

## TRABAJO DE REVISIÓN

Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón"

# ENZIMAS GENERADORAS DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO: MIELOPEROXIDASA

*Lic. Onel H. García Morales, Dra. Nayade Pereira Roche y Dra. Rosa M. Flores Sánchez*

### RESUMEN

La defensa del organismo está mediada por las células del llamado sistema retículo endotelial, de las cuales los polimorfonucleares neutrófilos constituyen la primera línea de defensa inespecífica. La mieloperoxidasa es la proteína más abundante en los neutrófilos y es la única peroxidasa que cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno y cloruro a ácido hipocloroso. Este es un potente agente oxidante que contribuye al mecanismo de defensa contra los agentes infecciosos; sin embargo, puede ser capaz de actuar sobre las células del hospedero en caso de activación incontrolable o excesiva e inactivar factores humorales. Dado el amplio espectro de reactividad, el ácido hipocloroso es un mediador de daño hístico en numerosos procesos inflamatorios. Se presentan algunas características físico-químicas, el mecanismo de reacción, la biosíntesis y la relación de la enzima mieloperoxidasa con diferentes procesos patológicos.

Descriptores DeCS: PEROXIDASA/metabolismo; PEROXIDASA/química; NEUTROFILOS/enzimología; ESPECIES DE OXIGENO REACTIVO.

La mieloperoxidasa (MPO, peróxido de hidrógeno oxidorreductasa, EC 1.11.1.7.) es una enzima ampliamente distribuida en el organismo y sus fuentes fundamentales las constituyen los leucocitos (neutrófilos y monocitos) y los macrófagos a pesar de que ha sido aislada a partir de diferentes fluidos biológicos (saliva, líquido sinovial y semen, entre otros)<sup>1-3</sup> y también de diferentes tejidos (corazón, riñón, piel, hígado y placenta).<sup>4-8</sup> No obstante las fuentes más empleadas son los neutrófilos,

donde la enzima se encuentra localizada a nivel lisosomal, en los gránulos azurófilos. Constituye del 2-5 % de las proteínas del neutrófilo,<sup>9</sup> con una concentración en sangre humana normal de alrededor del 1 nM.<sup>10</sup>

Esta enzima fue aislada por primera vez por *Agner* en 1941, denominándola verdoperoxidasa.<sup>11</sup> Posteriormente en 1958, el propio *Agner* la purificó en forma cristalina y en 1977 *Harrison* tuvo igual resultado.<sup>12</sup>

## CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

La MPO es una glicoproteína tetramérica, constituida por 4 subunidades formando 2 homodímeros. Cada uno de ellos contiene una subunidad  $\alpha$  (pesada) de aproximadamente 59 kDa y una subunidad  $\beta$  (ligera) de aproximadamente 14 kDa. El peso molecular de la enzima se estima entre 130-150 kDa.<sup>13</sup> Las subunidades pesadas se unen a través de un enlace bisulfuro simple y a cada una de ellas se le une covalentemente un grupo prostético hemo.<sup>13,14</sup> Estas subunidades son las únicas glicosiladas y contienen entre 2-4 % de carbohidratos.<sup>13</sup>

Se reporta que esta proteína es fuertemente catiónica con un punto isoeléctrico mayor de 10 y su pH óptimo es de 5.<sup>5,11,13</sup>

El contenido de aminoácidos se caracteriza por presentar aproximadamente 1 150 residuos, que se corresponden con 573 aminoácidos cada homodímero. De ellos 466 forman la subunidad pesada y 107 la subunidad ligera.<sup>15</sup>

El patrón espectrofotométrico muestra un máximo de absorbancia a 430 nm, con otros picos a 375, 575, 620 y 690 nm.<sup>16</sup> Se reporta una relación de absorbancia 430/280 nm entre 0,80 y 0,87 para una solución de esta enzima pura.<sup>15,17,18</sup>

