



Universidad Nacional Autónoma de México



Programa de Doctorado  
en Ciencias Biomédicas

**“TRANSDUCCION DE SEÑALES EN LA  
REGULACION DE RESPUESTAS CELULARES  
MEDIADAS POR RECEPTORES FcγR EN  
FAGOCITOS”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**ERICK GARCÍA GARCÍA**

**Director de Tesis: Dr. Carlos Rosales Ledezma.**

**Jurado: Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay.**

**Dr. Carlos Rosales Ledezma.**

**Dra. Claudia González Espinosa.**

**Dra. Laura Cecilia Bonifaz Alfonso.**

**Dra. Marta Robles Flores.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Dedicatorias

A Tannia, por su amor, su ternurita, por sus juegos, sus gruñiditos y todo lo bonito que hay en ella, por dentro y por fuera. Gracias por enseñarme tantas cosas, por hacerme más humano y por disfrutar conmigo lo que tengo de marciano. Gracias por llenar mi vida de tanta dulzurita, y sacar todo lo tiernosito que hay en mí. Te amo.

A mi hermanito Pedrito. Creo que alguna vez te lo dije, pero si no, te lo digo de nuevo: has sido un gran ejemplo para mí. Me has hecho ver caminos posibles montones de veces. Andando tu propio camino me has animado a ir mucho más lejos. Te quiero muchísimo. Te vas a poner bueno, y verás que armamos tu buffet en miniatura. Ya sabes que tengo un hombro multiusos que puedes usar siempre que lo necesites.

## Agradecimientos

Un agradecimiento súper especial al Dr. Carlos Rosales Ledezma, mi jefecito, por años y años de latigazos, y montones de enseñanzas. Por todo su apoyo y confianza, y por no tenerle miedo a los moluscos. Eres un gran ejemplo para mi futura vida como “Dotor”.

A mis padres por su apoyo, su amor, por su confianza en mí. Un agradecimiento especial a mi mami por ocultarme tanto tiempo los análisis de la Dra. Silvia. No sabes cuánto me sirvió que nunca me dijeras nada 😊.  
Gracias ma’.

A mi hermanita, por todo su cariño y su ternurita. Gracias por dejarme acompañarte en los momentos güenos, maso’, y malos en la vida. Te quiero bien retiarlo.

A la familia Oviedo González (Yeni, Liber, Gris, Jorge, Ofe, Raymundo, René y Aurora) por abrirme las puertas de su casa y de su corazón.

A mi hermanita adoptiva Ginisisisisisima, por ser quien es. A sus marcianos, por ser unos niños tan lindos.

A la familia García Ramírez, por darle a mi hermanito fuerzitas para ir pa’ delante.

Al Dr. Alejandro Zentella Dehesa y al Dr. Eduardo García Cepeda, por su apoyo y valiosa dirección como miembros de mi comité tutorial.

A CONACyT por la beca otorgada para la realización de esta tesis.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) por la beca otorgada para la realización de esta tesis.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) por el apoyo otorgado para la realización de la estancia de investigación en el laboratorio del Dr. Antonio Figueras del Instituto de Investigaciones Marinas (IIM) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, en Vigo, España.

A Hectorín por su amistad que, aunque difusa, es bien fuerte. Gracias por tu labor de celestino, compadre.

A todos los locos del laboratorio de patología del IIM de Vigo.

A María del IIM. ¿Ves como al final no necesitamos un experto en relaciones internacionales para poder machacar a los pobriños mejillones?... ¡Gracias

bonita! Que me hiciste la vida laboratoril súper divertida. No olvides nunca mi gran capacidad y gran destreza para hacer estropicios, que seguro te hará sonreír cuando te sientas agobiada.

A Iván del IIM, por hacerme llevadero el curro con mucha marcha y mucho vino. iiiiEres la ostia tío!!!! Que ya veremos la puesta de sol en México tomados de la mano, jeje.

A Loli del IIM, por su gran corazón que no le cabe en el pecho. Por el biscocho de limón (¿O era naranja salvaje?), el arroz con cositas del mar y salchichón, por los paseos, las cenas y las risas.

A Jorge del IIM, que detrás de esa pinta de chico malo tiene un gran corazón propenso a desmayarse. ¡Me debes las quesadas tío!

A mi amiguito Rodrigo por Asimov, por las charlas tan fumadas de la actualidad, y los poquitos ratos de ocio laboratorio que compartimos.

Al Dr. Antonio Figueras y a la Dra. Beatriz Novoa del IIM, por abrirme las puertas de su laboratorio (a pesar de mi pinta gangsteril) para hacer locuras con los mejillones.

Y aunque nada que ver con la ciencia y las pipetas, van montones de agradecimientos a todos mis amigos, por ser mis amigos y por estar allí: a Heydicita, a Palola, a Itzelita, a Jackis, a Sandy, a Judith, a Carlitos (iiidisfruta tu tatuaje!!!), a Flor, a Mel (que sí tiene que ver con las pipetas y la ciencia), a Elsita y Paty las vecinas, a Boo Boo, a Anita en stand-by.

A Nancy Y. Mora Pérez por apoyo.

A todas las personas, y los moluscos, que literalmente derramaron su sangre para la realización de esta tesis.

A la biología por darme cinco sentidos para explorar el mundo y para sorprenderme. Por contestarme un montón de preguntas, que a pesar de ser ridículas comparadas con la magnitud del universo, tiene su maña plantear y no dejan de asombrarme.

## ÍNDICE GENERAL

<b>1. Resumen</b>	<b>3</b>
<b>2. Introducción.</b>	<b>5</b>
<b>3. Objetivo.</b>	<b>17</b>
<b>4. Capítulo I.</b> <i>En monocitos la fagocitosis y la activación de NF-<math>\kappa</math>B son reguladas por diferentes vías de señalización.</i>	<b>18</b>
<b>5. Capítulo II.</b> <i>Reclutamiento de PI 3-K y ERK para la regulación de la fagocitosis por receptores Fc<math>\gamma</math>R, durante la diferenciación de monocitos.</i>	<b>21</b>
<b>6. Capítulo III.</b> <i>La vía de señalización del receptor Fc<math>\gamma</math>R1IA puede ser modulada por su asociación de con microdominios de membrana (MDM).</i>	<b>23</b>
<b>7. Capítulo IV.</b> <i>Los receptores Fc<math>\gamma</math>R1IA y Fc<math>\gamma</math>R1IIB de neutrófilos activan a NF-<math>\kappa</math>B: Aplicación de la citometría de flujo al estudio de la activación de factores nucleares.</i>	<b>26</b>
<b>8. Capítulo V.</b> <i>Identificación de los fagocitos profesionales del mejillón <u>Mytilus galloprovincialis</u>, y caracterización bioquímica de sus respuestas celulares.</i>	<b>28</b>
<b>9. Conclusiones y discusión general.</b>	<b>31</b>
<b>10. Bibliografía.</b>	<b>34</b>
<b>11. Apéndices.</b>	<b>44</b>
A) <i>J Leukoc Biol</i> , 2002, 72:1092-1108	
B) <i>J Leukoc Biol</i> , 2001, 70: 649-658	
C) <i>J Leukoc Biol</i> , 2002, 72:107-114	
D) <i>J Immunol</i> , 2007, 178:3048-3058	
E) <i>J Immunol Methods</i> , 2007, 320:104-118	
F) Manuscrito enviado a publicación a <i>Developmental and Comparative Immunology</i>	

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Fagocitos del sistema inmunológico de mamíferos</i>	8
<b>Figura 2.</b> <i>Respuestas celulares activadas por receptores Fc.</i>	10
<b>Figura 3.</b> <i>Familia de receptores Fc<math>\gamma</math>R humanos.</i>	11
<b>Figura 4.</b> <i>Representación esquemática de la vía de transducción de señales de receptores Fc<math>\gamma</math>R.</i>	13
<b>Figura 5.</b> <i>Microdominios de membrana y transducción de señales.</i>	17
<b>Figura 6.</b> <i>En monocitos dos vías de señalización independientes regulan la fagocitosis y la activación de NF-<math>\kappa</math>B, a través de receptores Fc<math>\gamma</math>R.</i>	21
<b>Figura 7.</b> <i>La vía de señalización para la fagocitosis por Fc<math>\gamma</math>R es diferente entre fagocitos profesionales y fagocitos no profesionales.</i>	23
<b>Figura 8.</b> <i>Modulación de la vía de señalización de Fc<math>\gamma</math>RIIA por asociación a microdominios de membrana.</i>	26
<b>Figura 9.</b> <i>Los receptores Fc<math>\gamma</math>RIIA y Fc<math>\gamma</math>RIIIB de neutrófilos activan diferentes vías de señalización hacia el núcleo.</i>	28
<b>Figura 10.</b> <i>Los fagocitos profesionales de <i>M. galloprovincialis</i> son las células Grandes Granulares, y Grandes Semigranulares.</i>	31

### 1. RESUMEN.

En la actualidad el estudio de la inmunología de vertebrados superiores, como el humano y el ratón, se desarrolla a nivel molecular y genético. El estudio de los mecanismos de inmunidad en organismos invertebrados es actualmente un campo en expansión, y en muchas especies apenas se ha comenzado la caracterización funcional de las células que componen sus sistemas inmunológicos: los hemocitos.

La fagocitosis es una función celular muy relevante dentro de los mecanismos de inmunidad de organismos vertebrados e invertebrados. Los fagocitos son un grupo de células especializadas del sistema inmunológico, cuya función principal es la ingestión y eliminación de microorganismos y restos celulares. Los fagocitos humanos expresan en la membrana plasmática diferentes receptores capaces de iniciar el proceso de fagocitosis, entre los que se encuentran los receptores para las inmunoglobulinas (receptores Fc). La unión de los receptores Fc con las inmunoglobulinas inicia una serie de cascadas bioquímicas que activan y regulan el proceso de fagocitosis y otras respuestas celulares, como el estallido respiratorio o la activación de genes. Las cascadas bioquímicas activadas por receptores se conocen como “vías de señalización” hacia la activación de respuestas celulares. Los mecanismos moleculares involucrados en la vía de señalización de los receptores Fc se conocen sólo parcialmente. En esta tesis doctoral se abordaron diferentes aspectos de las vías de señalización de los receptores Fc que unen inmunoglobulinas G (FcγR). Los resultados presentados muestran que: A) En monocitos humanos existen dos vías de señalización que regulan de manera independiente el proceso de fagocitosis y la activación del factor nuclear NF-κB. B) Las vías de señalización de los receptores FcγR para fagocitosis son diferentes entre fagocitos profesionales y fagocitos no profesionales. Durante la diferenciación monocito → macrófago la maquinaria molecular que regula la fagocitosis se modifica, haciendo este proceso más eficiente. C) La vía de señalización del receptor FcγRIIA es modulada a través de su asociación con estructuras membranales lipídicas conocidas como microdominios de membrana. La región transmembranal del receptor FcγRIIA es la responsable de regular esta asociación. D) En neutrófilos, el factor nuclear NF-κB, necesario para la activación de genes de citocinas, es activado a través de los receptores FcγRIIA o FcγRIIIB. El receptor FcγRIIIB activa además una vía de señalización independiente de FcγRIIA, que lleva a la activación nuclear de ERK y Elk-1.

En esta tesis doctoral se abordó el campo de la inmunología comparada, para caracterizar las propiedades de los fagocitos profesionales de invertebrados. Utilizando como modelo el molusco marino *Mytilus galloprovincialis*, se encontró que su sistema inmunológico está compuesto por al menos cuatro subtipos celulares. De estos cuatro, dos subtipos son fagocitos profesionales, con alta capacidad de fagocitosis, de producción de radicales reactivos de oxígeno, y de producción de óxido nítrico. En *M. galloprovincialis* la enzima PI 3-K juega un papel central en la activación de los mecanismos de defensa celulares, que parece haber sido conservado a través de la evolución.

Los resultados que se presentan en esta tesis se encuentran publicados en: J. Leukoc. Biol, 2001, 70: 649-658; J. Leukoc. Biol, 2002, 72:1092-1108; J. Leukoc. Biol, 2002, 72:107-114, J. Immunol. 2007, 178:3048-3058; J. Immunol Methods, 2007, 320:104-118.

**Abreviaturas usadas en esta tesis:** [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, concentración intracelular de calcio; ERK, cinasa activada por mitógenos; ElgG, eritrocitos opsonizados con IgG; GG, células grandes granulares; GSG, células grandes semigranulares; IL, interleucina; ITAM, del inglés “Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif”; ITIM, del inglés “Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif”; MAcDM, macrófagos derivados de monocitos; MDM, microdominios de membrana; PI 3-K, fosfatidilinositol 3-cinasa; PKC, proteína cinasa C; PLA2, fosfolipasa A2; PLCγ, fosfolipasa C gamma; PLD, fosfolipasa D; PH, células pequeñas hialinas; PSG, células pequeñas semigranulares.

### 1. ABSTRACT.

In our time, the study of immunity in higher vertebrates, such as mice and humans, is being developed at the genetic and molecular level. The study of invertebrate immunity is currently an expanding field, and in most species we have barely begun with the functional characterization of the cells composing their immune systems: the hemocytes.

Phagocytosis is a cell function of relevance, among the mechanisms of immunity in either vertebrate or invertebrate organisms. Phagocytes are a group of specialized cells of the immune system, whose main function is the ingestion and elimination of microorganisms and cell debris. Phagocytes express on their plasma membrane a series of receptors capable of triggering the phagocytic process. Among these receptors are the immunoglobulin receptors (Fc Receptors). Fc Receptor binding to immunoglobulins initiates a series of biochemical cascades that activate and regulate phagocytosis, as well as other cell responses such as the respiratory burst or gene activation. These receptor-triggered biochemical cascades are called "signalling pathways" towards the activation of cellular responses. The molecular mechanisms involved in the signalling pathway of Fc Receptors are only partially known. This doctoral thesis deals with various aspects of the signalling pathways of Fc Receptors for immunoglobulin G (Fc $\gamma$ R). The results presented in this thesis show that: A) In human monocytes, there are two different signalling pathways that regulate phagocytosis and the activation of the NF- $\kappa$ B nuclear factor in an independent manner. B) The Fc $\gamma$ R signalling pathway for phagocytosis is different between professional and non-professional phagocytes. The molecular machinery that regulates phagocytosis is modified during monocyte to macrophage differentiation, making more efficient the phagocytic process. C) The Fc $\gamma$ RIIA signalling pathway is modulated through its association with lipidic membrane structures, known as membrane microdomains, or lipid rafts. The transmembrane domain of Fc $\gamma$ RIIA is responsible for regulating this association. D) In neutrophils, the NF- $\kappa$ B nuclear factor, required for the activation of cytokine genes, is activated through the Fc $\gamma$ RIIA or Fc $\gamma$ RIIIB receptors. The Fc $\gamma$ RIIIB receptor activates an additional signalling pathway that leads to the activation of ERK and Elk-1 in the nucleus.

This doctoral thesis explored the field of comparative immunology, to characterize the properties of professional phagocytes in invertebrates. Using the marine mollusc *Mytilus galloprovincialis* as a model, it was found that its immune system is composed of at least four different cell types. Two out of these four cell types are professional phagocytes, presenting high phagocytic ability, as well as high capacity for the production of reactive oxygen species, and nitric oxide. In *M. galloprovincialis* the signalling enzyme PI 3-K plays a central role in the activation of cellular defense mechanisms; a role that appears to have been conserved throughout evolution.

The results presented in this thesis have been published in: J. Leukoc. Biol, 2001, 70: 649-658; J. Leukoc. Biol, 2002, 72:1092-1108; J. Leukoc. Biol, 2002, 72:107-114, J. Immunol. 2007, 178:3048-3058; J. Immunol Methods, 2007, 320:104-118.

## 2. INTRODUCCIÓN.

### ***Sistemas inmunológicos.***

En la naturaleza, los organismos multicelulares se encuentran en permanente competencia con millones de microorganismos unicelulares, para quienes los primeros representan una fuente de alimento [1, 2]. Los microorganismos capaces de colonizar y alimentarse de otros organismos, causándoles daño, son considerados patógenos [3]. A través de la evolución, los organismos multicelulares han adquirido una serie de herramientas celulares y moleculares que les permiten reconocer lo propio de lo ajeno, y de esta forma sobrevivir en un mundo plagado de microorganismos potencialmente patógenos [1-3]. En organismos multicelulares complejos estas herramientas de defensa se encuentran integradas en lo que llamamos “sistema inmunológico” [1]. Los sistemas inmunológicos de diferentes organismos están compuestos por diferentes órganos y tipos celulares, con funciones de defensa específicas [1, 3]. Además, muchos organismos multicelulares producen, como parte de sus sistemas de defensa, moléculas capaces de dañar a microorganismos patógenos, moléculas capaces de inhibir el crecimiento de patógenos; o bien moléculas capaces de regular las funciones de órganos o de células específicas que contribuyen a combatir las infecciones [1-3].

Por décadas el estudio de la inmunología se ha centrado en organismos vertebrados superiores, siendo el humano y el ratón los modelos más estudiados. En estas dos especies de mamíferos se conocen con gran detalle mecanismos celulares y moleculares que componen sus sistemas inmunológicos [4, 5]. El sistema inmunológico de estas dos especies, así como el de otros vertebrados superiores estudiados [2], está compuesto por dos subsistemas conocidos como “inmunidad innata” e “inmunidad específica” [2, 6, 7]. Los mecanismos de inmunidad innata permiten el reconocimiento y la eliminación casi inmediata de un número limitado de microorganismos potencialmente patógenos [2, 7]. Los mecanismos de la inmunidad específica permiten a su vez reconocer y eliminar a prácticamente cualquier microorganismo patógeno, aunque suelen actuar de forma más lenta [2, 6]. Los mecanismos de la inmunidad específica confieren además protección contra infecciones subsecuentes de un mismo microorganismo [2, 6].

En años recientes la inmunología, como una disciplina científica bien establecida, ha empezado a explorar los mecanismos de defensa de otros organismos vertebrados e invertebrados, diferentes del humano y del ratón [8, 9]. Lo anterior ha contribuido al fortalecimiento del campo de la inmunología comparada, y particularmente de la inmunología de invertebrados marinos con importancia económica para la industria de la acuicultura [10]. Hoy sabemos que aún los sistemas inmunológicos de vertebrados inferiores, como los peces, son muy similares a los de vertebrados superiores [2, 8]. En vertebrados inferiores, al igual que en mamíferos, existen mecanismos de inmunidad innata y de inmunidad específica [2]. En cambio, los sistemas inmunológicos de organismos invertebrados parecen estar integrados únicamente por mecanismos de inmunidad innata, y no se han observado mecanismos de inmunidad específica [2, 8, 11].

En la actualidad, el estudio de los mecanismos de inmunidad en vertebrados superiores (como el humano o el ratón) se desarrolla a nivel molecular y genético. Una parte importante de la inmunología de vertebrados es el estudio de los eventos bioquímicos activados por receptores, llamados “vías de transducción de señales”, que regulan las funciones celulares de defensa. En comparación con la inmunología de vertebrados, el estudio de los mecanismos de inmunidad en invertebrados está tremendamente rezagado. En la mayoría de las especies, a penas se ha comenzado con una descripción morfológica y funcional de los diferentes órganos y tipos celulares que componen sus sistemas inmunológicos. Esta tesis doctoral aborda el estudio de las vías de transducción de señales que regulan respuestas celulares activadas por receptores para inmunoglobulinas G (receptores Fc $\gamma$ ), en células fagocíticas humanas. Se abordó además el campo de la inmunología comparada, para integrar una

descripción morfológica y funcional de los hemocitos molusco marino *Mytilus galloprovincialis*, con el estudio de las vías de transducción de señales que regulan sus respuestas celulares de defensa.

### **Fagocitosis.**

El término fagocitosis se aplica al proceso celular de ingestión de partículas con un diámetro mayor de 1  $\mu\text{m}$  [12]. El proceso de fagocitosis fue descrito por el investigador ruso Élie Metchnikoff alrededor de 1880 [2]. Durante sus estudios sobre el origen de los órganos digestivos de larvas de estrellas de mar, Metchnikoff observó que ciertos tipos celulares ameboidales, no relacionados con el proceso digestivo, rodeaban e ingerían partículas de colorante y astillas vegetales introducidas en las larvas [2]. Metchnikoff llamó a estas células “fagocitos” (del griego “células devoradoras”), y al proceso celular “fagocitosis”. Metchnikoff demostró la existencia de fagocitos en gran variedad de animales, incluidos los humanos, reconociendo que estas células constituyen una de las primeras líneas de defensa en contra de infecciones por microorganismos. En organismos vertebrados e invertebrados, el proceso de fagocitosis es una parte esencial de los mecanismos de la inmunidad innata [10, 12, 13].

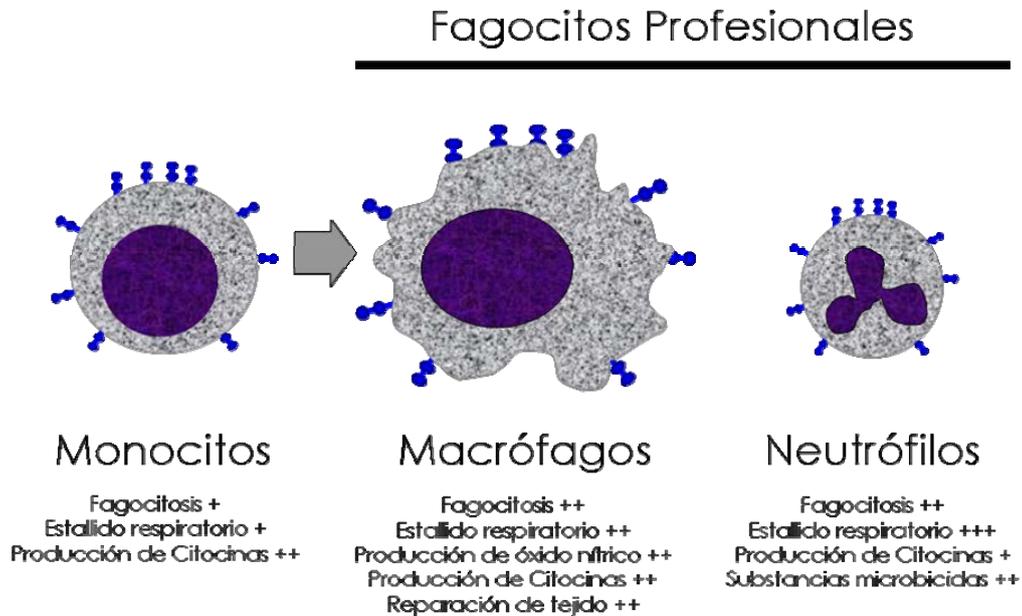
El primer paso del proceso de fagocitosis es la unión de los fagocitos con las partículas que se van a internalizar, a través de receptores de membrana. Esta unión induce una serie de cambios al interior de los fagocitos, que les permiten atraer a las partículas hacia el interior de la célula, formando una vesícula de gran tamaño conocida como “fagosoma”. Las partículas contenidas dentro de los fagosomas son destruidas por acción de enzimas lisosomales durante la maduración del fagosoma. Excelentes revisiones acerca de los pasos que componen el proceso de fagocitosis se encuentran en [12] y [13].

