



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**MOVILIZACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR
INDUCIDA POR LOS RECEPTORES Fc EN
MONOCITOS THP-1 Y U937**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ADRIANA RODRÍGUEZ CRUZ



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. CARLOS ROSALES LEDEZMA
2012**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

1. DATOS DEL ALUMNO

Rodríguez
Cruz
Adriana
56728406
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
305557072

2. DATOS DEL TUTOR.

Dr.
Rosales
Ledezma
Carlos

3. DATOS DEL SINODAL 1

Dr.
Arreola
Ramírez
José Luis

4. DATOS DEL SINODAL 2

Dra.
Salceda
Sacanelles
Rocio

5. DATOS DEL SINODAL 3

M. en IBB.
Aguilar
León
Diana Elodia

6. DATOS DEL SINODAL 4

Dr.
Lascurain
Ledesma
Ricardo

7. DATOS DEL TRABAJO ESCRITO

Movilización de calcio intracelular inducida por los Receptores Fc en monocitos THP-1 y U937
51 p
2012

MOVILIZACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR INDUCIDA POR LOS RECEPTORES Fc EN MONOCITOS THP-1 Y U937

Este trabajo de tesis se realizó en el laboratorio del Dr. Carlos Rosales Ledezma, en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), con apoyo del Proyecto 168098 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y del Proyecto IN205311-2 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos Rosales Ledezma por abrir las puertas de su laboratorio, el cual me ha guiado hacia la investigación desde los inicios de la carrera, y por permitirme realizar la tesis bajo su tutoría.

A mi comité de sinodales: Dr. José Luis Arreola Ramírez, Dra. Rocío Salceda Sacanelles, M. en IIB. Diana Elodia Aguilar León y al Dr. Ricardo Lascurain Ledesma, quienes revisaron este trabajo y lo enriquecieron con sus comentarios, críticas y aportaciones.

A la M. en IBB. Nancy Yorley Mora Pérez por todo el apoyo y el tiempo que me brindó durante la fase experimental de este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio del Dr. Carlos Rosales Ledezma por su apoyo, enseñanzas y contribuciones.

A la M. en C. María del Carmen Arenas del Ángel quien me apoyo en la realización de varias técnicas de manera incondicional y me enseñó a disfrutar todos los momentos de la investigación.

Al Dr. Jaime Chávez Aldrete quien me motivó a continuar en la investigación y buscar nuevos horizontes.

A mi madre, padre y hermana por ser la base de lo que este trabajo representa.

Tabla de contenido

1. ABREVIATURAS	3
2. RESUMEN	5
3. ABSTRACT	6
4. INTRODUCCIÓN	8
4.1 EL SISTEMA INMUNOLÓGICO.....	8
4.1.2 <i>Células del sistema inmunológico</i>	8
4.1.3 <i>Los monocitos</i>	10
4.2 RECEPTORES FC.....	11
4.2.1 <i>Los FcγR</i>	11
4.2.1.1 El FcγRI.....	13
4.2.1.2 El FcγRII.....	13
4.2.1.3 FcγRIII.....	14
4.3 SEÑALIZACIÓN CELULAR MEDIANTE RECEPTORES FcγR.....	14
4.3.1 <i>Señalización mediante FcγR posterior a la activación de Syk</i>	15
4.3.2 <i>Calcio</i>	18
4.3.3 <i>Mediciones de [Ca²⁺]_i por Fluorescencia</i>	20
5. ANTECEDENTES	23
6. JUSTIFICACIÓN	24
7. HIPÓTESIS	24
8. OBJETIVOS	25
8.1 OBJETIVOS GENERALES.....	25
8.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	25
9. MÉTODOS	25
9.1 ANTICUERPOS Y REACTIVOS.....	25
9.2 CULTIVO CELULAR.....	26
9.3 CITOMETRÍA DE FLUJO.....	26
9.4 INCREMENTO EN LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR [Ca ²⁺] _i	27
9.4.1 <i>Carga celular con FURA-2/AM</i>	27
9.4.2 <i>Entrecruzamiento de los receptores FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIIA</i>	27
9.4.3 <i>Cambios en la [Ca²⁺]_i monitoreados mediante fluorescencia</i>	28
9.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	28
10. RESULTADOS	29
10.1 VERIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE FcγRI, FcγRII, FcγRIII EN LAS LÍNEAS CELULARES DE MONOCITOS THP-1 Y U937.....	29
10.1.1 <i>Expresión de FcγRI, FcγRII, FcγRIII en monocitos U937</i>	29
10.1.1 <i>Expresión de FcγRI, FcγRII, FcγRIII en monocitos THP-1</i>	30
10.2 INCREMENTO DE CALCIO INTRACELULAR [Ca ²⁺] _i MEDIADO POR LA ESTIMULACIÓN DE LOS RECEPTORES DE FcγRI, FcγRII, FcγRIII.....	31
10.2.1 <i>Incremento de calcio intracelular [Ca²⁺]_i en monocitos U937</i>	32

10.2.2 Incremento de calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ en monocitos THP-1.....	36
10.2.3 Incremento de calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ en ambas líneas celulares.....	40
11. DISCUSIÓN	41
12. CONCLUSIÓN	45
13. REFERENCIAS	46

1. Abreviaturas

BCR: receptor de células B.

Btk: cinasa de tirosina de Bruton.

$[Ca^{2+}]_i$: concentración de calcio intracelular.

DAG: diacilglicerol.

ERK: cinasa regulada por señales extracelulares.

Fc: región carboxilo terminal del anticuerpo conocida como fragmento cristalizante.

FcR: receptor Fc.

FcγR: receptor para la porción Fc de inmunoglobulina G (IgG).

FcγRI: clase I del receptor para la porción Fc de inmunoglobulina G (IgG).

FcγRII: clase II del receptor para la porción Fc de inmunoglobulina G (IgG).

FcγRIII: clase III del receptor para la porción Fc de inmunoglobulina G (IgG).

Gads: proteína adaptadora relacionada Grb2.

GPI: glicosilfosfatidilinositol.

HB-EGF: unión a heparina EGF.

IgG: inmunoglobulina G.

IP₃: inositol trifosfato

ITAM: secuencia de activación con tirosinas de inmunoreceptores.

ITIM: secuencia de inhibición con tirosinas de inmunoreceptores

LAT: ensamblador de activación para células T.

MAPK: proteína cinasa activada por mitógeno.

NF- κ B: factor nuclear κ B.

PH: homólogo de plecstrina.

PI3K: cinasa de fosfatidilinositol.

PIP₂: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

PIP₃: fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato

PLC γ : fosfolipasa C gamma

PKC: proteína cinasa C

PMN: polimorfonucleares.

RNA: ácido ribonucleico.

ROOC: canales de Ca²⁺ operados por receptores.

SH2: región homóloga a src2.

SLP76: región de SH2 que contiene proteína de leucocito de 76 kDa.

SOOC: canales de Ca²⁺ operados por almacenamiento.

Syk: cinasa de tirosina de vaso.

TCR: receptor de células T.

Vav: factor intercambiador de nucleótidos de guanina.

VOOC: canales de Ca²⁺ operados por voltaje.

2. Resumen

Los monocitos de humano expresan de manera constitutiva a la familia de receptores para la porción Fc de inmunoglobulina G (FcγR), la cual cuenta con tres clases de receptores FcγRI, FcγRII y FcγRIII, con subclases FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIC, FcγRIIIA y FcγRIIIB. Las vías de señalización que generan los FcγR han sido parcialmente caracterizadas, en general se conoce que los FcγR son capaces de activar diversas respuestas celulares en leucocitos, particularmente la fagocitosis, la producción de sustancias inflamatorias y el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$.

A pesar de que los tres receptores expresados en monocitos, sean activados de manera simultánea bajo condiciones fisiológicas, no existen trabajos recientes que investiguen la respuesta celular generada por la activación de cada uno de los FcγR con respecto al incremento en la $[Ca^{2+}]_i$. Dentro de los segundos mensajeros que actúan en la transducción de señales mediadas por FcγR, el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, es relevante para la fagocitosis. Por ello, el objetivo de este trabajo es determinar si la activación específica de cada uno de los FcγR, expresados en las líneas celulares de monocitos THP-1 y U937, induce un incremento distinto en la concentración intracelular de calcio.

Mediante citometría de flujo, se observó que los monocitos THP-1, al igual que los U937, expresan los receptores FcγRI y FcγRII; mientras que el FcγRIII no se encuentra expresado en estas líneas celulares. El incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ fue analizado por espectrofluorometría utilizando FURA-2/AM. En los monocitos THP-1 ambos receptores, tanto el FcγRI como el FcγRII, son capaces de inducir un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, siendo 2.7 veces mayor la respuesta mediada por el FcγRII. Mientras que en los monocitos U937 únicamente el FcγRII es capaz de inducir un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$. En conclusión, los FcγR expresados en ambas líneas celulares poseen diferentes capacidades en cuanto a la activación celular.

3. Abstract

The activation of FcγRs is critical in linking humoral and cellular immune response. The interaction of FcγRs with IgG antibodies, mediates several intracellular responses through signaling cascades, including: phagocytosis, respiratory burst, degranulation, antibody-dependent-cell-mediated cytotoxicity (ADCC), and cytokine production. Signal transduction is important to generate and regulate the immune response.

Monocytes are phagocytic cells that circulate in the blood and are present at high concentrations; they constantly migrate into the tissues to complete their differentiation to macrophages. Human monocytes constitutively express FcγRs family, which includes three classes FcγI, FcγII γ FcγIII.

Cross-linking of FcγRs leads to the activation of tyrosine kinases, followed by the phosphorylation and activation of PLC that forms IP₃ as a second messenger, which in turns participates in the mobilization of intracellular free calcium ($[Ca^{2+}]_i$). Therefore, $[Ca^{2+}]_i$ is considered an important reporter of signal transduction mechanisms, since the elevation of this ion is relevant for phagocytosis. To examine the signal transduction pathways mediated through FcγRs two human monocytic cell lines, THP-1 and U937, were used.

The expression of the FcγRs family in monocytes was detected by flow cytometry. Both cell lines expressed FcγRI and FcγRIIA but neither of them showed FcγRIIIA. In order to evaluate if each receptor was capable of inducing different signaling cascades; monocytes were stimulated by cross-linking selectively each type of FcγR with specific mAbs, and $[Ca^{2+}]_i$ elevation was then analyzed with fluorescent calcium measurements.

Even though both receptors FcγRI and FcγRIIA are capable of inducing a $[Ca^{2+}]_i$ elevation, in the monocytic cell line THP-1, this calcium rise is higher when FcγRIIA is cross-linked. In contrast, U937 monocytes are only capable of increasing the level of $[Ca^{2+}]_i$ when FcγRIIA is

activated. These data clearly show that each FcγR, expressed in both cell lines, possesses different signaling capabilities.

4. Introducción

4.1 El sistema inmunológico

El sistema inmunológico está conformado por un conjunto de tejidos, células y moléculas involucradas en la defensa del organismo. La cooperación de estos elementos sirve para proteger al individuo contra enfermedades y agentes infecciosos. Para ello debe existir reconocimiento inmunológico, funciones efectoras del sistema inmunológico y memoria inmunológica.

El reconocimiento inmunológico se lleva a cabo mediante células del sistema inmunológico innato, el cual provee una respuesta inmediata y poco específica, y por los linfocitos del sistema inmunológico adaptativo, el cual es un sistema tardío más preciso. Para contener y/o eliminar la infección son necesarias las funciones efectoras del sistema inmunológico, las cuales actúan mediante proteínas en sangre (complemento), anticuerpos y células del sistema inmunológico (leucocitos) (Murphy *et. al.*; 2008).

La inmunidad adaptativa, es la respuesta montada por linfocitos específicos para un antígeno. En la respuesta inmunológica adaptativa, los linfocitos contra un antígeno específico proliferan y se diferencian en linfocitos efectores que eliminan el patógeno. En el proceso de eliminación de un patógeno, el sistema inmunológico adaptativo genera un aumento en el número de linfocitos de memoria diferenciados lo cual permite una respuesta más efectiva y rápida en caso de reinfección. La memoria inmunológica es una característica única del sistema inmunológico adaptativo y gracias a ésta los individuos pueden estar protegidos contra enfermedades recurrentes (Murphy *et. al.*; 2008).

4.1.2 Células del sistema inmunológico

Las células del sistema inmunológico denominadas leucocitos o glóbulos blancos, se originan de células hematopoyéticas pluripotenciales que se encuentran en la médula ósea. Estas

células pluripotenciales se dividen para producir dos linajes: el linfoide y el mieloide (Figura 1.).

