



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**PAPEL DE PKC EN LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN ACTIVADA POR RECEPTORES Fc gamma EN NEUTRÓFILOS HUMANOS.**

**T E S I S**  
**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**  
**DOCTOR**

**PRESENTA:**  
**M. en C. OMAR RAFAEL ALEMÁN MUÑOZ**

**TUTOR PRINCIPAL**  
**Dr. CARLOS ROSALES LEDEZMA**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES**  
**BIOMEDICAS, UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**  
**Dra. MARTHA ROBLES FLORES**  
**FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**  
**Dr. JULIO CÉSAR CARRERO SÁNCHEZ**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES**  
**BIOMEDICAS, UNAM**



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.

**ALEMÁN MUÑOZ OMAR RAFAEL**  
**Estudiante de Doctorado en Ciencias Bioquímicas**  
**Presente**

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria **de mayo de 2023**, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Doctor en Ciencias**, con la réplica de la tesis "**Papel de PKC en la vía de señalización activada por receptores Fc gamma en neutrófilos humanos.**", dirigida por el/la Dr(a). **ROSALES LEDEZMA CARLOS.**

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

FRAGOSO GONZÁLEZ GLADIS DEL CARMEN	PMDCBQ	PRESIDENTE
CRISPÍN ACUÑA JOSÉ CARLOS	PMDCBQ	SECRETARIO
LÓPEZ VIDAL YOLANDA	PMDCBQ	VOCAL
MACIAS SILVA MARINA	PMDCBQ	VOCAL
ORTEGA SOTO ENRIQUE	PMDCBQ	VOCAL

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
**Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 11 de mayo de 2023**



**Coordinadora**  
**Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz**


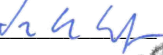

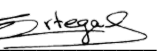
**SINODALES DESIGNADOS**

Presente

Estimado académico:

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria **de mayo de 2023**, conocieron la solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Doctor en Ciencias** del/la estudiante **ALEMÁN MUÑOZ OMAR RAFAEL**, con la tesis "**Papel de PKC en la vía de señalización activada por receptores Fc gamma en neutrófilos humanos.**", dirigida por el/la Dr(a). **ROSALES LEDEZMA CARLOS**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado en el que se encuentra usted incluido:

			ACEPTA	FECHA	FIRMA
FRAGOSO GONZÁLEZ GLADIS DEL CARMEN	PMDCBQ	PRESIDENTE	SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	17 / mayo / 2023	
CRISPÍN ACUÑA JOSÉ CARLOS	PMDCBQ	SECRETARIO	SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	16 / mayo / 2023	
LÓPEZ VIDAL YOLANDA	PMDCBQ	VOCAL	SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	17 / 05 / 2023	
MACIAS SILVA MARINA	PMDCBQ	VOCAL	SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	17 / mayo / 2023	Marina Macías Silva
ORTEGA SOTO ENRIQUE	PMDCBQ	VOCAL	SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	16 / mayo / 2023	

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
 Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 11 de mayo de 2023



**Coordinadora**  
**Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz**

**A LOS MIEMBROS DEL JURADO:**

Es obligación de los tutores de este programa participar en éstas y otras actividades académicas encomendadas por nuestro Comité Académico. Sin embargo, en caso de que tenga un impedimento académico o de salud para cumplir con esta encomienda, es muy importante contar con su respuesta (Formato anexo) en un plazo no mayor a una semana.

Tome en cuenta que usted tiene un límite de 20 días hábiles para Maestría y 30 días hábiles para Doctorado, para emitir su voto con las rondas de revisión que considere necesarias.

## **Reconocimientos.**

Este trabajo de tesis doctoral se realizó en el departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) bajo la dirección del Dr. Carlos Rosales Ledezma, con el apoyo del proyecto CF-2023-I-610 del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), México, y de los proyectos PAPIIT IN202520 e IN205523 otorgados por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), UNAM.