### **Células fagocíticas y sus funciones.**

La función principal de los fagocitos es la ingestión y destrucción de microorganismos, de células apoptóticas, de restos celulares, y de agregados moleculares de gran tamaño [12, 13]. Sin embargo, como parte de sus mecanismos de defensa, los fagocitos activan otras respuestas celulares que pueden ocurrir de forma casi simultánea a la fagocitosis [12-14]. Entre estas respuestas celulares se encuentran la producción de radicales reactivos de oxígeno durante el estallido respiratorio [15-17], la activación de genes moduladores de la respuesta inmunológica [18-23], la liberación de sustancias proinflamatorias como los leucotrienos [23-26], y la liberación de sustancias bactericidas por degranulación [27-29].

En el sistema inmunológico de mamíferos se conocen tres tipos principales de células fagocíticas: neutrófilos, macrófagos y monocitos [30-32] (Fig. 1). Los neutrófilos y los macrófagos son considerados “fagocitos profesionales”, pues presentan una alta capacidad para ingerir y destruir microorganismos [32]. Los monocitos son los precursores de los macrófagos, y son células fagocíticas poco eficientes [32] (Fig. 1). Los monocitos migran a través de los vasos sanguíneos hacia los sitios de inflamación, donde diversas moléculas solubles inducen su diferenciación a macrófagos [33, 34]. Una vez activados, los macrófagos presentan respuestas celulares altamente eficientes, entre las que se encuentran la fagocitosis [32, 35], la producción de radicales reactivos de oxígeno [17, 27], la producción de óxido nítrico [36-38], la producción de citocinas moduladoras de la respuesta inmunológica [21, 39, 40], y la reparación del tejido [12, 17, 21, 41] (Fig. 1). Los neutrófilos son los leucocitos más abundantes, y son las primeras células en llegar a los sitios de inflamación [42]. Las funciones principales de los neutrófilos son la fagocitosis de microorganismos [32], y la liberación de radicales tóxicos de oxígeno y otras sustancias microbicidas [15-17, 32, 43] (Fig. 1). Los neutrófilos también participan en la modulación de la respuesta inmunológica a través de la liberación de factores proinflamatorios como las prostaglandinas y los leucotrienos [25, 44], y la producción de algunas citocinas [20, 45] (Fig. 1). En mamíferos, existe además un tipo de células gliales fagocíticas llamadas microglia, que forman parte del sistema

nervioso central [46]. Estas células se originan a partir de monocitos circulantes, que colonizan el cerebro durante el desarrollo embrionario, y comparten algunas propiedades con éstos [47].



**Figura 1. Fagocitos del sistema inmunológico de mamíferos.** Existen tres tipos principales de fagocitos en el sistema inmunológico de mamíferos, macrófagos, neutrófilos y monocitos, que son los precursores de los macrófagos. Los macrófagos y los neutrófilos son considerados fagocitos profesionales. Además de su actividad fagocítica, los fagocitos poseen otros mecanismos de defensa como el estallido respiratorio, la producción de óxido nítrico, la producción de citocinas, la liberación de sustancias microbicidas, y mecanismos de reparación de tejido.

**Funciones celulares dependientes del factor nuclear NF-κB en fagocitos.**

Como ya se mencionó, la función principal de los fagocitos es la ingestión y destrucción de microorganismos potencialmente patógenos, a través de la fagocitosis y de la producción de sustancias microbicidas. Sin embargo, los fagocitos contribuyen además a la modulación de la respuesta inmunológica a través de la producción y liberación de sustancias que regulan el funcionamiento de otras células del sistema inmunológico, como son las citocinas [20, 21, 39, 40, 45]. El factor nuclear NF-κB es muy importante para regular la producción de diversas citocinas. NF-κB regula la activación de genes de interleucinas, como IL-1 [48-50], IL-12 [45, 51], IL-8 [18, 52], e IL-6 [53-55]. En neutrófilos, el factor nuclear NF-κB es además necesario para inhibir el proceso normal de apoptosis, que sufren los neutrófilos que no son activados [56-59]. Aunque es claro que la activación de NF-κB regula importantes funciones celulares de los fagocitos, los mecanismos de activación de este factor nuclear en estas células se conocen solo parcialmente.

### **Receptores Fc.**

Lo fagocitos de vertebrados, principalmente los fagocitos profesionales, son células altamente especializadas, que expresan en su membrana plasmática una gran variedad de receptores capaces de iniciar el proceso de fagocitosis. Entre éstos se encuentran los receptores para componentes del sistema de complemento [12, 60], receptores para células apoptóticas [61, 62], receptores con propiedades de lectina que reconocen azúcares complejos de diversos microorganismos [61-65], y los receptores para inmunoglobulinas (receptores Fc) [12, 66].

Los receptores Fc reconocen la porción constante de las inmunoglobulinas (porción Fc). Las inmunoglobulinas son uno de los ejes principales de la inmunidad específica, por lo que los receptores Fc constituyen un puente entre los mecanismos específicos de la inmunidad específica y los mecanismos inespecíficos y altamente destructivos de la inmunidad innata [66, 67]. Existen diferentes familias de receptores Fc, que reconocen distintas clases de inmunoglobulinas [12]. Se han descrito receptores Fc para las inmunoglobulinas G (Fc $\gamma$ R), para las inmunoglobulinas E (Fc $\epsilon$ R), y para las inmunoglobulinas A (Fc $\alpha$ R). La interacción de los receptores Fc con sus ligandos (entrecruzamiento) puede disparar respuestas celulares como la fagocitosis, el estallido respiratorio, la citotoxicidad dependiente de anticuerpos, la liberación de mediadores proinflamatorios y microbicidas, y la producción y liberación de citocinas [12, 68] (Fig. 2A). El tipo de respuesta celular que activan los receptores Fc depende del tipo de receptor involucrado, y del tipo celular en que estos receptores se expresen. Dentro de las diferentes familias de receptores Fc, únicamente los receptores Fc $\gamma$ R y Fc $\alpha$ R inducen fagocitosis [66, 69].

Dentro de la familia de receptores Fc los Fc $\gamma$ R son los más estudiados. Esto obedece a que sus ligandos, las inmunoglobulinas G, son de gran importancia en la respuesta inmunológica. Las inmunoglobulinas G son los anticuerpos más abundantes en el suero, inician eficientemente la cascada del complemento, y son la base de las respuestas humorales secundarias [33]. Una particularidad de los receptores Fc $\gamma$ R, que los hace especialmente interesantes, es su capacidad de disparar múltiples respuestas celulares de forma casi simultánea en una misma célula [14, 66] (Fig. 2B).

En humanos existen tres clases de receptores Fc $\gamma$ R: Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII, y Fc $\gamma$ RIII [66] (Fig. 3). Cada clase está compuesta por diferentes isoformas, que pueden ser producto de diferentes genes, o bien variantes generadas por "splicing" alternativo del ARN mensajero. Los receptores Fc $\gamma$ RI están constituidos por dos cadenas polipeptídicas: una cadena  $\alpha$  y una cadena accesoria  $\gamma$  [66] (Fig. 3). La cadena  $\alpha$  está codificada por tres genes homólogos (A, B y C), consta de una porción extracelular con tres secciones tipo inmunoglobulina, de una porción transmembranal y de una porción citoplásmica (Fig. 3) [66]. La cadena accesoria  $\gamma$  de Fc $\gamma$ RI posee en su porción citoplásmica secuencias de aminoácidos conocidas como ITAM (del inglés "Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif"), que son necesarias para la activación de respuesta celulares [70, 71] (Fig. 3). Los receptores Fc $\gamma$ RII están compuestos por una sola cadena  $\alpha$  codificada por dos genes (A y B) (Fig. 3). Los productos polipeptídicos de estos dos genes, Fc $\gamma$ RIIA y Fc $\gamma$ RIIB, son receptores de baja afinidad que sólo unen inmunoglobulinas agrupadas, como las que se encuentran formando complejos inmunes o sobre la superficie de microorganismos opsonizados. La cadena  $\alpha$  de Fc $\gamma$ RIIA o de Fc $\gamma$ RIIB tiene dos secciones tipo inmunoglobulina en su porción extracelular, una región transmembranal, y una región citoplásmica (Fig. 3). La región citoplásmica de Fc $\gamma$ RIIA contiene un ITAM activador [70, 71], mientras que la región citoplásmica de Fc $\gamma$ RIIB posee un ITIM (del inglés "Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif") inhibidor [66, 72] (Fig. 3). Los receptores Fc $\gamma$ RIIIA y Fc $\gamma$ RIIIB, están codificados por dos genes (A y B) y son receptores de baja afinidad. El receptor Fc $\gamma$ RIIIA está compuesto por una cadena  $\alpha$  y un dímero de cadenas accesorias  $\gamma/\gamma$  o  $\gamma/\zeta$  (Fig. 3). La cadena  $\alpha$  de Fc $\gamma$ RIIIA consta de una porción extracelular con dos secciones tipo inmunoglobulina, una porción transmem-

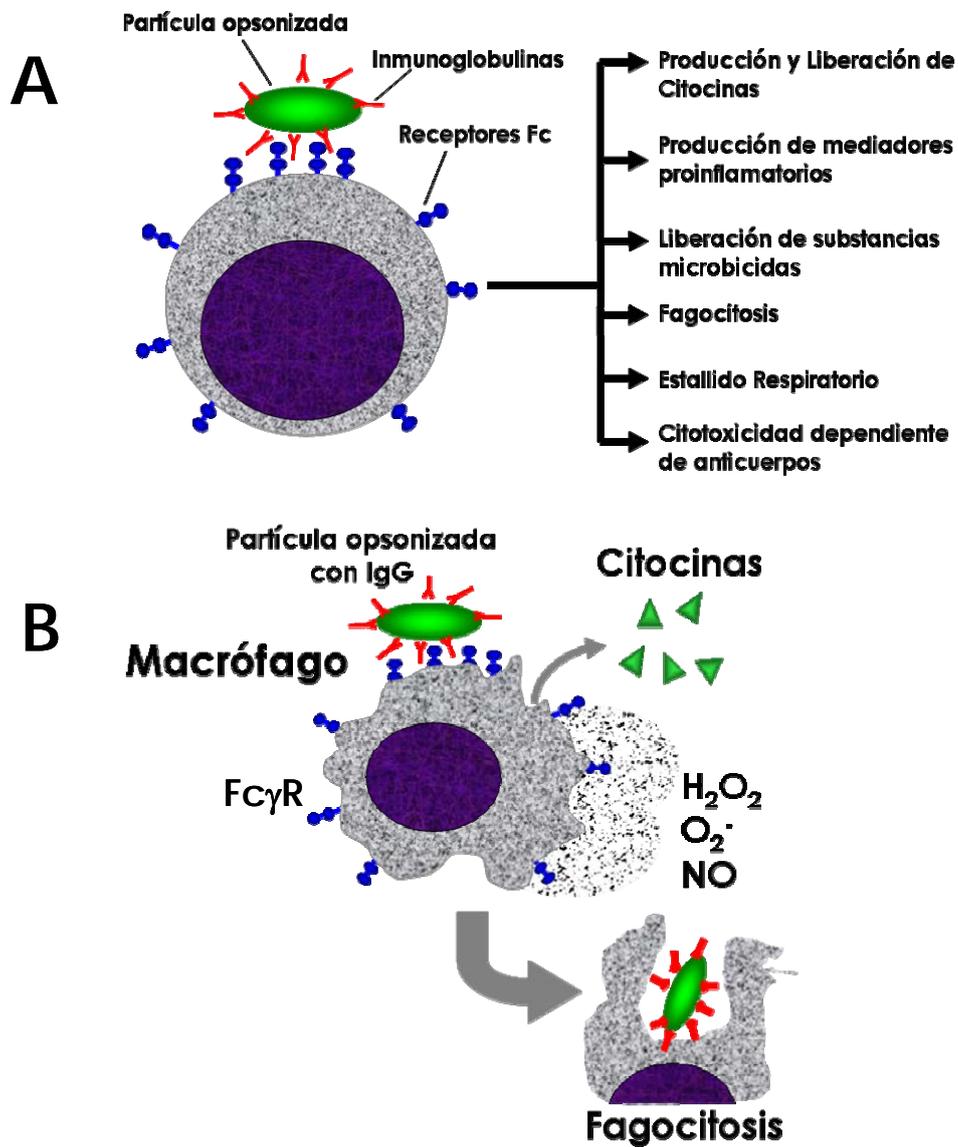
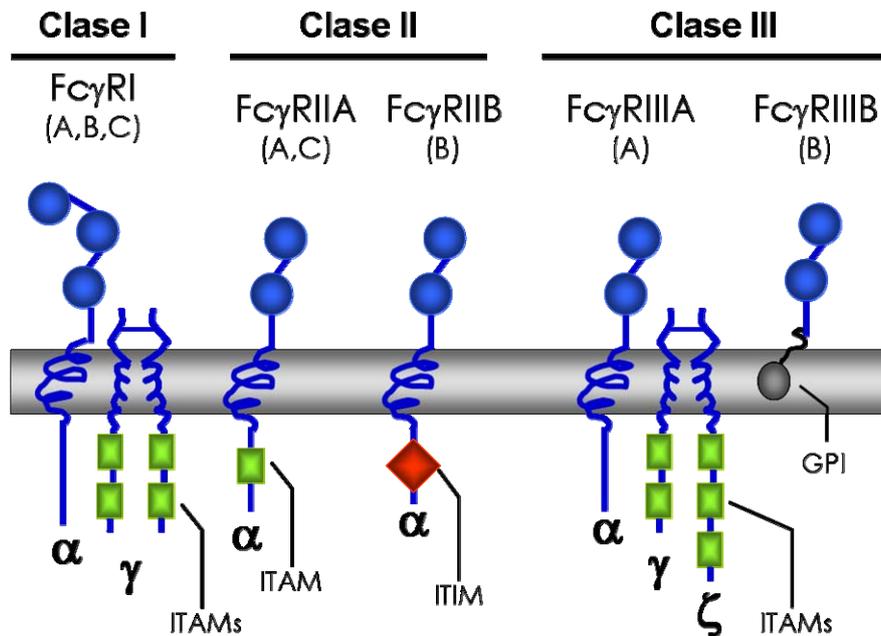


Figura 2. *Respuestas celulares activadas por Receptores Fc.* A) El entrecruzamiento de de Receptores Fc por medio de partículas opsonizadas puede activar diversas respuestas celulares, dependiendo del tipo de Receptor Fc que se entrecruce, y del tipo de célula en que estos receptores se expresen. B) El entrecruzamiento de receptores Fc $\gamma$ R puede activar múltiples respuestas celulares de manera casi simultánea.

branal, y una porción citoplásmica (Fig. 3). Las cadenas accesorias  $\gamma$  o  $\zeta$  contienen ITAMs [70, 71]. El receptor Fc $\gamma$ RIIIB está compuesto por una sola cadena  $\alpha$  con dos secciones tipo inmunoglobulina en su porción extracelular. A diferencia del resto de los receptores Fc $\gamma$ R, el receptor Fc $\gamma$ RIIIB no posee regiones transmembranal ni citoplásmica, y se encuentra unido a la membrana por medio de un ancla de glucofosfatidilinositol (Fig. 3).

Existen diferencias en la expresión de los receptores Fc $\gamma$ R en los distintos fagocitos [66]. Los neutrófilos expresan constitutivamente receptores Fc $\gamma$ RIIA y Fc $\gamma$ RIIIB, y pueden expresar Fc $\gamma$ RI si son activados con interferón gama [66]. Los monocitos expresan principalmente receptores Fc $\gamma$ RIIA, y en menor cantidad receptores Fc $\gamma$ RI [66]. Los macrófagos expresan abundantemente receptores Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA y Fc $\gamma$ RIIIA [66].

Si bien se conocen las diferentes respuestas celulares activadas por el entrecruzamiento de los receptores Fc $\gamma$ R, no se ha establecido claramente qué respuestas celulares son activadas por clases específicas de receptores Fc $\gamma$ R. Tampoco se ha establecido si un tipo de receptor Fc $\gamma$ R específico activa las mismas respuestas celulares en dos tipos celulares distintos.



**Figura 3. Familia de Receptores Fc $\gamma$ R humanos.** La familia de receptores Fc $\gamma$ R está compuesta por tres clases, I, II y III. A las cadenas polipeptídicas que componen cada receptor se asignan letras griegas ( $\alpha$ ,  $\gamma$ , o  $\zeta$ ). Las cadenas  $\alpha$  unen a la porción Fc de las inmunoglobulinas G. Las cadenas  $\alpha$  están codificados por distintos genes, A, B o C. La clase I sólo posee un miembro, Fc $\gamma$ RI, que es un receptor activador, asociado a un dímero de cadenas  $\gamma$  con ITAMs (Immunoreceptor, Tyrosine-based Activation Motif). La clase II posee 2 miembros, Fc $\gamma$ RIIA, que es un receptor activador con un ITAM en su porción citoplásmica; y Fc $\gamma$ RIIB, que es un receptor inhibidor con un ITIM (Immunoreceptor, Tyrosine-based Inhibition Motif) en su porción citoplásmica. La clase III posee dos miembros, Fc $\gamma$ RIIIA, que es un receptor activador asociado a un dímero de cadenas  $\gamma$  o  $\zeta$ ; y Fc $\gamma$ RIIIB, que es un receptor activador anclado a la membrana por una unidad de glucofosfatidilinositol (GPI).

**Transducción de señales por receptores Fc $\gamma$ R.** (*J Leukoc Biol*, 2002, 72:1092-1108. Ver apéndice A).

**Eventos tempranos de señalización.** Para la activación de respuestas celulares los receptores Fc necesitan ser agregados en la membrana plasmática, por unión a inmunoglobulinas agrupadas. La agregación, o entrecruzamiento, de los receptores Fc inicia cascadas de eventos bioquímicos conocidas como “vías de señalización”, o “vías de transducción de señales” [67, 68, 73].

El evento bioquímico que parece producirse de manera más temprana tras el entrecruzamiento de los receptores Fc $\gamma$ R es la activación de cinasas de tirosina de la familia de Src [74-76], asociadas a las regiones citoplásmicas de algunos receptores Fc $\gamma$ R [71, 77] (Fig. 4). Se piensa que el entrecruzamiento de los receptores Fc $\gamma$ R activa a las cinasas de la familia de Src [77]. Las cinasas Src activadas fosforilan tirosinas ubicadas en las regiones ITAM de los receptores Fc $\gamma$ R. Una vez fosforilados, los ITAMs sirven como sitios de anclaje para cinasas de la familia Syk/Zap70. Se piensa que la unión de las cinasas de Syk/Zap70 a los ITAMs es suficiente para activarlas [71]. Este modelo de activación secuencial de Fc $\gamma$ R  $\rightarrow$  Src  $\rightarrow$  Syk/Zap70 es relativamente simple. En realidad el mecanismo exacto de activación es más complejo, tal como lo sugieren trabajos recientes que indican la participación de lípidos de membrana en el mecanismo de activación de Src y Syk/Zap70 [78-81]. Existen además reportes que sugieren la existencia de mecanismos de señalización independientes de los ITAMs [75, 78, 82-87].

**Señalización posterior a Syk/Zap70.** En la vía de transducción de señales de los receptores Fc $\gamma$ R, los eventos de señalización posteriores a la activación de Syk/Zap70 se conocen sólo parcialmente (Fig. 4). Posteriormente a la activación de Syk/Zap70 se ha reportado la activación de enzimas de la familia de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI 3-K), la activación de algunos miembros de la familia de la proteína cinasa C (PKC), la activación de la cinasa activada por mitógenos (ERK), la activación de fosfolipasa C gama (PLC $\gamma$ ), un incremento en la concentración de intracelular de calcio, la activación de la fosfolipasa A2 (PLA2), y la activación de la fosfolipasa D (PLD) [67, 73, 88] (Fig. 4). Dada la variedad de respuestas celulares que son activadas por Fc $\gamma$ R, no resulta sorprendente el número de moléculas involucradas en la vía de señalización de estos receptores. En la actualidad la disección de las vías de señalización activadas por los diferentes receptores Fc $\gamma$ R, y la participación de distintas moléculas de señalización en respuestas celulares activadas por estos receptores, son campos de investigación muy activos.

A continuación se presentan detalles de algunas de las moléculas que participan en la vía de señalización de los receptores Fc $\gamma$ R, posteriormente a la activación de Syk/Zap70.