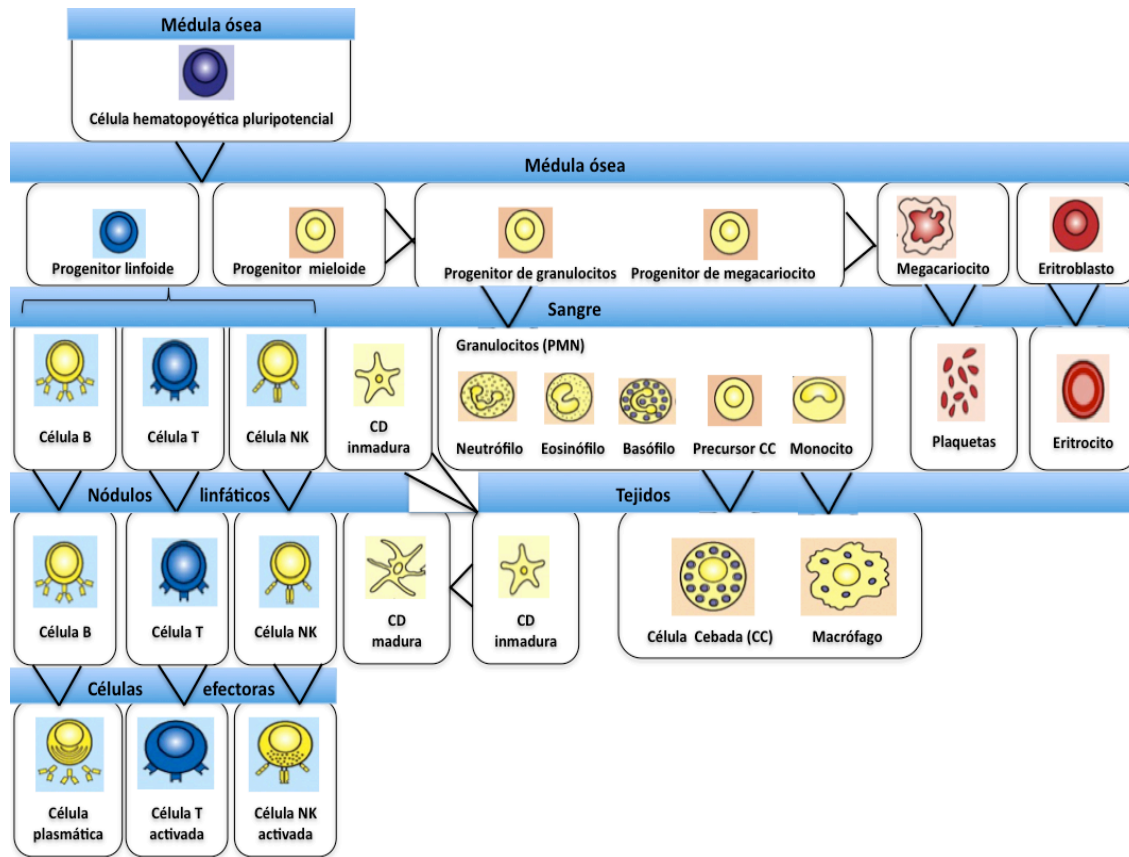


Figura 1. Diferenciación de las células del sistema inmunológico. La célula hematopoyética pluripotencial da origen a dos linajes el linfóide y el mieloide. El linaje mieloide da lugar a los granulocitos o células polimorfonucleares (PMN). El precursor de las células cebadas (CC) no se conoce aún pero se sabe que pertenece al linaje mieloide. Por su parte las células dendríticas son de origen tanto linfóide como mieloide; sin embargo la mayor parte se originan del progenitor mieloide (Modificado de: Murphy *et. al.*; 2008).

El progenitor linfóide se desarrolla y diferencia en linfocitos T, linfocitos B y células asesinas naturales (NK) del inglés natural killer. Los linfocitos T y B se distinguen de los otros leucocitos por que cuentan con receptores de antígenos, y entre ellos por su sitio de diferenciación, los linfocitos T se diferencian en el timo y los linfocitos B en la médula ósea. Éstos leucocitos se convierten en células efectoras cuando reconocen a un antígeno; en este

caso los linfocitos B se diferencian en células plasmáticas secretoras de anticuerpos y los linfocitos T se diferencian en tres tipos funcionales (Murphy *et. al.*; 2008).

Las células T citotóxicas, se encargan de matar a células infectadas por virus o patógenos intracelulares, las células T ayudadoras proveen señales adicionales que son esenciales para activar a las células B y así estimular la producción de anticuerpos, y las células T reguladoras suprimen la actividad de otros linfocitos y ayudan a controlar la respuesta inmunológica (Murphy *et. al.*; 2008).

El progenitor mieloide da lugar al resto de los leucocitos, a los eritrocitos (células rojas) y a los megacariocitos, los cuales producen las plaquetas. Los leucocitos que se desarrollan del linaje mieloide son los monocitos, las células dendríticas y los granulocitos. Dentro de estos últimos se encuentran los neutrófilos (también conocidos como células polimorfonucleares PMN), los eosinófilos y los basófilos. Las células del linaje mieloide conforman la mayor parte de los leucocitos de la inmunidad innata (Murphy *et. al.*; 2008).

4.1.3 Los monocitos

Después de los neutrófilos, los monocitos son las células del linaje mieloide presentes en mayor concentración en sangre. Por cada litro de sangre, el número de monocitos varía entre un $0.15-0.6 \times 10^9$. Estas células fagocíticas circulan en la sangre y constantemente migran a los tejidos para completar su diferenciación a macrófagos (Murphy *et. al.*; 2008).

La fagocitosis es el proceso mediante el cual las células ingieren partículas de gran tamaño, normalmente con un diámetro mayor a $0.5 \mu\text{m}$. Este proceso juega un papel esencial en los mecanismos de defensa inmunológica a través de la captura, la destrucción de antígenos y también contribuye en procesos inflamatorios (García y Rosales, 2002).

A pesar de presentar una respuesta fagocítica menor a aquella de los neutrófilos y macrófagos; los monocitos se incluyen dentro del grupo de fagocitos profesionales (Rabinovitch, 1995). Debido a su papel fagocítico, estas células son importantes en la respuesta de la inmunidad innata.

4.2 Receptores Fc

Los receptores Fc (FcR) son una familia de moléculas de superficie celular que se unen a la porción Fc (fragmento cristalizante) de las inmunoglobulinas. Por ello también se les conoce como receptores específicos para anticuerpos. Dependiendo del tipo de inmunoglobulina que reconocen; se les han clasificado de la siguiente manera: para los que reconocen anticuerpos IgA se les denomina Fc α R, para IgE se denominan Fc ϵ R y para la IgG denominados Fc γ R (Mora y Rosales, 2009).

La interacción de los receptores Fc con anticuerpos, media numerosas respuestas celulares importantes para contribuir con la respuesta del sistema inmunológico contra el organismo invasor. Las cuales incluyen la fagocitosis, el estallido respiratorio, la liberación de moléculas microbicidas por degranulación, la citotoxicidad dependiente de anticuerpos y la producción de citocinas proinflamatorias (García *et. al.*; 2009).

4.2.1 Los Fc γ R

Los receptores que se unen a inmunoglobulina G (IgG) se conocen como receptores Fc gamma (Fc γ R); en humanos se han identificado tres clases de Fc γ R: Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) y Fc γ RIII (CD16) (Figura 2.). Varios genes codifican para los Fc γ R en cada clase y se localizan en el cromosoma 1 en q21-23. Tres genes A, B y C existen para Fc γ RI y Fc γ RII; y dos genes A y B existen para Fc γ RIII (García y Rosales, 2002). Funcionalmente, los receptores Fc γ R se pueden dividir en dos clases, los activadores y los inhibidores.

Los activadores (FcγR1a, FcγR1la, FcγR1lla) presentan en su región intracitoplásmica secuencias ITAM (secuencia de activación con tirosinas de inmunoreceptores), que consisten en dos pares de tirosinas y leucinas con una secuencia consenso Tyr-X-X-(Leu/Ile)-X6–8-Tyr-X-X-(Leu/Ile), donde X denota cualquier amino ácido. Se ha demostrado que ésta secuencia es importante para la transducción de señales (Sánchez-Mejorada y Rosales, 1998 b). Las secuencias ITAM no sólo se encuentran en los receptores FcγR, sino también en otros inmunoreceptores involucrados en la activación de células del sistema inmune; como lo son: TCR, BCR, FcαRI y el FcεRI.

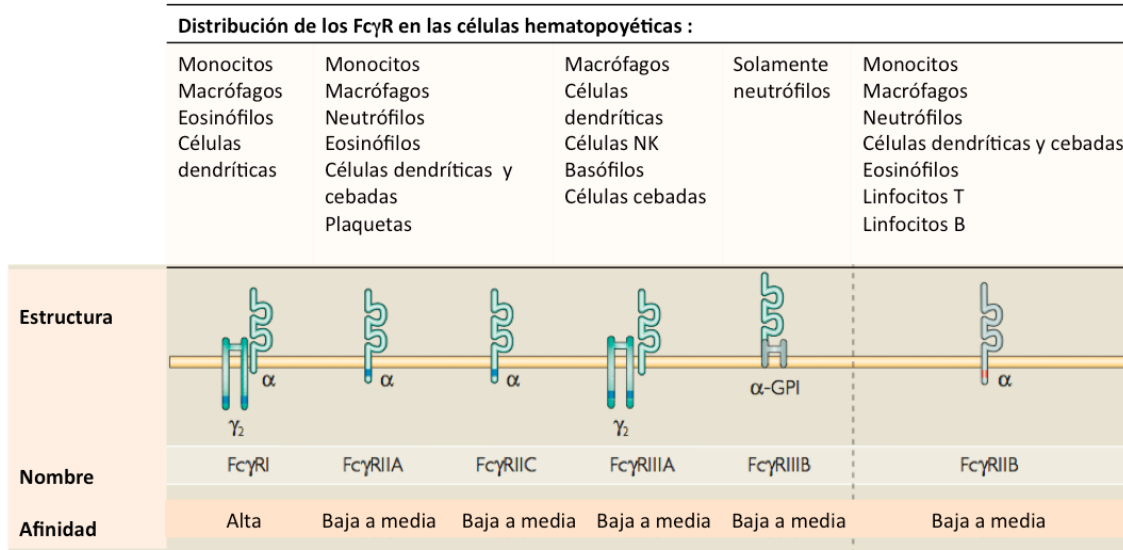


Figura 2. Familia de receptores Fcγ en humano. Cuenta con tres clases de receptores FcγRI, FcγRII y FcγRIII. Sus isoformas se representan mediante letras mayúsculas. Cada subunidad del receptor se representa con letras griegas (α o γ). Con respecto al tipo de señales iniciadas por cada FcRγ, sólo existe un receptor, el FcγRIIB, con cadena inhibitoria la cual contiene una secuencia ITIM (secuencia de inhibición con tirosinas de inmunoreceptores) en la región citoplásmica (representado en rojo). A excepción de los receptores FcγRIIA y FcγRIIC; los FcRγs activadores consisten de un ligando unido a una cadena α y una cadena γ de transducción de señal, la cual cuenta con una secuencia ITAM (secuencia de activación con tirosinas de inmunoreceptores). El receptor FcγRIIB se ancla a la membrana plasmática por medio del receptor glicosilfosfatidilinositol (GPI), el cual se encuentra expresado exclusivamente en neutrófilos. En la parte superior de la figura de cada receptor se

mencionan las células hematopoyéticas que lo expresan, y en la inferior la afinidad de cada receptor por la IgG. (Modificado de: Nimmerjahn y Ravetch, 2008).

Los receptores involucrados en la señalización negativa (FcγRIIB) cuentan con una secuencia ITIM (secuencia de inhibición con tirosinas de inmunoreceptores) (Mora y Rosales, 2009). Esta secuencia se encuentra en la porción citoplasmática del FcγRIIB; una región pequeña que consta de trece residuos de aminoácidos. Su secuencia consenso es (Ile/Val/Leu/Ser)-X-Tyr-X-X- (Leu/Val), donde X denota cualquier aminoácido. La secuencia ITIM, contiene un residuo de tirosina y es necesaria para reclutar proteínas reguladoras con señalización inhibitoria (Nimmerjahn y Ravetch, 2008).

4.2.1.1 El FcγRI

A pesar de que en humanos se han identificado tres genes para el receptor FcγRI, sólo la isoforma FcγRIa es expresada en las membranas celulares; los RNA mensajeros de los genes FcγRIb y C producen proteínas solubles. El receptor FcγRIa se clasifica como receptor de alta afinidad. Es un heterotrímero compuesto de una subunidad α la cual se asocia de manera no covalente a un dímero de cadenas γ (Ortega y Soto, 2007).

4.2.1.2 El FcγRII

En humanos, existen al menos cinco isoformas del receptor FcγRII (FcγRIIa, FcγRIIb1, FcγRIIb2, FcγRIIb3, FcγRIIc) las cuales derivan de la maduración del RNA de sus tres genes (FcγRIIA, B y C); y la isoforma FcγRIIa únicamente se expresa en humanos (Ortega y Soto, 2007).

Los FcγRII son receptores de baja afinidad por la IgG. Por ello presentan afección por complejos inmunes multiméricos. Las regiones extracelulares de todas las isoformas presentan dos regiones tipo IgG. Las diferencias en la estructura de las porciones intracitoplásmicas de estos receptores determinan su actividad activadora o inhibitoria (Mora y Rosales, 2009).