El Comité Tutor que asesoró el desarrollo de esta tesis doctoral estuvo formado por:

Dr. Carlos Rosales Ledezma	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dra. Martha Robles Flores	Facultad de Medicina, UNAM
Dr. Julio César Carrero Sánchez	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

## **Agradecimientos.**

- A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la maravillosa oportunidad de formarme y desarrollarme profesionalmente.
- Al Dr. Carlos Rosales Ledezma por haberme aceptado en su laboratorio y por la dirección durante toda mi formación académica.
- A la M. en IBB. Nancy Yorley Mora Pérez por su excelente asesoría y apoyo técnico durante la realización de esta tesis.
- A la M. en C. Nathalia Fernanda Naranjo Pinto por su apoyo durante el desarrollo de esta tesis.
- Al cDr. José Carlos Blanco Camarillo por su apoyo durante el desarrollo de esta tesis.
- cDr. Cesar Díaz Godínez por su apoyo durante el desarrollo de esta tesis.
- Al Programa de Apoyo a Estudios de Posgrado (PAEP) por su apoyo para asistir al XXXII congreso nacional de Bioquímica 2018 organizado por la Sociedad Mexicana de Bioquímica, A. C.
- A todos los donadores de sangre ya que sin su generosa contribución todos los experimentos aquí realizados no hubiesen sido posible.

## **Dedicatoria.**

- A mis padres Mercedes Muñoz Miranda y Rafael Antonio Alemán Reyna, por siempre estar para apoyarme y ayudarme a culminar un capítulo más en mi vida, los amo.
- A mi hermana Miriam Alemán Muñoz, por ser mi amiga y brindarme la dicha de ser tío
- A mis sobrinos Santiago e Isaac por recordarme que nunca debemos de dejar de ser niños.
- A mis abuelos María Miranda y Guadalupe Muñoz por toda su ayuda durante mi día a día.
- A mis familiares que de alguna u otra forma siempre están para brindarme su apoyo y consejo incondicional.
- A mis compañeros Ricardo Muñoz, Fernando Gutiérrez, Carlos Blanco, Nathalia Naranjo, Cesar Díaz, Fernanda Aguillón, Noemi Hernández, Devi Reyes, por hacer tan divertida mi estancia en el laboratorio además de brindarme su amistad.



## Índice.

ABREVIATURAS. ....	1
ABSTRACT .....	2
RESUMEN. ....	3
CAPÍTULO I .....	4
CADA UNO DE LOS FCGAMMAR DEL NEUTRÓFILO HUMANO REQUIERE DE LA ACTIVACIÓN DE DIFERENTES ISOFORMAS DE PKC.....	4
Introducción.....	4
Planteamiento del problema.....	10
Hipótesis .....	10
Objetivo General. ....	10
Objetivos particulares .....	10
Materiales y métodos.....	11
Resultados.....	17
Capítulo II .....	29
El FcyRIIIb requiere de la activación del canal TRPM2 para inducir el incremento de la [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> en el neutrófilo humano.....	29
Antecedentes.....	29
Planteamiento del problema.....	30
Hipótesis.....	30
Objetivo General.....	30
Objetivos particulares .....	31
Materiales y métodos. ....	31
Resultados.....	35
Capítulo IV .....	43
Discusión. ....	43
Capítulo V .....	50
Conclusión y perspectivas.....	50

