



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y
BIOLOGÍA MOLECULAR

DOCTORADO EN FISIOPATOLOGÍA Y
FARMACOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

**p22^{phox} y NADPH oxidasas en
la hematopoyesis *in vivo***

Rodrigo Prieto Bermejo
Salamanca, 2020



VNIVERSIDAD
SALAMANCA
CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



D. **ÁNGEL HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ**, Profesor Titular de Universidad del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca,

CERTIFICA:

Que la presente Memoria de Tesis Doctoral, titulada “**p22^{phox} y NADPH oxidasas en la hematopoyesis *in vivo***” y presentada por **D. Rodrigo Prieto Bermejo** para optar al Grado de Doctor en Fisiopatología y Farmacología, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca.

Considerando que la Tesis Doctoral se halla concluida, autorizo su presentación para que sea evaluada por el Tribunal correspondiente.

Y, para que así conste, firmo el presente documento en Salamanca, a 29 de Julio de 2020.

HERNANDEZ Firmado
HERNANDEZ digitalmente por
HERNANDEZ ANGEL -
ANGEL - 07955380W
07955380W Fecha: 2020.07.30
09:28:34 +02'00'

Fdo: Ángel Hernández Hernández



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA
CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



D. RODRIGO PRIETO BERMEJO, Graduado en Farmacia y Máster en Fisiopatología y Farmacología Celular y Molecular por la Universidad de Salamanca,

DECLARA:

Que es autor de la presente Tesis Doctoral, titulada “**p22^{phox} y NADPH oxidasas en la hematopoyesis *in vivo***”, realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca bajo la dirección del Profesor **Dr. Ángel Hernández Hernández**.

Y, para que así conste, firmo el presente documento en Salamanca, a 29 de Julio de 2020.

PRIETO
BERMEJO
RODRIGO -
71155491T

Firmado digitalmente
por PRIETO BERMEJO
RODRIGO - 71155491T
Fecha: 2020.07.29
20:46:40 +02'00'

Fdo: Rodrigo Prieto Bermejo

NOTA PRELIMINAR

El trabajo de investigación detallado en el presente manuscrito ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad, en base al proyecto “Estudio de la regulación de la hematopoyesis y del metabolismo de las células leucémicas mediante señalización redox” (BFU2014-56490-R), y por la Fundación Ramón Areces, en base al proyecto “NADPH oxidasas y regulación del metabolismo intermediario de las células leucémicas: búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas” (CIV17A2822).

Durante la realización del trabajo, el autor ha sido financiado por la Junta de Castilla y León y el Fondo Social Europeo, en base a una de las “Ayudas destinadas a la contratación predoctoral de personal investigador, cofinanciadas por el Fondo Social Europeo” (ORDEN EDU/1083/2013, del 27 de Diciembre de 2013).

Los resultados descritos a continuación han sido parcialmente publicados en el siguiente artículo:

Prieto-Bermejo R, Romo-González M, Pérez-Fernández A, García-Tuñón I, Sánchez-Martín M, Hernández-Hernández Á. “Cyba-deficient mice display an increase in hematopoietic stem cells and an overproduction of immunoglobulins”. *Haematologica* 2020; Online ahead of print. doi: 10.3324/haematol.2019.233064

AGRADECIMIENTOS

Parecía que no iba a llegar, el tiempo se ha ido alargando y alargando sin parar, pero por fin comienzo la que es verdaderamente la última parte de mi tesis, escribir los agradecimientos. Puede parecer algo sencillo de hacer en comparación con todo el trabajo realizado, pero los que me conocéis ya sabéis que nunca he destacado en el arte de la locución y la expresividad.

Lo primero de todo, por supuesto, he de agradecer a Ángel todo lo que ha hecho por mí. Me abriste la puerta del laboratorio sin ningún tipo de referencia, y te volcaste en enseñarme directamente tú mucho de lo que aprendí durante los primeros años. Pero no solo eso, apostaste para que me quedara e hiciste todo lo que estuvo en tu mano para poder aportarme financiación mientras se resolvían (no una, sino dos veces, gracias a los errores tipográficos...) las convocatorias de contratos de investigación, y también tras concluir mi contrato, para poder terminar lo que nos quedaba en marcha. Además, eres una persona trabajadora, que se enfunda la bata y se pone a hacer experimentos como cualquiera de nosotros en cuanto puede, se nota que vives por y para la ciencia, y a pesar de que la investigación en este país esté tan ninguneada y no dejen de ponerte piedras en el camino, no cejas en tu empeño, te levantas y vuelves a pelear. Gracias por ese gran espíritu de esfuerzo.

En segundo lugar, he de agradecer su ayuda a todos mis compañeros del laboratorio, sin los que no hubiera podido realizar todo este trabajo, y es que, como he podido comprobar durante este tiempo, los experimentos *in vivo* no esperan a nadie, y un par de manos nunca son suficientes para todo lo que uno quiere hacer. Muchas gracias a Guiller y a Bea que, aunque quede ya muy lejos, me acogisteis en el laboratorio y me aguantasteis mucho tiempo observando a vuestro lado cada cosa que hacíais, pero aun así me recibíais con un buen comentario y una sonrisa. Gracias por vuestras charlas, vuestros consejos y filosofía de vida, de la que siempre hay algo enriquecedor que aprender. Después llegó el alboroto, y es que en un par de años el laboratorio aumentó mucho sus filas. Alex, Marta y Carla (auténticos motores de laboratorio) llegaron para dar vidilla al día a día, y junto con Nere (nuestro miembro en la sombra, buenísima persona) y Violeta (el gran fichaje, que te hiciste rápidamente imprescindible en todos los sentidos) formamos una pequeña familia disfuncional. Por supuesto, gracias por las veces que me

habéis echado una mano con los experimentos, que no han sido pocas, pero desde luego muchas más gracias por todo lo que no tenía que ver con ellos. Por la hora del café, por la hora de comer, por los ratos “deportivos”, por los “lunes de”, por las escapadas, las vacaciones, las visitas... ¡por todo lo que se nos ha ocurrido! Lo bueno nunca dura para siempre, y menos en profesiones con tanto movimiento y poco tiempo libre como esta, pero agradezco mucho haber coincidido con vosotros, todo lo que hemos disfrutado juntos, y lo que aún podemos seguir disfrutando de vez en cuando. Por último, gracias también al resto de personas que habéis ido pasando por el laboratorio para realizar prácticas, trabajos de grado o de máster, técnicos y demás gente con la que he coincidido menos tiempo, que por lo general siempre habéis tendido una mano cuando se os ha solicitado.

Fuera del laboratorio también hay personas que han puesto su granito de arena para poder sacar adelante este proyecto. Quiero agradecer a Manuel su ayuda indispensable con los modelos animales y con su mantenimiento, y por siempre estar disponible para todas las dudas y decisiones importantes con ellos, sin ti habría sido muy difícil llevar a cabo este trabajo. A Laura, por ser un gran apoyo en el animalario, siempre dispuesta a ayudar y a enseñarme, y a Javier, por responder siempre tan rápido y en cualquier momento a mis correos y nunca decir que ese día no podías. También agradezco al personal del Servicio de Citometría, M^a Luz, Paloma y Sheila, vuestra disponibilidad y facilidades siempre que tenía experimentos, y a Álvaro la mano que nos echaste con los experimentos de radiactividad.

Quiero dar las gracias también al resto de miembros del Departamento de Bioquímica que han compartido piso conmigo en el edificio, Pablo, Isabel, Marcial, Jesús, Carmen, Enrique, con vosotros he pasado ratos agradables en el café de vez en cuando, y siempre que he ido a pedir materiales o ayuda lo habéis hecho de muy buen grado. Además, quiero agradecer en especial su amabilidad y compañía a Fer, con quien a raíz de los tableros surgió una buena relación de amistad de la que disfruto enormemente, contigo siempre hay algo de lo que hablar y el tiempo se pasa volando. También agradezco a Javier, Tomi y Victoria su buen hacer y la ayuda que me han prestado cuando la he necesitado.

Por otro lado, en un ambiente ya totalmente fuera de lo profesional, quiero agradecer el punto de referencia que siempre suponen mis amigos, los de toda la

vida, un refugio aislado de todo lo que tenga que ver con este trabajo, y que por ello precisamente me ha ayudado mucho a resetear y renovar fuerzas de vez en cuando. Sé que no os visito todo lo que debería, pero, para ser justos, ¡vosotros a mí tampoco!

A Marta, ... ¿qué no agradecer a Marta? Una persona buena, sensible, luchadora y justa como ninguna otra que conozca, que de la noche a la mañana se convirtió en amiga, consejera, compañera a tiempo completo, en alguien que realmente me conoce y me entiende, y sobre todo que me aguanta. Gracias por llenar mi vida con palabras, abrazos, canciones, risas, bailes, siestas, viajes, animales, ... y, por qué no, lágrimas. En definitiva, gracias por tu tiempo, por decidir malgastarlo conmigo. Quiero agradecer también a tu familia que desde el primer momento me han tratado como uno más, haciéndome sentir como si estuviera en casa en Salamanca.

Por último, al final siempre quedan los mismos, la propia familia, los que se llevan contigo más alegrías, pero también más penas. Quiero agradeceros toda la compañía, el apoyo y la confianza que he sentido gracias a vosotros. De mis hermanas, Eloísa, que eres todo corazón, cariño y generosidad, una pequeña luz entre las personas que verdaderamente merece la pena tener a tu lado, y Celeste, mi otra mitad, que contigo he tenido un entendimiento especial por nuestro carácter tan parecido, aunque eso nos haya hecho discutir también mucho, pero para mí siempre serás un clarísimo ejemplo de trabajo y esfuerzo. Cómo envidio no tener un poquito más de vosotras. Y por supuesto, de mis padres, Alberto y Consuelo, a los que quiero agradeceros que nunca hayáis dudado de mis decisiones, nunca he recibido un *pero* ni un *¿por qué?* cuando he querido emprender los caminos que me han llevado hasta aquí, a pesar de que no supierais a dónde llevaba o pudiera suponer un importante desembolso económico para la familia. Pero más aún os agradezco todos los valores y educación que nos habéis brindado, seguramente no hemos sido fáciles de llevar, pero habéis creado un hogar perfecto para nosotros. Me siento muy orgulloso de todos vosotros.

A todos, mil gracias.



Í
N
D
I
C
E

INDICE	i
INDICE DE FIGURAS	vii
ABREVIATURAS	xv
INTRODUCCION	1
I.1 – ROS	3
I.2 – Defensas antioxidantes	4
I.3 – Origen de las ROS	7
I.4 – Señalización redox	10
I.4.A – Oxidación de residuos cisteína	11
I.4.B – Oxidación de residuos metionina	15
I.4.C – Oxidación de residuos tirosina y triptófano	17
I.4.D – Relación ROS y calcio en señalización	18
I.5 – NADPH oxidasas	21
I.5.A – Subunidades proteicas	24
p22 ^{phox}	24
p47 ^{phox} y NoxO1	25
p67 ^{phox} y NoxA1	25
p40 ^{phox}	26
DuoxA1 y DuoxA2	26
Rac	26
I.5.B – Localización subcelular	27
I.5.C – Nox2	28
Funciones conocidas	29
Patologías en las que interviene	30
I.5.D – Nox1	31
Funciones conocidas	32
Patologías en las que interviene	33
I.5.E – Nox3	34
Funciones conocidas	35
Patologías en las que interviene	35
I.5.F – Nox4	36
Funciones conocidas	37
Patologías en las que interviene	38
I.5.G – Nox5	39

Funciones conocidas	40
Patologías en las que interviene	40
I.5.H – Duox1/2	41
Funciones conocidas	42
Patologías en las que intervienen	42
I.6 – Hematopoyesis	43
I.6.A – ROS y hematopoyesis	49
I.6.B – NADPH oxidasas y hematopoyesis	52
OBJETIVOS	57
MATERIALES Y MÉTODOS	63
MyM.1 – Materiales	65
MyM.1.A – Reactivos	65
MyM.1.B – Soluciones de trabajo	66
MyM.1.C – Anticuerpos y compuestos utilizados en citometría	67
MyM.1.D – Anticuerpos de western blot	68
MyM.1.E – Aparataje	69
MyM.1.F – Herramientas informáticas	70
MyM.2 – Técnicas experimentales	71
MyM.2.A – Animales	71
Generación del modelo ES <i>Cyba</i> ^{-/-}	71
Generación del modelo CR <i>Cyba</i> ^{-/-}	73
MyM.2.B – Obtención de muestras de ratones	74
MyM.2.C – Extracción de ARN	76
MyM.2.D – Síntesis del ADN copia (retrotranscripción)	77
MyM.2.E – PCR a Tiempo Real o cuantitativa (qPCR)	77
MyM.2.F – Extracción de ADN genómico	79
MyM.2.G – PCR convencional	79
MyM.2.H – Electroforesis en gel de agarosa	81
MyM.2.I – Southern blot	82
MyM.2.J – Obtención de extractos celulares proteicos y valoración	85
MyM.2.K – Análisis de las vías de señalización mediante WB	86
MyM.2.L – Análisis morfológico de los bazos	87
MyM.2.M – Citometría de flujo	88
Marcaje de poblaciones celulares	88
Niveles de ROS intracelulares	89

Proliferación celular <i>in vivo</i> mediante BrdU	90
Viabilidad celular	90
MyM.2.N – Niveles de ROS extracelulares	91
MyM.2.O – Ensayos de formación de colonias	91
MyM.2.P – Análisis transcriptómico (<i>RNAseq</i>)	92
MyM.2.Q – Concentración sérica de inmunoglobulinas	93
MyM.2.R – Trasplante de médula ósea en ratones	93
MyM.2.S – Análisis estadístico	94
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	97
RyD.1 – Expresión de NADPH oxidasas en células Lin⁻	99
RyD.2 – Generación de modelos de ratón deficientes en el gen <i>Cyba</i>	100
RyD.3 – Hematopoyesis <i>in vivo</i> en ausencia de p22^{phox}	107
RyD.3.A – Influencia del nicho celular sobre los resultados de los modelos <i>Cyba</i> ^{-/-}	111
RyD.3.B – Capacidad de proliferación de las HSCs <i>Cyba</i> ^{-/-}	113
RyD.3.C – Capacidad clonogénica de las células <i>Cyba</i> ^{-/-}	114
RyD.4 – Análisis transcriptómico de células Lin⁻ <i>Cyba</i>^{-/-}	116
RyD.5 – Otras vías de señalización hematopoyéticas alteradas en células de médula ósea <i>Cyba</i>^{-/-}	128
RyD.6 – Capacidad de repoblación de la hematopoyesis <i>in vivo</i> mediante trasplante competitivo de médula ósea <i>Cyba</i>^{-/-}	134
RyD.6.A – Capacidad de repoblación de la hematopoyesis a largo plazo mediante trasplante secundario de médula ósea <i>Cyba</i> ^{-/-}	141
RyD.7 – Capacidad de repoblación de la hematopoyesis <i>in vivo</i> mediante trasplante competitivo de médula ósea de ratones <i>Nox1</i>^{-/-}, <i>Cybb</i>^{-/-} o <i>Nox4</i>^{-/-}	145
RyD.7.A – Capacidad de repoblación de la hematopoyesis a largo plazo mediante trasplante secundario de médula ósea <i>Nox1</i> ^{-/-} , <i>Cybb</i> ^{-/-} o <i>Nox4</i> ^{-/-}	149
RyD.8 – Inhibición farmacológica de la actividad NADPH oxidásica como tratamiento para mejorar la regeneración hematopoyética en trasplantes de médula ósea	153
CONCLUSIONES	159
REFERENCIAS	163

Í
N
D
I
C
E

D
E
F
I
G
U
R
A
S

Figura 1- Conexiones entre las principales ROS fisiológicas	4
Figura 2- Puntos de interacción de los principales sistemas antioxidantes con las ROS	6
Figura 3- Cadena transportadora de electrones mitocondrial	8
Figura 4- Fuentes de ROS mitocondriales	9
Figura 5- Red de modificaciones por oxido-reducción de la cisteína	12
Figura 6- Red de modificaciones por oxido-reducción de la metionina	15
Figura 7- Relación entre las ROS y el calcio celulares	19
Figura 8- Estructura básica de la región catalítica de las NADPH oxidasas	22
Figura 9- Mapa estructural de la región catalítica de NADPH oxidasas	23
Figura 10- Localización subcelular de las diferentes NADPH oxidasas	28
Figura 11- Complejo activo completo de Nox2	29
Figura 12- Complejo activo completo de Nox1	32
Figura 13- Complejo activo completo de Nox3	34
Figura 14- Complejo activo completo de Nox4	36
Figura 15- Estructura activa de Nox5	39
Figura 16- Complejo activo completo de Duox1/Duox2	41
Figura 17- Modelo jerárquico tradicional de hematopoyesis	44
Figura 18- Modelo jerárquico de hematopoyesis más actualizado	46
Figura 19- Modelo de hematopoyesis de flujo continuo	48
Figura 20- Evolución de los niveles de ROS con el proceso de maduración celular	49
Figura 21- Modelo de nicho celular hematopoyético	51
Figura 22- Inserción de las células ES modificadas en el gen <i>Cyba</i>	72
Figura 23- Esquema de la inserción del modelo CR <i>Cyba</i> ^{-/-}	74
Figura 24- Esquema de las PCRs realizadas para la comprobación génica del modelo ES <i>Cyba</i> ^{-/-}	80
Figura 25- Esquema de las PCRs realizadas para la comprobación génica del modelo CR <i>Cyba</i> ^{-/-}	81
Figura 26- Esquema del diseño de southern blot realizado para la comprobación génica del modelo ES <i>Cyba</i> ^{-/-}	82
Figura 27- Ejemplo de marcaje para el análisis de las poblaciones de células Lin ⁻	89
Figura 28- Expresión de NADPH oxidasas en células Lin ⁻ de ratón	100
Figura 29- Genotipado de los ratones ES <i>Cyba</i> ^{-/-} modificados genéticamente	101

Figura 30- Medida de la formación de ROS por NADPH oxidasas en granulocitos de ratones ES <i>Cyba</i> ^{-/-}	102
Figura 31- Esplenomegalia de los bazo de ratones ES <i>Cyba</i> ^{-/-}	104
Figura 32- Genotipado de los ratones CR <i>Cyba</i> ^{-/-} modificados genéticamente	105
Figura 33- Medida de la formación de ROS por NADPH oxidasas en granulocitos de ratones CR <i>Cyba</i> ^{-/-}	106
Figura 34- Análisis de las poblaciones celulares hematopoyéticas maduras en ratones ES <i>Cyba</i> ^{-/-} y CR <i>Cyba</i> ^{-/-}	108
Figura 35- Análisis de las HSPCs en ratones ES <i>Cyba</i> ^{-/-} y CR <i>Cyba</i> ^{-/-}	109
Figura 36- Resumen de los efectos sobre la hematopoyesis <i>in vivo</i> de los modelos de ratón <i>Cyba</i> ^{-/-}	111
Figura 37- Análisis de las HSPCs en ratones trasplantados con médula ósea ES <i>Cyba</i> ^{-/-}	112
Figura 38- Análisis de la proliferación celular de HSPCs <i>Cyba</i> ^{-/-} mediante incorporación de BrdU <i>in vivo</i>	114
Figura 39- Ensayos de formación de colonias (CFU)	115
Figura 40- Análisis transcriptómico de células Lin ⁻ de ratones <i>Cyba</i> ^{-/-}	117
Figura 41- Niveles de inmunoglobulinas en ratones <i>Cyba</i> ^{-/-}	119
Figura 42- Etapas finales de la diferenciación de células B	120
Figura 43- qPCR del gen <i>Cybb</i> en células Lin ⁻ de ratones <i>Cyba</i> ^{-/-}	123
Figura 44- Red del análisis funcional de procesos alterados con los resultados del <i>RNAseq</i> de células Lin ⁻ de ratones <i>Cyba</i> ^{-/-}	124
Figura 45- Red del análisis funcional de vías alteradas con los resultados del <i>RNAseq</i> de células Lin ⁻ de ratones <i>Cyba</i> ^{-/-}	125
Figura 46- Análisis del estado de activación de Akt en médula ósea de ratones <i>Cyba</i> ^{-/-}	126
Figura 47- Análisis del estado de activación de varias vías de señalización en médula ósea de ratones <i>Cyba</i> ^{-/-}	128
Figura 48- Análisis de los niveles de STAT5 en médula ósea y bazo de ratones <i>Cyba</i> ^{-/-}	129
Figura 49- Análisis de los niveles de MYC en médula ósea y bazo de ratones <i>Cyba</i> ^{-/-}	131
Figura 50- Esquema del modelo de trasplante de médula ósea competitivo	134
Figura 51- Análisis de la evolución de células CD45.1 ⁺ tras el trasplante competitivo con células <i>Cyba</i> ^{-/-}	135

Figura 52- Análisis de las poblaciones celulares hematopoyéticas generadas por las células CD45.1 ⁺ tras el trasplante competitivo de células <i>Cyba</i> ^{-/-}	136
Figura 53- Análisis de las HSPCs generadas por las células CD45.1 ⁺ tras el trasplante competitivo de células <i>Cyba</i> ^{-/-}	137
Figura 54- Análisis de la evolución de células CD45.1 ⁺ tras el trasplante competitivo con células ES <i>Cyba</i> ^{+/+} y <i>Cyba</i> ^{-/-}	138
Figura 55- Análisis de las poblaciones celulares hematopoyéticas generadas por las células CD45.1 ⁺ tras el trasplante competitivo de células ES <i>Cyba</i> ^{+/+} y <i>Cyba</i> ^{-/-}	138
Figura 56- Análisis de las HSPCs generadas por las células CD45.1 ⁺ tras el trasplante competitivo de células ES <i>Cyba</i> ^{+/+} y <i>Cyba</i> ^{-/-}	139
Figura 57- Expresión relativa de <i>Cxcr4</i> en el análisis <i>RNAseq</i> de células Lin ⁻ de ratones <i>Cyba</i> ^{-/-}	140
Figura 58- Esquema del modelo de trasplante de médula ósea secundario competitivo	142
Figura 59- Análisis de la evolución de células CD45.1 ⁺ tras el trasplante secundario con células ES <i>Cyba</i> ^{+/+} y <i>Cyba</i> ^{-/-}	142
Figura 60- Análisis de las poblaciones celulares hematopoyéticas generadas por las células CD45.1 ⁺ tras el trasplante secundario de células ES <i>Cyba</i> ^{+/+} y <i>Cyba</i> ^{-/-}	143
Figura 61- Análisis de las HSPCs generadas por las células CD45.1 ⁺ tras el trasplante secundario de células ES <i>Cyba</i> ^{+/+} y <i>Cyba</i> ^{-/-}	144
Figura 62- Análisis de la evolución de células CD45.2 ⁺ tras el trasplante competitivo con células <i>Nox1</i> ^{-/-} , <i>Cybb</i> ^{-/-} o <i>Nox4</i> ^{-/-}	146
Figura 63- Análisis de las poblaciones celulares hematopoyéticas generadas por las células CD45.2 ⁺ tras el trasplante competitivo con células <i>Nox1</i> ^{-/-} , <i>Cybb</i> ^{-/-} o <i>Nox4</i> ^{-/-}	147
Figura 64- Análisis de las HSPCs generadas por las células CD45.2 ⁺ tras el trasplante competitivo con células <i>Nox1</i> ^{-/-} , <i>Cybb</i> ^{-/-} o <i>Nox4</i> ^{-/-}	149
Figura 65- Análisis de la evolución de células CD45.2 ⁺ tras el trasplante secundario con células <i>Nox1</i> ^{-/-} , <i>Cybb</i> ^{-/-} o <i>Nox4</i> ^{-/-}	150
Figura 66- Análisis de las HSPCs generadas por las células CD45.2 ⁺ tras el trasplante secundario con células <i>Nox4</i> ^{-/-}	151
Figura 67- Esquema del modelo de trasplante de médula ósea utilizado para evaluar el tratamiento con DPI	154

Figura 68- Análisis de las células utilizadas para el trasplante competitivo de médula ósea tratada con DPI	155
Figura 69- Análisis de la evolución de células CD45.1 ⁺ tras el trasplante competitivo de células tratadas con DPI	155
Figura 70- Análisis de la evolución de células CD45.1 ⁺ tras el trasplante secundario de células tratadas con DPI	156
Figura 71- Esquema del segundo modelo de trasplante de médula ósea utilizado para evaluar el tratamiento con DPI	157
Figura 72- Análisis de la evolución de células CD45.1 ⁺ tras el segundo modelo de trasplante competitivo de células tratadas con DPI	157
Tabla 1- Proteínas reguladas por oxidación a ácido sulfénico de alguno de sus residuos cisteína	13

A
B
R
E
V
I
A
T
U
R
A
S

7-AAD: 7-aminoactinomicina D

BrdU: Bromodesoxiuridina

CaM: Calmodulina

CaMKII: Quinasa II dependiente de calmodulina

Cas9 (*CRISPR associated protein 9*): Proteína asociada a CRISPR 9

CFU (*Colony-forming unit*): Unidad formadora de colonias

CGD (*Chronic granulomatous disease*): Enfermedad granulomatosa crónica

CLPs (*Common lymphoid progenitors*): Progenitores linfoides comunes

CMPs (*Common myeloid progenitors*): Progenitores mieloides comunes

CRAC (*Calcium-release-activated calcium*): Liberación de calcio activada por calcio

CRISPR (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*): Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas

DCF: Diclorofluoresceína

DCFDA: Diacetato de 2,7-dihidrodiclorofluoresceína

DMSO: Dimetilsulfóxido

DPI (*Diphenyliodonium*): Difenileniodonium

Duox (*Dual oxidases*): Oxidasas dobles

ETC (*Electron transport chain*): Cadena transportadora de electrones

GMPs (*Granulocyte-monocyte progenitors*): Progenitores de granulocitos-monocitos

GPx: Glutatión peroxidasa

GR: Glutatión reductasa

GSH: Glutatión reducido

HPCs (*Hematopoietic progenitor cells*): Células progenitoras hematopoyéticas

HRP (*Horseradish peroxidase*): Peroxidasa de rábano

HSCs (*Hematopoietic stem cells*): Células madre hematopoyéticas

HSPCs (*Hematopoietic stem and progenitor cells*): Células madre y progenitoras hematopoyéticas

IP₃R (*Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor*): Receptor de inositol trifosfato

LDCCs (*Ligand-dependent calcium channels*): Canales de calcio dependientes de ligando

Lin⁻ (*Lineage negative cells*): Células linaje negativas

LKs: Células Lin⁻ Sca-1⁻ c-Kit⁺ (marcaje equivalente a HPCs)

LMPPs (*Lymphoid-primed multipotent progenitors*): Progenitores multipotentes comprometidos a linfoides

LSKs: Células Lin⁻ Sca-1⁺ c-Kit⁺ (marcaje equivalente a HSCs)

LT-HSCs (*Long-term HSCs*): Células madre hematopoyéticas de largo plazo

MEPs (*Megakaryocyte-erythrocyte progenitors*): Progenitores de megacariocitos-eritrocitos

MO: Médula ósea

MPPs (*Multipotent progenitors*): Progenitores multipotentes

MSCs (*Mesenchymal-stromal cells*): Células madre mesenquimales del estroma

Msrs: Metionina sulfóxido reductasas

NAC: N-acetilcisteína

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NCX (*Sodium(Na)-calcium exchanger*): Intercambiadores de sodio/calcio

NOS: Óxido nítrico sintasa

Nox: NADPH oxidasas

PBS (*Phosphate-buffered saline*): Tampón fosfato salino

phox (*phagocyte oxidase*): Oxidasa de fagocitos

PKA: Proteína quinasa A

PKC: Proteína quinasa C

PMA: Forbol(*Phorbol*) 12-**miristato**-13-**acetato**

PMCA: ATPasas de calcio de **m**embrana **p**lasmática

Prxs: Peroxirredoxinas

PTPs: Proteína tirosina fosfatasas

RE: Retículo endoplásmico

RNAseq (*RNA sequence*): Secuenciación de ARN

RONS (*Reactive oxygen and nitrogen species*): Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno

ROS (*Reactive oxygen species*): Especies reactivas de oxígeno

RyR (*Ryanodine receptor*): Receptor de rianodina

SERCA: ATPasa de calcio del retículo endoplásmico/sarcoplásmico

SOCCs (*Store-operated calcium channels*): Canales de calcio dependientes de depósito

SOD: Superóxido dismutasa

SP: Sangre periférica

Srx: Sulfirredoxina

ST-HSCs (*Short-term HSCs*): Células madre hematopoyéticas de corto plazo

Tks4 / Tks5 (*Tyrosine kinase substrate with 4 / 5 SH3 domains*): Proteína sustrato de tirosina quinasa con 4 / 5 dominios SH3

TrxR: Tiorredoxina reductasa

Trxs: Tiorredoxinas

VDCCs (*Voltage-dependent calcium channels*): Canales de calcio dependientes de voltaje

vSMCs (*Vascular smooth muscle cells*): Células de músculo liso vascular

vWF: Factor von Willebrand



I N T R O D U C C I Ó N

En su forma más básica, la vida se reduce al flujo de electrones. Los organismos, a través de miles de años de evolución, siempre han basado su metabolismo en la extracción de electrones del medio que los rodea para emplearlos en la producción de energía. Durante todo ese tiempo se ha ido perfeccionando el sistema, obteniendo los electrones de compuestos cada vez más complejos, o utilizando diferentes moléculas como aceptores finales para esos electrones. Aun así, el flujo de electrones nunca ha sido perfecto, dando lugar a la aparición ocasional de compuestos con electrones desapareados en sus orbitales externos. Estos compuestos se denominan radicales y poseen una baja estabilidad y una alta reactividad con moléculas susceptibles de su entorno. Debido a ello, los radicales siempre se han considerado agentes nocivos que provocan la oxidación y el deterioro celular, y se ha buscado la forma de eliminarlos para evitar su efecto perjudicial sobre la salud. Sin embargo, durante las últimas décadas se ha descubierto que los organismos también aprendieron a aprovechar la formación de algunos de estos radicales en su propio beneficio, principalmente de las especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*), de manera que los integraron dentro de su metabolismo y regulación. Al haber adquirido esta gran importancia en diferentes funciones celulares, la eliminación indiscriminada de ROS puede tener tantos efectos perjudiciales como el exceso de su formación. Por tanto, uno de los retos de la investigación hoy día es conocer fielmente qué especies se forman, cómo y dónde lo hacen, cómo intervienen en la regulación celular normal, y cómo podemos modularlas sin afectar al resto de funciones celulares en caso de que sus niveles se encuentren alterados.

Mediante esta tesis intentamos dar un poco más de luz a la función de estas ROS durante la hematopoyesis *in vivo*, y en especial al papel fundamental que pueden estar cumpliendo sus principales enzimas productoras, las NADPH oxidasas.

I.1 - ROS

Las ROS son uno de los grupos de radicales más importantes biológicamente, y se caracterizan por la presencia de oxígeno como átomo central de sus moléculas. El compuesto más sencillo y generado mayoritariamente es el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), ya que únicamente necesita la adición de un electrón a la molécula de oxígeno (O_2). Posee una vida media corta, pero no tiene gran

capacidad de difusión ni una alta capacidad oxidante, por lo que no es capaz de oxidar macromoléculas. Por el contrario, el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) es posiblemente el más nocivo de todos, con una vida media extremadamente corta, es capaz de atacar inespecíficamente a prácticamente cualquier tipo de molécula. Dentro de las ROS también podemos encontrar compuestos no radicales, sin electrones desapareados, pero que igualmente pueden ser muy oxidantes. Entre ellos el más importante es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que puede generarse a partir del $\text{O}_2\cdot^-$, es capaz de difundir a través de las membranas, tiene gran poder oxidante y puede generar $\text{OH}\cdot$ en presencia de metales catiónicos como el Fe^{2+} o el Cu^+ . Por último, el $\text{O}_2\cdot^-$ también puede reaccionar con el radical óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), formando especies reactivas mixtas de oxígeno y nitrógeno (RONS) (Fig. 1).

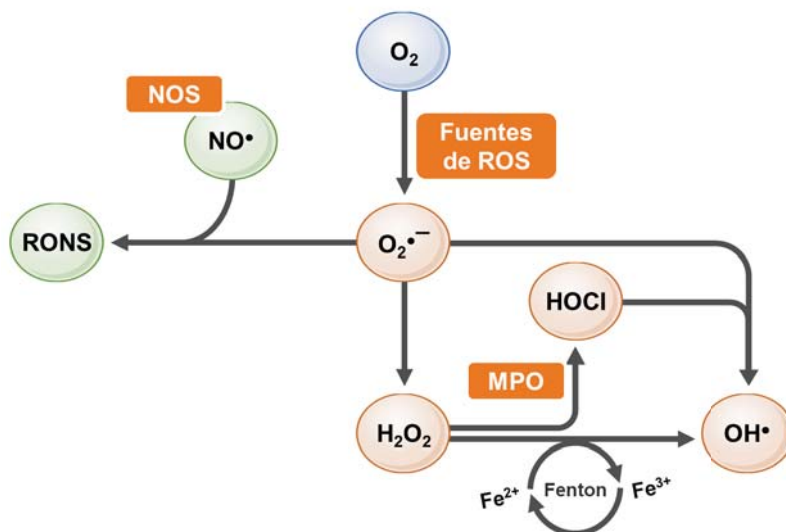


Figura 1- Conexiones entre las principales ROS fisiológicas. NOS: óxido nítrico sintasa; $\text{NO}\cdot$: radical óxido nítrico; RONS: especies reactivas de oxígeno y nitrógeno; MPO: mieloperoxidasa; Fenton: reacción de Fenton.

I.2 - DEFENSAS ANTIOXIDANTES

Hoy en día el oxígeno es un elemento esencial en nuestra atmósfera, pero en las etapas iniciales de la vida esto no era así. La atmósfera primigenia del planeta estaba principalmente constituida por gases expulsados por los volcanes, como H_2 , CO , CO_2 , H_2S y CH_4 , por lo que poseía condiciones reductoras ¹. Tras la aparición

de las cianobacterias, y su capacidad de fotosíntesis oxigénica, el oxígeno comenzó a acumularse y aumentó sus niveles atmosféricos hasta prácticamente los niveles de hoy en día ². Este proceso es denominado la Gran Oxidación (*the Great Oxidation Event* ¹) y, gracias a la capacidad del O₂ como aceptor final de electrones para multitud de procesos biológicos, supuso su incorporación al metabolismo de los organismos. Sin embargo, la utilización del O₂ también trajo consigo la aparición de las ROS como subproductos, y todos sus daños nocivos, de manera que los organismos con una defensa efectiva ante estos elementos serían los que evolutivamente continuarían con la vida en el planeta. Buena prueba de ello es que, hasta la fecha, todos los organismos han demostrado tener algún sistema de eliminación de O₂•⁻ y de H₂O₂ ^{3,4}.

Como sistemas antioxidantes podemos encontrar sistemas enzimáticos especializados en degradar las ROS, compuestos reductores que se oxidan para eliminar la capacidad oxidante de las ROS, o incluso compuestos quelantes que secuestran metales catiónicos libres que son susceptibles de reaccionar para generar más ROS.

Entre los sistemas enzimáticos más importantes encontramos las superóxido dismutasas (SOD), la catalasa, las glutatión peroxidasas (GPx) y las peroxirredoxinas (Prxs). Estos grupos de enzimas combinan muy bien su actividad, ya que el producto de reacción de una suele ser el sustrato de la siguiente. Las SOD son metaloenzimas que eliminan muy eficientemente el O₂•⁻ tanto en la mitocondria (Mn-SOD) como en el citoplasma (Cu-Zn-SOD), a costa de generar H₂O₂. La catalasa es una enzima muy común que cataliza la reducción de dos moléculas de H₂O₂ en H₂O y O₂, aunque en mamíferos se localiza casi exclusivamente en los peroxisomas ⁵, por lo que debe haber más enzimas que se encarguen de la degradación del H₂O₂ celular. Entre ellas están las GPx, que reducen gran variedad de peróxidos gracias a la oxidación del glutatión reducido (GSH), el cual se regenera posteriormente gracias a las glutatión reductasas (GR). Pero las más efectivas son las Prxs ⁶, proteínas que poseen un residuo cisteína N-terminal capaz de oxidarse para eliminar el H₂O₂. Estas enzimas suelen actuar de forma conjunta a las tiorredoxinas (Trxs), que se oxidan para devolver a las Prxs a su estado reducido y así poder volver a actuar, mientras que ellas son reducidas de nuevo por la tiorredoxina reductasa (TrxR). Tanto la GR como la TrxR recuperan a sus respectivos productos a su estado reducido gracias a la oxidación del NADPH celular ⁷. De esta manera, la actividad conjunta de estos sistemas enzimáticos

degrada rápidamente las ROS generadas impidiendo que oxiden o interaccionen con otras moléculas sensibles (Fig. 2).

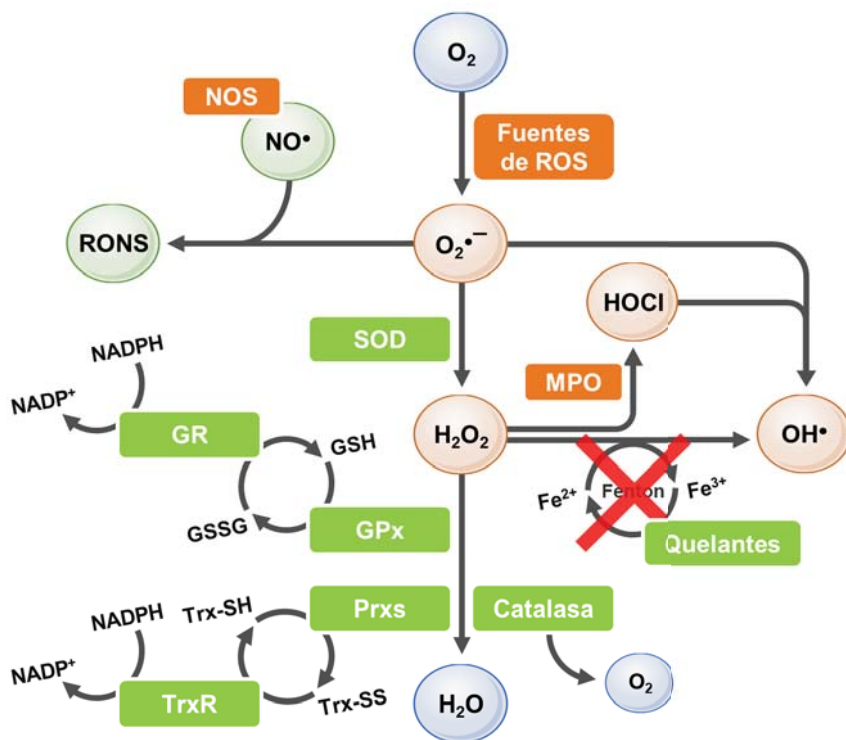


Figura 2- Puntos de interacción de los principales sistemas antioxidantes con las ROS. SOD: superóxido dismutasas; GSH: glutatión reducido; GSSG: glutatión oxidado; GPx: glutatión peroxidasas; GR: glutatión reductasas; Prxs: peroxirredoxinas; Trx-SH: tiorredoxinas reducidas; Trx-SS: tiorredoxinas oxidadas; TrxR: tiorredoxina reductasa.

A parte de los sistemas enzimáticos, como compuesto reductor principal también encontramos al propio GSH. Este compuesto es un tripéptido (γ -glutamil-cisteinil-glicina) muy abundante que además de ser sustrato de la GPx puede actuar por sí solo gracias al grupo tiol (R-SH) de su cisteína, el cual puede formar puentes disulfuro con otras cisteínas para protegerlas de la oxidación ⁸. Estas uniones son reversibles gracias a la acción también de la GR. Adicionalmente, la capacidad reductora del GSH le permite incluso regenerar otros compuestos reductores antioxidantes (por ejemplo, las vitaminas C y E).

Compuestos como la ceruloplasmina, la ferritina y la transferrina son considerados antioxidantes gracias a su capacidad de actuar como quelantes de metales de transición, ya que se unen a ellos e impiden que se autooxiden y reaccionen generando ROS más peligrosas, como el OH^\bullet .

Finalmente, podemos encontrar una gran variedad de compuestos químicos que en las condiciones apropiadas también pueden actuar como antioxidantes, como el ácido úrico, el ácido lipoico, los flavonoides, el β -caroteno o las vitaminas C y E. Estos compuestos son capaces de reducir elementos oxidantes a derivados menos reactivos, pero poseen la contrapartida de que ellos mismos se convierten entonces en radicales oxidantes. Por tanto, lo importante para considerar a un compuesto como antioxidante es que su forma oxidada sea menos reactiva y peligrosa que el elemento inicial al que haya neutralizado⁹, y eso depende de muchos factores (pH, reactividad relativa, disponibilidad de catalizadores metálicos, ...) ¹⁰.

I.3 - ORIGEN DE LAS ROS

Tras la Gran Oxidación el metabolismo aerobio se convirtió en el protagonista de la mayoría de procesos vitales, sobre todo gracias a su mayor producción energética, y su principal efector es la cadena transportadora de electrones mitocondrial (ETC, *electron transport chain*). Tradicionalmente, el funcionamiento de esta ETC ha constado de 5 complejos proteicos, todos ellos situados en la membrana interna mitocondrial (**Fig. 3**).

- El Complejo I aprovecha los electrones obtenidos al oxidar el NADH (obtenido de alguna de las rutas metabólicas) a NAD^+ para reducir ubiquinona en ubiquinol. Además, durante el proceso bombea 4H^+ hacia el espacio intermembrana.
- El Complejo II es la propia succinato deshidrogenasa del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, que aprovechando la oxidación del succinato a fumarato es capaz de reducir también la ubiquinona en ubiquinol.
- El Complejo III oxida el ubiquinol previamente formado por los Complejos I y II de nuevo a ubiquinona, y cede esos electrones a moléculas de citocromo c. Durante el proceso también bombea 4H^+ hacia el espacio intermembrana.

- El Complejo IV va captando los electrones del citocromo c y reduciendo con ellos una molécula de O_2 , de manera que con 4 electrones acaba generando 2 moléculas de H_2O . A su vez, expulsa otros $2H^+$ hacia el espacio intermembrana.
- La ATP sintasa (o Complejo V) aprovecha la fuerza motriz generada por el gradiente de H^+ en el espacio intermembrana para unir una molécula de adenosín difosfato (ADP) con otro fosfato inorgánico y generar ATP.

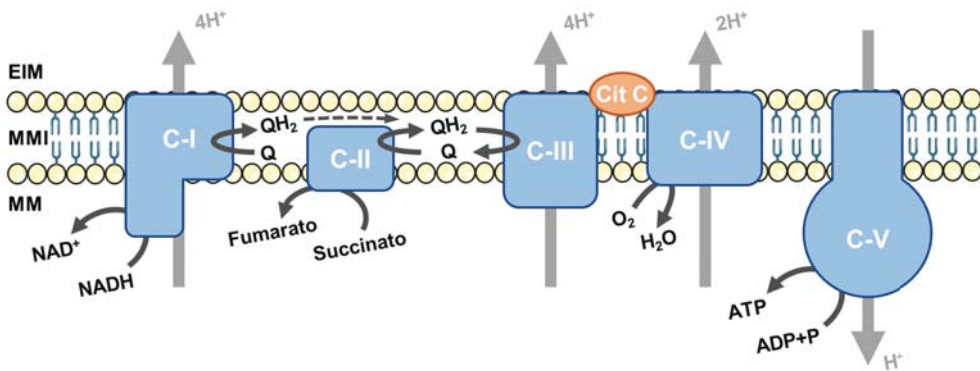


Figura 3- Cadena transportadora de electrones mitocondrial. C-I a C-V: los diferentes complejos de la cadena; Q: ubiquinona; QH₂: ubiquinol; Cit C: citocromo c; EIM: espacio intermembrana mitocondrial; MMI: membrana mitocondrial interna; MM: matriz mitocondrial.

El problema de este sistema es que durante todo este flujo de electrones mediante procesos de oxido-reducción se producen pequeños desajustes que acaban desencadenando la pérdida de electrones, y con ello la formación de ROS. Se han realizado múltiples estudios para conocer cuál es la fuente principal de generación de estas ROS, y parece que los Complejos I y III son los que mayor tasa de formación de ROS poseen, mientras que los Complejos II y IV generarían cantidades despreciables en comparación con ellos ¹¹. Sin embargo, todos estos estudios se han realizado bajo las condiciones óptimas de formación de ROS para cada complejo específico, y utilizando distintos inhibidores del resto de componentes, de manera que no se está evaluando el comportamiento mitocondrial real, y la generación de ROS *in vivo* por cada complejo aún no se conoce exactamente ¹¹.

Además, actualmente los estudios apuntan a que todos estos complejos no se encuentran de forma libre fluyendo por la membrana interna mitocondrial, sino que poseen zonas específicas de unión entre ellos y se suelen enlazar formando supercomplejos ^{12,13}. El más abundante parece ser la unión entre un Complejo I, un dímero de dos Complejos III y un Complejo IV, que se ha demostrado que posee la actividad necesaria para realizar la fosforilación oxidativa por sí solo ¹⁴, y se le ha denominado respirasoma. Una de las aparentes ventajas de la formación de estos supercomplejos es que el flujo de electrones se realiza de manera más eficiente y existe una menor pérdida, de manera que se generan menos ROS ¹⁵.

A pesar de ser la gran productora de ROS mitocondrial, la ETC no es la única fuente de ROS, sino que en la mitocondria existen otros tantos sistemas enzimáticos que generan ROS de forma indirecta. En la matriz mitocondrial encontramos complejos como la α -cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada, las α -cetoacil-CoA, piruvato y α -cetoglutarato deshidrogenasas, la aconitasa, o la flavoproteína de transporte de electrones ubiquinona oxidorreductasa (que se puede considerar como una tercera entrada de electrones a la ETC, ya que también

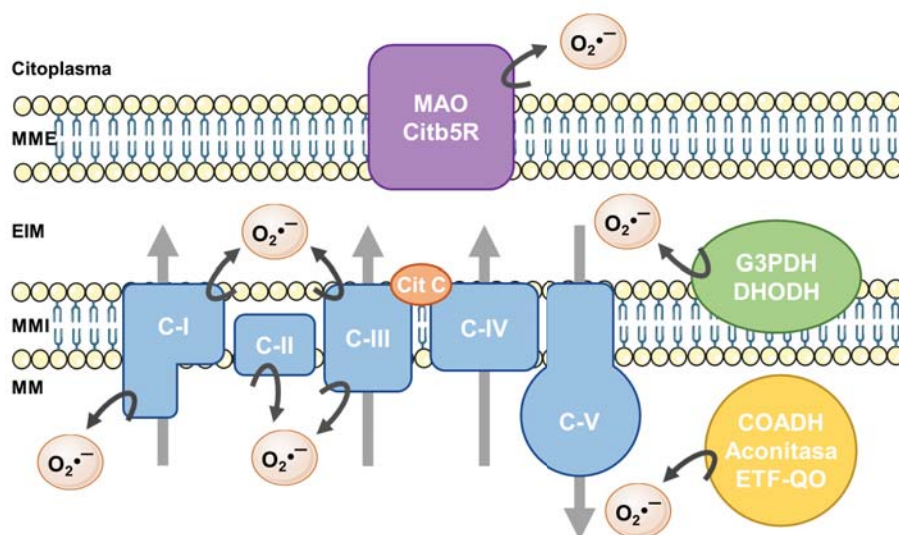


Figura 4- Fuentes de ROS mitocondriales. MAO: monoamino oxidasa; Citb5R: citocromo b₅ reductasa; Cit C: citocromo c; G3PDH: glicerol-3-fosfato deshidrogenasa; DHODH: dihidroorotato deshidrogenasa; COADH: complejos de 2-oxoácido (α -cetoácido) deshidrogenasas; ETF-QO: flavoproteína de transporte de electrones ubiquinona oxidorreductasa; MME: membrana mitocondrial externa; EIM: espacio intermembrana mitocondrial; MMI: membrana mitocondrial interna; MM: matriz mitocondrial.

reduce ubiquinona en ubiquinol), que son sistemas que generan cierta cantidad de ROS durante sus procesos de oxido-reducción ^{11,16,17}. En la membrana interna mitocondrial se encuentran la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa y la dihidroorotato deshidrogenasa mitocondriales, y algunas enzimas del sistema citocromo P450, que también generan ROS que se liberan al espacio intermembrana mitocondrial ^{16,18}. Por último, en la membrana externa mitocondrial podemos encontrar a la monoamino oxidasa y la citocromo b₅ reductasa ¹⁶, cuya formación indirecta de ROS sería liberada al exterior de la mitocondria (**Fig. 4**).

Finalmente, no sólo la mitocondria es capaz de generar ROS, sino que en el resto de la célula también podemos encontrar una gran variedad de enzimas capaces de generar ROS de forma secundaria, sobre todo aquellas enzimas que poseen actividad oxidasa, como la xantina oxidasa, monooxigenasa, lipooxigenasa, ciclooxigenasa o la óxido nítrico sintasa (NOS) desacoplada ¹⁹. Pero de entre todos los sistemas celulares generadores de ROS el más destacado es la familia de enzimas NADPH oxidasas que, al contrario de todos los demás sistemas, no las generan como subproductos, sino que lo hacen de forma directa como principal función. Sobre esta importante familia hablaremos en un capítulo más adelante.

I.4 - SEÑALIZACIÓN REDOX

Los sistemas de defensa antioxidante ofrecieron a los organismos la capacidad de lidiar con la continua superproducción de ROS, pero la evolución no paró ahí, los organismos comenzaron a utilizar estos sistemas para modular los niveles de ROS y utilizarlos en su beneficio. Gran muestra de ello es la multitud de respuestas celulares a señales externas que son acompañadas por pequeñas subidas en los niveles de ROS, como factores de crecimiento (PDGF, EGF, GM-CSF), citoquinas (IL-1, IL-3, TGF- β 1, TNF- α) o agonistas de receptores acoplados a proteína G (angiotensina II, tirotrópina, trombina, hormona paratiroidea, serotonina, bradiquinina) ²⁰. Si se inhibe el aumento de ROS generado por estos estímulos la respuesta celular se ve comprometida, por lo tanto, las ROS deben estar actuando como parte de la señalización que enlaza el estímulo con su respuesta específica. Además, también se ha visto que la estimulación exógena con H₂O₂ promueve la activación de muchas de las vías de señalización involucradas

en estos procesos ¹⁰, evidenciando el importante papel que han adquirido las ROS en la señalización celular durante la evolución.

Dada la rápida transformación que puede darse entre unas ROS y otras, y la falta de compuestos específicos que nos permitan detectarlas de forma discriminada, es muy complicado conocer la ROS específica que pueda estar involucrada en cada reacción. Aun así, la baja reactividad biológica del $O_2^{\bullet-}$ ⁹, en comparación con el alto ratio de dismutación por parte de la SOD, hace que éste posiblemente solo sea capaz de actuar en distancias muy cortas de su lugar de generación, no siendo la mejor opción para la señalización. En el caso del OH^\bullet sucede lo contrario, su altísima capacidad de reaccionar con casi cualquier molécula biológica que se encuentre hace imposible pensar que tenga un mínimo de especificidad para poder actuar como segundo mensajero. Por tanto, la principal molécula involucrada en la señalización celular parece ser el H_2O_2 , gracias a su falta de carga por no tener electrones desapareados, lo que le aporta una relativa estabilidad y una mayor capacidad de difusión ⁹. También posee cierto grado de especificidad, ya que su reacción con la mayoría de moléculas biológicas necesita una alta energía de activación y es lenta ⁹, sin embargo, con sus principales dianas reacciona mucho más fácilmente y además poseen un amplio rango de sensibilidad a la oxidación ²¹. Así, a bajas concentraciones de H_2O_2 solo se verán afectadas las moléculas más reactivas hacia este, mientras que las menos sensibles únicamente se oxidarán a concentraciones más altas.

Las principales dianas sensibles de oxidación por H_2O_2 son proteínas con centros metálicos o con residuos de cisteína, que es uno de los aminoácidos más sensibles a la oxidación junto con metionina, tirosina y triptófano ^{22,23}.

I.4.A - Oxidación de residuos cisteína

La característica diferencial de la cisteína es su grupo tiol ($R-SH$), que es capaz de ionizar fácilmente a tiolato ($R-S^-$) si se encuentra en un entorno adecuado que estabilice su carga negativa (por ejemplo, al lado de aminoácidos como lisina o arginina ²¹), haciéndola mucho más sensible aún a la oxidación. Su oxidación por H_2O_2 genera la formación de ácidos sulfénicos ($R-SOH$) inestables, que pueden: reducirse de nuevo a su forma original; reaccionar con otros grupos $R-SH$ cercanos y formar puentes disulfuro ($R-SS-R$); u oxidarse nuevamente generando ácidos

sulfínicos ($R-SO_2H$) y posteriormente sulfónicos ($R-SO_3H$) (**Fig. 5**). Si estos procesos de oxidación tienen lugar en residuos de cisteína situados en el centro activo de alguna enzima suele significar la modificación reversible ($R-SOH$ y $R-SS-R$) o irreversible ($R-SO_2H$ y $R-SO_3H$) de su actividad, ofreciendo al H_2O_2 una gran versatilidad de regulación y la posible diversificación de la señal según el tipo de modificación formada.

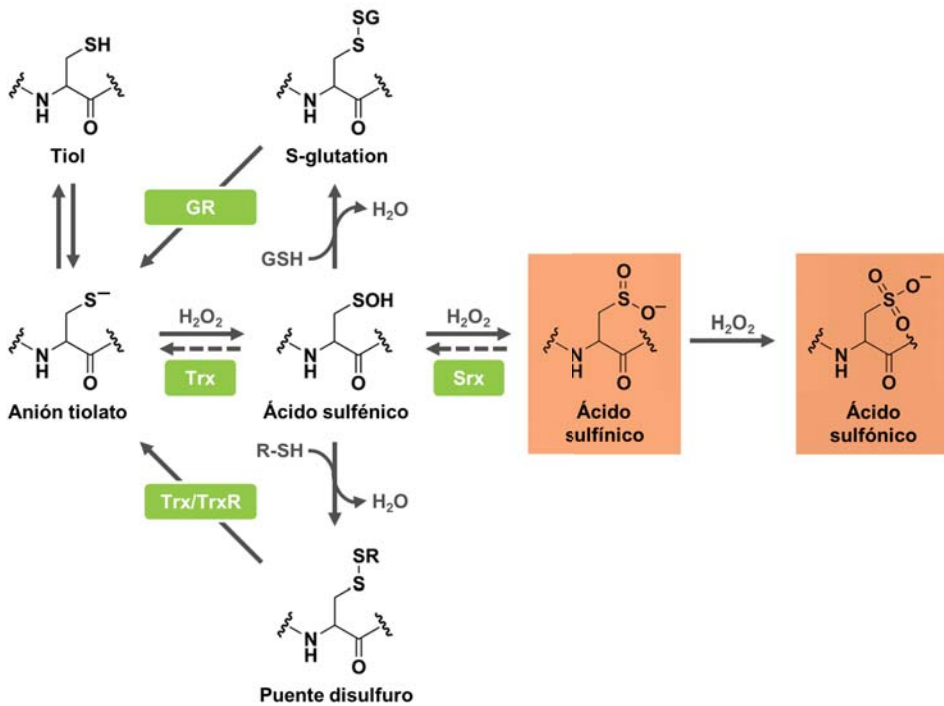


Figura 5- Red de modificaciones por oxido-reducción de la cisteína. Los estados de oxidación *a priori* irreversibles se encuentran marcados en rojo. GSH: glutatión; GR: glutatión reductasa; Trx: tiorredoxinas; TrxR: tiorredoxina reductasa; Srx: sulfirredoxina.

A pesar de la baja estabilidad de los ácidos sulfénicos se ha identificado su formación en multitud de proteínas involucradas en señalización celular como fosfatasa, quinasas, factores de transcripción, desubiquitinasa y canales iónicos^{24,25} (**Tabla 1**).

Los puentes disulfuro son una frecuente modificación postranscripcional de las proteínas que ayuda a su plegamiento y estabilidad, sucediendo generalmente en el retículo endoplásmico. En el citoplasma es raro que se generen,

Tabla 1- Proteínas reguladas por oxidación a ácido sulfénico de alguno de sus residuos cisteína.

Tipo	Proteína	Organismo	Cisteína
Peroxidasas	AhpC	<i>M. tuberculosis</i>	Cys-165
	Prx	<i>H. sapiens</i>	Cys-51 (Prxl)
	Orp1/GPx3	<i>S. cerevisiae</i>	Cys-36
Fosfatasas	PTP1B	<i>H. sapiens</i>	Cys-215
	PTEN	<i>H. sapiens</i>	Cys-124
	Cdc25a	<i>H. sapiens</i>	Cys-431
	SHP-1	<i>H. sapiens, M. musculus</i>	Cys-455
	SHP-2	<i>H. sapiens, M. musculus</i>	Cys-459
Quinasas	EGFR	<i>H. sapiens</i>	Cys-797
	JAK2	<i>M. musculus</i>	Cys-866/Cys-917
	Akt2	<i>M. musculus</i>	Cys-124
	IKK-β	<i>H. sapiens</i>	Cys-179
	RegB	<i>R. capsulatus</i>	Cys-265
	L-PYK	<i>H. sapiens</i>	Cys-436
Factores de transcripción	AphB	<i>V. cholerae</i>	Cys-235
	MgrA	<i>S. aureus</i>	Cys-12
	OxyR	<i>E. coli</i>	Cys-199
	CrtJ	<i>R. capsulatus</i>	Cys-420
	p50 (NF-κB)	<i>H. sapiens</i>	Cys-62
Cisteína proteasas	USP1	<i>H. sapiens</i>	Cys-90
	USP7	<i>H. sapiens</i>	Cys-223
	A20	<i>H. sapiens</i>	Cys-103
	Catepsina K	<i>H. sapiens</i>	Cys-25
	Papaína	<i>P. latex</i>	Cys-25
Canales	Kv1.5	<i>H. sapiens</i>	Cys-581
Oxidorreductasas	GAPDH	<i>O. cuniculus</i>	Cys-298
	Aldosa reductasa	<i>H. sapiens</i>	Cys-298
	MsrA	<i>S. cerevisiae</i>	Cys-72
Transferasas	MTAP	<i>H. sapiens</i>	Cys-136/Cys-223
Chaperonas	Hsp70	<i>H. sapiens</i>	Cys-306
Reguladores de apoptosis	Bcl-2	<i>H. sapiens</i>	Cys-158/Cys-229
Proteínas de citoesqueleto	β-Actina	<i>H. sapiens</i>	Cys-272

IKK-β: IκB quinasa β; L-PYK: piruvato quinasa hepática; MTAP: metiltioadenosina fosforilasa. (Modificada de Lo Conte and Carroll, 2013²⁴).

debido al carácter reductor que mantienen las reductasas en ese entorno, pero si aumenta el nivel de oxidación por la generación localizada de ROS se pueden dar las condiciones para su formación²⁵. Una vez formados son bastante estables y pueden alterar la actividad, localización subcelular e interacciones de las proteínas. Algunos ejemplos de proteínas que son inhibidas por la formación de puentes disulfuro entre cisteínas de su centro activo y otras cercanas en respuesta al

aumento de ROS son las proteína tirosina fosfatasa (PTPs), AKT o ciertas caspasas ^{25,26}. Las proteína quinasas también pueden regularse de esta manera, aunque en este caso su efecto puede variar según la proteína: pueden ser activadas, como en el caso de serina-treonina quinasas PKG1 α o ATM, cuya unión entre homodímeros mediante puentes disulfuro mejora la afinidad por sus dianas; o pueden ser inhibidas, como ciertas Src tirosina quinasas ²⁵. Otras proteínas sensibles a su modificación por puentes disulfuro son canales iónicos como TRPA1 o la enzima glucolítica piruvato quinasa M2 ²⁵.

En muchos casos la proteína sulfenilada no posee otra cisteína cercana con la que pueda formar un puente disulfuro para estabilizarse o evitar su hiperoxidación. Es aquí donde entra en juego la capacidad antioxidante del GSH, que aporta su cisteína para formar ese puente disulfuro con la proteína sulfenilada y quedar así S-glutationilada y protegida de la oxidación ⁸. Enzimas como la tripsina, la colagenasa, la fructosa-1,6-bisfosfatasa, o las ATPasas de Ca²⁺ de retículo endoplásmico/sarcoplásmico (SERCA) ²⁷ son activadas mediante este mecanismo, mientras que MAPK/ERK ²⁸, proteína quinasa C (PKC) ²⁹, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, la caspasa-1, el proteasoma 26S, o ciertas PTPs como PTP1B son inhibidas ²⁵.

La fosforilación, sobre todo la fosforilación en tirosina, es un mecanismo de regulación fundamental de las proteínas pertenecientes a vías de señalización de proliferación, diferenciación, ciclo celular o factores de transcripción ³⁰. Como estamos viendo, la mayor parte de proteínas cuya actividad es regulada reversiblemente por ROS pertenecen a las dos familias más involucradas en el proceso de fosforilación, las fosfatasa y las quinasas, lo que indica la gran importancia de las ROS en la señalización celular.