En su región intracitoplásmica, los receptores FcγRII no tienen cadenas γ asociadas. Las isoformas activadoras, FcγRIIa y FcγRIIc, se expresan en células mieloides, entre ellas los monocitos; y su cadena α dentro de su porción citoplasmática contiene una secuencia ITAM. La isoforma FcγRIIb, cuenta con una secuencia ITIM; por lo que éste receptor regula negativamente las funciones celulares como fue revisado por Rosales, 2007.

4.2.1.3 FcγRIII

Como fue revisado por Ortega y Soto, 2007; los receptores FcγRIII presentan baja afinidad y dos regiones extracelulares de tipo IgG. El gen FcγRIIIA codifica una proteína transmembranal (FcγRIIIa) asociada no covalentemente con un dímero de cadenas γ. La asociación con ellas es necesaria para la expresión del receptor en la membrana celular. La vía de señalización es a través de su secuencia ITAM. El gen FcγRIIIB codifica para el receptor FcγRIIIb, el cual no cuenta con una región transmembranal y solamente se expresa en humanos. Este receptor se encuentra anclado a la membrana mediante glicosilfosfatidilinositol (GPI), se expresa únicamente en neutrófilos y sus mecanismos de transducción de señal no se conocen con claridad.

4.3 Señalización celular mediante receptores FcγR

Los FcγR modulan la respuesta inmunológica por medio de cascadas de señalización intracelulares. El entrecruzamiento de los FcγR, inducido por los complejos inmunes o por partículas opsonizadas con IgG, dispara los eventos bioquímicos que median la transducción de señal y la activación celular.

El entrecruzamiento de los FcγR resulta en la colocalización de los mismos hacia las balsas lipídicas, regiones de la membrana celular enriquecidas de colesterol y esfingolípidos (Rajendran y Simons, 2005), junto con las cinasas de la familia de Src incluyendo a Src, Fyn,

Fgr, Hck, y Lyn, las cuales han sido identificadas en células fagocíticas (Sánchez-Mejorada y Rosales, 1998b).

Las cinasas de Src se encuentran de forma inactiva en la parte interna de la membrana celular, cerca de las porciones citoplásmicas de los receptores. Cuando los Fc γ R son agregados en las balsas lipídicas, entonces las cinasas de la familia Src pueden interactuar con ellos; fosforilando los residuos de tirosina de las secuencias ITAM del receptor. Las principales cinasas de la familia de Src involucradas en la señalización por los Fc γ R son Fgr, Hck, y Lyn. En el caso de los monocitos, se ha observado que Lyn y Hck son activados por los receptores Fc γ R1IIa y Fc γ R1IIa (Ghazizadeh *et. al.*; 1994).

Como fue revisado por Mora y Rosales, 2009; los ITAM fosforilados se convierten en sitios de unión para las regiones SH2 (región homóloga a src2) de la cinasa Syk (cinasa de tirosina de vaso). La cinasa Syk, fosforila múltiples sustratos que activan diversas vías de señalización para llevar a cabo respuestas celulares específicas o cambios transcripcionales de genes involucrados en la regulación del crecimiento celular como lo son HB-EGF, ciclina D1, Fos y p21 (Weinberg, 2007) (Figura 3.).

4.3.1 Señalización mediante Fc γ R posterior a la activación de Syk

La activación de Syk genera la fosforilación y activación del complejo molecular de señalamiento formado por SLP76 (región de SH2 que contiene proteína de leucocito de 76 kDa) y LAT (ensamblador de activación para células T), los cuales interactúan por medio de la proteína Gads (proteína adaptadora relacionada Grb2) (Bezman y Koretzky, 2007). En monocitos LAT se encontró constitutivamente asociada con la cadena de Fc γ R, esta unión podría explicar por qué SLP76 parece no ser requerida durante la señalización de Fc γ R en monocitos (Tridandapani *et. al.*; 2000).

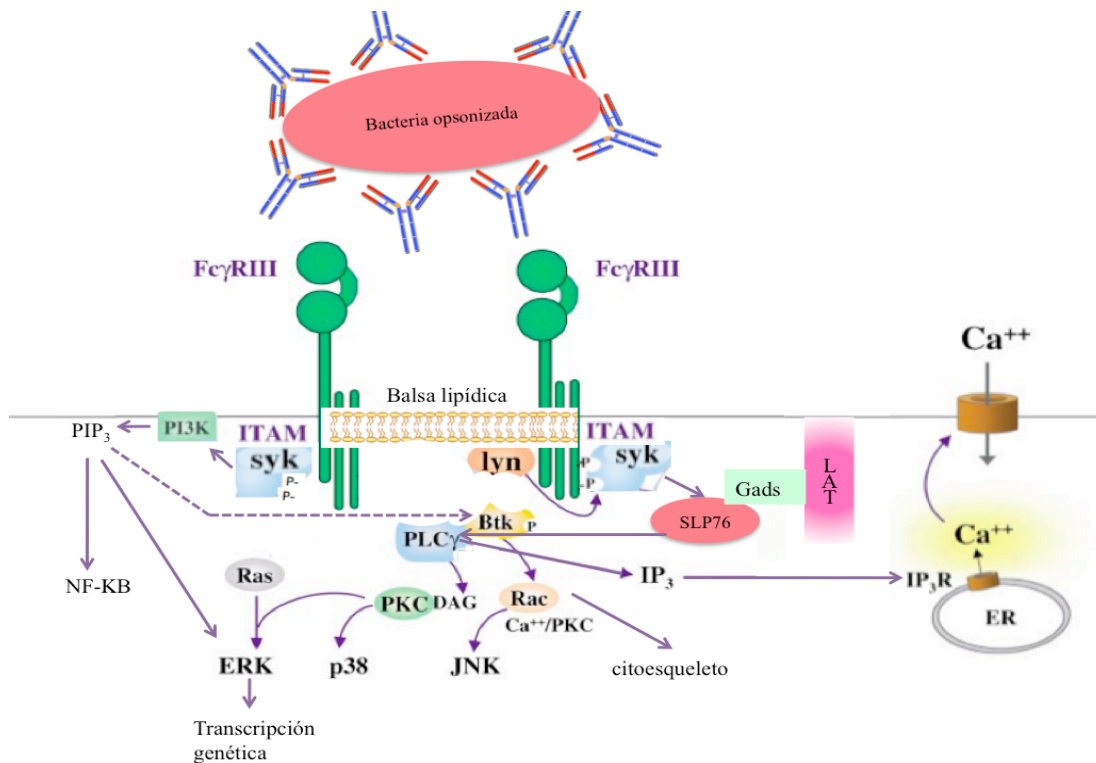


Figura 3. Transducción de señales de los receptores Fcγ. La agregación de los FcγR por las IgG unidas a antígeno inducen la activación de las cinasas de la familia Src (Lyn), fosforilando los residuos de tirosina de las secuencias ITAM. Los ITAM fosforilados se convierten en sitios de unión para las regiones SH2 de la cinasa Syk. La activación de Syk genera la fosforilación y activación del complejo molecular de señalamiento formado por SLP76 y LAT, los cuales interactúan por medio de la proteína Gads. Otras proteínas también son reclutadas, entre ellas la PLCγ, la cual genera dos segundos mensajeros: IP₃ el cual causa la liberación de calcio intracelular [Ca²⁺]_i; y DAG quien activa a la PKC. La PKC activa a las cinasas p38 y ERK. Por su parte, la activación de PI3K, genera la producción de PIP₃; con ello activa a factores nucleares como NF-κB. La Btk activa a la GTPasa de Rac quienes están involucradas en la regulación del citoesqueleto de actina. P representa un grupo fosfato, JNK cinasa de Jun, IP₃R receptor para IP₃ (Modificado de: Ravetch y Bolland, 2001).

Posterior al ensamblaje del complejo SLP76 y LAT, los eventos de señalización no se tienen bien definidos. Sin embargo, se conoce que otras proteínas son reclutadas a este complejo, entre ellas la fosfolipasa C (PLCγ), la cual hidroliza a fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) generando dos segundos mensajeros. Inositol trifosfato (IP₃) el cual causa la liberación de

calcio intracelular [Ca^{2+}]_i y diacilglicerol (DAG) quien activa a la proteína cinasa C (PKC) (revisado por Rosales, 2007).

La PKC activa a las cinasas p38 y ERK (cinasa regulada por señales extracelulares) también conocida como MAPK (proteína cinasa activada por mitógeno). La cascada de señalización de la MAPK fosforila serinas y treoninas de proteínas reguladoras de genes, como Elk-1, Ets y SAP-1 (Weinberg, 2007); por lo que se altera su capacidad para controlar la transcripción de los genes, produciendo un cambio en el patrón de expresión génica (Alberts *et. al.*; 2004). ERK también tiene la capacidad de fosforilar diversos sustratos localizados en diferentes compartimientos celulares; los cuales incluyen a: proteínas cinasas, proteínas efectoras de señalización, receptores, proteínas de citoesqueleto y factores nucleares de regulación transcripcional (revisado por Ortega y Soto, 2007). ERK media la activación de factores nucleares como Elk y NF- κ B (factor nuclear κ B), los cuales son importantes para la expresión de citocinas (Sánchez-Mejorada y Rosales, 1998a).

Es importante señalar, que ERK también puede ser activado mediante la vía de señalización de las MAP cinasas. La activación de estas cinasas involucra una activación de cascadas que se compone de tres proteínas cinasas; las cuales actúan en un relevo controlado mediante el cambio a su forma activa a partir de fosforilación. La unión de ligandos a su respectivo receptor celular induce la activación de Ras, una proteína de unión a GTP monomérica. Ras recluta a la MAP cinasa cinasa cinasa (Raf) a la membrana para su subsecuente activación mediante fosforilación. La forma activa de Raf, fosforila y activa a la MAP cinasa cinasa (MEK), que a su vez activa a la cinasa efectora MAP cinasa (ERK) (revisado por Ortega y Soto, 2007).

Por su parte, Syk induce la activación de otras enzimas como la cinasa de fosfatidilinositol 3 (PI3K), la cual genera la producción de fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP₃) a partir de fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂). El PIP₃ señala desde la membrana celular sirviendo como

sitio de anclaje para dominios PH (homólogo de plecstrina) presentes en varias proteínas; incluyendo a: la familia de tirosincinasas de Tec (Btk y Tec), factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs) para GTPasas pequeñas (como Vav).

La Btk (cinasa de tirosina de Bruton) activa a la familia de GTPasas Rac, quienes a su vez están involucradas en la regulación del citoesqueleto de actina (Ravetch y Bolland, 2001). Vav activa a la familia de GTPasas de Rho, que incluye a Rho, Rac y Cdc42. La catálisis por GEFs (factores intercambiadores de nucleótidos de guanina), induce el intercambio de estas GTPasas, mediante la transición de la guanosina 5'-bifosfato (GDP) a la forma guanosina 5'-trifosfato (GTP). Estas GTPasas son importantes en la reorganización del citoesqueleto generando la formación de filopodios y lamelipodios (García y Rosales, 2002). A su vez el PIP₃, activa a factores nucleares como NF-κB quien activa ciertos genes para la codificación de proteínas involucradas en la defensa inmunológica.

Dependiendo del tipo celular y de las señales de regulación; las vías de transducción de señal mediadas a partir del acoplamiento de los FcγR con complejos inmunes, pueden llevar a respuestas funcionales como: la producción de citocinas, endocitosis, fagocitosis, estallido respiratorio, degranulación y la citotoxicidad mediada por células dependiente anticuerpo; de esta manera la activación de los FcγR modula la respuesta inmunológica (Sánchez-Mejorada y Rosales, 1998b).

4.3.2 Calcio

La movilización de calcio en las células del sistema inmunológico puede tener distintos orígenes: el medio extracelular, las reservas citosólicas (retículo endoplásmico y mitocondria) o ambos mediante varios mecanismos. Existen diversos canales de calcio involucrados en su movilización desde el medio extracelular; los cuales incluyen: canales de Ca²⁺ operados por voltaje (VOCC), canales de Ca²⁺ operados por receptores (ROCC), y canales de Ca²⁺ operados

por almacenamiento (SOCC). Estos últimos se expresan de manera ubicua en la membrana plasmática y son activados en respuesta a la liberación de calcio de las reservas intracelulares. En estado de reposo, las $[Ca^{2+}]_i$ son muy bajas (100-200 nM); sin embargo el estímulo de las células induce un incremento drástico de $[Ca^{2+}]_i$ llegando hasta concentraciones de $1\mu M$ (Bootman *et. al.*; 2001).

Dentro de los segundos mensajeros que actúan en la transducción de señales mediadas por Fc γ R, el incremento en las $[Ca^{2+}]_i$, es relevante para la fagocitosis. A pesar de que los receptores Fc γ R pueden inducir un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ durante la fagocitosis, este incremento parece estar asociado con las diferentes isoformas de Fc γ R.

Se ha reportado que en macrófagos la estimulación de Fc γ RI o el Fc γ RII, inducen a un incremento de las $[Ca^{2+}]_i$ mediado por la PLC (Choi *et. al.*; 1996). En el caso de células dendríticas, se encontró que posterior al entrecruzamiento del Fc ϵ RI el fosfato de esfingosina, es el segundo mensajero responsable para el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ (Melendez *et. al.*; 1998). De igual forma, fue reportado que para los monocitos diferenciados a macrófagos, el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ es más prolongada (Choi *et. al.*; 1996). Por ello, el segundo mensajero así como el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ causado por la activación de los Fc γ R durante la fagocitosis, debe variar dependiendo del receptor particular involucrado y el estado de diferenciación de la célula (García y Rosales, 2002).