**ABREVIATURAS.**

ADPR	Adenosine diphosphate ribose
BSA	Bovine Serum Albumin
DAG	Diacylglycerol
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
Fab	Fragment antigen-binding
Fc	Fragment crystallizable
FcR	Receptor Fc
fMLF	formil-metionil-leucil-fenilalanina
GPCR	G Protein-Coupled Receptor
GPI	Glycosylphosphatidilinositol
Ig	Inmunoglobulina
IgG	Inmunoglobulina tipo G
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5 trifosfato
ITAM	Immunorreceptor Tyrosine-based Activation Motif
MEK	Mitogen-activated protein/Extracellular signal-regulated Kinase
NETs	Neutrophil Extracellular Traps
NUDT9	nucleotide diphosphate linked moiety type hydrolase motif 9
PBS	Phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehído
PIP <sub>2</sub>	PhosPhatidylInositol 4,5 biphosphate
PKC	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PS	Phosphatidylserine
ROS	Reactive Oxygene Species
SFK	Src family kanes
SOCE	Store Operated Calcium Entry
STIM1	Stromal Interaction Molecule 1
Syk	Spleen Tyrosine Kinase
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor $\alpha$
TRPM2	Transient Receptor Potential Melastatin 2

## ABSTRACT

### ROLE OF PKC IN THE SIGNALLING ACTIVATED BY Fc GAMMA RECEPTORS IN HUMAN NEUTROPHILS

Neutrophils are considered as the first line of defense against infections. Once an infection appears, neutrophils are recruited to eliminate it. To eliminate the infection neutrophils, employ a set of strategies such as phagocytosis, degranulation, Neutrophil Extracellular Traps (NETs) production and cytokine secretion. However, the ability of neutrophil to deploy these strategies depends on the neutrophil capability to recognize the infective microorganisms. Human neutrophils employ a major mechanism for pathogen recognition, the recognition of IgG opsonized pathogens. Neutrophils recognize IgG via FcγRIIa and FcγRIIIb. Recently, it has been described, that each FcγR can activate different responses in human neutrophils. For instance, FcγRIIa and not FcγRIIIb induces phagocytosis in human neutrophils. In contrast, FcγRIIIb and not FcγRIIa induces NETs formation. However, the signal transduction pathways activated by both FcγRIIa and FcγRIIIb are not yet fully understood. Recent studies have showed that, FcγRIIa signaling and not FcγRIIIb signaling induces IP<sub>3</sub> production. Likewise, FcγRIIIb signaling and not FcγRIIa signaling induces TAK1 activation. In sharp contrast both FcγR can activate protein kinase C (PKC). PKC are a family of kinases that include different isoforms. Human neutrophils express PKC α, β, δ, ζ isoforms. However, it has not been described which isoforms could be activate by each FcγR, in human neutrophil. Therefore, the objective of this work was to evaluate, what is the role of PKC in the mechanism activated by each FcγR in human neutrophils. Hence, each FcγR of human neutrophils was selectively cross-linked by monoclonal antibodies, in presence or absence of inhibitors for each PKC isoform that human neutrophils express. And ROS production, ERK phosphorylation and the increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> was measured. Several differences were found, first FcγRIIa requires both PKCα and PKCδ to induce ROS production. In sharp contrast, FcγRIIIb requires both PKCα and PKCβ to induce ROS production. Second, FcγRIIa does not require the activation of any PKC isoforms to induce ERK phosphorylation. In contrast, FcγRIIIb requires PKCα to induce ERK phosphorylation. Finally, FcγRIIa does not require the activation of any PKC isoforms to induce the increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. In the other hand, FcγRIIIb requires the activation of PKCα to induce the increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Therefore, taken together data, suggest that a differential use of PKC isoforms by each FcγR in human neutrophils. Reinforcing the hypothesis that, each FcγR activate different signal transduction pathways and consequently specific functions in human neutrophils.