## MECANISMO DE REACCIÓN

Los neutrófilos contienen 4 formas de MPO, las cuales se denominan compuesto I, compuesto II, compuesto III y MPO nativa o férrica, con una similitud en su composición aminoacídica y actividad, así como en sus propiedades ópticas. No obstante se han observado diferencias en relación con la intensidad de absorción a 430 nm y 620 nm.<sup>17</sup> El sistema MPO-peróxido de

hidrógeno ( $H_2O_2$ ) - haluro ha sido un sistema bien estudiado (fig. 1).<sup>19-21</sup> La MPO reacciona con el  $H_2O_2$  proveniente de las células fagocitarias activadas por contacto con partículas extrañas, formando un complejo enzima-sustrato con una fuerte capacidad oxidativa (reacción 1). Este complejo se combina con el haluro, generalmente cloruro, que se oxida para formar el ácido hipocloroso (HOCl) (reacción 2). El compuesto I puede ser reducido a compuesto II por un exceso de  $H_2O_2$ . Por ejemplo, concentraciones mayores a 20  $\mu$ M lo transforma parcialmente y mayores de 200  $\mu$ M completamente, o por la presencia de un agente reductor ( $AH_2$ ) como por ejemplo el ditiotreitól, cisteína, glutatión y cisteamina (reacción 3). Este compuesto II, a pesar de ser bastante estable puede reducirse a MPO férrica en presencia de un agente reductor o el radical superóxido ( $O_2^-$ ) (reacción 4) o también puede oxidarse a compuesto III bajo concentraciones elevadas de  $H_2O_2$  (2-3 mM) (reacción 5). Por otra parte la MPO nativa puede ser oxidada por el  $O_2$  a oximieloperoxidasa (compuesto III) (reacción 6).

Además puede funcionar como genuina oxidasa (fig. 2), de tal forma que va a depender del oxígeno y no del  $H_2O_2$  como co-sustrato para la oxidación de compuestos.<sup>18</sup>

En presencia de un agente reductor (RSH), la enzima se reduce a la forma ferro, que se oxida en presencia de  $O_2$  para dar lugar al compuesto III que tiene capacidad oxidante.

El ácido hipocloroso (reacción 2) es un potente agente oxidante que si bien contribuye al mecanismo de defensa contra los agentes infecciosos, puede actuar sobre las células del hospedero lo que provocaría inactivación de  $\alpha$ -antiproteinasas, entrecruzamientos de proteínas y reacción

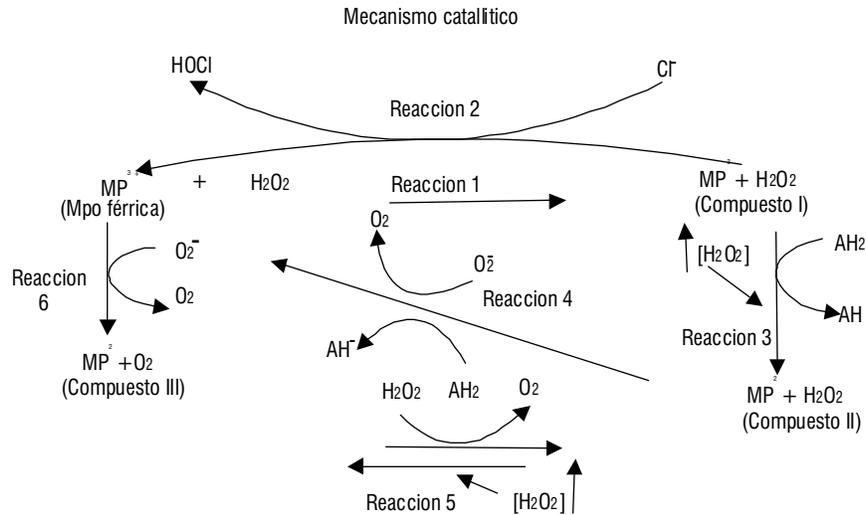


Fig. 1. Mecanismo de reacción de la mieloperoxidasa.