**Fosfatidilinositol 3-cinasa (PI 3-K).** Las enzimas la familia de PI 3-K fosforilan el anillo de inositol en la posición tres [89, 90]. La familia de PI 3-K está compuesta por tres clases (I, II, y III) de enzimas [89]. Estas enzimas constan de dos subunidades: una subunidad reguladora y una subunidad catalítica. Sólo las enzimas de la clase I parecen poseer un papel importante en la vía de transducción de señales de los receptores Fc $\gamma$ R [90]. Las enzimas PI 3-K clase I se dividen en dos subclases: IA y IB. Las enzimas PI 3-K IA interaccionan con la forma activa de la enzima Ras, y pueden ser activadas por unión a otras moléculas de señalización, a través de sus dominios SH2 que unen tirosinas fosforiladas [91, 92]. Las enzimas PI 3-K IB son activadas por interacción con las subunidades  $\beta\gamma$  de proteínas G heterotriméricas [91, 92]. Ambas subclases de PI 3-K pueden ser activadas por el entrecruzamiento de receptores Fc $\gamma$ R [93-95]. Experimentos *in vitro* han mostrado que los productos de PI 3-K clase I pueden activar isoformas específicas de PKC, como PKC $\beta$ 1 [96], PKC $\delta$  [97], PKC $\theta$  [97], PKC $\epsilon$  [96, 97], PKC $\nu$  [96] y PKC $\zeta$  [98], que también pueden participar en la vía de señalización de los receptores Fc $\gamma$ R. En algunos tipos celulares se ha documentado la participación de PI 3-K clase I en la regulación de la fagocitosis [99, 100] y el estallido respiratorio [101, 102], activados por

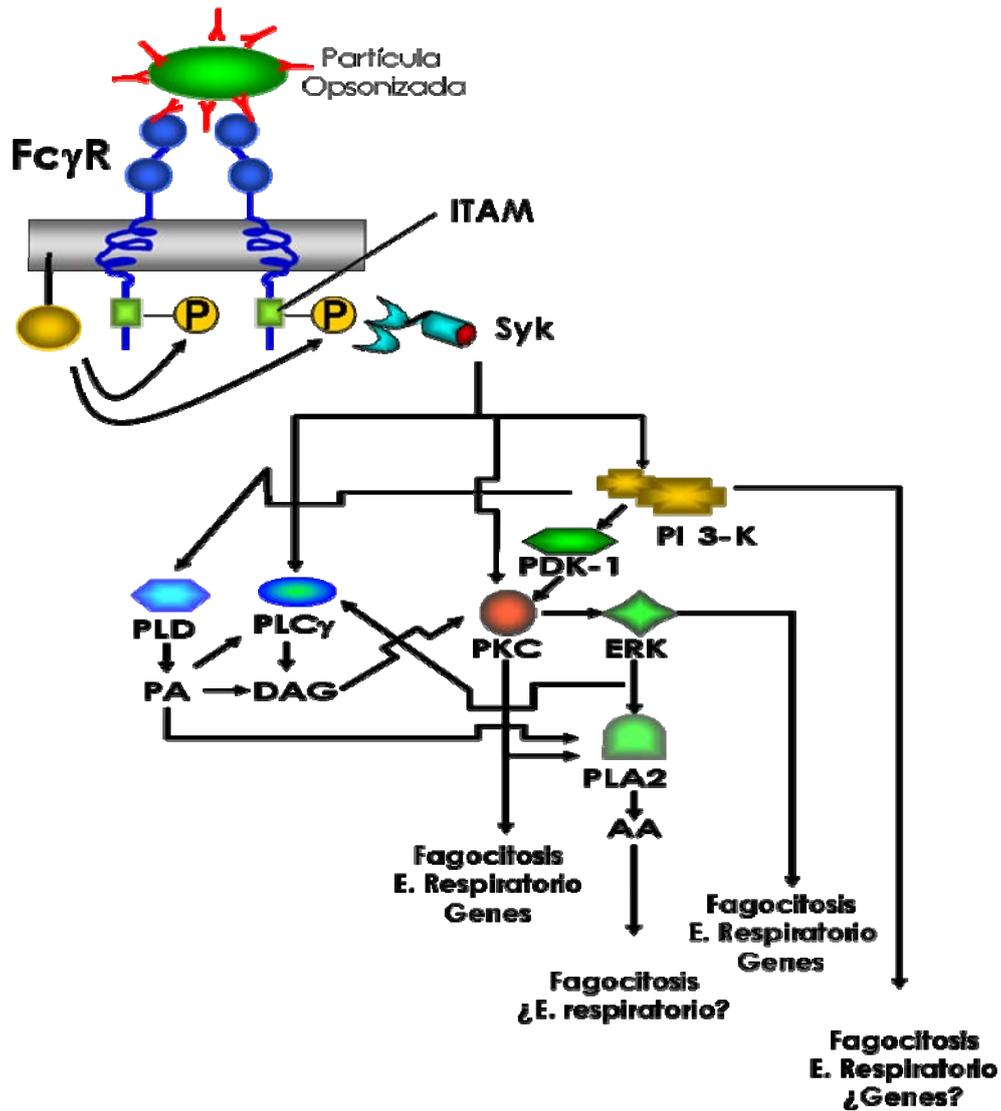


Figura 4. Representación esquemática de la vía de transducción de señales de receptores FcγR. La agregación, o entrecruzamiento, de receptores FcγR por partículas opsonizadas con inmunoglobulinas G activa cinasas de la familia Src, que fosforilan los ITAMs de los receptores. Los ITAMs fosforilados (P) sirven como sitios de anclaje para cinasas de la familia de Syk. Las enzimas de la familia de Syk al ser activadas inducen la activación de otras moléculas de señalización, involucradas en la regulación de diferentes respuestas celulares. Véanse detalles en el texto. PA, ácido fosfatídico; DAG, diacilglicerol; AA, ácido araquidónico.

receptores Fc $\gamma$ R. PI 3-K parece regular la fagocitosis a través de la extensión de pseudópodos [99, 103, 104]. El papel de PI 3-K en la regulación del estallido respiratorio está probablemente relacionado con la activación de isoformas de PKC [89, 90, 105], que pueden regular esta respuesta celular. PI 3-K parece estar implicada en la activación de genes dependientes del factor nuclear NF- $\kappa$ B en algunos sistemas [106, 107]. Su participación en la activación de genes a través de receptores Fc $\gamma$ R no está descrita. No es claro tampoco, si todos los tipos celulares que expresan receptores Fc $\gamma$ R utilizan PI 3-K clase IA o IB para activar diferentes respuestas celulares. Tampoco está claro si todos los tipos de receptores Fc $\gamma$ R activan a enzimas de esta familia, ni si todas las respuestas celulares activadas por Fc $\gamma$ R dependen de la activación de PI 3-K.

**Proteína cinasa C (PKC).** Las enzimas de la familia de PKC son cinasas de serina y treonina que se clasifican en cuatro subfamilias, en función de su estructura y de su necesidad de cofactores para poder ser activadas [108]. Las enzimas de la familia de PKC son citosólicas, pero se translocan a la membrana plasmática en respuesta a diversos estímulos activadores, entre los que se encuentra el entrecruzamiento de los receptores Fc $\gamma$ R [109-111]. Se ha reportado que enzimas de la familia de PKC pueden activar, aunque posiblemente de forma indirecta, a otras moléculas involucradas en la vía de señalización de los receptores Fc $\gamma$ R como la fosfolipasa A2 [112, 113] o ERK [114, 115]. Se ha reportado la participación de PKC en la regulación de la fagocitosis mediada por receptores Fc $\gamma$ R [110, 112, 114, 116], así como del estallido respiratorio activado por estos receptores [101, 110]. Se ha sugerido que el papel de PKC en la regulación de la fagocitosis podría estar relacionado con la activación de la fosfolipasa A2 [113, 117] y de la enzima ERK [114, 115, 118]. El estallido respiratorio requiere la activación de la oxidasa de NADPH por PKC [101, 119, 120]. Se ha reportado también la participación de PKC en la activación de factores nucleares por receptores Fc $\gamma$ R [121], pero el mecanismo que regula esta activación se desconoce. Aunque se ha reportado que isoformas particulares de PKC pueden regular respuestas celulares específicas [110, 122], no está claro si todos los tipos de receptores Fc $\gamma$ R activan a enzimas de esta familia, o si diferentes clases de Fc $\gamma$ R activan isoformas específicas de PKC.

**Cinasa activada por mitógenos (ERK).** ERK pertenece a una familia de cinasas de serina y treonina que incluye a JNK, y a p38MAPK [123]. La enzima ERK, posee dos isoformas; una de 42 kDa y otra de 44 kDa, denominadas ERK-1 y ERK-2 respectivamente. Estas enzimas son reguladas por fosforilación en residuos de serinas, treoninas y tirosinas [123]. Se conocen diferentes vías de activación de ERK dependientes de PI 3-K, PKC, o Ras [67, 73, 88, 123]. Existen diversos sustratos para ERK relacionados con el proceso de fagocitosis. Entre estos se encuentran proteínas asociadas al citoesqueleto, como la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK) [124], y proteínas de señalización citoplásmicas como PLA2 citoplásmica [125]. En diferentes tipos celulares, la activación de ERK induce su traslocación al núcleo, donde fosforila factores de transcripción como Elk-1, c-Myc, c-Jun, c-Fos, and C/EBP beta, y así regula la expresión de genes [126-128]. ERK parece ser central en la vía de señalización de los receptores Fc $\gamma$ R [67, 73, 114, 129-132]. En algunos tipos celulares se ha reportado que la activación de ERK es necesaria para la fagocitosis mediada por receptores Fc $\gamma$ R [114, 124], para la activación del estallido respiratorio [133, 134], y para la activación de genes de citocinas por receptores Fc $\gamma$ R [50]. Aunque ERK es una enzima central en la vía de señalización por Fc $\gamma$ R, la participación de esta enzima en la regulación de diferentes respuestas celulares parece no ser una generalidad en todos los fagocitos. La estimulación de receptores Fc en monocitos ([115] y capítulo I de esta tesis [135]) y en microglia [132] activa el proceso de fagocitosis de forma independiente de ERK.

**Fosfolipasa A2 (PLA2).** La enzima PLA2 produce ácido araquidónico a partir de fosfatidilcolina o de fosfatidiletanolamina [90]. Se ha reportado la activación de esta enzima por entrecruzamiento de receptores Fc $\gamma$ R [90, 117, 136]. Aunque el ácido araquidónico parece

actuar como un segundo mensajero en la vía de señalización de los receptores Fc $\gamma$ R [137], aún no se ha identificado qué moléculas son reguladas por este segundo mensajero en el sistema inmunológico. El ácido araquidónico parece ser importante para la extensión de pseudópodos y para la formación del fagosoma durante la fagocitosis mediada por receptores Fc $\gamma$ R [117, 136]. Existen reportes contradictorios respecto a la participación de la PLA2 en la activación del estallido respiratorio [119, 138]. No está claro si todas las clases de receptores Fc $\gamma$ R utilizan PLA2 como parte de sus vías de señalización.

**Fosfolipasa C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ).** La enzima PLC $\gamma$  es reclutada a los ITAMs fosforilados, a través de sus dominios SH2. Esta enzima cataliza la formación de inositoltrifosfato y diacilglicerol a partir de fosfatidilinositol-4, 5 bifosfato [90]. El inositoltrifosfato actúa sobre receptores en el retículo endoplásmico que provocan la liberación de Ca<sup>+2</sup>. Tanto el Ca<sup>+2</sup> como el diacilglicerol son necesarios para la activación de isoformas de PKC convencionales y nuevas [90]. Se ha reportado la activación de PLC $\gamma$  tras el entrecruzamiento de receptores Fc $\gamma$ R [139-141]. La inhibición de PLC $\gamma$  provoca una disminución de la fagocitosis mediada por receptores Fc $\gamma$ R [142]. La participación de PLC $\gamma$  en las respuestas celulares activadas por receptores Fc $\gamma$ R está relacionada con su capacidad de activar a PKC, a través del diacilglicerol y de la liberación de Ca<sup>+2</sup>. El papel del Ca<sup>+2</sup> en la regulación de las respuestas celulares activadas por receptores Fc $\gamma$ R no está muy claro, pues se ha reportado que, al menos la fagocitosis, puede ocurrir de forma independiente de este segundo mensajero [143].

**Fosfolipasa D (PLD).** La enzima PLD cataliza la formación de ácido fosfatídico, a partir de fosfatidilcolina. El ácido fosfatídico puede actuar como segundo mensajero activando enzimas como PLC $\gamma$  y PLA2 [90]. El ácido fosfatídico puede también ser metabolizado en diacilglicerol y activar a PKC [90]. Se ha reportado que el entrecruzamiento de receptores Fc $\gamma$ R induce la activación de PLD [144, 145]. En neutrófilos la inhibición de PLD bloquea la fagocitosis mediada por receptores Fc $\gamma$ R [145]. La participación de PLD en la regulación de respuestas celulares activadas por receptores Fc $\gamma$ R puede estar relacionada con la activación de PKC, a través de la formación de DAG a partir del ácido fosfatídico [90]. Aunque se reportó que el entrecruzamiento específico de Fc $\gamma$ R1IIIA induce la activación de PLD en células NK [146], en células fagocíticas se desconoce cuáles tipos de receptores Fc $\gamma$ R pueden activar a PLD.

### **Microdominios de membrana (MDM) y transducción de señales.**

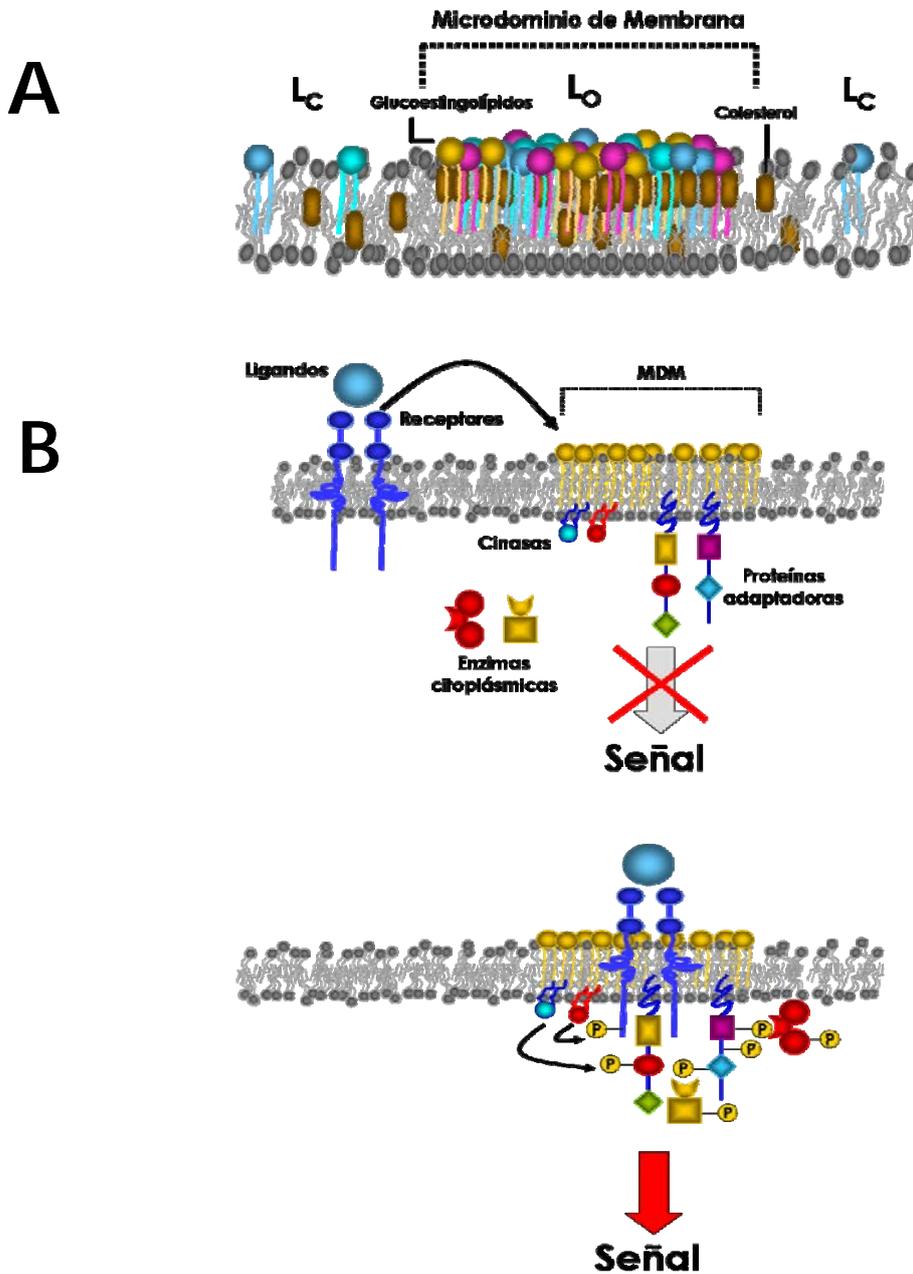
Los microdominios de membrana (MDM) se describieron inicialmente en células epiteliales, como estructuras lipídicas responsables del transporte de proteínas desde Golgi hacia la membrana apical [147-149]. Debido a esta función de transporte, los MDM también son llamados "lipid rafts" o "balsas de lípidos". Si bien la composición y estructura precisas de los MDM siguen siendo sujetos de intenso debate [148, 150, 151], las evidencias que indican que estas estructuras membranales son importantes para diversas funciones celulares siguen acumulándose [147, 148, 152, 153].

Uno de los modelos más aceptados sobre la naturaleza y el comportamiento de los MDM postula que existe una separación de fase entre los MDM y el resto de la membrana plasmática [148, 151]. Esta separación obedece a la composición de lípidos de los MDM, rica en esfingolípidos y colesterol, que podría mantenerlos en una fase de líquido ordenado, distinta de la fase de líquido cristalino del resto de la membrana plasmática [148, 151, 154] (Fig. 5A). Si bien este modelo está fundamentado en estudios de membranas modelo y de lípidos extraídos de membranas biológicas ("membranas resistentes a detergentes"), se piensa que los MDM en membranas biológicas *in vivo* poseen al menos en parte la propiedad de líquido ordenado [148, 151, 154].

Reportes recientes indican que los MDM, además de su función de transporte, son importantes para la transducción de señales [81, 152, 155-160]. Se ha encontrado una gran variedad de receptores asociados a MDM, y diversas funciones celulares parecen depender de

la integridad de los MDM [81, 152, 155-160]. Se ha postulado que los MDM actúan como “plataformas de señalización”, concentrando moléculas implicadas en vías de señalización específicas [81, 152, 153, 156, 158] (Fig. 5B). No sólo se han encontrado receptores de membrana asociados a MDM, sino también cinasas de diferentes familias, y proteínas adaptadoras, que se cree pueden estar formando complejos moleculares eficientes que permiten la transducción de señales (Fig. 5B) [81, 152, 160]. Las investigaciones relativas a la participación de los MDM en mecanismos de señalización han ido cobrando importancia en los últimos años.

Se ha demostrado que diversos receptores del sistema inmunológico, incluyendo los receptores de antígeno de los linfocitos y algunos receptores Fc, se asocian de forma transitoria a los MDM de manera dependiente de ligando [81, 153, 155-159]. Dentro de la familia de los receptores Fc $\gamma$ R, Fc $\gamma$ RIIA [80, 161], Fc $\gamma$ RIIB [162] y Fc $\gamma$ RIIIA [163] se han encontrado asociados a MDM. El mecanismo molecular que permite esta asociación no se conoce.



**Figura 5. Microdominios de membrana (MDM) y transducción de señales.** A) Los MDM son estructuras membranales que, por su composición de lípidos (enriquecida en esfingolípidos y colesterol), se encuentran en una fase de líquido ordenado ( $L_o$ ) distinta a la fase de líquido cristalino ( $L_c$ ) del resto de la membrana. B) Modelo de señalización dependiente de MDM. La unión de un receptor a su ligando induce su asociación con MDM, donde residen cinasas y proteínas adaptadoras. La activación de estas cinasas induce la formación de complejos de señalización, que dependen en muchos casos de la fosforilación de proteínas (P).

### **3. OBJETIVO.**

El objetivo general de este trabajo fue el análisis de los mecanismos de transducción de señales que regulan diversas funciones celulares en células fagocíticas de vertebrados y de invertebrados. Se plantearon cinco objetivos específicos:

1. Determinar si la fagocitosis y la activación del factor nuclear NF- $\kappa$ B, que se observan tras el entrecruzamiento de receptores Fc $\gamma$ R en fagocitos humanos, están reguladas por una única vía de señalización.
2. Determinar si la vía de señalización que activan los receptores Fc $\gamma$ R para la regulación de la fagocitosis presenta diferencias entre fagocitos humanos profesionales y fagocitos humanos no profesionales.
3. Conocer el mecanismo por medio del cual los receptores Fc $\gamma$ R pueden asociarse a MDM, y saber si esta asociación es necesaria para la activación de respuestas celulares como la fagocitosis y la activación de NF- $\kappa$ B.
4. Determinar si los diferentes tipos de receptores Fc $\gamma$ R expresados por neutrófilos humanos pueden inducir la activación de factores nucleares como NF- $\kappa$ B y Elk-1.
5. Identificar los fagocitos profesionales del sistema inmunológico del molusco *Mytilus galloprovincialis*, y determinar si enzimas de señalización que regulan funciones celulares de fagocitos en vertebrados también regulan funciones celulares de fagocitos en invertebrados.

#### 4. CAPÍTULO I.

**En monocitos la fagocitosis y la activación de NF- $\kappa$ B son reguladas por diferentes vías de señalización.** (*J Leukoc Biol*, 2001, 70: 649-658. Ver apéndice B).

**Antecedentes:** El entrecruzamiento de receptores Fc $\gamma$ R activa diferentes respuestas celulares de forma casi simultánea. En fagocitos humanos, el entrecruzamiento de receptores Fc $\gamma$ R promueve la fagocitosis de partículas opsonizadas con inmunoglobulinas G [12], así como la producción de citocinas proinflamatorias dependientes del factor nuclear NF- $\kappa$ B [164, 165], como IL-1 [50], IL-6 [166], IL-8 [167], y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  [168, 169]. No era claro, sin embargo, si estas dos respuestas celulares (i.e. fagocitosis y activación de NF- $\kappa$ B) estaban reguladas por una misma vía de señalización; o bien si existían diferentes vías de señalización que regularan estas funciones de manera independiente.