## RESUMEN.

### **PAPEL DE PKC EN LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN ACTIVADA POR RECEPTORES Fc GAMMA EN NEUTRÓFILOS HUMANOS.**

Los neutrófilos son considerados la primera línea de defensa contra las infecciones. Cuando se presenta una infección, los neutrófilos son reclutados para eliminarla, desplegando diferentes estrategias como la fagocitosis, la degranulación de moléculas microbidas, la formación de NETs (del inglés Neutrophil Extracellular Traps) y la secreción de citocinas. Sin embargo, la capacidad del neutrófilo para desplegar dichas estrategias, dependerá de si puede reconocer a los microorganismos infecciosos. Un mecanismo importante de reconocimiento, empleado por el neutrófilo, es el reconocimiento de microorganismos opsonizados con anticuerpos. Para este reconocimiento, los neutrófilos, expresan a los receptores FcγR1a y FcγR1b. Se ha descrito que cada FcγR puede inducir diferentes respuestas en el neutrófilo. El FcγR1a induce la fagocitosis, mientras que, el FcγR1b induce la producción de NETs. Sin embargo, las vías de señalización activadas tanto por FcγR1a como FcγR1b aún no se conocen con exactitud. Se ha descrito que, el FcγR1a y no el FcγR1b, induce la producción de IP<sub>3</sub>. En contraste, el FcγR1b y no el FcγR1a, requiere de la activación de TAK1. No obstante, se ha descrito que tanto el FcγR1a como el FcγR1b requieren de la activación de proteínas cinasas C o PKC (del inglés Protein Kinase C). Sin embargo, las PKC son una familia de enzimas que incluye diferentes isoformas, de las cuales los neutrófilos humanos pueden expresar a PKC α, β, δ, ζ y no se conoce que isoformas puede activar cada uno de los FcγR del neutrófilo. Por lo tanto, el objetivo de mi trabajo fue dilucidar cuál es el papel de las isoformas de PKC en el mecanismo activado por cada uno de los FcγR en el neutrófilo humano. Con ese objetivo, se estimuló selectivamente cada uno de los FcγR del neutrófilo humano con anticuerpos monoclonales, en presencia o ausencia de inhibidores para las isoformas de PKC que expresa el neutrófilo humano, y se estimó la producción de ROS, la fosforilación de ERK y el incremento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Se descubrió que, el FcγR1a emplea tanto a PKCα como a PKCδ para inducir la producción de ROS, mientras que, el FcγR1b emplea tanto a PKCα como a PKCβ para inducir la producción de ROS. Además, El FcγR1a no emplea a ninguna isoforma de PKC para inducir la fosforilación de ERK. En contraste, El FcγR1b emplea a PKCα para inducir la fosforilación de ERK. Finalmente, el FcγR1a no requiere de la activación de ninguna isoforma de PKC para inducir el incremento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Por otro lado, el FcγR1b requiere de la activación PKCα para inducir el incremento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo, sugieren un uso diferencial de las PKC por cada uno de los FcγR en neutrófilos humanos. Reforzando la hipótesis de que, cada receptor FcγR activa vías de señalización diferentes y por lo tanto funciones específicas en el neutrófilo humano.