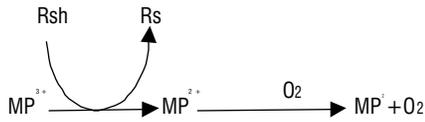
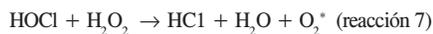


Fig. 2. Función oxidasa de la mieloperoxidasa.

con ácidos grasos insaturados para formar clorohidrinadas, las cuales pueden desestabilizar las membranas celulares. De aquí que el HOCl es un candidato a causar mucho del daño mediado por neutrófilos en enfermedades inflamatorias.<sup>19</sup> El HOCl puede reaccionar con otra molécula de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y dar lugar al oxígeno singlete (reacción 7) o reaccionar con aminas para formar las N-cloraminas que son altamente reactivas y presentan un largo tiempo de vida media (reacción 8).<sup>22</sup>



## INHIBIDORES

Se han reportado diferentes drogas como: la dapsona, benzocaína, primaquina y famotidina, las cuales inhiben a la MPO secuestrando a la enzima en forma de compuesto II;<sup>23-25</sup> por otro lado los antihipertensivos como la hidralacina, además de la indometacina y los salicilatos.<sup>26,27</sup> El cianuro y la azida de sodio también han sido reconocidos como inhibidores de la MPO, si bien no se conoce el mecanismo por el cual la inhiben.

## BIOSÍNTESIS

La biosíntesis de la MPO es un proceso complejo que incluye la formación de una pro-enzima a partir de una pre-pro-enzima. La enzima activa se obtiene a partir de la maduración de la pro-enzima,<sup>28</sup> que tiene lugar en los lisosomas, en la fase promielocítica de la diferenciación del neutrófilo.<sup>20</sup>



al grado de obstrucción de las vías respiratorias que presentan estos pacientes. La enzima por la vía de inactivación de la  $\alpha$ -1 antiproteasa contribuye a incrementar la actividad de la elastasa de los neutrófilos sobre la elastina pulmonar, la cual desempeña una importante función en la fisiopatología de la enfermedad.<sup>36,37</sup>

Con respecto al daño pulmonar en pacientes fumadores se reporta que en fumadores inveterados hay un incremento de ácidos grasos saturados libres que afectan el metabolismo oxidativo de los polimorfonucleares. Se produce un aumento de la actividad MPO y la producción de HOCl, con lo que se amplifica el daño oxidativo mediado por esta enzima en los pulmones.<sup>38</sup>

#### *Enfermedades del sistema circulatorio*

La MPO es capaz de generar especies reactivas que dañan lípidos y proteínas,<sup>39,40</sup> y parece contribuir a la aterogénesis a través de las reacciones oxidativas que ésta cataliza. El sistema MPO-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al tener como sustrato la L-tirosina produce el radical tirosilo, que es capaz de estimular la peroxidación lipídica. Esta peroxidación es vital para la transformación de las LDL en partículas aterogénicas.<sup>39</sup>

#### *Enfermedades del sistema digestivo*

Estudios en pacientes con cirrosis hepática y hepatitis crónica muestran niveles aumentados de MPO. Cuando se acompañan de esplenomegalia este ascenso es mayor. El incremento es siempre más evidente en la primera entidad. Lo anterior sugiere la función de la MPO en la fisiopatología del hiperesplenismo relacionado con estas enfermedades.<sup>41</sup>

#### *Enfermedades del sistema hemolinfopoyético*

La MPO se utiliza como índice de diferenciación entre las leucemias linfoblásticas y mieloblásticas, por el aumento de la enzima en estas últimas.<sup>42</sup>

En los pacientes sickléemicos se reportan aumentos significativos de MPO, con una correlación inversa a la concentración de hemoglobina, lo que sugiere que los polimorfonucleares y el sistema de complemento participan en los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad.<sup>43</sup>

Se ha encontrado que el sistema MPO-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Cl es capaz de inactivar las células infectadas por el HIV tipo 1.<sup>44</sup> En este mecanismo se utiliza el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> elaborado por las propias células infectadas sin necesidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno. En estudios *in vitro* se demostró que la actividad antiviral se logra a concentraciones bajas de MPO, concentraciones mayores resultan citotóxicas.