Durante la fagocitosis mediada por IgG, el incremento de $[Ca^{2+}]_i$ es mayor en el citoplasma que rodea a la copa fagocítica; por ello se considera que el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ es una consecuencia directa de la señalización mediante Fc γ R. De igual manera, el Ca^{2+} es importante para iniciar la depolimerización de actina alrededor de los fagosomas (García y Rosales, 2002).

4.3.3 Mediciones de $[Ca^{2+}]_i$ por Fluorescencia

Existen diversos indicadores para fluorescencia; FURA-2/AM es el indicador ejemplar para excitación dual, es decir a dos longitudes de onda. En cuanto a sus propiedades de fluorescencia, FURA-2/AM se encuentra en el grupo de los indicadores excitados cerca de la longitud de onda de luz ultravioleta (UV) que va de los 340 a 380 nm. Las propiedades fundamentales de éste indicador, consisten en que su unión a Ca^{2+} produce un cambio en la longitud de onda ya sea en el espectro de emisión o excitación (Hirst *et. al.*; 1999).

Los indicadores de Ca^{2+} , son moléculas polares y por ello no pueden cruzar la membrana celular. Sin embargo FURA-2/AM (AM: acetometil) (Figura 4.), que tiene esterificados sus grupos carboxilos, los hace lipofílicos y puede ser introducido a la célula. Dentro de la célula las esterasas que remueven grupos éster, dejan al indicador de Ca^{2+} libre y con carga dentro de la misma; en donde es capaz de unirse a Ca^{2+} (Simpson, 1999).

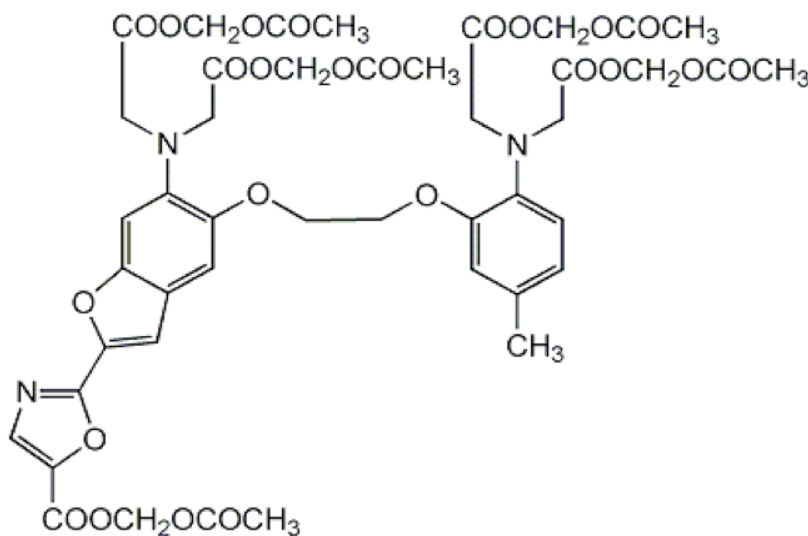


Figura 4. Fórmula semidesarrollada de FURA-2/AM. En su estructura se observan los grupos éster.

En condiciones donde las concentraciones de Ca^{2+} son bajas, FURA-2/AM muestra un espectro de excitación amplio entre los 300 y 400nm con un pico aproximado a 370nm;

cuando hay unión a Ca^{2+} el pico de excitación incrementa en intensidad y también se mueve hacia el espectro UV (Hirst *et. al.*; 1999).

La unión de Ca^{2+} con FURA-2/AM producirá un aumento en fluorescencia. La máxima fluorescencia de FURA-2/AM se observa a una longitud de onda excitatoria de 340 nm, y su emisión a 510 nm. Mientras que, una disminución en la señal de fluorescencia se observará cuando el indicador se excita a 380 nm, es decir en condiciones libres de Ca^{2+} (Figura 5.). Es por ello que cuando FURA-2/AM es excitado mediante una sucesión rápida entre 340 y 380 nm, la razón entre las señales de emisión puede ser utilizada para monitorear las concentraciones de Ca^{2+} ; ya que la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es proporcional a la razón de fluorescencia entre 340/380 nm (Hirst *et. al.*; 1999).

En este sistema de monitoreo de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, la señal de la razón no depende de la concentración de FURA-2/AM dentro de las células. Por ello, las variaciones en estos parámetros no afectarán a las estimaciones de $[\text{Ca}^{2+}]$.

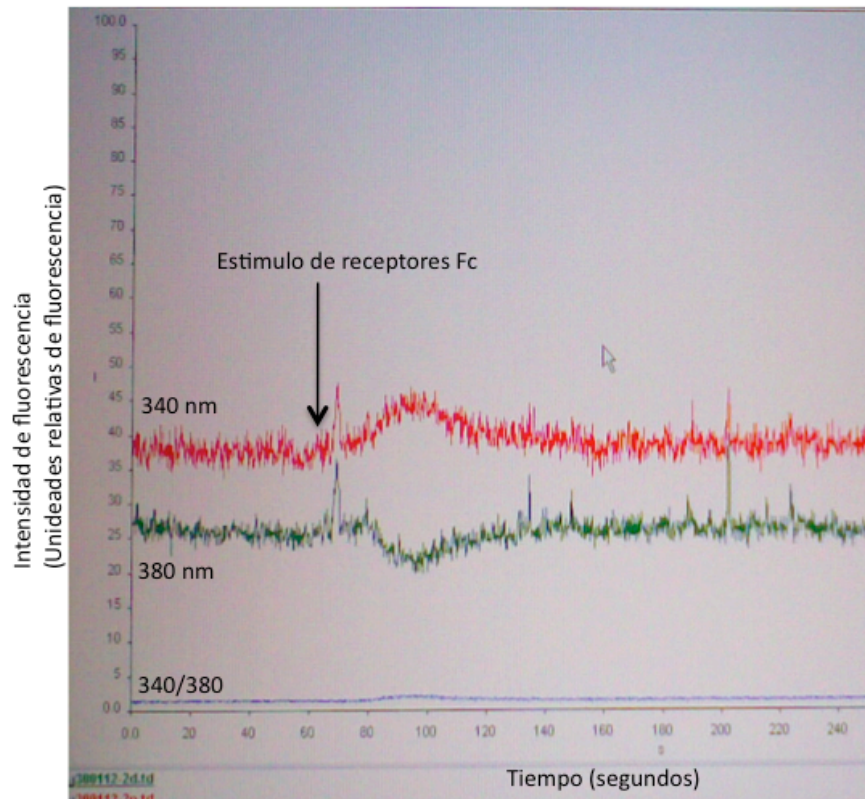


Figura 5. Señales típicas obtenidas de una lectura con monocitos THP-1, cargados con FURA-2/AM y excitadas alternativamente a 340nm y 380nm. El estímulo de los FcγR ocasiona un aumento en la señal de 340 nm (rojo: FURA-2/AM unido a Ca²⁺) y un decremento en la señal de 380 nm (verde: FURA-2/AM libre). La razón de fluorescencia entre 340/380 nm se observa en azul.

5. Antecedentes

Las vías de señalización que generan los FcγR han sido parcialmente caracterizadas, en general se conoce que los FcγR son capaces de activar diversas respuestas celulares en leucocitos, particularmente la fagocitosis, la producción de sustancias inflamatorias y el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ (Odin *et. al.*; 1991).

Estudios previos realizados en monocitos y neutrófilos, activan a los FcγR con IgG policlonal de humano. En algunos también se incluyen partículas opsonizadas con IgG, en su mayoría se utiliza el zymosan (Floto *et. al.*; 1997 y Melendez *et. al.*; 1999). Estos trabajos han contribuido enormemente al entendimiento de las vías de señalización intracelulares, generadas a partir de la activación de los FcγR. Sin embargo, poco se sabe acerca del papel de señalización que juegan las distintas isoformas de estos receptores.

Trabajos realizados en neutrófilos humanos sugieren que la expresión de diferentes isoformas de estos receptores, no conllevan a una señalización redundante. En particular, se ha observado que los FcγR presentan diferente potencial fagocítico en neutrófilos humanos (Rivas *et. al.*; 2010). Así mismo, en neutrófilos cada FcγR media la activación de factores nucleares a través de diferentes vías de señalización (García *et. al.*; 2009).

En monocitos tres receptores se expresan de manera constitutiva, el FcγRI, FcγRII y el FcγRIII. Sin embargo, a pesar de que los tres receptores expresados, son activados de manera simultánea bajo condiciones fisiológicas; no existen trabajos recientes que investiguen la respuesta celular generada por la activación de cada uno de los FcγR, con respecto al incremento de la $[Ca^{2+}]_i$. Para abordar este problema, el presente trabajo estimula de manera específica a cada isoforma de los FcγR, expresados en dos líneas celulares de monocitos, utilizando anticuerpos monoclonales para cada receptor.

6. Justificación

Dado que la activación de los FcγR es la unión clave entre la respuesta inmunológica humoral y celular; y esta interacción media numerosas respuestas celulares por medio de cascadas de señalización al interior de la célula, las cuales son importantes para generar y regular la respuesta del sistema inmunológico; incluyendo la fagocitosis, el estallido respiratorio, la liberación de moléculas microbicidas por degranulación, la citotoxicidad dependiente de anticuerpos y la producción de citocinas proinflamatorias (Graziano y Fanger, 1987). Resulta importante observar, si cada isoforma de FcγR se encuentra especializada para la activación de funciones celulares específicas.

De manera opuesta a la visión tradicional de los FcγR, en donde la función de todas las isoformas es redundante, se han descrito cambios bioquímicos en las vías de señalización de distintas isoformas de FcγR (García y Rosales, 2002).

En el caso de monocitos de humano se expresan de manera constitutiva tres clases de receptores FcγRI, FcγRII y FcγRIII. Por ello, resulta interesante determinar si las respuestas celulares activadas por cada uno de estos receptores es responsable de diferencias en las vías de señalización de estas células efectoras; en particular en el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$.

7. Hipótesis

La activación de cada una de las isoformas de los FcγR, expresadas en las líneas celulares de monocitos U937 y THP-1, inducen el incremento de calcio intracelular a distintos niveles.

8. Objetivos

8.1 Objetivos Generales

Determinar si la activación específica de cada uno de los Fc γ R, expresados en las líneas celulares de monocitos THP-1 y U937, induce un incremento distinto en la concentración intracelular de calcio.

8.2 Objetivos Particulares

Determinar si las líneas celulares de monocitos THP-1 y U937 expresan la familia de receptores de humanos para la porción Fc de las inmunoglobulinas G, los cuales incluyen a los receptores Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII.

Determinar si al estimular individualmente a los diferentes receptores Fc γ R (Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII) en ambas líneas celulares, estos son capaces de inducir un incremento en la concentración de calcio citosólico.

9. Métodos

9.1 Anticuerpos y Reactivos

Los siguientes anticuerpos fueron utilizados: anti Fc γ RI de humano (CD64) anticuerpo monoclonal 32.2 (mAb 32.2), anti Fc γ RII de humano (CD32) anticuerpo monoclonal IV.3 (mAb IV.3), anti Fc γ RIII de humano (CD16) anticuerpo monoclonal 3G8 (mAb 3G8); provenientes de hibridomas cultivados en el laboratorio del Dr. Carlos Rosales Ledezma (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México D.F.). Anticuerpo F(ab')₂ de cabra conjugado con FITC anti IgG de ratón (catálogo No. sc-3699) de Santa Cruz Biotechnology. Se utilizó el

anticuerpo de cabra F(ab')₂ anti IgG de ratón, este anticuerpo reconoce a toda la molécula IgG (catálogo No.55468) de Cappel. Finalmente, Fura 2/AM (catálogo No. 344905) de Calbiochem (San Diego, CA).

9.2 Cultivo celular

Las líneas celulares de monocitos THP-1 y U937, se mantuvieron en medio de cultivo (RPMI-1640, suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2 mM glutamina, 50 U/mL de penicilina y 50 µg/mL de estreptomina), a 37°C en una atmósfera al 5 % en CO₂.

9.3 Citometría de Flujo

Las células se resuspendieron a una concentración de 1×10^6 células/mL en solución amortiguadora de fosfato salino PBS (0.14 mM de NaCl, 2.7 mM de KCl, 1.5mM de KH₂PO₄ y 8.1 mM de Na₂HPO₄; pH de 7.2) adicionado con 0.5 % de albúmina sérica bovina y 1 % de sacarosa, se incubaron en baño de hielo por 45 minutos con 10 µg/mL del anticuerpo monoclonal correspondiente para cada receptor Fcγ. Las células se lavaron tres veces agregando 1mL de PBS adicionado y se centrifugaron a 5973.75 g, lo que representa 4500 rpm durante 1 min, tras cada lavado. Las células se incubaron en baño de hielo, por 45 minutos con 20 µL para monocitos U937 y 50 µL para monocitos THP-1, de una dilución 1:50 del anticuerpo F(ab')₂ de cabra conjugado con FITC anti IgG de ratón. Posteriormente las células se lavaron tres veces y finalmente se resuspendieron en 300 µL de paraformaldehído al 1% en PBS. Finalmente fueron analizadas en un citómetro de flujo (FACSCan y FACScalibur BECTON DICKINSON) y nuevamente analizadas con el programa FlowJo versión 8.7.