Si hay un exceso de oxidantes y el ácido sulfénico no es protegido puede ser oxidado hasta ácido sulfínico, el cual ya no permite la interacción con otros grupos tiol. Esta modificación, *a priori* irreversible, puede inactivar definitivamente a la mayoría de proteínas. No es el caso de proteínas con centros metálicos unidos a residuos cisteína, en las cuales su oxidación a ácido sulfínico modifica el comportamiento de los cationes provocando, por ejemplo, una mayor actividad de las metaloproteasas de matriz extracelular o de las nitrilo hidratasa ²⁵. Curiosamente, entre las proteínas más susceptibles a la formación de ácido sulfínico se encuentran las Prxs, las enzimas antioxidantes de mayor afinidad por

el H_2O_2 , de manera que esta modificación puede servir como sistema de regulación ante la señalización por ROS. Esta es la base de la teoría denominada “*floodgate*” o “de compuerta”, en la cual las Prxs actúan como una barrera eliminando rápidamente la mayoría de H_2O_2 formado. Su función como mensajero solo se daría en caso de un aumento brusco y localizado de H_2O_2 que inactivase la reserva de Prxs disponibles, pudiendo así el H_2O_2 restante afectar a las proteínas con menor sensibilidad y transmitir la señal ³¹. Finalmente, no podemos descartar por completo la posibilidad de que la sufinilación tenga cierta función reguladora similar a la vista con las anteriores modificaciones. Esto es debido a la existencia de una ácido sulfínico reductasa, la sulfirredoxina (Srx), que es capaz de revertir el ácido sulfínico de las Prxs a ácido sulfénico, para luego recuperar ambas su estado reducido mediante el sistema de la Trx/TrxR ²⁵. Otro indicio de esta posibilidad es que varias vías de señalización promueven la mayor expresión de esta Srx ²⁵.

El último estado de oxidación del grupo tiol es el de ácido sulfónico, que modifica irreversiblemente el residuo cisteína y altera definitivamente la actividad de la proteína.

I.4.B - Oxidación de residuos metionina

La metionina, junto con la cisteína, son los únicos aminoácidos que contienen azufre en su estructura, pero en ésta en lugar de en forma de R-SH se encuentra como grupo tioéster (R-S-CH₃). Al igual que sucede con la cisteína, la oxidación de metionina a metionina sulfóxido es reversible, gracias a la acción de las enzimas metionina sulfóxido reductasas (Msrs), mientras que su mayor oxidación hasta metionina sulfona es un proceso irreversible (**Fig. 6**).

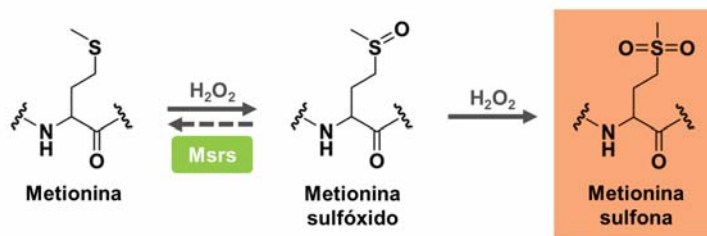


Figura 6- Red de modificaciones por oxido-reducción de la metionina. El estado de oxidación irreversible se encuentra marcado en rojo. Msrs: metionina sulfóxido reductasas.

La oxidación en metionina posee una importante función como defensa antioxidante. Los residuos de metionina se disponen en gran medida hacia el exterior de las proteínas y alrededor de los centros catalíticos de las enzimas, y la oxidación de la mitad de estos residuos en proteínas como la α -macroglobulina o la glutamina sintetasa ha demostrado que no produce la alteración de su actividad^{32,33}. De esta manera, la metionina actuaría como barrera eliminando oxidantes antes de que estos reaccionen con aminoácidos más importantes para la función proteica. Además, en caso de estrés oxidativo se produce una desregulación de la síntesis de proteínas que promueve una mayor incorporación de metioninas en posiciones que deberían ocupar otros aminoácidos, de forma que su proporción aumenta notablemente aportando una mayor defensa antioxidante³³.

Sin embargo, la capacidad de las Msrs de revertir la metionina sulfóxido a su estado reducido hace suponer que la oxidación de residuos de metionina también pueda tener una función reguladora de la actividad proteica similar a la vista con la oxidación de residuos de cisteína. Por ejemplo, la calmodulina (CaM) y la calcineurina, dos proteínas relacionadas con la señalización por Ca^{2+} , poseen residuos metionina sensibles de oxidación que causan la pérdida de su capacidad de unión y actividad^{34,35}. La oxidación de I κ B en su Met-45 hace que sea más resistente a la degradación, y por ello mantiene el complejo NF- κ B más inactivo³⁶. La oxidación de la Met-340 de p53 puede ser una de las causas de la inhibición de su función en caso de estrés oxidativo³⁷. Pero la formación de metionina sulfóxido no siempre supone la inactivación de las proteínas, ya que la oxidación de las Met-281 y Met-282 de la quinasa II dependiente de CaM (CaMKII) promueve su autofosforilación y activación independiente de CaM/ Ca^{2+} ³⁸; y la oxidación de 3 residuos de metionina del factor de transcripción HypT también promueve su activación³⁹.

Finalmente, la formación de metionina sulfóxido también parece ser capaz de actuar sobre la señalización celular mediante la regulación de la fosforilación de las proteínas. Se ha encontrado que el 98% de las proteínas con residuos metionina oxidables son fosfoproteínas, y que en ellas las metioninas oxidables y las serinas fosforilables se encuentran mucho más agrupadas que en el resto de proteínas⁴⁰. Un ejemplo de esta regulación sucede en la nitrato reductasa, cuya oxidación en la Met-538 inhibe la fosforilación de la Ser-534 alterando su función⁴¹.

El estudio de la oxidación en metionina como mecanismo de regulación de la señalización celular aún se encuentra en un estado muy temprano en comparación con todo el estudio que se ha realizado sobre la oxidación de cisteínas, pero sin lugar a duda está demostrando que puede llegar a tener un futuro tan prometedor como este.

I.4.C - Oxidación de residuos tirosina y triptófano

Al contrario que en el caso de cisteína y metionina, la oxidación de residuos de tirosina o de triptófano es siempre irreversible.

El mayor causante de la oxidación de tirosinas *in vivo* es el OH•, generando tirosinas hidroxiladas que a su vez pueden actuar como oxidantes, por lo que continuarían propagando el estrés oxidativo ²³. Sin embargo, dada la alta reactividad y baja especificidad del OH• la oxidación de tirosinas es una reacción bastante limitada *in vivo*. En cambio, la nitración de residuos tirosina mediante NO• u ONOO⁻, radicales que se encuentran también aumentados en estados de estrés oxidativo, es un proceso más habitual y que lleva a la formación de 3-nitrotirosinas. La nitración de tirosinas modifica su polaridad y su capacidad de interacción con el entorno, siendo común que altere la estructura y función proteica ²³. Algunas proteínas sensibles de inactivarse por medio de esta modificación son la Mn-SOD, el citocromo c, el sustrato del receptor de insulina ²³, AKT ⁴², JAK2 ⁴³ o IκBα (promoviendo la activación de NF-κB) ⁴⁴. Pero también existe algún caso en el que la nitración en tirosina promueve la activación de proteínas, como p53 ⁴⁵ o ERK ⁴².

La oxidación del triptófano suele producir hidroperóxidos de triptófano que terminan provocando la ruptura de su anillo indol, generando N-formilkinurenina y finalmente kinurenina ⁴⁶, y con ello la alteración de la estructura proteica. La oxidación de triptófanos parece regular la actividad de algunas proteínas, como lisozima, SOD1, α-cristalina, apolipoproteína A-1 (apoA-1) y apoB-100 ⁴⁶, pero por ahora no se ha encontrado esta alteración sobre proteínas importantes para la señalización celular.

I.4.D - Relación ROS y calcio en señalización

Además de su propia actividad como moléculas señalizadoras, es importante mencionar que la actividad de las ROS está muy interconectada con la señalización mediante otro conocido segundo mensajero, el Ca^{2+} , que es capaz de regular funciones como la contracción muscular, secreciones, metabolismo celular, expresión génica y supervivencia o muerte celular. El Ca^{2+} es un compuesto que no se sintetiza ni se degrada, siempre se encuentra en el mismo estado, de manera que su señalización se produce únicamente mediante su movilización. Las corrientes de Ca^{2+} se producen desde la zona extracelular y/o desde sus almacenes intracelulares (principalmente retículo endoplásmico/sarcoplásmico) hacia el citoplasma, donde aumenta su concentración y puede interactuar con sus dianas, o puede generar la despolarización de membranas⁴⁷. El control del desplazamiento del Ca^{2+} se lleva a cabo mediante diversos tipos de canales iónicos, bombas y transportadores: en la membrana celular encontramos canales de calcio dependientes de voltaje (VDCCs) o dependientes de ligandos (LDCCs), entre los que también se encuentran canales dependientes de depósito (SOCCs) como los canales ORAI, que son los responsables de la denominada “liberación de Ca^{2+} activada por Ca^{2+} ” (CRAC). Todos ellos introducen Ca^{2+} al interior celular, mientras que las bombas ATPasas de Ca^{2+} de membrana plasmática (PMCA) o los intercambiadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) y de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}-\text{K}^+$ lo expulsan de la célula. En orgánulos intracelulares se encuentran los receptores de inositol trifosfato (IP_3Rs) y los receptores de rianodina (RyRs), que son LDCCs que liberan Ca^{2+} al citoplasma, y las bombas SERCA que lo devuelven a sus reservorios⁴⁸.

Como hemos visto anteriormente, las ROS son capaces de oxidar los residuos cisteína de varios canales y modificar su actividad, y entre ellos se encuentran muchos de los relacionados con Ca^{2+} . Por ejemplo, la oxidación de residuos cisteína en VDCCs inhibe el flujo de Ca^{2+} a través de ellos, y en bombas SERCA o PMCA desacopla la unión e hidrólisis del ATP, inhibiendo su función^{47,49}. En cambio, parece que la S-glutationilación de la Cys-674 de bombas SERCA produce un aumento de su actividad; la oxidación de los tioles de receptores RyR e IP_3R promueve una mayor frecuencia de activación y liberación de Ca^{2+} , al estabilizar la conformación activa del receptor^{47,50}; y la oxidación reversible de los intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mejora el flujo de Ca^{2+} ⁴⁹. Pero las ROS no solo influyen sobre los canales de manera directa, sino que pueden modificar su actividad de

manera indirecta, oxidando elementos necesarios para su activación. Por ejemplo, el aumento de ROS puede producir la S-glutationilación de la molécula sensora de RE STIM1, haciendo que se desplace a membrana plasmática y active canales ORAI, pero también puede producir la formación de un puente disulfuro entre sus dos cisteínas más sensibles de oxidación, reduciendo entonces la entrada de Ca^{2+} ^{47,50}. También, la oxidación de la CaMKII mejora su actividad, lo que lleva a una mayor fosforilación y activación del receptor RyR2 o de la bomba SERCA⁴⁸; y se ha visto que los canales VDCCs en células de músculo liso vascular (vSMCs) son activados en respuesta a ROS, presumiblemente por la activación de quinasas encargadas de su fosforilación⁴⁷ (Fig. 7).

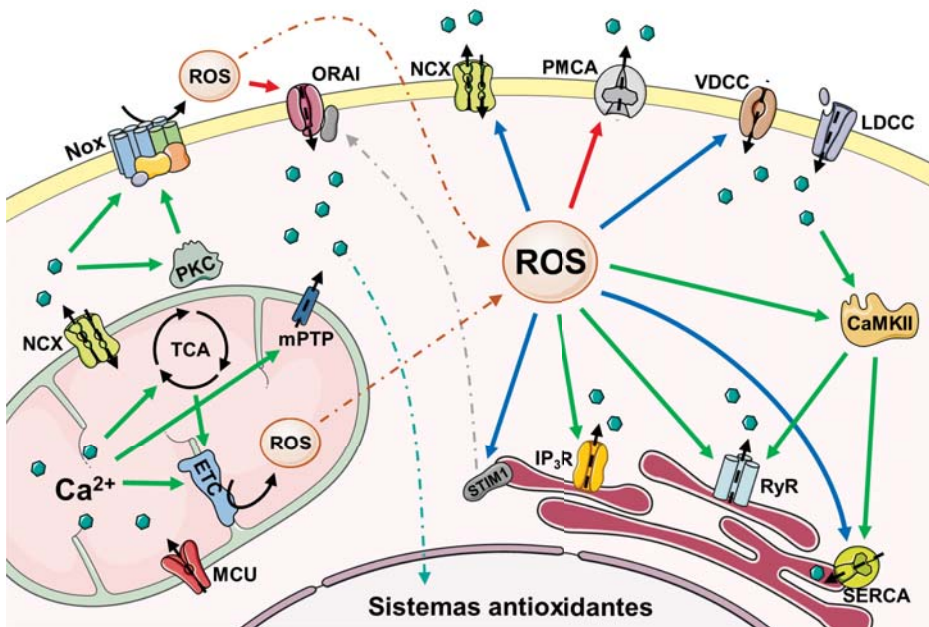


Figura 7- Relación entre las ROS y el calcio celulares. Las flechas continuas verdes representan activación, las rojas inhibición, y las azules modulación positiva o negativa dependiendo del estímulo. Las flechas discontinuas representan desplazamientos. Nox: NADPH oxidasas; ORAI: canales de liberación de Ca^{2+} en respuesta a Ca^{2+} ; NCX: intercambiadores $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$; PMCA: ATPasas de Ca^{2+} de membrana plasmática; VDCC: canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje; LDCC: canales de Ca^{2+} dependientes de ligando; IP₃R: receptores de inositol trifosfato; RyR: receptores de rianodina; SERCA: ATPasas de Ca^{2+} de retículo endoplásmico/sarcoplásmico; MCU: uniportador mitocondrial de Ca^{2+} ; mPTP: poro de transición de la permeabilidad mitocondrial; ETC: cadena transportadora de electrones; TCA: ciclo de ácidos tricarboxílicos; PKC: proteína quinasa C.

A su vez, en esta interconectada relación ROS-Ca²⁺, el Ca²⁺ también es capaz de modificar los niveles de ROS. De forma normal el Ca²⁺ promueve la síntesis de ATP al estimular enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (piruvato, isocitrato y α -cetoglutarato deshidrogenasas) y de la fosforilación oxidativa (Complejo V-ATP sintasa), de manera que aumenta la actividad mitocondrial y promueve la generación de ROS^{50,51}. Además, si se produce un aumento excesivo de Ca²⁺ en la mitocondria se puede generar la despolarización de la membrana mitocondrial, desacoplando la ETC y generando aún mayores niveles de ROS mitocondriales^{48,51}. También, varias de las enzimas no mitocondriales que generan ROS de forma secundaria pueden ser moduladas por Ca²⁺, y muchas de las subunidades de los complejos proteicos de las NADPH oxidasas (p47^{phox}, p40^{phox}, Rac) son activadas por fosforilación mediante PKC, que a su vez es activada por Ca²⁺⁴⁷. Incluso, como veremos más adelante, las NADPH oxidasas Nox5 y Duox1/2 son directamente reguladas por Ca²⁺. Finalmente, el Ca²⁺ y su proteína asociada CaM también son capaces de activar sistemas antioxidantes que eliminan las ROS⁵¹.

Por tanto, es evidente que ambos mecanismos de señalización se autorregulan a muchos niveles, e incluso pueden actuar potenciando y expandiendo sus señales. Debido a ello, una gran parte de la importancia de la señalización redox tiene que ver con su capacidad para actuar sobre la actividad del Ca²⁺ como segundo mensajero.

Tras muchos años de investigación y trabajo con moléculas totalmente reconocidas como segundos mensajeros (cAMP, DAG, NO•, Ca²⁺) se ha llegado a la conclusión de que existen 4 características básicas para que una molécula pueda ser considerada un buen segundo mensajero y transmisor de la señal⁵²:

- Ser generados o liberados de forma regulada, generalmente de forma enzimática o mediante canales.
- Ser degradados de forma específica para restablecer sus niveles basales, ya sea mediante enzimas, bombas transportadoras o mediante la reacción con sus dianas.
- Que sus fluctuaciones intracelulares sean rápidas, con periodos cortos entre su aumento y su recuperación a niveles basales, pudiendo formar gradientes desde su origen que determinen su efectividad.
- Poseer especificidad en su acción.

Como hemos visto, la señalización redox cumple con la mayoría de esos ingredientes: una molécula (H_2O_2) con unas características químicas y de difusión adecuadas, un sistema de control y eliminación rápido y efectivo mediante los sistemas antioxidantes, y cierta especificidad de acción mediante la diferente sensibilidad y estados de oxidación de las proteínas. Sin embargo, un factor importante es disponer de un sistema de producción de ROS controlado, y hasta ahora solo hemos visto su generación de forma colateral por la mitocondria y por otros sistemas inespecíficos que pueden generar variaciones espontáneas y no deseadas, lo cual no supone un mecanismo ideal. Es aquí donde gana gran importancia la familia de enzimas NADPH oxidasas, un sistema capaz de producir ROS de forma directa, controlada y en respuesta a multitud estímulos, que además le aporta otro grado de especificidad de acción a las ROS mediante sus diferentes miembros y localizaciones subcelulares, como veremos en el siguiente capítulo. Posiblemente la aparición de estas enzimas supuso el impulso final al desarrollo y estabilización de la señalización redox.

I.5 - NADPH OXIDASAS

Las nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasas, abreviadas generalmente como Nox, son una familia de enzimas transmembrana cuya acción metabólica es oxidar NADPH para generar ROS. Por tanto, hablamos del único sistema celular conocido especializado y diseñado específicamente para producir ROS y poder utilizarlas sin necesidad de que se generen de forma secundaria por medio de otras reacciones.

La proteína estandarte de la familia es la enzima Nox2, que fue la primera en identificarse y la que más se ha estudiado. Fue nombrada inicialmente como gp91^{phox} u oxidasa de fagocitos, debido a que se descubrió que es la responsable del aumento drástico en el consumo de oxígeno y la generación de ROS (efecto conocido como “estallido respiratorio”) durante la defensa inmune en estas células. Posteriormente se identificaron nuevas oxidasas en diferentes tejidos, lo que ha hecho que la familia aumente en el hombre hasta los 7 miembros, denominados de Nox1 a Nox5, y Duox1 y Duox2 que poseen un dominio peroxidasa adicional y por ello se las considera oxidasas dobles (*dual oxidases*). Las NADPH oxidasas se pueden dividir en subfamilias atendiendo a varios aspectos:

- Según su actividad: las enzimas Nox1-4 son dependientes de $p22^{phox}$, ya que requieren de esta pequeña subunidad transmembrana para su actividad, mientras que Nox5 y Duox1/2 poseen dominios en mano EF de unión a calcio para su regulación.
- Según su producto: Nox1-3 y Nox5 generan $O_2^{\bullet-}$ como principal producto detectable, mientras que durante la actividad de Nox4 y Duox1/2 lo que se detecta mayoritariamente es H_2O_2 .

Las primeras en surgir evolutivamente fueron las NADPH oxidasas basadas en activación por Ca^{2+} ^{4,53}, presentes en prácticamente todos los eucariotas, por lo que su desarrollo tuvo lugar una vez que los organismos ya poseían sistemas enzimáticos antioxidantes, hecho clave para poder controlar y dirigir su acción. Tras ellas aparecerían las NADPH oxidasas reguladas por subunidades, siendo la primera un ortólogo de Nox2 en el erizo de mar (equinodermos), donde no se tiene claro si su función es la producción de ROS para la eliminación de microbios. Posteriormente surgiría Nox4 en urocordados y más adelante nos encontramos con homólogos de Nox1 a partir de los peces teleósteos. Finalmente aparecería Nox3, que únicamente está presente en vertebrados terrestres.

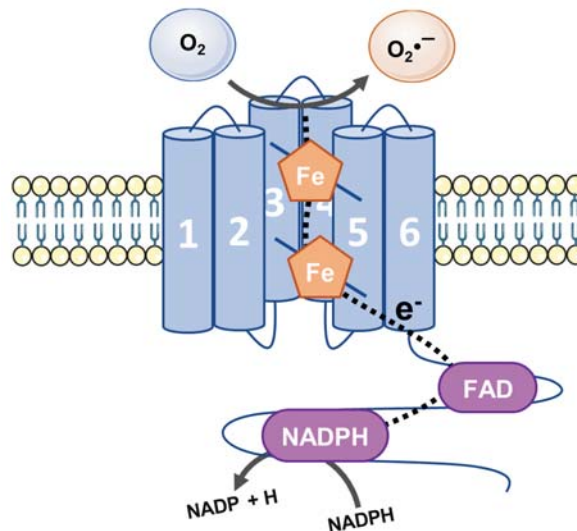


Figura 8- Estructura básica de la región catalítica de las NADPH oxidasas. Se representan las 6 regiones transmembrana, los dos grupos hemo (Fe), el FAD y NADPH unidos en sus regiones correspondientes, y el camino que siguen los electrones durante la reacción (línea negra de puntos).

La estructura básica de todas ellas consta de un dominio transmembrana formado por 6 hélices α y un dominio deshidrogenasa interno, a los que deben unirse otras subunidades para formar el complejo activo final, principalmente $p22^{\text{phox}}$ en aquellas que sean dependientes de su actividad. En el dominio deshidrogenasa poseen zonas de unión para NADPH y para FAD, y en el dominio transmembrana se sitúan dos pares de histidinas que sirven de anclaje para dos grupos hemo. Durante su actividad el flujo de electrones comienza con la unión del NADPH, que se oxida al ceder sus electrones por gradiente al FAD, y éste a su vez también se oxida para pasar los electrones secuencialmente al grupo hemo más interno. Únicamente si en la parte externa del complejo se encuentra una molécula de O_2 se ve favorecido el paso de electrones entre los dos grupos hemo, para ceder definitivamente uno a la molécula de O_2 formándose el $O_2^{\cdot-}$ (Fig. 8). En el caso de Nox4 y Duox1/2 el $O_2^{\cdot-}$ es transformado rápidamente en H_2O_2 , siendo ésta la molécula detectada tras su activación, aunque existe algo de controversia en el mecanismo exacto por el cual se forma.

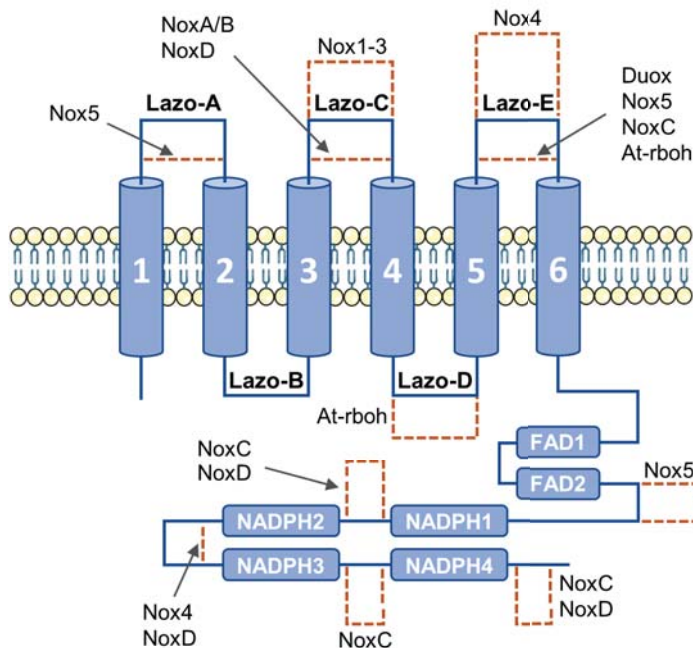


Figura 9- Mapa estructural de la región catalítica de NADPH oxidasas. En azul se representa la estructura básica consenso para la mayoría de miembros de la familia. La línea naranja discontinua representa modificaciones de la estructura que poseen determinados miembros, y su tamaño relativo. NoxA, NoxB y NoxC son enzimas presentes en hongos; NoxD está presente en algas; At-rboh presente en plantas. (Modificada de Kawahara et al., 2007⁵³).

Aunque la estructura básica de las hélices α transmembrana y de las regiones de unión a FAD y NADPH está muy conservada, existe variación entre las diferentes Nox en la longitud de casi todos los segmentos que unen estas regiones ⁵³, lo que indica que la actividad catalítica de estas enzimas es capaz de tolerar bastantes cambios estructurales en estas zonas (**Fig. 9**). Sin embargo, hay 2 de ellas que se mantienen totalmente inalteradas: el lazo-B que une las regiones transmembrana II y III, y el segmento de unión entre la región transmembrana VI y las dos regiones de unión a FAD. Por tanto, es evidente que estas dos zonas estructurales deben tener una importancia fundamental para el correcto funcionamiento de las enzimas.

I.5.A - Subunidades proteicas

p22^{phox}:

Inicialmente descubierta como parte del citocromo b₅₅₈ de la oxidasa de fagocitos, dímero que forma junto a Nox2, p22^{phox} es la subunidad más importante para la actividad de más de la mitad de miembros de la familia, las enzimas Nox1 a Nox4, debido a que es esencial para la localización subcelular y la estabilidad del heterodímero Nox-p22^{phox} en la membrana. Además, actúa como anclaje para la subunidad p47^{phox} (o sus homólogos) al complejo, paso necesario durante el proceso de activación ⁵⁴. Otro hecho que apoya su importancia es que posee una expresión constitutiva y ubicua, encontrándose presente en todos los tipos celulares ⁵⁵.

Su estructura posee 2 regiones transmembrana, alojando sus dos terminaciones hacia el interior celular. El extremo C-terminal es necesario para la actividad oxidasa del complejo, por ser la zona de unión de p47^{phox}, y el extremo N-terminal es necesario tanto para la actividad como para la maduración del complejo ⁵⁴. Prácticamente todas las mutaciones de p22^{phox} dan lugar a la ausencia de la proteína, señalando la importancia de todas sus regiones para su estabilidad, y conllevan la aparición de la enfermedad granulomatosa crónica (CGD), caracterizada por la incapacidad de las células fagocíticas de acabar con los organismos patógenos durante las infecciones. La mayor causa genética de esta enfermedad se debe a mutaciones en el gen *CYBB* que codifica Nox2 (70% casos), mientras que las mutaciones en el gen *CYBA* que codifica p22^{phox} suponen un

pequeño porcentaje de casos (6%), pero la severidad de la enfermedad es similar en ambas situaciones ⁵⁴.

p22^{phox} es fosforilado por PKC en su Thr-147, cerca de su zona de unión a p47^{phox}, promoviendo el ensamblaje y la activación del complejo ⁵⁶.

p47^{phox} y NoxO1:

La proteína p47^{phox} es una subunidad que se considera organizadora del complejo proteico de Nox2, ya que es capaz de unirse a p22^{phox} y una vez ahí promover la unión de la subunidad p67^{phox} a Nox2 para permitir el correcto flujo de electrones desde el NADPH hasta el O₂ ⁵⁵. Como característica de p47^{phox}, posee una región autoinhibidora que impide su unión a p22^{phox} en estado basal, por lo que necesita ser fosforilada para poder unirse. De esta forma, la fosforilación de p47^{phox}, principalmente por PKC ⁵⁶, es un mecanismo de regulación de la actividad del complejo. Mutaciones en el gen *NCF1* que codifica p47^{phox} suponen la segunda mayor causa de CGD (25% de casos) ⁵⁴, lo que evidencia la importancia de esta subunidad para la actividad de Nox2.

NoxO1 (*Nox organizer protein 1*) es una proteína homóloga a p47^{phox} descubierta posteriormente, que comparte un 25% de identidad con ésta. Su función es similar a la de p47^{phox}, sustituyéndola en la activación de Nox1 y Nox3 ⁵⁵. Sin embargo, su principal diferencia es que carece de la región autoinhibidora de p47^{phox}, de manera que se considera constitutivamente activa, aunque la fosforilación por PKC aumenta su afinidad por NoxA1 y le permite una mejor interacción con p22^{phox} ⁵⁷.

p67^{phox} y NoxA1:

p67^{phox} es otra subunidad necesaria para la activación del complejo Nox2, y cuya función se considera activadora, ya que posee un dominio que es absolutamente necesario para la producción de O₂^{•-} ⁵⁸, además de suponer el mecanismo de unión de p40^{phox} al complejo. Posee zonas susceptibles de fosforilación por ERK1/2 y p38MAPK, aunque no se conoce su función ^{56,57}.

NoxA1 (*Nox activator protein 1*) es un homólogo de p67^{phox} que comparte un 30% de identidad con ella, y que la sustituye también en la activación de Nox1 y Nox3 ⁵⁵. Al contrario que p67^{phox}, NoxA1 posee una región rica en prolinas en su

extremo N-terminal donde son capaces de unirse las proteínas Tks4 (*Tyrosine kinase substrate with 4 SH3 domains*) y Tks5, que también poseen una función homóloga a p47^{phox}, promoviendo la unión de NoxA1 a Nox1 y la generación de ROS ⁵⁹. NoxA1 es susceptible de fosforilación en varios residuos de serina por la proteína quinasa A (PKA), PKC, ERK1/2 o p38MAPK, lo que disminuye la generación de ROS por el complejo de Nox1, mientras que la fosforilación en tirosina por Src provoca un aumento de su actividad ⁶⁰.

p40^{phox}:

Es una subunidad reguladora únicamente del complejo de Nox2. En estado basal se suele encontrar en el citoplasma celular, donde es estabilizada por su unión a p67^{phox}. La fosforilación de p40^{phox} por PKC aumenta la afinidad del complejo p67^{phox}-p40^{phox} por el citocromo b₅₅₈, y su reclutamiento hacia fagolisosomas ⁵⁶.

DuoxA1 y DuoxA2:

Las proteínas DuoxA1 (*Duox activator protein 1*) y DuoxA2 son subunidades necesarias para el correcto transporte y maduración de las enzimas Duox1 y Duox2 (respectivamente) a través de los orgánulos celulares, y su localización final en la membrana plasmática ⁶¹. Aunque pueden actuar de forma cruzada, por ejemplo DuoxA1 junto con Duox2, se pierde efectividad en el proceso y supone la transformación de parte del flujo de electrones como O₂^{•-} en lugar de H₂O₂ ⁶², por lo que estas subunidades pueden estar involucradas en el mecanismo de generación de las ROS.

Rac:

Las proteínas Rac son una subfamilia de 4 miembros dentro de las Rho GTPasas, conocidas principalmente por su papel en la reorganización del citoesqueleto de actina durante muchos procesos celulares. Debido a estas funciones propias no relacionadas con la actividad NADPH oxidásica, no se consideran específicamente como subunidades Nox.

Las proteínas Rac únicamente son necesarias para la activación de las enzimas Nox1, Nox2 y Nox3 ⁵⁵. Los dos miembros involucrados en la actividad de NADPH oxidasas son Rac1, cuya expresión es ubicua y parece actuar en la

activación de NADPH oxidasas en macrófagos y monocitos circulantes; y Rac2, que se expresa principalmente en células mieloides y es el miembro asociado a la activación de NADPH oxidasas en neutrófilos circulantes ⁶³. En estado basal se encuentran secuestradas en su forma GDP inactiva en el citoplasma por proteínas reguladoras Rho-GDI, que impiden su paso a la forma GTP activa. La señal de activación provoca la disociación de Rho-GDI, dejando libre a la proteína Rac, la cual pasa a su forma GTP activa y se desplaza a la membrana donde se une a p67^{phox} y al citocromo b₅₅₈, activando el complejo ^{63,64}.

I.5.B - Localización subcelular

Al ser proteínas transmembrana la forma activa de las NADPH oxidasas se encuentra en las membranas celulares, siendo la membrana plasmática la única zona donde se ha detectado la presencia de todas ellas ⁵². De hecho, Nox3 y las enzimas Duox1 y Duox2 no se han detectado en ninguna otra membrana subcelular. A pesar de esto, la membrana plasmática no es una estructura homogénea con un contenido similar en todas sus partes, sino que posee diferentes dominios especializados en determinados procesos. Por ello, su presencia en diferentes regiones puede dar lugar a diferentes funciones. Los “*lipid rafts*” o cúmulos lipídicos suelen ser regiones donde se unen con mayor afinidad proteínas transmembrana como receptores acoplados a proteína G, receptores tirosina quinasa, canales iónicos o transportadores. De esta forma, se considera que son regiones organizadoras de diferentes procesos celulares, ya que pueden concentrar a sus diversos integrantes ⁶⁵. Uno de esos procesos posiblemente sea la señalización redox, ya que muchos receptores, NADPH oxidasas, peroxiporinas (acuaporinas que permiten el paso de H₂O₂ además de agua) e incluso Src quinasa y PTPs se han identificado conjuntamente en estas regiones ^{52,65}.

Actualmente se ha detectado la presencia en caveolas de Nox1 ⁶⁶ y Nox5 (en respuesta a estimulación por fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato) ⁶⁷; en endosomas-redoxosomas la de Nox1 y Nox2 ⁶⁸⁻⁷⁰; la de Nox2 en lamelipodio ⁷¹; y la de Nox1 y Nox4 en invadopodia ⁷². De hecho, la formación de invadopodia parece depender de la producción de ROS mediada por NADPH oxidasas ⁷³. También se ha encontrado la presencia de Nox4 en adhesiones focales ⁶⁶.

En cuanto a membranas de orgánulos intracelulares, los que mayor variedad de NADPH oxidasas presentan son el retículo endoplásmico y la membrana de la zona perinuclear, donde se ha detectado la presencia de Nox1^{74,75}, Nox2^{72,76}, Nox4^{77,78} y Nox5^{79,80}, pudiendo tener importancia en las modificaciones postraduccionales de proteínas y en la regulación de factores de transcripción. Finalmente, Nox4 también está presente en la membrana mitocondrial⁸¹, siendo hasta el momento el único miembro de la familia localizado en este orgánulo, lo que puede significar que tiene un papel muy importante en la relación ROS-mitocondria-metabolismo⁸².

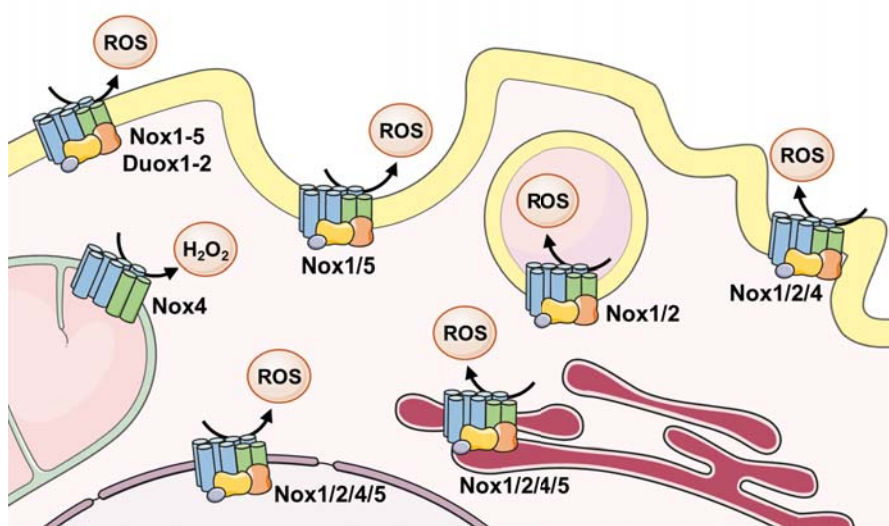


Figura 10- Localización subcelular de las diferentes NADPH oxidasas.

I.5.C - Nox2

Fue la primera en descubrirse, estando presente en los conocidos como fagocitos profesionales, principalmente neutrófilos y monocitos/macrófagos. Estas células se encuentran distribuidas por el organismo en busca de cualquier rastro químico microbiológico o señal de citoquinas inflamatorias, y cuando lo encuentran se desplazan e infiltran en los tejidos hasta dar con el patógeno responsable para fagocitarlo y eliminarlo. En este proceso Nox2 es la principal responsable del estallido respiratorio, situándose en la membrana de los fagosomas donde genera concentraciones extremadamente altas de O₂^{•-} que se transforman

en ROS de todo tipo, e incluso en moléculas de actividad microbicida mucho más potente, como el HOCl generado a partir del H₂O₂ y Cl⁻ por acción de la mieloperoxidasa.

Al ser la NADPH oxidasa más relacionada con el sistema inmune es muy abundante en tejidos hematopoyéticos como la médula ósea, nódulos linfáticos o bazo, pero también se expresa en multitud de otros tejidos: pulmón, vejiga, colon, intestino, cerebro, hígado, riñón, ... aunque esta expresión puede estar en parte adulterada por la presencia de células hematopoyéticas maduras en estos tejidos.

El complejo activo de Nox2 está formado por ésta, por las subunidades p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} y p40^{phox}, y por la GTPasa Rac ⁵⁵ (Fig. 11).

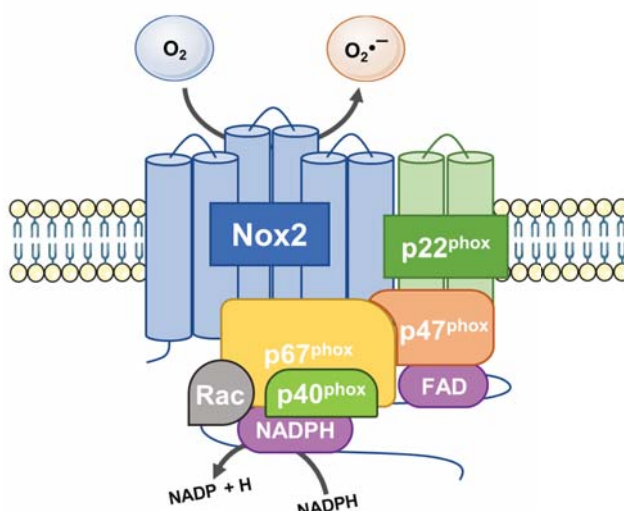


Figura 11- Complejo activo completo de Nox2.

Funciones conocidas:

Durante la respuesta inmune Nox2 no solo está involucrada en la generación de compuestos microbicidas, sino que también parece necesaria para una correcta quimiotaxis y capacidad invasiva de los fagocitos ⁸³, y para la producción de múltiples sustancias inmunes por parte de estos, como citoquinas inflamatorias (IL-1, IL-6, TNF- α), quimioquinas atrayentes de fagocitos (CXCL8, CCL3, CCL4) o lípidos bioactivos (prostaglandinas, leucotrienos,...) ^{84,85}. Incluso es importante para la formación de las trampas extracelulares de neutrófilos (NETs), mallas de cromatina recubiertas con proteínas antimicrobianas y liberadas por los

neutrófilos al espacio extracelular para atrapar y acabar con multitud de microorganismos ⁸⁶. Otras células fagocíticas en las que realiza funciones similares son la microglía o las células dendríticas, dónde también es importante en el procesamiento de antígenos previamente a su presentación a células T ⁸⁷.

Además de su inestimable actividad durante toda la defensa inmunitaria, se han descubierto muchas otras funciones en las que interviene Nox2:

- Se expresa en los tres tipos celulares más importantes de los vasos sanguíneos (células endoteliales -ECs-, vSMCs y fibroblastos de la capa adventicia), siendo la NADPH oxidasa predominante en los fibroblastos adventicios ⁸⁸. En todas ellas interviene en la proliferación y migración celular, estando involucrada en el mantenimiento del tono vascular inducido por angiotensina II y en la respuesta a factores angiogénicos VEGF y angiotensina I ⁸⁹.
- Se encuentra involucrada en la regulación de la secreción de insulina por parte de las células β pancreáticas ⁹⁰.
- La generación de ROS mediante Nox2 permite la activación de los flujos de Ca^{2+} necesarios para el correcto funcionamiento de las células musculares cardíacas ⁹¹.
- Ha sido relacionada con la plasticidad sináptica y la memoria dependientes del hipocampo ⁹².
- Parece estar implicada en la regulación de la diferenciación de células madre pluripotentes inducidas de ratón (miPSC) a células endoteliales arteriales (miPSC-EC) ⁹³.

Patologías en las que interviene:

Lógicamente, la mayor patología con la que está relacionada es la ya comentada CGD, en la que la ausencia de la actividad de Nox2 impide la correcta realización del estallido respiratorio de los fagocitos, generando una inmunodeficiencia muy importante, además de otras múltiples complicaciones ⁹⁴.

Las células fagocíticas son las responsables de los procesos de inflamación e infiltración de tejidos, y en caso de que estos procesos se cronifiquen aparecen lesiones relacionadas con la mayor producción de ROS por estas células. Por ello, Nox2 se considera la principal causante del daño tisular por exceso de ROS en patologías como la inflamación pulmonar aguda ⁹⁵, el síndrome de estrés

respiratorio, la artritis, autoinmunidad, ...⁹⁶. En enfermedades neuroinflamatorias⁹⁷⁻⁹⁹ u otras patologías como Alzheimer o Parkinson¹⁰⁰⁻¹⁰² también se ha observado una mayor activación de esta enzima, promoviendo una mayor generación de ROS y de citoquinas inflamatorias que participan en los procesos de neurodegeneración.

Nox2 es considerado un agente oxidante vascular, ya que el $O_2^{\bullet-}$ que genera es capaz de reaccionar con el NO^{\bullet} endotelial, el principal factor homeostático vascular, reduciendo su biodisponibilidad y generando $ONOO^-$, compuesto altamente reactivo y que desacopla la NOS endotelial (eNOS), generando aún más ROS y potenciando la disfunción endotelial⁸⁸. Por tanto, Nox2 parece ser un agravante de patologías como la hipertensión arterial, aterosclerosis, hipertensión pulmonar o hipertrofia y fibrosis de miocardio, donde su expresión se suele encontrar aumentada^{60,103,104}.

La regulación defectuosa de Nox2 también se ha relacionado con la falta de una buena respuesta inmune antitumoral. Es el caso de las células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) presentes en multitud de tumores, que ejercen un efecto supresor sobre el sistema inmune mediante el aumento de ROS por Nox2¹⁰⁵, o la formación de redes de macrófagos asociados a tumores (TAM), que sobreexpresan Nox2 y cuyas ROS parecen contribuir al crecimiento tumoral¹⁰⁶.

Su sobreexpresión también puede estar relacionada con otras patologías como la hipertensión renal¹⁰⁷, diabetes mellitus tipo 2¹⁰⁸ o nefropatía diabética¹⁰⁹.

I.5.D - Nox1

Fue el primer homólogo descrito de Nox2¹¹⁰, cuya expresión principal se encontró en colon, próstata, útero y músculo liso vascular, pero no en células fagocitarias, lo cual confirmaba la existencia de otras NADPH oxidasas cuya función no se centraba en el estallido respiratorio del sistema inmune. Posteriormente se ha comprobado su presencia también en cerebro, estómago, riñón, hígado, glándulas salivares, tráquea, timo o pulmón.

El complejo activo está formado por Nox1 y $p22^{phox}$, que deben estar ancladas a la membrana, y las subunidades citosólicas NoxO1 y NoxA1, además de la proteína de unión a GTP Rac⁵⁵ (**Fig. 12**). A pesar de la homología entre $p47^{phox}$ y NoxO1, y $p67^{phox}$ y NoxA1, Nox1 es mucho más específica de las segundas, ya que al utilizar las subunidades *phox* se detecta poca activación.

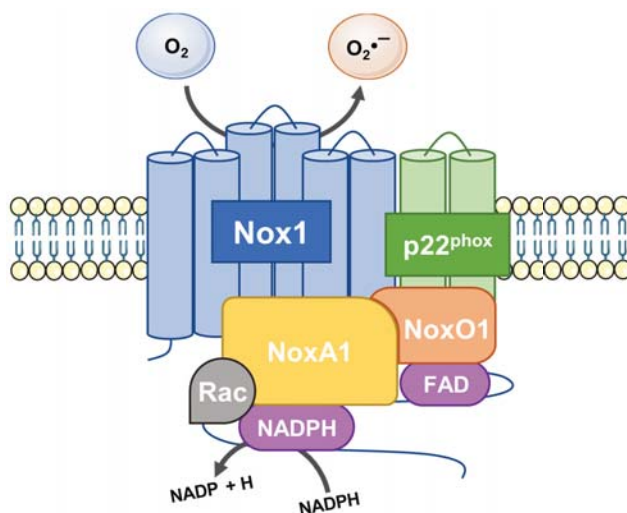


Figura 12- Complejo activo completo de Nox1.

Como se ha comentado anteriormente, la diferente fosforilación de NoxA1 por diferentes quinasas puede modular la actividad del complejo ⁶⁰, y además posee la capacidad de activarse por la unión de los homólogos de p47^{phox} Tks4 y Tks5, que son capaces de dirigir el complejo hacia zonas específicas como el invadopodia ^{59,111}. Por ello, es posible que Nox1 realice diferentes funciones mediante diferentes mecanismos de señalización dependiendo del agonista que active su señal y de la subunidad reguladora que promueva su ubicación y activación. Por ejemplo, en respuesta a activación por citoquinas como TNF- α , Nox1 es endocitada en vesículas en las que genera ROS, proceso necesario para la posterior activación de NF- κ B ⁶⁸. En cambio, en respuesta a factores de crecimiento como la trombina no necesita ser endocitada, sino que se activa en la propia membrana generando ROS que activan metaloproteasas y provocan la liberación del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y la posterior activación de su receptor EGFR ¹¹².

Funciones conocidas:

La función principal estimada para esta enzima es promover el crecimiento y proliferación celular, ya que su expresión aumenta en respuesta a multitud de factores de crecimiento (PDGF, KGF, Prostaglandina F2, uPA, ...). Pero también interviene en otros procesos:

- Al igual que Nox2, Nox1 se expresa en los principales tipos celulares vasculares, aunque en este caso es la NADPH oxidasa predominante en las vSMCs ⁸⁸. Como su mayor función es promover la proliferación celular su efecto vascular es similar al de Nox2, estando relacionada con el mantenimiento del tono vascular en respuesta a angiotensina II y otros factores de crecimiento. También actúa en la señalización pro-inflamatoria mediante la activación de NF-κB ¹¹³ y promueve la angiogénesis en respuesta a la citoquina IL-1β ¹¹⁴.

- Parece estar involucrada en los mecanismos de adaptación pulmonar a grandes alturas o a hipoxia, mediante la activación de HIF-1 ¹¹⁵

- Controla el destino de las células progenitoras de colon durante su proliferación y diferenciación, equilibrando el balance entre células absorbentes y células caliciformes ¹¹⁶.

- Actúa como regulador negativo de la diferenciación neuronal ¹¹⁷.

- Está involucrada en la percepción del dolor inflamatorio, como la hiperalgesia térmica o mecánica ¹¹⁸, y en la respuesta analgésica a los opiáceos ¹¹⁹.

Patologías en las que interviene:

La actividad de Nox1 genera la formación de O₂•⁻, así que también es considerada un oxidante vascular que reduce la biodisponibilidad del NO• endotelial y produce disfunción endotelial ⁸⁸. Se encuentra aumentada en lesiones vasculares como hipertensión pulmonar o las etapas iniciales de aterosclerosis, promueve la angiogénesis tumoral y está involucrada en los daños por isquemia/reperfusión ^{60,113}.

Puede ser causante del desarrollo de enfermedad pulmonar obstructiva crónica en respuesta a agentes nocivos como el humo de tabaco ¹²⁰.

Nox1 se encuentra sobreexpresada en diversos tipos de carcinomas: cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer gástrico por *H. pylori*, y melanoma. En este último puede desencadenar la transición epitelio-mesenquimal típica de células cancerosas que inician la metástasis ¹²¹.

Su sobreexpresión también se ha encontrado relacionada con otras patologías como la hipertensión renal ¹⁰⁷ o la enfermedad de Parkinson ^{122,123}.

I.5.E - Nox3

Junto a Nox1 son los dos miembros de la familia que mayor homología comparten con Nox2. Nox3 es la NADPH oxidasa menos extendida de todas ya que en el adulto sólo se encuentra de forma abundante en el oído interno, donde tiene un papel fundamental en la generación de la otoconia y el correcto funcionamiento del aparato vestibular. También está presente en cantidades muy bajas en cráneo y cerebro, y sobre todo es más abundante en los tejidos en etapa embrionaria (riñón, hígado, pulmón y bazo). Este reducido patrón de expresión posiblemente se deba a que fue la última en surgir evolutivamente ⁵³, de manera que ha tenido menos tiempo que el resto de la familia para desarrollarse e implicarse en funciones biológicas.

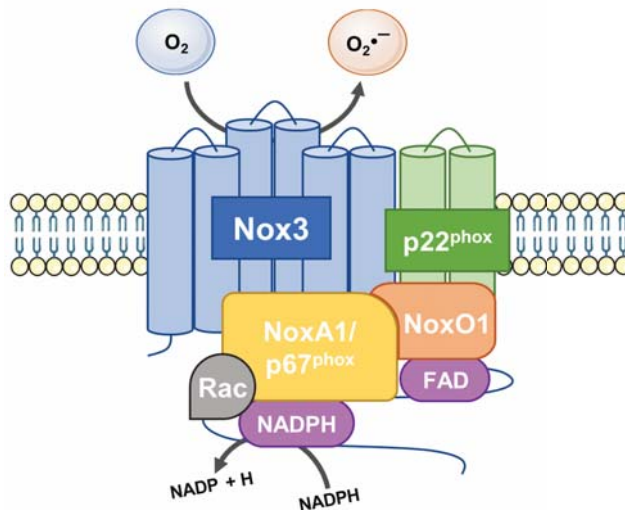


Figura 13- Complejo activo completo de Nox3.

Para la activación completa de Nox3 se requiere de la unión de p22^{phox}, de las subunidades NoxO1 y NoxA1, y de la GTPasa Rac (**Fig. 13**), aunque se ha visto que sin la unión de NoxA1 también se alcanza un nivel de actividad bastante elevado ¹²⁴. De hecho, la eliminación de Nox3 ¹²⁵, de p22^{phox} ¹²⁶ o de NoxO1 ¹²⁷ están relacionados con problemas en el equilibrio, efecto que no se observa con la pérdida de NoxA1 ¹²⁸. Además, la sustitución de NoxA1 por su homólogo p67^{phox} produce una activación similar, por lo que Nox3 no parece ser específico de

ninguna de las dos subunidades ¹²⁴. Sin embargo, si NoxA1 es la subunidad que se encuentra actuando, las proteínas Tks4 y Tks5 también pueden tener efecto activador sobre Nox3, al igual que en el caso de Nox1 ¹¹¹. En todas estas situaciones la activación de Nox3 es independiente de PMA (forbol 12-miristato-13-acetato), mientras que, si en lugar de NoxO1 se introduce a p47^{phox} como organizador, su activación sí se hace dependiente de PMA por su necesidad de fosforilación mediante PKC para actuar ¹²⁴. Esto hace que Nox3 posea una versatilidad muy interesante según las subunidades reguladoras con las que actúe.

Funciones conocidas:

A parte de su función esencial en la formación de la otoconia se conoce que:

- Nox3 puede desempeñar un papel importante en la mediación del efecto de la insulina durante el desarrollo embrionario, ya que promueve la activación del factor de transcripción Sp1 en respuesta a ésta ¹²⁹.
- La actividad de Nox3 parece estar involucrada en la proliferación y en el potencial de autorrenovación de las células madre espermato-goniales, dónde podría actuar de forma coordinada con Nox1 ¹³⁰.

Patologías en las que interviene:

A pesar de ser una enzima mínimamente detectable a nivel del endotelio pulmonar o de los vasos sanguíneos, se ha encontrado un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) dentro del gen *Nox3* que se ha asociado con susceptibilidad a padecer hipertensión pulmonar ¹³¹.

El aumento de expresión de Nox3, y de las ROS generadas por éste, puede favorecer la aparición de enfisema pulmonar ¹³².

Finalmente, en relación con su capacidad de respuesta a insulina, Nox3 ha demostrado ser la principal fuente de ROS en un modelo de generación de resistencia a insulina en respuesta a palmitato ¹³³. Y dado que hay una mayor sobreexpresión de Nox3 en tejido cerebral de pacientes con enfermedad de Alzheimer ¹³⁴, y que se ha vinculado la falta de respuesta a insulina en el cerebro con la deficiencia en acetilcolina de esta enfermedad ¹³⁵, es posible que Nox3 también esté involucrada en esta patología.

I.5.F - Nox4

Inicialmente denominada renox por estar presente principalmente en riñón¹³⁶, es el último miembro de la familia que depende de la unión con p22^{phox}. Posteriormente también se ha comprobado su expresión en páncreas, placenta, ovario, testículo, músculo esquelético, endotelio vascular y pulmón entre otros.

A diferencia del resto de miembros dependientes de p22^{phox}, Nox4 no requiere de la unión de ninguna otra subunidad adicional para su activación, sólo con la unión de p22^{phox} se considera activa (**Fig. 14**), y por tanto su regulación se llevaría a cabo mediante el control de su transcripción. Estados de hipoxia (en células de músculo liso arterial pulmonar), TGF- β , cannabidiol (en células leucémicas) y 7-quetocolesterol (en células del músculo liso aórtico) son algunos de los estímulos que inducen una mayor expresión de Nox4¹³⁷. A pesar de no requerir más subunidades para activarse, sí que han surgido ciertas proteínas que parecen regular parcialmente su actividad: la proteína 2 de interacción con polimerasa- δ (Poldip2) puede activar Nox4 en vSMCs¹³⁸, Tks5 parece activar Nox4 al menos en células B16-F10 de melanoma⁷³, y el clon-5 inducible por H₂O₂ (Hic-5) la regula negativamente a nivel postraduccional, favoreciendo su degradación por el proteasoma¹³⁹. Además, también parece ser regulada negativamente por la unión de ATP, pudiendo llegar a actuar como un sensor energético en la mitocondria⁸².

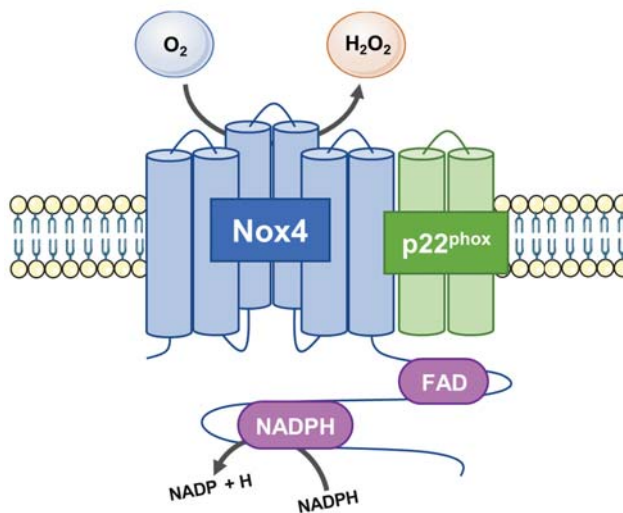


Figura 14- Complejo activo completo de Nox4.

El hecho de que Nox4 tenga una expresión tan ubicua, tanto a nivel subcelular como de tipos celulares y tejidos en los que se expresa, y de que su activación sea constitutiva, ha llevado a sugerir que pueda actuar como un gen de mantenimiento (*housekeeping*). Es más, la región promotora del gen *Nox4* es muy similar a las islas CpG comunes de los genes de mantenimiento, y hasta ahora no se ha descrito ninguna mutación espontánea que suponga la pérdida de función de *Nox4* en humanos ni mamíferos ¹⁴⁰. Sin embargo, sí se han creado ratones deficitarios para *Nox4* en varios laboratorios, y en ningún caso se ha observado ningún fenotipo ni patología específica. Por tanto, es posible que esté involucrada en la regulación de múltiples procesos esenciales y funciones clave, que por lo general poseen mecanismos redundantes de regulación ¹⁴⁰.

Como última característica diferencial de *Nox4*, se estima que el 90% de su flujo de electrones genera H_2O_2 , y solamente el 10% restante es transformado en $\text{O}_2^{\bullet-}$. El causante de esta anomalía parece ser el lazo-E que conecta las regiones transmembrana V y VI por la parte exterior de la membrana. Este segmento es más largo en *Nox4* y posee una histidina en la posición 222 que es esencial para esta función “dismutasa”, ya que mutaciones en este residuo provocan que el principal compuesto generado sea $\text{O}_2^{\bullet-}$ ¹⁴¹. El modelo teórico que explica esta actividad propone que el $\text{O}_2^{\bullet-}$ generado por la unión del primer electrón desde el grupo hemo B forma un intermedio estable con éste gracias a un protón cedido por la His-222 (hemo B:HO $_2^{\bullet}$). Este intermediario facilita que al llegar el segundo electrón (y uniéndose otro protón) se pueda formar H_2O_2 en lugar de que se libere simplemente el $\text{O}_2^{\bullet-}$ ¹⁴². Marginalmente, a partir del intermediario también escaparía una pequeña parte del flujo en forma de $\text{O}_2^{\bullet-}$.

Funciones conocidas:

Los principales efectos que induce *Nox4* en multitud de tipos celulares son regular la diferenciación celular ⁷² y promover la proliferación y migración celular y la apoptosis inducida por $\text{TNF-}\alpha$ y $\text{TNF-}\beta$, actuando mediante vías de señalización diferentes según el tipo celular ¹⁴³. Pero también está involucrada en otras funciones:

- En el riñón se sabe que interviene en la secreción de eritropoyetina, la regulación renal de la presión arterial, la regulación de la síntesis de proteínas de células mesangiales y en la inmunidad innata ⁹⁶.

- Se encuentra presente en todos los tipos celulares vasculares, donde participa en las vías de señalización de proliferación, migración y diferenciación celular, aunque es la NADPH oxidasa que predomina en las células endoteliales ⁸⁸. Además, Nox4 posee la capacidad de responder rápidamente a cambios en la concentración de oxígeno en el rango fisiológico, pudiendo actuar como un auténtico sensor de O₂ ¹⁴². Esto hace que esté muy implicada en procesos de remodelado vascular y de angiogénesis fisiológica ⁶⁰.
- Está implicada en la secreción de insulina en respuesta a glucosa por los islotes pancreáticos, y en la señalización en respuesta a insulina de diferentes tejidos ¹⁴⁴.
- El H₂O₂ generado por Nox4 es necesario para la actividad de miofibroblastos, siendo muy importante en la reparación de tejidos y en la fibrosis mediada por éstos ¹⁴⁵.
- Su actividad es importante para la osteoclastogénesis ¹⁴⁶.

Patologías en las que interviene:

Al contrario que el resto de NADPH oxidasas vasculares, Nox4 es considerada un protector vascular, ya que el H₂O₂ que produce no reduce la biodisponibilidad del NO• endotelial, e incluso es capaz de inducir la actividad de la eNOS ¹⁴³, de manera que inhibe la inflamación vascular y la angiogénesis patológica ⁶⁰, y parece prevenir la aterosclerosis ¹⁴⁷. Sin embargo, el exceso de H₂O₂ en vSMCs también puede generar fibrosis, apoptosis e incluso necrosis, viéndose un aumento de expresión de Nox4 en lesiones vasculares avanzadas ⁸⁸.

Parece que Nox4 participa activamente en la hipercontractilidad de las células de musculo liso respiratorio de individuos asmáticos ¹⁴⁸.

Nox4 es la NADPH oxidasa que se expresa con más frecuencia en las líneas celulares tumorales, siendo posiblemente la fuente principal de ROS en melanoma y glioblastoma ¹⁴⁹⁻¹⁵¹. Está implicada tanto en el inicio como en la progresión y la metástasis tumoral, y puede llegar a generar la resistencia de células tumorales a los agentes quimioterápicos ^{82,152}.

Otras patologías donde se ha encontrado un aumento en la expresión de Nox4 son la hipertensión central ¹⁵³, hipertensión pulmonar ¹⁵⁴ y nefropatía diabética ¹⁵⁵.

I.5.G - Nox5

Fue el último miembro de la familia descrito, cuya expresión se encontró principalmente en bazo y testículos, por lo que se le supuso una función en la biología de linfocitos y en la espermatogénesis, pero también se expresa en próstata, ovario, placenta, útero, páncreas, médula ósea y músculo liso vascular.

Estructuralmente es la más básica de todas, ya que no requiere de la unión de ninguna subunidad proteica para su actividad, ni siquiera de p22^{phox}, sino que posee 4 dominios en mano EF de unión a Ca²⁺ y es regulada directamente por éste (**Fig. 15**). Por tanto, al contrario que el resto de NADPH oxidasas, no necesita formar un complejo multiproteico para su activación. Contiene un sitio de unión para CaM en su dominio C-terminal que la sensibiliza al Ca²⁺, de manera que una vez unida es capaz de activarse con niveles de Ca²⁺ intracelulares más bajos ¹⁵⁶. Adicionalmente, la actividad de Nox5 también puede regularse mediante fosforilación por varias quinasas (MAPK, PKC o CaMKII) que de nuevo facilitan su activación con menores niveles de Ca²⁺ ^{79,157,158}.

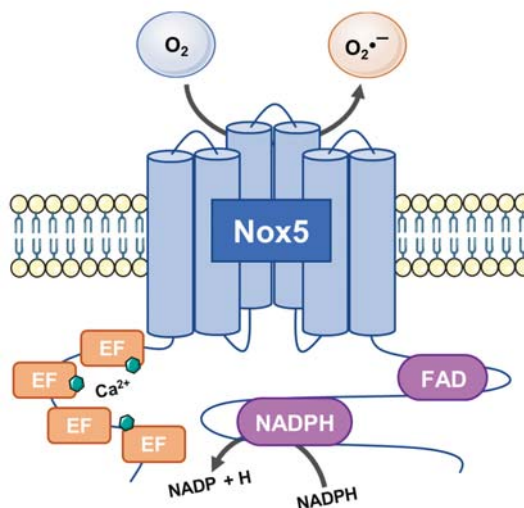


Figura 15- Estructura activa de Nox5.