Se ha reportado que las enzimas ERK [50, 129, 130] y PI 3-K [118, 170] pueden ser activadas por el entrecruzamiento de receptores Fc $\gamma$ R. En monocitos humanos la activación de ERK es independiente de la vía clásica de Ras [50]. Se desconoce qué otras señales participan en la activación de ERK en estas células. En otros sistemas experimentales se ha demostrado que PI 3-K puede activar a ERK de manera independiente de Ras [171], por lo que era posible que en monocitos ocurriera algo similar.

Se había reportado que en neutrófilos y en macrófagos las enzimas ERK y PI 3-K son necesarias para la fagocitosis mediada por receptores Fc $\gamma$ R [99, 100, 114, 124], pero en monocitos no era claro si estas enzimas regulaban esta respuesta celular. Aunque en diferentes sistemas experimentales se ha reportado que las enzimas ERK [50] y PI 3-K [172, 173] participan en la activación de NF- $\kappa$ B, no se conocía si ambas enzimas eran necesarias para la activación de NF- $\kappa$ B por receptores Fc $\gamma$ R.

**Hipótesis:** Se utilizaron monocitos humanos como modelo experimental para explorar las siguientes hipótesis:

- A) La activación de ERK, inducida por receptores Fc $\gamma$ R, ocurre a través de PI 3-K.
- B) La fagocitosis y la activación de NF- $\kappa$ B, mediadas por receptores Fc $\gamma$ R, están reguladas por PI 3-K y ERK, dentro de una misma vía de señalización.

**Resultados:** Para establecer si la activación de ERK inducida por Fc $\gamma$ R requiere la actividad de PI 3-K se utilizaron dos inhibidores farmacológicos de esta enzima (wortmannina y LY294002). El entrecruzamiento de receptores Fc $\gamma$ R con complejos inmunes insolubles indujo la activación de ERK. El tratamiento de los monocitos con wortmannina o LY294002, antes del entrecruzamiento de los receptores Fc $\gamma$ R, bloqueó por completo esta activación. Wortmannina o LY294002 disminuyeron sustancialmente la activación de la cinasa MEK (responsable de la activación de ERK) inducida por receptores Fc $\gamma$ R [123]. Ambos inhibidores bloquearon completamente la activación de PI 3-K por Fc $\gamma$ R. Estos resultados indicaron que, en monocitos humanos, la vía de señalización que activa a ERK, a partir de Fc $\gamma$ R, requiere de la activación de PI 3-K.

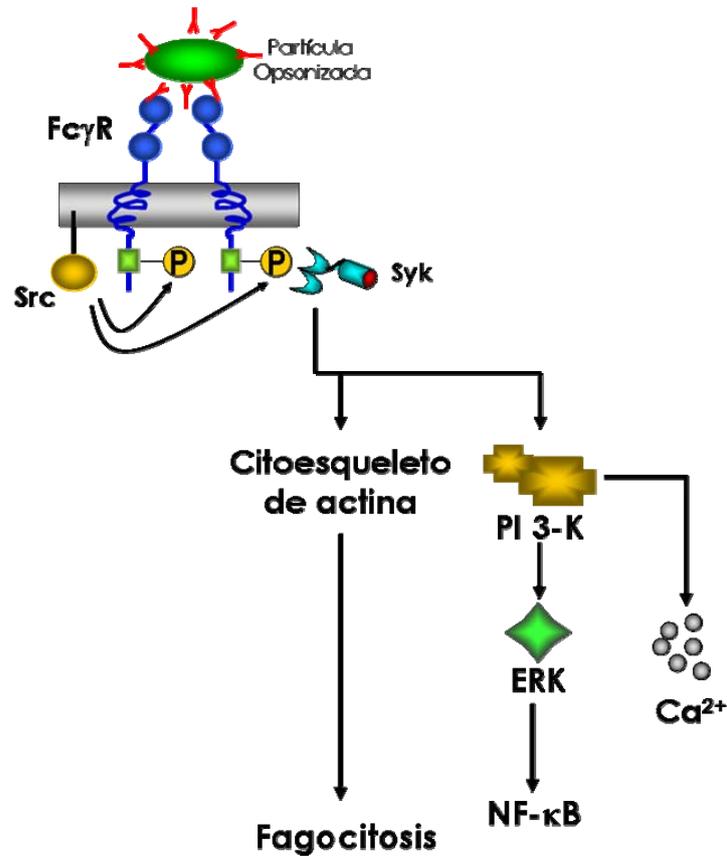
La activación de NF- $\kappa$ B, en respuesta al entrecruzamiento de receptores Fc $\gamma$ R, se vio disminuida cuando los monocitos se trataron previamente con wortmannina o LY294002. En monocitos humanos la activación de NF- $\kappa$ B por receptores Fc $\gamma$ R depende de la activación de ERK [50]. Por lo tanto, nuestros resultados indican que en monocitos la vía de señalización que activa a NF- $\kappa$ B a partir de receptores Fc $\gamma$ R depende de la activación secuencial de PI 3-K  $\rightarrow$  ERK.

A continuación quisimos determinar si la vía de señalización PI 3-K  $\rightarrow$  ERK también regula el proceso de fagocitosis dependiente de receptores Fc $\gamma$ R. La fagocitosis de eritrocitos opsonizados con IgG (ElgG) no se vio afectada por los inhibidores de ERK o de PI 3-K. Estos

resultados indicaron que, a diferencia de la activación de NF- $\kappa$ B, la fagocitosis mediada por receptores Fc $\gamma$ R en monocitos es independiente de estas dos enzimas.

El entrecruzamiento de receptores Fc $\gamma$ R induce un aumento de la concentración de calcio intracelular ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) [174, 175], que puede ser necesario en algunos tipos celulares para la activación del estallido respiratorio [176, 177] y la fagocitosis [143, 178]. En células activadas por receptores Fc $\epsilon$ RI, PI 3-K regula la elevación de calcio intracelular [179]. Quisimos entonces determinar si la elevación de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> inducida por Fc $\gamma$ R depende de PI 3-K, y si esta respuesta de calcio es necesaria para la fagocitosis de IgG. La estimulación de monocitos con complejos inmunes insolubles indujo un aumento de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Éste se vio sustancialmente disminuido en células previamente tratadas con wortmannina, y fue completamente bloqueado por el quelante intracelular de calcio MAPTAM. Para determinar si la respuesta de calcio es necesaria para la fagocitosis por Fc $\gamma$ R, los monocitos se trataron con MAPTAM, un quelante de calcio, antes de incubarlos con IgG. El tratamiento con MAPTAM no tuvo ningún efecto sobre la fagocitosis de IgG. Estos resultados apoyan la idea de que la vía de señalización que regula la fagocitosis por Fc $\gamma$ R es independiente de la vía de señalización que pasa por PI 3-K, y que regula la activación de ERK y la respuesta de calcio. Lo que es más, la fagocitosis de IgG, pero no la activación de NF- $\kappa$ B, se vio disminuida por un agente despolimerizante del citoesqueleto de actina; reforzando la idea de que las vías de señalización que regulan la fagocitosis y la activación de NF- $\kappa$ B a través de receptores Fc $\gamma$ R son diferentes (Fig. 6).

**Conclusiones:** Nuestros resultados muestran claramente que la vía de señalización que activa a ERK, tras el entrecruzamiento de receptores Fc $\gamma$ R, depende de PI 3-K (Fig. 6). También mostramos que a diferencia de neutrófilos y macrófagos [99, 100, 114, 124], los monocitos no utilizan a PI 3-K o a ERK para regular la fagocitosis por Fc $\gamma$ R (Fig. 6). Nuestros resultados sugieren fuertemente la existencia de dos vías de señalización activadas por receptores Fc $\gamma$ R, que regulan de forma independiente la activación de NF- $\kappa$ B y la fagocitosis (Fig. 6).



**Figura 6.** En monocitos dos vías de señalización independientes regulan la fagocitosis y la activación de NF-κB, a través de receptores FcγR. En monocitos el entrecruzamiento de receptores FcγR induce la activación de dos vías de señalización que regulan la activación de NF-κB y la fagocitosis de manera independiente. La activación de NF-κB requiere a las enzimas PI 3-K y ERK, y es independiente del citoesqueleto de actina. La fagocitosis, por otro lado, depende del citoesqueleto de actina, pero no de las enzimas PI 3-K o ERK, ni del aumento del calcio intracelular dependiente de PI 3-K.

## 5. CAPÍTULO II.

**Reclutamiento de PI 3-K y ERK para la regulación de la fagocitosis por receptores Fc $\gamma$ R, durante la diferenciación de monocitos.** (*J Leukoc Biol*, 2002, 72:107-114. Ver apéndice C).

**Antecedentes:** En el capítulo anterior establecimos que, a diferencia de los fagocitos profesionales humanos (neutrófilos y macrófagos) [99, 100, 114, 124], los monocitos no utilizaban a PI 3-K o a ERK para regular la fagocitosis dependiente de receptores Fc $\gamma$ R.

**Hipótesis:** Considerando que los monocitos son los precursores de los macrófagos, quisimos probar las siguientes hipótesis:

- A) Las enzimas PI 3-K y ERK son reclutadas para la regulación de la fagocitosis, durante el proceso de diferenciación monocito  $\rightarrow$  macrófago.
- B) En fagocitos profesionales (macrófagos y neutrófilos), la participación de PI 3-K y de ERK en la fagocitosis por receptores Fc $\gamma$ R hace este proceso más eficiente.

**Resultados:** Utilizamos inhibidores farmacológicos de PI 3-K (wortmannina o LY294002) y de ERK (PD98059) para evaluar la participación de estas enzimas en la fagocitosis por receptores Fc $\gamma$ R de neutrófilos, monocitos, y macrófagos derivados de monocitos (MacDM).

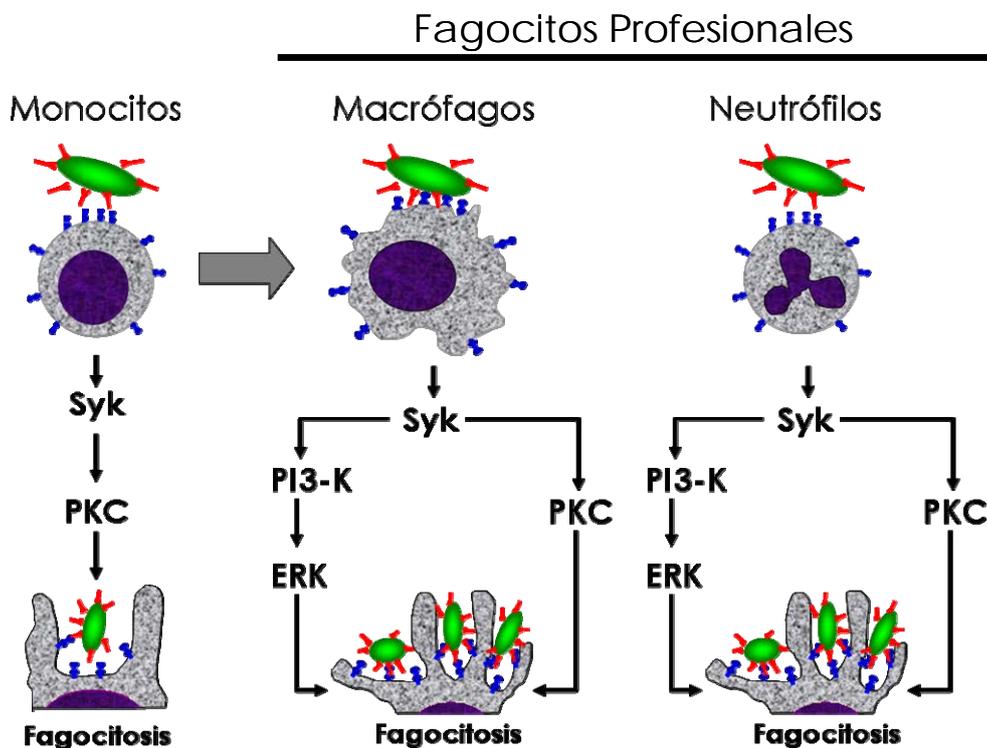
La fagocitosis de eritrocitos opsonizados con IgG (ElgG) se vio disminuida por los inhibidores de PI 3-K y de ERK en neutrófilos, pero no en monocitos de la línea celular THP-1, ni en monocitos humanos purificados de sangre periférica. Se ha reportado que PKC regula la fagocitosis por receptores Fc $\gamma$ R en diferentes tipos celulares, incluyendo los neutrófilos [110, 112, 114, 116, 180]. El tratamiento de monocitos con un inhibidor de PKC (estaurosporina) bloqueó la fagocitosis de ElgG. Estos resultados indican que existen diferencias entre las vías de señalización que regulan la fagocitosis por Fc $\gamma$ R en neutrófilos y en monocitos. A diferencia de los neutrófilos, los monocitos no utilizan a PI 3-K o a ERK para la fagocitosis por Fc $\gamma$ R, aunque este tipo de fagocitosis sí depende de PKC.

Utilizamos una combinación de ácido retinoico e interferón- $\gamma$  para inducir la diferenciación de monocitos hacia macrófagos. La capacidad de estos compuestos para inducir la diferenciación de monocitos se confirmó analizando distintos marcadores de macrófagos, como está reportado [181, 182]. A diferencia de los monocitos, los MacDM diferenciados por 24 horas mostraron una disminución sustancial de la fagocitosis de ElgG al ser tratados previamente con el inhibidor de ERK. Sin embargo, a las 24 horas de diferenciación ningún inhibidor de PI 3-K tuvo efecto sobre la fagocitosis de ElgG por MacDM. En contraste, la inhibición tanto de PI 3-K como de ERK disminuyó la fagocitosis de ElgG por MacDM diferenciados por 48 horas. El tratamiento con estaurosporina bloqueó la fagocitosis de ElgG en MacDM diferenciados por 24 o 48 horas. Estos resultados indicaron que hay un reclutamiento secuencial de ERK y PI 3-K para la regulación de la fagocitosis, durante el proceso de diferenciación monocito  $\rightarrow$  macrófago. ERK se recluta primero y PI 3-K se recluta después. La diferenciación monocito  $\rightarrow$  macrófago, sin embargo, no altera la participación de PKC en la fagocitosis. La expresión de ERK o PI 3-K, a nivel de RNA mensajero o proteína, no cambió durante la diferenciación de monocitos; sugiriendo que el mecanismo de regulación de fagocitosis por estas enzimas depende eventos de señalización adicionales, o bien de la expresión de algún otro factor que no ha sido identificado.

Se sabe que todos los fagocitos presentan en condiciones basales un nivel de fagocitosis pobre, que aumenta cuando las células son activadas [12, 183-185]. Quisimos determinar si la utilización de PI 3-K y ERK permite a los fagocitos profesionales alcanzar una fagocitosis eficiente cuando son activados. El nivel de fagocitosis observado en condiciones basales (i.e. en ausencia de estímulos activadores) no fue diferente entre neutrófilos, monocitos, o MacDM diferenciados por 24 o 48 horas. Sin embargo tras la activación de las células con ésteres de forbol, únicamente los neutrófilos y los MacDM diferenciados por 48 horas mostraron alta

actividad fagocítica. Es interesante notar que únicamente neutrófilos y los MacDM diferenciados por 48 horas utilizan a tanto a PI 3-K y a ERK para fagocitosis. Esta observación apoya la idea de que la utilización de ambas enzimas permite que se dé un proceso de fagocitosis eficiente, una vez que las células son activadas (Fig. 7).

**Conclusiones:** Los resultados presentados en este capítulo muestran que la vía de señalización que activan los receptores FcγR para la regulación de la fagocitosis es diferente entre fagocitos profesionales y fagocitos no profesionales (Fig. 7). Las enzimas PI 3-K y ERK son reclutadas a la maquinaria fagocítica durante la diferenciación monocito → macrófago. Nuestros resultados sugieren además que la utilización de PI 3-K y ERK para la regulación de la fagocitosis permite que esta respuesta celular se dé eficientemente (Fig. 7).



**Figura 7.** La vía de señalización para la fagocitosis por FcγR es diferente entre fagocitos profesionales y fagocitos no profesionales. En fagocitos profesionales (neutrófilos y macrófagos), la fagocitosis está regulada por las enzimas PI 3-K, ERK y PKC. En monocitos únicamente PKC participa en la fagocitosis por FcγR. Las enzimas PI 3-K y ERK son reclutadas a la maquinaria fagocítica durante la diferenciación monocito → macrófago. La utilización de PI 3-K y ERK para la regulación de la fagocitosis permite que esta respuesta celular sea eficiente.

## 6. CAPÍTULO III.

**La vía de señalización del receptor Fc $\gamma$ RIIA puede ser modulada por su asociación de con microdominios de membrana (MDM).** (*J Immunol*, 2007, 178:3048-3058. Ver apéndice D).

**Antecedentes:** Se ha postulado que los MDM pueden actuar como “plataformas de señalización”, concentrando moléculas implicadas en vías de señalización [81, 152, 153, 158, 160]. Se ha demostrado que algunos inmunorreceptores, como los receptores de antígeno de linfocitos y algunos receptores Fc, se asocian de forma transitoria a los MDM, tras interactuar con sus ligandos [81, 153, 155-159]. Los receptores Fc $\gamma$ RIIA [80, 161], Fc $\gamma$ RIIB [162] y Fc $\gamma$ RIIIA [163], se han encontrado asociados a MDM tras ser entrecruzados. En otros sistemas experimentales se ha reportado que diferentes proteínas de membrana requieren regiones específicas de sus cadenas polipeptídicas para poder asociarse a MDM [186-190], y también que algunas proteínas membranales requieren modificaciones postraduccionales, como la acilación de aminoácidos localizados en regiones cercanas a la membrana plasmática, para poder asociarse a MDM [187, 191]. En el caso de los Fc $\gamma$ R no se conocía qué parte de la molécula o posible modificación postraduccional era necesaria para su asociación con MDM.

También se ha postulado que la asociación de receptores de membrana con MDM induce la formación de complejos de señalización eficientes, que permiten la activación de diversas respuestas celulares [78, 155, 161, 162]. La validez de esta idea ha sido cuestionada [192] debido al tipo de metodología que se ha usado para relacionar a los MDM con funciones celulares específicas. Como el colesterol es un componente esencial de los MDM [149-151], la relación entre funciones celulares y MDM se ha inferido, en muchos casos, a partir de experimentos en los que se extrae el colesterol de la membrana por métodos químicos [151, 192, 193]. Se ha reportado que la extracción de colesterol puede alterar la estructura y función celular, de formas no necesariamente relacionadas con eventos de transducción de señales [192-197]. Por estas razones no estaba claro si los receptores Fc $\gamma$ R dependen de su asociación a MDM para poder activar respuestas celulares.

**Hipótesis:** En este trabajo utilizamos al receptor Fc $\gamma$ RIIA humano como modelo para probar las siguientes hipótesis:

- A) La cadena polipeptídica de Fc $\gamma$ RIIA contiene regiones específicas que le permiten asociarse a MDM.
- B) La asociación de Fc $\gamma$ RIIA con MDM es necesaria para la activación de respuestas celulares.

**Resultados:** A diferencia de la gran mayoría de receptores Fc que se componen de varias cadenas polipeptídicas, el receptor Fc $\gamma$ RIIA está constituido por una única cadena polipeptídica, que contiene todos los elementos necesarios para activar respuestas celulares como la fagocitosis y la activación de NF- $\kappa$ B [66, 198]. Para determinar qué región de Fc $\gamma$ RIIA es necesaria para permitir su asociación a MDM se crearon una serie de mutantes, partiendo del ADNc del receptor Fc $\gamma$ RIIA silvestre humano. Se generaron tres mutantes de la región citoplásmica de Fc $\gamma$ RIIA: en una de ellas se eliminó toda la región citoplásmica, en otra se eliminó un sitio de acilación localizado en la región citoplásmica proximal a la cara interna de la membrana plasmática, en la tercera se eliminaron las tirosinas fosforilables de la región ITAM. Se generaron además una serie de mutantes en las que se alteraron aminoácidos específicos localizados dentro de la región transmembranal del receptor: A220G, A224S, T225A, VA231-2MM y VVAL234-7GISF.

El receptor Fc $\gamma$ RIIA silvestre humano y sus mutantes fueron transfectadas en una línea celular de basófilos de rata (RBL-2H3), que no expresan este receptor. Utilizamos metodología estándar de extracción con detergente y centrifugación en gradientes de densidad para

separar MDM [80, 151, 199, 200], y analizar la asociación del receptor Fc $\gamma$ RIIA y de sus mutantes a estas estructuras. Este análisis mostró que el receptor Fc $\gamma$ RIIA silvestre, expresado en células RBL-2H3, se comporta igual que el receptor Fc $\gamma$ RIIA endógeno de monocitos: en condiciones basales (sin entrecruzamiento) el receptor se no se asocia a MDM, pero su entrecruzamiento por medio de anticuerpos específicos induce su asociación con estas estructuras membranales. Todas las mutantes citoplásmicas de Fc $\gamma$ RIIA se asociaron a MDM tras ser entrecruzadas; indicando así que la región citoplásmica del receptor no es necesaria para su asociación con MDM. No obstante, identificamos una mutante transmembranal de Fc $\gamma$ RIIA (A224S) que perdió la capacidad de asociarse a MDM tras ser entrecruzada, y dos mutantes transmembranales (VA231-2MM y VVAL234-7GISF) asociadas a MDM aún en ausencia de entrecruzamiento. Estos resultados indicaron que la región transmembranal de Fc $\gamma$ RIIA es la responsable de modular su asociación con MDM, tanto en condiciones basales, como tras su entrecruzamiento.