9.4 Incremento en la concentración de calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$

9.4.1 Carga celular con FURA-2/AM

Los monocitos U937 y THP-1, se resuspendieron a una concentración de 1×10^8 células/mL, en PBS Ca^{2+}/Mg^{2+} (1.5 mM de calcio y 1.5 mM de magnesio en PBS). La suspensión celular se estabilizó a 37°C por 5 min, se añadió 10 μ M FURA-2/AM, y se incubó a 37°C por 5 minutos. Posteriormente, la suspensión celular se diluyó 1:10 en PBS Ca^{2+}/Mg^{2+} a 37°C ajustando a una concentración de 1×10^7 células/mL, y se incubó durante 20 minutos a 37°C. Las células se lavaron agregando PBS Ca^{2+}/Mg^{2+} a 37°C y centrifugando a 424.8 g, lo que representa 1200 rpm durante 4 min, a 37°C. Posteriormente, se resuspendieron en PBS Ca^{2+}/Mg^{2+} y se incubaron 15 minutos a 37°C. Finalmente las células se lavaron y se resuspendieron en PBS $Ca^{2+}-Mg^{2+}$ a 4°C, ajustando a una concentración de 5×10^6 células/mL.

9.4.2 Entrecruzamiento de los receptores Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIIA

Las células previamente tratadas con Fura-2/AM, se incubaron por 15 minutos a 4°C, con 10 μ g/mL del anticuerpo monoclonal correspondiente a cada receptor. Después se lavaron tres veces agregando PBS $Ca^{2+}-Mg^{2+}$ a 4°C y centrifugando a 424.8 g, lo que representa 1200 rpm durante 4 min. Las células se resuspendieron a una concentración final de 1.2×10^6 células/mL. Se colocaron 2mL de la suspensión celular en una celda para espectrofluorómetro. Para realizar la estimulación, se añadieron 40 μ g/mL del anticuerpo secundario; anticuerpo entrecruzador F(ab')₂ de cabra contra IgG de ratón (Figura 6.).

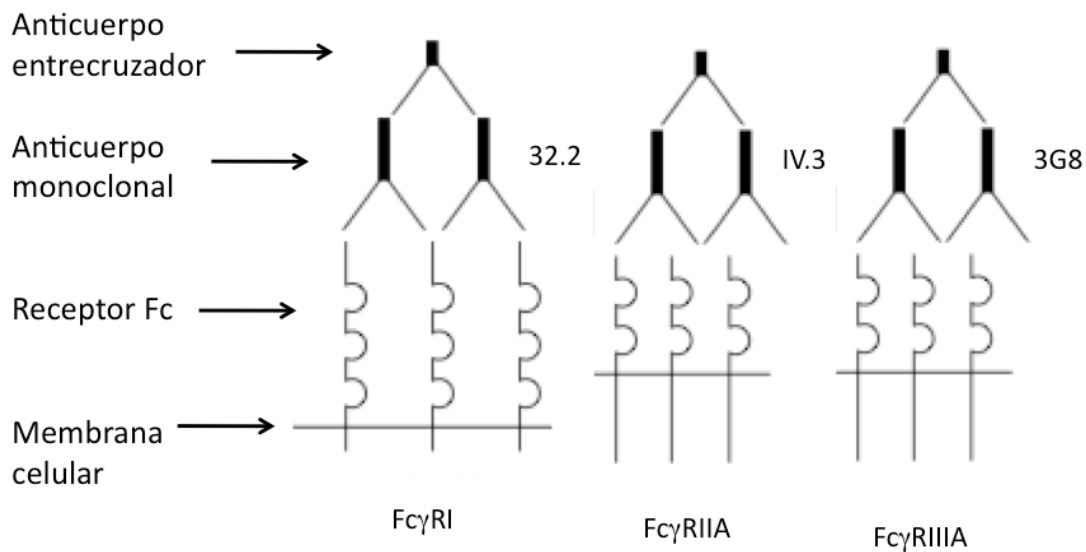


Figura 6. Representación del entrecruzamiento específico de cada receptor. Se muestra cada uno de los receptores así como el anticuerpo monoclonal utilizado para cada uno. El anticuerpo entrecruzador fue F(ab')₂ de cabra contra IgG de ratón (Modificado de: Melendez *et. al.*; 1998).

9.4.3 Cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ monitoreados mediante fluorescencia

Los cambios de fluorescencia fueron monitoreados con un espectrofluorómetro (PerkinElmer LS55), la concentración de calcio fue calculada con el programa PerkinElmer FL WinLab (versión 4.00.02).

9.5 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron comparados mediante *t* de Student no pareada utilizando el programa de computación Prism Graph pad 5 para Mac OS X. Para denotar las diferencias entre los datos que se consideraron estadísticamente significativos se utilizó la escala "Michelin Guide" (Motulsky, 2010) (Tabla 1.).

Símbolo	Significado	Valor de p
NS	No significativo	$p > 0.05$
*	Significativo	$p < 0.05$
**	Altamente significativo	$p < 0.01$
***	Extremadamente significativo	$p < 0.001$

Tabla 1. Uso de asteriscos para denotar significancia estadística. Descripción del uso de asteriscos por la escala de "Michelin Guide" para denotar la significancia estadística. Tomado sin permiso de: (Motulsky, 2010).

10. Resultados

10.1 Verificación de la expresión de FcγRI, FcγRII, FcγRIII en las líneas celulares de monocitos THP-1 y U937.

10.1.1 Expresión de FcγRI, FcγRII, FcγRIII en monocitos U937

Para confirmar la expresión de los receptores FcγRI, FcγRII y FcγRIII en esta línea celular, las células fueron incubadas con un anticuerpo monoclonal; el anticuerpo monoclonal (mAb) 32.2 (mAb 32.2), mAb IV.3, mAb 3G8 respectivamente. Posteriormente cada mAb fue reconocido por un anticuerpo F(ab')₂ conjugado con FITC. La expresión del receptor se detectó mediante citometría de flujo. Los monocitos U937 expresaron los receptores FcγRI y FcγRII; mientras que el FcγRIII no se encuentra expresado en esta línea celular (Figura 7.).

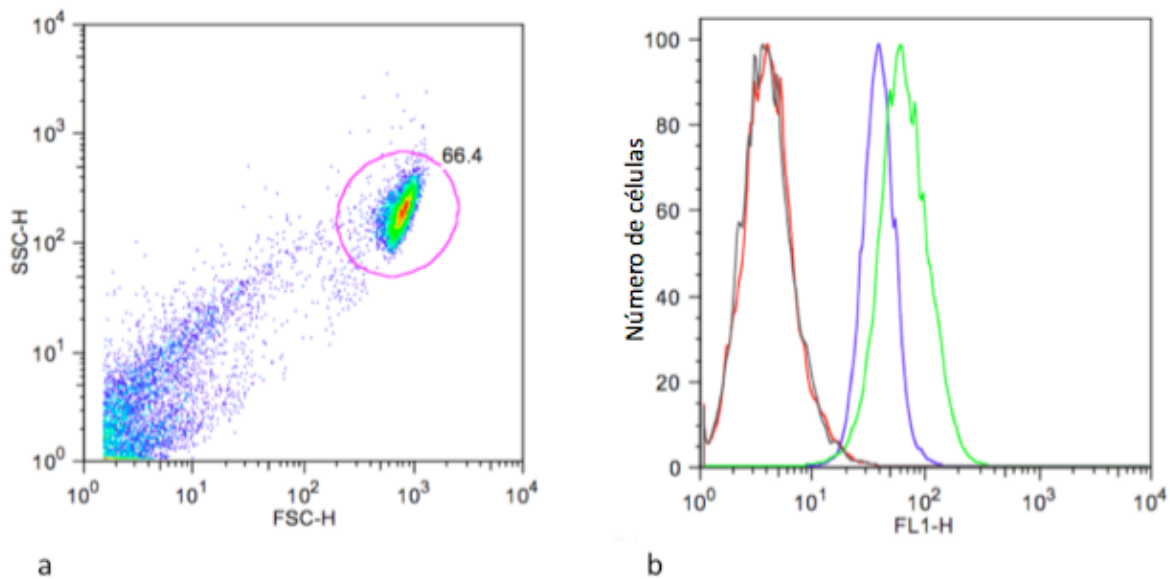


Figura 7. Los receptores FcγRI y FcγRII se expresan en monocitos U937 mientras que el receptor FcγRIII no se expresa. a. Región seleccionada para analizar a la población de monocitos U937, según la dispersión frontal de luz (FSC-H) y la dispersión lateral de luz (SSC-H) de las células; 10,000 monocitos fueron contados para producir cada gráfica. b. Histograma donde la abscisa es una escala logarítmica de la fluorescencia y la ordenada es el número de células. Las líneas en la gráfica indican: fluorescencia basal (rojo), expresión de FcγRI (azul), expresión de FcγRII (verde) y expresión de FcγRIII (negro). Las lecturas fueron analizadas con FlowJo versión 8.7. Esta gráfica es un experimento representativo de 6 experimentos independientes.

10.1.1 Expresión de FcγRI, FcγRII, FcγRIII en monocitos THP-1

En el caso de los monocitos THP-1, la expresión de los receptores FcγRI, FcγRII y FcγRIII se identificó con el uso de los anticuerpos monoclonales (mAb) 32.2 (mAb 32.2), mAb IV.3, mAb 3G8 respectivamente, y su posterior análisis por citometría de flujo. Posteriormente cada mAb fue reconocido por un anticuerpo F(ab')₂ conjugado con FITC. Los monocitos THP-1, al igual que los U937, expresaban los receptores FcγRI y FcγRII; mientras que el FcγRIII no se encuentra expresado en esta línea celular (Figura 8.).

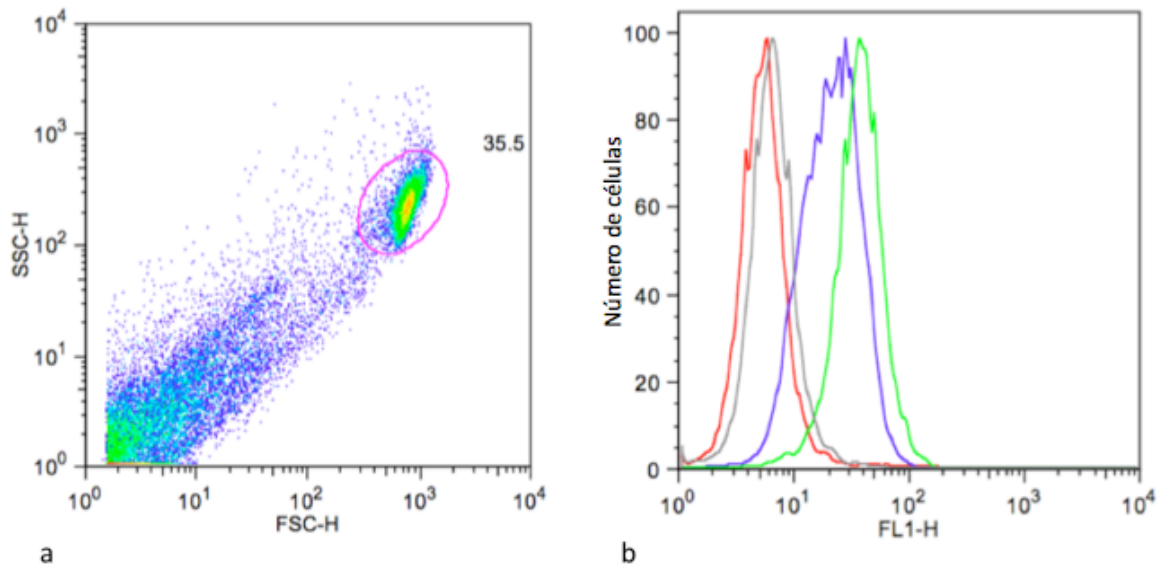


Figura 8. Los receptores FcγRI y FcγRII se expresan en monocitos THP-1, mientras que el receptor FcγRIII no se expresa. a. Región seleccionada para analizar a la población de monocitos THP-1, según la dispersión frontal de luz (FSC-H) y la dispersión lateral de luz (SSC-H) de las células; 10,000 células fueron contadas para producir cada gráfica. b. Histograma donde la abscisa es una escala logarítmica de la fluorescencia y la ordenada es el número de células. Las líneas en la gráfica indican: fluorescencia basal (rojo), expresión de FcγRI (azul), expresión de FcγRII (verde) y expresión de FcγRIII (negro). Las lecturas fueron analizadas con FlowJo versión 8.7. Esta gráfica es un experimento representativo de 6 experimentos independientes.

10.2 Incremento de calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ mediado por la estimulación de los receptores de FcγRI, FcγRII, FcγRIII.

Los receptores FcγRI y FcγRII se expresan en las líneas celulares de monocitos U937 y THP-1, mientras que el FcγRIII no se expresa. Por este motivo, el FcγRIII fungió como control negativo en la evaluación del incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ mediado por el entrecruzamiento de estos receptores.