Esta estructura tan básica de Nox5, junto a que los límites entre exones e intrones de su gen son muy diferentes al resto de miembros de la familia, que poseen una estructura mucho más conservada, hace pensar que existe una

considerable distancia evolutiva entre Nox5 y el resto de NADPH oxidasas, y por ello se le supone la NADPH oxidasa humana más cercana a la Nox primordial ^{4,53}.

Funciones conocidas:

A Nox5 no se le conoce una función esencial principal ni se ha descrito ninguna patología asociada a su deficiencia. De hecho, no se encuentra presente en animales tan cercanos a los humanos como los roedores, por lo que su función debe poder ser compensada por la actividad de otra enzima de la familia, o no ser muy importante en animales de vida media muy corta. También debido a esto, el estudio de sus funciones *in vivo* es mucho más complicado que con el resto de miembros de la familia.

- Nox5 ha sido implicada en la regulación de la motilidad del esperma y su fusión con el ovocito ¹⁵⁹.
- En el sistema vascular Nox5 se expresa en endotelio, vSMCs y fibroblastos, aunque en ninguna de ellas es la NADPH oxidasa más abundante ⁸⁸. Como efectos directos, se ha visto que actúa en la proliferación de vSMCs en respuesta a PDGF ⁸⁸, su sobreexpresión induce el crecimiento microvascular endotelial ¹⁶⁰, y las ROS derivadas de su actividad intervienen en la angiogénesis regulada por SDF-1 α ⁶⁰.

Patologías en las que interviene:

A pesar del desconocimiento de su función principal, es importante destacar que Nox5 se encuentra sobreexpresada en multitud de estados patológicos en el hombre.

Al generar O₂^{•-} se le supone una actividad de disfunción endotelial similar a la citada para Nox1 y Nox2, de manera que un exceso de activación conllevaría efectos vasculares negativos. Prueba de ello es que su expresión y actividad se ve aumentada en caso de hipertensión, enfermedad arterial coronaria y aterosclerosis ¹⁶¹⁻¹⁶³, postulándose en ésta última como la principal responsable del aumento de ROS ¹⁶⁴.

La expresión de Nox5 se encuentra aumentada en muchos tipos de cáncer o líneas celulares tumorales, incluyendo cáncer de mama, de endometrio, de tiroides, de próstata, de esófago, hepatocarcinoma, glioblastoma, melanoma, o leucemia de células peludas ¹⁶⁵⁻¹⁶⁹. Su eliminación en alguna de estas líneas

celulares consigue reducir la proliferación y aumentar la apoptosis celular ¹⁷⁰, revelando su importante papel en la biología del tumor.

También se encuentra aumentada en otras patologías como en la hipertensión esencial en el riñón ¹⁵⁸ o en la nefropatía diabética ¹⁷¹, donde puede acelerar muchos de los procesos de progresión de la enfermedad ¹⁷².

I.5.H - Duox1/2

Duox1 y Duox2 son las proteínas más grandes de la familia, prácticamente triplican en aminoácidos a las demás NADPH oxidasas. Esto se debe a que, además del dominio deshidrogenasa y el dominio transmembrana, en su extremo N-terminal poseen 2 motivos en mano EF de unión a Ca^{2+} , una α -hélice transmembrana adicional y un dominio peroxidasa externo. La presencia de los motivos en mano EF haría pensar que su actividad depende únicamente de Ca^{2+} , al igual que pasa con Nox5, pero en realidad las Duox también requieren de la unión de las subunidades DuoxA1 y DuoxA2, respectivamente, para completar su maduración postraduccional, localizarse adecuadamente en la membrana plasmática, y posiblemente para la efectiva formación de ROS ^{61,62} (Fig. 16). El producto mayoritario detectado tras su actividad es H_2O_2 , aunque aún no se conoce el mecanismo exacto por el que éste se produce.

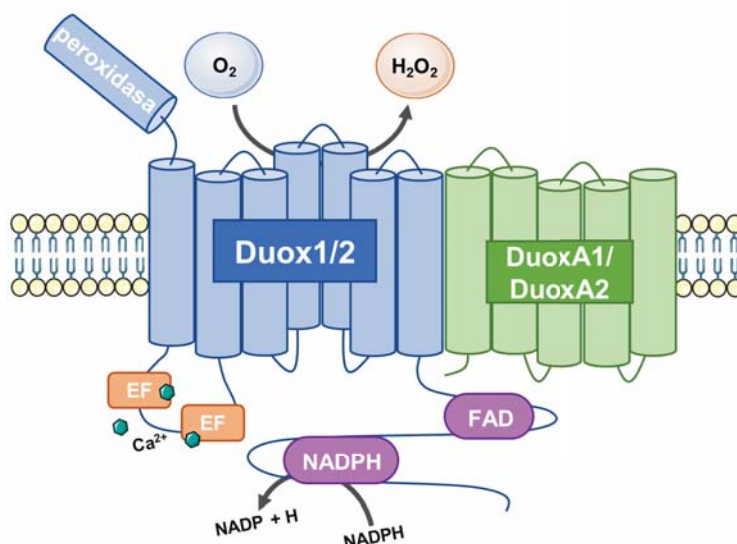


Figura 16- Complejo activo completo de Duox1/Duox2.

El principal órgano dónde se expresan ambas enzimas es el tiroides, en el que su papel fundamental es generar el H_2O_2 necesario para oxidar al yoduro durante la síntesis de las hormonas tiroideas ^{173,174}. En este sentido, Duox2 parece ser la principal efectora, ya que mutaciones de pérdida de función en su gen suponen la aparición de hipotiroidismo ¹⁷⁵, a pesar de que Duox1 se encuentre con plena capacidad activa. También se encuentran presentes en otros tejidos: Duox1 es abundante en pulmón, y en menor medida en placenta, testículos, próstata, páncreas, corazón y riñón; Duox2 se expresa en colon, testículos, páncreas, hígado, pulmón y próstata ¹⁷⁶.

Funciones conocidas:

A parte de su función esencial en la generación de las hormonas tiroideas, se conoce que Duox1/2:

- Se encuentran presentes en la mayoría de zonas epiteliales del aparato digestivo, donde se piensa que actúan en la defensa contra patógenos al proporcionar el H_2O_2 necesario para generar hipotiocianito ($OSCN^-$) por la lactoperoxidasa ¹⁷⁷.
- En el epitelio pulmonar Duox1 se expresa de forma constitutiva y se considera que mantiene la actividad fisiológica normal ¹⁷⁸. En cambio, Duox2 se expresa en menor medida y aumenta sus niveles drásticamente en respuesta a citoquinas Th-1 (como $IFN-\gamma$) o activación de receptores TLR, por lo que parece que actúa en respuesta a infecciones virales ¹⁷⁸.

Patologías en las que intervienen:

Las ROS generadas por las Duox pueden contribuir a la patología de enfermedades pulmonares como el asma o la fibrosis quística ^{177,179,180}. En cambio, en el cáncer de pulmón se suele encontrar una reducción de la expresión de las Duox de forma epigenética, y la reintroducción de Duox1 parece mejorar la reparación tisular del epitelio ¹⁸¹.

En caso de cáncer de tiroides, la expresión de las Duox puede actuar como marcador predictivo del pronóstico de la enfermedad ¹⁸².

I.6 - HEMATOPOYESIS

Uno de los grandes saltos biológicos que sucedieron durante la evolución fue la aparición de organismos pluricelulares, organizados para un funcionamiento celular común mucho más eficiente. Todos estos organismos surgen a raíz de una única célula capaz de multiplicarse y generar gran número de células con potencial para diferenciarse a los distintos tipos celulares que formarán al individuo. Por tanto, la diferenciación celular es uno de los procesos más importantes y variados que se pueden encontrar, ya que cada tipo celular presente en un organismo requiere de un patrón de diferenciación específico para desarrollarse.

Lógicamente, la diferenciación celular es indispensable durante el período embrionario, donde se tiene que dar lugar a todos los tejidos del individuo. Se podría pensar que posteriormente en el humano adulto no es un proceso tan fundamental, sin embargo, la mayoría de tejidos del organismo requieren de la continua regeneración de sus células a partir de la diferenciación de células madre adultas. Éstas son células con capacidad de autorrenovarse y de diferenciarse, y que generalmente son unipotentes, pueden diferenciarse a un solo tipo celular. Entre las pocas células madre adultas con capacidad multipotente encontramos a las células madre hematopoyéticas (HSCs), que son las células que se encargan de reponer todos los linajes de células sanguíneas durante toda la vida del individuo. Este proceso de diferenciación se denomina hematopoyesis y, aunque ha sido ampliamente estudiado, aún no está completamente aclarado debido a la gran complejidad que supone regular la generación de tal variedad de tipos celulares a partir de un único origen común.

La existencia de las HSCs comenzó a vislumbrarse en 1960, cuando Till y McCulloch utilizaron el conteo de colonias originadas en el bazo de ratones trasplantados de médula ósea para determinar el número de células viables y capaces de formar colonias presentes en médula ósea de ratón ¹⁸³. En estos experimentos determinaron que necesitaban inyectar alrededor de 10.000 células nucleadas de médula ósea para generar una sola colonia en el bazo del ratón receptor. La mayoría de esas células inyectadas estaban diferenciadas, por lo que se supuso que no eran capaces de generar nuevas células. Además, sólo podían contar las colonias formadas por células que llegaban al bazo, no las que anidaban en la médula ósea. Por ello, consideraron que lo más probable es que esas colonias

derivasen de muy pocas células, o incluso de una única célula. A partir de entonces, la ciencia ha pasado por un continuo desarrollo de técnicas para poder identificar y aislar esas células madre hematopoyéticas para su estudio.

Hoy en día lo más común es identificar las HSCs y las HPCs (células progenitoras hematopoyéticas, que suponen un paso más diferenciado que las HSCs y han perdido la capacidad de autorrenovarse, pero aún mantienen cierta capacidad de diferenciarse a varios tipos celulares) mediante marcadores específicos de superficie por medio de citometría. Sca-1, c-Kit (CD117), CD34 o los marcadores SLAM (CD150, CD48 y CD41) son de los marcadores de superficie más utilizados. En base a estos marcajes Weissman y colaboradores establecieron el modelo clásico de diferenciación hematopoyética, con una jerarquía en forma de árbol ¹⁸⁴⁻¹⁸⁷ (Fig. 17).

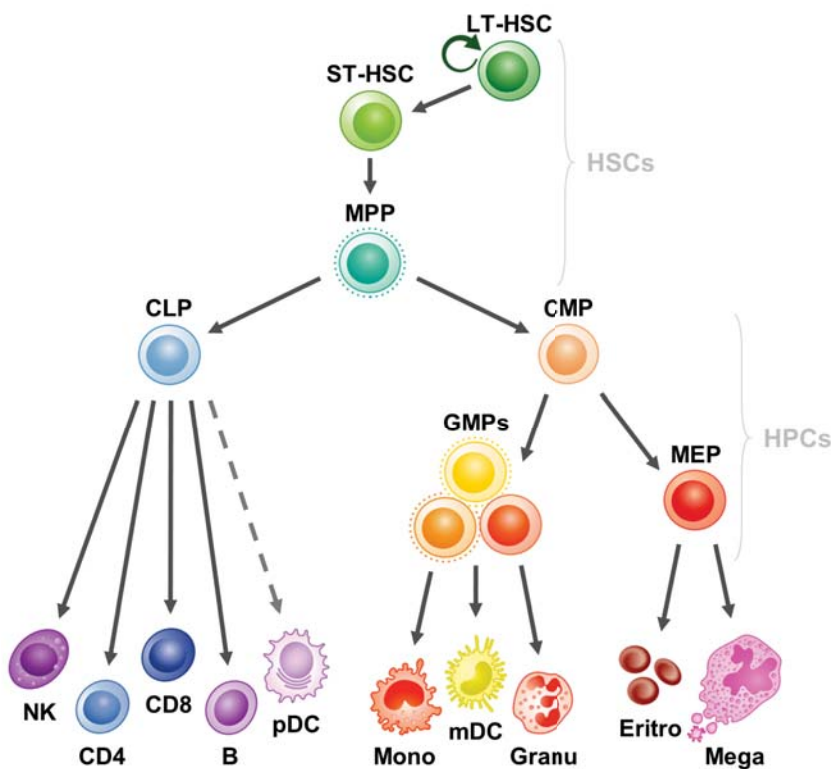


Figura 17- Modelo jerárquico tradicional de hematopoyesis. Más información en el texto. NK: células *natural killer*; CD4/CD8: linfocitos T CD4/8; B: linfocitos B; pDC: células dendríticas plasmáticas; mDC: células dendríticas mieloides; Mono: monocitos/macrófagos; Granu: granulocitos; Eritro: eritrocitos; Mega: megacariocitos. (Modificada de Bao et al., 2019 ¹⁸⁸).

En esta clasificación las HSCs se compondrían de 3 subtipos, siendo las LT-HSCs (del inglés *long term*) las células iniciales, al ser capaces de reconstituir el árbol hematopoyético al completo y durante largos periodos de tiempo (de ahí su nombre). Estas células se encuentran en su mayoría en estado quiescente ¹⁸⁹, y se activan de forma periódica para regenerar la reserva de LT-HSCs o para diferenciarse a ST-HSCs (del inglés *short term*), que siguen siendo capaces de reconstituir la hematopoyesis al completo, pero durante plazos más cortos de tiempo, y no son capaces de regenerar células LT-HSCs. Finalmente, las ST-HSCs se diferencian a células progenitoras multipotentes (MPPs) que pueden dar lugar a todos los linajes sanguíneos maduros, pero prácticamente no tienen capacidad de autorrenovación. A partir de este punto se encontrarían las HPCs, cuya diferenciación puede separarse en varios caminos generándose diversos progenitores celulares que solo darán lugar a determinados linajes celulares. En primer lugar, los MPPs se pueden diferenciar a CMPs (progenitores mieloides comunes) o a CLPs (progenitores linfoides comunes), que solo poseen capacidad de generar células mieloides y linfoides, respectivamente. En segundo lugar, los CMPs pueden diferenciarse a GMPs (progenitores de granulocitos-monocitos) o a MEPs (progenitores de megacariocitos-eritrocitos), con capacidad para generar esos subtipos celulares. Este modelo clásico ha sido muy útil para avanzar en los estudios sobre los procesos de diferenciación hematopoyética durante bastante tiempo, pero al fin y al cabo es una simplificación bastante limitada de la realidad, y hoy día ha evolucionado en varios aspectos.

Por un lado, se ha observado que alrededor de un 25% de las LT-HSCs expresan el factor von Willebrand (vWF) ¹⁹⁰, típicamente relacionado con las plaquetas y la hemostasia sanguínea. Estas LT-HSCs vWF⁺ son capaces de autorrenovarse y de generar LT-HSCs vWF⁻, mientras que el paso contrario no sucede, por lo que se situarían en el punto más alto de jerarquía hematopoyética (**Fig. 18**). Además, las LT-HSCs vWF⁺ no generan una hematopoyesis equilibrada, sino que tienden a generar principalmente megacariocitos y plaquetas de forma directa, sin pasar por medio de progenitores mieloides ¹⁹¹. De hecho, los megacariocitos y plaquetas son los únicos linajes celulares que pueden llegar a reponerse de forma exclusiva a partir de HSCs, sin que se reponga a su vez ningún otro tipo de célula sanguínea ¹⁹². De esta manera, parece claro que el desarrollo de los megacariocitos se puede producir de forma independiente al resto de linajes

sanguíneos mediante un mecanismo específico a partir del primer escalón de la hematopoyesis (**Fig. 18**).

Por otro lado, varios grupos de investigación han realizado una división dentro de la población de MPPs ^{189,193}, dando lugar a 4 subtipos: MPP1, MPP2, MPP3 y MPP4. MPP1 se correspondería con las anteriores ST-HSCs, mientras que MPP2-3-4 se encontrarían un paso más diferenciadas que MPP1, y serían poblaciones sin capacidad de autorrenovación, con una capacidad de repoblación mucho más corta, y totalmente independientes entre sí. Mientras que los progenitores MPP2 darían lugar principalmente a megacariocitos y eritrocitos, y los MPP3 al resto de células mieloides, los MPP4 serían los que generarían los linajes linfoides de manera prácticamente exclusiva, por lo que entre los tres subtipos cubrirían la renovación de todos los linajes hematopoyéticos (**Fig. 18**).

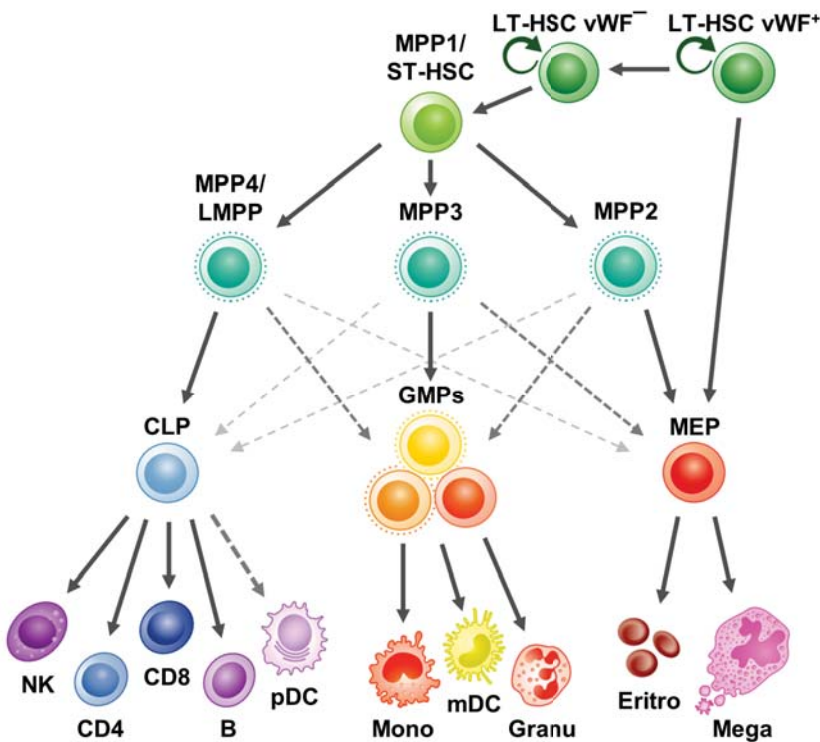


Figura 18- Modelo jerárquico de hematopoyesis más actualizado. Más información en el texto. LMPP: progenitores multipotentes comprometidos a linfoides; NK: células *natural killer*; CD4/CD8: linfocitos T CD4/8; B: linfocitos B; pDC: células dendríticas plasmáticas; mDC: células dendríticas mieloides; Mono: monocitos/macrófagos; Granu: granulocitos; Eritro: eritrocitos; Mega: megacariocitos.

Pero el cambio más importante del modelo hematopoyético se está viviendo durante los últimos años, gracias a las nuevas técnicas de secuenciación y análisis masivos de células únicas. Gracias a estas técnicas se ha podido comprobar la heterogeneidad que existe dentro de la población de HSCs, haciendo que, a pesar de que seamos incapaces de diferenciar fenotípicamente dos células en base a sus marcadores hematopoyéticos, éstas pueden ser distintas genotípicamente y estar ya preparadas para dar lugar a diferentes linajes ¹⁹⁴. Y, al contrario, células con diferente expresión de marcadores hematopoyéticos y que se encontrarían en diferentes escalones según el modelo clásico pueden no estar tan alejadas genéticamente y tener un potencial similar. De esta manera, las HSCs parecen decidir su destino celular de forma muy temprana, y las HPCs únicamente continúan ese camino hasta su destino celular final, aunque seguirían manteniendo cierta capacidad para desviarse hacia poblaciones adyacentes que compartieran un patrón de expresión semejante ^{195,196}. Así, sigue siendo posible encontrar células oligopotentes dentro de poblaciones como los GMPs o LMPPs (progenitores multipotentes comprometidos a linfoides) ¹⁹⁷. Por tanto, lo que anteriormente separábamos como diferentes tipos celulares en diferentes estratos según la expresión de determinados marcadores de superficie y su capacidad de generación de linajes, realmente a nivel genético es más un flujo continuo y difuso, sin separaciones ni estados celulares definidos (**Fig. 19**).

Por último, prácticamente todos los estudios *in vivo* realizados hasta ahora se han llevado a cabo mediante técnicas que indirectamente pueden producir la alteración de las células o del nicho hematopoyético (irradiación, estrés hematopoyético por falta de celularidad, trasplantes con cambios de concentración de oxígeno, ...), de forma que la mayoría de nuestro conocimiento no es sobre la hematopoyesis normal que tiene lugar en estado basal, sino sobre la hematopoyesis en estado de estrés. En los últimos años han surgido algunos estudios basados en modelos de ratón transgénicos que permiten marcar las células hematopoyéticas y poder realizar así un seguimiento posterior de las poblaciones originadas. De esta forma evitan las anteriores alteraciones y se evalúa mejor la hematopoyesis basal, aunque los resultados hasta ahora han sido bastante dispares. Por ejemplo, Sun et al. utilizan un modelo en el que la inducción con doxiciclina hace que la transposasa HSB movilice el único transposón de la construcción a una parte aleatoria del genoma, de forma que analizar la zona de inserción del transposón

permite discriminar entre la progenie de diferentes clones hematopoyéticos ¹⁹⁸. Además, las células que hayan respondido a la inducción pueden identificarse mediante la expresión de la proteína DsRed. Su análisis 40 semanas tras la inducción con doxiciclina indica que son las MPPs las que se encargan de mantener la hematopoyesis durante ese tiempo, sin apenas contribución de las LT-HSCs. En otro estudio, la inducción con tamoxifeno permite que las células *Tie2*⁺ (las HSCs más inmaduras) y su posterior progenie expresen la proteína fluorescente amarilla (YFP) ¹⁹⁹. En su análisis las células ST-HSCs son el pilar fundamental que mantiene la hematopoyesis basal en el adulto, mientras que el mayor aporte de las LT-HSCs se produce durante la vida fetal. Sin embargo, mediante otro modelo similar, la inducción con tamoxifeno promueve la expresión de la proteína fluorescente tdTomato únicamente en células *Pdzk1ip1*⁺ (aparentemente las HSCs más inmaduras) y su progenie, y los autores concluyen que el aporte de estas HSCs a la hematopoyesis basal es mucho más robusto e importante ²⁰⁰.

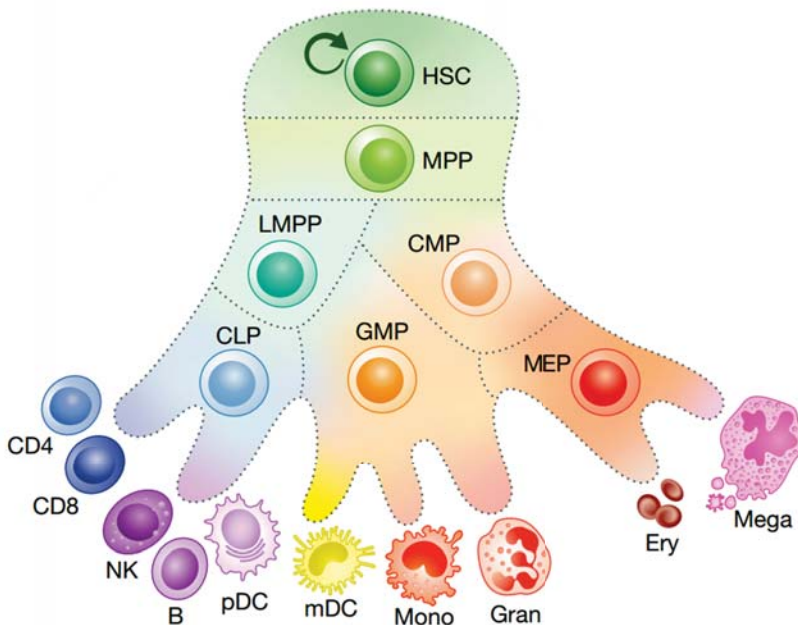


Figura 19- Modelo de hematopoyesis de flujo continuo. Más información en el texto. LMPP: progenitores multipotentes comprometidos a linfoides; NK: células *natural killer*; CD4/CD8: linfocitos T CD4/8; B: linfocitos B; pDC: células dendríticas plasmáticas; mDC: células dendríticas mieloides; Mono: monocitos/macrófagos; Gran: granulocitos; Ery: eritrocitos; Mega: megacariocitos. (Tomada de Bao et al., 2019 ¹⁸⁸).

I.6.A - ROS y hematopoyesis

Las HSCs son necesarias para mantener la hematopoyesis a lo largo de toda la vida del individuo, pero de forma normal la mayoría se encuentran en estado quiescente ¹⁸⁹, esperando a ser activadas. Este estado de quiescencia se caracteriza por tener una actividad celular mínima y un metabolismo basado en la glucólisis, sirviendo como mecanismo de protección ante cualquier efecto nocivo que se genere durante la actividad normal de las células y pueda acabar produciendo su senescencia. Por supuesto, uno de los principales factores de los que se protegen de esta manera es de las ROS. Las HSCs poseen unos niveles de ROS inferiores a las HPCs y células más maduras ^{201,202}, y el aumento de sus niveles de ROS promueve la pérdida de su capacidad de autorrenovación, su entrada en ciclo y su diferenciación celular ²⁰³⁻²⁰⁵ (**Fig. 20**). De hecho, dentro de una misma población de HSCs se pueden encontrar células con mayor o menor cantidad de ROS, y se ha observado que las células con menos ROS mantienen un perfil más quiescente y con plenas capacidades de reconstitución hematopoyética, mientras que las células con mayores niveles de ROS se encuentran más activas, dan lugar a una mayor proporción de células mieloides, y tienen una menor capacidad de mantener la reconstitución hematopoyética a largo plazo ²⁰⁶. Además, el tratamiento de la población de niveles elevados de ROS con el antioxidante NAC (N-acetilcisteína) o con un inhibidor de p38 (que contribuye al aumento de ROS en HSCs) restaura las capacidades de estas células a las de la población de niveles bajos de ROS ^{204,205}.

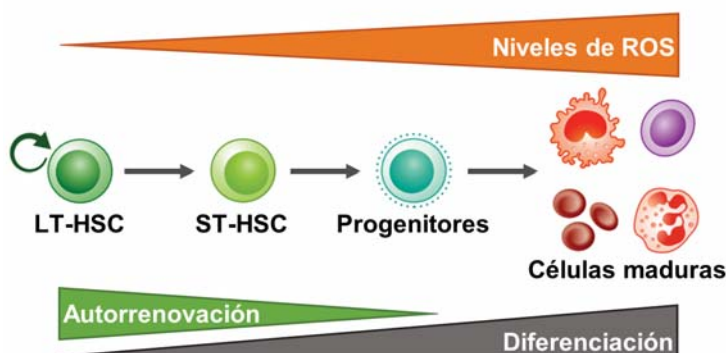


Figura 20- Evolución de los niveles de ROS con el proceso de maduración celular. En la hematopoyesis las células más inmaduras son las que presentan los niveles más bajos de ROS, y cuanto más aumentan sus niveles de ROS más avanzan en el proceso de diferenciación hematopoyética y menor capacidad de autorrenovación presentan.

Pero no todo consiste en eliminar las ROS, porque ya hemos visto que son compuestos muy necesarios para la regulación de multitud de vías de señalización, y este caso no iba a ser diferente. Se ha demostrado que una reducción severa de los niveles de ROS en HSCs provoca deficiencias en su capacidad de diferenciación celular, y con ello la pérdida de su capacidad de repoblación hematopoyética ²⁰⁷. Por tanto, es evidente que los niveles de ROS son un factor muy importante para las HSCs, que debe estar perfectamente regulado para mantener el potencial de sus capacidades de células madre. La regulación de estos niveles se produce de forma autónoma en las propias células mediante múltiples mecanismos: manteniendo un metabolismo muy bajo y basado en la glucólisis, lo que evita gran formación de ROS por la ETC; mediante la regulación de vías de señalización que promueven las ROS, como p38 ²⁰⁴ o AKT ²⁰⁷; o mediante factores de transcripción que estimulan los sistemas antioxidantes, como los FoxOs ²⁰⁸ o Nrf2 ²⁰⁹. Pero existe otro elemento fundamental en la regulación de las ROS de las HSCs, el nicho hematopoyético.

Con el término nicho denominamos al microambiente más cercano que se encuentra alrededor de las células, compuesto por aquellas otras células y elementos que son necesarios para su desarrollo y cuidado. Inicialmente se pensó que el nicho hematopoyético se localizaba en la zona endosteal de la médula ósea, ya que es la zona más alejada de los vasos sanguíneos y se había observado que las HSCs se localizaban en una zona situada al final del gradiente de oxígeno generado en la médula ósea ²¹⁰. Además, los osteoblastos parecían tener gran importancia en el mantenimiento de las HSCs ²¹¹. Sin embargo, posteriormente se ha comprobado que la zona perivascular posee realmente menor presión de oxígeno que la zona endosteal ²¹², y que en ella se sitúan las células endoteliales de médula ósea y las células madre mesenquimales estromales (MSCs), que han demostrado ser las células que realmente aportan SCF o CXCL12 a las HSCs ^{213,214}, factores esenciales para su supervivencia. De hecho, incluso el nicho perivascular es diferente dependiendo del tipo de vaso sanguíneo al que rodea ²¹⁵: las arterias y arteriolas por donde llega la sangre poseen un flujo rápido y están formadas por células endoteliales Sca-1⁺ y rodeadas por pericitos α -SMA⁺ (α -actina de músculo liso, marcador de miofibroblastos), proporcionando una barrera de muy baja permeabilidad que mantiene bajos los niveles de oxígeno en la zona perivascular. Al acercarse a la zona del endosteo se dividen en arteriolas más pequeñas que siguen teniendo un flujo rápido de sangre, y además se encuentran rodeadas por

MSCs e invadas por fibras de células de Schwann, que también aportan factores esenciales para el mantenimiento de las HSCs. Finalmente, las arteriolas desembocan en sinusoides que recogen el flujo sanguíneo y lo drenan al sinus central para salir del hueso. Estos sinusoides están formados por células endoteliales Sca-1⁺ y son mucho más anchos y sin un recubrimiento celular especial, lo que hace que el flujo sanguíneo sea mucho menor y la barrera endotelial mucho más permeable, permitiendo un mejor tráfico celular a cambio de una mayor exposición al oxígeno (Fig. 21).

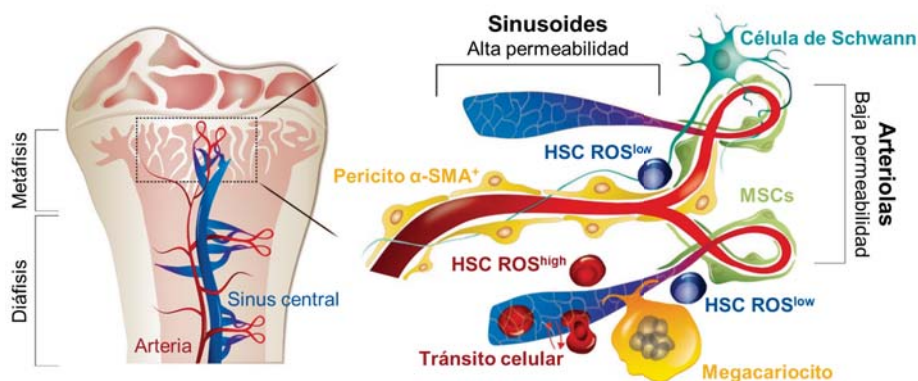


Figura 21- Modelo de nicho celular hematopoyético. Representación de los dos tipos de nicho vascular que presenta la médula ósea. MSCs: células madre mesenquimales del estroma. (Tomada de Itkin et al., 2016 ²¹⁵).

Y es que, el grado de exposición al oxígeno es la característica clave a tener en cuenta por el nicho hematopoyético, ya que cuanto mayor es la presencia de O₂ en el entorno más ROS generan las HSCs ²¹⁶. La hipoxia mantiene bajos los niveles de ROS de las HSCs promoviendo el metabolismo a través de la glucólisis, gracias a HIF-1α ^{217,218}, y reduciendo la expresión de las NADPH oxidasas ²¹⁶, por lo que inhibe los dos principales mecanismos de formación de ROS celulares. Además, la hipoxia también activa otros mecanismos de protección de las HSCs frente al estrés oxidativo, como la activación de NF-κB ²⁰². Es tan grande la dependencia de las HSCs hacia un estado de hipoxia que una corta exposición a condiciones de normoxia provoca el aumento en sus niveles de ROS y su activación y rápida diferenciación hacia células progenitoras ^{215,219}. De esta manera, el nicho perivascular arteriolar de la zona endosteal posee las condiciones y elementos adecuados para proteger y mantener a las HSCs más inmaduras, mientras que en

el nicho perivascular sinusoidal encontramos HSCs con mayor exposición al oxígeno y con un fácil acceso al torrente sanguíneo ²¹⁵, candidatas perfectas para activarse y pasar a formar parte de cualquier población en circulación.

Pero el nicho hematopoyético no solo ayuda a regular los niveles de ROS de las HSCs mediante la hipoxia, sino que posee varios sistemas de mantenimiento adicionales para preservar sus niveles. Las MSCs del nicho y las HSCs se pueden encontrar unidas mediante *gap junctions* gracias a su alta expresión de conexina-43, y se ha demostrado que existe un paso de ROS desde las HSCs a las MSCs por medio de esta vía, para así reducir los niveles de ROS de las HSCs ²²⁰. Si a esto se une que las MSCs poseen elevados niveles de GSH y la expresión constitutiva de múltiples enzimas involucradas en la eliminación de ROS (SOD, catalasa, ...) ²²¹, se convierte en un sistema de depuración de ROS presentes en HSCs muy efectivo. Entre las células del nicho también se encuentra una población de monocito-macrófagos que expresan α -SMA, a los que se les supone un papel cercano al de los pericitos perivascuales. Éstos poseen una alta expresión de ciclooxigenasa-2, la cual sintetiza prostaglandina-E2 que promueve la reducción de los niveles de ROS en HSCs mediante la inhibición de AKT ²²². Finalmente, los propios factores generados por el nicho y necesarios para el mantenimiento de las HSCs también han sido involucrados en la regulación de sus niveles de ROS: la activación de c-Kit, receptor del SCF, está ligada a un descenso de ROS que promueve la expansión y mantenimiento de la población de HSCs más inmaduras ²²³; y la estimulación de HSCs con CXCL12 ayuda a proteger a las células frente al estrés oxidativo ²²⁴.

Por todo ello, dada la gran regulación que existe para mantener las ROS en equilibrio y la cantidad de mecanismos y procesos en los que se encuentra implicada la alteración de sus niveles, es evidente que son un factor importantísimo en la biología de las HSCs.

I.6.B - NADPH oxidasas y hematopoyesis

Una vez conocida la gran importancia de las ROS para la homeostasis hematopoyética, sería de gran utilidad discriminar el papel de las NADPH oxidasas en su regulación. Nuestro conocimiento sobre este tema aún es bastante limitado y se basa principalmente en algunas de las funciones de Nox2, por ser la NADPH oxidasa más estudiada.

Como he comentado anteriormente, las HSCs son las células hematopoyéticas con menores niveles de ROS, para poder protegerse de efectos nocivos y mantener sus capacidades de quiescencia y repoblación. La menor masa mitocondrial y el metabolismo glucolítico que poseen estas células favorece que hasta un 50% de su consumo de O₂ se deba a la actividad de NADPH oxidasas ²²⁵, mucho más que en cualquier otra célula hematopoyética (salvo en fagocitos). De esta forma, los aumentos de ROS que acompañan a la estimulación por la mayoría de citoquinas y factores de crecimiento encargados de la regulación de HSCs probablemente tienen su origen en miembros de esta familia. Por ejemplo, el tratamiento con las citoquinas GM-CSF o IL-8 promueve la movilización de las HSCs a la circulación sanguínea, pero en el caso de ratones deficientes para el gen *Cybb*, que codifica Nox2, se observa una menor afluencia de HSCs en circulación tras su estimulación ²²⁶, de manera que las ROS producidas por Nox2 intervienen de alguna manera en la respuesta a estas citoquinas. De hecho, en caso de infecciones, lesiones inflamatorias o isquemia se activan la liberación rápida de granulocitos desde la médula ósea y la granulopoyesis de emergencia, que consiste en la movilización de HSPCs para su activación, expansión y recuperación de las células perdidas. Se ha visto que la señal que activa todo este proceso es el aumento de los niveles de ROS en la médula ósea por la actividad de Nox2 de células mieloides ^{83,227,228}. Este aumento de ROS provoca la oxidación de PTEN, y con ello una mayor activación de AKT ²²⁸; la estabilización de HIF-1 α , que a su vez promueve la expresión de VEGF; y la mayor actividad de metaloproteasas como MT1-MPP y MMP-9 ²²⁷, todos ellos factores muy importantes para la movilización de HSCs ^{227,229,230}. Además, este aumento de ROS en la médula ósea induce la proliferación de progenitores mieloides ²²⁸, que parecen necesitar específicamente de la actividad de Nox2 para proliferar adecuadamente ^{227,231}, y también provoca la activación de Lyn, que junto con AKT están relacionadas con la inhibición de la monopoyesis en favor de la granulopoyesis ²³¹.

Las HSCs también poseen un mecanismo de activación metabólica rápida basado en la transferencia de mitocondrias desde el nicho celular, sin necesidad de esperar al proceso de biogénesis mitocondrial para aumentar su metabolismo. Esta transferencia parece estar regulada por Nox2, ya que las células de leucemia mieloides aguda son capaces de activarse y proliferar rápidamente mediante este mecanismo, gracias al contacto con MSCs y la producción de ROS dependiente de Nox2 ²³². Este efecto también se observa en HSCs normales en respuesta a

infecciones²³³, y en células CD34⁺ en cocultivo con MSCs a las que se estimula con ROS²³².

En cuanto a la regulación de células más maduras, la actividad de Nox2 parece ser necesaria para el adecuado control de la expansión de células T CD4 por parte de las células reguladoras T CD8²³⁴. Las células T CD8 expresan Nox2 en gran cantidad, y al activarse generan microvesículas donde cargan parte de estos complejos. Al contactar con células T CD4 les ceden las microvesículas provocando un gran aumento de ROS en ellas, que inhibe la activación de su señalización y su proliferación. La deficiencia de Nox2 genera una menor diferenciación y activación de las células reguladoras y la hiperactivación de las T CD4^{234,235}.

También, la formación de ROS por Nox2 puede afectar a algunas poblaciones de linfocitos B, ya que en pacientes con CGD se ha observado un claro aumento de linfocitos B CD5⁺ (denominados tipo B1a), que son de los primeros linfocitos originados, al proceder de la hematopoyesis fetal, y generan los denominados anticuerpos naturales²³⁶. En cambio, poseen un gran descenso de linfocitos B de memoria (CD27⁺)^{237,238}, lo que podría deberse a un defecto de expresión del receptor CD40 en las células inmunes, necesario para varios de sus procesos de activación^{239,240}.

Existe un artículo que relaciona un tipo de eosinofilia hereditaria severa en ratas con la mutación del gen *Cyba* y la falta de p22^{phox}²⁴¹, aunque no parece ser un efecto visto en humanos.

Finalmente, en nuestro laboratorio se demostró que la estimulación de la diferenciación megacariocítica, tanto en líneas celulares como en células CD34⁺ humanas, requiere de la formación de ROS mediante una NADPH oxidasa dependiente de p22^{phox}²⁴². Estas ROS son necesarias para que se produzca la activación completa de las vías de señalización encargadas del proceso de diferenciación. También se ha visto que la estimulación de megacariocitos con TPO aumenta principalmente la expresión de Nox1²⁴³, señalando a ésta como posible fuente de las ROS en este proceso, sin embargo, la eliminación del gen *Nox1* no demostró ningún efecto sobre la megacariopoyesis.



**O
B
J
E
T
I
V
O
S**

La generación de ROS es un efecto inevitable del metabolismo aerobio que, lejos de mantenerse únicamente como una contrapartida tóxica, los organismos han acabado aprovechando y potenciando para la regulación de multitud de sus procesos celulares más importantes. Uno de esos procesos es la homeostasis de las HSCs y la hematopoyesis, claramente influenciadas por los niveles de ROS. Sin embargo, aún no se conoce con profundidad el papel que pueden estar interpretando las NADPH oxidasas, las enzimas que mayor control poseen sobre la formación de ROS, en esa homeostasis.

En nuestro laboratorio ya hemos realizado ciertos avances en la importancia de las NADPH oxidasas para la megacariopoyesis²⁴², observando que la actividad de alguna de las Nox dependientes de p22^{phox} es necesaria para la completa activación de las vías de señalización que intervienen en el proceso. Además, también hemos comprobado que en la diferenciación megacariocítica de una línea celular eritroleucémica (células HEL) intervienen varias de estas enzimas, y sorprendentemente con una función opuesta: mientras que la actividad de Nox2 y Nox5 parece ser necesaria para el proceso de diferenciación, Nox4 estaría actuando como un regulador negativo del mismo (datos no publicados).

En base a todo esto, el principal objetivo que nos propusimos para este trabajo fue **profundizar en la función que pueden estar cumpliendo las NADPH oxidasas y sus ROS en el desarrollo de la hematopoyesis en general**, tanto en el mantenimiento y activación de las HSCs como en su maduración durante la diferenciación hematopoyética. Para ello, durante la realización del trabajo nos fuimos planteando los siguientes objetivos específicos:

1. Análisis de la expresión de NADPH oxidasas en células Lin⁻
2. Generación de modelos de ratón deficientes en el gen *Cyba*
3. Análisis de la hematopoyesis *in vivo* en ausencia de p22^{phox}
4. Análisis transcriptómico de células Lin⁻ *Cyba*^{-/-}
5. Evaluación de otras vías de señalización hematopoyéticas alteradas en células de médula ósea *Cyba*^{-/-}
6. Estudio de la capacidad de repoblación de la hematopoyesis *in vivo* mediante trasplante competitivo de médula ósea *Cyba*^{-/-}
7. Estudio de la capacidad de repoblación de la hematopoyesis *in vivo* mediante trasplante competitivo de médula ósea de ratones *Nox1*^{-/-}, *Cybb*^{-/-} o *Nox4*^{-/-}

8. Evaluación de la inhibición farmacológica de la actividad NADPH oxidásica como tratamiento para mejorar la regeneración hematopoyética en trasplantes de médula ósea

M
A
T
E
R
I
A
L
E
S

Y
M
É
T
O
D
O
S

MyM.1 - MATERIALES

MyM.1.A - Reactivos

Producto	Casa comercial	Técnica de uso
Lineage Cell Depletion Kit, mouse	Miltenyi Biotec	Purificación células Lin ⁻
TRI Reagent	Sigma Aldrich	Extracción de ARN
RNAspin Mini Kit	GE Healthcare	Extracción de ARN
SuperScript II	Invitrogen	Retrotranscripción de ARN
RNase Out	Invitrogen	Retrotranscripción de ARN
GoTaq qPCR Master Mix	Promega	qPCR
DNA Polimerasa	Biotools	PCR convencional
Bromuro de etidio	Sigma Aldrich	Electroforesis en gel de agarosa
RedSafe	iNtRON Biotechnology	Electroforesis en gel de agarosa
Fragmento Klenow polimerasa	Fermentas	Generación sonda southern blot
GeneJET PCR Purification Kit	Thermo Scientific	Generación sonda southern blot
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma Aldrich	Extracción de proteínas
Pierce ECL Plus WB Substrate	Thermo Scientific	Western blot
Forbol 12-miristato-13-acetato (PMA)	Sigma Aldrich	Activación NADPH oxidasas
MethoCult #M3234	STEMCELL Technologies	Formación de Colonias
mSCF (<i>Stem Cell Factor</i>)	Miltenyi Biotec	Formación de Colonias Estimulación de MO para WB Cultivo células Lin ⁻
mIL-3	Miltenyi Biotec	Formación de Colonias Estimulación de MO para WB Cultivo células Lin ⁻
mGM-CSF	Miltenyi Biotec	Formación de Colonias Estimulación de MO para WB
mIL-7	Miltenyi Biotec	Formación de Colonias Estimulación de MO para WB
EPO (Eritropoyetina)	Miltenyi Biotec	Formación de Colonias Estimulación de MO para WB
mTPO (Trombopoyetina)	Miltenyi Biotec	Estimulación de MO para WB Cultivo células Lin ⁻

mFlt3-Ligando	Miltenyi Biotec	Cultivo células Lin ⁻
IgA Mouse Uncoated ELISA Kit with plates	Invitrogen	Medida IgA en suero
IgG (total) Mouse Uncoated ELISA Kit with plates	Invitrogen	Medida IgG en suero
IgM Mouse Uncoated ELISA Kit with plates	Invitrogen	Medida IgM en suero
Difenileniodonium (DPI)	Sigma Aldrich	Trasplante competitivo con DPI

MyM.1.B - Soluciones de trabajo

- PBS (tampón fosfato salino)
NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 100 mM; KH₂PO₄ 2 mM; pH 7,4.
- Solución de lisis de la serie roja (cloruro amónico)
NH₄Cl 155 mM; KHCO₃ 10 mM; EDTA 0,13 mM; pH 7,4.
- Tampón TE (Tris-EDTA)
Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8.
- Tampón TAE (Tris-acético-EDTA)
Tris 40 mM; ácido acético 20 mM; EDTA 2 mM; pH 7,9-8.
- Tampón de lisis para la extracción de ADN genómico
Tris 0,1 M; NaCl 0,2 M; EDTA 5 mM; SDS 0,2% p/v; proteinasa K 200 µg/ml.
- SSC (solución salina de citrato sódico)
NaCl 0,3 M; Citrato 30 mM; pH 7.
- Tampón de Church & Gilbert
BSA 1% p/v; EDTA 1 mM; NaHPO₄ 1 M; SDS 7% p/v; pH 7,2.
- Tampón de lisis MLB
HEPES 25 mM pH 7,5; NaCl 150 mM; Igepal 1% v/v; glicerol 10% v/v; MgCl₂ 10 mM; EDTA 1 mM; NaF 25 mM; Na₃VO₄ 1 mM.
- Tampón de carga para proteínas (2X)
Tris 125 mM; SDS 2% p/v; glicerol 5% v/v; azul de bromofenol 0,003% p/v; β-mercaptoetanol 1% v/v; pH 6,8.

- Tampón de electroforesis para WB
Tris 5 mM; glicina 40 mM; SDS 0,1% p/v; pH 8,3.
- Tampón de transferencia para WB
Tris 25 mM; glicina 190 mM; metanol 20% v/v.
- TBS-Tween (tampón tris salino - tween)
Tris 10 mM; NaCl 100 mM; Tween-20 0,05% v/v; pH 7,5.
- Tampón de quimioluminiscencia
PBS; glucosa 5 mM; Mg²⁺ 1 mM; Ca²⁺ 0,5 mM; BSA 0,05% p/v.

MyM.1.C - Anticuerpos y compuestos utilizados en citometría

Producto	Casa comercial	Conjugado	Clon
Anti-mouse CD3 ϵ	Miltenyi Biotec	PE	145-2C11
Anti-human and mouse CD11b	Miltenyi Biotec	PerCP-Vio700	REA592
Anti-human and mouse CD11b	Miltenyi Biotec	APC	M1/70.15.11.5
Anti-mouse CD16/32	eBioscience	PE-Cy7	93
Anti-mouse CD19	Miltenyi Biotec	APC	6D5
Anti-mouse CD34	eBioscience	eFluor450	RAM34
Anti-mouse CD45	Miltenyi Biotec	VioBlue	30F11
Anti-mouse CD45	Miltenyi Biotec	PerCP	30F11
Anti-mouse CD45.1	Miltenyi Biotec	FITC	A20
Anti-mouse CD45.1	Miltenyi Biotec	APC	A20
Anti-mouse CD45.1	Miltenyi Biotec	PE-Vio770	A20
Anti-mouse CD45.1	Miltenyi Biotec	APC-Vio770	A20
Anti-mouse CD45.2	Miltenyi Biotec	FITC	104-2
Anti-mouse CD45.2	Miltenyi Biotec	APC-Vio770	104-2
Anti-mouse CD45R (B220)	Miltenyi Biotec	PE	RA3-6B2
Anti-mouse CD45R (B220)	Miltenyi Biotec	PerCP-Vio700	RA3-6B2
Anti-mouse CD117 (c-Kit)	Miltenyi Biotec	APC	3C11
Anti-mouse CD117 (c-Kit)	Miltenyi Biotec	PE-Vio770	3C11
Anti-mouse CD117 (c-Kit)	BD Pharmingen	APC-H7	2B8
Anti-mouse CD127 (IL-7R α)	eBioscience	APC-eFluor780	A7R34
Anti-mouse CD135 (Flt3)	eBioscience	PE-Cy5	A2F10
Anti-mouse CD135 (Flt3)	Miltenyi Biotec	PE	A2F10
Anti-mouse Gr1	Miltenyi Biotec	PerCP-Vio700	RB6-8C5

Anti-mouse Sca-1	Miltenyi Biotec	PE	REA422
Anti-mouse Ter-119	Miltenyi Biotec	PE	Ter-119
Lineage Cell Detection Cocktail-Biotin	Miltenyi Biotec	Biotina	
Anti-Biotina	Miltenyi Biotec	FITC	Bio3-18E7
Anti-Biotina	Miltenyi Biotec	PerCP-Vio700	Bio3-18E7
FcR Blocking Reagent mouse	Miltenyi Biotec	-	
Diacetato de 2,7-dihidrodicloro-fluoresceína (DCFDA)	Sigma Aldrich	-	
APC BrdU Flow Kit	BD Pharmingen	APC	
PE Annexin V Apoptosis Detection Kit with 7-AAD	Immunostep	PE	

MyM.1.D - Anticuerpos de western blot

Anticuerpos Primarios	Casa comercial	Dilución	A. Secundario
AKT	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	IRDye 800CW
p-AKT (Ser-473)	Santa Cruz Biotechnology	1:750	m-IgGκ BP-HRP
β-CATENINA	Abcam	1:1000	Anti-mouse light chain HRP
CRKL	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	IRDye 800CW
ERK	Santa Cruz Biotechnology	1:3000	Anti-rabbit light chain HRP
p-ERK (Tyr-204)	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	Anti-mouse light chain HRP
GAPDH	ThermoFisher Scientific	1:40000	m-IgGκ BP-HRP
c-MYC	Cell Signaling Technology	1:1000	Anti-mouse light chain HRP
p22 ^{phox}	OriGene	1:200	Anti-rabbit light chain HRP
STAT3	Cell Signaling Technology	1:500	IRDye 800CW
STAT5	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	IRDye 800CW
p-STAT5 (Tyr-694)	BD Transduction Laboratories	1:1000	Anti-mouse light chain HRP
VINCULINA	Santa Cruz Biotechnology	1:3000	StarBright Blue 700

Anticuerpos Secundarios	Casa comercial	Dilución
m-IgGκ BP-HRP	Santa Cruz Biotechnology	1:10000
AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG, light chain specific HRP	Jackson ImmunoResearch	1:20000
Monoclonal Mouse Anti-Rabbit IgG, light chain specific HRP	Jackson ImmunoResearch	1:20000
IRDye 800CW Goat anti-Rabbit IgG Secondary Antibody	LI-COR	1:5000
StarBright Blue 700 Goat Anti-Mouse IgG	BIO-RAD	1:5000

MyM.1.E - Aparataje

-Agitadores Roller mix (Ovan) y Navigator Model 128 Roller Bottle Type Blotter Rotator (BioComp Instruments), y plataforma mezcladora BFR25 (Grant Boekel).

-Autoclaves Steam Sterilizer (Raypa) y Autester-G (Selecta).

-Balanza analítica 40SM-200A (Precisa) y balanza granataria Electronic Scale (Want).

-Baños termostáticos Precistern (Selecta) e Isotemp 105 modelo 2240 (Fisher Scientific), y termostato de inmersión SBS TFB serie B (Mettler).

-Campanas de flujo laminar Bio II A (Telstar) y Class II BSC (ESCO).

-Centrífugas Allegra 21R Centrifuge (Beckman), 5810R Centrifuge (Eppendorf), IEC MicroCL 17 y Sorvall Legend Micro 21R (Thermo Electron Corporation).

-Citómetros de flujo FACSCalibur y FACSAria III (BD Biosciences).

-Densitómetro CS-9000 (Shimadzu).

-Documentador de geles Gel Doc XR System (compuesto por Universal Hood II, Universal XR Camera w/MZL y Quantity One Software) (BIO-RAD).

-Espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific)

-Fotómetro de microplacas Multiskan FC (Thermo Scientific).

-Incubador de CO₂ Forma Direct Heat 311 (Thermo Scientific).

-Irradiador de fuente de cesio Gammacell 1000 Elite.

-Lector multidetección de barrido espectral Varioskan Flash (Thermo Scientific).

- Máquina de revelado para western Medical X-ray Processor 102 (Kodak).
- Microscopio Eclipse TS100 (Nikon), y microscopio IX51 con cámara digital DP70 acoplada (Olimpus).
- pH-metro PB-11 Basic Meter (Sartorius).
- Sistemas de detección de western por fluorimetría Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR) y ChemiDoc MP Imaging System (BIO-RAD).
- Sistemas de electroforesis horizontal MultiSUB Mini (Fisherbrand) y Wide mini-sub Cell GT (BIO-RAD).
- Sistemas de electroforesis vertical y transferencia Mini-PROTEAN 3 Cell y Mini Trans-Blot Cell (BIO-RAD).
- Stratalinker UV Crosslinker (Stratagene).
- Tanque de nitrógeno líquido CryoPlus 3 (Thermo Forma).
- Termocicladores Mastercycler EPgradient (Eppendorf) y StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems).
- Unidades de corriente MPSU-200/100, PowerPac Basic y PowerPac HC (BIO-RAD).
- Otros aparatos de uso común en laboratorio.

MyM.1.F - Herramientas informáticas

- La herramienta online Primer3Plus y el programa SeqBuilder (DNASTAR) para el diseño de oligonucleótidos de qPCR.
- StepOne Software v2.1 para el diseño y realización de las reacciones qPCR.
- CellQuest Pro (BD Biosciences) para la adquisición de las muestras por citometría de flujo, y Flowing Software 2.5 (Turku Centre for Biotechnology) y FlowJo v10.5.3 (FlowJo LLC) para su análisis.
- Quantity One Software (BIO-RAD) para la visualización y adquisición de las imágenes de electroforesis en gel de agarosa con el Gel Doc XR System.
- ImageStudio Lite 5.2 (LI-COR) para el análisis de las imágenes por medio de western blot.
- SPSS Statistics 23 (IBM) para el análisis estadístico de los datos.

- DP Controller (Olimpus) para la realización de fotografías al microscopio de luz invertida IX51 (Olimpus).
- Las herramientas de imagen de Servier Medical ART (SMART) para la creación de algunas de las figuras del trabajo (bajo licencia Creative Commons Attribution 3.0).
- Mendeley Reference Manager para la gestión de las citas y referencias de este trabajo.
- El paquete Microsoft Office 365 para el análisis de resultados, la construcción de figuras y la realización de este trabajo.

MyM.2 - TÉCNICAS EXPERIMENTALES

MyM.2.A - Animales

Adquirimos los ratones C57BL/6J silvestres utilizados en este trabajo del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca, mientras que los ratones modificados genéticamente albinos, CD45.1⁺ y deficientes para *Nox1*, *Cybb* y *Nox4* los compramos a The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA).

Nombre de la cepa	Modificación genética
B6(Cg)- <i>Tyrc</i> ^{-2l} /J	Pelaje albino
B6.SJL- <i>Ptprca</i> ^a <i>Pepc</i> ^b /BoyJ	CD45.1 ⁺
B6.129X1- <i>Nox1</i> ^{tm1Kkr} /J	Deficiencia <i>Nox1</i>
B6.129S- <i>Cybb</i> ^{tm1Din} /J	Deficiencia <i>Cybb</i>
B6.129- <i>Nox4</i> ^{tm1Kkr} /J	Deficiencia <i>Nox4</i>

La generación de los 2 modelos de ratón modificados genéticamente para el gen *Cyba* se llevó a cabo en colaboración con el Servicio de Transgénesis de Nucleus, de la Universidad de Salamanca.

Generación del modelo ES *Cyba*^{-/-}:

Para la generación de los ratones deficientes en el gen *Cyba* adquirimos dos clones de células madre embrionarias (células ES) al consorcio EUCOMM con una inserción en el intrón 1 del gen *Cyba* (células ES *Cyba*^{tm1e(EUCOMM)Wtsi}) (**Fig. 22**). La

inserción genera una proteína truncada y sin función, y permite su detección mediante el gen reportero *LacZ*. Además, estas células ES proceden del tipo celular JM8A3.N1, una estirpe de ratón C57BL/6N que ha sido modificada para corregir la mutación negra en el alelo *Agouti*, de manera que el color del pelaje de sus ratones será agouti (marrón), permitiendo la visualización de las posibles quimeras en fondos genéticos de ratones C57BL/6J negros.

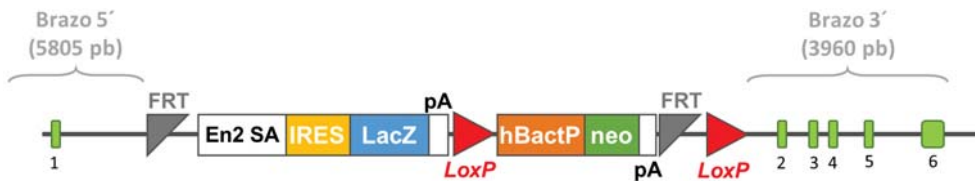


Figura 22- Inserción de las células ES modificadas en el gen *Cyba*. Mapa de la inserción introducida en el gen *Cyba* para truncar la producción de p22^{phox}, proporcionado por EUCOMM.

Crecimos las células ES siguiendo el protocolo recomendado por EUCOMM, y las microinyectamos en blastocistos de hembras C57BL/6J (10-14 células por blasto), que posteriormente implantamos en hembras pseudopreñadas. Elegimos al fundador (F0) entre múltiples quimeras en base a su género (masculino, ya que las células ES son XY) y su porcentaje de quimerismo (80-90% de pelaje agouti), lo que se corresponde con un mayor porcentaje de tejidos procedentes de las células ES modificadas. Cruzamos al fundador con ratones albinos B6(Cg)-*Tyrc^{-2j}*/J para corroborar la transmisión de la línea germinal por el color del pelaje y el genotipo de la descendencia (F1). Finalmente, para homogeneizar el fondo genético y mantener un genotipo estable, retrocruzamos a los mutantes heterocigotos F1 de nuevo con la cepa C57BL/6J.

Aunque la subcepa de procedencia de las células ES (C57BL/6N) es muy próxima a la subcepa C57BL/6J que hemos utilizado como fondo de referencia para la generación del modelo, y como cepa de ratones silvestres control, posee pequeñas diferencias genéticas respecto a ésta ²⁴⁴, que pueden dar lugar a diferencias fenotípicas en determinadas condiciones ²⁴⁵⁻²⁴⁹. Por ello, cuando tuvimos la oportunidad decidimos generar el modelo deficiente para el gen *Cyba* mediante CRISPR/Cas9 en un fondo genético C57BL/6J puro.

Generación del modelo CR *Cyba*^{-/-}:

Generamos este modelo mediante el sistema CRISPR/Cas9, el cual induce mutaciones tipo INDEL (inserción/delección) que provocan cambios en la fase de lectura de los genes con la aparición de codones STOP prematuros.

Con la herramienta online del Centro Nacional de Biotecnología (CNB)-CSIC (<http://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/breakingcas/>) diseñamos una guía para la nucleasa Cas9 (*sgRNA*) que la dirige al exón 1 del gen *Cyba* (**Fig. 23-A**). Para la síntesis *in vitro* de la guía generamos dos oligonucleótidos cuyas secuencias fueron:

Sentido	5' - caccgAGACGCCAGCGCCTGTTCGT - 3'
Antisentido	5' - aaacACGAACAGGCGCTGGCGTCTc - 3'

Anillamos y clonamos los oligonucleótidos en el vector pX458 (plásmido de Addgene #48138), que también contiene la secuencia que codifica Cas9. Amplificamos mediante PCR del vector la secuencia del *sgRNA* de *Cyba* junto a la ORF de la nucleasa Cas9, con cebadores que además poseen una cola de nucleótidos correspondiente al promotor de la ARN polimerasa T7 en su extremo 5'. Purificamos el producto de la PCR por columna, y lo usamos como molde para la transcripción *in vitro* de la ARN polimerasa T7 (*MEGAscript T7 Transcription Kit*, ThermoFisher Scientific). Añadimos al ARNm de Cas9 generado la señal de caperuza en 5' (*mMESSAGE mMACHINE T7 Transcription Kit*, ThermoFisher Scientific) y una cola poli-A en 3' (*Poly(A) Tailing Kit*, ThermoFisher Scientific). Purificamos los productos de transcripción con el kit *RNeasy Mini Kit* (Quiagen) y los eluimos en tampón de microinyección libre de nucleasas *EmbryoMax* (Millipore).

Microinyectamos tanto el *sgRNA* como el ARNm Cas9 sintetizados en cigotos de ratón C57BL/6J, a una concentración de 20 ng/μL, para posteriormente implantarlos en hembras pseudopreñadas. Elegimos al fundador (F0) entre los múltiples animales mutantes estudiando el tipo de mutación originada mediante secuenciación Sanger. De entre todos elegimos un macho con una mutación de cambio de marco de lectura por una INDEL de +111/-5 pb, fácilmente detectable por PCR, y que genera 3 codones STOP en la secuencia (**Fig. 23-B**). Retrocruzamos al fundador con la cepa C57BL/6J para eliminar las posibles modificaciones inespecíficas en otras zonas del genoma y generar homocigotos puros.