Las mutantes transmembranales A224S, VA231-2MM y VVAL234-7GISF sirvieron entonces como modelo para analizar la capacidad del receptor Fc $\gamma$ RIIA para activar respuestas celulares, en condiciones anormales de asociación con MDM. Tanto el receptor Fc $\gamma$ RIIA silvestre, como las mutantes A224S, VA231-2MM y VVAL234-7GISF activaron a la cinasa Syk tras ser entrecruzados. El receptor Fc $\gamma$ RIIA silvestre y las mutantes A224S, VA231-2MM y VVAL234-7GISF fueron fosforilados tras su entrecruzamiento, aunque con diferentes cinéticas. Estos resultados indicaron que los eventos tempranos de señalización por Fc $\gamma$ RIIA no requieren de la asociación del receptor con MDM. Sin embargo, únicamente el receptor silvestre y las mutantes VA231-2MM y VVAL234-7GISF (que se asocian a MDM de forma constitutiva) fueron capaces de activar a NF- $\kappa$ B. La activación de NF- $\kappa$ B fue mayor con las mutantes VA231-2MM y VVAL234-7GISF, y estos altos niveles de activación requirieron de la actividad de ERK. Estos resultados indicaron que la asociación de Fc $\gamma$ RIIA con MDM sí es necesaria para la activación del factor nuclear NF- $\kappa$ B. No obstante, no se observaron diferencias entre los niveles de fagocitosis del receptor Fc $\gamma$ RIIA silvestre y de la mutante A224, que no se asocia a MDM. Estos resultados indican que la fagocitosis es independiente de la asociación del receptor con MDM.

**Conclusiones:** Los resultados presentados en este capítulo muestran que el mecanismo que regula la asociación de Fc $\gamma$ RIIA con MDM depende de la secuencia de la región transmembranal del receptor (Fig. 8). Es posible que esta región interaccione con elementos lipídicos presentes en los MDM. Nuestros resultados también indican que la asociación de Fc $\gamma$ RIIA con MDM es necesaria para la activación de algunas respuestas celulares como la activación de NF- $\kappa$ B, pero no para la activación de otras, como la fagocitosis (Fig. 8). Estos datos sugieren además que las vías de señalización que regulan respuestas celulares dependientes de Fc $\gamma$ RIIA pueden ser moduladas por su asociación con MDM (Fig. 8).

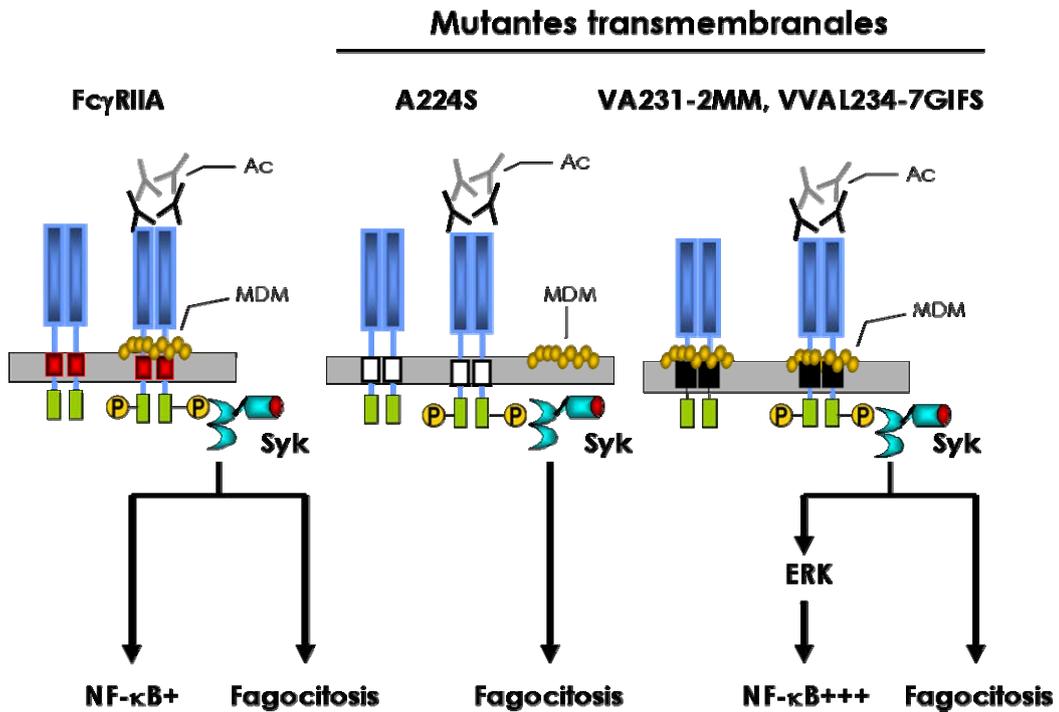


Figura 8. Modulación de la vía de señalización de Fc $\gamma$ RIIA por asociación a microdominios de membrana (MDM). El entrecruzamiento del receptor Fc $\gamma$ RIIA induce su asociación a MDM, y posteriormente la activación de Syk, del factor nuclear NF- $\kappa$ B, y de la fagocitosis. En ausencia de asociación con MDM, la mutante transmembranal A224S induce la activación de Syk, y de la fagocitosis, pero no de NF- $\kappa$ B. La asociación constitutiva a MDM de las mutantes VA231-2MM y VVAL234-7GISF promueve la activación de Syk, la fagocitosis y una activación de NF- $\kappa$ B eficiente, que depende de ERK. Ac, anticuerpos.

## 7. CAPÍTULO IV.

**Los receptores Fc $\gamma$ RIIA y Fc $\gamma$ RIIIB de neutrófilos activan a NF- $\kappa$ B: Aplicación de la citometría de flujo al estudio de la activación de factores nucleares.** (*J Immunol Methods*, 2007, 320:104-118. Ver apéndice E).

**Antecedentes:** Los neutrófilos expresan de forma constitutiva a los receptores Fc $\gamma$ RIIA y Fc $\gamma$ RIIIB [66]. La capacidad del receptor Fc $\gamma$ RIIA de activar vías de transducción de señales, y respuestas celulares está bien documentada [66, 71, 82, 174, 201, 202]. La capacidad del receptor Fc $\gamma$ RIIIB para señalar no está del todo clara, debido en parte a que este receptor carece de regiones evidentes que lo relacionen con eventos de transducción de señales [66, 203]. Existen evidencias que sugieren que el receptor Fc $\gamma$ RIIIB señala por medio de su unión con receptor Fc $\gamma$ RIIA [204, 205], pero también hay evidencias que sugieren que ambos receptores pueden señalar de manera independiente [203, 206, 207]. Se desconoce el mecanismo que integra las posibles vías de señalización de ambos receptores.

En contraste con otros tipos de leucocitos, los neutrófilos son células de vida corta que inician el proceso de apoptosis, a menos que sean activadas durante el proceso inflamatorio [208, 209]. En neutrófilos, el factor nuclear NF- $\kappa$ B es necesario para controlar el proceso de apoptosis [56-59]. La activación de los neutrófilos también les permite realizar eficientemente funciones celulares como la fagocitosis, el estallido respiratorio, la liberación de sustancias microbicidas, y la producción de algunas citocinas [20, 210, 211]. La activación de neutrófilos puede inducir la producción de citocinas dependientes de NF- $\kappa$ B, como IL-1 [48, 49], IL-12 [45, 51], IL-8 [18, 52], e IL-6 [53-55]. Se desconocía si cada uno de los receptores Fc $\gamma$ RIIA y Fc $\gamma$ RIIIB de neutrófilos podía inducir la activación de NF- $\kappa$ B.

Una dificultad en el estudio de la activación de factores nucleares en neutrófilos, es que estas células son de vida corta y no pueden manipularse genéticamente. Por lo tanto, los sistemas de gen reportero que se usan para explorar los mecanismos de activación de factores nucleares en otros sistemas [135, 212-215] no son aplicables a los neutrófilos. Algunos grupos han utilizado ensayos radioactivos de movilidad retardada en gel (EMSA, por sus siglas en inglés), para el estudio de la activación de NF- $\kappa$ B en estas células [56, 216]. Este tipo de metodología es, sin embargo, laboriosa e implica trabajar con materiales radioactivos de alta energía.

**Hipótesis:** En este trabajo nos propusimos desarrollar una metodología basada en la citometría de flujo para medir la activación de NF- $\kappa$ B, con el fin de probar las siguientes hipótesis:

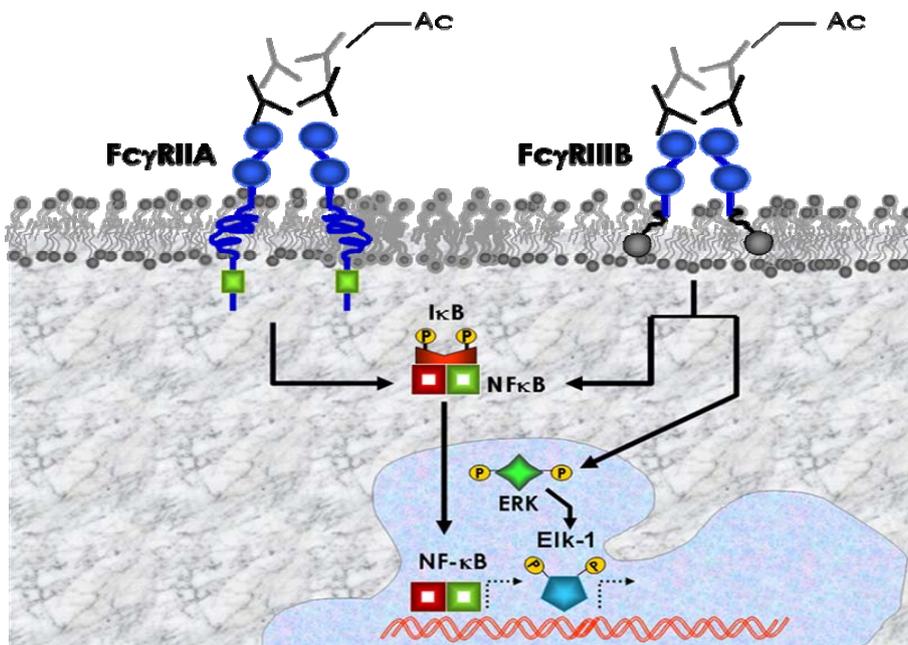
- A) Los receptores Fc $\gamma$ RIIA y Fc $\gamma$ RIIIB son capaces de activar a NF- $\kappa$ B en neutrófilos.
- B) Los receptores Fc $\gamma$ RIIA y Fc $\gamma$ RIIIB poseen vías de señalización independientes hacia el núcleo.

**Resultados:** La metodología desarrollada para medir la activación de NF- $\kappa$ B se basó en el aislamiento de núcleos celulares, y la detección de diferentes subunidades de NF- $\kappa$ B (p50 y p65) dentro de éstos, por medio de anticuerpos específicos marcados fluorescentemente. El factor nuclear NF- $\kappa$ B está compuesto por un dímero de diferentes subunidades que, en condiciones basales, se encuentran en el citoplasma unidas a la subunidad inhibidora I $\kappa$ B [217, 218]. Tras la activación de vías de señalización específicas, I $\kappa$ B se degrada, permitiendo que NF- $\kappa$ B entre al núcleo y se una a sus genes blanco. Por lo tanto, un aumento en el nivel de las subunidades de NF- $\kappa$ B en el núcleo fue indicativo de la activación de NF- $\kappa$ B. Esta estrategia metodológica permitió cuantificar la activación de NF- $\kappa$ B no sólo en neutrófilos, sino también en líneas celulares de monocitos, y de linfocitos T.

En neutrófilos el entrecruzamiento de los receptores  $Fc\gamma RIIA$  o  $Fc\gamma RIIB$  aumentó los niveles de p50 y p65 en el núcleo. La estimulación de neutrófilos con lipopolisacárido indujo únicamente un aumento de p50 en el núcleo. Estos resultados indican que tanto  $Fc\gamma RIIA$  como  $Fc\gamma RIIB$  pueden activar a NF- $\kappa B$  en neutrófilos y sugieren que, en estas condiciones, la forma activa de NF- $\kappa B$  está compuesta por p50 y p65. La estimulación de neutrófilos con lipopolisacárido también activa a NF- $\kappa B$ , aunque en este caso la forma activa de NF- $\kappa B$  puede ser un dímero de p50, o bien un heterodímero de p50 y una subunidad diferente a p65.

Aunque ERK no es un factor nuclear, tras la activación de vías de señalización específicas [128, 219, 220] esta cinasa puede translocarse al núcleo y activar factores nucleares como Elk-1 [127, 128, 221]. Habiendo establecido que tanto  $Fc\gamma RIIA$  como  $Fc\gamma RIIB$  pueden activar a NF- $\kappa B$ , quisimos determinar si ambos receptores activan a ERK  $\rightarrow$  Elk-1 en el núcleo. Utilizando anticuerpos contra las formas fosforiladas (activas) de ERK y de Elk-1, observamos que el entrecruzamiento del receptor  $Fc\gamma RIIB$  aumentó los niveles de fosfo-ERK y de fosfo- Elk-1 en el núcleo de neutrófilos. El entrecruzamiento del receptor  $Fc\gamma RIIA$ , por el contrario, no tuvo ningún efecto sobre los niveles nucleares de fosfo-ERK o fosfo- Elk-1. Estos resultados sugieren fuertemente que el receptor  $Fc\gamma RIIB$  puede activar una vía de señalización independiente de  $Fc\gamma RIIA$ , que permite la activación de ERK y de Elk-1 en el núcleo del neutrófilo.

**Conclusiones:** Los resultados presentados en este capítulo describen una metodología novedosa basada en la citometría de flujo, que permite medir la activación de factores nucleares en neutrófilos y en otros tipos celulares. Nuestros resultados muestran que tanto  $Fc\gamma RIIA$  como  $Fc\gamma RIIB$  son capaces de activar a NF- $\kappa B$  en neutrófilos. Nuestros resultados también sugieren la existencia de una vía de señalización que parte de  $Fc\gamma RIIB$ , y que lleva a la activación de ERK  $\rightarrow$  Elk-1 en el núcleo, de manera independiente de  $Fc\gamma RIIA$  (Fig. 9).



**Figura 9.** Los receptores  $Fc\gamma RIIA$  y  $Fc\gamma RIIB$  de neutrófilos activan diferentes vías de señalización hacia el núcleo. El entrecruzamiento de los receptores  $Fc\gamma RIIA$  o  $Fc\gamma RIIB$  por medio de anticuerpos (Ac) induce la activación de NF- $\kappa B$ . El entrecruzamiento del receptor  $Fc\gamma RIIB$  promueve además la activación de ERK y de Elk-1 en el núcleo, a través de una vía de señalización independiente de  $Fc\gamma RIIA$ .

## 8. CAPÍTULO V.

**Identificación de los fagocitos profesionales del mejillón *Mytilus galloprovincialis*, y caracterización bioquímica de sus respuestas celulares.** (Manuscrito enviado a publicación a "Developmental and Comparative Immunology". Ver apéndice F).

**Antecedentes:** Por décadas la inmunología se ha centrado en el estudio de dos modelos de vertebrados: el humano y el ratón. Poco se sabe acerca de los sistemas inmunológicos de otros organismos. El estudio de los sistemas inmunológicos de organismos invertebrados es actualmente un área de investigación en expansión [11]. El surgimiento de bacterias patógenas con resistencia a múltiples antibióticos [222], y la crisis actual en el desarrollo de nuevos antibióticos [223], ponen de manifiesto la necesidad de nuevas herramientas para el control de infecciones emergentes. El estudio básico de los mecanismos de defensa de organismos modelo no tradicionales (como lo son el humano y el ratón) seguramente brindará a la inmunología clínica nuevas herramientas en un futuro no lejano [10, 11, 222].

A pesar de no poseer mecanismos de inmunidad específica, los organismos invertebrados reconocen bacterias, hongos, y virus [224-226], y son capaces de activar mecanismos de defensa eficientes que les permiten combatir las infecciones [224, 227]. Dentro de los mecanismo de defensa de organismos invertebrados están la fagocitosis, el estallido respiratorio, la producción de óxido nítrico, la activación del sistema de la fenoloxidasas, la encapsulación, y la producción y liberación de diversas sustancias bactericidas [227]. En la gran mayoría de especies de invertebrados no está claro cuáles son los mecanismos de defensa que poseen las diferentes células que componen sus sistemas inmunológicos: los hemocitos.

Se han descrito diferentes subtipos de hemocitos en varias especies de organismos invertebrados. No existe una clasificación precisa de subtipos hemocitos. En muchos casos estas células se han clasificado de acuerdo a la presencia o ausencia de gránulos citoplásmicos, y a las propiedades de éstos [228-232]. En algunas especies se ha observado que los hemocitos granulares son las células con mayor capacidad fagocítica [233-236].

El molusco marino *Mytilus galloprovincialis* es un organismo de importancia comercial en distintos países de Europa. Este molusco bivalvo vive en zonas de poca profundidad sobre sustratos naturales o artificiales, formando racimos. Es un organismo filtrador que prefiere lugares con mucha materia orgánica en suspensión [237]. En la hemolinfa de *M. galloprovincialis* se ha observado la existencia de mecanismos de inmunidad innata, como la fagocitosis [238], el estallido respiratorio [239] y la producción de óxido nítrico [237]. Sin embargo, los diferentes tipos de hemocitos de *M. galloprovincialis* no han sido caracterizados funcionalmente de forma detallada.

**Hipótesis:** En este trabajo utilizamos como modelo al mejillón *Mytilus galloprovincialis* para caracterizar funcionalmente los diferentes tipos de hemocitos presentes en moluscos, incluyendo su capacidad fagocítica, su capacidad para activar el estallido respiratorio, y su capacidad para producir óxido nítrico. Este trabajo tuvo como bases las siguientes hipótesis:

- A) El sistema inmunológico de *M. galloprovincialis* está compuesto por diversos tipos de hemocitos que pueden diferenciarse morfológicamente.
- B) Dentro de los hemocitos de *M. galloprovincialis* existe al menos un tipo celular con alta capacidad fagocítica.
- C) Los distintos tipos de hemocitos de *M. galloprovincialis* difieren en su capacidad de activar el estallido respiratorio, y de producir NO.
- D) Las funciones celulares de los hemocitos de *M. galloprovincialis* están reguladas por enzimas de las familias de PI 3-K, PKC y ERK.

**Resultados:** Utilizando técnicas de citometría de flujo se separaron 4 subtipos de hemocitos, con claras diferencias morfológicas entre ellos: Células Grandes Granulares (GG),

Células Grandes Semigranulares (GSG), Células Pequeñas Semigranulares (PSG), y Células Pequeñas Hialinas (PH).

Habiendo establecido que existen por lo menos cuatro tipos diferentes de hemocitos en el sistema inmunológico de *M. galloprovincialis*, se buscó caracterizar funcionalmente a estas células para determinar cuáles poseen actividad fagocítica, cuáles poseen capacidad para activar el estallido respiratorio, y cuáles pueden producir NO.

El análisis de fagocitosis por citometría de flujo mostró que únicamente los hemocitos GG, GSG y PSG poseen actividad fagocítica. Los niveles de fagocitosis variaron en función del subtipo de hemocito y de la partícula fagocítica involucrada: las células GG presentaron la mayor actividad fagocítica, seguidas de GSG y PSG. Estos resultados sugieren que los fagocitos profesionales de *M. galloprovincialis* son las células GG y las células GSG.

Se utilizaron técnicas de citometría de flujo, en combinación con sondas intracelulares sensibles a radicales reactivos de oxígeno (RRO) u óxido nítrico (NO), para determinar la capacidad de los hemocitos de producir RRO y NO. Únicamente las células GG, GSG y PSG activaron el estallido respiratorio en respuesta a zymosan, aunque en diferentes niveles: en los hemocitos GG y GSG se observó la mayor producción de RRO, seguidos de los hemocitos PSG. Todos los subtipos de hemocitos produjeron NO en respuesta a zymosan. En los hemocitos GG y GSG se observó también la mayor producción de NO, seguidos de los hemocitos PSG y PH. En vertebrados, los fagocitos profesionales poseen alta capacidad de producción de RRO [16, 17, 32], y al menos los macrófagos son una fuente importante de NO [36-38]. La alta capacidad de los hemocitos GG y GSG para producir RRO y NO apoya la idea de que estas células constituyen los fagocitos profesionales de *M. galloprovincialis*.

La existencia de miembros de las familias de PI 3-K, PKC y ERK en *M. galloprovincialis* se ha demostrado por medio de técnicas de Western-blot en muestras de hemolinfa total [240, 241]; o bien se ha inferido a partir de experimentos en los que algunas funciones celulares se ven bloqueadas por inhibidores farmacológicos de estas enzimas [240, 242]. Utilizamos los inhibidores farmacológicos wortmannina, estaurosporina y PD98059, para determinar si las funciones de los hemocitos de *M. galloprovincialis* están reguladas por enzimas de las familias de PI 3-K, PKC y ERK, respectivamente.

La inhibición de PI 3-K bloqueó la fagocitosis de látex, zymosan, *E. coli* y *V. alginolyticus* en los hemocitos GG, GSG y PSG. La inhibición de PKC o de ERK disminuyó ligeramente la fagocitosis de látex en GG, GSG y PSG, pero no tuvo efecto sobre la fagocitosis de *E. coli* o *V. alginolyticus*. Interesantemente la fagocitosis de zymosan fue bloqueada por estaurosporina o PD98059 únicamente en las células GSG. Wortmannina bloqueó la activación del estallido respiratorio en GG, GSG y PSG. Estaurosporina o PD98059, por el contrario, no tuvieron efecto sobre el estallido respiratorio en ningún tipo de hemocito. La producción de NO fue bloqueada por wortmannina únicamente en los hemocitos GSG y PSG. Estaurosporina no tuvo ningún efecto sobre la producción de NO. Interesantemente, la producción de NO fue bloqueada por PD98059 únicamente en GSG. Estos resultados indican que PI 3-K posee un papel muy importante en el sistema inmunológico de *M. galloprovincialis*, y que las enzimas PKC y ERK sólo son necesarias para regular las respuestas celulares de algunos subtipos de hemocitos.