#### *Otras enfermedades*

La función de la MPO en la patogénesis de la catarata se demostró al evaluar el efecto de la MPO sobre el cristalino de animales viejos, en los cuales se produjo opacidad del lente.<sup>45</sup>

Los niveles de lipoperóxidos (LPO) y MPO en el vítreo de pacientes vitrectomizados con retinopatía diabética proliferativa se encuentran aumentados, lo cual sugiere que la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) y los mecanismos inflamatorios participan en la patogénesis de la enfermedad.<sup>46</sup> Estos niveles se encuentran elevados en la retina de pacientes con melanoma coroidal, lo que evidencia su relación con la retinopatía asociada al tumor.<sup>47</sup>

En los pacientes con trisomía 21 se encuentran bajos niveles de superóxido y una actividad reducida de MPO, por lo que se produ-

ce un desbalance en la producción de ERO en los neutrófilos de esos niños y hace que aumente el daño oxidativo en estos pacientes.<sup>48</sup>

## SUMMARY

Organism's defence is mediated by cells of the so-called reticuloendothelial system, of which, neutrophils polymorphonuclear, are the first line of nonspecific defense. Myeloperoxidase is the more abundant protein in neutrophils, and is the sole peroxidase catalysing hydrogen peroxide and chloride conversion to hypochlorous acid. This is a powerful oxidative agent leading to defense mechanism against infectious agents; however, is able to act on host cells in case of uncontrollable or excessive activation, and in the humoral factors inactivation. In view of the ample spectrum of reactivity, hypochlorous acid is a mediator of tissue damage in many inflammatory process. Authors present some physico-chemical features, mechanism of action, biosynthesis, and relation of myeloperoxidase with different pathologic process.

Subject headings: PEROXIDASE/ metabolism; PEROXIDASE/ chemistry; NEUTROPHILS/ enzymology; REACTIVE OXYGEN SPECIES.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Van Den Abbeele A, Pourtois M, Courtois P. Fluoride inhibition of SCN and Cl peroxidase activities in whole saliva and of recombinant myeloperoxidase. Influence of pH and hydrogen peroxide concentration. *J Biol Buccale* 1992;20:219-24.
2. Edwards SW, Hughes V, Barlow J, Bucknall R. Immunological detection of MPO in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *Biochem J* 1988;250(1):81-5.
3. Wolff H, Panhans A, Zebhauser M, Meurer M. Comparison of three methods to detect white blood cells in semen leukocyte esterase dipstick test granulocyte elastase enzymeimmunoassay, and peroxidase cytochemistry. *Fertil Steril* 1992;58(6):1260-2.
4. Karger S, Campo GM, Squadrito F, Ioculano M, Altavilla D, Zingarelli B, et al. Protective effects of IRFI-016, a new antioxidant agent in myocardial damage, following coronary artery occlusion and reperfusion in the rat. *Pharmacology* 1994;48:157-66.
5. Johnson R, Couser WG, Chi EY, Adler S, Klebanoff SJ. New mechanism for glomerular injury. *J Clin Invest* 1987;79(5):1379-87.
6. Bradley PP, Priebe PA, Christensen RD, Rothstein GR. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 1982;78:206-9.
7. Komatsu H, Koo A, Ghadishah E, Zeng H, Kuhlenkamp JF, Inova M. Neutrophil accumulation in ischemic reperfused rat liver evidence for a role of superoxide free radicals. *Am J Physiol* 1992;262(4 Pt 1):6669-76.
8. Joseph P, Srinivasan NS, Kulkarni AP. Placental peroxidase further purification of the enzyme and oxidation of thiobenzamide. *Placenta* 1993;14(3):309-19.
9. Márquez LA, Dunford HB, Wart HV. Kinetic studies on the reaction of compound II of myeloperoxidase with ascorbic acid. Role of ascorbic acid in myeloperoxidase function. *J Biol Chem* 1990;265(10):5666-70.
10. Svensson BE, Lindvall S. Myeloperoxidase-oxidase oxidation of cysteamine. *Biochem J* 1988;249(2):521-30.
11. Agner K. Myeloperoxidase. A ferment isolated from leukocytes. *Acta Physiol Scand* 1941;2(Suppl 8):1-62.
12. Harrison JE. The subunit structure of crystalline canine myeloperoxidase. *Biochim Biophys Acta* 1977;493:247-59.
13. Nauseef WM. Myeloperoxidase biosynthesis by a human promyelocytic leukemia cell line: insight into myeloperoxidase deficiency. *Blood* 1986;67(4):865-72.
14. Morishita Y, Morishima Y, Ogura M, Nagai Y, Ohno P. Biochemical characterization of human myeloperoxidase using three specific monoclonal antibodies. *Br J Haematol* 1986;63(3):435-44.