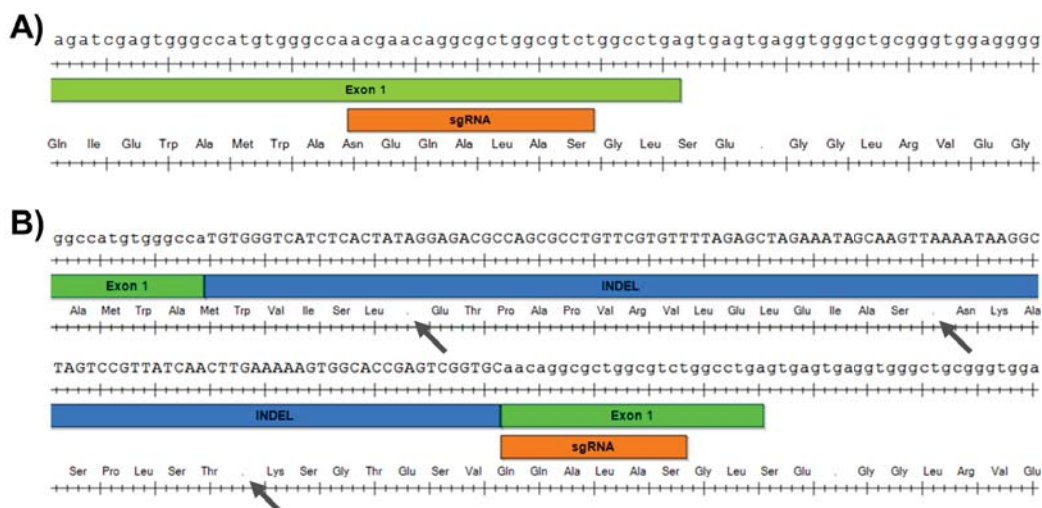


Figura 23- Esquema de la inserción del modelo CR *Cyba*^{-/-}. **A)** Zona de hibridación de la guía *sgRNA* (naranja) para la nucleasa Cas9 diseñada frente al exón 1 del gen *Cyba* (verde). **B)** Mapa de la inserción/delección (azul) generada en el gen *Cyba* para truncar la producción de p22^{phox}. Las flechas señalan los codones STOP originados tras el cambio de marco de lectura.

Mantuvimos a todos los animales con una dieta estándar y bajo condiciones específicas libres de patógenos. Para los experimentos utilizamos como controles animales del mismo género y edad similar (diferencia máxima de 3 semanas). Todos los procedimientos que utilizamos durante este estudio se llevaron a cabo de acuerdo con la legislación vigente (Real Decreto 53/2013 de 1 de febrero, y Orden ECC/566/2015 de 20 de marzo), fueron aprobados previamente por el Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca (018Nº201400031244), y autorizados por la Consejería de Agricultura y Ganadería de la Junta de Castilla y León.

MyM.2.B - Obtención de muestras de los ratones

Células de sangre periférica:

Obtuvimos las muestras sanguíneas mediante inmovilización y punción de la vena submandibular de los ratones, recogiendo las gotas de sangre en tubos recubiertos con EDTA para evitar su coagulación (excepto para los experimentos de medida de la concentración de inmunoglobulinas en suero).

Células de bazo:

Tras el sacrificio del animal, extrajimos el órgano del ratón y realizamos múltiples cortes sobre un portaobjetos esmerilado, para después homogeneizarlo mediante fricción con la ayuda de otro portaobjetos. Posteriormente recogimos las células mediante lavado de los portaobjetos con PBS sobre placas de cultivo, y pasamos la solución de lavado a través de tamices de 70 μm de poro para eliminar los agregados celulares. Finalmente, centrifugamos la suspensión (300 xg, 10 minutos) para eliminar el sobrenadante.

Células de médula ósea:

Tras el sacrificio del animal, extrajimos las tibias, fémures y caderas de los ratones, cortamos las epífisis de los huesos con un bisturí, y extrajimos la médula ósea mediante inyección de PBS a través de los huesos con agujas de 25G, recogiendo la suspensión celular en placas de cultivo. Se puede ver que la extracción es correcta porque la médula interior del hueso pierde su coloración rojiza. Finalmente, pasamos la suspensión celular a través de tamices de 70 μm de poro para eliminar los agregados celulares, y la centrifugamos (300 xg, 10 minutos) para eliminar el sobrenadante.

En la mayoría de experimentos utilizamos muestras en las que hemos eliminado las células no nucleadas mediante una solución de lisis de la serie roja. Para ello, resuspendimos el sedimento celular, o la propia sangre periférica, en 10 mL de la solución de lisis y lo incubamos durante 20 minutos en hielo. Posteriormente, centrifugamos la suspensión (300 xg, 10 minutos) para eliminar la solución de lisis, lavamos el sedimento celular con PBS, y centrifugamos de nuevo, dejando las muestras preparadas para su utilización.

Células linaje negativas (Lin^-):

Para la obtención de las células Lin^- partimos de las muestras de médula ósea ya procesadas y lisadas para la serie roja. Realizamos la purificación mediante un kit de columnas magnéticas (*Lineage Cell Depletion Kit*), siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, el kit se basa en el uso de una mezcla de anticuerpos de células maduras (CD5, CD11b, CD45R (B220), Anti-7-4, Anti-Gr-1 (Ly6G/C), y Anti-Ter-119) conjugados con biotina, que marcan cualquier célula

madura de la muestra de médula ósea, y posteriormente la biotina es marcada con estreptavidina unida a pequeñas esferas metálicas. De esta manera, al pasar la muestra tratada a través de una columna magnética todas las células maduras que están marcadas son atraídas y quedan retenidas, dejando salir de la columna únicamente a las células inmaduras que no se encuentran unidas a ningún anticuerpo (Lin⁷).

MyM.2.C - Extracción de ARN

De forma general, para la extracción del ARN total de las células empleamos el reactivo *TRI Reagent*, siguiendo las instrucciones de la casa comercial. En resumen, resuspendimos e incubamos las células en 1 mL de reactivo para degradar todas las membranas celulares y liberar los ácidos nucleicos. Tras esto añadimos cloroformo, agitamos fuertemente y centrifugamos las muestras, solubilizando el ARN en la fase acuosa superior, que separamos a un tubo limpio. Añadimos isopropanol e incubamos en hielo para precipitar el ARN, y centrifugamos para retirar el sobrenadante. Posteriormente lavamos el precipitado con etanol al 75%, para eliminar impurezas, y centrifugamos de nuevo para retirar el sobrenadante y dejar secar el precipitado a temperatura ambiente. Finalmente, resuspendimos el precipitado de ARN en tampón TE. Almacenamos las muestras a -80°C hasta su utilización.

En el caso de las muestras de ARN para la realización del análisis transcriptómico, realizamos la extracción mediante un kit comercial (*RNASpin Mini Kit*), siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, lisamos las células mediante la solución RA1 del kit con β -mercaptoetanol, agitando bien en vortex para liberar los ácidos nucleicos, y añadimos etanol al 70% al homogeneizado para precipitarlos. Pasamos la muestra a una de las columnas de purificación del kit, donde eliminamos el sobrenadante por centrifugación, desalamos la membrana con la solución MDB, y digerimos el ADN que haya quedado retenido con la ADNasa proporcionada. Lavamos varias veces por centrifugación con las soluciones de lavado RA2 y RA3 del kit, y finalmente diluimos el ARN en agua libre de ARNasas. Almacenamos las muestras a -80°C hasta su utilización.

MyM.2.D - Síntesis del ADN copia (retrotranscripción)

Para la retrotranscripción del ARN mensajero en ADNc mezclamos:

- 2 a 5 µg del ARN a transcribir
- 2 µL de oligo-dT (dirigido a la cola poli-A del ARNm)
- Llevamos hasta 11 µL con agua ultrapura.

Incubamos la mezcla a 65°C durante 5 minutos y dejamos enfriar, para el anillamiento del oligo-dT. Después añadimos a cada muestra:

- 4 µL del tampón de reacción de la *SuperScript II*
- 2 µL de DTT (ditiotreitól, reductor proporcionado con la enzima)
- 1,5 µL de dNTPs 10 mM
- 0,5 µL de inhibidor *RNase OUT*

Incubamos la mezcla a 42°C durante 5 minutos para que actúe el inhibidor de ribonucleasas, y finalmente añadimos 1 µL de enzima *SuperScript II* (volumen de reacción final 20 µL). Dejamos transcurrir la reacción durante 50 minutos a 42°C, y finalmente paramos la reacción calentando la mezcla a 70°C durante otros 10 minutos.

MyM.2.E - PCR a Tiempo Real o cuantitativa (qPCR)

De forma general, realizamos las reacciones de qPCR en un volumen final de 10 µL, donde se incluían:

- 2 µL del ADNc de la muestra a analizar
- 0,1 µL de oligos (sentido y antisentido) del gen a analizar, a 10 mM
- 0,1 µL de *ROX reference Dye* (proporcionado con la enzima)
- 5 µL de *GoTaq qPCR Master Mix* (contiene la enzima, los dNTPs, el tampón de reacción y el *SYBR*)

Llevamos a cabo las reacciones en el termociclador StepOne RealTime PCR System, utilizando de forma normal un protocolo de 44 ciclos de temperatura de dos etapas, desnaturalización a 95°C durante 15 segundos y anillamiento de oligonucleótidos (temperatura en torno a 56-60°C, según la pareja utilizada) durante 30 segundos. Como paso final de cada reacción programamos un aumento de temperatura y medida de la fluorescencia progresivos desde la temperatura de anillamiento hasta la de desnaturalización, para conocer la temperatura de *melting* de los productos amplificados y comprobar si la reacción había sido específica.

Además, para cada grupo de reacciones siempre pusimos una reacción de control negativo en paralelo.

Realizamos el análisis de la expresión relativa de ARNm mediante el método comparativo de C_t (*threshold cycle*, o ciclo umbral) ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), usando la β -actina como control endógeno entre diferentes muestras.

Los oligonucleótidos utilizados fueron:

Gen	Dirección	Secuencia	Amplificación
<i>Actb</i>	Sentido	CAGCCTTCCTTCTTGGGTAT	100 pb
<i>Actb</i>	Antisentido	TGGCATAGAGGTCTTTACGG	
<i>Nox1</i>	Sentido	CCACTGGCTCTCAGTTTTGT	122 pb
<i>Nox1</i>	Antisentido	TCCAAGAATTTCTCTCGTG	
<i>Cybb</i>	Sentido	ATGCAGGAAAGGAACAATGC	90 pb
<i>Cybb</i>	Antisentido	GTGCACAGCAAAGTGATTGG	
<i>Nox3</i>	Sentido	GGTCCTGTGGTCTTGATGC	142 pb
<i>Nox3</i>	Antisentido	CAGGTGCCATCTTGAAGTCT	
<i>Nox4</i>	Sentido	TGGGCCTAGGATTGTGTTTA	127 pb
<i>Nox4</i>	Antisentido	CTGCTAGGGACCTTCTGTGA	
<i>Duox1</i>	Sentido	CATCATGGGGTTCCACTTAG	131 pb
<i>Duox1</i>	Antisentido	TGTGCTCCATGAGGTTGTTA	
<i>Duox2</i>	Sentido	CTCCAAGGACGAGTTCTTCA	106 pb
<i>Duox2</i>	Antisentido	CTCCCGGAACATAGACTCAA	
<i>Itgam</i>	Sentido	CCCATCTTTCCTGCTAATTCTGA	198 pb
<i>Itgam</i>	Antisentido	ACTCTCATCACTGGTGACAATC	
<i>Ccr1</i>	Sentido	CTCTGGAAACACAGACTCACT	164 pb
<i>Ccr1</i>	Antisentido	AGCAGTCTTTTGGCATGGAG	
<i>Lrg1</i>	Sentido	GATCAAGGAAGCCTCCAG	199 pb
<i>Lrg1</i>	Antisentido	GGAGAATTCCACCGACAGATG	
<i>Lilrb4</i>	Sentido	CTCAGAAACCAAGGACCAGT	217 pb
<i>Lilrb4</i>	Antisentido	TGGGTTCCAAGTTCAGC	
<i>Pirb</i>	Sentido	TCACAGTCTCAGGACCCATC	114 pb
<i>Pirb</i>	Antisentido	GGATGAAGGCCACAGACAC	
<i>Stat5a</i>	Sentido	AGCACCTTCAGATCAACCAA	290 pb
<i>Stat5a</i>	Antisentido	GGTCTTCTGGTGCTTCTCAG	
<i>Stat5b</i>	Sentido	TACAACAGCATGTCCGTGTC	126 pb
<i>Stat5b</i>	Antisentido	CCAGTGAGGCTTGAGATGTT	

MyM.2.F - Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico la realizamos a partir de un trozo de cola de 2 mm de ratones con 4 semanas de vida.

Digerimos las colas con 500 μL de tampón de lisis con proteinasa K fresco a 55°C durante toda la noche. Después, centrifugamos 20 minutos a máxima velocidad para decantar los restos, y pasamos el sobrenadante a pocillos de una placa P-24. Añadimos 750 μL de isopropanol para precipitar el ADN, y lo dejamos incubado durante unos 40 minutos en un balancín, hasta que el ADN fue visible. Pasamos el ADN precipitado con cuidado a un nuevo tubo con 500 μL de etanol al 70%, para limpiar impurezas, y centrifugamos 10 minutos a máxima velocidad. Eliminamos el sobrenadante y dejamos secar el precipitado de ADN, que finalmente incubamos en 200 μL de TE a 55°C durante toda la noche para resuspenderlo.

MyM.2.G - PCR convencional

Genotipado ratones ES *Cyba*^{-/-}:

Para la comprobación del genotipo de los ratones ES *Cyba*^{-/-} realizamos reacciones de PCR convencional en un volumen final de 15 μL , donde se incluían:

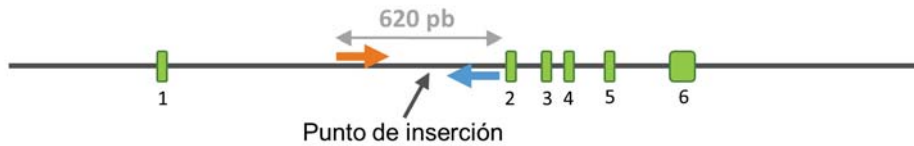
- 1 μL del ADN genómico (a una concentración aproximada de 30 ng/ μL)
- 1,5 μL del tampón de la DNA polimerasa
- 0,6 μL de dNTPs a 10 mM
- 0,3 μL de cada oligonucleótido a 10 mM
- 0,6 μL de la enzima DNA polimerasa

Llevamos a cabo las reacciones en el termociclador Mastercycler EPgradient, utilizando un protocolo de 38 ciclos de temperatura de tres etapas, desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, anillamiento de oligonucleótidos a 58°C durante 1 minuto, y extensión de la polimerasa a 72°C durante 45 segundos. Para cada grupo de reacciones pusimos en paralelo un control positivo de ADN de ratón silvestre y otro de ADN de las células ES utilizadas para la generación de la cepa ES *Cyba*^{-/-}, que poseen un alelo modificado y por tanto deben generar ambas bandas de amplificación.

Oligonucleótidos de comprobación del modelo ES *Cyba*^{-/-} por PCR:

Gen	Dirección	Secuencia	Amplicón
<i>Cyba</i>	Sentido	AGGAGGAGGGTGGTCCATGCCTGC	620 pb
<i>Cyba</i>	Antisentido	CCACCATAGCTGTCCAGTGCTACA	
Inserción	Antisentido	CACAACGGGTTCTTCTGTTAGTCC	514 pb

Secuencia silvestre



Secuencia mutada

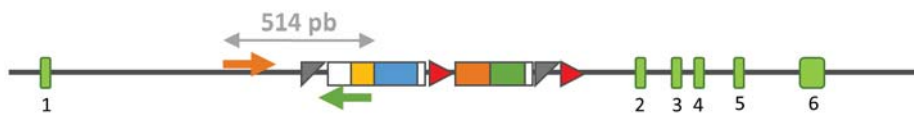


Figura 24- Esquema de las PCRs realizadas para la comprobación genética del modelo ES *Cyba*^{-/-}. Con la pareja de oligonucleótidos silvestre (*Cyba* sentido -flecha naranja- y *Cyba* antisentido -flecha azul-), el gen silvestre da lugar a un amplicón de 620 pb, mientras que el gen mutado no da lugar a ningún producto, ya que el tamaño de la inserción (>7 kb) impide que se pueda amplificar en el tiempo de reacción establecido. En cambio, con la pareja de oligonucleótidos dirigidos a la mutación (*Cyba* sentido -flecha naranja- e Inserción antisentido -flecha verde-), el gen silvestre no posee ningún tipo de amplificación, puesto que el oligonucleótido de la inserción no encuentra donde hibridarse, mientras que el gen mutado genera un amplicón de 514 pb.

Genotipado ratones CR *Cyba*^{-/-}:

La comprobación del genotipo de los ratones CR *Cyba*^{-/-} fue llevada a cabo por el Servicio de Transgénesis, donde también se realizó mediante PCR convencional. Las condiciones de reacción fueron muy similares, con un protocolo de 35 ciclos de temperatura también en tres etapas: desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, anillamiento de oligonucleótidos a 60°C durante 30 segundos, y extensión de la polimerasa a 72°C durante 30 segundos.

Oligonucleótidos de comprobación del modelo CR *Cyba*^{-/-} por PCR:

Gen	Dirección	Secuencia	Amplicón WT	Amplicón KO
<i>Cyba</i>	Sentido	CAAGGCTCAAAGGGAAGGTG	700 pb	806 pb
<i>Cyba</i>	Antisentido	GAGGATCCGCGCTTTGAGGT		

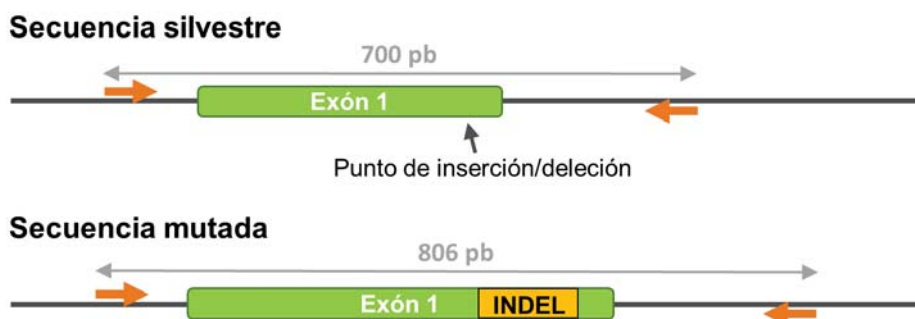


Figura 25- Esquema de las PCRs realizadas para la comprobación génica del modelo CR *Cyba*^{-/-}. La amplificación con los oligonucleótidos diseñados (flechas naranjas) genera un amplicón de 700 pb en el gen silvestre, mientras que, debido a la inserción/delección, el tamaño del producto amplificado en el gen mutado aumenta hasta 806 pb.

MyM.2.H - Electroforesis en gel de agarosa

Realizamos esta técnica para comprobar los productos amplificados durante las reacciones de PCR. Preparamos los geles realizando una disolución de agarosa al 2% en tampón TAE, calentándola en un microondas. Una vez disuelta la agarosa, y después de dejarla atemperar, añadimos 3 µL de bromuro de etidio (10 mg/mL) ó 2 µL de *RedSafe* por cada 50 mL de solución y lo vertimos sobre el molde, dejándolo solidificar a temperatura ambiente. Colocamos el gel en su posición sobre la cubeta de electroforesis y cargamos las muestras, previamente mezcladas con tampón de carga, además de un marcador de tamaño en uno de los pocillos. Finalmente, corrimos la electroforesis a 90 V, usando también TAE como tampón de electroforesis, y detectamos el desplazamiento de las bandas en el documentador de geles (Gel Doc XR System).

MyM.2.I - Southern blot

La técnica se basa en cortar todo el ADN de las muestras en fragmentos con una enzima de restricción que también posea una secuencia de corte dentro de la inserción que trunca la formación de la proteína. De esta forma, el aumento de tamaño del inserto y la zona adicional de corte van a provocar la creación de un fragmento de diferente tamaño entre la secuencia silvestre y la secuencia mutada (**Fig. 26**). Mediante electroforesis se separan las bandas por su tamaño, y finalmente se hibrida una sonda radiactiva diseñada específicamente para una región de ese fragmento (que no se encuentre dentro de los brazos de recombinación de la inserción) para detectar su presencia y correcta localización.

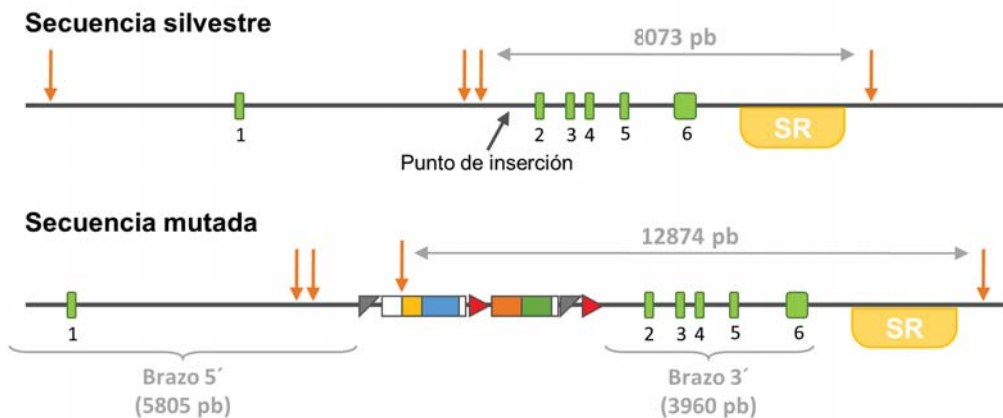


Figura 26- Esquema del diseño de southern blot realizado para la comprobación genética del modelo ES *Cyba*^{-/-}. Las flechas naranjas indican los puntos de corte de la enzima de restricción Bgl II, de manera que en el gen silvestre se forma un fragmento de 8073 pb que contiene los exones 2 a 6 del gen *Cyba*. En cambio, en el gen mutado, además del aumento de tamaño por la inserción, existe una zona de corte adicional en ésta, de manera que el fragmento generado que contiene a los exones 2 a 6 del gen *Cyba* posee 12874 pb. Para la identificación de estos fragmentos, y de la correcta introducción de la inserción, diseñamos una sonda radiactiva (SR) que se uniera en la parte más alejada de la zona de inserción, fuera del alcance de sus brazos de recombinación.

Digestión del ADN genómico:

En nuestro caso la enzima de restricción elegida fue Bgl II, la cual genera un fragmento de 8073 pb en la secuencia silvestre, mientras que en la secuencia con la inserción el fragmento es de 12874 pb. Digerimos 20 µg de ADN genómico con

1,8 μL de enzima Bgl II, en un volumen de reacción final de 100 μL , incubando la reacción a 37°C durante toda la noche.

Purificación del ADN mediante fenol-cloroformo:

Añadimos 100 μL de fenol-cloroformo al producto de la digestión, agitamos fuerte y centrifugamos a máxima velocidad durante 2 minutos. Recuperamos la fase acuosa superior y repetimos el proceso con otros 100 μL de fenol-cloroformo. Tras pasar la fase acuosa a un tubo limpio, añadimos 250 μL de etanol, 10 μL de acetato sódico 3M y 1 μL de glucógeno (para ver el precipitado al final del proceso). Agitamos la mezcla y la incubamos a -20°C durante 3 horas para que precipitara el ADN.

Una vez precipitado, centrifugamos 15 minutos a 4°C y máxima velocidad, retiramos el sobrenadante y lavamos el precipitado de ADN con etanol al 75%. Centrifugamos de nuevo 10 minutos a 4°C, eliminamos el sobrenadante y dejamos secar el tubo para evaporar el etanol. Por último, resuspendimos el ADN en 28 μL de TE.

Electroforesis en gel de agarosa:

Preparamos un gel de agarosa al 0,8% con bromuro de etidio y cargamos 14 μL de las muestras de ADN purificado. Corrimos la electroforesis a 120-150 V durante 3 horas, y realizamos una foto del gel en el documentador de geles con una regla fluorescente en el lateral, para tener la referencia de la altura a la que salen las diferentes bandas del marcador de tamaño.

Transferencia a la membrana de Nylon:

Tras la electroforesis incubamos los geles en una bandeja con solución de desnaturalización (NaCl 1,5 M; NaOH 0,5 M) durante una hora en el balancín. A continuación, realizamos una transferencia por capilaridad: situamos el gel sobre un soporte que poseía papel de filtro en contacto con la solución de desnaturalización, colocamos una membrana de Nylon (previamente humedecida en agua) sobre el gel, encima varios trozos más de papel de filtro, y finalmente una torre de papel absorbente, el cual hacía ascender la solución a través del gel transfiriendo el ADN desnaturalizado hacia la membrana de Nylon. Mantuvimos

el sistema tapado para que no se evaporase la solución de desnaturalización, y lo dejamos transfiriendo durante 14 horas.

Al terminar, antes de separar el gel y la membrana de Nylon, marcamos sobre ésta con un lápiz la situación de los pocillos del gel. Lavamos la membrana 5 minutos en SSC y la dejamos secar a temperatura ambiente. Finalmente, expusimos la membrana a luz UV por la zona de transferencia en un Stratalinker UV Crosslinker, para unir el ADN de forma covalente.

Generación de la sonda de hibridación:

Para la generación de la sonda primero necesitamos ADN como molde para la secuencia, el cual obtuvimos mediante PCR convencional. Diseñamos oligonucleótidos específicos para una zona del gen dentro del fragmento previsto, pero fuera del alcance de los brazos de recombinación de la inserción (**Fig. 26**):

Sentido	TACACATAAATAGAAGGTGTCCTCCTC
Antisentido	TCTGTAGCATTACATTCTCAGACTAC

Utilizamos las mismas condiciones de reacción que anteriormente, escalando los volúmenes de reacción para 100 μ L finales, y usamos como molde 400 ng de ADN de las células ES con las que originamos la cepa de ratón. Una vez amplificado, purificamos el ADN mediante un kit de purificación de PCR por columnas (*GeneJet PCR Purification Kit*).

Para la generación de la sonda preparamos una reacción con un volumen final de 20 μ L, que contenía:

- 40 ng de ADN molde purificado
- 2 μ L de tampón de la enzima
- 2 μ L de hexámeros
- 3 μ L de mezcla de dNTPs sin CTP
- 5 μ L de CTP marcada radiactivamente con 32 P
- 1 μ L de fragmento Klenow de la ADN polimerasa I

Incubamos la reacción durante 30 minutos a 37°C, y purificamos el producto obtenido mediante filtración por columnas de Sephadex G-50.

Finalmente, desnaturalizamos la sonda a 100°C y la introducimos en un tubo de hibridación junto con 4 mL de tampón de Church & Gilbert y ADN de esperma de salmón (100 µg/mL) previamente desnaturalizado.

Hibridación de la sonda:

Antes de la hibridación, mantuvimos la membrana durante 1 hora a 65°C en el un tubo de hibridación con 5 mL de tampón de Church & Gilbert y ADN de esperma de salmón desnaturalizado (100 µg/mL), para bloquearla. **Durante esta hora aprovechamos para realizar la reacción final de generación de la sonda radiactiva.*

Una vez todo preparado, retiramos el tampón usado para el bloqueo de la membrana y añadimos los 4 mL de tampón Church & Gilbert y ADN de esperma de salmón con la sonda de hibridación desnaturalizada, incubando la hibridación a 65°C durante toda la noche.

Detección:

Una vez terminada la hibridación lavamos la membrana durante 30 minutos con una solución de SDS 0,1% p/v y SSC 0,1% v/v a 65°C, 3 veces. Dejamos que se seque un poco y la colocamos en un *cassette* con una pantalla especial para detección de ³²P, exponiéndola durante 24 y 48 horas, tras lo cual revelamos la pantalla.

MyM.2.J - Obtención de extractos celulares proteicos, y valoración

Resuspendimos las muestras celulares en tampón de lisis MLB con un cóctel inhibidor de proteasas, e incubamos en hielo durante 20 minutos para permitir la ruptura y solubilización de las membranas celulares. Centrifugamos los extractos durante 15 minutos a 17.000 xg y 4°C, y separamos el sobrenadante para su uso posterior.

Valoramos la concentración de proteínas totales según el método de Bradford ²⁵⁰, utilizando seroalbúmina bovina (BSA) a distintas concentraciones como patrón.

MyM.2.K - Análisis de las vías de señalización mediante western blot

Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS:

Para la separación de las proteínas utilizamos la técnica de electroforesis desnaturante en condiciones reductoras (SDS-PAGE). Primero incubamos los extractos a 100°C durante 5 minutos en tampón de carga para proteínas (proporción 1:1), y realizamos geles de poliacrilamida al 8-12%, según el tamaño de las proteínas a separar. En cada carril del gel cargamos una muestra, depositando un volumen variable correspondiente a 50 µg de proteínas totales. Corrimos las electroforesis en un tampón de electroforesis para WB, a temperatura ambiente y aplicando un voltaje constante de 125 V.

Transferencia de las proteínas a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF):

Tras la electroforesis, transferimos las proteínas a una membrana de PVDF, previamente activada con metanol, por medio de un sistema de transferencia húmedo, empleando un tampón de transferencia para WB y aplicando un amperaje constante de 400 mA a 4°C durante 4 horas. Comprobamos que la transferencia se había realizado correctamente mediante la tinción de la membrana con rojo Ponceau.

Hibridación de los anticuerpos:

Antes de la hibridación con los anticuerpos, bloqueamos la membrana mediante inmersión en TBS-Tween con BSA al 2% (en el caso de analizar proteínas fosforiladas) o leche desnatada al 5% (para niveles de proteína totales) durante 1 hora, a temperatura ambiente y con agitación constante. Entonces incubamos la membrana con el anticuerpo primario convenientemente diluido (ver anticuerpos WB **MyM.1.D**) a 4°C y agitación constante durante toda la noche. Tras hibridar el anticuerpo primario, lavamos la membrana con TBS-Tween (3 períodos de 10 minutos) e incubamos con el anticuerpo secundario correspondiente, convenientemente diluido (ver anticuerpos WB **MyM.1.D**), a temperatura ambiente y agitación constante durante 1 hora (y si es un secundario fluorescente también en oscuridad). Por último, lavamos de nuevo la membrana 3 veces con TBS-Tween.

Detección:

La detección de la señal depende del tipo de anticuerpo secundario utilizado. Para los anticuerpos secundarios conjugados con HRP incubamos la membrana con las soluciones del kit comercial *Pierce ECL Plus WB Substrate*, siguiendo las instrucciones de la casa comercial, que activan la HRP y generan quimioluminiscencia. Realizamos varias exposiciones de películas de detección a las membranas en *cassettes*, con tiempos variables entre 10 segundos y 2 minutos, revelándolas posteriormente en una máquina de revelado (Medical X-ray Processor).

Para los anticuerpos secundarios fluorescentes analizamos las membranas directamente en uno de los sistemas de detección por fluorimetría (Oddysey System o ChemiDoc MP).

Cuantificación:

Los resultados de las películas obtenidas por western blot a través de anticuerpos secundarios conjugados con HRP los cuantificamos mediante densitometría, haciendo pasar un haz de luz de longitud de onda de 580 nm sobre las bandas presentes, de manera que registramos la intensidad de señal de cada banda.

Los resultados de western blot obtenidos a través de anticuerpos secundarios fluorescentes los cuantificamos mediante el software de análisis de imagen ImageStudio Lite 5.2 (LI-COR).

MyM.2.L - Análisis morfológico de los bazos

Para el análisis morfológico del bazo de los ratones ES *Cyba^{-/-}* frente al de ratones silvestres, incubamos el órgano en una solución de fijación compuesta por PBS y paraformaldehído al 4%, a 4°C durante 24 horas. Al día siguiente cambiamos la solución por PBS limpio, y entregamos los bazos fijados al Servicio de Patología Molecular Comparada del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca, que se encargaron del corte histológico y de su tinción mediante hematoxilina-eosina.

La hematoxilina es un colorante de carácter básico, por lo que tiene preferencia por estructuras ácidas como el núcleo celular, a las que proporciona

una tonalidad azul-púrpura. En cambio, la eosina es un colorante de carácter ácido con afinidad por estructuras básicas, como el citoplasma o el colágeno, a las que dota de una coloración rosada.

MyM.2.M - Citometría de flujo

Marcaje de poblaciones celulares:

Por norma general, para cualquier experimento de citometría utilizamos muestras de células lisadas para la serie roja y lavadas con PBS. Resuspendemos las células en 100 μ L de PBS y las incubamos con *FcR Blocking Reagent* a temperatura ambiente y en oscuridad durante 10 minutos, que actúa como solución de bloqueo para evitar la aparición de uniones inespecíficas de los anticuerpos. Este paso de bloqueo no se utilizó en el caso de los marcajes de poblaciones HSPCs debido a su interferencia con el marcador CD16/32. Tras esto, añadimos los anticuerpos específicos e incubamos el marcaje a temperatura ambiente y en oscuridad durante 15 minutos. Finalmente, lavamos de nuevo las células con PBS para eliminar los restos de anticuerpos y adquirimos las muestras en el citómetro.

Los marcajes poblacionales utilizados fueron los siguientes:

Población celular	Combinación de anticuerpos
Eritroblastos	Anti-Ter119 ⁺
Granulocitos	CD11b ⁺ y Anti-Gr1 ⁺
Monocitos/macrófagos	CD11b ⁺ y Anti-Gr1 ⁻
Células T	CD3 ⁺
Células B	CD19 ⁺ y/o Anti-B220 ⁺
HSCs	Lin ⁻ Sca-1 ⁺ y c-Kit ⁺ (denominada LSK)
LT-HSCs	LSK, CD34 ⁻ y Flt3 ⁻
ST-HSCs	LSK, CD34 ⁺ y Flt3 ⁻
MPPs	LSK, CD34 ⁺ y Flt3 ⁺
HPCs	Lin ⁻ Sca-1 ⁻ y c-Kit ⁺ (denominada LK)
MEPs	LK, CD34 ⁻ , CD16/32 ⁻
GMPs	LK, CD34 ⁺ , CD16/32 ⁺
CMPs	LK, CD34 ⁺ , CD16/32 ⁻
CLPs	Lin ⁻ Sca-1 ^{low} , c-Kit ^{low} , IL-7R α ⁺

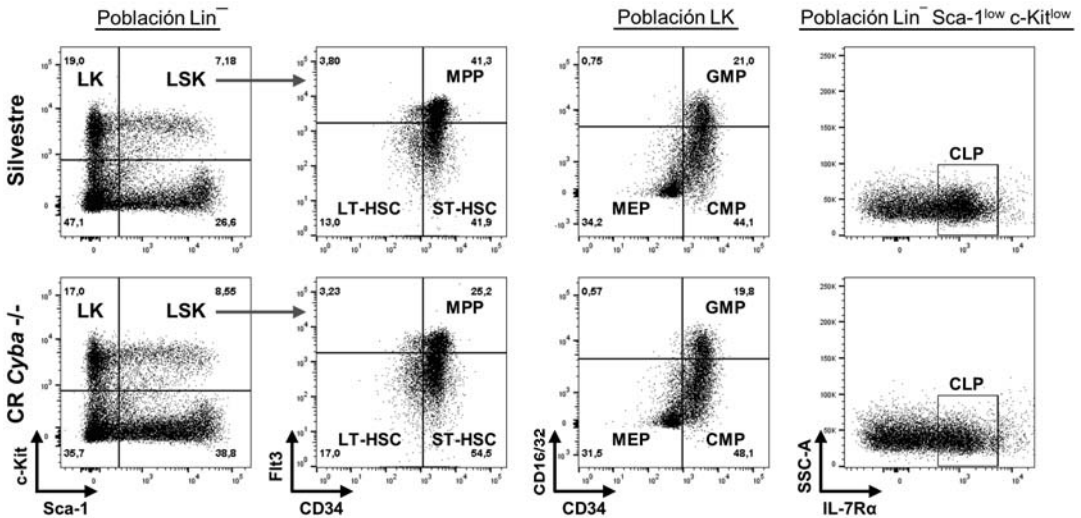


Figura 27- Ejemplo de marcaje para el análisis de las poblaciones de células Lin⁻. Imagen representativa de un experimento de citometría de flujo en la que se muestran los anticuerpos utilizados y las regiones seleccionadas para la separación de las poblaciones celulares inmaduras en un ratón silvestre y un ratón de la cepa CR *Cyba*^{-/-}.

Niveles de ROS intracelulares:

Realizamos medidas de los niveles celulares de ROS sobre muestras de sangre periférica, recogidas como hemos comentado anteriormente, y lisadas para la serie roja. Tras el marcaje de la población de granulocitos con anticuerpos fluorescentes, como se ha explicado previamente, incubamos las muestras con diacetato de 2,7-dihidrodiclorofluoresceína (DCFDA) 10 μ M a 37°C y en oscuridad durante 30 minutos. Este compuesto penetra en las células y es degradado por las esterasas del citoplasma, liberando 2,7-dihidrodiclorofluoresceína que ya no es capaz de difundir a través de las membranas, y que tras ser oxidado por las ROS a diclorofluoresceína (DCF) emite fluorescencia. Lavamos las células con PBS y las adquirimos en el citómetro.

Las muestras que tratamos con PMA 2 μ M para activar la actividad NADPH oxidásica las incubamos con este compuesto a la vez que la propia DCFDA, a 37°C y oscuridad durante 30 minutos. Y las muestras en las que utilizamos el inhibidor DPI 1 μ M para confirmar el efecto de la ausencia de actividad NADPH oxidásica las incubamos con este compuesto a 37°C y en

oscuridad durante 5 minutos, previamente a su estimulación con PMA y el marcaje con DCFDA.

Proliferación celular *in vivo* mediante BrdU:

El análisis de la proliferación celular *in vivo* se llevó a cabo mediante un kit de análisis con bromodesoxiuridina (BrdU). Este compuesto es un análogo de la timidina que se incorpora durante la síntesis del ADN en células que se activan y entran en ciclo celular y, por tanto, detecta qué células han entrado en proliferación durante el periodo de incubación con el compuesto.

Inyectamos a los ratones 100 mg/kg de la solución de BrdU vía intraperitoneal, y los dejamos de forma normal en sus jaulas durante un periodo de incubación de 14 horas. Pasado ese tiempo, extrajimos la médula ósea, lisamos la serie roja y marcamos las poblaciones celulares inmaduras de forma habitual. Una vez lavadas, fijamos y permeabilizamos las células mediante los reactivos presentes en el kit, siguiendo las instrucciones del fabricante. Esto es necesario para que el anticuerpo que marca el BrdU pueda llegar hasta él en el núcleo celular. Tras la fijación, incubamos las muestras a 37°C con ADNasa durante 1 hora, para exponer el BrdU. Lavamos con la solución de lavado del kit, y finalmente marcamos las células con el anticuerpo anti-BrdU a temperatura ambiente y en oscuridad durante 20 minutos. Tras un último lavado del anticuerpo, adquirimos las células en el citómetro.

Viabilidad celular:

Comprobamos la viabilidad celular de las células de médula ósea tratadas con DPI mediante el kit *PE Annexin V Apoptosis Detection Kit with 7-AAD*, siguiendo las instrucciones del fabricante. La técnica se basa en la unión de la anexina V a residuos de fosfatidilserina, que solo se encuentran en la parte externa de la membrana en condiciones de apoptosis celular; y la unión del 7-AAD al ADN, que solo se produce si la estructura de la membrana está muy comprometida, ya que el 7-AAD no es capaz de solubilizar a través de éstas. En resumen, suspendimos las células en el tampón específico del kit, añadimos el anticuerpo y el 7-AAD, e incubamos a temperatura ambiente y en oscuridad durante 20 minutos. Diluimos las células con más tampón para parar la reacción, y las adquirimos en el citómetro directamente, sin lavar con PBS.

MyM.2.N - Niveles de ROS extracelulares

En cuanto a la medida de ROS extracelulares, utilizamos también muestras de sangre periférica lisadas para la serie roja, en este caso sin marcar ninguna población celular. Suspendimos 200.000 células en 200 μL de tampón de quimioluminiscencia por cada pocillo de reacción, y las plaqueamos en placas P-96 especiales para la medida por luminometría. Añadimos luminol 100 μM a cada pocillo para la detección de las ROS, DPI 1 μM en los pocillos correspondientes como control, e introducimos la placa en un Varioskan Flash. El protocolo de actuación programado constó de los siguientes pasos:

- Incubación a 37°C y detección de los niveles basales de ROS cada 20 segundos, durante 5 minutos.
- Extracción de la placa para añadir PMA 2 μM a los pocillos.
- Introducción nuevamente de la placa, agitación, e incubación a 37°C y detección de los niveles de ROS cada 20 segundos, durante 15 minutos.

MyM.2.O - Ensayos de formación de colonias

Llevamos a cabo estos experimentos en alícuotas de un medio básico de metilcelulosa (*MethoCult #M3234*) al cual añadimos las citoquinas correspondientes para los diferentes tipos de linajes a evaluar, según los volúmenes aconsejados por el protocolo de la casa comercial. Una vez listo el medio, añadimos las células resuspendidas en medio de cultivo IMDM al 2% en FBS, mezclamos todo en vortex y dejamos reposar los tubos durante 5 minutos para eliminar las burbujas. Por último, recogimos la mezcla mediante jeringas y sembramos 500 μL en pocillos de placas P-24, con la ayuda de agujas de 18G. Incubamos las placas a 37°C y un 5% de CO_2 durante 12 días (7 días en el caso de las colonias pre-B), y contamos el número de colonias (CFU) de cada pocillo mediante observación por microscopía óptica.

Para la realización de estos experimentos utilizamos muestras de médula ósea completa, sin lisar la serie roja.

Las condiciones utilizadas fueron:

Muestra	Nº células	Citoquinas	Concentración (ng/mL)	Colonias desarrollables	
MO	10.000	IL-3	20	CFU-G, CFU-M y CFU-GM	
MO	10.000	GM-CSF	20	CFU-G, CFU-M y CFU-GM	
MO	10.000	Completa:	SCF	50	CFU-G, CFU-M, CFU-GM y CFU-GEMM
			IL-3	20	
			GM-CSF	20	
			EPO	3 (U/mL)	
MO	200.000	IL-7	20	CFU-preB	
Bazo	200.000	Completa:	SCF	50	CFU-G, CFU-M, CFU-GM y CFU-GEMM
			IL-3	20	
			GM-CSF	20	
			EPO	3 (U/mL)	

MyM.2.P - Análisis transcriptómico (RNAseq)

Para el análisis utilizamos muestras de células Lin⁻ de 2 ratones silvestres y 2 ratones CR *Cyba*^{-/-} a las que extrajimos el ARN total mediante el kit de extracción *RNAspin Mini Kit*, según los protocolos comentados anteriormente. Una vez purificadas, entregamos las muestras al Servicio de Genómica del Instituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG) de Salamanca, que se encargaron de preparar y realizar la secuenciación, y de la obtención de los datos. Brevemente, compilaron las bibliotecas de ADNc con 2 µg de ARN total de las células Lin⁻, utilizando el kit *TruSeq RNA Library Preparation Kit v2* (Illumina), y realizaron una secuenciación *single-end* de 150 nt de longitud en un NextSeq 500 System (Illumina), utilizando el kit *Mid Output kit v2.5* (Illumina).

Comparamos las lecturas obtenidas en la secuenciación con el genoma GRCm38 de ratón mediante la herramienta RaNAseq del Servicio de Bioinformática de la Universidad de Salamanca (<https://ranaseq.eu/home>). Los archivos y análisis realizados pueden comprobarse mediante el número de acceso GSE131725 en la base de datos Gene Expression Omnibus (GEO).

MyM.2.Q - Concentración sérica de inmunoglobulinas

Obtuvimos muestras de sangre periférica de los ratones según la técnica comentada anteriormente, aunque esta vez recogimos la sangre en tubos eppendorf sin EDTA, dejándola coagular a temperatura ambiente durante 1 hora. Una vez coagulada, centrifugamos los tubos a 3000 rpm durante 20 minutos para decantar los restos al fondo y poder recoger el suero sanguíneo, pasándolo a tubos limpios. Congelamos las muestras de suero a -20°C durante unos días hasta tener todas las muestras disponibles para medir la concentración de inmunoglobulinas a la vez.

La medida de la concentración la realizamos mediante kits comerciales de ELISA específicos para las IgA, IgG total e IgM (*IgA / IgG / IgM Mouse Uncoated ELISA Kit with Plates*), siguiendo las instrucciones de la casa comercial. En general, preparamos las placas con el anticuerpo de captura, incubándolas a 4°C hasta el día siguiente. Lavamos los pocillos, bloqueamos a temperatura ambiente durante 2 horas, y tras lavar incubamos las muestras (diluidas 1:1.000 IgA e IgG / 1:30.000 IgM) con el tampón de ensayo a temperatura ambiente y agitación de 400 rpm durante 2 horas. A la vez que las muestras realizamos una recta patrón con diferentes concentraciones del estándar proporcionado por el kit. Lavamos de nuevo y añadimos el anticuerpo de detección a cada pocillo, incubando a temperatura ambiente y agitación de 400 rpm durante 1 hora. Finalmente, tras lavar el anticuerpo de detección, incubamos con el sustrato de reacción a temperatura ambiente durante 15 minutos, tras los que paramos la reacción con H₃PO₄ 1M y leímos los pocillos a 450 nM en el fotómetro de microplacas Multiskan FC.

MyM.2.R - Trasplante de médula ósea en ratones

Obtuvimos las muestras de médula ósea de los ratones donantes según la técnica comentada anteriormente, y lisamos la serie roja. Una vez lavadas, las preparamos según el tipo de trasplante a realizar: para trasplantes completos simplemente separamos 3.000.000 de células por cada ratón receptor, mientras que para trasplantes competitivos mezclamos 1.500.000 de células del grupo experimental con 1.500.000 de células silvestres en competición. Resuspendimos las células en 100 µL de PBS estéril, y las inyectamos en las venas laterales de la

cola de los ratones receptores mediante jeringas con agujas de 27G. Los ratones receptores fueron ratones C57BL/6J silvestres previamente irradiados de forma letal por una fuente de cesio (Gammacell 1000 Elite) con 2 dosis de 5 Gy, separadas 2 horas.

En el caso de los experimentos de trasplante competitivo con células tratadas con DPI, separamos las células CD45.1⁺ ya lisadas para la serie roja en dos grupos, DPI y control. Incubamos cada grupo celular en una placa de cultivo a 37°C y 5% CO₂ en medio IMDM (al 20% en FBS), con el tratamiento correspondiente (DPI 1 μM o DMSO -vehículo-), y con un cóctel de citoquinas específicas (TPO, SCF, IL-3 y Flt3-L a 10 ng/mL) para el mantenimiento de las células inmaduras durante el periodo de incubación. Las células CD45.2⁺ de competición también las cultivamos de forma similar durante ese tiempo, pero sin tratarlas con DPI ni con el vehículo. Tras el tratamiento lavamos las células con PBS y las mezclamos con las células en competición, de forma similar al resto de trasplantes competitivos.

Mantuvimos a los ratones receptores estabulados en condiciones estándar, controlando su peso y aspecto físico cada 2 días. Durante las 2 primeras semanas postrasplante los tratamos con enrofloxacino diluido en el agua de bebida (100 μg/mL), para evitar posibles infecciones. De forma general, a las 6 semanas postrasplante, y a partir de ahí cada 4 semanas, obtuvimos muestras de sangre periférica de todos ellos para comprobar la evolución del trasplante hematopoyético.

MyM.2.S - Análisis estadístico

En los gráficos de puntos, cada punto representa el resultado de un individuo, y la línea negra horizontal el valor medio del grupo experimental. En los gráficos de barras se representan el valor medio y la desviación estándar (DE).

Analizamos los datos con el paquete estadístico de Excel y el software SPSS 23, utilizando pruebas t de *Student* de dos colas, y consideramos las diferencias estadísticamente significativas cuando el *p*-valor fue inferior a 0,05 (*), 0,01 (**), y 0,001 (***)).

R
E
S
U
L
T
A
D
O
S

Y
D
I
S
C
U
S
I
Ó
N

RyD.1 - EXPRESIÓN DE NADPH OXIDASAS EN CÉLULAS LIN⁻

Nuestro primer objetivo fue conocer qué miembros de la familia NADPH oxidasa se encuentran presentes en las células hematopoyéticas más inmaduras de ratón, de manera que puedan estar involucradas en la quiescencia, activación o procesos de diferenciación de las HSPCs, y focalizar nuestra atención sobre ellas.

Para este análisis lo que hicimos fue extraer la médula ósea de varios ratones de la cepa C57BL/6J, y purificar su población de células *Lineage* negativas (Lin⁻), que son aquellas células que no expresan ningún tipo de marcador de superficie de linajes maduros, como son CD5, CD45R (B220), CD11b, Gr-1 (Ly-6G/C), 7/4 (Ly-6B.2), y Ter-119, y por tanto se corresponden con las HSPCs. Una vez obtenidas, realizamos una extracción de ARNm total de las muestras, y una retrotranscripción de ese ARNm a ADNc para poder usarlo como molde para realizar PCR a tiempo real de cada una de las NADPH oxidasas. Ya hemos comentado que los roedores no presentan Nox5, por lo que diseñamos oligonucleótidos específicos para las enzimas Nox1 a Nox4 y Duox1/2 de ratón (secuencias en **MyM.2.E**). Como control positivo para las reacciones también obtuvimos muestras de los tejidos en los que cada enzima se expresa en mayor cantidad: colon (Nox1), médula ósea completa (Nox2), cerebro (Nox3), riñón (Nox4) y tiroides (Duox1/2).

Los miembros de la familia que mostraron amplificación (**Fig. 28-A**), y cuyo producto poseía un tamaño de banda adecuado al diseñado para la pareja de oligonucleótidos (**Fig. 28-B**) fueron Nox1, Nox2 y Nox4.

Por tanto, las NADPH oxidasas que se encuentran presentes en células HSPC de ratón, y por ello pueden tener alguna función en su regulación, son Nox1, Nox2 y Nox4. En un artículo reciente se ha identificado también la presencia de Nox3 en HSCs de ratón²⁵¹, pudiendo deberse a una mayor sensibilidad de la técnica al utilizar una población celular más purificada que las células Lin⁻. Además, en células CD34⁺ humanas, movilizadas a sangre periférica mediante G-CSF, se detectó la presencia principalmente de Nox1, Nox2 y Nox4, y una pequeña expresión residual de Nox5²⁵², lo que concuerda perfectamente con nuestros datos sobre la expresión en células Lin⁻ de ratón.

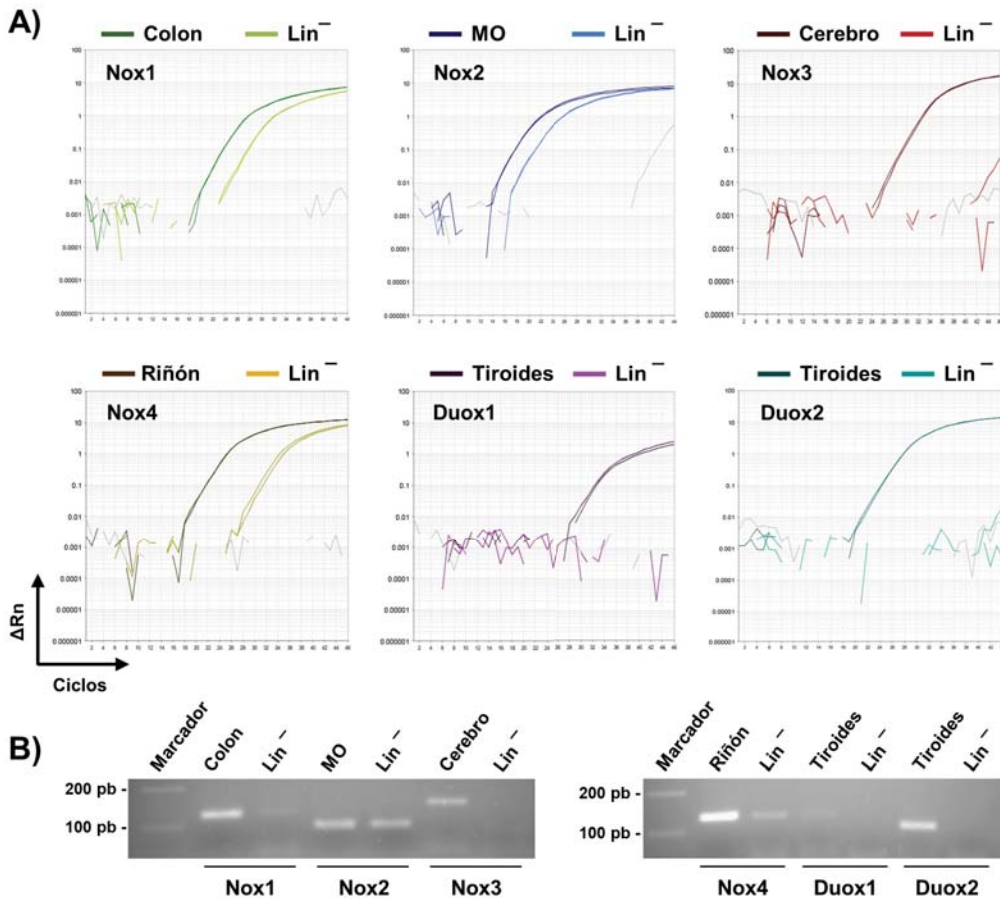


Figura 28- Expresión de NADPH oxidasas en células Lin^{-} de ratón. A) Imagen representativa de las curvas de amplificación obtenidas durante las qPCRs realizadas para las diferentes NADPH oxidasas en muestras de células Lin^{-} y en sus respectivos tejidos de control (n=2). Las líneas de colores representan la amplificación del tejido de su respectivo color, mientras que las grises representan los controles negativos para cada reacción. B) Imagen de electroforesis de los productos de amplificación de las qPCRs para confirmar el tamaño del producto amplificado (Nox1: 122 pb; Nox2: 99 pb; Nox3: 142 pb; Nox4: 127 pb; Duox1: 131 pb; Duox2: 106 pb).

RyD.2 - GENERACIÓN DE MODELOS DE RATÓN DEFICIENTES EN EL GEN *Cyba*

Tras conocer el patrón de expresión en células Lin^{-} , y puesto que todas ellas son NADPH oxidasas dependientes de $p22^{phox}$, nuestro planteamiento fue la eliminación del gen *Cyba* como primera aproximación al papel de las NADPH

oxidasas en hematopoyesis, ya que así bloquearíamos la actividad de todas ellas a la vez para ver si poseen alguna función sobre la hematopoyesis.

En el momento en que comenzamos este trabajo ningún grupo de investigación había publicado nada sobre ratones deficientes para el gen *Cyba*, ni encontramos ninguna cepa disponible para su compra, de manera que decidimos generar la línea de ratón deficitaria para p22^{phox} nosotros mismos. Para ello adquirimos varios clones de células madre embrionarias (ES) con una inserción que genera una proteína truncada (más información en **MyM.2.A**), y con la ayuda del Servicio de Transgénesis de la USAL generamos una cepa de ratón modificada genéticamente deficitaria en este gen (denominada a partir de ahora ES *Cyba*^{-/-}).

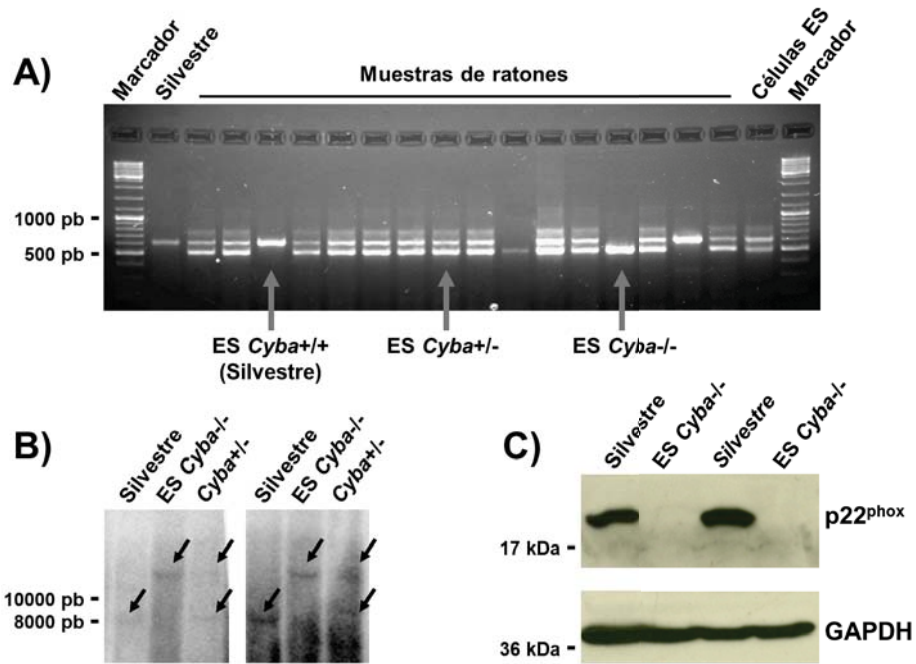


Figura 29- Genotipado de los ratones ES *Cyba*^{-/-} modificados genéticamente. **A)** Imagen de electroforesis de productos obtenidos mediante PCR del ADN genómico de los ratones, para comprobar si portan la inserción que trunca la expresión del gen *Cyba* (Genotipo silvestre: 620 pb; genotipo *Cyba*^{-/-}: 514 pb; genotipo heterocigótico *Cyba*^{+/-}: doble banda 514 pb y 620 pb). **B)** Imagen de southern blot de las bandas originadas tras el corte del ADN genómico con Bgl II y su hibridación con la sonda radiactiva diseñada, para comprobar si portan la inserción y si está situada en el lugar correcto (Genotipo silvestre: 8073 pb; genotipo *Cyba*^{-/-}: 12874 pb; genotipo heterocigótico *Cyba*^{+/-}: doble banda 8073 pb y 12874 pb). **C)** Imagen representativa de western blot realizado para comprobar la ausencia de p22^{phox} en la médula ósea de ratones ES *Cyba*^{-/-} (n=4).

El primer paso con la cepa ES *Cyba*^{-/-} fue genotipar los ratones para confirmar la presencia del inserto y su correcta colocación, lo cual realizamos mediante técnicas de PCR y southern blot (Fig. 29-A, B). También confirmamos la ausencia de proteína p22^{phox} en los ratones mediante western blot, tomando como muestra células de médula ósea (Fig. 29-C).

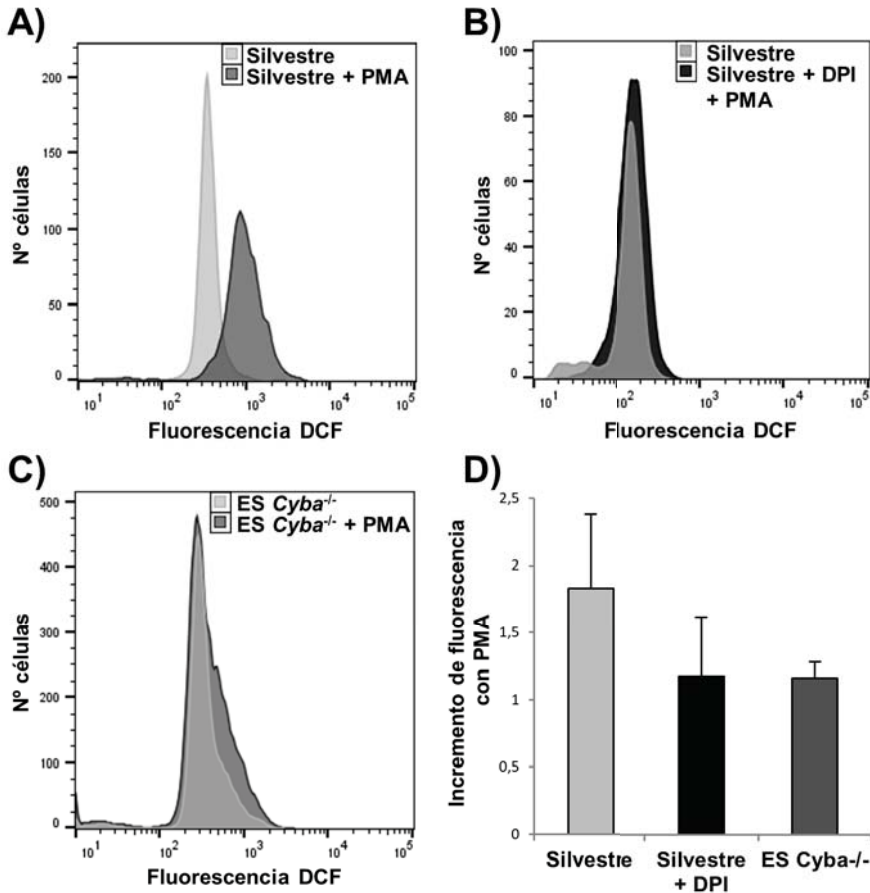


Figura 30- Medida de la formación de ROS por NADPH oxidasas en granulocitos de ratones ES *Cyba*^{-/-}. Histogramas representativos del nivel de fluorescencia media de DCF en granulocitos de **A)** ratones silvestres en estado basal y tras 30 minutos de estimulación con 2 μ M de PMA, **B)** ratones silvestres en estado basal y tras 5 minutos de estimulación con 1 μ M de DPI previamente a la estimulación con PMA, y **C)** ratones ES *Cyba*^{-/-} en estado basal y tras estimulación con PMA. **D)** Diagrama de barras que muestra el aumento de fluorescencia media de DCF que se produce entre los granulocitos en estado basal y los granulocitos tras su estimulación con PMA en los tres grupos. Se representa la media + DE (Silvestre n=2; silvestre + DPI n=4; ES *Cyba*^{-/-} n=3).