**Conclusiones:** Los resultados presentados en este capítulo revelan diferencias importantes, en cuanto a función y a mecanismos de regulación, entre los diferentes hemocitos presentes en el mejillón. Los resultados también sugieren fuertemente que las células GSG y PSG constituyen los fagocitos profesionales de *M. galloprovincialis* (Fig. 10) y además que, al igual que en mamíferos [132, 135, 214, 243, 244], las vías de señalización que regulan diferentes respuestas celulares pueden cambiar en función del tipo celular. Es posible que las diferencias observadas en hemocitos respecto la regulación de sus respuestas celulares por PI 3-K, PKC o ERK refleje la existencia de diferentes receptores de membrana con vías de señalización particulares.

## Fagocitos Profesionales

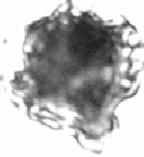
	GG	GSG	PSG	PH
				
<b>Fagocitosis</b>	+++	++	+	
<b>Estallido respiratorio</b>	+++	+++	++	
<b>Producción de NO</b>	+++	+++	++	++

Figura 10. Los fagocitos profesionales de *M. galloprovincialis* son las células *Grandes Granulares (GG)*, y *Grandes Semigranulares (GSG)*. El sistema inmunológico de *M. galloprovincialis* está compuesto por al menos cuatro tipos de hemocitos: *Grandes Granulares (GG)*, y *Grandes Semigranulares (GSG)*, *Pequeños Semigranulares (PSG)*, y *Pequeños Hialinos (PH)*. Los fagocitos profesionales de este invertebrado presentan alta capacidad fagocítica, de activación del estallido respiratorio, y de producción de óxido nítrico (NO).

## 9. CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN GENERAL.

La inmunología, como una rama de la biología, se ha centrado principalmente en el estudio de los sistemas inmunológicos de dos organismos modelo: el humano y el ratón. Este esfuerzo ha permitido un gran avance en la comprensión de mecanismos muy complejos de inmunidad en vertebrados. Por lo anterior ahora es posible que el estudio de la inmunología en vertebrados se desarrolle a nivel molecular y genético. La inmunología comparada, por otra parte, ha ido cobrando fuerza en los últimos años, debido en parte al crecimiento de la industria acuicultora, que depende en gran medida del buen estado del sistema inmunológico de los organismos que cultiva. Si bien se ha encontrado que los sistemas inmunológicos de vertebrados son muy parecidos entre organismos que van desde los peces hasta los mamíferos, poco se sabe acerca de los sistemas inmunológicos de organismos invertebrados. En la mayoría de las especies de invertebrados, a penas se ha comenzado con una descripción morfológica y funcional de los diferentes órganos y tipos celulares que componen sus sistemas inmunológicos.

Esta tesis doctoral abordó el estudio de las vías de transducción de señales que regulan respuestas celulares activadas por receptores para inmunoglobulinas G (receptores Fc $\gamma$ ), en células fagocíticas humanas. También se abordó el campo de la inmunología comparada, integrando una descripción morfológica y funcional de las células del sistema inmunológico de *M. galloprovincialis*, con las vías de transducción de señales que regulan la fagocitosis, el estallido respiratorio, y la producción de óxido nítrico en los hemocitos de este molusco.

Los fagocitos de vertebrados son células altamente especializadas, que expresan en su membrana plasmática una gran variedad de receptores capaces de activar el proceso de fagocitosis. Entre estos receptores se encuentran los receptores para las inmunoglobulinas G, receptores Fc $\gamma$ R, que además de la fagocitosis pueden activar otras respuestas celulares, como el estallido respiratorio, la citotoxicidad dependiente de anticuerpos, la liberación de mediadores proinflamatorios y microbicidas, y la producción y liberación de citocinas [66, 67]. Si bien se sabe que los hemocitos de muchos invertebrados poseen capacidad fagocítica [8-10], no se han identificado los receptores responsables de la activación de la fagocitosis. Tampoco se sabe si, en invertebrados, existen receptores capaces de activar múltiples respuesta celulares de forma casi simultánea, como lo hacen los receptores Fc $\gamma$ R. La búsqueda de los receptores que activan mecanismos celulares de defensa en invertebrados seguramente será una tarea muy emocionante, para un futuro muy próximo.

Nuestra exploración de los mecanismos de transducción de señales por receptores Fc $\gamma$ R en monocitos humanos, mostró que existen dos vías de señalización activadas por receptores Fc $\gamma$ R, que regulan de forma independiente la activación de NF- $\kappa$ B y la fagocitosis. Aunque se había reportado que la activación de ERK en monocitos, necesaria para la activación de NF- $\kappa$ B, no depende de la vía clásica de Ras [50], no estaba claro qué molécula participa en la activación de ERK. Nuestros resultados mostraron que la enzima PI 3-K es necesaria para la activación de ERK en estas células, y que la vía Fc $\gamma$ R  $\rightarrow$  PI 3-K  $\rightarrow$  ERK es necesaria para la activación de NF- $\kappa$ B. La vía de señalización que regula la fagocitosis por Fc $\gamma$ R es, sin embargo, independiente de PI 3-K y de ERK. Es interesante notar que, posteriormente a la publicación de estos resultados, se reportó que, en la microglia, la fagocitosis mediada por receptores Fc $\gamma$ R también es independiente de ERK. Como las células microgliales se derivan de los monocitos durante el desarrollo embrionario [46, 47], es posible que los mecanismos de transducción de señales por receptores Fc $\gamma$ R sean semejantes en estos dos tipos celulares.

Aunque se sabe que los receptores Fc $\gamma$ R pueden activar las mismas respuestas celulares en distintos fagocitos [66, 67], no está claro si las vías de señalización involucradas en su regulación son iguales en distintos tipos celulares. Al explorar los mecanismos de transducción de señales por Fc $\gamma$ R, en distintos fagocitos humanos, encontramos que las vías de señalización que activan estos receptores hacia la fagocitosis son diferentes entre fagocitos

profesionales y fagocitos no profesionales. En neutrófilos y macrófagos la fagocitosis está regulada por PI 3-K, ERK, y PKC. En los monocitos, por otro lado, sólo PKC participa en la regulación de esta respuesta celular. Las enzimas PI 3-K y ERK son reclutadas a la maquinaria fagocítica durante la diferenciación monocito → macrófago, permitiendo que el proceso de fagocitosis sea más eficiente. Las diferencias de mecanismos de señalización entre fagocitos profesionales y no profesionales podrían estar relacionadas con la expresión diferencial de receptores FcγR. Es también posible que un mismo receptor, por ejemplo FcγRIIA que se expresa en monocitos, macrófagos y neutrófilos, señalice de forma diferente en distintos tipos celulares. Resultados preliminares de nuestro laboratorio sugieren que la vía de señalización de un receptor Fcγ en particular, puede ser modificada en función del tipo celular en el que sea expresado.

En el sistema inmunológico de vertebrados, se ha postulado que los microdominios de membrana (MDM) actúan como “plataformas de señalización”, concentrando moléculas implicadas en la transducción de señales [81, 152, 153, 158, 160]. Algunos inmunorreceptores, incluyendo receptores FcγR, se asocian de forma transitoria a los MDM, tras interactuar con sus ligandos [81, 153, 155-159]. Los mecanismos moleculares que regulan esta asociación han sido poco explorados. Nosotros encontramos que la secuencia de la región transmembranal del receptor FcγRIIA regula su capacidad de asociación a MDM, ya sea en ausencia o en presencia de ligando. Es posible que la región transmembranal de FcγRIIA interactúe con elementos lipídicos presentes en los MDM, como se ha sugerido para otros sistemas [150].

Se ha postulado que la asociación de inmunorreceptores de vertebrados con MDM promueve la formación de complejos de señalización eficientes, que permiten la activación de respuestas celulares [78, 155, 161, 162]. La absoluta dependencia de MDM para la activación de respuestas celulares mediadas por inmunorreceptores es, sin embargo, cuestionable [151, 192, 193]. Nuestros resultados indican que los eventos de señalización tempranos, en la vía de señalización de FcγRIIA, no se ven disminuidos en ausencia de asociación a MDM. Sin embargo, encontramos que la asociación de FcγRIIA con MDM sí es necesaria para la activación de NF-κB, pero no para la activación la fagocitosis. Nuestros resultados sugieren entonces que las vías de señalización que regulan respuestas celulares dependientes de FcγRIIA pueden ser moduladas por su asociación con MDM. En un futuro próximo será interesante determinar si los MDM juegan algún papel en la regulación de los mecanismos celulares de defensa en organismos invertebrados.

Utilizando como modelo los neutrófilos humanos, quisimos determinar si diferentes tipos de receptores FcγR pueden activar vías de señalización independientes, para la regulación de factores nucleares como NF-κB. Los neutrófilos humanos expresan receptores FcγRIIA y FcγRIIB [66]. En contraste con el receptor FcγRIIA, la capacidad de FcγRIIB para señalar ha sido cuestionada, pues no posee regiones evidentes que lo relacionen con eventos de transducción de señales [66, 203]. Existen evidencias que sugieren que FcγRIIB señala por medio de su unión a FcγRIIA [204, 205], y también hay evidencias que sugieren que ambos receptores pueden señalar de manera independiente [203, 206, 207]. Para poder estudiar los mecanismos de activación de NF-κB por distintos receptores FcγR en neutrófilos, se desarrolló una metodología novedosa basada en la citometría de flujo que permite medir la activación de NF-κB. Con esta metodología pudimos determinar que tanto FcγRIIA como FcγRIIB poseen la capacidad de activar a NF-κB en neutrófilos. Nuestros resultados también indican la existencia de una vía de señalización que parte de FcγRIIB, y que lleva a la activación de ERK → Elk-1 en el núcleo, de manera independiente de FcγRIIA. Resultados preliminares de nuestro laboratorio sugieren que los mecanismos de señalización de FcγRIIA y de FcγRIIB para la activación de NF-κB son diferentes. Interessantemente, la vía de activación ERK en el núcleo, a partir de FcγRIIB, parece ser independiente de la vía de activación de ERK

citoplásmica. Ambas observaciones apoyarían la idea de que Fc $\gamma$ RIIA y Fc $\gamma$ RIIB señalizan de manera independiente hacia el núcleo, en neutrófilos humanos. En invertebrados también se ha reportado la activación de la vía ERK  $\rightarrow$  Elk-1 en el núcleo celular [245]. Sin embargo, los receptores que inducen esta activación, así como sus consecuencias funcionales no han sido descritos.

La posibilidad de encontrar nuevas herramientas para la inmunología clínica, y la importancia de algunos invertebrados marinos para la acuicultura, han hecho de la inmunología comparada un área de investigación en expansión [11]. No existe una clasificación precisa de las células que componen el sistema inmunológico de invertebrados, los hemocitos. De igual manera, las propiedades de estas células han sido poco caracterizadas. Abordando el campo de la inmunología comparada, buscamos identificar y caracterizar funcionalmente a los fagocitos profesionales del molusco marino *M. galloprovincialis*. Nuestros resultados muestran que su sistema inmunológico está compuesto por al menos cuatro subtipos celulares, de los cuales dos son fagocitos profesionales, con alta capacidad fagocítica, de producción de radicales reactivos de oxígeno, y de producción de óxido nítrico.

Utilizando inhibidores farmacológicos para enzimas de señalización presentes en mamíferos, como PI 3-K, PKC, y ERK, mostramos que al igual que en mamíferos [132, 135, 214, 243, 244], las vías de señalización que regulan diferentes mecanismos de defensa pueden cambiar en función del tipo celular. En los hemocitos de *M. galloprovincialis* la enzima PI 3-K juega un papel central en la activación de sus mecanismos de defensa. Se observaron además diferencias en la regulación de respuestas celulares por PI 3-K, PKC o ERK, en función del subtipo de hemocito involucrado. Estas diferencias podrían reflejar la existencia de diferentes receptores de membrana aún no identificados, con vías de señalización particulares. Resulta interesante el hecho de que inhibidores farmacológicos que alteran el funcionamiento de enzimas de señalización en mamíferos, hayan tenido efecto sobre mecanismos de defensa de los hemocitos de *M. galloprovincialis*. Lo anterior sugiere que enzimas como PI 3-K, PKC y ERK están relativamente conservadas entre moluscos y mamíferos, y que las vías de señalización que regulan las respuestas celulares del sistema inmunológico de vertebrados tienen su base en vías de señalización ya existentes en invertebrados.

Los diferentes estudios que componen esta tesis doctoral plantean nuevas interrogantes para el campo de la transducción de señales de células fagocíticas de vertebrados e invertebrados. La búsqueda de respuesta a estas interrogantes será seguramente una tarea sumamente emocionante en el futuro cercano.

## 10. BIBLIOGRAFÍA.

1. Paul, W.E. (2003) The Immune system: An introduction. In *Fundamental Immunology* (W. E. Paul, ed), Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1-222.
2. Dorit, R.L., Walker, W.F., Barnes, R.D. (1991) The immune system. In *Zoology* (J. L. Alexander, ed), Thomson Learning, Inc., New York 323-346.
3. Janeway, C. (2005) Basic concepts in immunology. In *Immunobiology* (E. Lawrence, ed), Garland Science Publishing, New York 1-36.
4. Janeway, C. (2005) *Immunobiology*. Garland Science Publishing, New York.
5. Paul, W.E. (2003) *Fundamental Immunology*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
6. Janeway, C. (2005) Adaptive immunity to infection. In *Immunobiology* (E. Lawrence, ed), Garland Science Publishing, New York 409-460.
7. Janeway, C. (2005) Innate immunity. In *Immunobiology* (E. Lawrence, ed), Garland Science Publishing, New York 37-102.
8. Cooper, E.L. (2003) Comparative immunology. *Curr Pharm Des* 9, 119-31.
9. Cooper, E.L., Kauschke, E., Cossarizza, A. (2002) Digging for innate immunity since Darwin and Metchnikoff. *Bioessays* 24, 319-33.
10. Loker, E., Adema, C., Zhang, S., Thomas, K. (2004) Invertebrate immune systems: not homogeneous, not simple, not well understood. *Immunol Rev* 198, 10-24.
11. Hoffmann, J. (2004) Primitive immune systems. *Immunol Rev* 198, 5-9.
12. Jones, S.L., Lindberg, F.P., Brown, E.J. (1999) Phagocytosis. In *Fundamental Immunology* (W. E. Paul, ed), Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 997-1020.
13. Brown, E.J., Gresham, H.D. (2003) Phagocytosis. In *Fundamental Immunology* (W. E. Paul, ed), Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1105-1126.
14. Garcia-Garcia, E. (2005) Adding complexity to phagocytic signaling: Phagocytosis-associated cell responses and phagocytic efficiency. In *Molecular Mechanisms of Phagocytosis* (C. Rosales, ed), Landes Biosciences/Eurekah.com and Springer Science+Business Media, Georgetown, Texas 58-71.
15. Hampton, M.B., Kettle, A.J., Winterbourn, C.C. (1998) Inside the neutrophil phagosome: Oxidants, myeloperoxidase and bacterial killing. *Blood* 92, 3007-17.
16. Cross, A.R., Segal, A.W. (2004) The NADPH oxidase of professional phagocytes—prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochim Biophys Acta* 1657, 1-22.
17. Morel, F., Doussiere, J., Vignais, P.V. (1991) The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects. *Eur J Biochem* 201, 523-46.
18. Cassatella, M.A., Bazzoni, F., Ceska, M., Ferro, I., Baggiolini, M., Berton, G. (1992) IL-8 production by human polymorphonuclear leukocytes. The chemoattractant formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine induces the gene expression and release of IL-8 through a pertussis toxin-sensitive pathway. *J Immunol* 148, 3216-20.
19. Kurosaka, K., Watanabe, N., Kobayashi, Y. (2001) Production of proinflammatory cytokines by resident tissue macrophages after phagocytosis of apoptotic cells. *Cell Imm* 211, 1-7.
20. Scapini, P., Lapinet-Vera, J.A., Gasperini, S., Calzetti, F., Bazzoni, F., Cassatella, M.A. (2000) The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev* 177, 195-203.
21. Gordon, S., Clarke, S., Greaves, D., Doyle, A. (1995) Molecular immunobiology of macrophages: recent progress. *Curr Opin Immunol* 7, 24-33.
22. Bodel, P., Miller, H. (1977) Differences in pyrogen production by mononuclear phagocytes and by fibroblasts or HeLa cells. *J Exp Med* 145, 607-17.
23. Fadok, V.A., Bratton, D.L., Konowal, A., Freed, P.W., Westcott, J.Y., Henson, P.M. (1998) Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit pro-inflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 101, 890-8.
24. Ito, N., Yokomizo, T., Sasaki, T., Kurosu, H., Penninger, J., Kanaho, Y., Katada, T., Hanaoka, K., Shimizu, T. (2002) Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase activation and calcium influx for leukotriene B4-induced enzyme release. *J Biol Chem* 277, 44898-904.
25. Nielsen, O.H., Elmgreen, J., Thomsen, B.S., Ahnfelt-Ronne, I., Wiik, A. (1986) Release of leukotriene B4 and 5-hydroxyeicosatetraenoic acid during phagocytosis of artificial immune complexes by peripheral neutrophils in chronic inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 65, 465-71.
26. Petersen, M., Steadman, R., Hallett, M.B., Matthews, N., Williams, J.D. (1990) Zymosan-induced leukotriene B4 generation by human neutrophils is augmented by rhTNF-alpha but not chemotactic peptide. *Immunology* 70, 75-81.
27. Neumann, N.F., Stafford, J.L., Barreda, D., Ainsworth, A.J., Belosevic, M. (2001) Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. *Dev Comp Immunol* 25, 807-25.
28. Martin, E., Ganz, T., Lehrer, R.I. (1995) Defensins and other endogenous peptide antibiotics of vertebrates. *J Leukoc Biol* 58, 128-36.
29. Lehrer, R.I., Ganz, T. (1990) Antimicrobial polypeptides of human neutrophils. *Blood* 76, 2169-81.

30. Albert, M.L., Kim, J.I., Birge, R.B. (2000) alphavbeta5 integrin recruits the CrkII-Dock180-rac1 complex for phagocytosis of apoptotic cells. *Nat Cell Biol* 2, 899-905.
31. Parnaik, R., Raff, M.C., Scholes, J. (2000) Differences between the clearance of apoptotic cells by professional and non-professional phagocytes. *Curr Biol* 10, 857-60.
32. Rabinovitch, M. (1995) Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell Biol* 5, 85-87.
33. Rosenberg, H.F., Gallin, J.I. (1999) Inflammation. In *Fundamental Immunology* (W. E. Paul, ed), Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1051-1066.
34. Valledor, A.F., Borrás, F.E., Cullell-Young, M., Celada, A. (1998) Transcription factors that regulate monocyte/macrophage differentiation. *J Leukoc Biol* 63, 405-17.
35. Kagan, V.E., Borisenko, G.G., Serinkan, B.F., Tyurina, Y.Y., Tyurin, V.A., Jiang, J., Liu, S.X., Shvedova, A.A., Fabisiak, J.P., Uthaisang, W., Fadeel, B. (2003) Appetizing rancidity of apoptotic cells for macrophages: oxidation, externalization, and recognition of phosphatidylserine. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285, L1-17.
36. Vazquez-Torres, A., Balish, E. (1997) Macrophages in resistance to candidiasis. *Microbiol Mol Biol Rev* 61, 170-92.
37. MacMicking, J., Xie, Q.W., Nathan, C. (1997) Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 15, 323-50.
38. Nathan, C.F., Hibbs, J.B., Jr. (1991) Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* 3, 65-70.
39. Gordon, S. (1999) Macrophages and the immune response. In *Fundamental Immunology* (W. E. Paul, ed), Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 533-547.
40. Reddy, S.M., Hsiao, K.H., Abernethy, V.E., Fan, H., Longacre, A., Lieberthal, W., Rauch, J., Koh, J.S., Levine, J.S. (2002) Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages induces novel signaling events leading to cytokine-independent survival and inhibition of proliferation: activation of Akt and inhibition of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *J Immunol* 169, 702-13.
41. Brozna, J.P., Hauff, N.F., Phillips, W.A., Johnston, R.B. (1988) Activation of the respiratory burst in macrophages. Phosphorylation specifically associated with Fc receptor-mediated stimulation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 141, 1642-7.
42. Johnson, K.J., Varani, J., Smolen, J.E. (1992) Neutrophil activation and function in health and disease. *Immunol Ser* 57, 1-46.
43. Segal, A.W. (2005) How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* 23, 197-223.
44. Faurschou, M., Borregaard, N. (2003) Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect* 5, 1317-27.
45. Denkers, E.Y., Del Rio, L., Bennouna, S. (2003) Neutrophil production of IL-12 and other cytokines during microbial infection. *Chem Immunol Allergy* 83, 95-114.
46. Graeber, M.B., Streit, W.J. (1990) Microglia: immune network in the CNS. *Brain Pathol* 1, 2-5.
47. Barron, K.D. (1995) The microglial cell. A historical review. *J Neurol Sci* 134, Suppl: 57-68.
48. Brooks, C.J., King, W.J., Radford, D.J., Adu, D., McGrath, M., Savage, C.O. (1996) IL-1 beta production by human polymorphonuclear leucocytes stimulated by anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies: relevance to systemic vasculitis. *Clin Exp Immunol* 106, 273-9.
49. Roberge, C.J., de Medicis, R., Dayer, J.M., Rola-Pleszczynski, M., Naccache, P.H., Poubelle, P.E. (1994) Crystal-induced neutrophil activation. V. Differential production of biologically active IL-1 and IL-1 receptor antagonist. *J Immunol* 152, 5485-94.
50. Sánchez-Mejorada, G., Rosales, C. (1998) Fcg receptor-mediated mitogen-activated protein kinase activation in monocytes is independent of Ras. *J Biol Chem* 273, 27610-27619.
51. Romani, L., Mencacci, A., Cenci, E., Spaccapelo, R., Del Sero, G., Nicoletti, I., Trinchieri, G., Bistoni, F., Puccetti, P. (1997) Neutrophil production of IL-12 and IL-10 in candidiasis and efficacy of IL-12 therapy in neutropenic mice. *J Immunol* 158, 5349-56.
52. Porreca, E., Sergi, R., Baccante, G., Reale, M., Orsini, L., Febbo, C.D., Caselli, G., Cuccurullo, F., Bertini, R. (1999) Peripheral blood mononuclear cell production of interleukin-8 and IL-8-dependent neutrophil function in hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis* 146, 345-50.
53. Jablonska, E., Pietruska, Z. (1998) Changes in soluble IL-6 receptor and IL-6 production by polymorphonuclear cells and whole blood cells of breast cancer patients. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 46, 25-9.
54. Mianji, S., Hamasaki, Y., Yamamoto, S., Miyazaki, S. (1996) Inhibition by dexamethasone of the lipopolysaccharide-induced increase in IL-6 mRNA abundance and IL-6 production in human polymorphonuclear leukocytes. *Int J Immunopharmacol* 18, 339-46.
55. Park, E., Alberti, J., Quinn, M.R., Schuller-Levis, G. (1998) Taurine chloramine inhibits the production of superoxide anion, IL-6 and IL-8 in activated human polymorphonuclear leukocytes. *Adv Exp Med Biol* 442, 177-82.

