* que en este caso llevó a que se presentaran tres especies de RNA mensajero. En el quinto caso, dos hermanas fueron heterocigóticas para la transición G→A en la posición +1 del intrón 4, lo que tuvo como consecuencia el procesamiento anormal del exón 4; mientras que la mutación identificada en el segundo alelo fue una delección de la adenina en la posición 728 (728 del A) del exón 9, lo cual produce un cambio en el marco de lectura del RNA mensajero durante su traducción y conduce a la síntesis de sólo una porción de la proteína, en este caso hasta el aminoácido 270. Finalmente, en el alelo paterno del sexto caso se observó la mutación hallada en las dos familias precedentes: la transición G→A en el primer nucleótido del intrón 4; por su parte, en el alelo materno se demostró una delección de 9 nucleótidos en la posición 55 del exón 2 (55 del 9) que originó la eliminación de 3 aminoácidos (Lys19, Lys20, Asp21) en el extremo aminoterminal de la p67-*phox* (23).

Además de las mutaciones descritas se han identificado varios polimorfismos en el gen de la p67-*phox*. Las transiciones de timina por citosina en la posición 895 (T895→C) y de adenina por guanina en el nucleótido 983 (A983→G) se encontraron en todos los individuos normales que estudiamos. El primero predice un cambio sinónimo del aminoácido leucina (L290L) mientras que el segundo conduce a un cambio conservativo del aminoácido lisina en la posición 328 por arginina (K328R). Otro polimorfismo, la transición de adenina por guanina en la posición 542 (A542→G), se identificó en alrededor de la mitad de los sujetos estudiados; ésta predice una sustitución conserva-

da de la lisina en la posición 180 de la p67-*phox* por arginina (K180R). Estas tres sustituciones de nucleótidos han sido previamente consideradas como polimorfismos del gen p67-*phox* (20). Además de éstas, en nuestro trabajo se encontraron otras dos sustituciones dentro de la secuencia de DNA que codifica la p67-*phox* en dos individuos normales usados como controles. Uno de ellos fue heterocigótico para la transición de adenina por guanina en la posición 235 (A235→G) en el exón 3, la cual predice el cambio de metionina por valina (M78V). El otro individuo evidenció una transversión citosina por adenina (C1167→A) en el exón 13 que predice la sustitución de histidina en la posición 389 por glutamina (H389Q). Estos dos cambios podrían obedecer a polimorfismos poco frecuentes en el gen de p67-*phox* o indicar un estado portador de un defecto para p67-*phox* (23). Finalmente, se encontraron otros cambios, no reportados previamente, en regiones no codificadoras del gen de la p67-*phox*. La sustitución de adenina por guanina en el intrón 10, 21 nucleótidos antes del inicio del exón 11 (IVS 10 -21 A→G), se evidenció en tres familias analizadas y en varios de los individuos controles. Aunque este cambio nucleotídico no se asoció con el fenotipo de EGC, en algunos individuos se observaron varios tipos de RNA mensajero a nivel del exón 11, lo cual se podría explicar porque la adenina de la posición -21 es importante para el procesamiento del RNA al interactuar con el extremo 5 del intrón que queda libre después de que éste es cortado del exón precedente. Además se encontraron en forma heterocigótica, en el DNA genómico de varios miembros de la quinta familia estudiada y de un sujeto control, tres transiciones en la región 5 reguladora del gen de la p67-*phox* en los nucleótidos 184, 180 y 23 antes del sitio de inicio de la transcripción: G-185→A, G-181→A y C-24→T. Estas sustituciones no se encuentran ubicadas en ningún motivo conocido implicado en la regulación de la transcripción de este gen y no hay evidencias que indiquen una alteración en los niveles del transcrito para p67-*phox* en estos individuos.

Los hallazgos anteriores, en especial aquéllos en los que se produce un cambio de un aminoácido por otro o la pérdida de uno o más residuos aminoacídicos, son bastantes interesantes y nos llevan a pensar en regiones o dominios críticos para la función de la p67-*phox*. Por lo tanto, profundizar en los cambios producidos por estas mutaciones sobre la función de esta proteína es un objetivo fundamental de nuestra línea de investigación en este campo. De otro lado, aquellas mutaciones y en menor medida algunos polimorfismos que modifican la transcripción o el procesamiento del RNA mensajero, son muy interesantes y nos podrían dar información valiosa acerca de aspectos básicos en la regulación de la transcripción, así como de los mecanismos involucrados en el procesamiento del pre-RNA mensajero a RNA mensajero.