Finalmente, realizamos una prueba de activación de NADPH oxidasas para comprobar si la falta de p22^{phox} reducía la formación de ROS mediante estas enzimas. La estimulación con forbol 12-miristato-13-acetato (PMA) activa PKC, enzima que fosforila y activa muchas de las subunidades y miembros de la familia ⁵⁶; y uno de los procesos de mayor formación de ROS por NADPH oxidasas es el estallido respiratorio de las células fagocíticas, llevado a cabo por Nox2 y la participación indispensable de p22^{phox}. Por tanto, medimos los niveles de ROS en granulocitos de sangre periférica de ratones control y ratones ES *Cyba*^{-/-} en condiciones basales y bajo estimulación con PMA.

Como se observa en la **Figura 30-A**, cuando estimulamos granulocitos de ratón silvestre con PMA se produce un aumento de ROS, con una media de fluorescencia de casi el doble que en estado basal (**Fig. 30-D**). En cambio, si tratamos los granulocitos previamente con difenileniodonium (DPI), un inhibidor de NADPH oxidasas ampliamente utilizado, la estimulación con PMA apenas genera ese aumento de fluorescencia (**Fig. 30-B, D**), demostrando que el aumento de ROS en respuesta a PMA es específico de NADPH oxidasas. Finalmente, cuando exponemos granulocitos de ratones ES *Cyba*^{-/-} a PMA tampoco se produce ningún aumento en los niveles de ROS (**Fig. 30-C, D**), por lo que la actividad de las NADPH oxidasas en la cepa de ratones deficitaria de p22^{phox} se encuentra inhibida.

Una vez confirmado que el modelo animal era correcto realizamos un análisis fenotípico básico, encontrando que los animales ES *Cyba*^{-/-} presentan una clara inclinación de la cabeza, unido a movimientos anómalos al levantarlos por la cola. Esta situación ya ha sido observada anteriormente en un mutante puntual del gen *Cyba* ¹²⁶, debido seguramente a la pérdida de actividad de Nox3, enzima que hemos visto que se encuentra muy implicada en la generación de la otoconia, y por tanto necesaria para un correcto funcionamiento del sistema vestibular.

Otra gran alteración que observamos en la cepa ES *Cyba*^{-/-} es una evidente esplenomegalia, presentando bazos con un volumen muy superior a los de ratones C57BL/6J silvestres (**Fig. 31-A**). Debido a esto, decidimos realizar un análisis morfológico de los bazos mediante fijación, corte histológico y tinción, para estudiar las posibles diferencias con respecto a un bazo normal (**Fig 31-B**). El análisis morfológico nos indica que los bazos de los ratones ES *Cyba*^{-/-} poseen un aumento del órgano en general, pero sobre todo una mayor proporción de pulpa roja, y dentro de ésta, un mayor número de focos de células mieloides en

comparación con la pulpa roja de bazos de ratones silvestres. Teniendo en cuenta que el bazo en el ratón también posee capacidad hematopoyética completa, parece que lo que pueden presentar estos bazos sería un aumento de la actividad hematopoyética local.

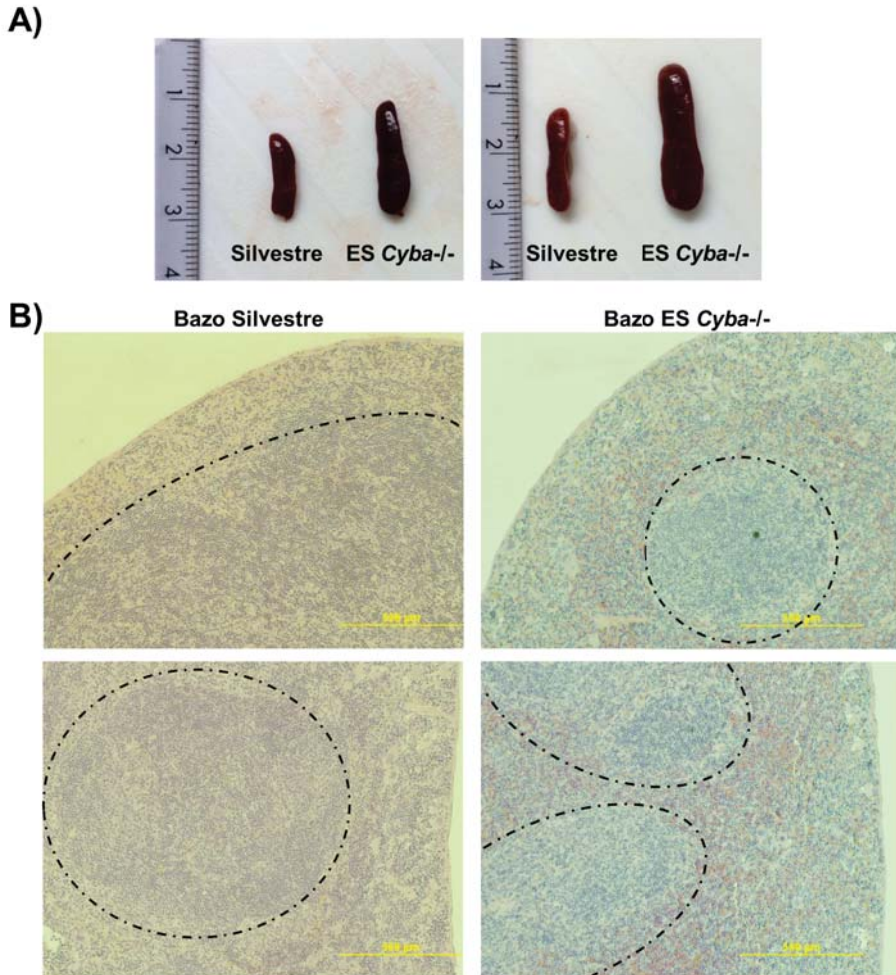


Figura 31- Esplenomegalia de los bazos de ratones ES *Cyba*^{-/-}. A) Imágenes representativas de la comparación del tamaño del bazo entre ratones silvestres control y ratones ES *Cyba*^{-/-}. B) Imagen de cortes histológicos de bazos procedentes de ratones silvestres y ratones ES *Cyba*^{-/-}. La tinción permite distinguir entre la pulpa roja del bazo en la parte externa, con una coloración rojiza por la presencia de eritrocitos, y la pulpa blanca en la parte interna, de coloración más azulada por la agrupación de linfocitos en los núcleos de maduración. Se han añadido líneas discontinuas para facilitar la diferenciación entre ambas partes.

Durante el transcurso de este trabajo se nos presentó la posibilidad de crear de nuevo el modelo de ratón mediante la novedosa técnica CRISPR/Cas9, con la ventaja de permitirnos hacerlo sobre un fondo genético C57BL/6J puro, ya que, como hemos comentado en materiales y métodos sobre la creación del modelo ES *Cyba*^{-/-}, éste posee un pequeño fondo genético de la subcepa C57BL/6N debido a la procedencia de las células ES (JM8A3.N1). Esta cepa fue generada también en colaboración con el Servicio de Transgénesis de la USAL, y a partir de este punto será denominada CR *Cyba*^{-/-}. Sobre los ratones de este modelo también llevamos a cabo el genotipado mediante PCR y el análisis mediante western blot, para confirmar la ausencia de expresión de p22^{phox} (Fig. 32).

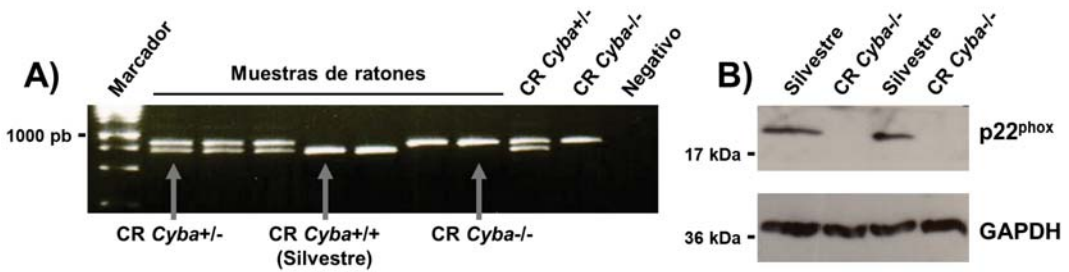


Figura 32- Genotipado de los ratones CR *Cyba*^{-/-} modificados genéticamente. A) Imagen de electroforesis de productos obtenidos mediante PCR del ADN genómico de los ratones, para comprobar si portan la inserción/delección que interrumpe la traducción del gen *Cyba* (Genotipo silvestre: 700 pb; genotipo *Cyba*^{-/-}: 806 pb; genotipo heterocigótico *Cyba*^{+/-}: doble banda 700 pb y 806 pb). B) Imagen representativa de western blot realizado para comprobar la ausencia de p22^{phox} en la médula ósea de ratones CR *Cyba*^{-/-} (n=4).

De igual manera, comprobamos la respuesta de sus granulocitos a la estimulación con PMA, midiendo sus niveles de ROS tanto de manera intracelular por citometría como extracelular mediante luminometría (Fig. 33). El resultado fue similar al obtenido en el modelo ES *Cyba*^{-/-}, de manera que con ambas cepas logramos inhibir la actividad de las NADPH oxidasas dependientes de p22^{phox}.

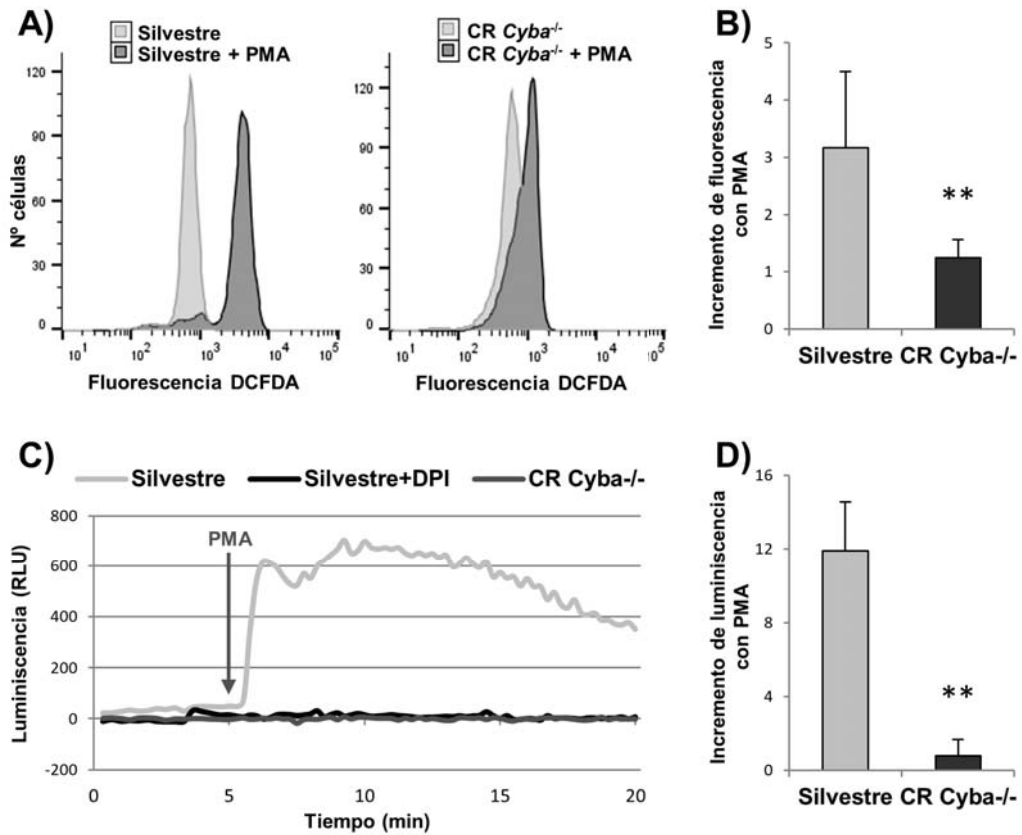


Figura 33- Medida de la formación de ROS por NADPH oxidasas en granulocitos de ratones CR *Cyba*^{-/-}. Histogramas representativos del nivel de fluorescencia media de DCF en granulocitos de **A)** ratones silvestres y ratones CR *Cyba*^{-/-} en estado basal y tras 30 minutos de estimulación con 2 μ M de PMA. **B)** Diagrama de barras que muestra el aumento de fluorescencia media de DCF que se produce entre los granulocitos en estado basal y los granulocitos tras su estimulación con PMA en ambos grupos. Se representa la media + DE (n=7). **C)** Gráfico de monitorización a tiempo real representativo del nivel de quimioluminiscencia extracelular medido con luminol en muestras de sangre periférica tras estimulación con 2 μ M de PMA. La muestra "Silvestre + DPI" fue tratada previamente con 1 μ M de DPI durante 5 minutos. (RLU: unidades de luminiscencia relativas). **D)** Diagrama de barras que muestra el aumento de quimioluminiscencia extracelular medido con luminol de las muestras tras 5 minutos de estimulación con PMA. Se representa la media + DE (n=3). Las diferencias significativas respecto al control se representan como ** p <0,01.

En cuanto a las características fenotípicas, los ratones CR *Cyba*^{-/-} también muestran la evidente inclinación de la cabeza, que como indicábamos antes, probablemente sea debida a la defectuosa generación de la otoconia por la falta de actividad de Nox3. Sin embargo, en el modelo CR *Cyba*^{-/-} la esplenomegalia solo aparece en un pequeño número de casos, y siempre asociada a la aparición de granulomas, inflamaciones características en caso de CGD ²⁵³. A pesar de que el mantenimiento de los animales CR *Cyba*^{-/-} se produjo en condiciones libres de patógenos en el OMG de la USAL, este tipo de inflamaciones pueden llegar a formarse por la presencia de cualquier elemento exógeno, aun no siendo infeccioso ^{254,255}, o por reacciones de autoinmunidad ²⁵³. En cambio, la esplenomegalia presente en la cepa ES *Cyba*^{-/-} se encontró en todos los animales, sin que ninguno de ellos presentara ningún signo de granuloma. Por tanto, este síntoma no parece tener el mismo origen en ambos modelos, y no conocemos a qué puede deberse esta diferencia fenotípica.

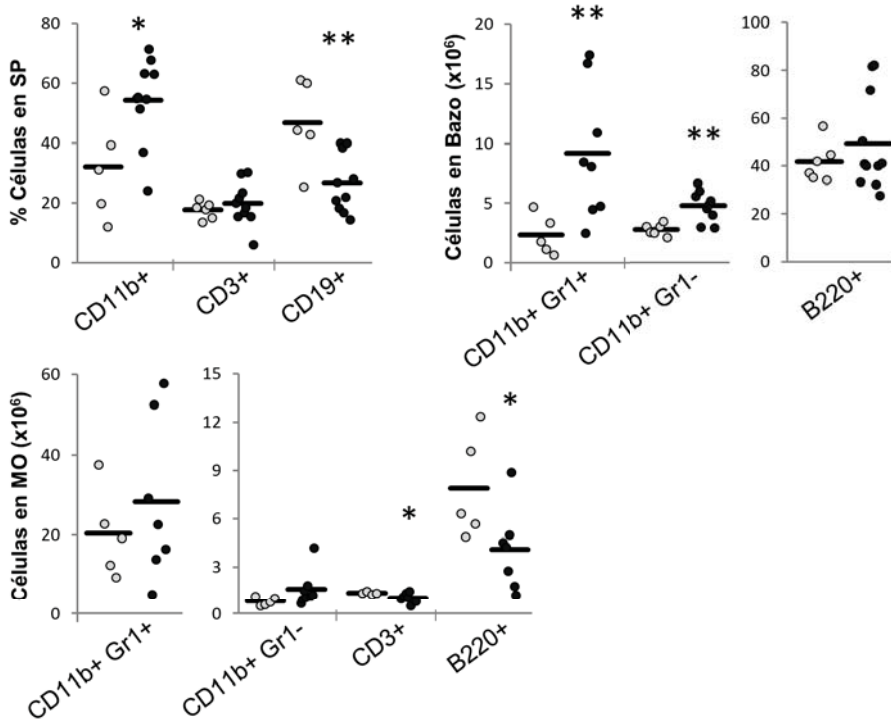
Los posteriores experimentos realizados en este trabajo con la cepa CR *Cyba*^{-/-} siempre se llevaron a cabo con ratones sin granulomas, sin esplenomegalia, ni ningún otro signo inflamatorio.

RyD.3 - HEMATOPOYESIS *IN VIVO* EN AUSENCIA DE P22^{phox}

Nuestra primera aproximación para evaluar el papel de p22^{phox} en la hematopoyesis *in vivo* fue estudiar si existen diferencias entre ratones *Cyba*^{-/-} y ratones silvestres en cuanto a las poblaciones celulares hematopoyéticas. Para ello, analizamos los linajes celulares sanguíneos en diferentes compartimentos hematopoyéticos de ratones entre 18-24 semanas de edad (**Fig. 34**).

En el modelo ES *Cyba*^{-/-} observamos un aumento significativo de poblaciones celulares mieloides (CD11b⁺) tanto en sangre periférica como en bazo, mientras que en médula ósea no llega a ser significativo (**Fig. 34-A**). Este aumento mieloides se encuentra compensado por un descenso en los linajes linfoides, siendo significativo el descenso de linfocitos B tanto en sangre periférica como en médula ósea, y el descenso de linfocitos T en ésta última.

A) ○ Silvestre ● ES Cyba ^{-/-}



B) ○ Silvestre ● CR Cyba ^{-/-}

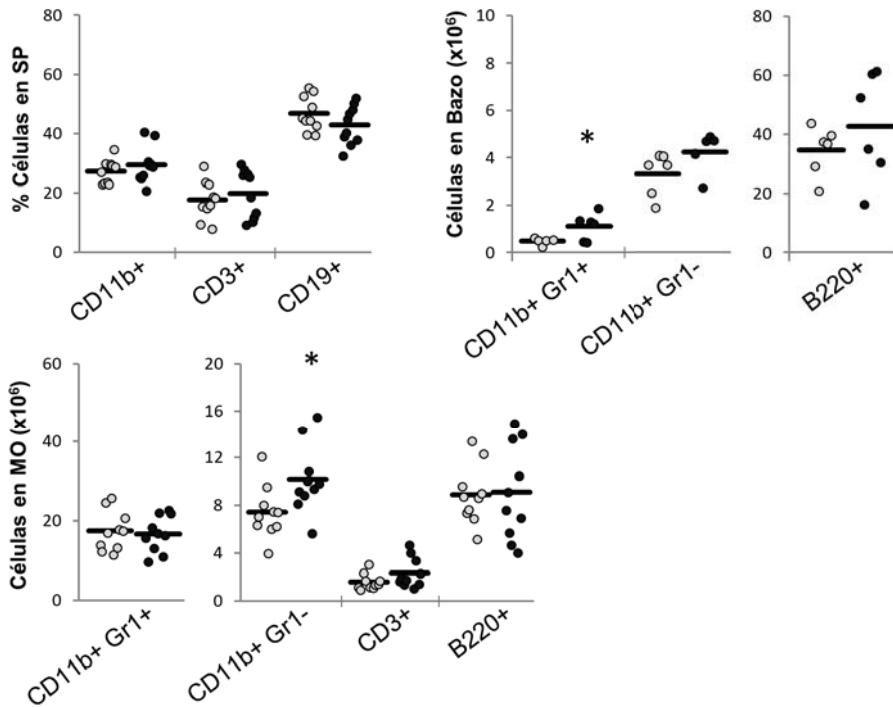


Figura 34 (página anterior)- Análisis de las poblaciones celulares hematopoyéticas maduras en ratones ES *Cyba*^{-/-} y CR *Cyba*^{-/-}. Las gráficas representan el porcentaje o número de células de cada población en los ratones silvestres control (puntos claros) y **A)** ratones ES *Cyba*^{-/-} (puntos oscuros), o **B)** ratones CR *Cyba*^{-/-} (puntos oscuros), y la media de cada grupo de experimento (líneas negras). CD11b⁺ Gr1⁺: granulocitos; CD11b⁺ Gr1⁻: monocito/macrófagos; CD3⁺: linfocitos T; CD19⁺/B220⁺: linfocitos B. Las diferencias significativas respecto al control se representan como **p*<0,05; ***p*<0,01.

Por su parte, el modelo CR *Cyba*^{-/-} también demuestra un sesgo hacia las poblaciones mieloides, como se observa por el aumento significativo de células CD11b⁺ Gr1⁺ en bazo, y el de células CD11b⁺ Gr1⁻ en médula ósea y bazo (en este último no significativo), aunque es menos acusado que en el modelo ES *Cyba*^{-/-} y no está acompañado por el descenso de linfocitos (**Fig. 34-B**).

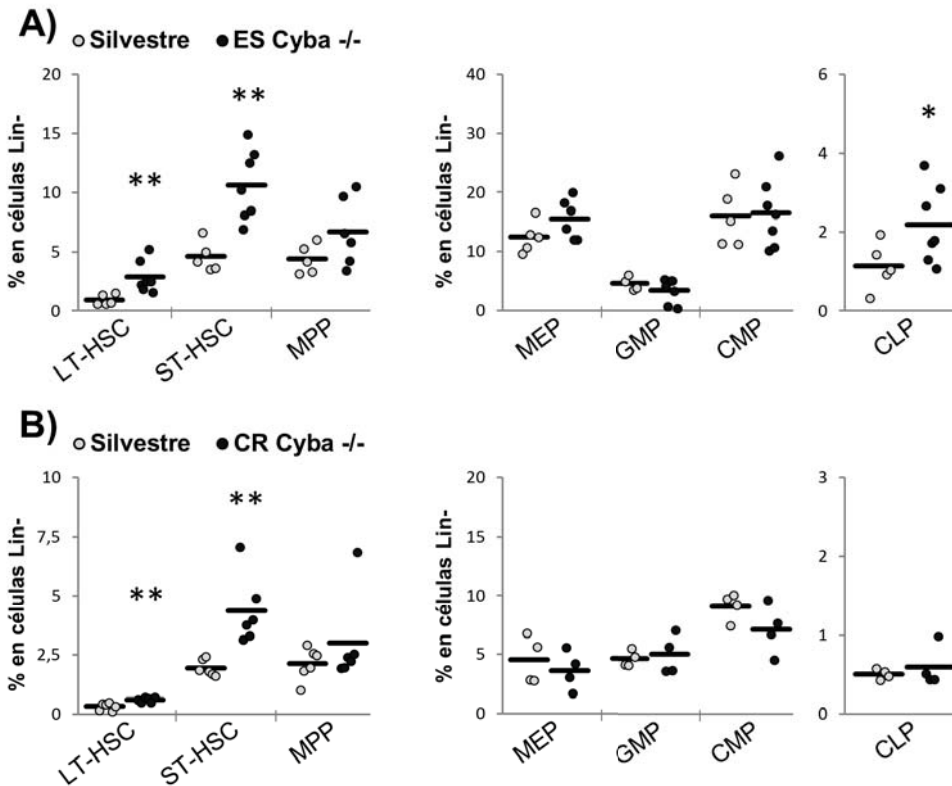


Figura 35- Análisis de las HSPCs en ratones ES *Cyba*^{-/-} y CR *Cyba*^{-/-}. Las gráficas representan el porcentaje de cada población celular dentro de la población de células Lin⁻, en ratones silvestres control (puntos claros) y **A)** ratones ES *Cyba*^{-/-} (puntos oscuros), o **B)** ratones CR *Cyba*^{-/-} (puntos oscuros), y la media de cada grupo de experimento (líneas negras). Las diferencias significativas respecto al control se representan como **p*<0,05; ***p*<0,01.

En cuanto a células inmaduras en la médula ósea, la población de HSCs se encuentra claramente aumentada en ambos modelos *Cyba*^{-/-} respecto a ratones control, sobre todo debido al aumento significativo en el porcentaje de poblaciones LT-HSCs y ST-HSCs (**Fig. 35**). En cambio, las poblaciones de células progenitoras no parecen verse muy afectadas por la ausencia de p22^{phox}, y únicamente se observa un aumento significativo en la población de CLPs en los ratones ES *Cyba*^{-/-} respecto al control.

En base a estos datos parece claro que p22^{phox}, y por ende la generación de ROS por alguna de las NADPH oxidasas dependientes de esta subunidad, está involucrada en la homeostasis y mantenimiento de las HSCs, ya que su eliminación provoca que sus dos poblaciones más primitivas se encuentren claramente aumentadas. De hecho, en un modelo de células iPSC humanas procedentes de pacientes con CGD por mutación en el gen *Cyba* y reprogramadas *in vitro* a células CD34⁺ también se ha observado un aumento de progenitores más inmaduros²⁵⁶, y la eliminación de Nox2 provoca un aumento en el número de HSCs *in vivo*, tanto circulantes como en médula ósea^{231,251,257}. Todo ello concuerda con los resultados previos en los que se observa que existe una relación entre los niveles de ROS y la diferenciación hematopoyética^{201,202} (**Fig. 20**), de manera que al reducir los niveles de ROS se podría estar reduciendo la capacidad de diferenciación de las HSCs, que se acumularían en sus estados más inmaduros.

Además de en la homeostasis de HSCs, p22^{phox} también parece tener un papel sobre el camino a seguir durante el proceso de diferenciación hematopoyética, ya que los ratones *Cyba*^{-/-} presentan un incremento de las poblaciones mieloides en detrimento de poblaciones linfoides. Recientemente, se ha descrito que la eliminación de Nox2 también induce el aumento de células mieloides^{231,251}, lo que está de acuerdo con el sesgo mieloides de los ratones *Cyba*^{-/-} y pone de manifiesto la relevancia de Nox2 y p22^{phox} para la hematopoyesis *in vivo*.

Finalmente, nos parece interesante el hecho de que en los ratones del modelo ES *Cyba*^{-/-}, que son precisamente los que presentan un descenso de poblaciones linfoides, sea en los que encontremos un aumento significativo de sus progenitores (CLPs). Esto podría indicar que alguna de las etapas del proceso de maduración de linfocitos requiere de la participación de las NADPH oxidasas dependientes de p22^{phox}.

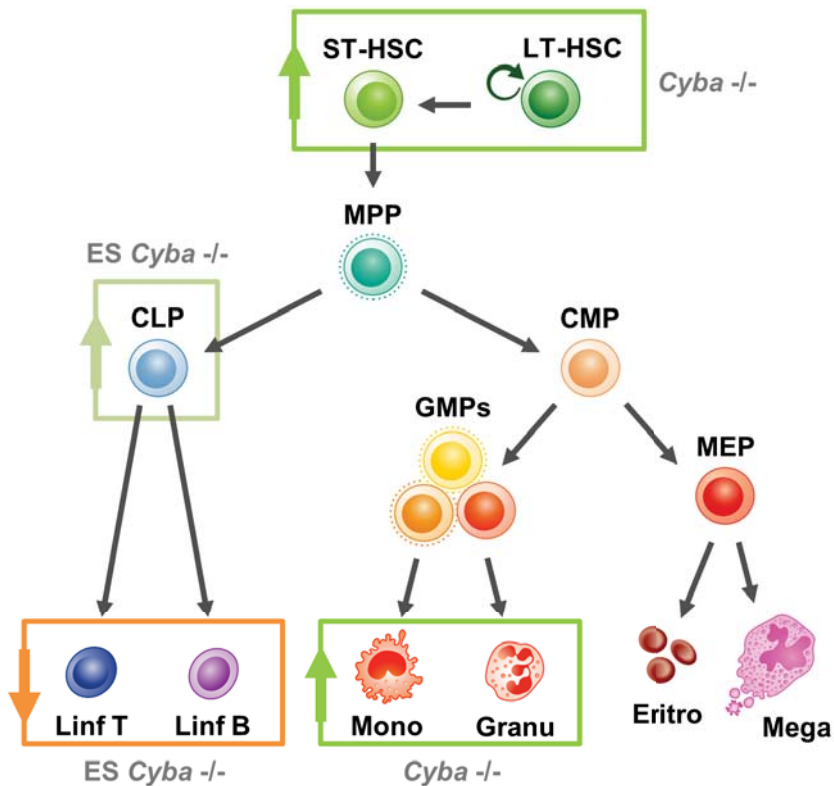


Figura 36- Resumen de los efectos sobre la hematopoyesis *in vivo* de los modelos de ratón *Cyba*^{-/-}. La ausencia de p22^{phox} provoca un aumento significativo de las HSCs en estados más inmaduros (LT-HSCs y ST-HSCs), y también de los linajes mieloides de monocitos y granulocitos (recuadros en verde). Además, en el modelo ES *Cyba*^{-/-} el aumento de células mieloides se acompaña de un descenso de linajes linfoides (recuadro naranja), y un aumento de sus progenitores CLP (recuadro verde tenue). Linf T: linfocitos T; Linf B: linfocitos B; Mono: monocitos/macrófagos; Granu: granulocitos; Eritro: eritrocitos; Mega: megacariocitos.

RyD.3.A - Influencia del nicho celular sobre los resultados de los modelos *Cyba*^{-/-}

Como hemos comentado en la introducción, uno de los principales factores que se encarga de mantener la homeostasis de las HSCs es el nicho hematopoyético, y puesto que los modelos de ratón *Cyba*^{-/-} poseen el déficit de p22^{phox} en todas sus células, tanto HSCs como nicho celular, no podemos discernir si el efecto observado se debe a la falta de p22^{phox} en las propias HSCs, a su falta en el nicho celular, o a una mezcla de ambos aspectos. Por ello, nuestro siguiente paso fue

realizar experimentos de trasplante de médula ósea en ratones silvestres, y así analizar la regeneración hematopoyética de HSCs *Cyba*^{-/-} sobre un nicho hematopoyético normal. Utilizamos ratones receptores C57BL/6J de entre 8 y 12 semanas de edad, a los que inyectamos células de médula ósea completa procedentes de ratones ES *Cyba*^{-/-} o ratones C57BL/6J silvestres. Analizamos los ratones a las 20 o 30 semanas postrasplante, no encontrando ninguna alteración significativa de los linajes sanguíneos maduros en los diferentes compartimentos hematopoyéticos, únicamente una reducción de linfocitos T en la médula ósea (datos no mostrados). Sin embargo, al analizar las células inmaduras los resultados fueron bastante diferentes: en los ratones trasplantados con células ES *Cyba*^{-/-} encontramos un aumento significativo en todas las poblaciones de HSCs (**Fig. 37-A**), que además se extiende a un incremento significativo en las poblaciones de progenitores MEP y CLP, y una tendencia de aumento en los CMPs (**Fig. 37-B**).

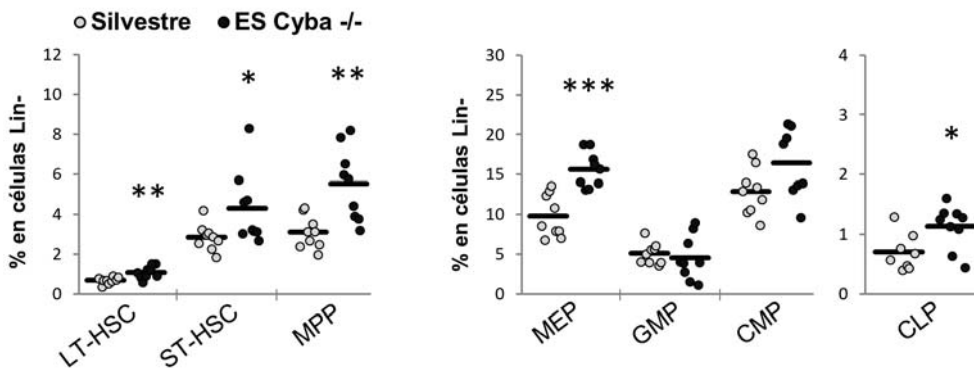


Figura 37- Análisis de las HSPCs en ratones trasplantados con médula ósea ES *Cyba*^{-/-}. Las gráficas representan el porcentaje de cada población celular dentro de la población de células *Lin*⁻, en ratones trasplantados con células silvestres control (puntos claros) y células ES *Cyba*^{-/-} (puntos oscuros), y la media de cada grupo de experimento (líneas negras). Las diferencias significativas respecto al control se representan como **p*<0,05; ***p*<0,01; ****p*<0,001.

Este aumento de las HSCs *Cyba*^{-/-} tras la regeneración hematopoyética en ratones con el nicho celular normal concuerda con el aumento visto durante la hematopoyesis de los modelos de ratón *Cyba*^{-/-} (**Fig. 35**). De esta forma, podemos descartar que el aumento de HSCs en estos modelos se deba a la falta de p22^{phox} en el nicho hematopoyético, y concluir que se debe a una función de p22^{phox} en las propias HSCs.

Por otro lado, tras el trasplante con células *Cyba*^{-/-} prácticamente no encontramos ningún efecto sobre los linajes maduros, mientras que en los ratones *Cyba*^{-/-} se observa un claro aumento de células mieloides (**Fig. 34**). Por ello, pensamos que la causa relacionada con la elección del camino a seguir durante el proceso de diferenciación hematopoyética podría ser la ausencia de p22^{phox} en el nicho y no en las células hematopoyéticas.

RyD.3.B - Capacidad de proliferación de las HSCs *Cyba*^{-/-}

Una vez visto que el aumento de HSCs es un efecto intrínseco de las propias HSCs *Cyba*^{-/-}, quisimos estudiar a qué podía deberse. Para ello, primero analizamos la capacidad de proliferación de las células *in vivo* mediante ensayos de incorporación de BrdU. Inyectamos 100 mg/kg de BrdU estéril vía intraperitoneal en ratones CR *Cyba*^{-/-} y ratones control, y tras 14 horas de incubación analizamos el porcentaje de células BrdU⁺ (células que han entrado en ciclo durante ese período) en las poblaciones de células Lin⁻ (**Fig. 38**). El resultado indica que han entrado en ciclo un mayor porcentaje de células HSC *Cyba*^{-/-} que HSC control (marcaje LSK), de manera que se encuentran más activas. Dentro de éstas, las ST-HSCs y los MPPs son las que poseen un aumento de células en ciclo mucho más significativo, mientras que las LT-HSCs solo muestran una tendencia de proliferación más alta que las células control (**Fig. 38-B**).

Estos resultados de nuevo concuerdan con los descritos en ratones en los que se ha eliminado *Nox2*, donde se observa un menor número de HSCs en estado G₀ quiescente²⁵⁷, y un mayor porcentaje de células BrdU⁺²³¹. Por ello, podemos sugerir que la falta de actividad NADPH oxidásica confiere un estado proliferativo más activo a las células HSC. Esto parece un poco contradictorio, puesto que lo que se ha relacionado con una mayor actividad mitocondrial y con el inicio del proceso de diferenciación celular es la mayor producción de ROS (**Fig. 20**). Sin embargo, el proceso de autorrenovación de HSCs, que se ve favorecido con menores niveles de ROS, también requiere de la entrada de las células al ciclo celular. Por tanto, es posible que el aumento en la proliferación de HSCs por la eliminación de p22^{phox} no esté relacionado con una mayor diferenciación celular, sino con una mayor promoción de su autorrenovación, y de ahí que encontremos un mayor número de ellas en ratones *Cyba*^{-/-}.

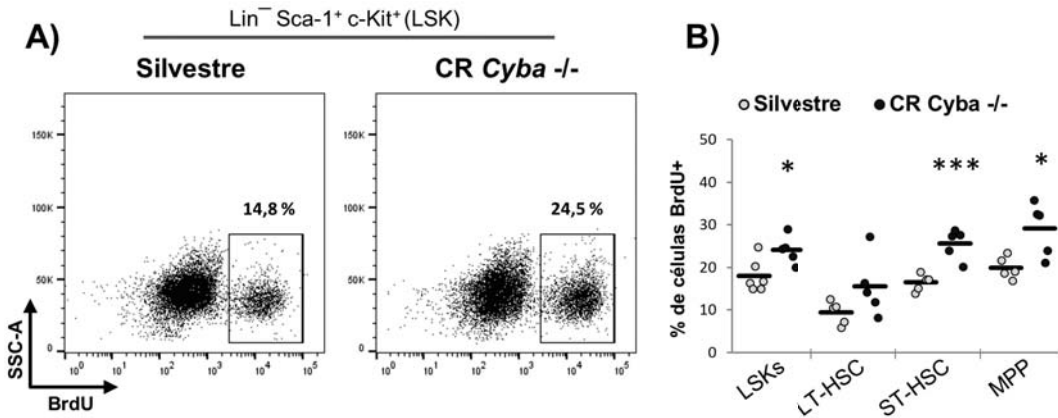


Figura 38- Análisis de la proliferación celular de HSPCs *Cyba*^{-/-} mediante incorporación de BrdU *in vivo*. **A)** Imagen representativa de un experimento de incorporación de BrdU por células LSK (HSCs) silvestres y CR *Cyba*^{-/-} adquirido mediante citometría de flujo. **B)** La gráfica representa el porcentaje de células positivas para BrdU en las diferentes poblaciones de HSCs de ratones silvestres control (puntos claros) y ratones CR *Cyba*^{-/-} (puntos oscuros), y la media de cada grupo de experimento (líneas negras). Las diferencias significativas respecto al control se representan como **p*<0,05; ****p*<0,001.

RyD.3.C – Capacidad clonogénica de las células *Cyba*^{-/-}

A parte del aumento de HSCs, el otro resultado claro que observamos en los modelos de ratón *Cyba*^{-/-} es el aumento de los linajes celulares mieloides. Para profundizar en este hecho, decidimos evaluar la funcionalidad de las células *Cyba*^{-/-} a través de experimentos de formación de colonias mediante su cultivo *in vitro* en medio semisólido de metilcelulosa. Llevamos a cabo los experimentos sembrando un mismo número de células de médula ósea completa de ratones CR *Cyba*^{-/-} o ratones control y añadiendo diversas citoquinas necesarias para su desarrollo. Debido al corto plazo de cultivo, 12 días, en este tipo de experimentos se evalúa en mayor medida la capacidad clonogénica de las HPCs, ya que las HSCs son más inmaduras y tardan más tiempo en desarrollar sus colonias.

Al estimular células de médula ósea, tanto con una mezcla completa de citoquinas como con citoquinas específicas de linaje mieloides por separado (**Fig. 39-A**), obtuvimos un mayor número de colonias de células *Cyba*^{-/-} que de células control, aunque sin ser estadísticamente significativo. En cambio, al estimular con IL-7, una citoquina específica de maduración de linfocitos B, la generación de

colonias pre-B en los cultivos de células de médula ósea *Cyba*^{-/-} fue significativamente inferior que en los de células control. Por último, como hemos comentado anteriormente, el bazo también es un órgano con capacidad hematopoyética completa en el ratón, por lo que realizamos el mismo estudio con células de bazo y la mezcla completa de citoquinas. En este caso sí obtuvimos un número significativamente superior de colonias en los cultivos de células *Cyba*^{-/-} que en los de células control (Fig. 39-B).

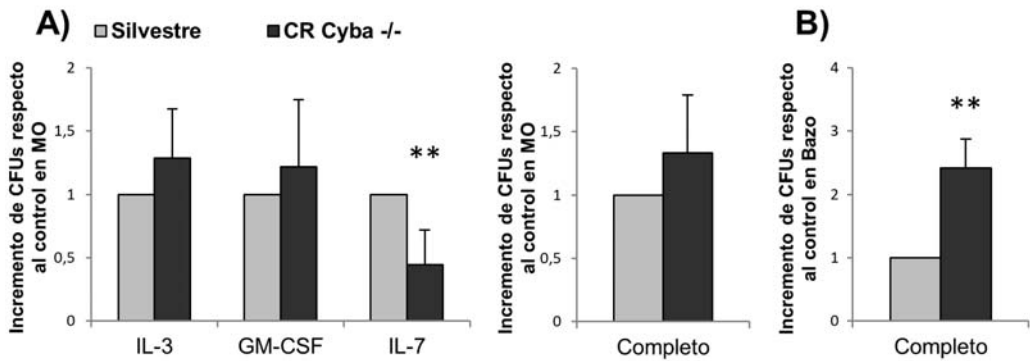


Figura 39- Ensayos de formación de colonias (CFU). Diagramas de barras que muestran el incremento en el número de CFUs generadas a partir de la médula ósea completa (A) o del bazo (tras eliminar la serie roja hemática) (B) de ratones *Cyba*^{-/-} respecto ratones control, tras 12 días de cultivo (7 con IL-7) con diferentes citoquinas (completo: SCF, IL3, GM-CSF y EPO). Se representa la media ± DE (IL-3, GM-CSF, IL-7: n=5; Completo MO: n=6; Completo bazo: n=9), y las diferencias significativas respecto al control como ***p*<0,01.

Teniendo en cuenta el significativo aumento de poblaciones mieloides que observamos en los ratones *Cyba*^{-/-}, estos resultados sobre la formación de colonias mieloides por células de médula ósea *Cyba*^{-/-} son menos pronunciados de lo que esperábamos. Esto, junto con los resultados del trasplante de médula ósea *Cyba*^{-/-}, en los que no obtuvimos diferencias en los linajes mieloides tras la repoblación hematopoyética, nos hace pensar de nuevo que la ausencia de p22^{phox} en los progenitores mieloides no es suficiente para promover el sesgo mieloides, sino que es necesaria la falta de esta proteína en el nicho celular. Aun así, la eliminación de Nox2 si parece haber demostrado una mayor capacidad de formación de colonias por sí misma²⁵⁷.

Por otro lado, los resultados sobre la formación de colonias pre-B demuestran que la ausencia de p22^{phox} en progenitores linfoides sí ejerce un claro

defecto de su capacidad clonogénica, sin necesidad de actuación del nicho celular. Este efecto explicaría el descenso de linfocitos B de los ratones ES *Cyba*^{-/-}, pero se debe poder compensar por otros mecanismos, ya que ni el modelo CR *Cyba*^{-/-} ni el trasplante de médula ósea muestran ese descenso.

Finalmente, en el bazo de ratones *Cyba*^{-/-} observamos un gran aumento de la capacidad formadora de colonias, lo que parece apuntar a que se esté generando una mayor hematopoyesis extramedular. Este hecho también se observa con la eliminación de *Nox2*, donde se ha descrito un aumento del número de HSCs en bazo y una mayor capacidad clonogénica de sus células²⁵⁷.

RyD.4 - ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE CÉLULAS

LIN⁻ *Cyba*^{-/-}

Tras conocer las características principales que confiere la ausencia de p22^{phox} tanto en HSPCs como en la hematopoyesis *in vivo*, decidimos estudiar el mecanismo por el cual podían estar sucediendo. Para ello, pensamos que la realización de un análisis del transcriptoma de células Lin⁻ de los ratones *Cyba*^{-/-} podría darnos muchas pistas sobre los procesos que se encuentran alterados en estas células. Por tanto, extrajimos el ARN total de dos muestras de células Lin⁻ de ratones CR *Cyba*^{-/-}, y otras dos de ratones C57BL/6J silvestres como control, y realizamos un estudio mediante secuenciación de ARN (*RNA sequence*).

En el análisis del transcriptoma observamos que las células Lin⁻ de ratones CR *Cyba*^{-/-} poseen 5 genes que se encuentran significativamente infraexpresados respecto a células Lin⁻ control, mientras que existen otros 47 genes cuya expresión se encuentra mucho más aumentada que en ratones control (**Fig. 40-A**). 5 de esos genes sobreexpresados pertenecen a proteínas muy presentes en células mieloides, como son *Itgam* (CD11b), *Pirb* (CD85A), *Lilrb4* (CD85K), *Ccr1*(CD191) y *Lrg1*. Decidimos corroborar los datos de expresión de estos genes mediante PCR cuantitativa, para lo cual diseñamos oligonucleótidos específicos (secuencias en **MyM.2.E**), confirmando que su ARNm se encontraba incrementado en varias muestras de células Lin⁻ de ratones CR *Cyba*^{-/-} (**Fig. 40-B**). Además de éstos, en las células Lin⁻ de ratones CR *Cyba*^{-/-} también encontramos claramente aumentada la expresión de los genes que codifican los receptores de las citoquinas mieloides GM-

CSF, G-CSF y M-CSF (**Fig. 40-C**). No aparecen en el mapa de calor porque al aplicar el modelo estadístico del análisis del *RNAseq* su *p*-valor (en origen significativo) pasa a un *p*-valor ajustado por encima de 0,05, seguramente por el bajo número de muestras analizado y que su alteración sea menor que los anteriores. Sin embargo, es una muestra más del aumentado carácter mieloides de las células *Cyba*^{-/-} que refuerza nuestros anteriores resultados sobre el sesgo de la hematopoyesis hacia el linaje mieloides, sobre todo teniendo en cuenta que son datos realizados con el modelo CR *Cyba*^{-/-}, donde las diferencias de poblaciones mieloides no son tan claras como en el modelo ES *Cyba*^{-/-}.

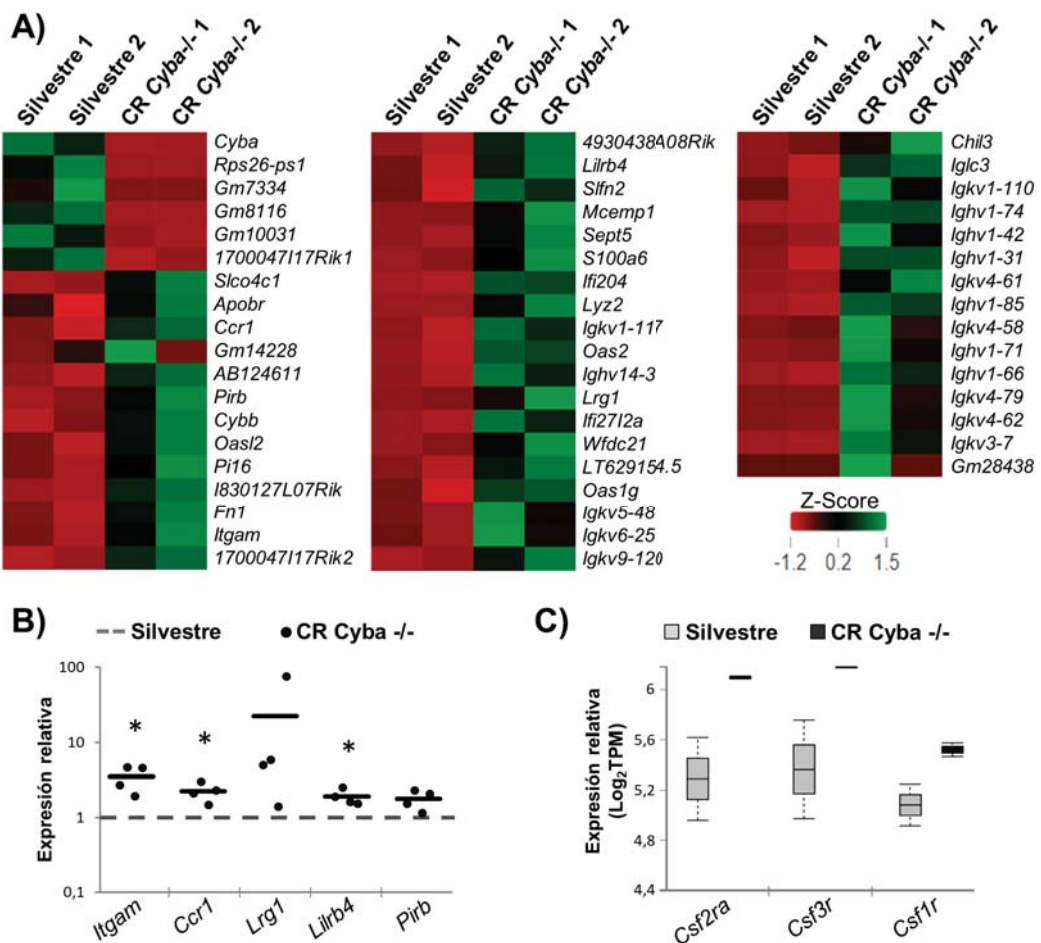


Figura 40- Análisis transcriptómico de células Lin⁻ de ratones *Cyba*^{-/-}. **A)** Mapa de calor que representa el Z-score de los valores de expresión (normalizados como TPM -transcritos por millón-) de los genes alterados significativamente en células CR *Cyba*^{-/-} respecto a células silvestres. **B)** qPCR de comprobación de los genes mieloides alterados significativamente en el

RNAseq. La gráfica representa el nivel de expresión relativa de cada gen en diferentes muestras de células Lin⁻ de ratones CR *Cyba*^{-/-} (puntos oscuros), y la media de cada gen (líneas negras), respecto a su expresión en ratones silvestres control (línea gris discontinua). Las diferencias significativas respecto al control se representan como **p*<0,05. **C**) Diagrama de caja que muestra la distribución del valor de expresión (normalizado como TPM) de los genes que codifican los receptores mieloides GM-CSFR (*Csf2ra*), G-CSFR (*Csf3r*) y M-CSFR (*Csf1r*), obtenida mediante el análisis *RNAseq* de células Lin⁻ de ratones *Cyba*^{-/-} (n=2).

Sin embargo, si hay un resultado que llama la atención entre los datos de los genes alterados por la eliminación del gen *Cyba* es que 18 de los 47 genes cuya expresión se encuentra aumentada pertenecen a inmunoglobulinas (Igs), tanto de cadenas pesadas variables (*Ighv*) como de cadenas ligeras κ variables (*Igkv*) (**Fig. 40-A**). Dentro de las células Lin⁻ podemos encontrar progenitores de linaje linfoide, pero que se encuentran en etapas muy inmaduras en las que no se debería producir aún la expresión de Igs. Además, todos los genes aumentados pertenecen a regiones variables de Igs, lo que podría indicar que se está promoviendo el reordenamiento génico de estas, proceso que suele darse en estados pro- y pre-B más maduros. Por lo tanto, la pérdida del gen *Cyba* parece anticipar el reordenamiento de genes de Igs a etapas más tempranas de la diferenciación.

En base a este resultado, quisimos comprobar si este aumento de expresión génica se traducía en mayores niveles de Igs totales en los ratones CR *Cyba*^{-/-}, lo cuál realizamos mediante western blot de muestras de médula ósea y bazo. Como se observa en la **Figura 41-A**, existe un aumento drástico en la cantidad de Igs totales, tanto de cadena pesada como de cadena ligera, en ambos órganos hematopoyéticos. Para saber si este aumento se correspondía con algún isotipo específico de Ig medimos los niveles séricos de las más comunes mediante un ELISA cuantitativo, confirmando que existe un aumento significativo de IgA e IgG, mientras que IgM no parece verse modificada (**Fig. 41-B**).

IgM es la estructura de inmunoglobulina por defecto, ya que la cadena pesada μ es la que se usa de base durante la maduración de los receptores BCR en el desarrollo de linfocitos B, y por ello es la principal implicada en la respuesta inmune primaria^{258,259}. Suelen ser anticuerpos de menor afinidad, que actúan opsonizando al antígeno para facilitar la fijación del complemento y promover su destrucción²⁵⁹. En cambio, IgA e IgG, anticuerpos con mayor afinidad, únicamente

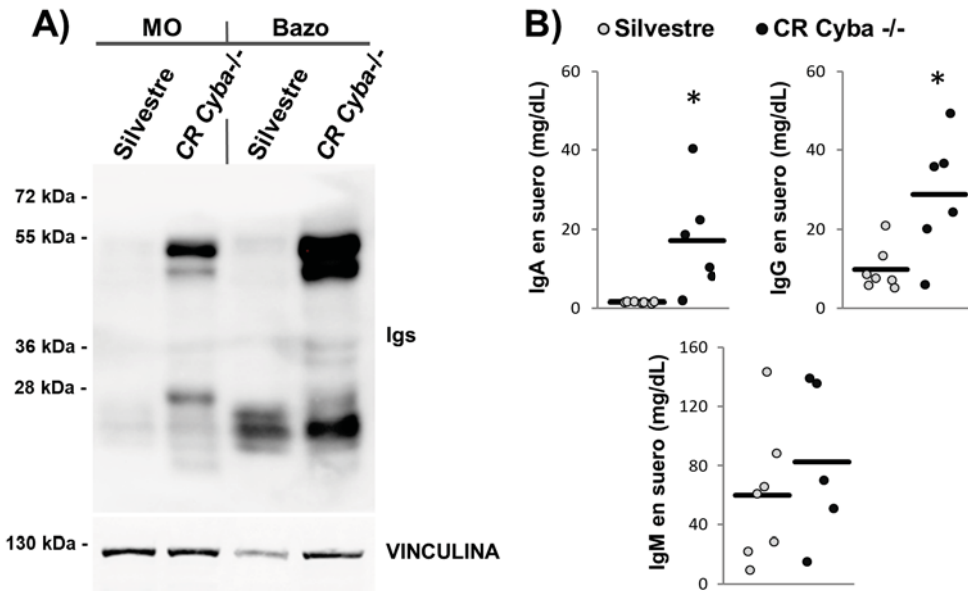


Figura 41- Niveles de inmunoglobulinas en ratones *Cyba*^{-/-}. A) Imagen representativa de western blot realizado para comprobar los niveles de Igs totales en médula ósea y bazo de ratones CR *Cyba*^{-/-} y ratones control (n=4). B) Niveles de Igs específicas en suero de ratones CR *Cyba*^{-/-} respecto a ratones control. Las gráficas representan la concentración de cada tipo de Ig en diferentes muestras de suero de ratones silvestres control (puntos claros) y ratones CR *Cyba*^{-/-} (puntos oscuros), y la media de cada grupo de experimentos (líneas negras). Las diferencias significativas respecto al control se representan como * $p < 0,05$.

son generadas por células plasmáticas maduras, previamente activadas, y que han sufrido recombinación de cambio de clase (*class-switch recombination*) de la IgM. IgA es la principal inmunoglobulina secretada en mucosas, actuando de primera línea de defensa ante microorganismos mediante su neutralización o prevención de su unión a la superficie de la mucosa ²⁵⁹. En condiciones normales IgG es la inmunoglobulina mayoritaria en el organismo, que está principalmente involucrada en la respuesta inmune secundaria ante infecciones ²⁵⁸, y actúa mayoritariamente eliminando antígenos mediante su opsonización y posterior actuación de células citotóxicas, aunque también es capaz de activar al complemento ²⁵⁹.

Las principales células encargadas de la producción de Igs en el organismo son los plasmoblastos y las células plasmáticas maduras ²⁶⁰ (Fig. 42). Los primeros se forman cuando la respuesta inmune es independiente de células T, y se

caracterizan por una gran proliferación y corta vida media, lo que deja poco tiempo para la hipermutación somática de sus Igs, de manera que suelen ser menos específicas. En cambio, las células plasmáticas maduras suelen formarse a partir de la respuesta inmune dependiente de células T, mediante la que los linfocitos B forman centros germinales de maduración en los que sufren gran hipermutación somática de sus Igs, para que sean mucho más específicas.

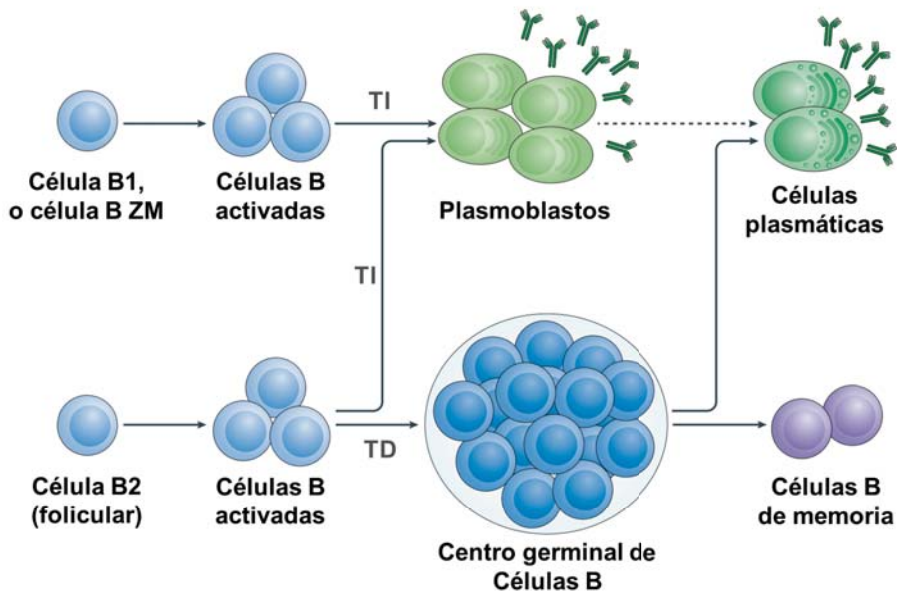


Figura 42- Etapas finales de la diferenciación de células B. La mayoría de células B maduras se localizan en folículos en los órganos linfoides, conociéndose como células foliculares (o B2). Pero existen otras células B especializadas, como las células B de la zona marginal (ZM) entre pulpa roja y pulpa blanca en el bazo, o las células B1 que se encuentran principalmente en cavidad peritoneal y pleural. Tras interactuar con un antígeno, las células B se activan rápidamente, proliferan y sufren recombinaciones de cambios de clase de Igs. Si durante esta activación no son reguladas por ningún tipo de célula T (respuesta T independiente, TI) acaban diferenciándose a plasmoblastos, células secretoras de Igs de vida corta. Sin embargo, la activación de células B2 suele ser regulada por células T (respuesta T dependiente, TD) que promueven la formación de centros germinales de células B, donde se produce un exhaustivo proceso de maduración de las Igs para mejorar su afinidad por el antígeno, sobre todo por hipermutación somática, aunque también se producen más procesos de cambios de clase. Finalmente, las células B que adquieren gran afinidad por el antígeno salen de los centros germinales y dan lugar a células B de memoria o a células plasmáticas de vida larga, que anidan en la médula ósea y secretan grandes cantidades de Igs. Residualmente, algunos plasmoblastos de vida corta pueden llegar también a la médula ósea y encontrar las condiciones adecuadas para anidar, convirtiéndose en células plasmáticas de vida larga. (Modificada de Nutt et al., 2015 ²⁶⁰).

Como hemos comentado durante la introducción, la falta de actividad Nox2 se ha relacionado con un aumento significativo de células B CD5⁺ ^{237,238}, denominadas B1a. Estas células surgen únicamente a raíz de la hematopoyesis fetal, se mantienen de forma totalmente autónoma, y su destino es la formación de plasmoblastos y células plasmáticas en recién nacidos y adultos previamente a ninguna infección, generando los denominados anticuerpos naturales ^{236,261}. Durante su activación también son capaces de realizar el cambio de clase de sus Igs, generando IgA e IgG, y de hecho, este proceso se ve aumentado en condiciones de autoinmunidad ²⁶¹, efecto común en casos de CGD. Por tanto, el aumento de células B1a en ausencia de actividad Nox2 puede ser un mecanismo compensatorio ante la falta de una respuesta fagocítica eficiente, para promover el aumento de Igs naturales como defensa. Aunque en uno de estos estudios no encontraron diferencias en los niveles de Igs séricas ²³⁷, en el otro encontraron un aumento de IgA e IgG en casi la mitad de los pacientes con CGD, sin alteraciones en los niveles de IgM ²³⁸. En un último artículo, esta vez con un modelo de ratón *Cybb*^{-/-}, éstos poseen un incremento en IgG₁ sérica, mientras que IgM y el resto de subtipos de IgG no se ven alterados (no analizan IgA) ²⁶². Además, con este modelo también demuestran que la falta del aumento de ROS en respuesta a activación del receptor BCR altera la respuesta inmunitaria *in vivo*, mejorando la respuesta independiente de células T. Por todo ello, si extrapolamos estos resultados al modelo *Cyba*^{-/-} (de hecho, algunos de los datos de estos artículos son de pacientes con CGD por mutaciones en el gen *Cyba*), donde también se produce un descenso de actividad Nox2, el aumento de IgA e IgG que observamos podría deberse a la mayor presencia de linfocitos B1a, que sufren un mayor cambio de clase de Igs debido al estado inflamatorio y autoinmune general. De esta forma promoverían un mayor nivel de alerta y de barrera ante patógenos mediante anticuerpos naturales, que pueden activar vías de eliminación alternativas como el complemento.

Por último, en la introducción también comentamos que la deficiencia de Nox2 provoca una menor diferenciación y activación de células T CD8 reguladoras ^{234,235}. Existe una pequeña población entre estas células que expresa *Foxp3* (Treg-Foxp3⁺) y se encargan principalmente de regular a las células plasmáticas y a las células T CD4 *helper* foliculares (Tfh) ^{263,264}, que son el principal tipo celular T que regula la producción de anticuerpos ²⁶⁵. Se ha visto que ratones deficientes en *Foxp3* poseen reacciones descontroladas de sus centros germinales y desarrollan un gran

número de células plasmáticas y células Tfh, las cuales a través de la mayor producción de citoquinas aumentan la recombinación de cambio de clase de las células B²⁶³. También, la depleción de células Treg-Foxp3⁺ durante cortos periodos de tiempo aumenta la proporción de Igs que han sufrido cambio de clase²⁶⁴, y la eliminación de CTLA-4, una de sus proteínas reguladoras más importantes, provoca un aumento en el número de células plasmáticas^{264,266}. Por todo ello, la menor activación de las células T CD8 reguladoras en caso de falta de actividad Nox2 podría ser también causante de la mayor actividad de células plasmáticas y generación de Igs observada en los pacientes con CGD, y por extrapolación, este también podría ser uno de los mecanismos por los que los ratones *Cyba*^{-/-} posean mayores niveles de IgA e IgG.