56. Choi, M., Rolle, S., Wellner, M., Cardoso, M.C., Scheidereit, C., Luft, F.C., Kettritz, R. (2003) Inhibition of NF-kappaB by a TAT-NEMO-binding domain peptide accelerates constitutive apoptosis and abrogates LPS-delayed neutrophil apoptosis. *Blood* 102, 2259-67.
57. Notebaert, S., Duchateau, L., Meyer, E. (2005) NF-kappaB inhibition accelerates apoptosis of bovine neutrophils. *Vet Res* 36, 229-40.
58. Valente, P., Arzani, D., Cesario, A., Margaritora, S., Carbone, E., Russo, P. (2003) TNF increases camptothecin-induced apoptosis by inhibition of NF-kappaB. *Eur J Cancer* 39, 1468-77.
59. Ward, C., Murray, J., Clugston, A., Dransfield, I., Haslett, C., Rossi, A.G. (2005) Interleukin-10 inhibits lipopolysaccharide-induced survival and extracellular signal-regulated kinase activation in human neutrophils. *Eur J Immunol* 35, 2728-37.
60. Dib, K., Andersson, T. (2000) BETA 2 integrin signaling in leukocytes. *Front Biosci* 5, 438-51.
61. Krieser, R.J., White, K. (2002) Engulfment mechanism of apoptotic cells. *Curr Opin Cell Biol* 14, 734-8.
62. Platt, N., da\_Silva, R.P., Gordon, S. (1998) Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Trends Cell Biol* 8, 365-72.
63. Gough, P.J., Gordon, S. (2000) The role of scavenger receptors in the innate immune system. *Microbes Infect* 2, 305-11.
64. Palecanda, A., Kobzik, L. (2001) Receptors for unopsonized particles: the role of alveolar macrophage scavenger receptors. *Curr Mol Med* 1, 589-95.
65. Platt, N., Haworth, R., Darley, L., Gordon, S. (2002) The many roles of the class A macrophage scavenger receptor. *Int Rev Cytol* 212, 1-40.
66. Ravetch, J.V., Bolland, S. (2001) IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 19, 275-290.
67. Garcia-Garcia, E., Rosales, C. (2002) Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Leukoc Biol* 72, 1092-108.
68. Sánchez-Mejorada, G., Rosales, C. (1998) Signal transduction by immunoglobulin Fc receptors. *J Leukoc Biol* 63, 521-533.
69. Monteiro, R.C., Van De Winkel, J.G. (2003) IgA Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 21, 177-204.
70. Isakov, N. (1997) Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM), a unique module linking antigen and Fc receptors to their signal cascades. *J Leukoc Biol* 61, 6-16.
71. Strzelecka, A., Kwiatkowska, K., Sobota, A. (1997) Tyrosine phosphorylation and Fcgamma receptor-mediated phagocytosis. *FEBS Lett* 400, 11-4.
72. Huang, Z.Y., Hunter, S., Kim, M.K., Indik, Z.K., Schreiber, A.D. (2003) The effect of phosphatases SHP-1 and SHIP-1 on signaling by the ITIM- and ITAM-containing Fcgamma receptors FcgammaRIIB and FcgammaRIIA. *J Leukoc Biol* 73, 823-9.
73. May, R.C., Machesky, L.M. (2001) Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* 114, 1061-1077.
74. Berton, G., Mocsai, A., Lowell, C.A. (2005) Src and Syk kinases: key regulators of phagocytic cell activation. *Trends Immunol* 26, 208-14.
75. Latour, S., Veillette, A. (2001) Proximal protein tyrosine kinases in immunoreceptor signaling. *Curr Opin Immunol* 13, 299-306.
76. Turner, M., E., S., Colucci, F., Di Santo, J.P., Tybulewicz, V.L. (2000) Tyrosine kinase SYK: essential functions for immunoreceptor signalling. *Immunol Today* 21, 148-154.
77. Erpel, T., Courtneidge, S.A. (1995) Src family protein tyrosine kinases and cellular signal transduction pathways. *Curr Opin Cell Biol* 7, 176-182.
78. Abdel Shakor, A.B., Kwiatkowska, K., Sobota, A. (2004) Cell surface ceramide generation precedes and controls FcgammaRII clustering and phosphorylation in rafts. *J Biol Chem* 279, 36778-87.
79. Bodin, S., Viala, C., Ragab, A., Payrastre, B. (2003) A critical role of lipid rafts in the organization of a key FcgammaRIIIa-mediated signaling pathway in human platelets. *Thromb Haemost* 89, 318-30.
80. Kwiatkowska, K., Sobota, A. (2001) The clustered Fcgamma receptor II is recruited to Lyn-containing membrane domains and undergoes phosphorylation in a cholesterol-dependent manner. *Eur J Immunol* 31, 989-98.
81. Horejsi, V. (2004) Transmembrane adaptor proteins in membrane microdomains: important regulators of immunoreceptor signaling. *Immunol Lett* 92, 43-9.
82. Nagarajan, S., Venkiteswaran, K., Anderson, M., Sayed, U., Zhu, C., Selvaraj, P. (2000) Cell-specific, activation-dependent regulation of neutrophil CD32A ligand-binding function. *Blood* 95, 1069-77.
83. Medgyesi, D., Sarkozi, R., Koncz, G., Arato, K., Varadi, G., Toth, G.K., Sarmay, G. (2004) Functional consequences of a MAPK docking site on human FcgammaRIIb. *Immunol Lett* 92, 83-90.
84. Van den Herik-Oudijk, I.E., Ter Bekke, M.W., Tempelman, M.J., Capel, P.J., Van de Winkel, J.G. (1995) Functional differences between two Fc receptor ITAM signaling motifs. *Blood* 86, 3302-7.
85. Nagarajan, S., Fifadara, N.H., Selvaraj, P. (2005) Signal-specific activation and regulation of human neutrophil Fc gamma receptors. *J Immunol* 174, 5423-32.

86. Selvaraj, P., Fifadara, N., Nagarajan, S., Cimino, A., Wang, G. (2004) Functional regulation of human neutrophil Fc gamma receptors. *Immunol Res* 29, 219-30.
87. Worth, R.G., Mayo-Bond, L., Kim, M.K., van de Winkel, J.G., Todd, R.F., 3rd, Petty, H.R., Schreiber, A.D. (2001) The cytoplasmic domain of Fc gammaRIIA (CD32) participates in phagolysosome formation. *Blood* 98, 3429-34.
88. Garcia-Garcia, E. (2005) Diversity in phagocytic signaling: A story of greed, sharing, and exploitation. In *Molecular Mechanisms of Phagocytosis* (C. Rosales, ed), Landes Biosciences/Eurekah.com and Springer Science+Business Media, Georgetown, Texas 1-22.
89. Toker, A., Cantley, L.C. (1997) Signaling through the lipid products of phosphoinositide 3-OH-kinase. *Nature* 387, 673-676.
90. Lennartz, M.R. (1999) Phospholipases and phagocytosis: the role of phospholipid-derived second messengers in phagocytosis. *Int J Biochem Cell Biol* 31, 415-430.
91. Carpenter, C.L., Cantley, L.C. (1996) Phosphoinositide kinases. *Curr Opin Cell Biol* 8, 153-158.
92. Vanhasebroek, B. (1997) Phosphoinositide kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci* 22, 267-272.
93. Leverrier, Y., Okkenhaug, K., Sawyer, C., Bilancio, A., Vanhaesebroeck, B., Ridley, A.J. (2003) Class I phosphoinositide 3-kinase p110beta is required for apoptotic cell and Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by macrophages. *J Biol Chem* 278, 38437-42.
94. Ninoyima, N., Hazeki, K., Fukui, Y., Seya, T., Okada, T., Hazeki, O., Ui, M. (1994) Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in Fc gamma receptor signaling. *J Biol Chem* 269, 22732-22737.
95. Melendez, A.J., Gillooly, D.J., Harnett, M.M., Allen, J.M. (1998) Aggregation of the human high affinity immunoglobulin G receptor (Fc gammaRI) activates both tyrosine kinase and G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2169-74.
96. Palmer, R.H., Dekker, L.V., Woscholski, R., Le Good, J.A., Gigg, R., Parker, P.J. (1995) Activation of PRK1 by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. A comparison with protein kinase C isoforms. *J Biol Chem* 270, 22412-22416.
97. Toker, A., Meyer, M., Reddy, K.K., Falck, J.R., Aneja, R., Aneja, S., Parra, A., Burns, D.J., Ballas, L.M., Cantley, L.C. (1994) Activation of protein kinase C family members by the novel polyphosphoinositides PtdIns-3,4-P2 and PtdIns-3,4,5-P3. *Biol Chem* 269, 32358-32367.
98. Nakanishi, H., Brewer, K.A., Exton, J.H. (1993) Activation of the zeta isozyme of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* 268, 13-16.
99. Cox, D., Tseng, C.C., Bjekic, G., Greenberg, S. (1999) A requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension. *J Biol Chem* 274, 1240-1247.
100. Cox, D., Dale, B.M., Kashiwada, M., Helgason, C.D., Greenberg, S. (2001) A regulatory role for Src homology 2 domain-containing inositol 5'-phosphatase (SHIP) in phagocytosis mediated by Fc gamma receptors and complement receptor 3 (aMb2; CD11b/CD18). *J Exp Med* 193, 61-72.
101. Yamamori, T., Inanami, O., Nagahata, H., Cui, Y., Kuwabara, M. (2000) Roles of p38MAPK, PKC and PI3-K in the signaling pathways of NADPH oxidase activation and phagocytosis in bovine polymorphonuclear leukocytes. *FEBS Lett* 467, 253-258.
102. Chen, Q., Powell, D.W., Rane, M.J., Singh, S., Butt, W., Klein, J.B., McLeish, K.R. (2003) Akt phosphorylates p47phox and mediates respiratory burst activity in human neutrophils. *J Immunol* 170, 5302-8.
103. Swanson, J.A., Johnson, M.T., Beningo, K., Post, P., Mooseker, M., Araki, N. (1999) A contractile activity that closes phagosomes in macrophages. *J Cell Sci* 112, 307-316.
104. Araki, N., Hatae, T., Furukawa, A., Swanson, J. (2003) Phosphoinositide-3-kinase-independent contractile activities associated with Fc gamma-receptor-mediated phagocytosis and macropinocytosis in macrophages. *J Cell Sci* 116, 247-57.
105. Kodama, T., Hazeki, K., Hazeki, O., Okada, T., Ui, M. (1999) Enhancement of chemotactic peptide-induced activation of phosphoinositide 3-kinase by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and its relation to the cytokine-mediated priming of neutrophil superoxide-anion production. *Biochem J* 337 (Pt 2), 201-9.
106. Ardeschna, K.M., Pizzey, A.R., Devereux, S., Khwaja, A. (2000) The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF-kappaB signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 96, 1039-46.
107. Hayes, A.L., Smith, C., Foxwell, B.M., Brennan, F.M. (1999) CD45-induced tumor necrosis factor alpha production in monocytes is phosphatidylinositol 3-kinase-dependent and nuclear factor-kappaB-independent. *J Biol Chem* 274, 33455-61.
108. Dempsey, E.C., Newton, A.C., Mochly-Rosen, D., Fields, A.P., Reyland, M.E., Insel, P.A., Messing, R.O. (2000) Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279, L429-L438.
109. Brumell, J.H., Howard, J.C., Craig, K., Grinstein, S., Schreiber, A.D., Tyers, M. (1999) Expression of the protein kinase C substrate pleckstrin in macrophages: association with phagosomal membranes. *Journal of Immunology* 163, 3388-3395.

110. Larsen, E.C., DiGennaro, J.A., Saito, N., Mehta, S., Loegering, D.J., Mazurkiewicz, J.E., Lennartz, M.R. (2000) Differential requirement for classic and novel PKC isoforms in respiratory burst and phagocytosis in RAW 264.7 cells. *J Immunol* 165, 2809-2817.
111. Melendez, A.J., Harnett, M.M., Allen, J.M. (1999) FcγRI activation of phospholipase Cg1 and protein kinase C in dibutyl cAMP-differentiated U937 cells is dependent solely on the tyrosine-kinase activated form of phosphatidylinositol 3-kinase. *Immunology* 98, 1-8.
112. Karimi, K., Gemmill, T.R., Lennartz, M.R. (1999) Protein kinase C and a calcium-independent phospholipase are required for IgG-mediated phagocytosis by Mono-Mac-6 cells. *J Leukoc Biol* 65, 854-862.
113. Karimi, K., Lennartz, M.R. (1995) Protein kinase C activation precedes arachidonic acid release during IgG-mediated phagocytosis. *J Immunol* 155, 5786-5794.
114. Breton, A., Descoteaux, A. (2000) Protein kinase C-α participates in FcγR-mediated phagocytosis in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 276, 472-476.
115. Karimi, K., Lennartz, M.R. (1998) Mitogen-activated protein kinase is activated during IgG-mediated phagocytosis, but it is not required for target ingestion. *Inflammation* 22, 67-82.
116. Allen, L.A., Aderem, A. (1995) A role for MARCKS, the α isozyme of protein kinase C and myosin I in zymosan phagocytosis by macrophages. *J Exp Med* 182, 829-840.
117. Lennartz, M.R., Yuen, A.F.C., McKenzie Masi, S., Russell, D.G., Buttle, K.F., Smith, J.J. (1997) Phospholipase A2 inhibition results in sequestration of plasma membrane into electronlucent vesicles during IgG-mediated phagocytosis. *J Cell Sci* 110, 2041-2052.
118. Raeder, E.M., Mansfield, P.J., Hinkovska-Galcheva, V., Shayman, J.A., Boxer, L.A. (1999) Syk activation initiates downstream signaling events during human polymorphonuclear leukocyte phagocytosis. *J Immunol* 163, 6785-6793.
119. Morgan, D., Cherny, V.V., Finnegan, A., Bollinger, J., Gelb, M.H., DeCoursey, T.E. (2007) Sustained activation of proton channels and NADPH oxidase in human eosinophils and murine granulocytes requires PKC but not cPLA2 α activity. *J Physiol* 579, 327-44.
120. Dekker, L.V., Leitges, M., Altschuler, G., Mistry, N., McDermott, A., Roes, J., Segal, A.W. (2000) Protein kinase C-β contributes to NADPH oxidase activation in neutrophils. *Biochem J* 347, 285-289.
121. Cote-Velez, M.J., Ortega, E., Ortega, A. (1999) Low affinity Fc γ receptors on murine macrophages: mitogen-activated protein kinase activation and AP-1 DNA binding activity. *Immunol Lett* 67, 251-5.
122. Nixon, J.B., McPhail, L.C. (1999) Protein kinase C (PKC) isoforms translocate to Triton-insoluble fractions in stimulated human neutrophils: correlation of conventional PKC with activation of NADPH oxidase. *J Immunol* 163, 4574-82.
123. Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B., Johnson, G.L. (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 79, 143-80.
124. Mansfield, P.J., Shayman, J.A., Boxer, L.A. (2000) Regulation of polymorphonuclear leukocyte phagocytosis by myosin light chain kinase after activation of mitogen-activated protein kinase. *Blood* 95, 2407-2412.
125. Hazan-Halevy, I., Seger, R., Levy, R. (2000) The requirement of both extracellular regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase for stimulation of cytosolic phospholipase A2 activity by either FcγRIIA or FcγRIIIB in human neutrophils: A possible role of Pyk2 but not for the Grb-2-Sos-Shc complex. *J Biol Chem* 275, 12416-12423.
126. Davis, R.J. (1995) Transcriptional regulation by MAP kinases. *Mol Reprod Dev* 42, 459-67.
127. Adachi, T., Kar, S., Wang, M., Carr, B.I. (2002) Transient and sustained ERK phosphorylation and nuclear translocation in growth control. *J Cell Physiol* 192, 151-9.
128. Zhao, M., Discipio, R.G., Wimmer, A.G., Schraufstatter, I.U. (2006) Regulation of CXCR4-mediated nuclear translocation of extracellular signal-related kinases 1 and 2. *Mol Pharmacol* 69, 66-75.
129. Coxon, P.Y., Rane, M.J., Powell, D.W., Klein, J.B., McLeish, K.R. (2000) Differential mitogen-activated protein kinase stimulation by Fcγ receptor IIa and Fcγ receptor IIIb determines the activation phenotype of human neutrophils. *J Immunol* 164, 6530-6537.
130. Kiefer, F., Brumell, J., Al-Alawi, N., Latour, S., Cheng, A., Veillette, A., Grinstein, S., Pawson, T. (1998) The Syk protein tyrosine kinase is essential for Fcγ receptor signaling in macrophages and neutrophils. *Mol Cell Biol* 18, 4209-20.
131. Raeder, E.M., Mansfield, P.J., Hinkovska-Galcheva, V., Kjeldsen, L., Shayman, J.A., Boxer, L.A. (1999) Sphingosine blocks human polymorphonuclear leukocyte phagocytosis through inhibition of mitogen-activated protein kinase activation. *Blood* 93, 686-693.
132. Song, X., Tanaka, S., Cox, D., Lee, S.C. (2004) Fcγ receptor signaling in primary human microglia: differential roles of PI-3K and Ras/ERK MAPK pathways in phagocytosis and chemokine induction. *J Leukoc Biol* 75, 1147-55.
133. Dewas, C., Fay, M., Gougerot-Pocidallo, M.A., El-Benna, J. (2000) The mitogen-activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway is involved in formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced p47phox phosphorylation in human neutrophils. *J Immunol* 165, 5238-44.

134. El Benna, J., Han, J., Park, J.W., Schmid, E., Ulevitch, R.J., Babior, B.M. (1996) Activation of p38 in stimulated human neutrophils: phosphorylation of the oxidase component p47phox by p38 and ERK but not by JNK. *Arch Biochem Biophys* 334, 395-400.
135. Garcia-Garcia, E., Sanchez-Mejorada, G., Rosales, C. (2001) Phosphatidylinositol 3-kinase and ERK are required for NF- $\kappa$ B activation, but not for phagocytosis. *J Leukoc Biol* 70, 649-658.
136. Lennartz, M.R., Lefkowitz, J.B., Bromley, F.A., Brown, E.J. (1993) Immunoglobulin G-mediated phagocytosis activates a calcium-independent, phosphatidylethanolamine-specific phospholipase. *J Leukoc Biol* 54, 389-398.
137. Lennartz, M.R., Brown, E.J. (1991) Arachidonic acid is essential for IgG Fc receptor-mediated phagocytosis by human monocytes. *J Immunol* 147, 621-626.
138. Aebischer, C.P., Pasche, I., Jorg, A. (1993) Nanomolar arachidonic acid influences the respiratory burst in eosinophils and neutrophils induced by GTP-binding protein. A comparative study of the respiratory burst in bovine eosinophils and neutrophils. *Eur J Biochem* 218, 669-77.
139. Azzoni, L., Kamoun, M., Salcedo, T.W., Kanakaraj, P., Perussia, B. (1992) Stimulation of Fc $\gamma$ RIIIA results in phospholipase C-g1 tyrosine phosphorylation and p56<sup>lck</sup> activation. *J Exp Med* 176, 1745-1750.
140. Shen, Z., Lin, C.T., Unkeless, J.C. (1994) Correlation among tyrosine phosphorylation of Sch, p72<sup>syk</sup>, PLC-g1, and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> flux in Fc $\gamma$ RIIA signaling. *J Immunol* 152, 3017-3023.
141. Scholl, P.R., Ahern, D., Geha, R.S. (1992) Protein tyrosine phosphorylation induced via the IgG receptors Fc gamma Ri and Fc gamma RII in the human monocytic cell line THP-1. *J Immunol* 149, 1751-7.
142. Botelho, R.J., Teruel, M., Dierckman, R., Anderson, R., Wells, A., York, J.D., Meyer, T., Gristein, S. (2000) Localized biphasic changes in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate at sites of phagocytosis. *J Cell Biol* 151, 1353-1368.
143. Rosales, C., Brown, E.J. (1991) Two mechanisms for IgG Fc-receptor-mediated phagocytosis by human neutrophils. *J Immunol* 146, 3937-44.
144. Melendez, A., Floto, R.A., Gillooly, D.J., Harnett, M.M., Allen, J.M. (1998) Fc $\gamma$ RI coupling to phospholipase D initiates sphingosine kinase-mediated calcium mobilization and vesicular trafficking. *J Biol Chem* 273, 9393-9402.
145. Suchard, S.J., Mansfield, P.J., Boxer, L.A., Shayman, J.A. (1997) Mitogen-activated protein kinase action during IgG-dependent phagocytosis in human neutrophils. Inhibition by Ceramide. *J Immunol* 158, 4961-4967.
146. Balboa, M.A., Balsinde, J., Aramburu, J., Mollinedo, F., Lopez-Botet, M. (1992) Phospholipase D activation in human natural killer cells through the Kp43 and CD16 surface antigens takes place by different mechanisms. Involvement of the phospholipase D pathway in tumor necrosis factor alpha synthesis. *J Exp Med* 176, 9-17.
147. Fullekrug, J., Simons, K. (2004) Lipid rafts and apical membrane traffic. *Ann N Y Acad Sci* 1014, 164-9.
148. Rajendran, L., Simons, K. (2005) Lipid rafts and membrane dynamics. *J Cell Sci* 118, 1099-102.
149. Simons, K., Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-72.
150. Anderson, R.G., Jacobson, K. (2002) A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science* 296, 1821-5.
151. Pike, L.J. (2004) Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem J* 378, 281-92.
152. Golub, T., Wacha, S., Caroni, P. (2004) Spatial and temporal control of signaling through lipid rafts. *Curr Opin Neurobiol* 14, 542-50.
153. Taner, S.B., Onfelt, B., Pirinen, N.J., McCann, F.E., Magee, A.I., Davis, D.M. (2004) Control of immune responses by trafficking cell surface proteins, vesicles and lipid rafts to and from the immunological synapse. *Traffic* 5, 651-61.
154. Brown, D.A., London, E. (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14, 111-36.
155. Bodin, S., Tronchere, H., Payrastre, B. (2003) Lipid rafts are critical membrane domains in blood platelet activation processes. *Biochim Biophys Acta* 1610, 247-57.
156. Harder, T. (2004) Lipid raft domains and protein networks in T-cell receptor signal transduction. *Curr Opin Immunol* 16, 353-9.
157. Holowka, D., Baird, B. (2001) Fc( $\epsilon$ )RI as a paradigm for a lipid raft-dependent receptor in hematopoietic cells. *Semin Immunol* 13, 99-105.
158. Matko, J., Szollosi, J. (2002) Landing of immune receptors and signal proteins on lipid rafts: a safe way to be spatio-temporally coordinated? *Immunol Lett* 82, 3-15.
159. Pierce, S.K. (2002) Lipid rafts and B-cell activation. *Nat Rev Immunol* 2, 96-105.
160. Resh, M.D. (2004) Membrane targeting of lipid modified signal transduction proteins. *Subcell Biochem* 37, 217-32.
161. Katsumata, O., Hara-Yokoyama, M., Sautes-Fridman, C., Nagatsuka, Y., Katada, T., Hirabayashi, Y., Shimizu, K., Fujita-Yoshigaki, J., Sugjya, H., Furuyama, S. (2001) Association of Fc $\gamma$ RII with low-density detergent-resistant membranes is important for cross-linking-dependent initiation of the tyrosine phosphorylation pathway and superoxide generation. *J Immunol* 167, 5814-23.