BIBLIOGRAFÍA

1. DELEO FR, QUINN MT. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. *J Leukocyte Biol* 1996; 60:677-691.
2. CHANOCK SJ, EL BENNA J, SMITH RM, BABIOR BM. The respiratory burst oxidase. *J Biol Chem* 1994; 269: 24.519-24.522.
3. SEGAL AW. The NADPH oxidase and chronic granulomatous disease. *Mol Med Today* 1996; March: 129-135.
4. ROSS D, DE BOER M, KURIBAYASHI F, MEISCHL C, WEENING RS, SEGAL AW, et al. Mutations in the X-linked and autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. *Blood* 1996; 87: 1.663-1.681.
5. ZHAN S, VAZQUEZ N, SHILI Z, WIENTJES FB, BUDARF ML, SCHROCK E, et al. Genomic structure, chromosomal localization, start of transcription, and tissue expression of the human p40-*phox*, a new component of the Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-oxidase complex. *Blood* 1996; 88: 2.714-2.721.
6. SATHYAMOORTHY M, DE MENDEZ I, ADAMS AG, LETO TL. P40-*phox* down-regulates NADPH oxidase activity through interactions with its SH3 domain. *J Biol Chem* 1997; 272: 9.141-9.146.
7. NAKAMURA R, SUMIMOTO H, MISUKI K, HATA K, AGO T, KITAJIMA S, et al. The PC motif: a novel and evolutionarily conserved sequence involved in interaction between p40-*phox* and p67-*phox*, SH3 domain-containing cytosolic factors of the phagocyte NADPH oxidase. *Eur J Biochem* 1998; 251: 583-589.
8. HEYWORTH PG, BOHL BP, BOKOCH GM, CURNUTTE JT. *Rac* translocate independently of the neutrophil oxidase components p47-*phox* and p67-*phox*. *J Biol Chem* 1994; 269: 30.749-30.756.
9. DUSSI S, DONI M, ROSSI F. Mechanism of NADPH oxidase activation in the human neutrophil: p67-*phox* is required for translocation of *rac-1* but not *rac-2* from cytosol to the membranes. *Biochem J* 1991; 308: 991-998.
10. LI SL, VALENTE AJ, ZHAO SJ, CLARK R. PU.1 is essential for p47-*phox* promoter activity in myeloid cell. *J Biol Chem* 1997; 272: 17.802-17.809.
11. EKLUND EA, SKALNIK DG. Characterization of a gp91-*phox* promoter element that is required for interferon gamma-induced transcription. *J Biol Chem* 1995; 270: 8.267-8.273.
12. LUO W, SKALNIK DG. CCAAT Displacement protein competes with multiple transcriptional activators for binding to four sites in the proximal gp91-*phox* promoter. *J Biol Chem* 1996; 271: 18.203-18.210.
13. EKLUND E, JALAVA A, KAKAR R, SHAW D. Characterization of the p67-*phox* promoter and description of a functional element homologous to an element in the gp91-*phox* promoter. *Blood* 1997; 90 (Supplement 1): 411a.
14. TANUGI-CHOLLEY LC, ISSARTEL JP, LUNARDI J, FREYCON F, MOREL F, VIGNAIS PV. A mutation located at 5' splice junction sequence of intron 3 in the p67-*phox* mRNA in a patient with chronic granulomatous disease. *Blood* 1995; 85: 242-249.
15. DE BOER M, HILARIU-STOKMAN PM, HOSSLE JP, VERHOEVCEN AJ, GRAF N, KENNEY RT, et al. 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: 531-536.
16. KENNEY RT, MALECH HL, EPSTEIN ND, ROBERTS RL, LETO TL. Characterization of the p67-*phox* gene: genomic organization and restriction fragment length polymorphism analysis for prenatal diagnosis in chronic granulomatous disease. *Blood* 1993; 82: 3.739-3.744.
17. PATIÑO PJ. Chronic granulomatous disease: a model to solve the NADPH oxidase puzzle. [Doctoral thesis]. Medellín, Colombia, University of Antioquia, 1997. 178 p.
18. MCPHAIL LC. SH3-dependent assembly of the phagocytes NADPH oxidase. *J Exp Med* 1994; 180: 2.011-2.015.
19. DE MENDEZ I, ADAMS AG, SOKOLIC RA, MALECH HL, LETO TL. Multiple SH3 domain interactions regulate NADPH oxidase assembly in the whole cell. *The EMBO J* 1996; 15: 1.211-1.220.
20. NUNOI H, IWATA M, TATSUZAWA S, ONOE Y, SHIMIZU S, KANEGASAKI S. AG Dinucleotide insertion in a patient with chronic granulomatous disease lacking cytosolic 67-kD protein. *Blood* 1995; 86: 329-333.
21. AOSHIMA M, NUNOI H, SHIMAZU M, SHIMAZU S, TATSUZAWA M, KENNEY RT, et al. Two-exon skipping due to a point mutation in p67-*phox*-deficient chronic granulomatous disease. *Blood* 1996; 88: 1.841-1.845.
22. BONIZZATO A, RUSSO MP, 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.
23. PATIÑO PJ, RAE J, ERICKSON R, DING J, GARCÍA DE O D, et al. Molecular characterization of autosomal recessive chronic granulomatous disease caused by a defect of the NADPH oxidase component p67-*phox*. 1998; sometido a consideración de *Blood*.