Siguiendo con el análisis transcriptómico, entre los genes con una expresión significativamente aumentada por la eliminación de p22^{phox} (**Fig. 40-A**) curiosamente encontramos al gen *Cybb*, lo cual confirmamos mediante PCR cuantitativa en varias muestras de células Lin⁻ de ratones CR *Cyba*^{-/-} (**Fig. 43**). Posiblemente esto se deba a un intento de las células de compensar la deficitaria formación de ROS generadas por el complejo Nox2, aumentando su expresión. Aun así, lo que nos indica es la gran e importante relación que existe entre ambas proteínas del citocromo b₅₅₈, ya que la expresión de ningún otro miembro de la familia se encuentra significativamente alterada. De hecho, aprovechando este análisis *RNAseq* podemos analizar de nuevo qué miembros de la familia NADPH oxidasa se expresan en células Lin⁻, y comparar con los datos que obtuvimos anteriormente. Además del gen *Cybb* y los genes *Ncf1*, *Ncf2* y *Ncf4*, que corresponden a sus subunidades (p47^{phox}, p67^{phox} y p40^{phox}, respectivamente), encontramos lecturas de los genes *Nox1*, de sus subunidades *Noxo1* y *Noxa1*, y del gen *Nox4*. Esto confirma completamente el patrón de expresión que obtuvimos en la sección **RyD.1** de este trabajo, y además asegura la presencia en estas células de todos los elementos necesarios para que esas enzimas sean activas (salvo, lógicamente, por la ausencia de *Cyba* en el caso de los ratones modificados).

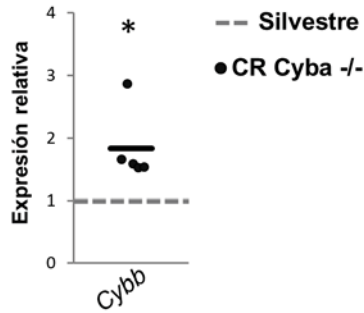


Figura 43- qPCR del gen *Cybb* en células Lin^- de ratones *Cyba*^{-/-}. La gráfica representa el nivel de expresión relativa de *Cybb* en diferentes muestras de células Lin^- de ratones CR *Cyba*^{-/-} (puntos oscuros), y su media (línea negra), respecto a su expresión en ratones silvestres control (línea gris discontinua). Las diferencias significativas respecto al control se representan como * $p < 0,05$.

Tras evaluar y corroborar estos primeros resultados del *RNAseq*, también realizamos un análisis funcional de los datos mediante la plataforma informática RaNA-seq de la Universidad de Salamanca, para poder obtener un estudio más profundo de los procesos y vías celulares que pueden estar alterados en las células Lin^- deficientes para el gen *Cyba*.

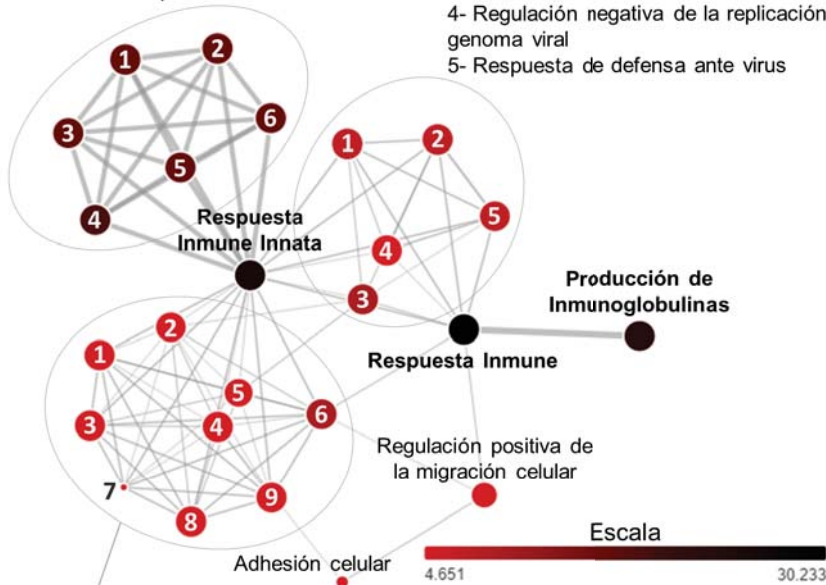
Lógicamente, entre los procesos que cuentan con mayor cantidad de genes alterados por la pérdida del gen *Cyba* se encuentran la respuesta inmune, en especial la innata, y la producción de inmunoglobulinas (**Fig. 44**), a causa del aumento de expresión de genes mieloides y de inmunoglobulinas que ya hemos visto. Al estar involucrados tanto *Cyba* como *Cybb*, también era de esperar que apareciesen alterados los procesos de generación y metabolismo del anión superóxido y el estallido respiratorio, además de procesos relacionados con esto y con algunos de los genes mieloides, como la angiogénesis, la proliferación, la migración y la adhesión celular. Finalmente, el análisis también nos muestra que es probable que se encuentren alterados procesos de respuesta ante bacterias y virus, procesos relacionados con la fagocitosis, la regulación de la activación de células B, y la activación del complemento.

Procesos relacionados con genes *Igs* y *Lyz2*:

- 1- Fagocitosis, reconocimiento
- 2- Vía de señalización del receptor de células B
- 3- Regulación de la activación de células B
- 4- Respuesta de defensa ante bacterias
- 5- Fagocitosis, envoltura
- 6- Activación del complemento, vía clásica

Procesos relacionados con genes *Oas1/2*, *Oas1g*, *Oas2*, *Ifi2712a*, *Ifi204* y *Sifn2*:

- 1- Respuesta a virus
- 2- Regulación de la actividad ribonucleasa
- 3- Respuesta a bacterias
- 4- Regulación negativa de la replicación del genoma viral
- 5- Respuesta de defensa ante virus



Procesos relacionados con genes *Cyba*, *Cybb*, *Lrg1*, *Itgam*, *Chil3* y *Ccr1*:

- 1- Generación de anión superóxido
- 2- Regulación positiva de la proliferación celular endotelial
- 3- Estallido respiratorio
- 4- Regulación de la generación de anión superóxido
- 5- Regulación positiva de la angiogénesis
- 6- Respuesta inflamatoria
- 7- Procesos de oxidación-reducción
- 8- Procesos biosintéticos del peróxido de hidrógeno
- 9- Procesos metabólicos del superóxido

Figura 44- Red del análisis funcional de procesos alterados con los resultados del *RNAseq* de células Lin^- de ratones *Cyba*^{-/-}. Cada nodo representa una categoría funcional, donde su color indica el porcentaje de genes significativamente alterados en las células Lin^- *Cyba*^{-/-} que se encuentran anotados en dicha categoría en la base de datos de *Gene Ontology*, según la escala, y su tamaño es inversamente proporcional al *p*-valor del resultado. Las líneas muestran los genes relacionados entre diferentes categorías, siendo su grosor proporcional al número de genes en común.

En cuanto al análisis de las vías alteradas, de nuevo las que muestran un mayor porcentaje de sus genes entre los genes alterados por la eliminación de *Cyba* son la respuesta inmune, en especial la innata, y también de forma importante la desgranulación de neutrófilos (**Fig. 45**). Además, muchas de las vías modificadas

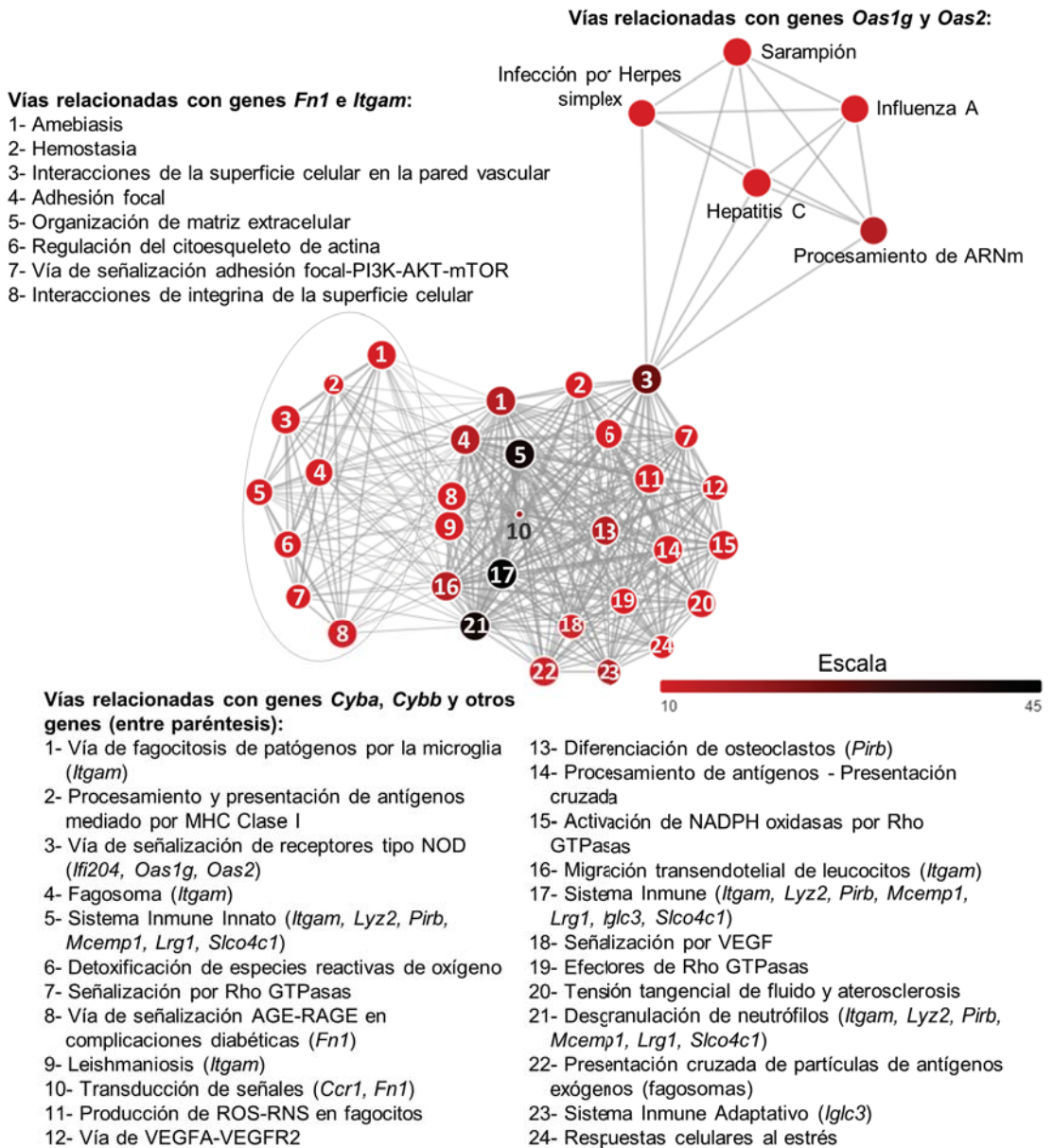


Figura 45- Red del análisis funcional de vías alteradas con los resultados del RNAseq de células Lin⁻ de ratones *Cyba*^{-/-}. Cada nodo representa una categoría funcional, donde su color indica el porcentaje de genes significativamente alterados en las células Lin⁻ *Cyba*^{-/-} que se encuentran anotados en dicha categoría en la base de datos (KEGG, REACTOME o WikiPathways), según la escala, y su tamaño es inversamente proporcional al p-valor del resultado. Las líneas muestran los genes relacionados entre diferentes categorías, siendo su grosor proporcional al número de genes en común.

tienen que ver con la adhesión y la migración celular, y con la respuesta ante diferentes patógenos. Por último, algunas vías de señalización celular importantes, como la señalización por VEGF, por Rho GTPasas, por receptores de tipo NOD o la vía PI3K-AKT-mTOR, se encontrarían potencialmente alteradas.

Decidimos confirmar estos datos mediante el análisis del estado de la vía PI3K-AKT-mTOR en ausencia de p22^{phox}, por lo que analizamos la activación de AKT1 en respuesta a múltiples citoquinas hematopoyéticas en médula ósea de ratones CR *Cyba*^{-/-} respecto de ratones control (**Fig. 46**). Como se puede observar, la deficiencia del gen *Cyba* conlleva una menor fosforilación de AKT en respuesta a las diferentes citoquinas, de manera que su estado de activación es menor que en las células control.

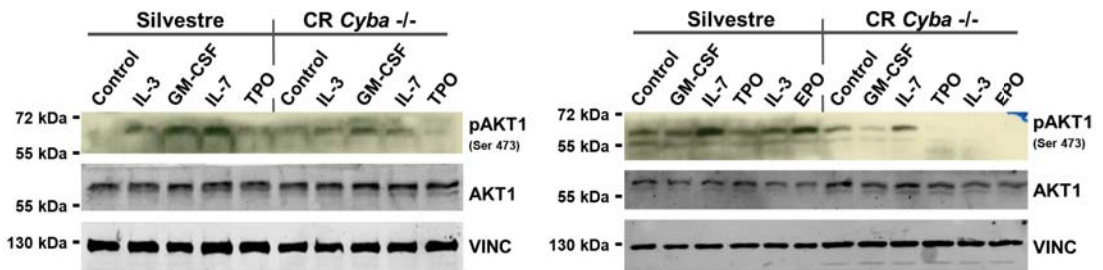


Figura 46- Análisis del estado de activación de AKT en médula ósea de ratones *Cyba*^{-/-}. Imágenes representativas de western blot realizados para comprobar los niveles de AKT total (AKT1) y de su forma activa (pAKT1) en médula ósea de ratones CR *Cyba*^{-/-} y ratones control, y en respuesta a estimulación con diversas citoquinas durante 30 minutos (n=4). (VINC: VINCULINA).

La vía de señalización PI3K-AKT-mTOR está involucrada en multitud de procesos celulares, como progresión del ciclo celular, diferenciación, transcripción, traducción, apoptosis, motilidad, autofagia, y metabolismo. En la hematopoyesis PI3K-AKT es una de las vías más importantes en el mantenimiento de HSCs, ya que a través de sus efectores mTOR o los factores de transcripción FoxO está involucrada en la respuesta a los factores esenciales SCF²⁶⁷ y CXCL12²⁶⁸. De esta forma, una mayor activación de la vía suele estar asociada con el aumento de ROS y la mayor activación y diferenciación celular, mientras que la eliminación de *Akt1* y *Akt2* supone la reducción de los niveles de ROS y la deficiencia del proceso de proliferación y diferenciación, promoviendo la pérdida de la capacidad

regenerativa a largo plazo de las LT-HSCs ²⁰⁷. Por tanto, el estado de menor activación de AKT de las HSCs *Cyba*^{-/-} favorecería una mayor retención de estas en su estado más inmaduro.

Además de regular el estado de las HSCs, la alteración de la vía PI3K-AKT también puede estar afectando al proceso de diferenciación de las células *Cyba*^{-/-}. El desarrollo y maduración de los linfocitos B está muy ligado a la regulación combinada de dos importantes receptores, el receptor de IL-7 (IL-7R) y el pre-receptor de células B (pre-BCR), que poseen efectos prácticamente opuestos ²⁶⁹. En determinadas etapas de células pre-B la señalización de IL-7R a través de la vía PI3K-AKT es esencial para promover el estado proliferativo en lugar del proceso de recombinación de I μ . Mediante la activación de AKT se inhibe FoxO1, principal factor de transcripción de los genes activadores de recombinación *Rag1* y *Rag2*, facilitando la proliferación celular. En cambio, la falta de estimulación con IL-7 provoca la reducción en la activación de AKT, y con ello la liberación de FoxO1 para que actúe a nivel transcripcional y active la recombinación de I μ ²⁶⁹. De esta forma, un control defectuoso de PI3K-AKT está relacionado con un desarrollo anómalo de la linfopoyesis B: el Síndrome de PI3K δ activado es una inmunodeficiencia debida a la hiperactivación de PI3K, ya sea por mutaciones en su gen o en el de subunidades reguladoras como PTEN, que produce una mayor fosforilación en Ser-473 de AKT principalmente en células B circulantes ²⁷⁰. En la mayoría de casos este síndrome cursa con infecciones del tracto respiratorio, hiperproliferación crónica de linfocitos B y descenso en los niveles séricos de IgA e IgG ²⁷¹. Al contrario, mutaciones que generan la supresión de PI3K o la deficiencia de CD19 producen una menor fosforilación de AKT y la activación de los RAG, que estimulan un continuo reordenamiento de los genes de Igs y un bloqueo medio entre los estadios de células pro-B y pre-B ²⁷².

En base a esto, el defecto de activación de AKT ante cualquier citoquina explicaría por qué la producción de colonias pre-B bajo estimulación con IL-7 es mucho menor en las células de médula ósea *Cyba*^{-/-} (**Fig. 39-A**) y, por tanto, también podría ser una de las principales causas del descenso de linfocitos B del modelo ES *Cyba*^{-/-} (**Fig. 34-A**). A su vez, PI3K-AKT también podría ser responsable de la mayor expresión de genes de Igs en las células Lin⁻ de ratones *Cyba*^{-/-} (**Fig. 40-A**), ya que la falta de activación de AKT ante IL-7 promovería una menor proliferación y un mayor estado de reordenamiento génico de progenitores linfoides.

RyD.5 - OTRAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN HEMATOPOYÉTICAS ALTERADAS EN CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA *Cyba*^{-/-}

Dada la importancia que están demostrando las NADPH oxidasas y sus ROS en la señalización celular, y que el análisis transcriptómico nos ha demostrado que existen varias vías de señalización alteradas por la falta de p22^{phox} en células Lin⁻ de ratón, quisimos analizar la posible alteración de otras vías importantes para la hematopoyesis que puedan ser susceptibles de ser reguladas por ROS. Mientras que el análisis de la activación de ERK o de los niveles de β -CATENINA en respuesta a citoquinas no mostró ninguna alteración significativa por la falta del gen *Cyba* en células de médula ósea (Fig. 47-A, B), en estas células sí se observa un importante descenso de los niveles de STAT5 total respecto a células control (Fig. 47-C).

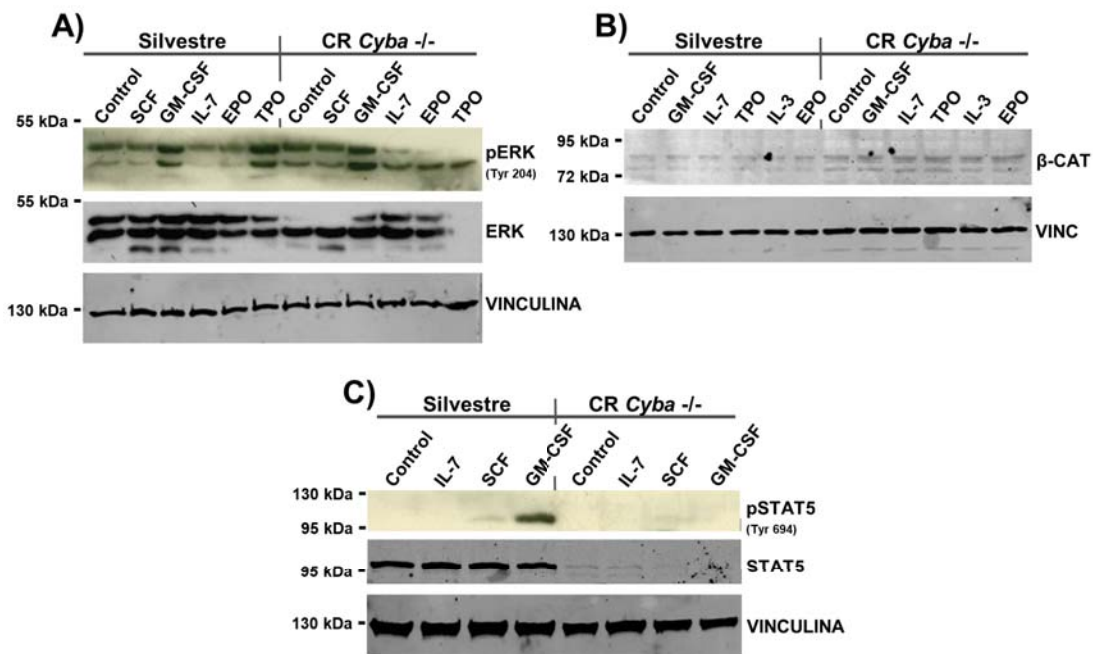


Figura 47- Análisis del estado de activación de varias vías de señalización en médula ósea de ratones *Cyba*^{-/-}. Imágenes representativas de western blot realizados para comprobar los niveles de **A)** ERK total y de su forma activa (pERK), **B)** β -CATENINA total (β -CAT), y **C)** STAT5 total y su forma activa (pSTAT5), en médula ósea de ratones CR *Cyba*^{-/-} y ratones control, y en respuesta a estimulación con diversas citoquinas durante 30 minutos (n=3). (VINC: VINCULINA).

Al ver este claro descenso en STAT5, incluso en condiciones basales sin estimulación ninguna de las células, decidimos analizar su estado también en el bazo de los ratones *Cyba*^{-/-}, encontrando igualmente una gran reducción de sus niveles (**Fig. 48-A**). Los niveles de proteína CRKL, que es capaz de formar heterodímeros con STAT5²⁷³, también se encuentran reducidos en médula ósea y bazo de ratones *Cyba*^{-/-} (**Fig. 48-A**), resultado que apoya el descenso de los niveles de STAT5. Además, este descenso es específico de STAT5, ya que al comprobar los niveles de STAT3, otro miembro de la familia, no observamos ninguna diferencia respecto al control (**Fig. 48-B**).

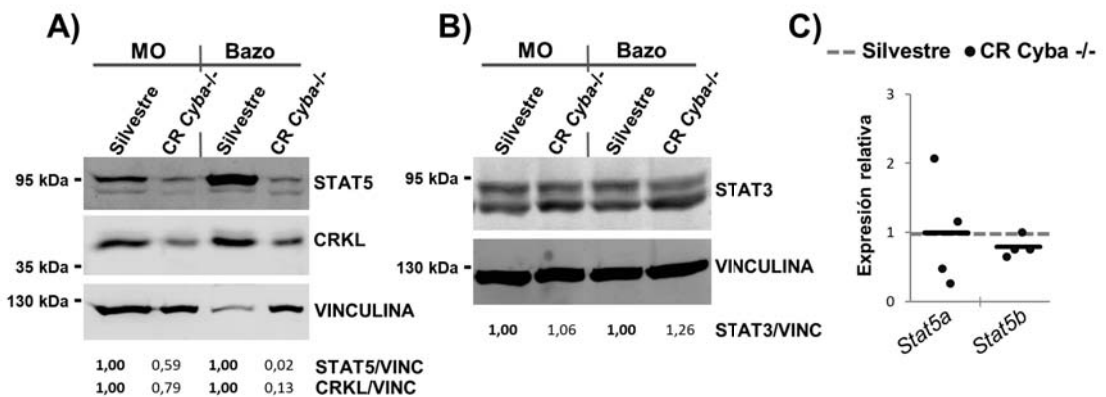


Figura 48- Análisis de los niveles de STAT5 en médula ósea y bazo de ratones *Cyba*^{-/-}. Imágenes representativas de western blot realizados para comprobar los niveles totales de **A)** STAT5 y CRKL (n=4), y **B)** STAT3 (n=3), en médula ósea y bazo de ratones CR *Cyba*^{-/-} y ratones control. **C)** qPCR de los dos genes que codifican STAT5. La gráfica representa su nivel de expresión relativa en diferentes muestras de células Lin⁻ de ratones CR *Cyba*^{-/-} (puntos oscuros), y la media de cada gen (líneas negras), respecto a su expresión en ratones silvestres control (línea gris discontinua).

Puesto que en el análisis transcriptómico no habíamos obtenido diferente expresión de STAT5 entre células *Cyba*^{-/-} y células control, confirmamos mediante PCR cuantitativa que la expresión a nivel de ARNm tanto de *Stat5a* como de *Stat5b* no era diferente respecto al control (**Fig. 48-C**). Por tanto, el descenso que observamos en los niveles de STAT5 debe estar produciéndose a nivel de proteína.

Al igual que ocurre con la vía PI3K-AKT, STAT5 también es de gran importancia para multitud de procesos celulares, como la proliferación, diferenciación, supervivencia y senescencia. Existe una gran variedad de

receptores que activan la vía de señalización JAK-STAT5 en respuesta a gran cantidad de citoquinas y factores de crecimiento hematopoyéticos (IL-3, IL-5, IL-2, IL-7, TPO, EPO, SCF, GM-CSF, IFN α , ...) ^{274,275}. A su vez, STAT5 regula la actividad de multitud de genes implicados en hematopoyesis (*Mpl*, *Spi1*, *Cited2*, *Gata1*, *Cebpa*, *Bmi1*, *Tie2*, *Cdk4*, ...) ²⁷⁶. Por tanto, no cabe duda de que STAT5 es un elemento indispensable en la regulación de la hematopoyesis, además de que, debido a esta gran cantidad de estímulos y receptores que promueven su activación, la respuesta puede ser muy diferente según el tipo celular en el que se produzca.

En relación con células HSC, la introducción de mutantes de STAT5 activos constitutivamente genera una mayor capacidad de autorrenovación en éstas, tanto *in vivo* como *in vitro*, presumiblemente mediante una fuerte reducción de los niveles de C/EBP α , mejorando su capacidad de repoblación frente a células silvestres ^{274,275}. En cambio, la eliminación de STAT5 produce la pérdida de la quiescencia y de la expansión de las LT-HSCs ^{274,277}, y una aparente menor capacidad de competir por el nicho celular en condiciones normales ²⁷⁴, por lo que la capacidad de repoblación a largo plazo de estas células se encuentra seriamente perjudicada. En los ratones *Cyba*^{-/-} se daría un cuadro leve de esta situación al encontrar un descenso de los niveles de STAT5 en médula ósea y bazo, pero explicaría la mayor activación y proliferación de las HSCs *Cyba*^{-/-} (**Fig. 38**).

En cuanto a la generación de los diferentes linajes, la eliminación de STAT5 provoca anemia y linfocitopenia ^{275,277}. Al igual que sucede con la vía PI3K-AKT, JAK-STAT5 también es una vía de señalización bajo la activación del receptor de IL-7, que actúa generando señales proliferativas y activando genes de supervivencia celular, e inhibiendo la recombinación de I γ k durante el desarrollo de linfocitos B ²⁶⁹. La diferenciación de linfocitos T y células NK depende tanto del receptor de IL-7 como del receptor de IL-2, que también actúa a través de STAT5, por lo que el déficit de STAT5 también conlleva la reducción de estos tipos celulares ²⁷⁵. Por todo ello, al igual que la menor activación de AKT, la reducción de los niveles de STAT5 en la médula ósea y bazo de ratones *Cyba*^{-/-} puede estar provocando el déficit en la maduración de células B, e incluso de células T, generando así la reducción de linfocitos en los ratones ES *Cyba*^{-/-} (**Fig. 34-A**). Y también, la mayor expresión de genes de Igs en las células Lin⁻ de ratones *Cyba*^{-/-} (**Fig. 40-A**), por la menor activación de señales de proliferación y supervivencia y la menor inhibición del reordenamiento de cadenas κ variables.

Finalmente, en células de médula ósea y bazo de ratones CR *Cyba*^{-/-} también encontramos un aumento en los niveles de MYC (**Fig. 49**). C-MYC es un factor de transcripción implicado en la regulación de muchos procesos biológicos, como el ciclo celular, apoptosis, crecimiento celular, angiogénesis y diferenciación. Se estima que alrededor del 10% de genes humanos pueden encontrarse bajo el control directo de la red de c-MYC²⁷⁸, lo que da una idea de su gran importancia en la regulación celular. De hecho, la eliminación constitutiva de *Myc* es inviable en ratones, produciendo la muerte de los embriones debido a una angiogénesis y hematopoyesis defectuosa^{279,280}. Por tanto, c-MYC es un elemento fundamental de la hematopoyesis.

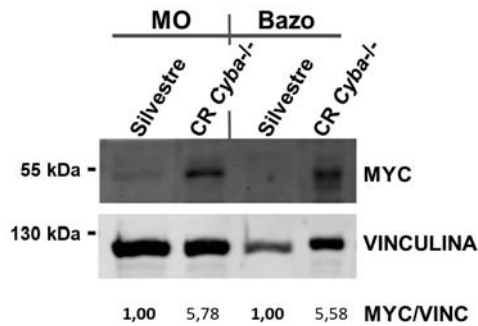


Figura 49- Análisis de los niveles de MYC en médula ósea y bazo de ratones *Cyba*^{-/-}. Imagen representativa de western blot realizado para comprobar los niveles totales de MYC en médula ósea y bazo de ratones CR *Cyba*^{-/-} y ratones control (n=3).

C-MYC se expresa prácticamente en todas las células en proliferación, promoviendo la activación del ciclo celular. Dentro de las células hematopoyéticas sus niveles varían según el estado de diferenciación de las células: su expresión es mucho más elevada en las HSPCs, que se encuentran en proliferación y expansión, que en las células maduras diferenciadas²⁸¹. Esta alta expresión en HSPCs no encaja muy bien con las LT-HSCs más inmaduras, ya que al encontrarse en estado quiescente lo lógico es que no tuvieran una gran expresión de c-MYC. La clave de ello es que a su vez poseen una gran expresión de *Fbxw7*, que codifica una de las principales ubiquitina ligasas encargadas de eliminar a c-MYC en HSCs²⁸². Así, los niveles reales de c-MYC en las LT-HSCs quiescentes son muy bajos, mientras que durante su activación a LT-HSCs activas y su paso a ST-HSCs y MPPs, que

necesitan expandirse y proliferar, van aumentando por la menor expresión de *Fbxw7*²⁸².

La eliminación de c-MYC genera la acumulación de las HSCs más inmaduras, y una citopenia y anemia severas por la falta de reposición de las células más maduras^{283,284}. Esto se debe a que las LT-HSCs más quiescentes, que ya poseían muy bajos niveles de c-MYC, no se ven alteradas por su eliminación y son capaces de proliferar por algún mecanismo independiente de c-MYC, o incluso porque N-MYC compense sus funciones²⁸¹. Sin embargo, c-MYC sí sería necesario para su activación y paso a HSPCs, ya sea por su activación del ciclo celular, o porque la eliminación de c-MYC supone la sobreexpresión de multitud de moléculas de adhesión al nicho celular y las LT-HSCs podrían estar quedando retenidas²⁸³. Por otra parte, el aumento de c-MYC por eliminación del gen *Fbxw7* supone una importante reducción del número de HSCs, principalmente de LT-HSCs, de manera que promueve su mayor activación y avance por el proceso de maduración²⁸². De esta forma, los mayores niveles de c-MYC que encontramos en médula ósea de ratones *Cyba*^{-/-} también pueden estar favoreciendo, al menos en parte, la mayor activación y proliferación de las HSCs *Cyba*^{-/-} (**Fig. 38**).

Además de ser un gran promotor de la proliferación, uno de los primeros efectos descritos para c-MYC fue la inhibición de la diferenciación celular²⁸⁵. Por ello, para que la mayoría de tipos celulares puedan pasar del estado de proliferación a su estado final de diferenciación es necesario que reduzcan sus niveles de c-MYC. Esta es la razón por la que muchos de los factores de transcripción que regulan los procesos de diferenciación hematopoyética, como C/EBP α , CTCF, BLIMP-1, o IKAROS, reprimen la expresión de c-MYC^{286,287}. La sobreexpresión de c-MYC en células hematopoyéticas genera un gran aumento inicial del número de células B, monocitos y granulocitos en los órganos hematopoyéticos, pero tras normalizarse, acaba por desencadenar linfomas de células T²⁸⁸. Si el desarrollo de células T se encuentra bloqueado, la sobreexpresión de c-MYC promueve la aparición de neoplasias de células pre-B, pre-T, progenitores multilinfoides o macrófagos²⁸⁸, evidenciando el marcado carácter oncogénico de este gen. En la diferenciación y maduración de linfocitos B, c-MYC se encuentra bajo la activación del receptor BCR y sus niveles varían según la etapa de maduración, encontrándose aumentado en los estados de mayor proliferación^{289,290}. Su expresión constitutiva en células B, mediante su transposición en el locus

IgH C α , promueve un descenso en el número de células pre-B en médula ósea, mientras que no se observan diferencias en células pro-B ni en células B inmaduras²⁹¹. A su vez, se genera un aumento significativo de células B CD5⁺ en la cavidad peritoneal, y un descenso en el número de células B de memoria y células plasmáticas maduras, debido a que la sobreexpresión de c-MYC induce una mayor apoptosis de las células B en su estado de diferenciación final²⁹¹.

En base a esto, los elevados niveles de c-MYC en médula ósea y bazo de ratones *Cyba*^{-/-} pueden estar alterando el proceso de diferenciación celular de los linfocitos B, provocando la menor capacidad de formación de colonias de los progenitores linfoides CR *Cyba*^{-/-} (**Fig. 39-A**), y la reducción de linfocitos B en ratones ES *Cyba*^{-/-} (**Fig. 34-A**). Pero, sobre todo, el aumento de c-MYC podría ser el causante del descenso de células B de memoria y del aumento de células B1 observado con la pérdida de actividad Nox2, y extrapolable al modelo *Cyba*^{-/-}, siendo así causante de la mayor producción de anticuerpos naturales.

Por tanto, el descubrimiento de estas nuevas vías de regulación alteradas amplía los mecanismos a través de los que se pueden estar produciendo los defectos hematopoyéticos que hemos encontrado en los modelos de ratón *Cyba*^{-/-}. Por un lado, la menor quiescencia y mayor activación de las HSCs *Cyba*^{-/-} (**Fig. 38**) puede estar promovida tanto por el acusado descenso de los niveles de STAT5 (**Fig. 48-A**) como por el aumento de c-MYC en la médula ósea (**Fig. 49**). De forma general esto supondría el agotamiento de las poblaciones de HSCs por su avance en la maduración, y con ello la pérdida de su capacidad de repoblación hematopoyética. Pero las HSCs *Cyba*^{-/-} también cuentan con una menor activación de AKT (**Fig. 46**), lo cual podría estar impidiendo el completo avance de las LT-HSCs hacia la diferenciación y promoviendo su mayor autorrenovación. Así, nos encontraríamos con la mayor activación y proliferación de HSCs, pero que serían capaces de aumentar su número y mantener la repoblación hematopoyética, similar a lo que sucede en nuestros modelos.

Por otro lado, el descenso en el número de linfocitos B podría deberse a la acción conjunta de las tres vías, ya que todas ellas se encuentran bajo la activación de los principales receptores involucrados en el desarrollo de linfocitos B: IL-7R (AKT y STAT5) y BCR (c-MYC). La menor activación de AKT y STAT5 estaría causando la falta de respuesta ante la citoquina IL-7, provocando así que las células pro-B entren en un estado continuo de reordenamiento génico de Igs en lugar de

entrar en proliferación, y por ello sufriendo un bloqueo en su desarrollo (**Fig. 39-A**) y la mayor expresión de Igs en etapas más inmaduras (**Fig. 40-A**). A su vez, los mayores niveles de c-MYC estarían inhibiendo la diferenciación celular, y en concreto alterando la maduración de linfocitos B en médula ósea, pero también podrían estar provocando el aumento de linfocitos B1 y con ello la mayor producción de Igs.

RyD.6 - CAPACIDAD DE REPOBLACIÓN DE LA HEMATOPOYESIS *IN VIVO* MEDIANTE TRASPLANTE COMPETITIVO DE MÉDULA ÓSEA *Cyba*^{-/-}

Teniendo en cuenta nuestros resultados hasta ahora, la eliminación de p22^{phox} provoca un incremento en el número y la capacidad proliferativa de HSPCs, de manera que nos planteamos la posibilidad de que estas características ofrecieran a las células *Cyba*^{-/-} una ventaja a la hora de repoblar la médula ósea en casos de trasplante hematopoyético. Para analizar esto decidimos realizar experimentos de trasplante competitivo de médula ósea, que son similares al trasplante completo realizado anteriormente, pero en este caso la nueva médula ósea que introducimos en los animales no procede sólo de un ratón donante *Cyba*^{-/-} o de uno control, sino que introducimos un 50% de células del ratón problema (*Cyba*^{-/-} o control) junto a otro 50% de células silvestres que actúan como células en competición.

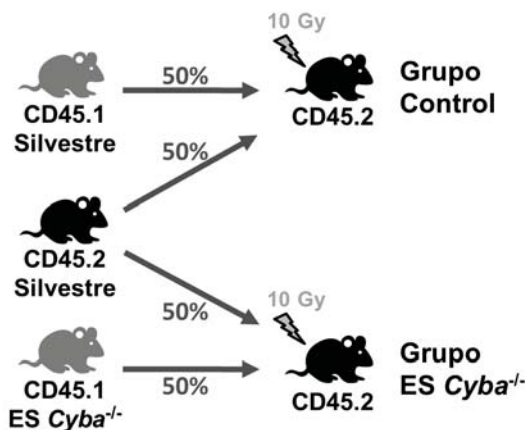


Figura 50- Esquema del modelo de trasplante de médula ósea competitivo. Más información en el texto.

Para poder diferenciar entre unas células y otras durante el trasplante utilizamos ratones con distinto isotipo del marcador hematopoyético CD45, de manera que las células de los ratones ES *Cyba*^{-/-} que expresan el isotipo CD45.1⁺ se pusieron en competición con células de ratones silvestres CD45.2⁺, y para los trasplantes control utilizamos células de ratones C57BL/6J silvestres CD45.1⁺ y CD45.2⁺ (**Fig. 50**). De esta forma podemos evaluar el comportamiento de las células *Cyba*^{-/-} frente a células silvestres, y si poseen algún tipo de ventaja de anidamiento o de proliferación respecto a éstas.

Como se puede observar en la **Figura 51-A**, los ratones trasplantados con células ES *Cyba*^{-/-} muestran un claro aumento de la población celular CD45.1⁺ con el paso de las semanas, respecto a los ratones trasplantados con células control. Estos datos sugieren que la falta de p22^{phox} aporta una ventaja de repoblación hematopoyética a las células.

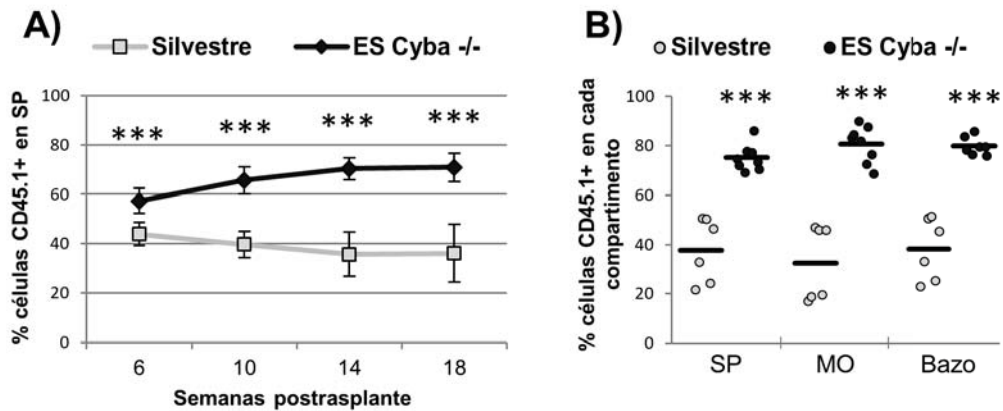


Figura 51- Análisis de la evolución de células CD45.1⁺ tras el trasplante competitivo con células *Cyba*^{-/-}. **A)** Evolución del quimerismo de células CD45.1⁺ en sangre periférica a lo largo de 18 semanas postrasplante. Se representa la media ± DE (n=6). **B)** Quimerismo de células CD45.1⁺ en los diferentes compartimentos hematopoyéticos a las 24 semanas postrasplante. La gráfica representa el porcentaje de células CD45.1⁺ en cada compartimento de los ratones del grupo control (puntos claros) y del grupo ES *Cyba*^{-/-} (puntos oscuros), y la media de cada grupo de experimento (líneas). Las diferencias significativas respecto al control se representan como ****p*<0,001.

24 semanas tras la realización del trasplante analizamos las poblaciones celulares de los ratones en los diferentes compartimentos hematopoyéticos. Como se observa en la **Figura 51-B**, en todos los compartimentos hay un porcentaje de

quimerismo para las células *Cyba*^{-/-} mucho más elevado que en los ratones control. En cuanto a los linajes celulares, mientras que en sangre periférica no se observa ningún cambio significativo, en médula ósea encontramos un aumento en la población de granulocitos y un descenso en las de linfocitos B y T, además de en monocito-macrófagos (Fig. 52). Por tanto, vemos que este trasplante competitivo está reproduciendo en parte los resultados del modelo ES *Cyba*^{-/-}, donde observábamos el aumento de células mieloides y descenso de linajes linfoides, tanto B como T (Fig. 34-A), a pesar de que, en este caso, en el bazo sí se observa un aumento del porcentaje de linfocitos B (Fig. 52).

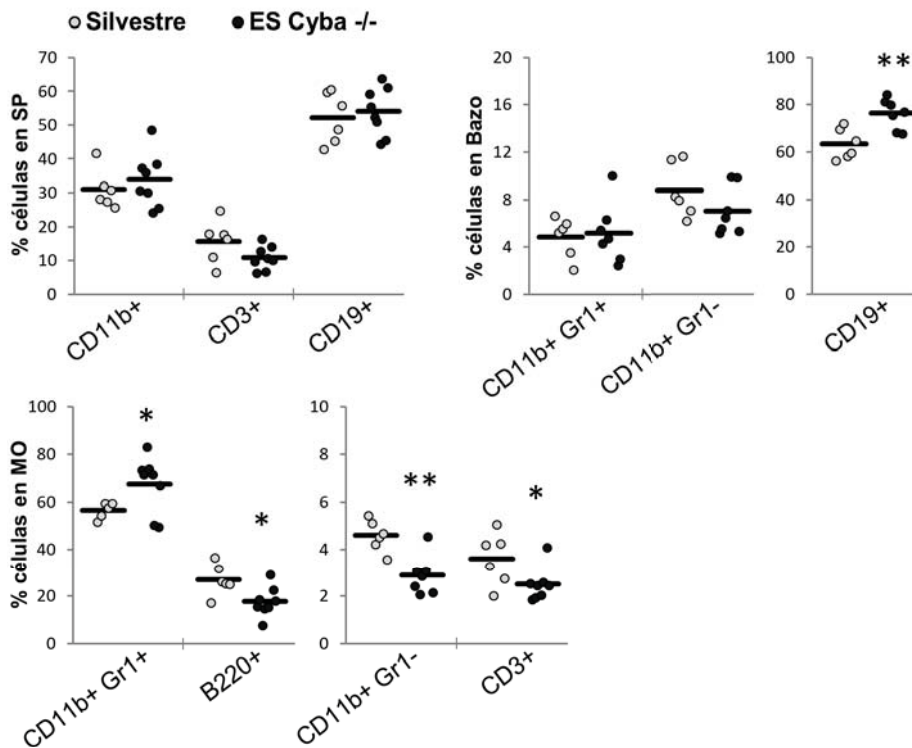


Figura 52- Análisis de las poblaciones celulares hematopoyéticas generadas por las células CD45.1⁺ tras el trasplante competitivo de células *Cyba*^{-/-}. Las gráficas representan el porcentaje de células de cada población, generadas a partir de las células CD45.1⁺, en los ratones del grupo control (puntos claros) y del grupo ES *Cyba*^{-/-} (puntos oscuros), y la media de cada grupo de experimento (líneas). CD11b⁺ Gr1⁺: granulocitos; CD11b⁺ Gr1⁻: monocito/macrófagos; CD3⁺: linfocitos T; CD19⁺/B220⁺: linfocitos B. Las diferencias significativas respecto al control se representan como *p<0,05; **p<0,01.

Las poblaciones de HSCs *Cyba*^{-/-} de estos trasplantes muestran un significativo aumento de las ST-HSCs y los MPPs, por el cuál la población general de células madre inmaduras (LSKs) también aumenta significativamente (**Fig. 53**). Las células progenitoras (LKs) sufren un pequeño aumento, pero que no llega a ser significativo. Así, de nuevo se sigue confirmando que la eliminación de p22^{phox} proporciona una mayor acumulación de HSCs en la médula ósea.

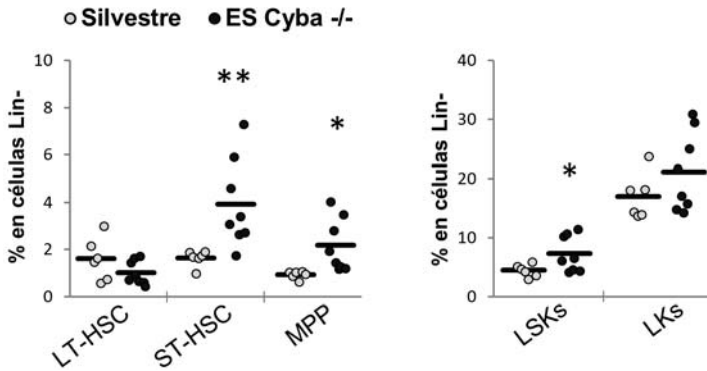


Figura 53- Análisis de las HSPCs generadas por las células CD45.1⁺ tras el trasplante competitivo de células *Cyba*^{-/-}. Las gráficas representan el porcentaje de células de cada población celular dentro de la población de células Lin⁻, generadas a partir de las células CD45.1⁺, en los ratones del grupo control (puntos claros) y del grupo ES *Cyba*^{-/-} (puntos oscuros), y la media de cada grupo de experimento (líneas). Las diferencias significativas respecto al control se representan como **p*<0,05; ***p*<0,01.

Para la realización de este experimento utilizamos un ratón C57BL/6J silvestre como donante de células control, por lo que cabe la posibilidad de que parte del efecto que observamos se deba a la pequeña variación en el fondo genético que puede poseer el modelo de ratón ES *Cyba*^{-/-} debido al origen de las células ES. Por ello, decidimos repetir el experimento empleando como donantes ratones ES *Cyba*^{-/-} y ES *Cyba*^{+/+} pertenecientes a la misma camada, y así igualar en cierta manera ese posible fondo genético.

Al realizar este nuevo ensayo seguimos encontrando el efecto de ventaja de la repoblación hematopoyética por parte de las células ES *Cyba*^{-/-} (**Fig. 54-A**), que, aunque de forma más sutil, también sigue propiciando un mayor quimerismo de éstas en todos los compartimentos 24 semanas tras el trasplante (**Fig. 54-B**).

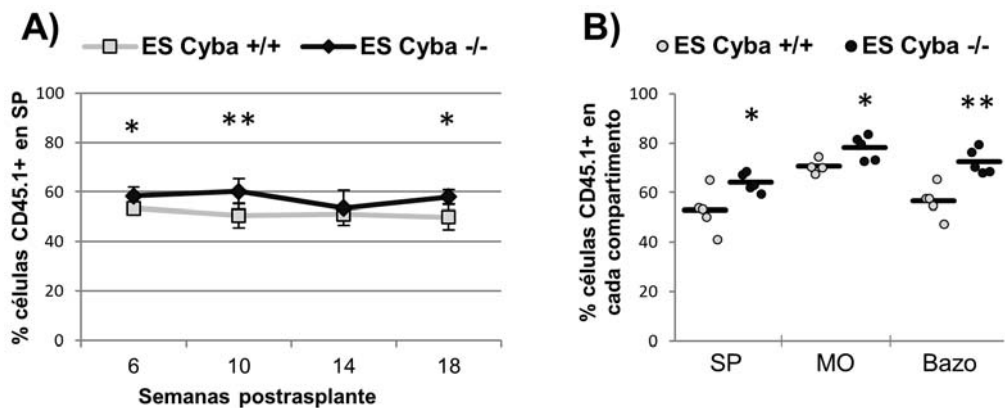


Figura 54- Análisis de la evolución de células CD45.1+ tras el trasplante competitivo con células ES *Cyba*^{+/+} y *Cyba*^{-/-}. **A)** Evolución del quimerismo de células CD45.1+ en sangre periférica a lo largo de 18 semanas postrasplante. Se representa la media ± DE (n=6). **B)** Quimerismo de células CD45.1+ en los diferentes compartimentos hematopoyéticos a las 24 semanas postrasplante. La gráfica representa el porcentaje de células CD45.1+ en cada compartimento de los ratones del grupo control ES *Cyba*^{+/+} (puntos claros) y del grupo ES *Cyba*^{-/-} (puntos oscuros), y la media de cada grupo de experimento (líneas). Las diferencias significativas respecto al control se representan como **p*<0,05; ***p*<0,01.

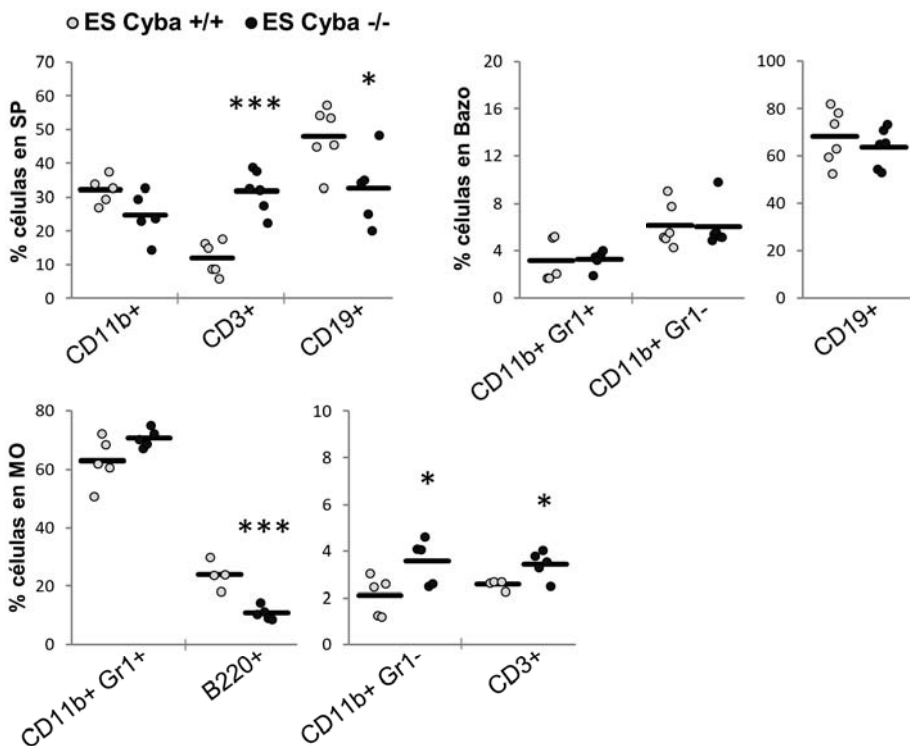


Figura 55 (página anterior)- Análisis de las poblaciones celulares hematopoyéticas generadas por las células CD45.1⁺ tras el trasplante competitivo de células ES *Cyba*^{+/+} y *Cyba*^{-/-}. Las gráficas representan el porcentaje de células de cada población, generadas a partir de las células CD45.1⁺, en los ratones del grupo control ES *Cyba*^{+/+} (puntos claros) y del grupo ES *Cyba*^{-/-} (puntos oscuros), y la media de cada grupo de experimento (líneas). CD11b⁺ Gr1⁺: granulocitos; CD11b⁺ Gr1⁻: monocito/macrófagos; CD3⁺: linfocitos T; CD19⁺/B220⁺: linfocitos B. Las diferencias significativas respecto al control se representan como **p*<0,05; ****p*<0,001.

En cuanto a los linajes celulares originados, tanto en sangre periférica como en médula ósea observamos que las células ES *Cyba*^{-/-} generan un menor porcentaje de linfocitos B respecto a las células ES *Cyba*^{+/+} control, además de un aumento significativo de monocito-macrófagos en médula ósea, y una tendencia al aumento de granulocitos (**Fig. 55**). De nuevo, estos datos se identifican en cierta manera con las alteraciones iniciales de los ratones *Cyba*^{-/-}, aunque de forma menos clara, puesto que en el bazo no encontramos ninguna diferencia y en sangre periférica puede haber una tendencia a la baja de células mieloides. Además, sorprendentemente en este caso encontramos un importante aumento de linfocitos T que no habíamos visto hasta ahora.

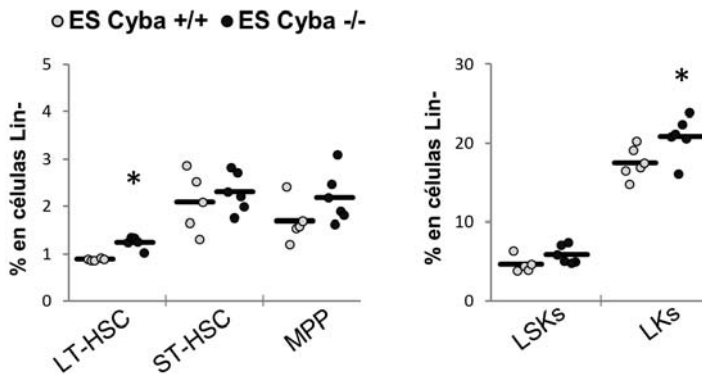


Figura 56- Análisis de las HSPCs generadas por las células CD45.1⁺ tras el trasplante competitivo de células ES *Cyba*^{+/+} y *Cyba*^{-/-}. Las gráficas representan el porcentaje de células de cada población celular dentro de la población de células Lin⁻, generadas a partir de las células CD45.1⁺, en los ratones del grupo control ES *Cyba*^{+/+} (puntos claros) y del grupo ES *Cyba*^{-/-} (puntos oscuros), y la media de cada grupo de experimento (líneas). Las diferencias significativas respecto al control se representan como **p*<0,05.

Por último, respecto a las HSPCs de los ratones trasplantados se puede ver que las células ES *Cyba*^{-/-} presentan un porcentaje significativamente mayor de LT-HSCs, junto con una tendencia al alza de MPPs, que las células ES *Cyba*^{+/+} control (**Fig. 56**). Además, las células progenitoras (LKs) también muestran un aumento significativo de su población.

Con los resultados de estos dos modelos de trasplante podemos confirmar que la eliminación de p22^{phox} en células de médula ósea genera ventaja en la regeneración hematopoyética tras un trasplante de médula ósea. Los factores que pueden estar promoviendo este efecto serían varios: las células *Cyba*^{-/-} de médula ósea trasplantadas se encuentran enriquecidas en poblaciones de HSCs (**Fig. 35**), y estas HSCs *Cyba*^{-/-} presentan un aumento de su capacidad de proliferación (**Fig. 38**). Además de esto, se ha demostrado que la inhibición de AKT en progenitores hematopoyéticos de forma previa a un trasplante de médula ósea aumenta la capacidad de anidamiento e injerto de las células ²⁹². Esta inhibición aportaría beneficios como preservar las características de célula madre de las HSCs, mejorar su capacidad de migración a la médula ósea, y la regulación de la expresión de integrinas como CD18 y CD49d ²⁹². De esta forma, la menor activación de AKT que presentan las células de médula ósea *Cyba*^{-/-} (**Fig. 46**) puede estar potenciando su capacidad de anidamiento y repoblación hematopoyética tras el trasplante. Por último, aunque con el modelo estadístico del *RNAseq* el *p*-valor ajustado deja de ser significativo, en las células Lin⁻ de ratones *Cyba*^{-/-} observamos una mayor expresión de *Cxcr4* (**Fig. 57**), efecto que también sucede en progenitores hematopoyéticos procedentes de células iPSC humanas deficientes en p22^{phox} ²⁵⁶. CXCR4 es uno de los receptores de quimioquinas más importantes para el mantenimiento de HSCs, y también es fundamental para la quimiotaxis y anidamiento de éstas durante el trasplante de médula ósea ²⁹³.

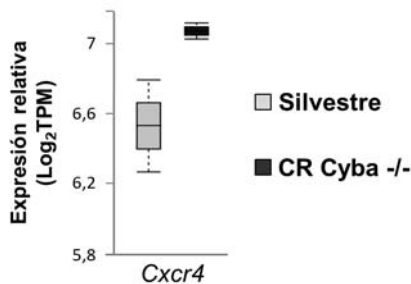


Figura 57- Expresión relativa de *Cxcr4* en el análisis *RNAseq* de células Lin⁻ de ratones *Cyba*^{-/-}. Diagrama de caja que muestra la distribución del valor de expresión (normalizado como TPM) del gen *Cxcr4* (n=2).

Por otro lado, durante el trasplante de médula ósea completo no encontramos el característico sesgo hacia la línea mieloide de los modelos *Cyba*^{-/-}, de manera que pensamos que podía ser un efecto influenciado por la pérdida de p22^{phox} en el nicho celular. Sin embargo, mediante estos trasplantes de médula ósea competitivos, donde igualmente tenemos un nicho hematopoyético normal, encontramos alteraciones de los linajes que recuerdan en parte a los de los modelos *Cyba*^{-/-}, aunque son menos consistentes en algunos casos (por ejemplo, en los resultados obtenidos en los bazos). También tenemos los datos de formación de colonias, donde no existe nicho celular alguno y encontramos un claro defecto de los progenitores B, pero solo una tendencia al aumento de la capacidad hematopoyética de los progenitores mieloides. Por todo ello, pensamos que el sesgo hacia la línea mieloide de los modelos *Cyba*^{-/-} durante la diferenciación hematopoyética se debe a la mezcla de ambas situaciones, tanto a un efecto intrínseco de las células *Cyba*^{-/-}, como a la falta de p22^{phox} en el nicho celular. De esta forma, cuando no hay nicho celular o éste es normal las células *Cyba*^{-/-} solo llegan a mostrar alteraciones leves en su diferenciación.

RyD.6.A - Capacidad de repoblación de la hematopoyesis a largo plazo mediante trasplante secundario de médula ósea *Cyba*^{-/-}

Durante la realización de nuestros experimentos de trasplante de médula ósea competitivo con ratones ES *Cyba*^{+/+} y ES *Cyba*^{-/-} decidimos aprovechar para realizar un trasplante secundario y evaluar la capacidad de repoblación hematopoyética de las células ES *Cyba*^{-/-} a largo plazo. Para ello, utilizamos la médula ósea de ratones previamente trasplantados de forma competitiva como donantes para un nuevo trasplante (**Fig. 58**). Puesto que el quimerismo entre células *Cyba*^{+/+} / *Cyba*^{-/-} y las células en competición en los ratones donantes no estaba igualado, reequilibramos el porcentaje de células CD45.1⁺ en ambos grupos a un 50% con células de médula ósea de otro ratón C57BL/6J silvestre (CD45.2⁺), antes de trasplantarlas en los receptores.

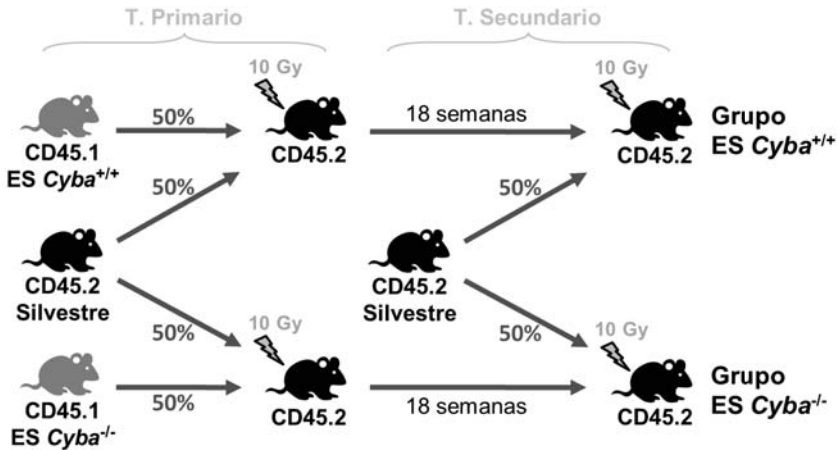


Figura 58- Esquema del modelo de trasplante de médula ósea secundario competitivo. Más información en el texto.

Realizamos el análisis de este experimento de forma similar a los anteriores, analizando la evolución de las células CD45.1⁺ en sangre periférica con el paso de las semanas, y los diversos compartimentos hematopoyéticos 24 semanas postrasplante, todo ello mediante citometría.

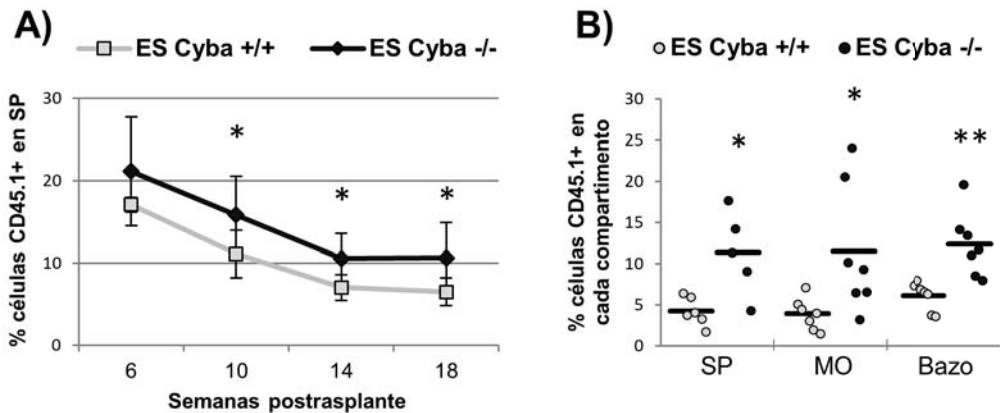


Figura 59- Análisis de la evolución de células CD45.1⁺ tras el trasplante secundario con células ES *Cyba*^{+/+} y *Cyba*^{-/-}. A) Evolución del quimerismo de células CD45.1⁺ en sangre periférica a lo largo de 18 semanas postrasplante. Se representa la media ± DE (n=7). B) Quimerismo de células CD45.1⁺ en los diferentes compartimentos hematopoyéticos a las 24 semanas postrasplante. La gráfica representa el porcentaje de células CD45.1⁺ en cada compartimento de los ratones del grupo control ES *Cyba*^{+/+} (puntos claros) y del grupo ES *Cyba*^{-/-} (puntos oscuros), y la media de cada grupo de experimento (líneas). Las diferencias significativas respecto al control se representan como **p*<0,05; ***p*<0,01.