15. Iwamoto H, Morita Y, Kobayashi T, Hasegawa E. Subunit structures of three human myeloperoxidases. *J Biochem* 1988;103:688-92.
16. Deseer RK, Himmelhoch SR, Evans WH, Januska M, Mage M, Shelton E. Guinea pig heterophil and eosinophil peroxidase. *Arch Biochem Biophys* 1972;148(2):452-65.
17. Svensson BE, Dome K, Lindvall S, Rydell G. Peroxidase and peroxidase-oxidase activities of isolated human myeloperoxidases. *J Biochem* 1987;242:673-80.
18. Svensson BE. Myeloperoxidase oxidation states involved in myeloperoxidase-oxidase oxidation of thiols. *J Biochem* 1988;256:751-5.
19. Kettle AJ, Winterbourn CC. Assays for the chlorination activity of myeloperoxidase. *Methods in Enzymology* 1994;233:502-12.
20. ———. Superoxide modulates the activity of myeloperoxidase and optimizes the production of hypochlorous acid. *J Biochem* 1988;252:529-36.
21. Kettle AJ, Robertson IGG, Palmer BD, Anderson RF, Patel KB, Winterbourn CC. Oxidative metabolism of Amsacrine by the neutrophil enzyme myeloperoxidase. *Biochem Pharmacol* 1992;44(9):1731-8.
22. Domigan NM, Charlton TS, Duncan MW, Winterbourn CC, Kettle AJ. Chlorination of tyrosyl residues in peptides by myeloperoxidase and human neutrophils. *J Biol Chem* 1995;270(28):1-7.
23. Kettle AJ, Gedye CA, Winterbourn CC. Superoxide is an antagonist of antiinflammatory drugs that inhibit hypochlorous acid production by myeloperoxidase. *Biochem Pharmacol* 1993;45(10):2003-10.
24. Van Zyl JM. Mechanism by which clofazimine and dapsone inhibit the MPO system. A possible correlation with their antiinflammatory properties. *Biochem Pharmacol* 1991;42(3):599-608.
25. Zyl JM van, Kriegler A, Wält BJ van der. Anti-oxidant properties of H<sub>2</sub>-receptor antagonists effects on myeloperoxidase catalysed reactions and hydroxyl radical generation in a ferrous hydrogen peroxide system. *Biochem Pharmacol* 1993;45(12):2389-97.
26. Kettle AJ. Mechanism of inhibition of myeloperoxidase by antiinflammatory drugs. *Biochem Pharmacol* 1991;41(10):1485-92.
27. Nassberger L. The antihypertensive compounds hidralazine, dihydralazine and cadralazine and their metabolites inhibit MPO activity as measured by chemiluminescence. *Biochem Pharmacol* 1991;42(9):1844-7.
28. Nauseef WM, Mc Cormick S, Yi H. Roles of hemo insertion the manose-6-phosphate receptor in processing of the human myeloid lysosomal enzyme, myeloperoxidase. *Blood* 1992;80(10):2622-33.
29. Simpson PJ, Fantone JC. Identification of a time window for therapy to reduce experimental canine myocardial injury. *Circulation Res* 1988;63(6):1070-9.
30. Nalini S, Mathan MM, Balasubramanian KA. Oxygen free radical induced damage during intestinal ischemia/reperfusion in normal and Xanthine oxidase deficient rats. *Mol Cell Biochem* 1993;124(1):59-66.
31. Wilson IC, Gardner TJ, Dinatale JM, Gillinov AM, Curtis WE, Cameron DE. Temporary leukocyte depletion reduces ventricular dysfunction during prolonged posts ischemic reperfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993;106(5):805-10.
32. Peralta JG, Llesuy S, Evelson P, Carreras MC, Flecha BG, Poderoso JJ. Oxidative stress in skeletal muscle during sepsis in rats. *Circ Shock* 1993;39(2):153-9.
33. Junger WG, Cardoza TA, Liu FC, Hoyt DB, Goodwin R. Improved rapid photometric assay for qualitative measurement of PMN migration. *J Immunol Methods* 1993;160:73-9.
34. Over C, Yamalik N, Yavuzylmaz E, Ersoy F, Eratalay K. Myeloperoxidase activity in peripheral blood, neutrophil crevicular fluid and whole saliva of patients with periodontal disease. *J Nihon Univ Sch Dent* 1993;35(4):235-40.
35. Venge P. Eosinophil activity in bronchial asthma. *Allergy Proc* 1994;15(3):139-41.
36. Meyer KC, Zimmerman J. Neutrophil mediators. Pseudomonas and pulmonary dysfunction in cystic fibrosis. *J Lab Clin Med* 1993;121(5):654-61.
37. Koller DY, Gotz M, Eichler I, Urbanek R. Eosinophil activation in cystic fibrosis. *Thorax* 1994;49(5):496-9.
38. Quian M, Eaton JW. Free fatty acids enhance hypochlorous acid production by activated neutrophils. *J Lab Clin Med* 1994;124(1):86-95.
39. Savenkova ML, Mueller DM, Heinecke JW. Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase is a physiological catalyst for the initiation of lipid peroxidation in low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1994;269(32):20394-400.
40. Heinicke JW, Li W, Fracis GA, Goldstein JA. Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase catalyzes the oxidative cross-linking of proteins. *J Clin Invest* 1993;91(6):2866-72.
41. Nakamuta M, Ohashi M, Tanabe Y, Hiroshige K, Nawata H. High plasma concentration of myeloperoxidase in cirrhosis: a possible marker of hypersplenism. *Hepatology* 1993;18(6):1377-83.