10.2.1 Incremento de calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ en monocitos U937

Como está establecido, la agregación de receptores $Fc\gamma$ conlleva al reclutamiento de tirosinas cinasas y a la subsecuente fosforilación y activación de PLC; a partir de la cual se forma IP_3 como segundo mensajero, que a su vez participa en la movilización de $[Ca^{2+}]_i$. Con el fin de investigar si ambos receptores expresados en los monocitos U937 incrementaban la $[Ca^{2+}]_i$ de igual manera, se realizó un estímulo específico para cada uno. Esto se logró mediante el uso de anticuerpos monoclonales para cada receptor, el anticuerpo 32.2 para el $Fc\gamma RI$ y el anticuerpo IV.3 para el $Fc\gamma RII$. En los monocitos U937, no se observó un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ posterior a la agregación de los receptores $Fc\gamma RI$ (Figura 9.).

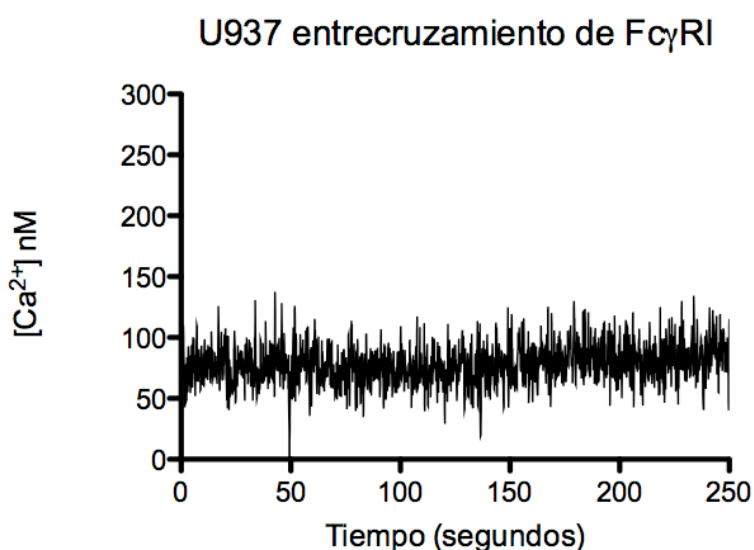


Figura 9. Entrecruzamiento de $Fc\gamma RI$ en monocitos U937. Los monocitos fueron tratados con Fura 2/AM, y tratados con el anticuerpo 32.2 contra $Fc\gamma RI$. La agregación del $Fc\gamma RI$ se inicia en el segundo 60, al añadir 40 $\mu g/mL$ del anticuerpo secundario. La gráfica es un experimento representativo de 10 experimentos independientes

Al contrario del Fc γ RI; el Fc γ RII, en los monocitos U937, sí presentó un incremento en la [Ca $^{2+}$]_i posterior a la agregación de estos receptores, con un Δ [Ca $^{2+}$]_i de hasta 120 nM con respecto a su [Ca $^{2+}$]_i basal (Figura 10.).

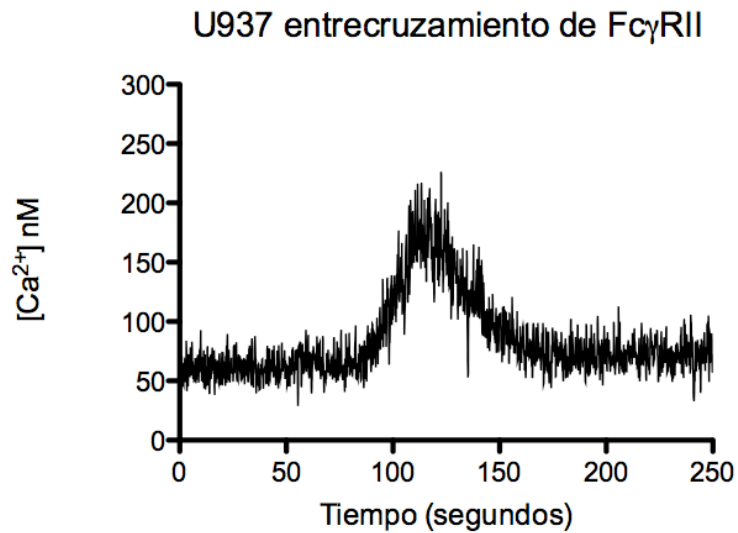


Figura 10. Entrecruzamiento de Fc γ RII en monocitos U937. Los monocitos fueron tratados con Fura 2/AM, y tratados con el anticuerpo IV.3 contra Fc γ RII. La agregación del Fc γ RII se inicia en el segundo 60, al añadir 40 μ g/mL del anticuerpo secundario. La gráfica es un experimento representativo de 15 experimentos independientes.

En los monocitos U937, al entrecruzar los Fc γ RIII, no se observó respuesta alguna con respecto a la [Ca²⁺]_i, lo cual confirma los resultados obtenidos por citometría de flujo (Figura 11.).

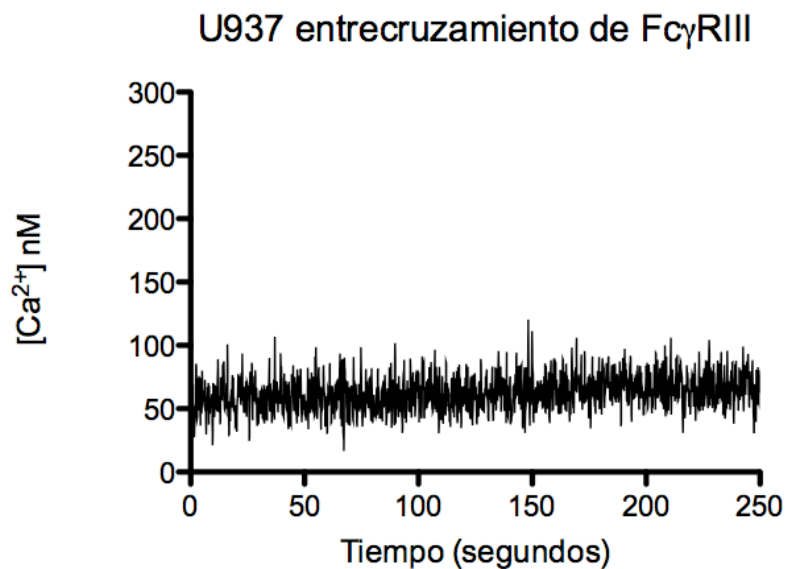


Figura 11. Entrecruzamiento de Fc γ RIIIA en monocitos U937. Los monocitos fueron tratados con Fura 2/AM, y tratados con el anticuerpo 3G8 contra Fc γ RIIIA. La agregación del Fc γ RIIIA se inicia en el segundo 60, al añadir 40 μ g/mL del anticuerpo secundario. La gráfica es un experimento representativo de 3 experimentos independientes.

Estos resultados nos indican que a pesar de que los receptores estimulados se encuentran en la misma línea celular; el flujo de $[Ca^{2+}]_i$ es mediado únicamente por el FcγRII. El análisis estadístico, presentó un aumento altamente significativo en la $[Ca^{2+}]_i$ mediado por el FcγRII, con respecto al FcγRI (Figura 12.).

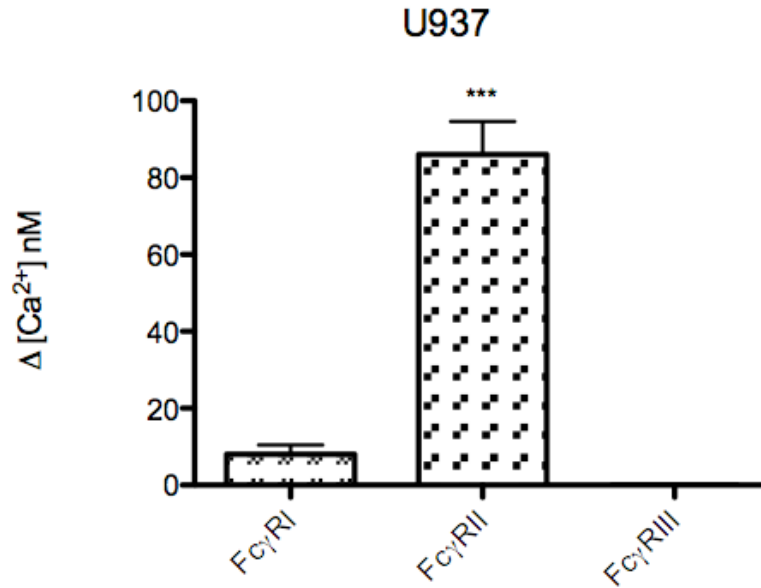


Figura 12. El FcγRII moviliza $[Ca^{2+}]_i$ en monocitos U937. Se muestra la respuesta en la $[Ca^{2+}]_i$ mediada por el entrecruzamiento de receptores Fcγ específicos utilizando anticuerpos monoclonales en monocitos U937. Esta gráfica representa la media de experimentos independientes para cada receptor, con 2.4×10^6 monocitos en cada uno, las barras representan el error estándar. Los asteriscos denotan las diferencias estadísticas entre el FcγRII y el FcγRI, ***($p < 0.0001$). Para el FcγRI $n= 10$, FcγRII $n=10$ y FcγRIII $n=3$.

10.2.2 Incremento de calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ en monocitos THP-1

De igual manera, para los monocitos THP-1 se realizó un estímulo específico para cada receptor. Esto se logró mediante el uso de anticuerpos monoclonales, el anticuerpo 32.2 para el Fc γ RI y el anticuerpo IV.3 para el Fc γ RII. En los monocitos THP-1, a diferencia de los U937, se observó un ligero incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ a tiempos más largos de la agregación de los receptores Fc γ RI (Figura 13.).

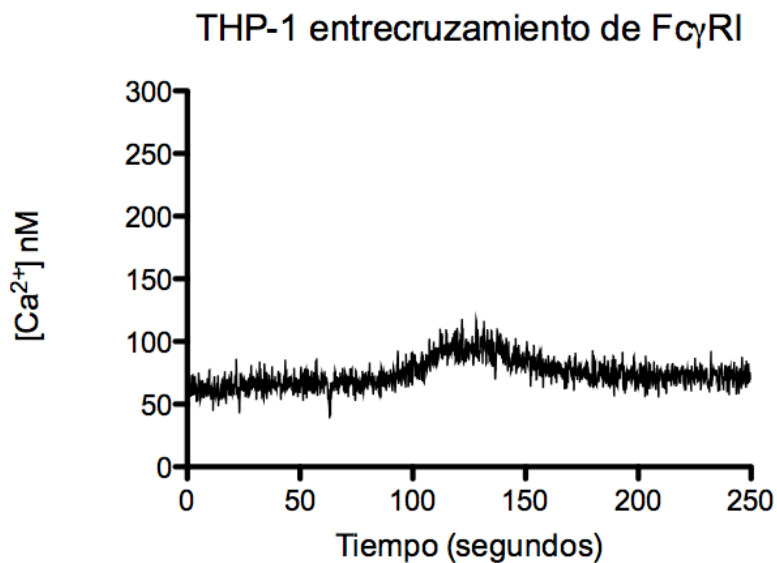


Figura 13. Entrecruzamiento de Fc γ RI en monocitos THP-1. Los monocitos fueron tratados con Fura 2/AM, y tratados con el anticuerpo 32.2 contra Fc γ RI. La agregación del Fc γ RI se inicia en el segundo 60, al añadir 40 μ g/mL del anticuerpo secundario. La gráfica es un experimento representativo de 9 experimentos independientes.

Al igual que el FcγRI, el FcγRII, en los monocitos THP-1, sí presentó un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ posterior a la agregación de estos receptores, con un $\Delta [Ca^{2+}]$ de hasta 160 nM con respecto a su $[Ca^{2+}]_i$ basal (Figura 14.).

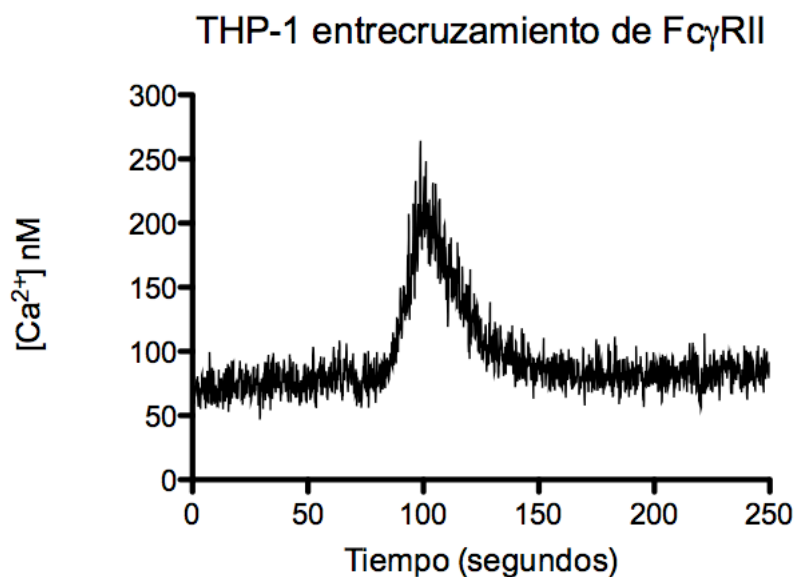


Figura 14. Entrecruzamiento de FcγRII en monocitos THP-1. Los monocitos fueron tratados con Fura 2/AM, y tratados con el anticuerpo IV.3 contra FcγRII. La agregación del FcγRII se inicia en el segundo 60, al añadir 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del anticuerpo secundario. La gráfica es un experimento representativo de 9 experimentos independientes.