En este caso, durante su evolución postrasplante observamos una disminución del quimerismo en ambos grupos experimentales (**Fig. 59-A**), posiblemente debido a que las células en competición utilizadas procedían de ratones más jóvenes (10 semanas de edad), por lo que su capacidad de repoblación seguramente fuese mayor que la de las células procedentes del trasplante primario (cuyos ratones de origen tendrían 30 semanas de edad). Aun así, los ratones trasplantados con las células ES *Cyba*^{-/-} mantienen un porcentaje de células CD45.1⁺ significativamente superior a los ratones ES *Cyba*^{+/+} control. Además, al analizar los diferentes compartimentos sanguíneos también se observa que los ratones trasplantados con células ES *Cyba*^{-/-} presentan un mayor porcentaje de quimerismo en todos sus compartimentos (**Fig. 59-B**). Por tanto, a largo plazo se sigue manifestando el mayor poder de repoblación de las células deficientes en p22^{phox}, en comparación con células silvestres.

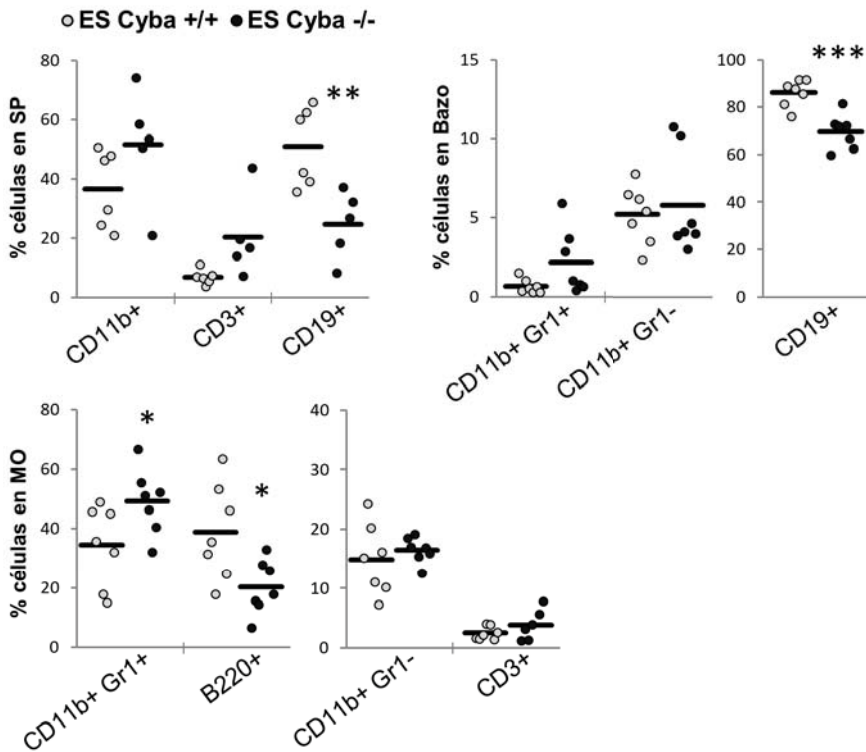


Figura 60- Análisis de las poblaciones celulares hematopoyéticas generadas por las células CD45.1⁺ tras el trasplante secundario de células ES *Cyba*^{+/+} y *Cyba*^{-/-}. Las gráficas representan el porcentaje de células de cada población, generadas a partir de las células CD45.1⁺, en los ratones del grupo control ES

Cyba^{+/+} (puntos claros) y del grupo ES *Cyba*^{-/-} (puntos oscuros), y la media de cada grupo de experimento (líneas). CD11b⁺ Gr1⁺: granulocitos; CD11b⁺ Gr1⁻: monocito/macrófagos; CD3⁺: linfocitos T; CD19⁺/B220⁺: linfocitos B. Las diferencias significativas respecto al control se representan como **p*<0,05; ***p*<0,01; ****p*<0,001.

Centrándonos en los linajes generados por las células CD45.1⁺, las células ES *Cyba*^{-/-} mantienen la línea de resultados obtenidos hasta ahora: encontramos una gran reducción en el porcentaje de linfocitos B en todos los compartimentos, y una tendencia al aumento de granulocitos también en todos ellos, aunque sólo significativa en el caso de la médula ósea (**Fig. 60**).

Finalmente, al contrario que en el trasplante primario, el porcentaje de poblaciones de HSPCs tras el trasplante secundario no mostró ninguna diferencia entre las células ES *Cyba*^{-/-} y las células ES *Cyba*^{+/+} control (**Fig. 61**). Este resultado puede indicar que a muy largo plazo se podría terminar perdiendo la mayor capacidad de proliferación y autorrenovación que confiere el déficit de p22^{phox} a las HSCs.

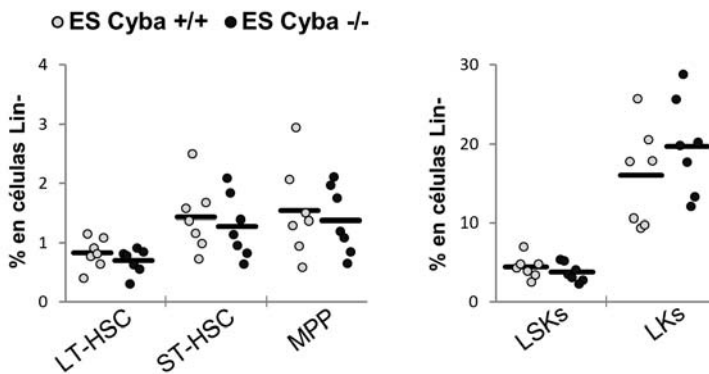


Figura 61- Análisis de las HSPCs generadas por las células CD45.1⁺ tras el trasplante secundario de células ES *Cyba*^{+/+} y *Cyba*^{-/-}. Las gráficas representan el porcentaje de células de cada población celular dentro de la población de células Lin⁻, generadas a partir de las células CD45.1⁺, en los ratones del grupo control ES *Cyba*^{+/+} (puntos claros) y del grupo ES *Cyba*^{-/-} (puntos oscuros), y la media de cada grupo de experimento (líneas).

**RyD.7 - CAPACIDAD DE REPOBLACIÓN DE LA
HEMATOPOYESIS *IN VIVO* MEDIANTE TRASPLANTE
COMPETITIVO DE MÉDULA ÓSEA DE RATONES *Nox1*^{-/-},
Cybb^{-/-} O *Nox4*^{-/-}**

Los resultados hasta ahora demuestran que p22^{phox} posee importantes funciones dentro de la hematopoyesis *in vivo*, tanto en la homeostasis de HSPCs como en el proceso de diferenciación hematopoyética. Pero p22^{phox} puede realizar estas funciones a través de la unión a cualquiera de las tres NADPH oxidasas que encontramos presentes en células Lin⁻ (*Nox1*, *Nox2* y *Nox4*), por lo que nuestro siguiente paso fue investigar cuáles de ellas podrían ser las enzimas involucradas en estos efectos. Para ello, adquirimos ratones carentes de estas NADPH oxidasas, tanto de *Nox1* (*Nox1*^{-/-}) como de *Nox2* (*Cybb*^{-/-}) y de *Nox4* (*Nox4*^{-/-}), y realizamos nuevos experimentos de trasplante competitivo de médula ósea usándolos como donantes, para comprobar si obteníamos los mismos efectos vistos con los ratones ES *Cyba*^{-/-}. Los ratones deficientes de las diferentes *Nox* presentan el isotipo CD45.2⁺, de manera que en este caso las células en competición que utilizamos fueron células CD45.1⁺.

La evolución en sangre periférica de las células *Nox1*^{-/-} y *Cybb*^{-/-} presenta un pequeño incremento en su quimerismo (**Fig. 62-A, B**), al igual que sucedía en los trasplantes competitivos de médula ósea con las células *Cyba*^{-/-}, mientras que las células *Nox4*^{-/-} no poseen ningún tipo de ventaja de repoblación, ya que se mantienen en el 50% de quimerismo inicial durante todo el tiempo (**Fig. 62-C**). De esta manera, parece que tanto *Nox1* como *Nox2* podrían estar implicadas en el efecto de ventaja de repoblación hematopoyética que presentan las células con delección de p22^{phox}, mientras que *Nox4* no estaría involucrada en ese proceso.

En este caso nuestros resultados no concuerdan con los obtenidos anteriormente mediante trasplantes hematopoyéticos de células *Cybb*^{-/-} ^{251,257}. Los anteriores reportes muestran un pequeño aumento de la capacidad de repoblación de las células *Cybb*^{-/-} a corto plazo, igual que en nuestros experimentos, pero con el tiempo van perdiendo esa capacidad y terminan por suponer un pequeño porcentaje del número de células hematopoyéticas. Respecto al trabajo de Weisser et al. ²⁵⁷, el diseño del experimento no es estrictamente el mismo, ya que ellos

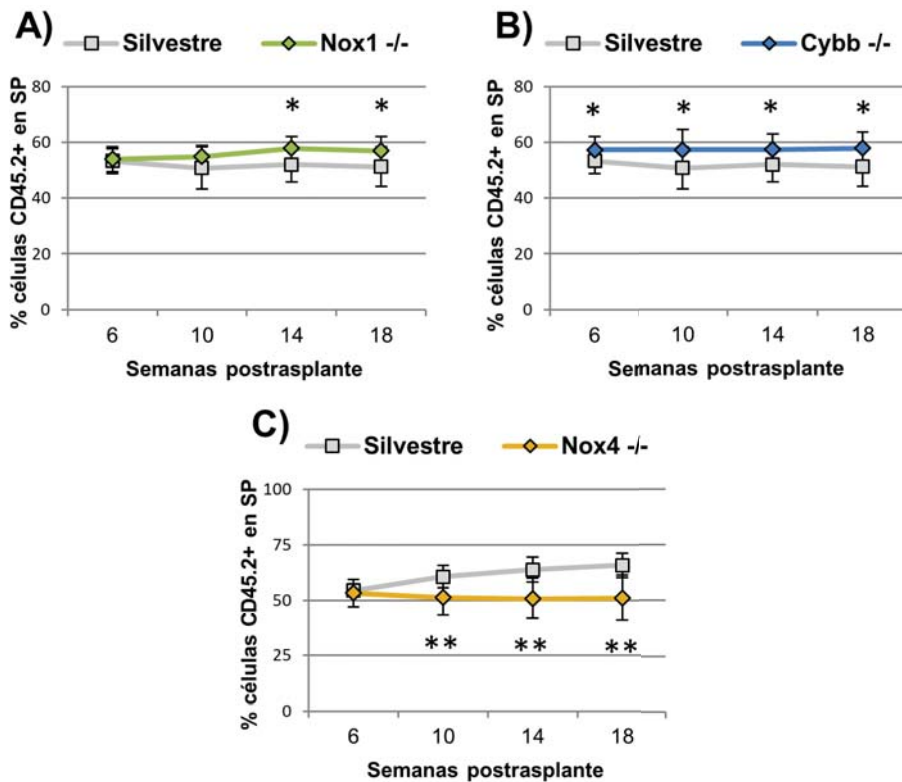


Figura 62- Análisis de la evolución de células CD45.2⁺ tras el trasplante competitivo con células *Nox1*^{-/-}, *Cybb*^{-/-} o *Nox4*^{-/-}. Evolución del quimerismo de células CD45.2⁺ en sangre periférica a lo largo de 18 semanas tras el trasplante competitivo con células A) *Nox1*^{-/-} (n=11), B) *Cybb*^{-/-} (n=11), y C) *Nox4*^{-/-} (n=10). Se representa la media ± DE, y las diferencias significativas respecto al control como *p<0,05; **p<0,01.

realizan el trasplante mediante un número muy limitado de HSCs purificadas, mientras que nosotros utilizamos 3.000.000 de células de médula ósea en la que únicamente hemos eliminado las células de la serie roja. Además, para la detección de las células mediante citometría ellos infectaron sus células mediante vectores lentivirales, mientras que nosotros utilizamos células con un distinto isotipo de CD45, y por tanto sin modificar. De esta forma, es posible que el mayor número de células de nuestros experimentos, o la presencia de una mayor cantidad de tipos celulares maduros, sea capaz de mantener en el tiempo esa ventaja de repoblación inicial de los trasplantes. También, la alteración de las células mediante la infección lentiviral es posible que provoque algún tipo de respuesta negativa que reduzca la capacidad regenerativa de las células en sus experimentos. Otra posible causa sería un diferente estado de inflamación de los animales, ya que en su estudio han

relacionado la mayor presencia de IL-1 β con una regeneración hematopoyética defectuosa de las HSCs. Así, mientras que los ratones *Cybb*^{-/-} que adquirimos y utilizamos nosotros no presentaban ningún tipo de alteración ni de inflamación, ellos comentan en su artículo que no utilizaron animales con infecciones abiertas, lo cual hace pensar que sí pudieran utilizar animales con algún otro tipo de inflamación o patología, y por ello distintos niveles de IL-1 β . Por otro lado, respecto al trabajo de Adane et al.²⁵¹, sí que utilizan células de médula ósea completa, similar a nosotros, pero de nuevo un número mucho más limitado de ellas, por lo que podría haber una diferente respuesta del entorno ante la diferente celularidad.

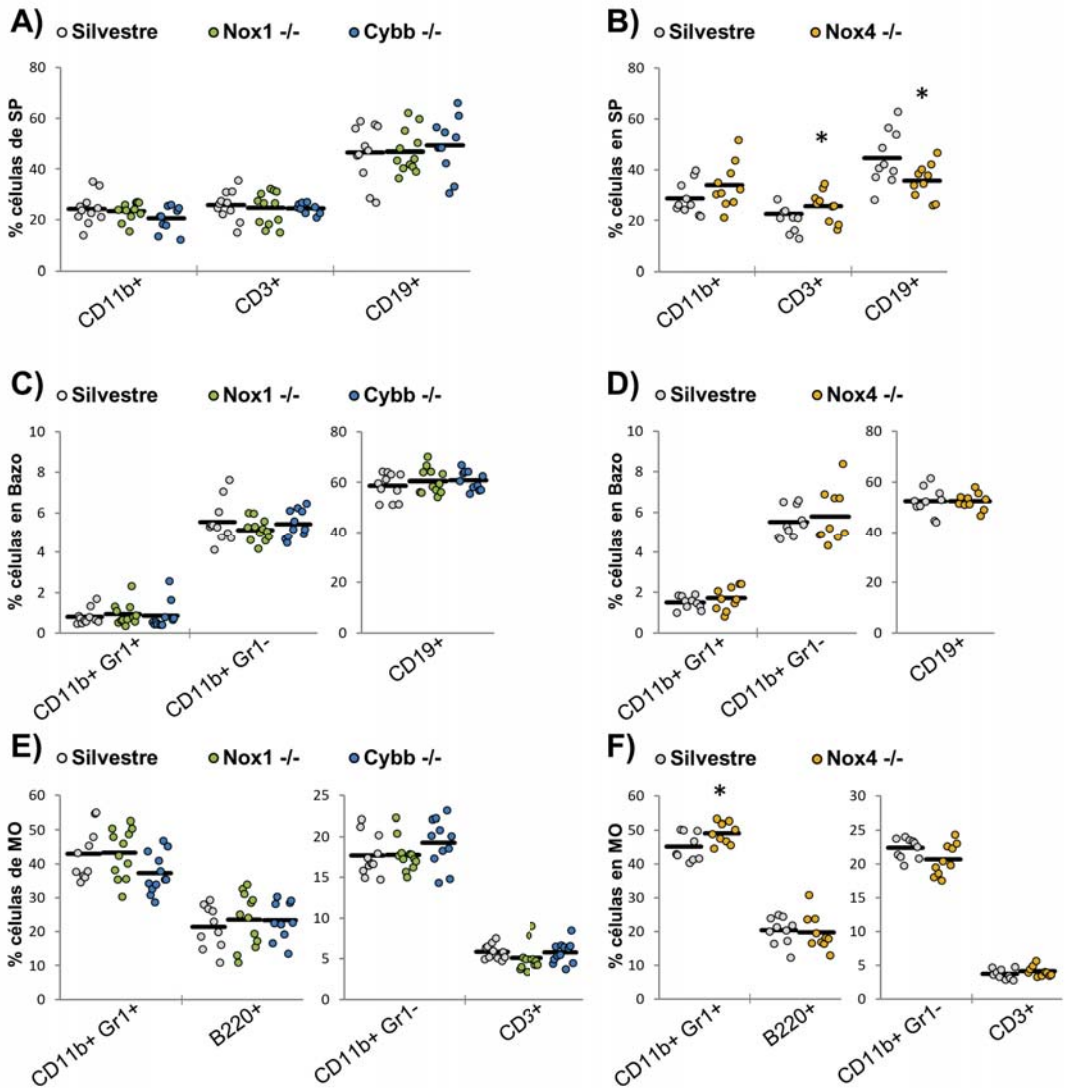
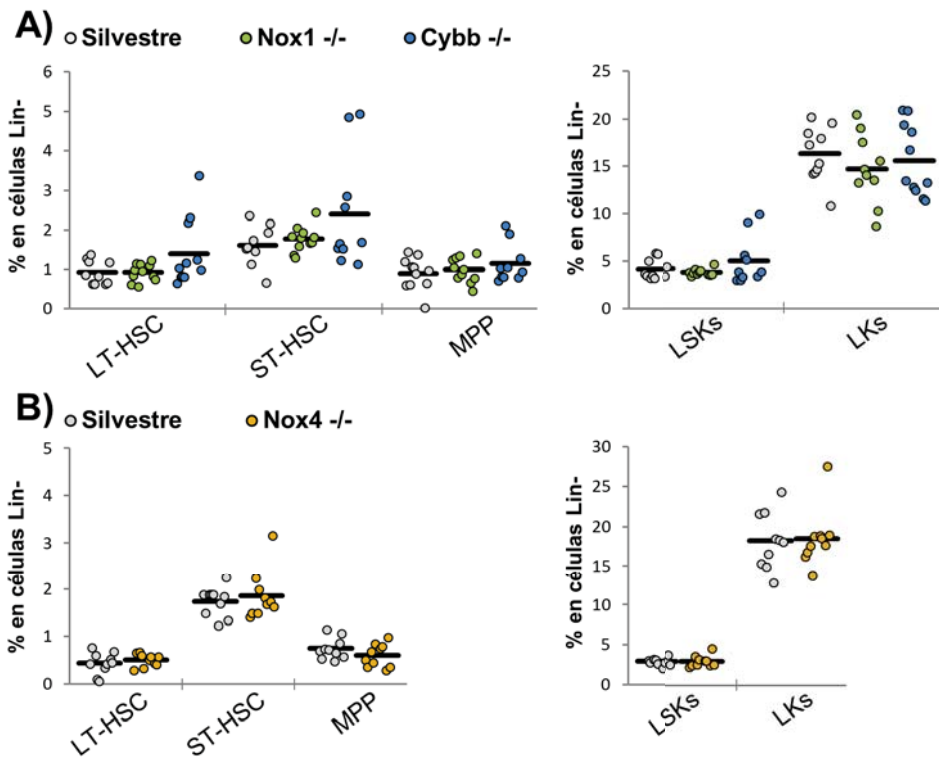


Figura 63 (página anterior)- Análisis de las poblaciones celulares hematopoyéticas generadas por las células CD45.2⁺ tras el trasplante competitivo con células *Nox1*^{-/-}, *Cybb*^{-/-} o *Nox4*^{-/-}. Las gráficas representan el porcentaje de células de cada población, generadas a partir de las células CD45.2⁺, en los ratones del grupo silvestre control (puntos grises) y de los grupos **(A, C, E)** *Nox1*^{-/-} (puntos verdes), *Cybb*^{-/-} (puntos azules), y **(B, D, F)** *Nox4*^{-/-} (puntos dorados), y la media de cada grupo de experimento (líneas). CD11b⁺ Gr1⁺: granulocitos; CD11b⁺ Gr1⁻: monocito/macrófagos; CD3⁺: linfocitos T; CD19⁺/B220⁺: linfocitos B. Las diferencias significativas respecto al control se representan como **p*<0,05.

En cuanto a la regeneración de los linajes maduros, el déficit de *Nox1* no muestra la alteración de ninguna población, mientras que en los ratones trasplantados con células *Cybb*^{-/-} sólo se observa un pequeño descenso en el porcentaje de granulocitos en médula ósea, que no llega a ser significativo (**Fig. 63-E**). En cambio, al eliminar *Nox4* nos encontramos con un aumento de granulocitos en médula ósea y un descenso de linfocitos B en sangre periférica, acompañado del aumento de linfocitos T (**Fig. 63-F, B**). Estas alteraciones recuerdan en cierta medida a los cambios obtenidos mediante el trasplante competitivo con células ES *Cyba*^{-/-} (**Fig. 55**). Por tanto, *Nox4* puede estar implicada en la regulación de la diferenciación hematopoyética vista con la eliminación de p22^{phox}.

Finalmente, respecto a las HSPCs no se observa ningún cambio significativo cuando las células trasplantadas carecen de *Nox1*, *Nox2* o *Nox4*, únicamente se puede ver una pequeña tendencia al aumento del porcentaje de LT-HSCs y ST-HSCs en algunos ratones del grupo *Cybb*^{-/-} (**Fig. 64-A**). De esta forma, no podemos concluir que ninguna de ellas sea la responsable del aumento de HSCs visto tras el trasplante competitivo con células ES *Cyba*^{-/-}, sino que posiblemente este efecto se deba a la inhibición conjunta de varias. En este caso, situaríamos a *Nox2* como una de las enzimas seguramente participantes, ya que es la única que muestra un aumento leve de HSCs tras el trasplante, y como hemos dicho anteriormente, su eliminación produce el aumento de HSPCs en el ratón^{231,257}.

Figura 64 (página siguiente)- Análisis de las HSPCs generadas por las células CD45.2⁺ tras el trasplante competitivo con células *Nox1*^{-/-}, *Cybb*^{-/-} o *Nox4*^{-/-}. Las gráficas representan el porcentaje de células de cada población celular dentro de la población de células Lin⁻, generadas a partir de las células CD45.2⁺, en los ratones del grupo silvestre control (puntos grises) y de los grupos **A)** *Nox1*^{-/-} (puntos verdes), *Cybb*^{-/-} (puntos azules), y **B)** *Nox4*^{-/-} (puntos dorados), y la media de cada grupo de experimento (líneas).



RyD.7.A - Capacidad de repoblación de la hematopoyesis a largo plazo mediante trasplante secundario de médula ósea *Nox1^{-/-}*, *Cybb^{-/-}* o *Nox4^{-/-}*

Al igual que hicimos en el caso de los trasplantes con células *Cyba^{-/-}*, decidimos analizar la hematopoyesis a largo plazo de las células *Nox1^{-/-}*, *Cybb^{-/-}* y *Nox4^{-/-}*, realizando trasplantes secundarios a partir de la médula ósea de los ratones de trasplantes primarios. En esta ocasión inyectamos la médula ósea donante en los ratones receptores sin reequilibrar los isotipos de CD45, con el mismo porcentaje de células CD45.1⁺ y CD45.2⁺ que poseían en ese momento, y analizamos su evolución durante el trasplante desde ese punto.

La evolución del quimerismo en sangre periférica en estos trasplantes secundarios nos demuestra que la ventaja de repoblación hematopoyética observada en el trasplante primario por las células *Nox1^{-/-}* y *Cybb^{-/-}* se potencia durante el trasplante secundario, donde aumenta desde un 60% y un 53% de las células trasplantadas, respectivamente (Fig. 65-A, C), hasta más de un 80% de las

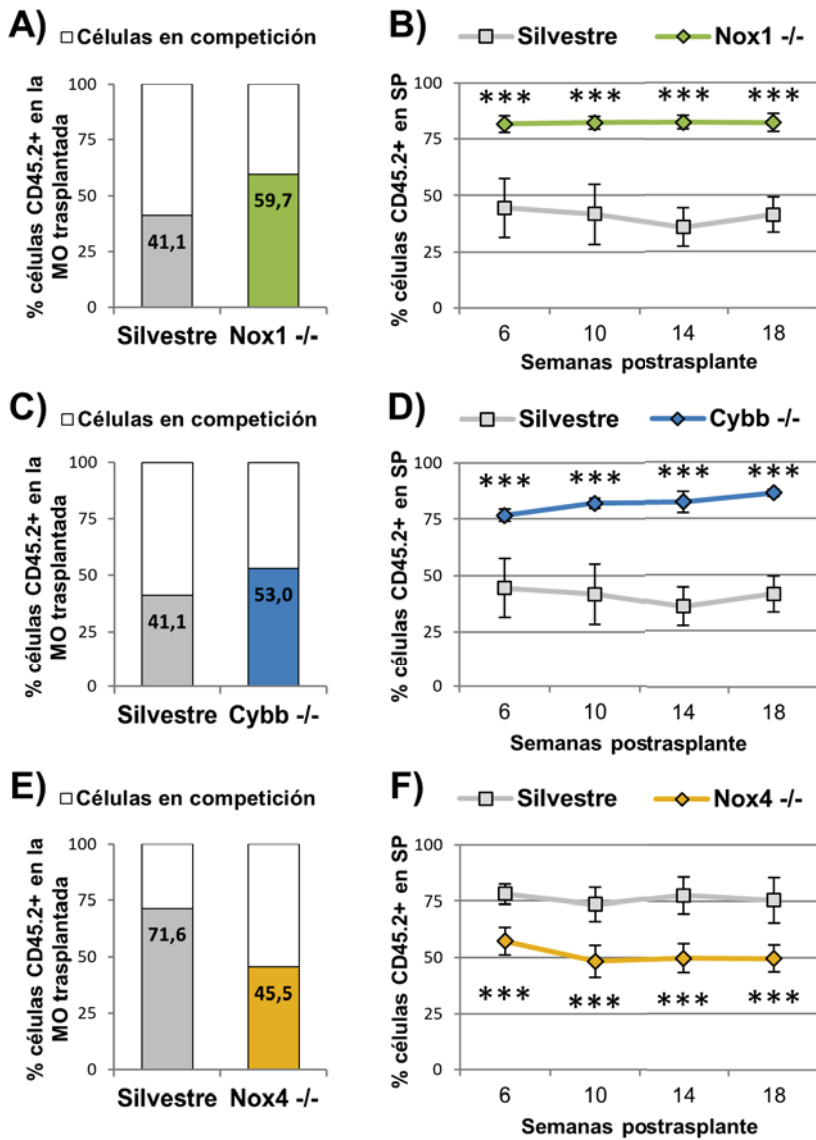


Figura 65- Análisis de la evolución de células CD45.2⁺ tras el trasplante secundario con células *Nox1*^{-/-}, *Cybb*^{-/-} o *Nox4*^{-/-}. (A, C, E) Porcentaje de células CD45.2⁺ en la médula ósea de los ratones del trasplante primario utilizados como donantes para el trasplante secundario. (B, D, F) Evolución del quimerismo de células CD45.2⁺ en sangre periférica a lo largo de 18 semanas tras el trasplante secundario con células *Nox1*^{-/-}, *Cybb*^{-/-} y *Nox4*^{-/-}. Se representa la media ± DE (n=6), y las diferencias significativas respecto al control como ****p*<0,001.

células presentes en sangre periférica a las 18 semanas del trasplante (Fig. 65-B, D), mientras que las células control se mantienen alrededor del mismo 40% de quimerismo inicial. Esto confirma la mayor capacidad de repoblación

hematopoyética de estas células, y en el caso de las células *Cybb*^{-/-} además valida nuestros resultados obtenidos durante los trasplantes primarios, a diferencia de los resultados de anteriores publicaciones^{251,257}. En cambio, en el caso de las células *Nox4*^{-/-}, el quimerismo se mantiene prácticamente igual que en los niveles de partida durante todo el trasplante (**Fig. 65-E, F**), lo mismo que sucede con las células del grupo control, demostrando nuevamente que no tiene ningún efecto sobre la repoblación hematopoyética.

La distribución de los diferentes linajes maduros y de las HSPCs en los ratones trasplantados con células *Nox1*^{-/-} y *Cybb*^{-/-} no mostró ninguna diferencia significativa respecto al control (datos no mostrados), al igual que sucedió durante el trasplante primario. En cuanto a los ratones con células *Nox4*^{-/-}, tampoco encontramos diferencias significativas en las poblaciones celulares de los diferentes compartimentos (datos no mostrados), por lo que las células que regeneran la hematopoyesis a largo plazo parecen perder esa capacidad de regular la diferenciación que observamos durante el trasplante primario (**Fig. 63-B, F**). Sin embargo, en las poblaciones de HSPCs sí encontramos grandes cambios por la pérdida de *Nox4*: una reducción significativa de las poblaciones de ST-HSC y MPP, lo que hace que las LSKs en general disminuyan, y un descenso drástico en la población de células progenitoras hematopoyéticas (**Fig. 66**).

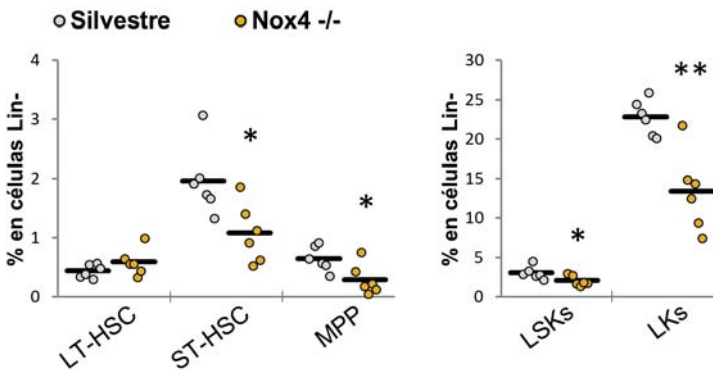


Figura 66- Análisis de las HSPCs generadas por las células CD45.2⁺ tras el trasplante secundario con células *Nox4*^{-/-}. Las gráficas representan el porcentaje de células de cada población celular dentro de la población de células Lin⁻, generadas a partir de las células CD45.2⁺, en los ratones del grupo silvestre control (puntos grises) y del grupo *Nox4*^{-/-} (puntos dorados), y la media de cada grupo de experimento (líneas). Las diferencias significativas respecto al control se representan como **p*<0,05; ***p*<0,01.

Este resultado nos indica que Nox4 puede ser una proteína muy importante para el mantenimiento de las HSPCs a largo plazo, y sin la cual las poblaciones hematopoyéticas inmaduras pueden terminar viéndose afectadas. De hecho, la inhibición de la actividad de Nox4 podría ser entonces la causante de que las células HSC *Cyba*^{-/-} pierden a largo plazo, durante el trasplante secundario (Fig. 61), la mayor presencia que tenían en los trasplantes primarios (Fig. 53 y 56).

En conclusión, Nox1 y Nox2 han demostrado que intervienen sobre la capacidad de repoblación hematopoyética, ya que al ser eliminadas las células obtienen cierta ventaja de repoblación respecto a células normales. Este efecto puede ser menor a corto plazo, durante el trasplante primario, y potenciarse si ambas enzimas son inhibidas, como demuestra el mayor porcentaje de quimerismo alcanzado con la eliminación del gen *Cyba*. Sin embargo, es un efecto completamente evidente a largo plazo, como se observa en nuestros experimentos de trasplante secundario, donde alcanzan un porcentaje de quimerismo superior al 80%. En cambio, Nox1 y Nox2 no parecen intervenir sobre el camino a seguir durante la diferenciación hematopoyética ya que, como hemos visto, su eliminación no genera ninguna alteración de las poblaciones celulares presentes tras la regeneración.

Por otro lado, Nox4 no posee influencia sobre la capacidad de repoblación hematopoyética, ya que el quimerismo en los trasplantes con células en las que ha sido eliminada se mantiene equilibrado durante todo el tiempo. Sin embargo, en cuanto a las poblaciones celulares sí que parece tener importantes funciones, puesto que su eliminación muestra un incremento de poblaciones mieloides y un descenso de poblaciones linfoides a corto plazo, que recuerda al visto anteriormente con el trasplante de células *Cyba*^{-/-}, y a largo plazo una importante caída en el porcentaje de HSPCs.

Finalmente, la eliminación del gen *Cyba* produce un incremento de poblaciones HSPC durante el trasplante primario, el cual no es imitado por la eliminación de ninguna de las NADPH oxidasas en solitario. Por ello, pensamos que éste puede ser un efecto debido a la inhibición combinada de varias de ellas, entre las que seguramente se encuentre Nox2, que sí ha demostrado el aumento de HSPCs en ratones *Cybb*^{-/-} 231,257.

RyD.8 - INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA DE LA ACTIVIDAD NADPH OXIDÁSICA COMO TRATAMIENTO PARA MEJORAR LA REGENERACIÓN HEMATOPOYÉTICA EN TRASPLANTES DE MÉDULA ÓSEA

Dos de las mayores complicaciones que se pueden encontrar a la hora de la realización de un trasplante de médula ósea son la disponibilidad de una reducida cantidad de células madre a injertar, y un elevado tiempo de espera hasta que las células madre trasplantadas comienzan a producir células inmunitarias maduras capaces de defender de nuevo al organismo, período durante el que el paciente es muy vulnerable a las infecciones. Ambos problemas pueden reducirse consiguiendo una mejoría en el anidamiento y proliferación de las células trasplantadas: un bajo número de células puede compensarse si un mayor porcentaje de ellas es capaz de anidar eficazmente en la médula ósea y poseen una mayor capacidad de autorrenovación; y un elevado tiempo de regeneración hematopoyética también puede acelerarse si las células madre son capaces de anidar y activarse antes. En este sentido, en los últimos años han surgido varias estrategias terapéuticas encaminadas a favorecer una mayor migración de las células trasplantadas hacia la médula ósea, y un mayor anidamiento en ésta ²⁹³. Por ejemplo, se ha intentado obtener una mayor expresión de *Cxcr4* en las HSPCs trasplantadas, a través de una mayor formación de cúmulos lipídicos, mediante factores como el fragmento C3a, péptidos como la catelicidina, o incluso pequeños aumentos de temperatura ²⁹³. También se ha estudiado la exposición de las células a prostaglandina E₂, que estimula la proliferación, división y diferenciación de HSCs, facilitando su anidamiento y activación ²⁹⁴. Incluso se ha demostrado el beneficio de realizar el trasplante en condiciones de hipoxia o en presencia de ciclosporina A, evitando la generación de ROS por la mitocondria y con ello la pérdida de las capacidades de células HSC ²¹⁹.

Durante este trabajo hemos demostrado que la eliminación del gen *Cyba* genera una ventaja competitiva en la regeneración de las células hematopoyéticas respecto a células normales, e incluso puede que una de las causas de esta ventaja sea precisamente una mayor expresión de *Cxcr4* (**Fig. 57**). Por tanto, pensamos que un tratamiento farmacológico que inhiba la actividad NADPH oxidásica también podría ser útil como terapia para mejorar el proceso de regeneración en los

trasplantes de médula ósea. Dado el poco desarrollo actual de inhibidores específicos frente a las NADPH oxidasas, para la comprobación de esta hipótesis nos decantamos por la utilización de DPI, el inhibidor más utilizado y conocido de la familia.

Como herramienta experimental utilizamos de nuevo el trasplante competitivo de médula ósea, en el cuál trasplantamos un 50% de células CD45.1⁺ tratadas durante 12 horas con DPI 1 μ M, en competición con un 50% de células CD45.2⁺. Por su parte, el grupo control fueron ratones trasplantados con un 50% de células CD45.1⁺ tratadas solo con vehículo, en competición con un 50% de células CD45.2⁺ (Fig. 67).

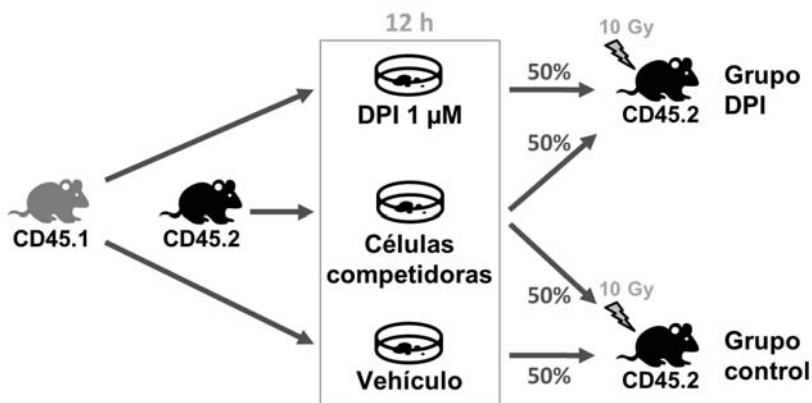


Figura 67- Esquema del modelo de trasplante de médula ósea utilizado para evaluar el tratamiento con DPI. Más información en el texto.

Previamente a la inyección de las células en los ratones receptores, analizamos una pequeña muestra de éstas para comprobar los niveles de ROS, y asegurarnos que el DPI hubiese sido efectivo. Los niveles de ROS medidos por citometría en las células tratadas con DPI fueron un 21% inferiores que en las células tratadas con vehículo (Fig. 68-A). Además, también comprobamos la viabilidad de las células mediante Anexina/7-AAD para confirmar que la dosis de DPI utilizada no era tóxica, encontrando un pequeño aumento del 3% de células en estado de necrosis respecto al grupo control (Fig. 68-B). Esta variación era muy pequeña, e incluso el porcentaje de células viables (negativas para ambos marcajes) difería mucho menos entre ambas condiciones, por lo que consideramos que la dosis era adecuada al producir un descenso destacable de los niveles de ROS sin apenas consecuencias sobre la viabilidad celular.

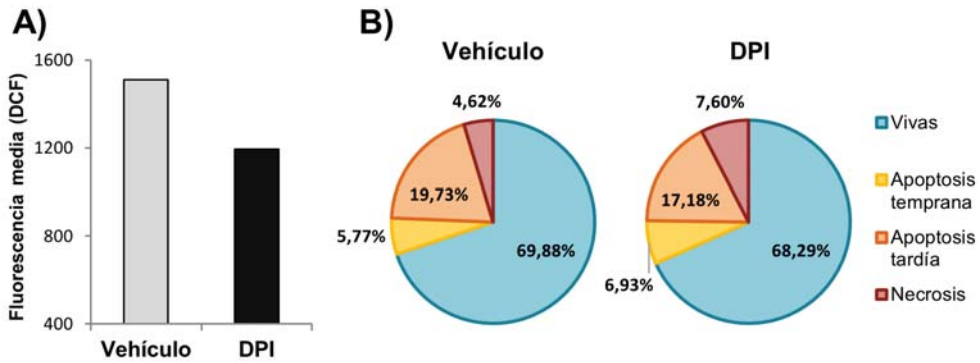


Figura 68- Análisis de las células utilizadas para el trasplante competitivo de médula ósea tratada con DPI. **A)** Diagrama de barras que muestra los niveles de ROS de las células tras 12 horas de tratamiento con vehículo o con 1 μM de DPI. **B)** Gráfico de sectores que representa el estado celular de las células tras el tratamiento.

Tras el trasplante, la evolución de las células en sangre periférica fue similar en ambos grupos, no observando ninguna ventaja regenerativa de las células tratadas con DPI (**Fig. 69-A**). Al término del experimento, el análisis de los compartimentos hematopoyéticos tampoco mostró diferencias en ninguno de los linajes maduros (datos no mostrados), ni en las poblaciones de HSPCs (**Fig. 69-B**).

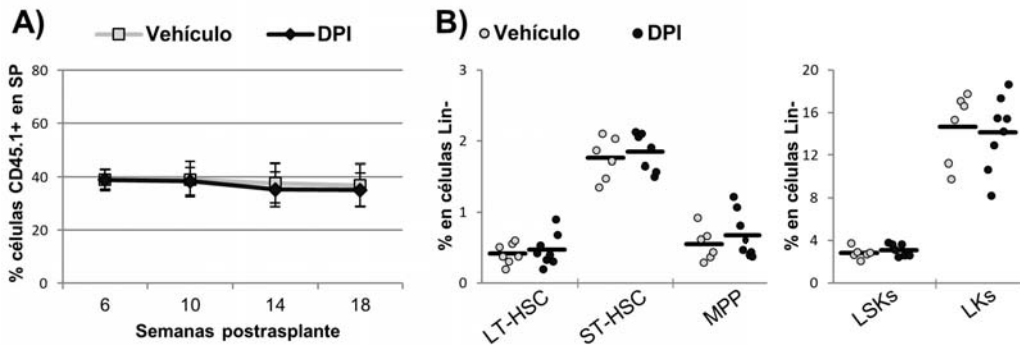


Figura 69- Análisis de la evolución de células CD45.1+ tras el trasplante competitivo de células tratadas con DPI. **A)** Evolución del quimerismo de células CD45.1+ en sangre periférica a lo largo de 18 semanas tras el trasplante competitivo de células tratadas con vehículo o con DPI. Se representa la media ± DE (n=7). **B)** Análisis de las HSPCs generadas tras el trasplante competitivo. Las gráficas representan el porcentaje de células de cada población celular dentro de la población de células Lin⁻, generadas a partir de las células CD45.1+, en los ratones del grupo control (puntos claros) y del grupo DPI (puntos oscuros), y la media de cada grupo de experimento (líneas).

A pesar de este resultado adverso, decidimos continuar adelante con un trasplante secundario, ya que, al igual que sucede en nuestros trasplantes secundarios de *Nox1^{-/-}* y *Cybb^{-/-}*, existen antecedentes en los que los resultados son más evidentes al evaluar la hematopoyesis a largo plazo que durante el trasplante primario, incluso con la utilización de un tratamiento frente a las ROS como la NAC ²⁹⁵. Desafortunadamente, a lo largo del trasplante secundario obtuvimos resultados bastante dispersos en el quimerismo y continuamos sin encontrar ninguna diferencia entre los ratones trasplantados con células tratadas con DPI y los ratones con células control (**Fig. 70**).

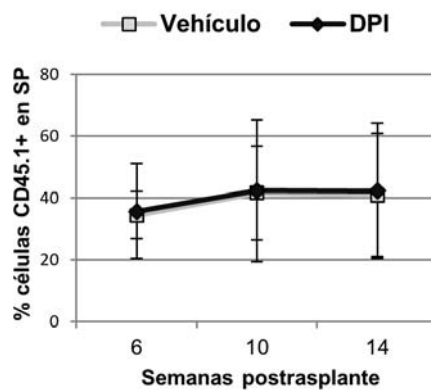


Figura 70- Análisis de la evolución de células CD45.1⁺ tras el trasplante secundario de células tratadas con DPI. Evolución del quimerismo de células CD45.1⁺ en sangre periférica a lo largo de 14 semanas tras el trasplante secundario de células tratadas con vehículo o con DPI. Se representa la media \pm DE (n=5).

Algunos artículos han demostrado beneficios en el anidamiento de las células trasplantadas mediante la reducción de los niveles de ROS de los individuos receptores con NAC ^{296,297}, de manera que decidimos reintentar el ensayo modificando el diseño del experimento para implementar también este método. Además de tratar con DPI a las células donantes, tratamos también a los ratones receptores previamente al trasplante, y durante las 5 semanas posteriores. En este caso también decidimos realizar una irradiación subletal, en la cual los ratones reciben una dosis de radiación menor, encaminada a que el nicho hematopoyético sea más receptivo para las células trasplantadas.

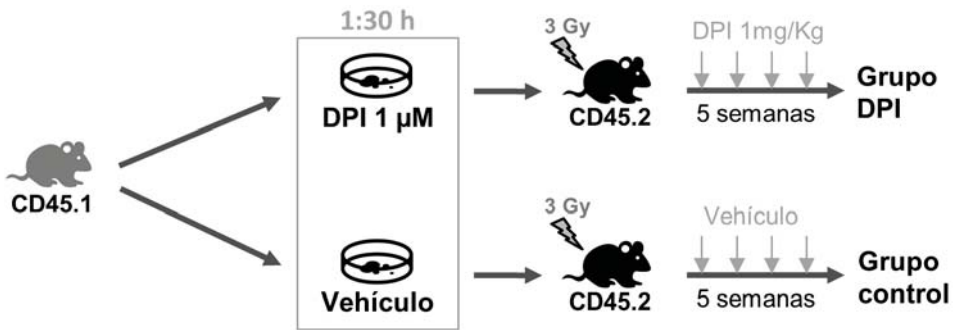


Figura 71- Esquema del segundo modelo de trasplante de médula ósea utilizado para evaluar el tratamiento con DPI. Más información en el texto.

Aun así, la evolución del trasplante continuó siendo similar en ambos grupos experimentales (Fig. 72), por lo que seguimos sin obtener una ventaja de repoblación hematopoyética aplicable mediante la inhibición de NADPH oxidasas.

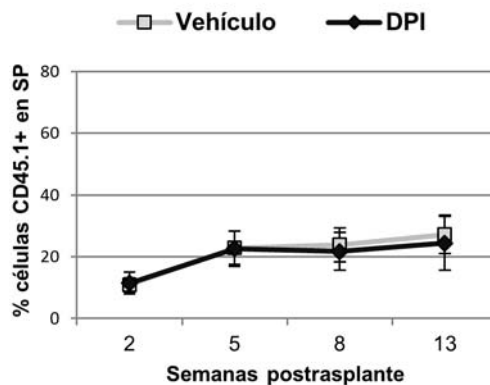


Figura 72- Análisis de la evolución de células CD45.1⁺ tras el segundo modelo de trasplante competitivo de células tratadas con DPI. Evolución del quimerismo de células CD45.1⁺ en sangre periférica a lo largo de 13 semanas tras el trasplante competitivo en el que tratamos tanto células trasplantadas como ratones con vehículo o con DPI. Se representa la media \pm DE (n=8).

Pensamos que estos resultados no implican que esta vía de tratamiento no sea efectiva, sino que sería necesaria la capacidad de actuar de forma mucho más selectiva para evaluar el verdadero potencial de la inhibición de la actividad NADPH oxidásica. Por ello, el desarrollo de inhibidores más específicos de estas enzimas es totalmente indispensable para poder continuar con su investigación.

C
O
N
C
L
U
S
I
O
N
E
S

En base a los resultados obtenidos, podemos concluir que:

1. Las células Lin^- de ratón expresan Nox1, Nox2 y Nox4.
2. La ausencia de p22^{phox} en ratones provoca un aumento de las poblaciones celulares hematopoyéticas más inmaduras, las LT y ST-HSCs.
3. La deficiencia en ratones del gen *Cyba* promueve una mayor generación de células mieloides.
4. La ausencia de p22^{phox} en progenitores linfoides de ratón provoca un defecto en la maduración de linfocitos B.
5. La ausencia de p22^{phox} en ratones estimula la expresión de genes de inmunoglobulinas en etapas más inmaduras de la hematopoyesis. A su vez, estos ratones presentan un aumento de la producción de IgA e IgG.
6. La deficiencia del gen *Cyba* en células hematopoyéticas de ratón reduce la activación de AKT en respuesta a citoquinas y los niveles totales de STAT5, mientras que aumenta los niveles de c-MYC.
7. Tanto las células *Cyba*^{-/-}, como las células *Nox1*^{-/-} y *Cybb*^{-/-} de ratón, presentan ventaja en la capacidad de repoblación hematopoyética tras un trasplante de médula ósea, la cual se mantiene a largo plazo.
8. Las células *Cyba*^{-/-} de ratón reproducen el aumento de las poblaciones más inmaduras tras un trasplante de médula ósea, al menos a corto plazo, y, en parte, también reproducen el sesgo mieloides.
9. Tras un trasplante de médula ósea, las células *Nox4*^{-/-} de ratón generan alteraciones de las poblaciones celulares hematopoyéticas, sobre todo la reducción de poblaciones de HSPCs a largo plazo.

R
E
F
E
R
E
N
C
I
A
S

1. Holland HD. "Volcanic gases, black smokers, and the great oxidation event". *Geochim Cosmochim Acta* 2002;66(21):3811–26.
2. Lyons TW, Reinhard CT, Planavsky NJ. "The rise of oxygen in Earth's early ocean and atmosphere.". *Nature* 2014;506(7488):307–15.
3. Case AJ. "On the Origin of Superoxide Dismutase: An Evolutionary Perspective of Superoxide-Mediated Redox Signaling.". *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 2017;6(4):82.
4. Inupakutika MA, Sengupta S, Devireddy AR, Azad RK, Mittler R. "The evolution of reactive oxygen species metabolism.". *J Exp Bot* 2016;67(21):5933–5943.
5. Hole PS, Darley RL, Tonks A. "Do reactive oxygen species play a role in myeloid leukemias?". *Blood* 2011;117(22):5816–26.
6. Ulrich K, Jakob U. "The role of thiols in antioxidant systems.". *Free Radic Biol Med* 2019;14014–27.
7. Holmgren A, Johansson C, Berndt C, Lönn ME, Hudemann C, Lillig CH. "Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems.". *Biochem Soc Trans* 2005;33(Pt 6):1375–7.
8. Poole LB, Karplus PA, Claiborne A. "Protein sulfenic acids in redox signaling.". *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004;44:325–47.
9. Winterbourn CC. "Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species.". *Nat Chem Biol* 2008;4(5):278–86.
10. Genestra M. "Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants.". *Cell Signal* 2007;19(9):1807–19.
11. Brand MD. "The sites and topology of mitochondrial superoxide production.". *Exp Gerontol* 2010;45(7–8):466–72.
12. Schägger H, Pfeiffer K. "Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria.". *EMBO J* 2000;19(8):1777–83.
13. Guo R, Gu J, Zong S, Wu M, Yang M. "Structure and mechanism of mitochondrial electron transport chain.". *Biomed J* 2018;41(1):9–20.
14. Acín-Pérez R, Fernández-Silva P, Peleato ML, Pérez-Martos A, Enriquez JA. "Respiratory active mitochondrial supercomplexes.". *Mol Cell* 2008;32(4):529–39.
15. Winge DR. "Sealing the mitochondrial respirasome.". *Mol Cell Biol* 2012;32(14):2647–52.
16. Angelova PR, Abramov AY. "Functional role of mitochondrial reactive oxygen species in physiology.". *Free Radic Biol Med* 2016;100:81–85.

17. Bunik VI, Brand MD. "Generation of superoxide and hydrogen peroxide by side reactions of mitochondrial 2-oxoacid dehydrogenase complexes in isolation and in cells.". *Biol Chem* 2018;399(5):407–420.
18. Wong H-S, Dighe PA, Mezera V, Monternier P-A, Brand MD. "Production of superoxide and hydrogen peroxide from specific mitochondrial sites under different bioenergetic conditions.". *J Biol Chem* 2017;292(41):16804–16809.
19. Paravicini TM, Touyz RM. "NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities.". *Diabetes Care* 2008;31 Suppl 2S170-80.
20. Rhee SG, Bae YS, Lee SR, Kwon J. "Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation.". *Sci STKE* 2000;2000(53):pe1.
21. Fu L, Liu K, Sun M, Tian C, Sun R, Morales Betanzos C, Tallman KA, Porter NA, Yang Y, Guo D, Liebler DC, Yang J. "Systematic and Quantitative Assessment of Hydrogen Peroxide Reactivity With Cysteines Across Human Proteomes.". *Mol Cell Proteomics* 2017;16(10):1815–1828.
22. Forman HJ, Ursini F, Maiorino M. "An overview of mechanisms of redox signaling.". *J Mol Cell Cardiol* 2014;732–9.
23. Bonini MG, Consolaro MEL, Hart PC, Mao M, de Abreu ALP, Master AM. "Redox control of enzymatic functions: The electronics of life's circuitry.". *IUBMB Life* 2014;66(3):167–181.
24. Lo Conte M, Carroll KS. "The redox biochemistry of protein sulfenylation and sulfinylation.". *J Biol Chem* 2013;288(37):26480–8.
25. Paulsen CE, Carroll KS. "Cysteine-mediated redox signaling: chemistry, biology, and tools for discovery.". *Chem Rev* 2013;113(7):4633–79.
26. Murata H, Ihara Y, Nakamura H, Yodoi J, Sumikawa K, Kondo T. "Glutaredoxin exerts an antiapoptotic effect by regulating the redox state of Akt.". *J Biol Chem* 2003;278(50):50226–33.
27. Evangelista AM, Thompson MD, Bolotina VM, Tong X, Cohen RA. "Nox4- and Nox2-dependent oxidant production is required for VEGF-induced SERCA cysteine-674 S-glutathiolation and endothelial cell migration.". *Free Radic Biol Med* 2012;53(12):2327–34.
28. Cross J V, Templeton DJ. "Oxidative stress inhibits MEKK1 by site-specific glutathionylation in the ATP-binding domain.". *Biochem J* 2004;381(Pt 3):675–83.
29. Chu F, Ward NE, O'Brian CA. "Potent inactivation of representative members of each PKC isozyme subfamily and PKD via S-thiolation by the tumor-promotion/progression antagonist glutathione but not by its precursor cysteine.".

- Carcinogenesis* 2001;22(8):1221–9.
30. Sardina JL, López-Ruano G, Sánchez-Sánchez B, Llanillo M, Hernández-Hernández A. "Reactive oxygen species: are they important for haematopoiesis?". *Crit Rev Oncol Hematol* 2012;81(3):257–74.
 31. Wood ZA, Poole LB, Karplus PA. "Peroxisredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling.". *Science* 2003;300(5619):650–3.
 32. Drazic A, Winter J. "The physiological role of reversible methionine oxidation.". *Biochim Biophys Acta* 2014;1844(8):1367–82.
 33. Aledo JC. "Methionine in proteins: The Cinderella of the proteinogenic amino acids.". *Protein Sci* 2019;28(10):1785–1796.
 34. Bigelow DJ, Squier TC. "Thioredoxin-dependent redox regulation of cellular signaling and stress response through reversible oxidation of methionines.". *Mol Biosyst* 2011;7(7):2101–9.
 35. Carruthers NJ, Stemmer PM. "Methionine oxidation in the calmodulin-binding domain of calcineurin disrupts calmodulin binding and calcineurin activation.". *Biochemistry* 2008;47(10):3085–95.
 36. Midwinter RG, Cheah F-C, Moskovitz J, Vissers MC, Winterbourn CC. "IkappaB is a sensitive target for oxidation by cell-permeable chloramines: inhibition of NF-kappaB activity by glycine chloramine through methionine oxidation.". *Biochem J* 2006;396(1):71–8.
 37. Nomura T, Kamada R, Ito I, Chuman Y, Shimohigashi Y, Sakaguchi K. "Oxidation of methionine residue at hydrophobic core destabilizes p53 tetrameric structure.". *Biopolymers* 2009;91(1):78–84.
 38. Erickson JR, Joiner MA, Guan X, Kutschke W, Yang J, Oddis C V, Bartlett RK, Lowe JS, O'Donnell SE, Aykin-Burns N, Zimmerman MC, Zimmerman K, Ham A-JL, Weiss RM, Spitz DR, Shea MA, Colbran RJ, Mohler PJ, Anderson ME. "A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation.". *Cell* 2008;133(3):462–74.
 39. Drazic A, Miura H, Peschek J, Le Y, Bach NC, Kriehuber T, Winter J. "Methionine oxidation activates a transcription factor in response to oxidative stress.". *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110(23):9493–8.
 40. Veredas FJ, Cantón FR, Aledo JC. "Methionine residues around phosphorylation sites are preferentially oxidized in vivo under stress conditions.". *Sci Rep* 2017;7:40403.
 41. Hardin SC, Larue CT, Oh M-H, Jain V, Huber SC. "Coupling oxidative signals to protein phosphorylation via methionine oxidation in Arabidopsis.". *Biochem J* 2009;422(2):305–12.

42. Csibi A, Communi D, Müller N, Bottari SP. "Angiotensin II inhibits insulin-stimulated GLUT4 translocation and Akt activation through tyrosine nitration-dependent mechanisms.". *PLoS One* 2010;5(4):e10070.
43. Elsasser TH, Li C-J, Caperna TJ, Kahl S, Schmidt WF. "Growth hormone (GH)-associated nitration of Janus kinase-2 at the 1007Y-1008Y epitope impedes phosphorylation at this site: mechanism for and impact of a GH, AKT, and nitric oxide synthase axis on GH signal transduction.". *Endocrinology* 2007;148(8):3792–802.
44. Yakovlev VA, Barani IJ, Rabender CS, Black SM, Leach JK, Graves PR, Kellogg GE, Mikkelsen RB. "Tyrosine nitration of IkappaBalpha: a novel mechanism for NF-kappaB activation.". *Biochemistry* 2007;46(42):11671–83.
45. Yakovlev VA, Bayden AS, Graves PR, Kellogg GE, Mikkelsen RB. "Nitration of the tumor suppressor protein p53 at tyrosine 327 promotes p53 oligomerization and activation.". *Biochemistry* 2010;49(25):5331–9.
46. Ehrenshaft M, Deterding LJ, Mason RP. "Tripping up Trp: Modification of protein tryptophan residues by reactive oxygen species, modes of detection, and biological consequences.". *Free Radic Biol Med* 2015;89:220–8.
47. Görlach A, Bertram K, Hudecova S, Krizanova O. "Calcium and ROS: A mutual interplay.". *Redox Biol* 2015;6:260–271.
48. Feno S, Butera G, Vecellio Reane D, Rizzuto R, Raffaello A. "Crosstalk between Calcium and ROS in Pathophysiological Conditions.". *Oxid Med Cell Longev* 2019;2019:324018.
49. Zima A V, Blatter LA. "Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters.". *Cardiovasc Res* 2006;71(2):310–21.
50. Hempel N, Trebak M. "Crosstalk between calcium and reactive oxygen species signaling in cancer.". *Cell Calcium* 2017;63:70–96.
51. Yan Y, Wei C, Zhang W, Cheng H, Liu J. "Cross-talk between calcium and reactive oxygen species signaling.". *Acta Pharmacol Sin* 2006;27(7):821–6.
52. Nordzike DE, Medraño-Fernandez I. "The Plasma Membrane: A Platform for Intra- and Intercellular Redox Signaling.". *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 2018;7(11):168.
53. Kawahara T, Quinn MT, Lambeth JD. "Molecular evolution of the reactive oxygen-generating NADPH oxidase (Nox/Duox) family of enzymes.". *BMC Evol Biol* 2007;7:109.
54. Stasia MJ. "CYBA encoding p22(phox), the cytochrome b558 alpha polypeptide: gene structure, expression, role and physiopathology.". *Gene* 2016;586(1):27–35.