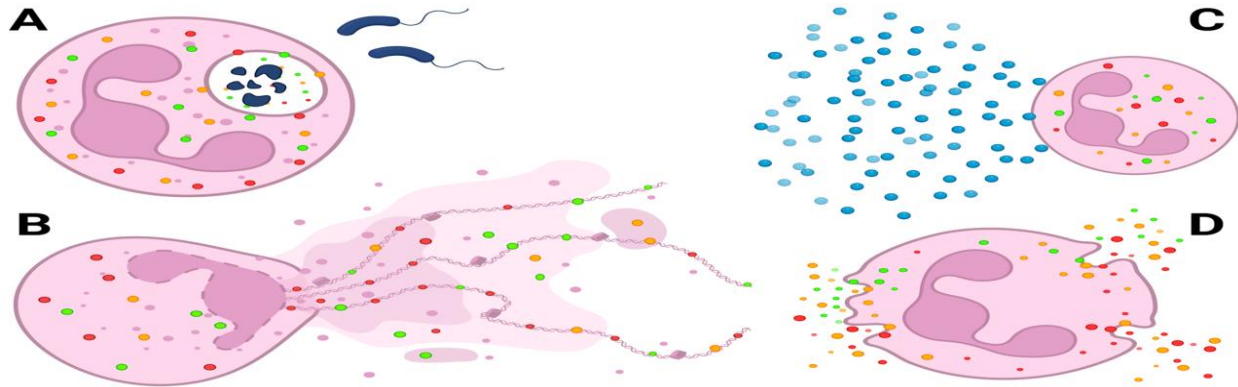
# CAPÍTULO I

**CADA UNO DE LOS FCGAMMAR DEL NEUTRÓFILO HUMANO REQUIERE DE LA ACTIVACIÓN DE DIFERENTES ISOFORMAS DE PKC.**

## **Introducción.**

Uno de los mecanismos de reconocimiento más efectivos para eliminar a los patógenos, que el sistema inmunológico utiliza, es la opsonización con inmunoglobulinas (Ig). Las Ig reconocen a los patógenos empleando los fragmentos de unión al antígeno o Fab (del inglés Fragment antigen-binding). La unión entre las Ig y los patógenos se conoce como complejos inmunes [1]. Estos complejos inmunes, son reconocidos a través de la región cristalizante de las Ig, o Fc (del inglés Fragment crystallizable), por medio de los receptores para Fc (FcR) en la superficie de las células inmunes [2]. Además, se ha descrito que en humanos existen tanto diferentes tipos de Ig como diferentes FcR en la superficie de las células inmunes para reconocerlos. Las IgM son las primeras Ig en producirse al activarse la respuesta inmunológica y son Ig con baja afinidad por su antígeno. Los complejos inmunes formados por IgM son reconocidos por el Fc $\mu$ R en la superficie de las células inmunitarias. Sin embargo, conforme la respuesta inmunológica va progresando, la producción de Ig cambia y se comienzan a producir otro tipo de Ig, por ejemplo: las Ig tipo G o IgG. Las IgG son Ig que reconocen con alta afinidad a su antígeno. Además, sabemos que los complejos inmunes formados por IgG son reconocidos por los Fc $\gamma$ R en la superficie de las células inmunes [3; 4; 5]. Por otro lado, se ha descrito que la estimulación de los FcR induce la activación de mecanismos para destruir a los patógenos. Además, sabemos que los FcR también pueden desencadenar la respuesta inflamatoria con el fin de eliminar las infecciones, así como participar en condiciones de autoinmunidad [6]. Por lo tanto, con el fin de en un futuro, ser capaces de influenciar los mecanismos para eliminar una infección o bien la respuesta autoinmune mediada por los FcR, es de gran importancia entender como los FcR regulan las respuestas de las células inmunes. Por otro lado, sabemos que los Fc pueden expresarse en diferentes células inmunes incluidos los leucocitos [7]. De la variedad de leucocitos, los más abundantes en el torrente sanguíneo son los neutrófilos y son las primeras células en ser reclutadas a los sitios de infección. Cuando los neutrófilos llegan a los sitios de infección pueden utilizar distintos mecanismos para combatir a los patógenos incluyendo: la fagocitosis, la degranulación, la producción