Por su parte, el Fc γ RIII en los monocitos THP-1, no se mostró respuesta alguna con respecto a la [Ca²⁺]_i, lo cual reafirma los resultados obtenidos por citometría de flujo (Figura 15.).

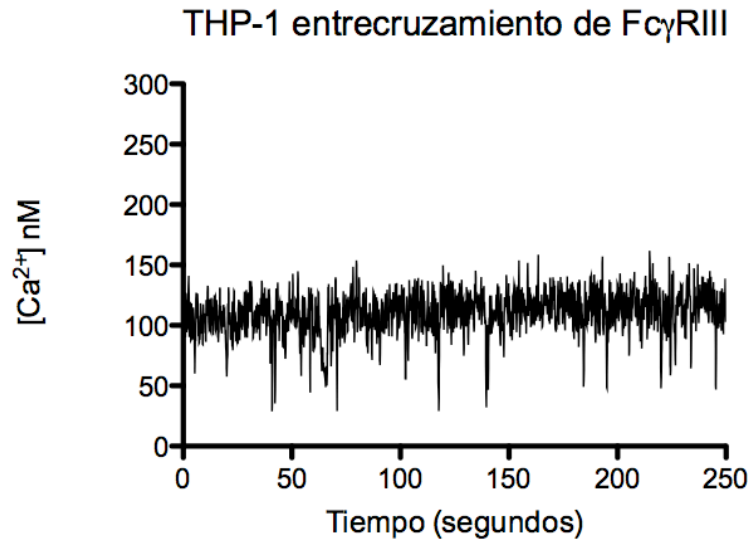


Figura 15. Entrecruzamiento de Fc γ RIII en monocitos THP-1. Los monocitos fueron tratados con Fura 2/AM, y tratados con el anticuerpo 3G8 contra Fc γ RIII. La agregación del Fc γ RIII se inicia en el segundo 60, al añadir 40 μ g/mL del anticuerpo secundario. La gráfica es un experimento representativo de 3 experimentos independientes.

Los resultados obtenidos muestran que en los monocitos THP-1 tanto el FcγRI como el FcγRII, son capaces de inducir una vía de señalización que module el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$. Mediante análisis estadístico (t de student no pareada), se obtuvo que los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ mediados por el FcγRII es mayor con respecto al FcγRI, esta diferencia es extremadamente significativa (Figura 16.).

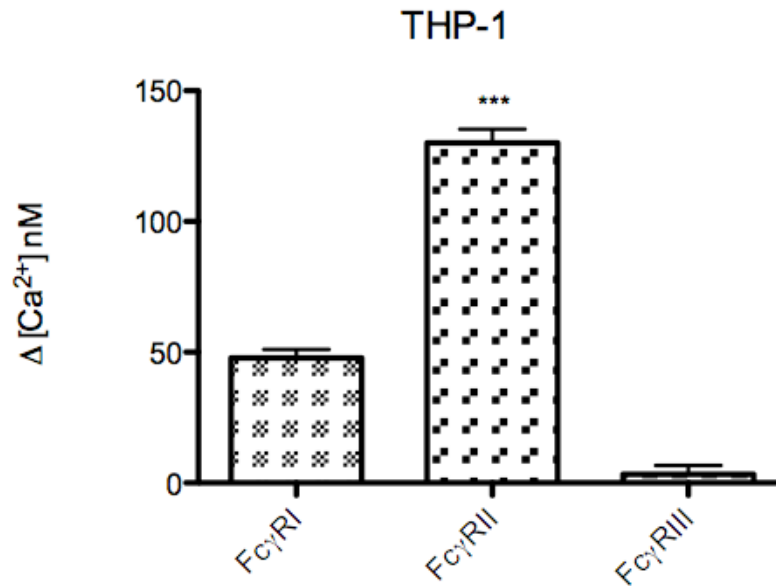


Figura 16. El FcγRII moviliza más $[Ca^{2+}]_i$ que el FcγRI en monocitos THP-1. Se muestra la respuesta en la $[Ca^{2+}]_i$ mediada por el entrecruzamiento de receptores Fcγ específicos utilizando anticuerpos monoclonales en monocitos THP-1. Esta gráfica representa la media de experimentos independientes para cada receptor, con 2.4×10^6 monocitos en cada uno, las barras representan el error estándar. Los asteriscos denotan las diferencias estadísticas del FcγRII con respecto al FcγRI, ***($p < 0.0001$). Para el FcγRI $n=9$, FcγRII $n=9$ y FcγRIII $n=3$.

10.2.3 Incremento de calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ en ambas líneas celulares

Los resultados obtenidos indican que, aunque los receptores estimulados son los mismos en ambas líneas celulares; las respuestas obtenidas son diferentes. Al comparar la respuesta inducida por el Fc γ RI se observa que, los monocitos U937 no inducen respuesta mientras que los monocitos THP-1 sí logran inducir un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$; la diferencia entre estos receptores es extremadamente significativa. En el caso del Fc γ RII ambos inducen un cambio en la $[Ca^{2+}]_i$. Sin embargo, en los monocitos THP-1 la diferencia en este cambio es significativamente mayor con respecto a los monocitos U937, pues el Fc γ RII incrementó los niveles en la $[Ca^{2+}]_i$ 1.51 veces más en THP-1 que en U937 (Figura 17.). De igual forma, en los monocitos THP-1 el receptor Fc γ RII incrementó 2.7 veces más las $[Ca^{2+}]_i$ que el Fc γ RI.

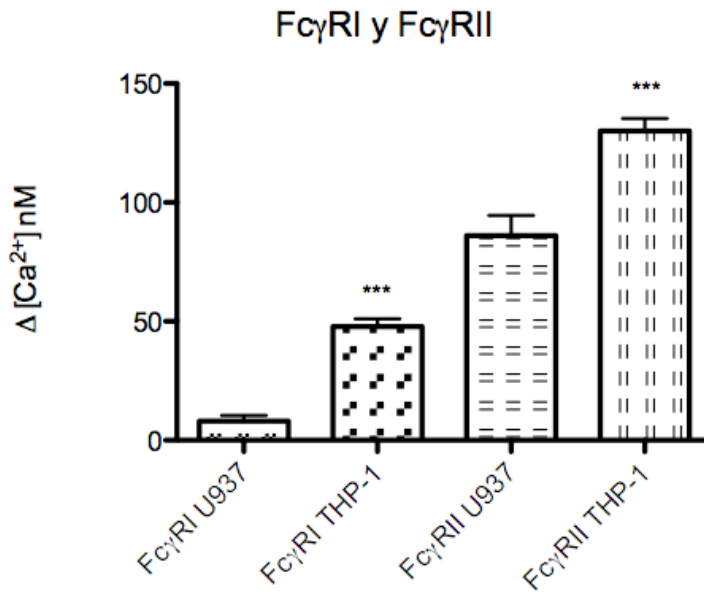


Figura 17. Los receptores Fc γ RI y Fc γ RII movilizan más $[Ca^{2+}]_i$ en monocitos THP- 1 que en U937. Se muestra la respuesta en la $[Ca^{2+}]_i$ mediada por el entrecruzamiento de receptores Fc γ específicos utilizando anticuerpos monoclonales en monocitos U937 y THP-1. Esta gráfica representa la media, las barras representan el error estándar. Los asteriscos denotan las diferencias estadísticas para el Fc γ RI entre los monocitos U937 y THP-1; y para el Fc γ RII entre los monocitos U937 y THP-1. Para el Fc γ RI ***($p < 0.0001$) y para el Fc γ RII ***($p = 0.0005$).

11. Discusión

En monocitos, la activación de los receptores Fc γ es necesaria para el inicio de las cascadas de señalización, que darán lugar a los mecanismos de defensa. Los cuales incluyen: la fagocitosis, el estallido respiratorio, la liberación de moléculas microbidas por degranulación, la citotoxicidad dependiente de anticuerpos y la producción de citocinas proinflamatorias (Graziano y Fanger, 1987). La visión tradicional de la respuesta mediada por Fc γ Rs, establece que es una respuesta redundante. Sin embargo, es posible que cada uno de los Fc γ Rs se encuentre especializado para la activación de funciones celulares específicas como las mencionados anteriormente.

Debido a que tres tipos de Fc γ Rs se encuentran constitutivamente expresados en los monocitos (Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII), ha sido difícil establecer las funciones iniciadas por cada uno de ellos.

Se ha reportado evidencia de la inestabilidad genotípica y fenotípica que ocurre durante la evolución de una línea celular. Lo anterior, es resultado de variaciones genéticas y de las condiciones del cultivo (Freshney, 1994). Existen dos razones principales para la variación genética de células en cultivo. La primera consiste en que la tasa de mutaciones espontáneas *in vitro* es mayor, lo cual podría estar asociado a la tasa de proliferación. La segunda consiste en que las células mutantes no son eliminadas, a menos que su capacidad de crecimiento esté comprometida. Por ello, las variaciones fenotípicas surgirán como resultado de la variación genética (Freshney, 1994).

Puesto que la variación genética es fundamental para los procesos de adaptación de las especies al medio ambiente, no es sorprendente, que en células en cultivo ocurran procesos similares. De este modo, se podría explicar la variación fenotípica en cuanto a la expresión de Fc γ Rs, en las líneas celulares de monocitos U937 y THP-1.

En las dos líneas celulares de monocitos (U937 y THP-1) utilizadas, se analizó la activación de cada una de las isoformas de los FcγRs. Se determinó si la activación de las isoformas de los FcγRs conlleva a cambios que puedan a su vez activar respuestas celulares en particular, como la elevación en la $[Ca^{2+}]_i$.

Determinamos la expresión de los FcγRI y FcγRII en dos líneas celulares de monocitos U937 y THP-1; a su vez también se determinó que ambas líneas no expresan el FcγRIII. Así mismo, se obtuvo que éstas células no modifican sus niveles de $[Ca^{2+}]_i$ por estimulación del FcγRIII. Estos resultados concuerdan con la expresión de FcγRs reportada para monocitos THP-1 (Fleit y Kobasiuk, 1991). De igual manera, la expresión de FcγRs para monocitos U937 también es consistente con estudios previos (Harris y Ralph, 1985 y Melendez *et. al.*; 1998), donde se reporta que únicamente los receptores FcγRI y FcγRII se expresan en esta línea celular.

Existen evidencias experimentales en donde se utilizan eritrocitos de borrego opsonizados con IgG para activar a los FcγRs de manera inespecífica, éstas reportan que la activación de estos receptores genera un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ (Myers y Swanson, 2002). Así mismo, existen trabajos realizados en macrófagos derivados de la línea monocítica U937, en donde se demuestra que la respuesta en la $[Ca^{2+}]_i$ cambia dependiendo del estado de diferenciación celular, estos trabajos estimulan a de manera inespecífica a los FcγRs con IgG policlonal de humano (Melendez *et. al.*; 1998). Sin embargo, en estos trabajos no se estudia la diferencia en la respuesta celular iniciada por cada FcγRs con respecto al incremento en la $[Ca^{2+}]_i$.

Los datos experimentales de este trabajo, muestran que en los monocitos THP-1, los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ se modifican de manera importante por el FcγRII, y en menor grado por el FcγRI. Si bien la activación del FcγRII, en monocitos U937, genera flujos de $[Ca^{2+}]_i$, el cambio producido por este receptor es menor que el observado en monocitos THP-1. Por su parte la activación del FcγRI, en los monocitos U937, no contribuye en absoluto al incremento de la $[Ca^{2+}]_i$. Estos

resultados, indican que la respuesta montada por el FcγRII no sólo es importante, sino también distinta de la respuesta del FcγRI.

Los resultados de este trabajo indican que las líneas celulares de monocitos THP-1 y U937, responden de manera diferente en cuanto al incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ ante la activación específica de sus receptores FcγR. Las señales obtenidas en el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$, no sólo fueron diferentes entre las dos líneas celulares sino también varió con respecto al receptor activado. Lo anterior sugiere que en ambas líneas celulares tanto el FcγRI, como el FcγRII cumplen roles no redundantes en la función efectora de los monocitos. Esta idea se ve reforzada por las observaciones realizadas en monocitos donde el FcγRI y el FcγRII activan a isoformas específicas de la PKC (Melendez *et. al.*; 1999 y Zheng *et. al.*; 1995). Otros estudios realizados en monocitos THP-1, demuestran que existen diferencias en la vía de señalización activada por los FcγR, que depende de la asociación de cada isoforma con las cinasas Syk y Src (Zhen *et. al.*; 2004). Lo anterior sugiere que distintas respuestas celulares son iniciadas por cada isoforma de los FcγR.