162. Floto, R.A., Clatworthy, M.R., Heilbronn, K.R., Rosner, D.R., MacAry, P.A., Rankin, A., Lehner, P.J., Ouwehand, W.H., Allen, J.M., Watkins, N.A., Smith, K.G. (2005) Loss of function of a lupus-associated FcγRIIb polymorphism through exclusion from lipid rafts. *Nat Med* 11, 1056-8.
163. Galandriani, R., Tassi, I., Mattia, G., Lenti, L., Piccoli, M., Frati, L., Santoni, A. (2002) SH2-containing inositol phosphatase (SHIP-1) transiently translocates to raft domains and modulates CD16-mediated cytotoxicity in human NK cells. *Blood* 100, 4581-9.
164. Sporn, S.A., Eierman, D.F., Johnson, C.E., Morris, J., Martin, G., Ladner, M., Haskill, S. (1990) Monocyte adherence results in selective induction of novel genes sharing homology with mediators of inflammation and tissue repair. *J Immunol* 144, 4434-41.
165. Haskill, S., Beg, A.A., Tompkins, S.M., Morris, J.S., Yurochko, A.D., Sampson-Johannes, A., Mondal, K., Ralph, P., Baldwin, A.S., Jr. (1991) Characterization of an immediate-early gene induced in adherent monocytes that encodes I kappa B-like activity. *Cell* 65, 1281-9.
166. Krutmann, J., Kirnbauer, R., Kock, A., Schwarz, T., Schopf, E., May, L.T., Sehgal, P.B., Luger, T.A. (1990) Cross-linking Fc receptors on monocytes triggers IL-6 production. Role in anti-CD3-induced T cell activation. *J Immunol* 145, 1337-42.
167. Marsh, C.B., Gadek, J.E., Kindt, G.C., Moore, S.A., Wewers, M.D. (1995) Monocyte Fc gamma receptor cross-linking induces IL-8 production. *J Immunol* 155, 3161-7.
168. Debets, J.M., Van de Winkel, J.G., Ceuppens, J.L., Dieteren, I.E., Buurman, W.A. (1990) Cross-linking of both Fc gamma RI and Fc gamma RII induces secretion of tumor necrosis factor by human monocytes, requiring high affinity Fc-Fc gamma R interactions. Functional activation of Fc gamma RII by treatment with proteases or neuraminidase. *J Immunol* 144, 1304-10.
169. Debets, J.M., Van der Linden, C.J., Dieteren, I.E., Leeuwenberg, J.F., Buurman, W.A. (1988) Fc-receptor cross-linking induces rapid secretion of tumor necrosis factor (cachectin) by human peripheral blood monocytes. *J Immunol* 141, 1197-201.
170. Crowley, M.T., Costello, P.S., Fitzer-Attas, C.J., Turner, M., Meng, F., Lowell, C., Tybulewicz, V.L., DeFranco, A.L. (1997) A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fcγ receptors on macrophages. *J Exp Med* 186, 1027-1039.
171. King, W.G., Mattaliano, M.D., Chan, T.O., Tschlis, P.N., Brugge, J.S. (1997) Phosphatidylinositol 3-kinase is required for integrin-stimulated AKT and Raf-1/mitogen-activated protein kinase pathway activation. *Mol Cell Biol* 17, 4406-4418.
172. Sizemore, N., Leung, S., Stark, G.R. (1999) Activation of phosphatidylinositol 3-kinase in response to interleukin-1 leads to phosphorylation and activation of the NF-kappaB p65/RelA subunit. *Mol Cell Biol* 19, 4798-805.
173. Reddy, S.A., Huang, J.H., Liao, W.S. (2000) Phosphatidylinositol 3-kinase as a mediator of TNF-induced NF-kappa B activation. *J Immunol* 164, 1355-63.
174. Hackam, D.J., Rotstein, O.D., Schreiber, A., Zhang, W., Grinstein, S. (1997) Rho is required for the initiation calcium signaling and phagocytosis by Fcγ receptors in macrophages. *J Exp Med* 186, 955-966.
175. Melendez, A.J., Harnett, M.M., Allen, J.M. (1999) Differentiation-dependent switch in protein kinase C isoenzyme activation by FcγRI, the human high-affinity receptor for immunoglobulin G. *Immunology* 96, 457-64.
176. Lang, M.L., Kerr, M.A. (2000) Characterization of FcαRI-triggered Ca<sup>2+</sup> signals: role in neutrophil NADPH oxidase activation. *Biochem Biophys Res Commun* 276, 749-55.
177. Zheng, L., Nibbering, P.H., Zomerijk, T.P., van Furth, R. (1994) Protein tyrosine kinase activity is essential for Fc gamma receptor-mediated intracellular killing of Staphylococcus aureus by human monocytes. *Infect Immun* 62, 4296-303.
178. Young, J.D., Ko, S.S., Cohn, Z.A. (1984) The increase in intracellular free calcium associated with IgG gamma 2b/gamma 1 Fc receptor-ligand interactions: role in phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 5430-4.
179. Barker, S.A., Caldwell, K.K., Pfeiffer, J.R., Wilson, B.S. (1998) Wortmannin-sensitive phosphorylation, translocation, and activation of PLCγ1, but not PLCγ2, in antigen-stimulated RBL-2H3 mast cells. *Mol Biol Cell* 9, 483-96.
180. Newman, S.L., Mikus, L.K., Tucci, M.A. (1991) Differential requirements for cellular cytoskeleton in human macrophage complement receptor- and Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Immunol* 146, 967-74.
181. Harris, P., Ralph, P. (1985) Human leukemic models of myelomonocytic development: a review of the HL-60 and U937 cell lines. *J Leukoc Biol* 37, 407-22.
182. Harris, P.E., Ralph, P., Gabrilove, J., Welte, K., Karmali, R., Moore, M.A. (1985) Distinct differentiation-inducing activities of gamma-interferon and cytokine factors acting on the human promyelocytic leukemia cell line HL-60. *Cancer Res* 45, 3090-5.
183. Mantovani, B. (1987) Phagocytosis of in vitro-aged erythrocytes—a sharp distinction between activated and normal macrophages. *Exp Cell Res* 173, 282-6.
184. Peters, M.J., Dixon, G., Kotowicz, K.T., Hatch, D.J., Heyderman, R.S., Klein, N.J. (1999) Circulating platelet-neutrophil complexes represent a subpopulation of activated neutrophils primed for adhesion, phagocytosis and intracellular killing. *Br J Haematol* 106, 391-9.

185. Richardson, M.D., Brownlie, C.E., Shankland, G.S. (1992) Enhanced phagocytosis and intracellular killing of *Candida albicans* by GM-CSF-activated human neutrophils. *J Med Vet Mycol* 30, 433-41.
186. Scheiffele, P., Roth, M.G., Simons, K. (1997) Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain. *Embo J* 16, 5501-8.
187. Balamuth, F., Brogdon, J.L., Bottomly, K. (2004) CD4 raft association and signaling regulate molecular clustering at the immunological synapse site. *J Immunol* 172, 5887-92.
188. Yamabhai, M., Anderson, R.G. (2002) Second cysteine-rich region of epidermal growth factor receptor contains targeting information for caveolae/rafts. *J Biol Chem* 277, 24843-6.
189. Walmsley, A.R., Zeng, F., Hooper, N.M. (2003) The N-terminal region of the prion protein ectodomain contains a lipid raft targeting determinant. *J Biol Chem* 278, 37241-8.
190. Polyak, M.J., Tailor, S.H., Deans, J.P. (1998) Identification of a cytoplasmic region of CD20 required for its redistribution to a detergent-insoluble membrane compartment. *J Immunol* 161, 3242-8.
191. Zhang, J., Pekosz, A., Lamb, R.A. (2000) Influenza virus assembly and lipid raft microdomains: a role for the cytoplasmic tails of the spike glycoproteins. *J Virol* 74, 4634-44.
192. Munro, S. (2003) Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* 115, 377-88.
193. Zidovetzki, R., Levitan, I. (2007) Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: Evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim Biophys Acta* 1768, 1311-24.
194. Giraud, F., M'Zali, H., Chailley, B., Mazet, F. (1984) Changes in morphology and in polyphosphoinositide turnover of human erythrocytes after cholesterol depletion. *Biochim Biophys Acta* 778, 191-200.
195. Ohvo-Rekila, H., Ramstedt, B., Leppimäki, P., Slotte, J.P. (2002) Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Prog Lipid Res* 41, 66-97.
196. Ramstedt, B., Slotte, J.P. (2002) Membrane properties of sphingomyelins. *FEBS Lett* 531, 33-7.
197. Haines, T.H. (2001) Do sterols reduce proton and sodium leaks through lipid bilayers? *Prog Lipid Res* 40, 299-324.
198. Hunter, S., Huang, M.M., Indik, Z.K., Schreiber, A.D. (1993) FcγRIIIA-mediated phagocytosis and receptor phosphorylation in cells deficient in the protein tyrosine kinase Src. *Exp Hematol* 21, 1492-1497.
199. Field, K.A., Holowka, D., Baird, B. (1997) Compartmentalized activation of the high affinity immunoglobulin E receptor within membrane domains. *J Biol Chem* 272, 4276-80.
200. Korzeniowski, M., Kwiatkowska, K., Sobota, A. (2003) Insights into the association of FcγRIII and TCR with detergent-resistant membrane domains: isolation of the domains in detergent-free density gradients facilitates membrane fragment reconstitution. *Biochemistry* 42, 5358-67.
201. Banki, Z., Kacani, L., Mullauer, B., Wilflingseder, D., Obermoser, G., Niederegger, H., Schennach, H., Sprinzl, G.M., Sepp, N., Erdei, A., Dierich, M.P., Stoiber, H. (2003) Cross-linking of CD32 induces maturation of human monocyte-derived dendritic cells via NF-κB signaling pathway. *J Immunol* 170, 3963-70.
202. Garcia-Garcia, E., Brown, E.J., Rosales, C. (2007) Transmembrane mutations to FcγRIIIA alter its association with lipid rafts: implications for receptor signaling. *J Immunol* 178, 3048-58.
203. Edberg, J.C., Salmon, J.E., Kimberly, R.P. (1992) Functional capacity of Fc γ receptor III (CD16) on human neutrophils. *Immunol Res* 11, 239-51.
204. Unkeless, J.C., Shen, Z., Lin, C.W., DeBeus, E. (1995) Function of human Fc γ RIIA and Fc γ RIIIB. *Semin Immunol* 7, 37-44.
205. Naziruddin, B., Duffy, B.F., Tucker, J., Mohanakumar, T. (1992) Evidence for cross-regulation of Fc γ RIIIB (CD16) receptor-mediated signaling by Fc γ RII (CD32) expressed on polymorphonuclear neutrophils. *J Immunol* 149, 3702-9.
206. Edberg, J.C., Moon, J.J., Chang, D.J., Kimberly, R.P. (1998) Differential regulation of human neutrophil FcγRIIIa (CD32) and FcγRIIIb (CD16)-induced Ca<sup>2+</sup> transients. *J Biol Chem* 273, 8071-9.
207. Williams, T.E., Nagarajan, S., Selvaraj, P., Zhu, C. (2000) Concurrent and independent binding of FcγRIIIa and IIIb to surface-bound IgG. *Biophys J* 79, 1867-75.
208. Sendo, F., Tsuchida, H., Takeda, Y., Gon, S., Takei, H., Kato, T., Hachiya, O., Watanabe, H. (1996) Regulation of neutrophil apoptosis—its biological significance in inflammation and the immune response. *Hum Cell* 9, 215-22.
209. Simon, H.U. (2003) Neutrophil apoptosis pathways and their modifications in inflammation. *Immunol Rev* 193, 101-10.
210. Burg, N.D., Pillinger, M.H. (2001) The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity. *Clin Immunol* 99, 7-17.
211. Downey, G.P., Butler, J.R., Tapper, H., Fialkow, L., Saitiel, A.R., Rubin, B.B., Grinstein, S. (1998) Importance of MEK in neutrophil microbicidal responsiveness. *J Immunol* 160, 434-443.
212. Lin, T.H., Rosales, C., Mondal, K., Bolen, J.B., Haskill, S., Juliano, R.L. (1995) Integrin-mediated tyrosine phosphorylation and cytokine message induction in monocytic cells. A possible signaling role for the Syk tyrosine kinase. *J Biol Chem* 270, 16189-97.
213. Rupprecht, A.P., Coleman, D.L. (1991) Transfection of adherent murine peritoneal macrophages with a reporter gene using DEAE-dextran. *J Immunol Methods* 144, 157-63.

214. Garcia-Garcia, E., Rosales, R., Rosales, C. (2002) Phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase are recruited for Fc receptor-mediated phagocytosis during monocyte to macrophage differentiation. *J Leukoc Biol* 72, 107-114.
215. Reyes-Reyes, M., Mora, N., Gonzalez, G., Rosales, C. (2002) beta1 and beta2 integrins activate different signalling pathways in monocytes. *Biochem J* 363, 273-80.
216. Wang, K., Scheel-Toellner, D., Wong, S.H., Craddock, R., Caamano, J., Akbar, A.N., Salmon, M., Lord, J.M. (2003) Inhibition of neutrophil apoptosis by type 1 IFN depends on cross-talk between phosphoinositol 3-kinase, protein kinase C-delta, and NF-kappa B signaling pathways. *J Immunol* 171, 1035-41.
217. Baeuerle, P.A. (1998) I kappa B-NF-kappa B structures: at the interface of inflammation control. *Cell* 95, 729-31.
218. Karin, M. (1999) The beginning of the end: I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B activation. *J Biol Chem* 274, 27339-42.
219. Buitrago, C.G., Ronda, A.C., de Boland, A.R., Boland, R. (2006) MAP kinases p38 and JNK are activated by the steroid hormone 1alpha,25(OH)2-vitamin D3 in the C2C12 muscle cell line. *J Cell Biochem* 97, 698-708.
220. Cianferoni, A., Massaad, M., Feske, S., de la Fuente, M.A., Gallego, L., Ramesh, N., Geha, R.S. (2005) Defective nuclear translocation of nuclear factor of activated T cells and extracellular signal-regulated kinase underlies deficient IL-2 gene expression in Wiskott-Aldrich syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 116, 1364-71.
221. Aplin, A.E., Hogan, B.P., Tomeu, J., Juliano, R.L. (2002) Cell adhesion differentially regulates the nucleocytoplasmic distribution of active MAP kinases. *J Cell Sci* 115, 2781-90.
222. Kasanah, N., Hamann, M.T. (2004) Development of antibiotics and the future of marine microorganisms to stem the tide of antibiotic resistance. *Curr Opin Investig Drugs* 5, 827-37.
223. Alanis, A.J. (2005) Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Arch Med Res* 36, 697-705.
224. Endo, Y., Takahashi, M., Fujita, T. (2006) Lectin complement system and pattern recognition. *Immunobiology* 211, 283-93.
225. Little, T.J., Hultmark, D., Read, A.F. (2005) Invertebrate immunity and the limits of mechanistic immunology. *Nat Immunol* 6, 651-4.
226. Nicholas, H.R., Hodgkin, J. (2004) Responses to infection and possible recognition strategies in the innate immune system of *Caenorhabditis elegans*. *Mol Immunol* 41, 479-93.
227. Iwanaga, S., Lee, B.L. (2005) Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *J Biochem Mol Biol* 38, 128-50.
228. Allam, B., Ashton-Alcox, K.A., Ford, S.E. (2002) Flow cytometric comparison of haemocytes from three species of bivalve molluscs. *Fish Shellfish Immunol* 13, 141-58.
229. Bigas, M., Durfort, M., Poquet, M. (2006) Cytological response of hemocytes in the European flat oyster, *Ostrea edulis*, experimentally exposed to mercury. *Biomaterials* 19, 659-73.
230. Carballal, M.J., Lopez, M.C., Azevedo, C., Villalba, A. (1997) Hemolymph cell types of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Dis Aqat Org* 29, 127-135.
231. Lopez, C., Carballal, M.J., Azevedo, C., Villalba, A. (1997) Morphological characterization of the hemocytes of the clam, *Ruditapes decussatus* (Mollusca: Bivalvia). *J Invertebr Pathol* 69, 51-7.
232. Soares-da-Silva, I.M., Ribeiro, J., Valongo, C., Pinto, R., Vilanova, M., Bleher, R., Machado, J. (2002) Cytometric, morphologic and enzymatic characterisation of haemocytes in *Anodonta cygnea*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 132, 541-53.
233. Gargioni, R., Barracco, M.A. (1998) Hemocytes of the palaemonids *Macrobrachium rosenbergii* and *M. acanthurus*, and of the penaeid *Penaeus paulensis*. *J Morphol* 236, 209-21.
234. Giulianini, P.G., Bertolo, F., Battistella, S., Amirante, G.A. (2003) Ultrastructure of the hemocytes of *Cetonischema aeruginosa* larvae (Coleoptera, Scarabaeidae): involvement of both granulocytes and oenocytoids in in vivo phagocytosis. *Tissue Cell* 35, 243-51.
235. Giulianini, P.G., Bierti, M., Lorenzon, S., Battistella, S., Ferrero, E.A. (2007) Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from the freshwater crayfish *Astacus leptodactylus*: cell types and their role after in vivo artificial non-self challenge. *Micron* 38, 49-57.
236. Goedken, M., De Guise, S. (2003) Flow cytometry as a tool to quantify oyster defence mechanisms. *Fish Shellfish Immunol* 10, 677-693.
237. Tafalla, C., Novoa, B., Figueras, A. (2002) Production of nitric oxide by mussel (*Mytilus galloprovincialis*) hemocytes and effect of exogenous nitric oxide on phagocytic functions. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 132, 423-31.
238. Carballal, M.J., Lopez, C., Azevedo, C., Villalba, A. (1997) In vitro study of phagocytic ability of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. haemocytes. *Fish Shellfish Immunol* 7, 403-416.
239. Arumugam, M., Romestand, B., Torreilles, J., Roch, P. (2000) In vitro production of superoxide and nitric oxide (as nitrite and nitrate) by *Mytilus galloprovincialis* haemocytes upon incubation with PMA or laminarin or during yeast phagocytosis. *Eur J Cell Biol* 79, 513-9.

240. Canesi, L., Betti, M., Ciacci, C., Scarpato, A., Citterio, B., Pruzzo, C., Gallo, G. (2002) Signaling pathways involved in the physiological response of mussel hemocytes to bacterial challenge: the role of stress-activated p38 MAP kinases. *Dev Comp Immunol* 26, 325-34.
241. Canesi, L., Lorusso, L.C., Ciacci, C., Betti, M., Zampini, M., Gallo, G. (2004) Environmental estrogens can affect the function of mussel hemocytes through rapid modulation of kinase pathways. *Gen Comp Endocrinol* 138, 58-69.
242. Canesi, L., Scarpato, A., Betti, M., Ciacci, C., Pruzzo, C., Gallo, G. (2002) Bacterial killing by *Mytilus* hemocyte monolayers as a model for investigating the signaling pathways involved in mussel immune defence. *Mar Environ Res* 54, 547-51.
243. Melendez, A., Floto, R.A., Cameron, A.J., Gillooly, D.J., Harnett, M.M., Allen, J.M. (1998) A molecular switch changes the signalling pathway used by the Fc gamma RI antibody receptor to mobilise calcium. *Curr Biol* 8, 210-21.
244. Melendez, A.J., Harnett, M.M., Allen, J.M. (1999) Differentiation-dependent switch in protein kinase C isoenzyme activation by FcγRI, the human high-affinity receptor for Immunoglobulin G. *Immunology* 96, 457-464.
245. Plows, L.D., Cook, R.T., Davies, A.J., Walker, A.J. (2004) Activation of extracellular-signal regulated kinase is required for phagocytosis by *Lymnaea stagnalis* haemocytes. *Biochim Biophys Acta* 1692, 25-33.