42. Schlaifer D, Cooper MR, Attal M, Sartor AO, Trepel JB, Laurent G, et al. MPO: an enzyme involved in intrinsic vincristine resistance in human myeloblastic leukemia. *Blood* 1993;81(2):482-9.
43. Mohamed AO, Hashim MS, Nilsson UR, Venge P. Increased in vivo activation of neutrophils and complement in sickle cell disease. *Am J Trop Med Hyg* 1993;49(6):799-803.
44. Chochola J, Yamaguchi Y, Moquilevsky N, Bollen A, Strosberg AD, Stanislawski M. Virocidal effect of myeloperoxidase in an human immunodeficiency type 1-infected T cells. *Antimicrob Agent Chemother* 1994;38(5):969-72.
45. Iugai MT, Formaziuk VE, Sergienko VI, Riabtseva AA, Romashova MP. The role of Myeloperoxidase, a product of the polymorphonuclear leukocytes, in the pathogenesis of cataract. *Biull Eksp Biol Med* 1992;114(10):364-6.
46. Augustin AJ, Boker J, Breipohl W. Increased lipid peroxide levels and myeloperoxidase activity in the vitreous of patients suffering from proliferative diabetic retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1993;231(11):647-50.
47. \_\_\_\_\_. Increased lipid peroxidase and inflammatory parameters in the retina adjacent to choroidal melanoma. *Br J Ophthalmol* 1994;78(2):130-2.
48. Gabianelli R, Kantar A, Oggiano N, Fiorini R, Falcioni G, Giorgi PL. Oxidative metabolism in polymorphonuclear granulocytes of children with trisomy 21. *Minerva Pediatr* 1993;45(12):493-7.

Recibido: 26 de junio de 1997. Aprobado: 30 de octubre de 1997.

Lic. *Onel H. García Morales*. Instituto Superior de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón". Ave 146 y 31 No. 3102, Playa, La Habana 16, CP 11600, Cuba.