La diferencia en la señal de $[Ca^{2+}]_i$ inducida por el FcγRI y el FcγRII; sugiere que estos receptores además de no llevar a cabo funciones redundantes, llevan a cabo funciones complementarias en la mediación de señales inducidas por las clases de IgG presentes en el organismo. Lo anterior, no significa que al montarse la respuesta inmunológica, ambos FcγRs sean excluyentes, sino que cada receptor juega un papel específico en la iniciación de la respuesta celular; en este caso el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ se modifica de manera importante por el FcγRII, y en menor grado por el FcγRI.

El incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ es sumamente importante dentro de las señales montadas durante la respuesta inmunológica, particularmente durante la fagocitosis. Existen trabajos en donde se reporta que el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ es mayor en la región cercana a la copa fagocítica que en el resto de la célula (Theler *et. al.*; 1995). También estudios sobre la

dinámica de la actina, durante el proceso fagocítico, sugieren que los cambios en las $[Ca^{2+}]_i$, al controlar las redes de actina, controlan de manera indirecta el movimiento de gránulos durante la fagocitosis (Bengtsson *et. al.*; 1993).

Dentro de todos los segundos mensajeros, el Ca^{2+} se ha considerado esencial para la fagocitosis, al parecer la activación de todos los Fc γ Rs genera un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ (Sánchez-Mejorada y Rosales, 1998b). Los resultados de este trabajo muestran que en las líneas celulares de monocitos U937 y THP-1, no todos los Fc γ Rs son capaces de inducir un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$. Esto apoya la idea de que cada Fc γ Rs inicia una vía de señalización específica.

Previos trabajos (Melendez *et. al.*; 1998) han descrito que, tanto monocitos de la línea celular U937 como macrófagos derivados de ésta, cultivados bajo condiciones y ambientes diferentes generan respuestas heterogéneas ante un reto de complejos inmunes, es decir ante antígenos opsonizados por anticuerpos. La diferencia que presenta este trabajo, es que ambas líneas celulares fueron cultivadas bajo las mismas condiciones y además; los receptores fueron activados a través de mAb específicos. Aún así, las respuestas celulares obtenidas al activar cada receptor fueron heterogéneas, pues no todos los Fc γ Rs fueron capaces de inducir una elevación en la $[Ca^{2+}]_i$.

Por su parte, la diferenciación celular, genera un cambio fundamental en cuanto a la naturaleza de la respuesta de los flujos de calcio (Melendez *et. al.*; 1998). En este trabajo no se indujo una diferenciación de las líneas celulares de monocitos U937 y THP-1 hacia macrófagos. Sin embargo, en futuros trabajos sería interesante evaluar si la diferenciación celular genera una diferencia en la señal, dependiente de la isoforma del Fc γ R que se active.

Los resultados de este trabajo proveen evidencia directa de la diferencia en la señal inducida por cada receptor Fc γ R en las líneas monocíticas THP-1 y U937. Mediante éstos, se muestra

el papel específico de cada isoforma de los FcγRs en el control de los niveles en la $[Ca^{2+}]_i$. En donde la movilización de $[Ca^{2+}]_i$ mediada por los FcγRs, representa un elemento importante en la optimización de las funciones dependientes de los FcγRs en monocitos.

Estas consideraciones, justifican la necesidad de realizar investigaciones en monocitos sobre el papel particular que juega cada FcγR, en la respuesta mediada por IgG. Por ello, es necesario realizar más estudios para determinar si además de inducir señales diferentes en cuanto a los niveles de $[Ca^{2+}]_i$; estos FcγRs modulan otras vías intracelulares de manera diferencial; como la vía de activación de las MAP cinasas o factores nucleares de regulación transcripcional.

12. Conclusión

En conclusión, las líneas celulares de monocitos U937 y THP-1 expresan el FcγRI, y el FcγRII y no expresan el FcγRIII. Además, los dos receptores Fcγ expresados en ambas líneas celulares poseen diferentes capacidades en cuanto a la activación celular mediada por el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$.

En los monocitos THP-1 los receptores FcγRI y FcγRII, son capaces de inducir un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$, siendo mayor la respuesta mediada por el FcγRII. Mientras que en los monocitos U937 únicamente el FcγRII es capaz de inducir un cambio en la $[Ca^{2+}]_i$. Estos resultados sugieren que estos receptores no llevan a cabo funciones redundantes.

13. Referencias

- Alberts Bruce, Dennis Bray, Karen Hopkin, Alexander Jonhson, Julia Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter. (2004). "Introducción a la Biología Celular" ed. Panamericana. 2ª edición. México. pp:559-560.
- Bengtsson T, M E Jaconi, M Gustafson, K E Magnusson, J M Theler, D P Lew y O Stendahl. (1993). "Actin dynamics in human neutrophils during adhesion and phagocytosis is controlled by changes in intracellular free calcium". *European Journal of Cell Biology*. 62. (1): 49-58.
- Bezman Natalie y Gary Koretzky A. (2007). "Compartmentalization of ITAM and integrin signaling by adapter molecules". *Immunology Review*. 218: 9-28.
- Bootman Martin D., Tony J. Collins, Claire M. Peppiatt, Larissa S. Prothero, Lauren MacKenzie, Patrick De Smet, Marianne Travers, Stephen C. Tovey, Jeong T. Seo, Michael J. Berridge, Francesca Ciccolini y Peter Lipp. (2001). "Calcium signalling - an overview". *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 12: 3-10.
- Choi, O. H., Kim, J. H., Kinet, J. P. (1996) "Calcium mobilization via sphingosine kinase in signaling by the FcεR1 antigen receptor". *Nature* 380: 634 – 636.
- Fleit B. Howard y Catherine D. Kobasiuk. (1991). "The Human MOnocyte -like Cell Line THP-1 Expresses FcγRI y FcγRII". *Journal of Leukocyte Biology*. 49: 556-565.
- Floto R. Andres, Baggi Somasundaram, Janet M. Allen y Martyn P. Mahaut-Smith. (1997). "Fcγ Receptor I Activation Triggers a Novel Ca²⁺ - activated Current Selective for Monovalent

Cations in the Human Monocytic Cell Line, U937". *Journal of Biological Chemistry*. 22. (8): 4753 -4758.

Freshney R. Ian. (1994). "Culture of animal cells a manual of basic techniques". ed. Wiley-Liss. 3ª edición. E.U.A. pp: 253 - 255.

García García Erick, Georgina Nieto Castañeda, Melissa Ruiz Saldaña, Nancy Mora y Carlos Rosales. (2009). "FcγRIIA and FcγRIIIB Mediate Nuclear Factor Activation through Separate Signalling Pathways in Human Neutrophils". *The Journal of Immunology*. 182:4547-4556.

García García Erick y Carlos Rosales. (2002). "Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis". *Journal of Leukocyte Biology*. 72:1092-1108.

Ghazizadeh Soosan, Joseph B. Bolen y Howard B. Fleit. (1994). "Physical and functional association of Src- related protein tyrosine kinases with Fc gamma RII in monocytic THP-1 cells". *Journal of Biological Chemistry*. 269. (12): 8878–8884.

Graziano RF y Fanger MW. (1987). "FcγRI and FcγRII on monocytes and granulocytes are cytotoxic trigger molecules for tumor cells". *Journal of Immunology*. 139:3536-3541.

Harris Paul y Peter Ralph. (1985). "Human Leukemic Models of Myelomonocytic Development: A Review of the HL-60 and U937 Cell Lines". *Journal of Leukocyte Biology*. 37:407-422.

Hirst Robert A., Charlotte Harrison, Kazuyoshi Hirota, and David G. Lambert "Measurement of [Ca²⁺]_i in Whole Cell Suspensions Using Fura-2". Editado por Lambert David. G. (1999).

"Calcium Signaling Protocols". *Methods in Molecular Biology*. (vol. 114). NJHumana Press Inc., Totowa, NJ. pp: 31 - 39.

Marois Louis, Guillaume Pare´, Myriam Vaillancourt, Emmanuelle Rollet-Labelle y Paul H. Naccache. (2011). "FcγRIIIb Triggers Raft-dependent Calcium Influx in IgG-mediated Responses in Human Neutrophils". *The Journal of Biological Chemistry*. 286. (5): 3509–3519.

Melendez Alirio, R. Andres Floto, Angus J. Cameron, David J. Gillooly, Margaret M. Harnett y Janet M. Allen. (1998). "A molecular switch changes the signalling pathway used by the FcγRI antibody receptor to mobilise calcium". 8: 210-221.

Melendez Alirio, Margaret M. Harnett y Janet M. Allen. (1999). "Differentiation-dependent switch in protein kinase C isoenzyme activation by FcγRI, the human high-affinity receptor for immunoglobulin G". *Immunology*. 96: 457–464.

Murphy Kenneth, Paul Travers y Mark Walport. (2008). "Janeway's Immunobiology". 7ª edición. Garland Science Taylor & Francis Group. E.U.A. Nueva York. pp: 37, 572-573.

Mora Nancy y Carlos Rosales. (2009). "Funciones de receptores Fc en mecanismos de defensa y regulación inmunológica". *Revista de Investigación Clínica*. 61.(4): 313-326.

Motulsky Harvey. (2010). "Intuitive Biostatistics. *A Nonmathematical Guide to Statistical Thinking*". ed. Oxford University Press. 2ª edición. E.U.A. pp: 122-126.

Myers Jesse T. y Joel A. Swanson. (2002). "Calcium spikes in activated macrophages during Fcγ receptor-mediated phagocytosis". *Journal of Leukocyte Biology*. 72: 677 - 684.

- Nimmerjahn Falk y Jeffrey V. Ravetch. (2008). "Fc receptors as regulators of immune responses". *Nature Reviews Immunology*. 8:34-47.
- Odin, J. A., Edberg, J. C., Painter, C. J., Kimberly, R. P. & Unkeless, J. C. (1991). "Regulation of phagocytosis and $[Ca^{2+}]_i$ flux by distinct regions of an Fc receptor". *Science*. 254: 1785 - 1788.
- Ortega Enrique e Isabel Soto Cruz. (2007). "Early biochemical events in leukocyte activation through receptors for IgG". *Signal Transduction*. 7: 415 - 426.
- Rabinovitch Michel. (1995). "Professional and non-professional phagocytes: an introduction". *Trends in Cell Biology*. 5: 85– 87.
- Rajendran Lawrence y Kai Simons. (2005). "Lipid rafts and membrane dynamics". *Journal of Cell Science*. 118: 1099-1102.
- Ravetch V. Jeffrey y Silvia Bolland. (2001). "IgG Fc Receptors". *Annual Review Immunology*. 19: 275–90.
- Rivas Fuentes Selma, Erick García García, Georgina Nieto Castañeda y Carlos Rosales. (2010). "Fcγ receptors exhibit different phagocytosis potential in human neutrophils". *Cellular Immunology*. 263: 114–121.
- Rosales Carlos. (2007). "Fc receptor and integrin signaling in phagocytes". *Signal Transduction*. 7: 386 - 401.

Sánchez-Mejorada Gabriela y Carlos Rosales. (1998a). "Fc receptor-mediated mitogen-activated protein kinase activation in monocytes is independent of Ras". *The Journal of Biological Chemistry*. 273. (42): 27610–27619.

Sánchez-Mejorada Gabriela y Carlos Rosales. (1998b). "Signal transduction by immunoglobulin Fc receptors". *Journal of Leukocyte Biology* 63: 521 - 533.

Simpson W. M. Alec. "Fluorescent Measurement of $[Ca^{2+}]_c$ Basic Practical Considerations". Editado por Lambert David. G. (1999). "Calcium Signaling Protocols". *Methods in Molecular Biology*. (vol. 114). NJHumana Press Inc., Totowa, NJ. pp: 3-30.

Theler J M , D P Lew, M E Jaconi, K H Krause, C B Wollheim y W Schlegel. (1995). "Intracellular pattern of cytosolic Ca^{2+} changes during adhesion and multiple phagocytosis in human neutrophils. Dynamics of intracellular Ca^{2+} stores". *Blood*. 85. (8): 2194 - 2201

Tridandapani Susheela, Timothy W. Lyden, James L. Smith, Jo Ellen Carter, K. Mark Coggeshall y Clark L. Anderson. (2000). The adapter protein LAT enhances Fc γ Receptor-mediated signal transduction in myeloid cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 275. (27): 20480 – 20487.

Weinberg Robert A. (2007). "The Biology of Cancer". ed. Garland Science, Taylor & Francis Group. E.U.A. Nueva York. pp: 173-177.

Zheng L., T. P. Zomerdijk, C. Aarnoudse, R. van Furth, and P. H. Nibbering. (1995). "Role of protein kinase C isozymes in Fc γ receptor-mediated intracellular killing of *Staphylococcus aureus* by human monocytes". *Journal of Immunology*. 155: 776 - 784.

Zhen-Yu Huang, Sharon Hunter, Moo-Kyung Kim, Paul Chien, Randall G. Worth, Zena K. Indik, y Alan D. Schreiber. (2004). "The monocyte Fc γ receptors Fc γ RI/ γ and Fc γ RIIA differ in

their interaction with Syk and with Src-related tyrosine kinases". *Journal of Leukocyte Biology*. 76: 491 - 499.