55. Bedard K, Krause K-H. "The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology.". *Physiol Rev* 2007;87(1):245–313.
56. Belambri SA, Rolas L, Raad H, Hurtado-Nedelec M, Dang PM-C, El-Benna J. "NADPH oxidase activation in neutrophils: Role of the phosphorylation of its subunits.". *Eur J Clin Invest* 2018;48 Suppl 2e12951.
57. Schröder K, Weissmann N, Brandes RP. "Organizers and activators: Cytosolic Nox proteins impacting on vascular function.". *Free Radic Biol Med* 2017;10922–32.
58. Nisimoto Y, Motalebi S, Han CH, Lambeth JD. "The p67(phox) activation domain regulates electron flow from NADPH to flavin in flavocytochrome b(558)". *J Biol Chem* 1999;274(33):22999–3005.
59. Gianni D, DerMardirossian C, Bokoch GM. "Direct interaction between Tks proteins and the N-terminal proline-rich region (PRR) of NoxA1 mediates Nox1-dependent ROS generation.". *Eur J Cell Biol* 2011;90(2–3):164–71.
60. Wang H, Hartnett ME. "Roles of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADPH) Oxidase in Angiogenesis: Isoform-Specific Effects.". *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 2017;6(2):40.
61. Grasberger H, Refetoff S. "Identification of the maturation factor for dual oxidase. Evolution of an eukaryotic operon equivalent.". *J Biol Chem* 2006;281(27):18269–72.
62. Morand S, Ueyama T, Tsujibe S, Saito N, Korzeniowska A, Leto TL. "Duox maturation factors form cell surface complexes with Duox affecting the specificity of reactive oxygen species generation.". *FASEB J* 2009;23(4):1205–18.
63. Pick E. "Role of the Rho GTPase Rac in the activation of the phagocyte NADPH oxidase: outsourcing a key task.". *Small GTPases* 2014;5e27952.
64. Stanley A, Thompson K, Hynes A, Brakebusch C, Quondamatteo F. "NADPH oxidase complex-derived reactive oxygen species, the actin cytoskeleton, and Rho GTPases in cell migration.". *Antioxid Redox Signal* 2014;20(13):2026–42.
65. Ushio-Fukai M. "Compartmentalization of redox signaling through NADPH oxidase-derived ROS.". *Antioxid Redox Signal* 2009;11(6):1289–99.
66. Hilenski LL, Clempus RE, Quinn MT, Lambeth JD, Griendling KK. "Distinct subcellular localizations of Nox1 and Nox4 in vascular smooth muscle cells.". *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24(4):677–83.
67. Kawahara T, Lambeth JD. "Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate modulates Nox5 localization via an N-terminal polybasic region.". *Mol Biol Cell* 2008;19(10):4020–31.
68. Miller FJ, Filali M, Huss GJ, Stanic B, Chamseddine A, Barna TJ, Lamb FS. "Cytokine activation of nuclear factor kappa B in vascular smooth muscle cells requires

- signaling endosomes containing Nox1 and CIC-3.". *Circ Res* 2007;101(7):663–71.
69. Li Q, Zhang Y, Marden JJ, Banfi B, Engelhardt JF. "Endosomal NADPH oxidase regulates c-Src activation following hypoxia/reoxygenation injury.". *Biochem J* 2008;411(3):531–41.
 70. Oakley FD, Abbott D, Li Q, Engelhardt JF. "Signaling components of redox active endosomes: the redoxosomes.". *Antioxid Redox Signal* 2009;11(6):1313–33.
 71. Ikeda S, Yamaoka-Tojo M, Hilenski L, Patrushev NA, Anwar GM, Quinn MT, Ushio-Fukai M. "IQGAP1 regulates reactive oxygen species-dependent endothelial cell migration through interacting with Nox2.". *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(11):2295–300.
 72. Skonieczna M, Hejmo T, Poterala-Hejmo A, Cieslar-Pobuda A, Buldak RJ. "NADPH Oxidases: Insights into Selected Functions and Mechanisms of Action in Cancer and Stem Cells.". *Oxid Med Cell Longev* 2017;20179420539.
 73. Diaz B, Shani G, Pass I, Anderson D, Quintavalle M, Courtneidge SA. "Tks5-dependent, nox-mediated generation of reactive oxygen species is necessary for invadopodia formation.". *Sci Signal* 2009;2(88):ra53.
 74. Laurindo FRM, Araujo TLS, Abrahão TB. "Nox NADPH oxidases and the endoplasmic reticulum.". *Antioxid Redox Signal* 2014;20(17):2755–75.
 75. Chamulitrat W, Schmidt R, Tomakidi P, Stremmel W, Chunglok W, Kawahara T, Rokutan K. "Association of gp91phox homolog Nox1 with anchorage-independent growth and MAP kinase-activation of transformed human keratinocytes.". *Oncogene* 2003;22(38):6045–53.
 76. Li J-M, Shah AM. "Intracellular localization and preassembly of the NADPH oxidase complex in cultured endothelial cells.". *J Biol Chem* 2002;277(22):19952–60.
 77. Chen K, Kirber MT, Xiao H, Yang Y, Keaney JF. "Regulation of ROS signal transduction by NADPH oxidase 4 localization.". *J Cell Biol* 2008;181(7):1129–39.
 78. Kuroda J, Nakagawa K, Yamasaki T, Nakamura K, Takeya R, Kuribayashi F, Imajoh-Ohmi S, Igarashi K, Shibata Y, Sueishi K, Sumimoto H. "The superoxide-producing NAD(P)H oxidase Nox4 in the nucleus of human vascular endothelial cells.". *Genes Cells* 2005;10(12):1139–51.
 79. Jagnandan D, Church JE, Banfi B, Stuehr DJ, Marrero MB, Fulton DJR. "Novel mechanism of activation of NADPH oxidase 5. Calcium sensitization via phosphorylation.". *J Biol Chem* 2007;282(9):6494–507.
 80. Ahmarani L, Avedanian L, Al-Khoury J, Perreault C, Jacques D, Bkaily G. "Whole-cell and nuclear NADPH oxidases levels and distribution in human endocardial endothelial, vascular smooth muscle, and vascular endothelial cells.". *Can J Physiol Pharmacol* 2013;91(1):71–9.

81. Graham KA, Kulawiec M, Owens KM, Li X, Desouki MM, Chandra D, Singh KK. "NADPH oxidase 4 is an oncoprotein localized to mitochondria.". *Cancer Biol Ther* 2010;10(3):223–31.
82. Shanmugasundaram K, Nayak BK, Friedrichs WE, Kaushik D, Rodriguez R, Block K. "NOX4 functions as a mitochondrial energetic sensor coupling cancer metabolic reprogramming to drug resistance.". *Nat Commun* 2017;8(1):997.
83. Urao N, Inomata H, Razvi M, Kim HW, Wary K, McKinney R, Fukai T, Ushio-Fukai M. "Role of nox2-based NADPH oxidase in bone marrow and progenitor cell function involved in neovascularization induced by hindlimb ischemia.". *Circ Res* 2008;103(2):212–20.
84. Dale DC, Boxer L, Liles WC. "The phagocytes: neutrophils and monocytes.". *Blood* 2008;112(4):935–45.
85. Soehnlein O, Lindbom L. "Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation.". *Nat Rev Immunol* 2010;10(6):427–39.
86. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. "Neutrophil extracellular traps kill bacteria.". *Science* 2004;303(5663):1532–5.
87. Kotsias F, Hoffmann E, Amigorena S, Savina A. "Reactive oxygen species production in the phagosome: impact on antigen presentation in dendritic cells.". *Antioxid Redox Signal* 2013;18(6):714–29.
88. Burtenshaw D, Hakimjavadi R, Redmond EM, Cahill PA. "Nox, Reactive Oxygen Species and Regulation of Vascular Cell Fate.". *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 2017;6(4):90.
89. Ushio-Fukai M, Nakamura Y. "Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy.". *Cancer Lett* 2008;266(1):37–52.
90. Li N, Li B, Brun T, Deffert-Delbouille C, Mahiout Z, Daali Y, Ma X-J, Krause K-H, Maechler P. "NADPH oxidase NOX2 defines a new antagonistic role for reactive oxygen species and cAMP/PKA in the regulation of insulin secretion.". *Diabetes* 2012;61(11):2842–50.
91. Prosser BL, Ward CW, Lederer WJ. "X-ROS signaling: rapid mechano-chemo transduction in heart.". *Science* 2011;333(6048):1440–5.
92. Kishida KT, Hoeffler CA, Hu D, Pao M, Holland SM, Klann E. "Synaptic plasticity deficits and mild memory impairments in mouse models of chronic granulomatous disease.". *Mol Cell Biol* 2006;26(15):5908–20.
93. Kang X, Wei X, Wang X, Jiang L, Niu C, Zhang J, Chen S, Meng D. "Nox2 contributes to the arterial endothelial specification of mouse induced pluripotent stem cells by upregulating Notch signaling.". *Sci Rep* 2016;6:33737.

94. Henrickson SE, Jongco AM, Thomsen KF, Garabedian EK, Thomsen IP. "Noninfectious Manifestations and Complications of Chronic Granulomatous Disease." *J Pediatric Infect Dis Soc* 2018;7(suppl_1):S18–S24.
95. Zhang W-J, Wei H, Tien Y-T, Frei B. "Genetic ablation of phagocytic NADPH oxidase in mice limits TNF α -induced inflammation in the lungs but not other tissues." *Free Radic Biol Med* 2011;50(11):1517–25.
96. Lambeth JD. "Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy." *Free Radic Biol Med* 2007;43(3):332–47.
97. Dohi K, Ohtaki H, Nakamachi T, Yofu S, Satoh K, Miyamoto K, Song D, Tsunawaki S, Shioda S, Aruga T. "Gp91phox (NOX2) in classically activated microglia exacerbates traumatic brain injury." *J Neuroinflammation* 2010;741.
98. Surace MJ, Block ML. "Targeting microglia-mediated neurotoxicity: the potential of NOX2 inhibitors." *Cell Mol Life Sci* 2012;69(14):2409–27.
99. Nayernia Z, Jaquet V, Krause K-H. "New insights on NOX enzymes in the central nervous system." *Antioxid Redox Signal* 2014;20(17):2815–37.
100. Bianca VD, Dusi S, Bianchini E, Dal Prà I, Rossi F. "beta-amyloid activates the O-2 forming NADPH oxidase in microglia, monocytes, and neutrophils. A possible inflammatory mechanism of neuronal damage in Alzheimer's disease." *J Biol Chem* 1999;274(22):15493–9.
101. Ansari MA, Scheff SW. "NADPH-oxidase activation and cognition in Alzheimer disease progression." *Free Radic Biol Med* 2011;51(1):171–8.
102. Wu D-C, Teismann P, Tieu K, Vila M, Jackson-Lewis V, Ischiropoulos H, Przedborski S. "NADPH oxidase mediates oxidative stress in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(10):6145–50.
103. Bendall JK, Cave AC, Heymes C, Gall N, Shah AM. "Pivotal role of a gp91(phox)-containing NADPH oxidase in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in mice." *Circulation* 2002;105(3):293–6.
104. Diebold BA, Smith SME, Li Y, Lambeth JD. "NOX2 As a Target for Drug Development: Indications, Possible Complications, and Progress." *Antioxid Redox Signal* 2015;23(5):375–405.
105. Corzo CA, Cotter MJ, Cheng P, Cheng F, Kusmartsev S, Sotomayor E, Padhya T, McCaffrey T V, McCaffrey JC, Gabrilovich DI. "Mechanism regulating reactive oxygen species in tumor-induced myeloid-derived suppressor cells." *J Immunol* 2009;182(9):5693–701.
106. Caillou B, Talbot M, Weyemi U, Pioche-Durieu C, Al Ghuzlan A, Bidart JM, Chouaib S, Schlumberger M, Dupuy C. "Tumor-associated macrophages (TAMs)

- form an interconnected cellular supportive network in anaplastic thyroid carcinoma.". *PLoS One* 2011;6(7):e22567.
107. Wilcox CS. "Oxidative stress and nitric oxide deficiency in the kidney: a critical link to hypertension?". *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;289(4):R913-35.
 108. Yuan H, Zhang X, Huang X, Lu Y, Tang W, Man Y, Wang S, Xi J, Li J. "NADPH oxidase 2-derived reactive oxygen species mediate FFAs-induced dysfunction and apoptosis of β -cells via JNK, p38 MAPK and p53 pathways.". *PLoS One* 2010;5(12):e15726.
 109. Asaba K, Tojo A, Onozato ML, Goto A, Quinn MT, Fujita T, Wilcox CS. "Effects of NADPH oxidase inhibitor in diabetic nephropathy.". *Kidney Int* 2005;67(5):1890-8.
 110. Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, Chung AB, Griendling KK, Lambeth JD. "Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1.". *Nature* 1999;401(6748):79-82.
 111. Gianni D, Diaz B, Taulet N, Fowler B, Courtneidge SA, Bokoch GM. "Novel p47(phox)-related organizers regulate localized NADPH oxidase 1 (Nox1) activity.". *Sci Signal* 2009;2(88):ra54.
 112. Miller FJ, Chu X, Stanic B, Tian X, Sharma R V, Davisson RL, Lamb FS. "A differential role for endocytosis in receptor-mediated activation of Nox1.". *Antioxid Redox Signal* 2010;12(5):583-93.
 113. Gimenez M, Schickling BM, Lopes LR, Miller FJ. "Nox1 in cardiovascular diseases: regulation and pathophysiology.". *Clin Sci (Lond)* 2016;130(3):151-65.
 114. Kim G-Y, Lee J-W, Ryu H-C, Wei J-D, Seong C-M, Kim J-H. "Proinflammatory cytokine IL-1 β stimulates IL-8 synthesis in mast cells via a leukotriene B4 receptor 2-linked pathway, contributing to angiogenesis.". *J Immunol* 2010;184(7):3946-54.
 115. Goyal P, Weissmann N, Grimminger F, Hegel C, Bader L, Rose F, Fink L, Ghofrani HA, Schermuly RT, Schmidt HHHW, Seeger W, Hänze J. "Upregulation of NAD(P)H oxidase 1 in hypoxia activates hypoxia-inducible factor 1 via increase in reactive oxygen species.". *Free Radic Biol Med* 2004;36(10):1279-88.
 116. Coant N, Ben Mkaddem S, Pedruzzi E, Guichard C, Tréton X, Ducroc R, Freund J-N, Cazals-Hatem D, Bouhnik Y, Woerther P-L, Skurnik D, Grodet A, Fay M, Biard D, Lesuffleur T, Deffert C, Moreau R, Groyer A, Krause K-H, Daniel F, Ogier-Denis E. "NADPH oxidase 1 modulates WNT and NOTCH1 signaling to control the fate of proliferative progenitor cells in the colon.". *Mol Cell Biol* 2010;30(11):2636-50.
 117. Ibi M, Katsuyama M, Fan C, Iwata K, Nishinaka T, Yokoyama T, Yabe-Nishimura C. "NOX1/NADPH oxidase negatively regulates nerve growth factor-induced neurite outgrowth.". *Free Radic Biol Med* 2006;40(10):1785-95.

118. Ibi M, Matsuno K, Shiba D, Katsuyama M, Iwata K, Kakehi T, Nakagawa T, Sango K, Shirai Y, Yokoyama T, Kaneko S, Saito N, Yabe-Nishimura C. "Reactive oxygen species derived from NOX1/NADPH oxidase enhance inflammatory pain.". *J Neurosci* 2008;28(38):9486–94.
119. Ibi M, Matsuno K, Matsumoto M, Sasaki M, Nakagawa T, Katsuyama M, Iwata K, Zhang J, Kaneko S, Yabe-Nishimura C. "Involvement of NOX1/NADPH oxidase in morphine-induced analgesia and tolerance.". *J Neurosci* 2011;31(49):18094–103.
120. Meng QR, Gideon KM, Harbo SJ, Renne RA, Lee MK, Brys AM, Jones R. "Gene expression profiling in lung tissues from mice exposed to cigarette smoke, lipopolysaccharide, or smoke plus lipopolysaccharide by inhalation.". *Inhal Toxicol* 2006;18(8):555–68.
121. Liu F, Gomez Garcia AM, Meyskens FL. "NADPH oxidase 1 overexpression enhances invasion via matrix metalloproteinase-2 and epithelial-mesenchymal transition in melanoma cells.". *J Invest Dermatol* 2012;132(8):2033–41.
122. Choi D-H, Cristóvão AC, Guhathakurta S, Lee J, Joh TH, Beal MF, Kim Y-S. "NADPH oxidase 1-mediated oxidative stress leads to dopamine neuron death in Parkinson's disease.". *Antioxid Redox Signal* 2012;16(10):1033–45.
123. Cristóvão AC, Guhathakurta S, Bok E, Je G, Yoo SD, Choi D-H, Kim Y-S. "NADPH oxidase 1 mediates α -synucleinopathy in Parkinson's disease.". *J Neurosci* 2012;32(42):14465–77.
124. Cheng G, Ritsick D, Lambeth JD. "Nox3 regulation by NOXO1, p47phox, and p67phox.". *J Biol Chem* 2004;279(33):34250–5.
125. Paffenholz R, Bergstrom RA, Pasutto F, Wabnitz P, Munroe RJ, Jagla W, Heinzmann U, Marquardt A, Bareiss A, Laufs J, Russ A, Stumm G, Schimenti JC, Bergstrom DE. "Vestibular defects in head-tilt mice result from mutations in Nox3, encoding an NADPH oxidase.". *Genes Dev* 2004;18(5):486–91.
126. Nakano Y, Longo-Guess CM, Bergstrom DE, Nauseef WM, Jones SM, Bánfi B. "Mutation of the Cyba gene encoding p22phox causes vestibular and immune defects in mice.". *J Clin Invest* 2008;118(3):1176–85.
127. Kiss PJ, Knisz J, Zhang Y, Baltrusaitis J, Sigmund CD, Thalmann R, Smith RJH, Verpy E, Bánfi B. "Inactivation of NADPH oxidase organizer 1 results in severe imbalance.". *Curr Biol* 2006;16(2):208–13.
128. Flaherty JP, Spruce CA, Fairfield HE, Bergstrom DE. "Generation of a conditional null allele of NADPH oxidase activator 1 (NOXA1)". *Genesis* 2010;48(9):568–75.
129. Carnesecchi S, Carpentier J-L, Foti M, Szanto I. "Insulin-induced vascular endothelial growth factor expression is mediated by the NADPH oxidase NOX3.". *Exp Cell Res* 2006;312(17):3413–24.

130. Morimoto H, Kanatsu-Shinohara M, Shinohara T. "ROS-Generating Oxidase Nox3 Regulates the Self-Renewal of Mouse Spermatogonial Stem Cells.". *Biol Reprod* 2015;92(6):147.
131. Yin C, Li K, Yu Y, Huang H, Yu Y, Wang Z, Yan J, Pu Y, Li Z, Li D, Chen P, Chen F. "Genome-wide association study identifies loci and candidate genes for non-idiopathic pulmonary hypertension in Eastern Chinese Han population.". *BMC Pulm Med* 2018;18(1):158.
132. Zhang X, Shan P, Jiang G, Cohn L, Lee PJ. "Toll-like receptor 4 deficiency causes pulmonary emphysema.". *J Clin Invest* 2006;116(11):3050–9.
133. Gao D, Nong S, Huang X, Lu Y, Zhao H, Lin Y, Man Y, Wang S, Yang J, Li J. "The effects of palmitate on hepatic insulin resistance are mediated by NADPH Oxidase 3-derived reactive oxygen species through JNK and p38MAPK pathways.". *J Biol Chem* 2010;285(39):29965–73.
134. de la Monte SM, Wands JR. "Molecular indices of oxidative stress and mitochondrial dysfunction occur early and often progress with severity of Alzheimer's disease.". *J Alzheimers Dis* 2006;9(2):167–81.
135. Rivera EJ, Goldin A, Fulmer N, Tavares R, Wands JR, de la Monte SM. "Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: link to brain reductions in acetylcholine.". *J Alzheimers Dis* 2005;8(3):247–68.
136. Geiszt M, Kopp JB, Várnai P, Leto TL. "Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney.". *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(14):8010–4.
137. Katsuyama M. "NOX/NADPH oxidase, the superoxide-generating enzyme: its transcriptional regulation and physiological roles.". *J Pharmacol Sci* 2010;114(2):134–46.
138. Datla SR, McGrail DJ, Vukelic S, Huff LP, Lyle AN, Pounkova L, Lee M, Seidel-Rogol B, Khalil MK, Hilenski LL, Terada LS, Dawson MR, Lassègue B, Griendling KK. "Poldip2 controls vascular smooth muscle cell migration by regulating focal adhesion turnover and force polarization.". *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2014;307(7):H945-57.
139. Desai LP, Zhou Y, Estrada A V, Ding Q, Cheng G, Collawn JF, Thannickal VJ. "Negative regulation of NADPH oxidase 4 by hydrogen peroxide-inducible clone 5 (Hic-5) protein.". *J Biol Chem* 2014;289(26):18270–8.
140. Buvelot H, Jaquet V, Krause K-H. "Mammalian NADPH Oxidases.". *Methods Mol Biol* 2019;198217–36.
141. Takac I, Schröder K, Zhang L, Lardy B, Anilkumar N, Lambeth JD, Shah AM, Morel F, Brandes RP. "The E-loop is involved in hydrogen peroxide formation by the

- NADPH oxidase Nox4". *J Biol Chem* 2011;286(15):13304–13.
142. Nisimoto Y, Diebold BA, Cosentino-Gomes D, Lambeth JD. "Nox4: a hydrogen peroxide-generating oxygen sensor." *Biochemistry* 2014;53(31):5111–20.
 143. Guo S, Chen X. "The human Nox4: gene, structure, physiological function and pathological significance." *J Drug Target* 2015;23(10):888–96.
 144. Goldstein BJ, Mahadev K, Wu X, Zhu L, Motoshima H. "Role of insulin-induced reactive oxygen species in the insulin signaling pathway." *Antioxid Redox Signal* 2005;7(7–8):1021–31.
 145. Hecker L, Vittal R, Jones T, Jagirdar R, Luckhardt TR, Horowitz JC, Pennathur S, Martinez FJ, Thannickal VJ. "NADPH oxidase-4 mediates myofibroblast activation and fibrogenic responses to lung injury." *Nat Med* 2009;15(9):1077–81.
 146. Goettsch C, Babelova A, Trummer O, Erben RG, Rauner M, Rammelt S, Weissmann N, Weinberger V, Benkhoff S, Kampschulte M, Obermayer-Pietsch B, Hofbauer LC, Brandes RP, Schröder K. "NADPH oxidase 4 limits bone mass by promoting osteoclastogenesis." *J Clin Invest* 2013;123(11):4731–8.
 147. Craige SM, Kant S, Reif M, Chen K, Pei Y, Angoff R, Sugamura K, Fitzgibbons T, Keaney JF. "Endothelial NADPH oxidase 4 protects ApoE^{-/-} mice from atherosclerotic lesions." *Free Radic Biol Med* 2015;891–7.
 148. Sutcliffe A, Hollins F, Gomez E, Saunders R, Doe C, Cooke M, Challiss RAJ, Brightling CE. "Increased nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 4 expression mediates intrinsic airway smooth muscle hypercontractility in asthma." *Am J Respir Crit Care Med* 2012;185(3):267–74.
 149. Brar SS, Kennedy TP, Sturrock AB, Huecksteadt TP, Quinn MT, Whorton AR, Hoidal JR. "An NAD(P)H oxidase regulates growth and transcription in melanoma cells." *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;282(6):C1212-24.
 150. Cheng G, Cao Z, Xu X, van Meir EG, Lambeth JD. "Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5." *Gene* 2001;269(1–2):131–40.
 151. Yu MO, Park K-J, Park D-H, Chung Y-G, Chi S-G, Kang S-H. "Reactive oxygen species production has a critical role in hypoxia-induced Stat3 activation and angiogenesis in human glioblastoma." *J Neurooncol* 2015;125(1):55–63.
 152. Chang G, Chen L, Lin H-M, Lin Y, Maranchie JK. "Nox4 inhibition enhances the cytotoxicity of cisplatin in human renal cancer cells." *J Exp Ther Oncol* 2012;10(1):9–18.
 153. Yu X-J, Zhang D-M, Jia L-L, Qi J, Song X-A, Tan H, Cui W, Chen W, Zhu G-Q, Qin D-N, Kang Y-M. "Inhibition of NF- κ B activity in the hypothalamic paraventricular nucleus attenuates hypertension and cardiac hypertrophy by modulating cytokines and attenuating oxidative stress." *Toxicol Appl Pharmacol* 2015;284(3):315–22.

154. Huetsch JC, Suresh K, Shimoda LA. "Regulation of Smooth Muscle Cell Proliferation by NADPH Oxidases in Pulmonary Hypertension.". *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 2019;8(3):56.
155. Gorin Y, Block K, Hernandez J, Bhandari B, Wagner B, Barnes JL, Abboud HE. "Nox4 NAD(P)H oxidase mediates hypertrophy and fibronectin expression in the diabetic kidney.". *J Biol Chem* 2005;280(47):39616–26.
156. Tirone F, Cox JA. "NADPH oxidase 5 (NOX5) interacts with and is regulated by calmodulin.". *FEBS Lett* 2007;581(6):1202–8.
157. Pandey D, Gratton J-P, Rafikov R, Black SM, Fulton DJR. "Calcium/calmodulin-dependent kinase II mediates the phosphorylation and activation of NADPH oxidase 5.". *Mol Pharmacol* 2011;80(3):407–15.
158. Yu P, Han W, Villar VAM, Yang Y, Lu Q, Lee H, Li F, Quinn MT, Gildea JJ, Felder RA, Jose PA. "Unique role of NADPH oxidase 5 in oxidative stress in human renal proximal tubule cells.". *Redox Biol* 2014;2570–9.
159. Ghanbari H, Keshtgar S, Kazeroni M. "Inhibition of the CatSper Channel and NOX5 Enzyme Activity Affects the Functions of the Progesterone-Stimulated Human Sperm.". *Iran J Med Sci* 2018;43(1):18–25.
160. Manuneechi Cholan P, Cartland SP, Kavurma MM. "NADPH Oxidases, Angiogenesis, and Peripheral Artery Disease.". *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 2017;6(3):56.
161. Montezano AC, Tsiropoulou S, Dulak-Lis M, Harvey A, Camargo LDL, Touyz RM. "Redox signaling, Nox5 and vascular remodeling in hypertension.". *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2015;24(5):425–33.
162. Guzik TJ, Chen W, Gongora MC, Guzik B, Lob HE, Mangalat D, Hoch N, Dikalov S, Rudzinski P, Kapelak B, Sadowski J, Harrison DG. "Calcium-dependent NOX5 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase contributes to vascular oxidative stress in human coronary artery disease.". *J Am Coll Cardiol* 2008;52(22):1803–9.
163. Manea A, Manea S-A, Gan AM, Constantin A, Fenyo IM, Raicu M, Muresian H, Simionescu M. "Human monocytes and macrophages express NADPH oxidase 5; a potential source of reactive oxygen species in atherosclerosis.". *Biochem Biophys Res Commun* 2015;461(1):172–9.
164. Bedard K, Jaquet V, Krause K-H. "NOX5: from basic biology to signaling and disease.". *Free Radic Biol Med* 2012;52(4):725–34.
165. Fu X, Beer DG, Behar J, Wands J, Lambeth D, Cao W. "cAMP-response element-binding protein mediates acid-induced NADPH oxidase NOX5-S expression in Barrett esophageal adenocarcinoma cells.". *J Biol Chem* 2006;281(29):20368–82.

166. Brar SS, Corbin Z, Kennedy TP, Hemendinger R, Thornton L, Bommarius B, Arnold RS, Whorton AR, Sturrock AB, Huecksteadt TP, Quinn MT, Krenitsky K, Ardie KG, Lambeth JD, Hoidal JR. "NOX5 NAD(P)H oxidase regulates growth and apoptosis in DU 145 prostate cancer cells.". *Am J Physiol Cell Physiol* 2003;285(2):C353-69.
167. Juhasz A, Ge Y, Markel S, Chiu A, Matsumoto L, van Balgooy J, Roy K, Doroshow JH. "Expression of NADPH oxidase homologues and accessory genes in human cancer cell lines, tumours and adjacent normal tissues.". *Free Radic Res* 2009;43(6):523-32.
168. Antony S, Wu Y, Hewitt SM, Anver MR, Butcher D, Jiang G, Meitzler JL, Liu H, Juhasz A, Lu J, Roy KK, Doroshow JH. "Characterization of NADPH oxidase 5 expression in human tumors and tumor cell lines with a novel mouse monoclonal antibody.". *Free Radic Biol Med* 2013;65:497-508.
169. Kamiguti AS, Serrander L, Lin K, Harris RJ, Cawley JC, Allsup DJ, Slupsky JR, Krause K-H, Zuzel M. "Expression and activity of NOX5 in the circulating malignant B cells of hairy cell leukemia.". *J Immunol* 2005;175(12):8424-30.
170. Höll M, Koziel R, Schäfer G, Pircher H, Pauck A, Hermann M, Klocker H, Jansen-Dürr P, Sampson N. "ROS signaling by NADPH oxidase 5 modulates the proliferation and survival of prostate carcinoma cells.". *Mol Carcinog* 2016;55(1):27-39.
171. Holterman CE, Thibodeau J-F, Towajj C, Gutsol A, Montezano AC, Parks RJ, Cooper ME, Touyz RM, Kennedy CRJ. "Nephropathy and elevated BP in mice with podocyte-specific NADPH oxidase 5 expression.". *J Am Soc Nephrol* 2014;25(4):784-97.
172. Jha JC, Banal C, Okabe J, Gray SP, Hettige T, Chow BSM, Thallas-Bonke V, De Vos L, Holterman CE, Coughlan MT, Power DA, Skene A, Ekinci EI, Cooper ME, Touyz RM, Kennedy CR, Jandeleit-Dahm K. "NADPH Oxidase Nox5 Accelerates Renal Injury in Diabetic Nephropathy.". *Diabetes* 2017;66(10):2691-2703.
173. Dupuy C, Ohayon R, Valent A, Noël-Hudson MS, Dème D, Virion A. "Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cdnas.". *J Biol Chem* 1999;274(52):37265-9.
174. De Deken X, Wang D, Many MC, Costagliola S, Libert F, Vassart G, Dumont JE, Miot F. "Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family.". *J Biol Chem* 2000;275(30):23227-33.
175. Pfarr N, Korsch E, Kaspers S, Herbst A, Stach A, Zimmer C, Pohlenz J. "Congenital hypothyroidism caused by new mutations in the thyroid oxidase 2 (THOX2) gene.". *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006;65(6):810-5.
176. Edens WA, Sharling L, Cheng G, Shapira R, Kinkade JM, Lee T, Edens HA, Tang X, Sullards C, Flaherty DB, Benian GM, Lambeth JD. "Tyrosine cross-linking of

- extracellular matrix is catalyzed by Duox, a multidomain oxidase/oxidoreductase with homology to the phagocyte oxidase subunit gp91phox." *J Cell Biol* 2001;154(4):879–91.
177. Geiszt M, Witta J, Baffi J, Lekstrom K, Leto TL. "Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense." *FASEB J* 2003;17(11):1502–4.
178. Harper RW, Xu C, Eiserich JP, Chen Y, Kao C-Y, Thai P, Setiadi H, Wu R. "Differential regulation of dual NADPH oxidases/oxidoreductases, Duox1 and Duox2, by Th1 and Th2 cytokines in respiratory tract epithelium." *FEBS Lett* 2005;579(21):4911–7.
179. Hristova M, Habibovic A, Veith C, Janssen-Heininger YMW, Dixon AE, Geiszt M, van der Vliet A. "Airway epithelial dual oxidase 1 mediates allergen-induced IL-33 secretion and activation of type 2 immune responses." *J Allergy Clin Immunol* 2016;137(5):1545-1556.e11.
180. Pongnimitprasert N, Hurtado M, Lamari F, El Benna J, Dupuy C, Fay M, Foglietti M-J, Bernard M, Gougerot-Pocidallo M-A, Braut-Boucher F. "Implication of NADPH oxidases in the early inflammation process generated by cystic fibrosis cells." *ISRN Inflamm* 2012;2012481432.
181. Luxen S, Belinsky SA, Knaus UG. "Silencing of DUOX NADPH oxidases by promoter hypermethylation in lung cancer." *Cancer Res* 2008;68(4):1037–45.
182. Pulcrano M, Boukheris H, Talbot M, Caillou B, Dupuy C, Virion A, De Vathaire F, Schlumberger M. "Poorly differentiated follicular thyroid carcinoma: prognostic factors and relevance of histological classification." *Thyroid* 2007;17(7):639–46.
183. Till JE, McCulloch EA. "A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells." *Radiat Res* 1961;14213–22.
184. Kondo M, Weissman IL, Akashi K. "Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow." *Cell* 1997;91(5):661–72.
185. Morrison SJ, Wandycz AM, Hemmati HD, Wright DE, Weissman IL. "Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors." *Development* 1997;124(10):1929–39.
186. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. "A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages." *Nature* 2000;404(6774):193–7.
187. Manz MG, Miyamoto T, Akashi K, Weissman IL. "Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(18):11872–7.
188. Bao EL, Cheng AN, Sankaran VG. "The genetics of human hematopoiesis and its disruption in disease." *EMBO Mol Med* 2019;11(8):e10316.

189. Wilson A, Laurenti E, Oser G, van der Wath RC, Blanco-Bose W, Jaworski M, Offner S, Dunant CF, Eshkind L, Bockamp E, Lió P, Macdonald HR, Trumpp A. "Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair.". *Cell* 2008;135(6):1118–29.
190. Sanjuan-Pla A, Macaulay IC, Jensen CT, Woll PS, Luis TC, Mead A, Moore S, Carella C, Matsuoka S, Bouriez Jones T, Chowdhury O, Stenson L, Lutteropp M, Green JCA, Facchini R, Boukarabila H, Grover A, Gambardella A, Thongjuea S, Carrelha J, Tarrant P, Atkinson D, Clark S-A, Nerlov C, Jacobsen SEW. "Platelet-biased stem cells reside at the apex of the haematopoietic stem-cell hierarchy.". *Nature* 2013;502(7470):232–6.
191. Yamamoto R, Morita Y, Ooehara J, Hamanaka S, Onodera M, Rudolph KL, Ema H, Nakauchi H. "Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells.". *Cell* 2013;154(5):1112–1126.
192. Carrelha J, Meng Y, Kettyle LM, Luis TC, Norfo R, Alcolea V, Boukarabila H, Grasso F, Gambardella A, Grover A, Högstrand K, Lord AM, Sanjuan-Pla A, Woll PS, Nerlov C, Jacobsen SEW. "Hierarchically related lineage-restricted fates of multipotent haematopoietic stem cells.". *Nature* 2018;554(7690):106–111.
193. Pietras EM, Reynaud D, Kang Y-A, Carlin D, Calero-Nieto FJ, Leavitt AD, Stuart JM, Göttgens B, Passegué E. "Functionally Distinct Subsets of Lineage-Biased Multipotent Progenitors Control Blood Production in Normal and Regenerative Conditions.". *Cell Stem Cell* 2015;17(1):35–46.
194. Buenrostro JD, Corces MR, Lareau CA, Wu B, Schep AN, Aryee MJ, Majeti R, Chang HY, Greenleaf WJ. "Integrated Single-Cell Analysis Maps the Continuous Regulatory Landscape of Human Hematopoietic Differentiation.". *Cell* 2018;173(6):1535-1548.e16.
195. Velten L, Haas SF, Raffel S, Blaszkiewicz S, Islam S, Hennig BP, Hirche C, Lutz C, Buss EC, Nowak D, Boch T, Hofmann W-K, Ho AD, Huber W, Trumpp A, Essers MAG, Steinmetz LM. "Human haematopoietic stem cell lineage commitment is a continuous process.". *Nat Cell Biol* 2017;19(4):271–281.
196. Brown G, Ceredig R. "Modeling the Hematopoietic Landscape.". *Front cell Dev Biol* 2019;7104.
197. Karamitros D, Stoilova B, Aboukhalil Z, Hamey F, Reinisch A, Samitsch M, Quek L, Otto G, Repapi E, Doondeea J, Usukhbayar B, Calvo J, Taylor S, Goardon N, Six E, Pflumio F, Porcher C, Majeti R, Göttgens B, Vyas P. "Single-cell analysis reveals the continuum of human lympho-myeloid progenitor cells.". *Nat Immunol* 2018;19(1):85–97.
198. Sun J, Ramos A, Chapman B, Johnnidis JB, Le L, Ho Y-J, Klein A, Hofmann O, Camargo FD. "Clonal dynamics of native haematopoiesis.". *Nature*

- 2014;514(7522):322–7.
199. Busch K, Klapproth K, Barile M, Flossdorf M, Holland-Letz T, Schlenner SM, Reth M, Höfer T, Rodewald H-R. "Fundamental properties of unperturbed haematopoiesis from stem cells in vivo.". *Nature* 2015;518(7540):542–6.
 200. Sawai CM, Babovic S, Upadhaya S, Knapp DJHF, Lavin Y, Lau CM, Goloborodko A, Feng J, Fujisaki J, Ding L, Mirny LA, Merad M, Eaves CJ, Reizis B. "Hematopoietic Stem Cells Are the Major Source of Multilineage Hematopoiesis in Adult Animals.". *Immunity* 2016;45(3):597–609.
 201. Cao Y, Fang Y, Cai J, Li X, Xu F, Yuan N, Zhang S, Wang J. "ROS functions as an upstream trigger for autophagy to drive hematopoietic stem cell differentiation.". *Hematology* 2016;21(10):613–618.
 202. Halvarsson C, Rörby E, Eliasson P, Lang S, Soneji S, Jönsson J-I. "Putative Role of Nuclear Factor-Kappa B But Not Hypoxia-Inducible Factor-1 α in Hypoxia-Dependent Regulation of Oxidative Stress in Hematopoietic Stem and Progenitor Cells.". *Antioxid Redox Signal* 2019;31(3):211–226.
 203. Ito K, Hirao A, Arai F, Matsuoka S, Takubo K, Hamaguchi I, Nomiyama K, Hosokawa K, Sakurada K, Nakagata N, Ikeda Y, Mak TW, Suda T. "Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells.". *Nature* 2004;431(7011):997–1002.
 204. Ito K, Hirao A, Arai F, Takubo K, Matsuoka S, Miyamoto K, Ohmura M, Naka K, Hosokawa K, Ikeda Y, Suda T. "Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells.". *Nat Med* 2006;12(4):446–51.
 205. Chen C, Liu Y, Liu R, Ikenoue T, Guan K-L, Liu Y, Zheng P. "TSC-mTOR maintains quiescence and function of hematopoietic stem cells by repressing mitochondrial biogenesis and reactive oxygen species.". *J Exp Med* 2008;205(10):2397–408.
 206. Jang Y-Y, Sharkis SJ. "A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche.". *Blood* 2007;110(8):3056–63.
 207. Juntilla MM, Patil VD, Calamito M, Joshi RP, Birnbaum MJ, Koretzky GA. "AKT1 and AKT2 maintain hematopoietic stem cell function by regulating reactive oxygen species.". *Blood* 2010;115(20):4030–8.
 208. Tothova Z, Gilliland DG. "FoxO transcription factors and stem cell homeostasis: insights from the hematopoietic system.". *Cell Stem Cell* 2007;1(2):140–52.
 209. Hu L, Zhang Y, Miao W, Cheng T. "Reactive Oxygen Species and Nrf2: Functional and Transcriptional Regulators of Hematopoiesis.". *Oxid Med Cell Longev* 2019;20195153268.
 210. Parmar K, Mauch P, Vergilio J-A, Sackstein R, Down JD. "Distribution of

- hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia.". *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(13):5431–6.
211. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, Martin RP, Schipani E, Divieti P, Bringhurst FR, Milner LA, Kronenberg HM, Scadden DT. "Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche.". *Nature* 2003;425(6960):841–6.
 212. Spencer JA, Ferraro F, Roussakis E, Klein A, Wu J, Runnels JM, Zaher W, Mortensen LJ, Alt C, Turcotte R, Yusuf R, Côté D, Vinogradov SA, Scadden DT, Lin CP. "Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals.". *Nature* 2014;508(7495):269–73.
 213. Ding L, Saunders TL, Enikolopov G, Morrison SJ. "Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells.". *Nature* 2012;481(7382):457–62.
 214. Morrison SJ, Scadden DT. "The bone marrow niche for haematopoietic stem cells.". *Nature* 2014;505(7483):327–34.
 215. Itkin T, Gur-Cohen S, Spencer JA, Schajnovitz A, Ramasamy SK, Kusumbe AP, Ledergor G, Jung Y, Milo I, Poulos MG, Kalinkovich A, Ludin A, Golan K, Khatib E, Kumari A, Kollet O, Shakhar G, Butler JM, Rafii S, Adams RH, Scadden DT, Lin CP, Lapidot T. "Distinct bone marrow blood vessels differentially regulate haematopoiesis.". *Nature* 2016;532(7599):323–8.
 216. Fan J, Cai H, Tan W-S. "Role of the plasma membrane ROS-generating NADPH oxidase in CD34+ progenitor cells preservation by hypoxia.". *J Biotechnol* 2007;130(4):455–62.
 217. Kim J, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang C V. "HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia.". *Cell Metab* 2006;3(3):177–85.
 218. Wheaton WW, Chandel NS. "Hypoxia. 2. Hypoxia regulates cellular metabolism.". *Am J Physiol Cell Physiol* 2011;300(3):C385-93.
 219. Mantel CR, O'Leary HA, Chitteti BR, Huang X, Cooper S, Hangoc G, Brustovetsky N, Srour EF, Lee MR, Messina-Graham S, Haas DM, Falah N, Kapur R, Pelus LM, Bardeesy N, Fitamant J, Ivan M, Kim K-S, Broxmeyer HE. "Enhancing Hematopoietic Stem Cell Transplantation Efficacy by Mitigating Oxygen Shock.". *Cell* 2015;161(7):1553–65.
 220. Taniguchi Ishikawa E, Gonzalez-Nieto D, Ghiaur G, Dunn SK, Ficker AM, Murali B, Madhu M, Gutstein DE, Fishman GI, Barrio LC, Cancelas JA. "Connexin-43 prevents hematopoietic stem cell senescence through transfer of reactive oxygen species to bone marrow stromal cells.". *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109(23):9071–6.

221. Valle-Prieto A, Conget PA. "Human mesenchymal stem cells efficiently manage oxidative stress.". *Stem Cells Dev* 2010;19(12):1885–93.
222. Ludin A, Itkin T, Gur-Cohen S, Mildner A, Shezen E, Golan K, Kollet O, Kalinkovich A, Porat Z, D'Uva G, Schajnovitz A, Voronov E, Brenner DA, Apte RN, Jung S, Lapidot T. "Monocytes-macrophages that express α -smooth muscle actin preserve primitive hematopoietic cells in the bone marrow.". *Nat Immunol* 2012;13(11):1072–82.
223. Itkin T, Ludin A, Gradus B, Gur-Cohen S, Kalinkovich A, Schajnovitz A, Ovadya Y, Kollet O, Canaani J, Shezen E, Coffin DJ, Enikolopov GN, Berg T, Piacibello W, Hornstein E, Lapidot T. "FGF-2 expands murine hematopoietic stem and progenitor cells via proliferation of stromal cells, c-Kit activation, and CXCL12 down-regulation.". *Blood* 2012;120(9):1843–55.
224. Zhang Y, Dépond M, He L, Foudi A, Kwarteng EO, Lauret E, Plo I, Desterke C, Dessen P, Fujii N, Opolon P, Herault O, Solary E, Vainchenker W, Joulin V, Louache F, Wittner M. "CXCR4/CXCL12 axis counteracts hematopoietic stem cell exhaustion through selective protection against oxidative stress.". *Sci Rep* 2016;6:37827.
225. Piccoli C, Ria R, Scrima R, Cela O, D'Aprile A, Boffoli D, Falzetti F, Tabilio A, Capitanio N. "Characterization of mitochondrial and extra-mitochondrial oxygen consuming reactions in human hematopoietic stem cells. Novel evidence of the occurrence of NAD(P)H oxidase activity.". *J Biol Chem* 2005;280(28):26467–76.
226. van Os R, Robinson SN, Drukteinis D, Sheridan TM, Mauch PM. "Respiratory burst of neutrophils is not required for stem cell mobilization in mice.". *Br J Haematol* 2000;111(2):695–9.
227. Urao N, McKinney RD, Fukai T, Ushio-Fukai M. "NADPH oxidase 2 regulates bone marrow microenvironment following hindlimb ischemia: role in reparative mobilization of progenitor cells.". *Stem Cells* 2012;30(5):923–34.
228. Kwak H-J, Liu P, Bajrami B, Xu Y, Park S-Y, Nombela-Arrieta C, Mondal S, Sun Y, Zhu H, Chai L, Silberstein LE, Cheng T, Luo HR. "Myeloid cell-derived reactive oxygen species externally regulate the proliferation of myeloid progenitors in emergency granulopoiesis.". *Immunity* 2015;42(1):159–71.
229. Rafii S, Avecilla S, Shmelkov S, Shido K, Tejada R, Moore MAS, Heissig B, Hattori K. "Angiogenic factors reconstitute hematopoiesis by recruiting stem cells from bone marrow microenvironment.". *Ann N Y Acad Sci* 2003;996:49–60.
230. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. "Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling.". *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8(3):221–33.
231. Fang MM, Barman PK, Thirupathi M, Mirza RE, McKinney RD, Deng J, Christman JW, Du X, Fukai T, Ennis WJ, Koh TJ, Ushio-Fukai M, Urao N. "Oxidant Signaling Mediated by Nox2 in Neutrophils Promotes Regenerative Myelopoiesis and Tissue

- Recovery following Ischemic Damage." *J Immunol* 2018;201(8):2414–2426.
232. Marlein CR, Zaitseva L, Piddock RE, Robinson SD, Edwards DR, Shafat MS, Zhou Z, Lawes M, Bowles KM, Rushworth SA. "NADPH oxidase-2 derived superoxide drives mitochondrial transfer from bone marrow stromal cells to leukemic blasts." *Blood* 2017;130(14):1649–1660.
233. Mistry JJ, Marlein CR, Moore JA, Hellmich C, Wojtowicz EE, Smith JGW, Macaulay I, Sun Y, Morfakis A, Patterson A, Horton RH, Divekar D, Morris CJ, Haestier A, Di Palma F, Beraza N, Bowles KM, Rushworth SA. "ROS-mediated PI3K activation drives mitochondrial transfer from stromal cells to hematopoietic stem cells in response to infection." *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019;116(49):24610–24619.
234. Wen Z, Shimojima Y, Shirai T, Li Y, Ju J, Yang Z, Tian L, Goronzy JJ, Weyand CM. "NADPH oxidase deficiency underlies dysfunction of aged CD8⁺ Tregs." *J Clin Invest* 2016;126(5):1953–67.
235. Kwon B-I, Kim TW, Shin K, Kim YH, Yuk CM, Yuk J-M, Shin D-M, Jo E-K, Lee C-H, Lee S-H. "Enhanced Th2 cell differentiation and function in the absence of Nox2." *Allergy* 2017;72(2):252–265.
236. Merino MC, Gruppi A. "Origin and development of B1 lymphocytes. A cell population involved in defence and autoimmunity." *Medicina (B Aires)* 2006;66(2):165–72.
237. Bleesing JJ, Souto-Carneiro MM, Savage WJ, Brown MR, Martinez C, Yavuz S, Brenner S, Siegel RM, Horwitz ME, Lipsky PE, Malech HL, Fleisher TA. "Patients with chronic granulomatous disease have a reduced peripheral blood memory B cell compartment." *J Immunol* 2006;176(11):7096–103.
238. Mohsenzadegan M, Fattahi F, Fattahi F, Mirshafiey A, Fazlollahi MR, Naderi Beni F, Movahedi M, Pourpak Z. "Altered pattern of Naïve and memory B cells and B1 cells in patients with chronic granulomatous disease." *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2014;13(3):157–65.
239. Salmen S, Corte D, Goncalves L, Barboza L, Montes H, Calderón A, Berrueta L. "CD40/CD40L expression in leukocytes from chronic granulomatous disease patients." *APMIS* 2007;115(8):939–47.
240. van Kooten C, Banchereau J. "Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells." *Curr Opin Immunol* 1997;9(3):330–7.
241. Mori M, Li G, Hashimoto M, Nishio A, Tomozawa H, Suzuki N, Usami S, Higuchi K, Matsumoto K. "Pivotal Advance: Eosinophilia in the MES rat strain is caused by a loss-of-function mutation in the gene for cytochrome b(-245), alpha polypeptide (Cyba)." *J Leukoc Biol* 2009;86(3):473–8.
242. Sardina JL, López-Ruano G, Sánchez-Abarca LI, Pérez-Simón JA, Gaztelumendi A,

- Trigueros C, Llanillo M, Sánchez-Yagüe J, Hernández-Hernández A. "p22phox-dependent NADPH oxidase activity is required for megakaryocytic differentiation.". *Cell Death Differ* 2010;17(12):1842-54.
243. McCrann DJ, Eliades A, Makitalo M, Matsuno K, Ravid K. "Differential expression of NADPH oxidases in megakaryocytes and their role in polyploidy.". *Blood* 2009;114(6):1243-9.
244. Mekada K, Abe K, Murakami A, Nakamura S, Nakata H, Moriwaki K, Obata Y, Yoshiki A. "Genetic differences among C57BL/6 substrains.". *Exp Anim* 2009;58(2):141-9.
245. Diwan BA, Blackman KE. "Differential susceptibility of 3 sublines of C57BL/6 mice to the induction of colorectal tumors by 1,2-dimethylhydrazine.". *Cancer Lett* 1980;9(2):111-5.
246. Mayorga AJ, Lucki I. "Limitations on the use of the C57BL/6 mouse in the tail suspension test.". *Psychopharmacology (Berl)* 2001;155(1):110-2.
247. Roth DM, Swaney JS, Dalton ND, Gilpin EA, Ross J. "Impact of anesthesia on cardiac function during echocardiography in mice.". *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;282(6):H2134-40.
248. Grottick AJ, Bagnol D, Phillips S, McDonald J, Behan DP, Chalmers DT, Hakak Y. "Neurotransmission- and cellular stress-related gene expression associated with prepulse inhibition in mice.". *Brain Res Mol Brain Res* 2005;139(1):153-62.
249. Khisti RT, Wolstenholme J, Shelton KL, Miles MF. "Characterization of the ethanol-deprivation effect in substrains of C57BL/6 mice.". *Alcohol* 2006;40(2):119-26.
250. Bradford MM. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.". *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
251. Adane B, Ye H, Khan N, Pei S, Minhajuddin M, Stevens BM, Jones CL, D'Alessandro A, Reisz JA, Zaberezhnyy V, Gasparetto M, Ho T-C, Kelly KK, Myers JR, Ashton JM, Siegenthaler J, Kume T, Campbell EL, Pollyea DA, Becker MW, Jordan CT. "The Hematopoietic Oxidase NOX2 Regulates Self-Renewal of Leukemic Stem Cells.". *Cell Rep* 2019;27(1):238-254.e6.
252. Piccoli C, D'Aprile A, Ripoli M, Scrima R, Lecce L, Boffoli D, Tabilio A, Capitanio N. "Bone-marrow derived hematopoietic stem/progenitor cells express multiple isoforms of NADPH oxidase and produce constitutively reactive oxygen species.". *Biochem Biophys Res Commun* 2007;353(4):965-72.
253. Rieber N, Hector A, Kuijpers T, Roos D, Hartl D. "Current concepts of hyperinflammation in chronic granulomatous disease.". *Clin Dev Immunol* 2012;2012:252460.

254. Petersen JE, Hiran TS, Goebel WS, Johnson C, Murphy RC, Azmi FH, Hood AF, Travers JB, Dinauer MC. "Enhanced cutaneous inflammatory reactions to *Aspergillus fumigatus* in a murine model of chronic granulomatous disease.". *J Invest Dermatol* 2002;118(3):424-9.
255. Schächli MG, Jaquet V, Belli DC, Krause K-H. "Hyperinflammation in chronic granulomatous disease and anti-inflammatory role of the phagocyte NADPH oxidase.". *Semin Immunopathol* 2008;30(3):255-71.
256. Brault J, Vigne B, Meunier M, Beaumel S, Mollin M, Park S, Stasia MJ. "NOX4 is the main NADPH oxidase involved in the early stages of hematopoietic differentiation from human induced pluripotent stem cells.". *Free Radic Biol Med* 2020;146:107-118.
257. Weisser M, Demel UM, Stein S, Chen-Wichmann L, Touzot F, Santilli G, Sujer S, Brendel C, Siler U, Cavazzana M, Thrasher AJ, Reichenbach J, Essers MAG, Schwäble J, Grez M. "Hyperinflammation in patients with chronic granulomatous disease leads to impairment of hematopoietic stem cell functions.". *J Allergy Clin Immunol* 2016;138(1):219-228.e9.
258. Furst DE. "Serum immunoglobulins and risk of infection: how low can you go?". *Semin Arthritis Rheum* 2009;39(1):18-29.
259. Schroeder HW, Cavacini L. "Structure and function of immunoglobulins.". *J Allergy Clin Immunol* 2010;125(2 Suppl 2):S41-52.
260. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. "The generation of antibody-secreting plasma cells.". *Nat Rev Immunol* 2015;15(3):160-71.
261. Panda S, Ding JL. "Natural antibodies bridge innate and adaptive immunity.". *J Immunol* 2015;194(1):13-20.
262. Richards SM, Clark EA. "BCR-induced superoxide negatively regulates B-cell proliferation and T-cell-independent type 2 Ab responses.". *Eur J Immunol* 2009;39(12):3395-403.
263. Wing JB, Sakaguchi S. "Foxp3⁺ T(reg) cells in humoral immunity.". *Int Immunol* 2014;26(2):61-9.
264. Wing JB, Ise W, Kurosaki T, Sakaguchi S. "Regulatory T cells control antigen-specific expansion of Tfh cell number and humoral immune responses via the coreceptor CTLA-4.". *Immunity* 2014;41(6):1013-25.
265. Reinhardt RL, Liang H-E, Locksley RM. "Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire.". *Nat Immunol* 2009;10(4):385-93.
266. Glatman Zaretsky A, Konradt C, Dépis F, Wing JB, Goenka R, Atria DG, Silver JS, Cho S, Wolf AI, Quinn WJ, Engiles JB, Brown DC, Beiting D, Erikson J, Allman D, Cancro MP, Sakaguchi S, Lu L-F, Benoist CO, Hunter CA. "T Regulatory Cells Support Plasma Cell Populations in the Bone Marrow.". *Cell Rep* 2017;18(8):1906-

- 1916.
267. Engström M, Karlsson R, Jönsson J-I. "Inactivation of the forkhead transcription factor FoxO3 is essential for PKB-mediated survival of hematopoietic progenitor cells by kit ligand.". *Exp Hematol* 2003;31(4):316–23.
268. Chabanon A, Desterke C, Rodenburger E, Clay D, Guerton B, Boutin L, Bennaceur-Griscelli A, Pierre-Louis O, Uzan G, Abecassis L, Bourgeade M-F, Lataillade J-J, Le Bousse-Kerdilès M-C. "A cross-talk between stromal cell-derived factor-1 and transforming growth factor-beta controls the quiescence/cycling switch of CD34(+) progenitors through FoxO3 and mammalian target of rapamycin.". *Stem Cells* 2008;26(12):3150–61.
269. Hamel KM, Mandal M, Karki S, Clark MR. "Balancing Proliferation with Igk Recombination during B-lymphopoiesis.". *Front Immunol* 2014;5139.
270. Asano T, Okada S, Tsumura M, Yeh T-W, Mitsui-Sekinaka K, Tsujita Y, Ichinose Y, Shimada A, Hashimoto K, Wada T, Imai K, Ohara O, Morio T, Nonoyama S, Kobayashi M. "Enhanced AKT Phosphorylation of Circulating B Cells in Patients With Activated PI3Kδ Syndrome.". *Front Immunol* 2018;9568.
271. Elkaim E, Neven B, Bruneau J, Mitsui-Sekinaka K, Stanislas A, Heurtier L, Lucas CL, Matthews H, Deau M-C, Sharapova S, Curtis J, Reichenbach J, Glastre C, Parry DA, Arumugakani G, McDermott E, Kilic SS, Yamashita M, Moshous D, et al., and Kracker S. "Clinical and immunologic phenotype associated with activated phosphoinositide 3-kinase δ syndrome 2: A cohort study.". *J Allergy Clin Immunol* 2016;138(1):210-218.e9.
272. Benhamou D, Labi V, Getahun A, Benchetrit E, Dowery R, Rajewsky K, Cambier JC, Melamed D. "The c-Myc/miR17-92/PTEN Axis Tunes PI3K Activity to Control Expression of Recombination Activating Genes in Early B Cell Development.". *Front Immunol* 2018;92715.
273. Brierley MM, Fish EN. "Stats: multifaceted regulators of transcription.". *J Interferon Cytokine Res* 2005;25(12):733–44.
274. Schepers H, Wierenga ATJ, Vellenga E, Schuringa JJ. "STAT5-mediated self-renewal of normal hematopoietic and leukemic stem cells.". *JAK-STAT* 2012;1(1):13–22.
275. Maurer B, Kollmann S, Pickem J, Hoelbl-Kovacic A, Sexl V. "STAT5A and STAT5B-Twins with Different Personalities in Hematopoiesis and Leukemia.". *Cancers (Basel)* 2019;11(11):1726.
276. Wang Z, Bunting KD. "Stat5 deficiency decreases transcriptional heterogeneity and supports emergence of hematopoietic sub-populations.". *Oncotarget* 2017;8(14):22477–22482.

277. Wang Z, Medrzycki M, Bunting ST, Bunting KD. "Stat5-deficient hematopoiesis is permissive for Myc-induced B-cell leukemogenesis.". *Oncotarget* 2015;6(30):28961–72.
278. Janz S. "Uncovering MYC's full oncogenic potential in the hematopoietic system.". *Oncogene* 2005;24(22):3541–3.
279. Baudino TA, McKay C, Pendeville-Samain H, Nilsson JA, Maclean KH, White EL, Davis AC, Ihle JN, Cleveland JL. "c-Myc is essential for vasculogenesis and angiogenesis during development and tumor progression.". *Genes Dev* 2002;16(19):2530–43.
280. Dubois NC, Adolphe C, Ehninger A, Wang RA, Robertson EJ, Trumpp A. "Placental rescue reveals a sole requirement for c-Myc in embryonic erythroblast survival and hematopoietic stem cell function.". *Development* 2008;135(14):2455–65.
281. Laurenti E, Varnum-Finney B, Wilson A, Ferrero I, Blanco-Bose WE, Ehninger A, Knoepfler PS, Cheng P-F, MacDonald HR, Eisenman RN, Bernstein ID, Trumpp A. "Hematopoietic stem cell function and survival depend on c-Myc and N-Myc activity.". *Cell Stem Cell* 2008;3(6):611–24.
282. Reavie L, Della Gatta G, Crusio K, Aranda-Orgilles B, Buckley SM, Thompson B, Lee E, Gao J, Bredemeyer AL, Helmink BA, Zavadil J, Sleckman BP, Palomero T, Ferrando A, Aifantis I. "Regulation of hematopoietic stem cell differentiation by a single ubiquitin ligase-substrate complex.". *Nat Immunol* 2010;11(3):207–15.
283. Wilson A, Murphy MJ, Oskarsson T, Kaloulis K, Bettess MD, Oser GM, Pasche A-C, Knabenhans C, Macdonald HR, Trumpp A. "c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation.". *Genes Dev* 2004;18(22):2747–63.
284. Baena E, Ortiz M, Martínez-A C, de Alborán IM. "c-Myc is essential for hematopoietic stem cell differentiation and regulates Lin(-)Sca-1(+)c-Kit(-) cell generation through p21.". *Exp Hematol* 2007;35(9):1333–43.
285. Leon J, Ferrandiz N, Acosta JC, Delgado MD. "Inhibition of cell differentiation: a critical mechanism for MYC-mediated carcinogenesis?". *Cell Cycle* 2009;8(8):1148–57.
286. Hoffman B, Amanullah A, Shafarenko M, Liebermann DA. "The proto-oncogene c-myc in hematopoietic development and leukemogenesis.". *Oncogene* 2002;21(21):3414–21.
287. Ferreirós-Vidal I, Carroll T, Zhang T, Lagani V, Ramirez RN, Ing-Simmons E, Gómez-Valadés AG, Cooper L, Liang Z, Papoutsoglou G, Dharmalingam G, Guo Y, Tarazona S, Fernandes SJ, Noori P, Silberberg G, Fisher AG, Tsamardinos I, Mortazavi A, Lenhard B, Conesa A, Tegner J, Merckenschlager M, Gomez-Cabrero D. "Feedforward regulation of Myc coordinates lineage-specific with housekeeping

- gene expression during B cell progenitor cell differentiation.". *PLoS Biol* 2019;17(4):e2006506.
288. Smith DP, Bath ML, Harris AW, Cory S. "T-cell lymphomas mask slower developing B-lymphoid and myeloid tumours in transgenic mice with broad haemopoietic expression of MYC.". *Oncogene* 2005;24(22):3544–53.
 289. Larsson LG, Schena M, Carlsson M, Sällström J, Nilsson K. "Expression of the c-myc protein is down-regulated at the terminal stages during in vitro differentiation of B-type chronic lymphocytic leukemia cells.". *Blood* 1991;77(5):1025–32.
 290. Huang C-Y, Bredemeyer AL, Walker LM, Bassing CH, Sleckman BP. "Dynamic regulation of c-Myc proto-oncogene expression during lymphocyte development revealed by a GFP-c-Myc knock-in mouse.". *Eur J Immunol* 2008;38(2):342–9.
 291. Khuda SE, Loo WM, Janz S, Van Ness B, Erickson LD. "Deregulation of c-Myc Confers distinct survival requirements for memory B cells, plasma cells, and their progenitors.". *J Immunol* 2008;181(11):7537–49.
 292. Buitenhuis M, van der Linden E, Ulfman LH, Hofhuis FM, Bierings MB, Coffier PJ. "Protein kinase B (PKB/c-akt) regulates homing of hematopoietic progenitors through modulation of their adhesive and migratory properties.". *Blood* 2010;116(13):2373–84.
 293. Ratajczak MZ, Suszynska M. "Emerging Strategies to Enhance Homing and Engraftment of Hematopoietic Stem Cells.". *Stem cell Rev reports* 2016;12(1):121–8.
 294. Hagedorn EJ, Durand EM, Fast EM, Zon LI. "Getting more for your marrow: boosting hematopoietic stem cell numbers with PGE2.". *Exp Cell Res* 2014;329(2):220–6.
 295. Ishida T, Suzuki S, Lai C-Y, Yamazaki S, Kakuta S, Iwakura Y, Nojima M, Takeuchi Y, Higashihara M, Nakauchi H, Otsu M. "Pre-Transplantation Blockade of TNF- α -Mediated Oxygen Species Accumulation Protects Hematopoietic Stem Cells.". *Stem Cells* 2017;35(4):989–1002.
 296. Hu L, Cheng H, Gao Y, Shi M, Liu Y, Hu Z, Xu J, Qiu L, Yuan W, Leung AY-H, Yang Y-G, Cheng T. "Antioxidant N-acetyl-L-cysteine increases engraftment of human hematopoietic stem cells in immune-deficient mice.". *Blood* 2014;124(20):e45-8.
 297. Kong Y, Wang Y, Zhang Y-Y, Shi M-M, Mo X-D, Sun Y-Q, Chang Y-J, Xu L-P, Zhang X-H, Liu K-Y, Huang X-J. "Prophylactic oral NAC reduced poor hematopoietic reconstitution by improving endothelial cells after haploidentical transplantation.". *Blood Adv* 2019;3(8):1303–1317.