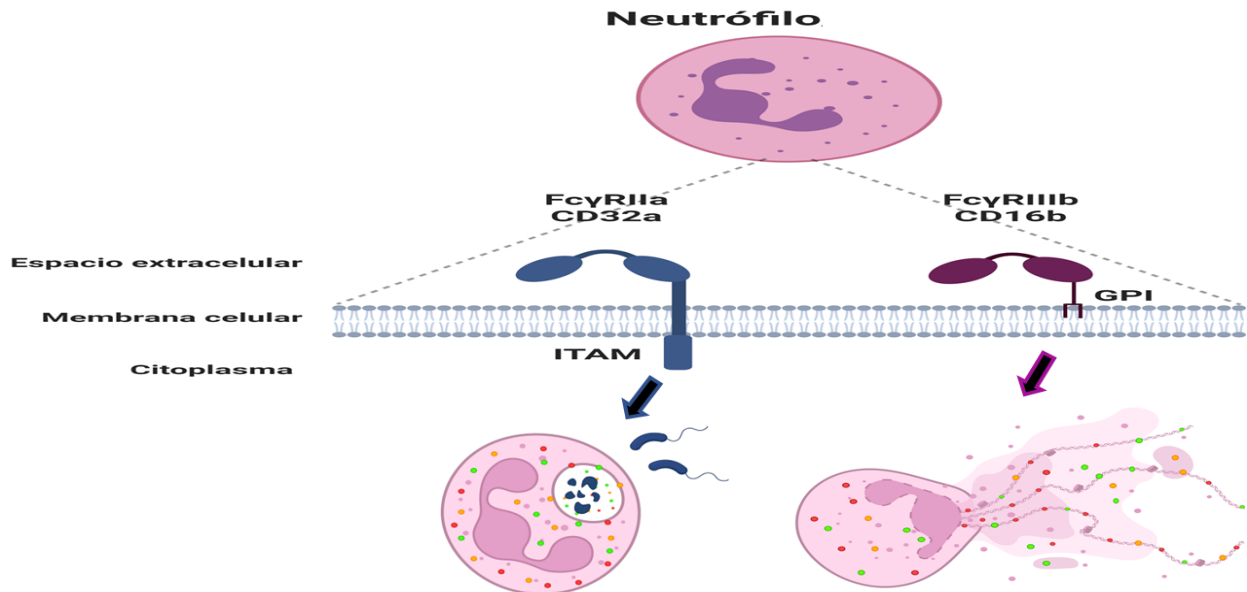
de especies reactivas del oxígeno o ROS (del inglés Reactive Oxygen Species) y la formación de redes extracelulares de neutrófilo o NETs (del inglés Neutrophil Extracellular Traps) (Figura 1) [8].



**Figura 1. Mecanismos del neutrófilo frente a las infecciones.** Cuando los neutrófilos llegan a los sitios de infección pueden promover (A) la fagocitosis, (B) la producción de NETs, (C) la producción de ROS o (D) la degranulación para eliminar a los patógenos. **Esquema creado con BioRender.com**

Sin embargo, aún no es claro el cómo los neutrófilos pueden elegir entre estos distintos mecanismos de eliminación microbiana ni el cómo estos mecanismos pueden coexistir en los neutrófilos. Una hipótesis es que la capacidad de los neutrófilos para destruir a los microorganismos patógenos depende de la efectividad con la que los reconocen. La unión entre FcR y los microorganismos patógenos opsonizados con IgG es una de las principales vías utilizadas por el neutrófilo para el reconocimiento de microorganismos invasores. Además, se ha descrito que, dicho reconocimiento puede activar en los neutrófilos los mecanismos de eliminación microbiana mencionados con anterioridad [9]. Los neutrófilos humanos expresan principalmente dos tipos de FcR en su superficie, el receptor FcγRIIa o CD32a y el receptor FcγRIIIb o CD16b. Tanto el FcγRIIa como el FcγRIIIb, son FcR que cuentan con baja afinidad por monómeros de IgG, pero son capaces de reconocer complejos inmunes con mayor afinidad [10; 11]. El FcγRIIa se expresa en monocitos, macrófagos, células cebadas, células dendríticas, basófilos y neutrófilos. Estructuralmente, el FcγRIIa está compuesto por una cadena  $\alpha$ , que atraviesa la membrana plasmática. Adicionalmente, en su porción extracelular, el FcγRIIa cuenta con dos dominios tipo Ig y la región intracelular contiene una secuencia que incluye tirosinas que son fosforiladas al activarse el receptor, conocida como ITAM (del inglés: Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) [12; 13]. Por otro lado, se sabe que el FcγRIIIb es exclusivo de neutrófilos humanos y estructuralmente este receptor en su porción extracelular está compuesto de dos dominios tipo inmunoglobulina, sin embargo, no cuenta con región intracelular y se

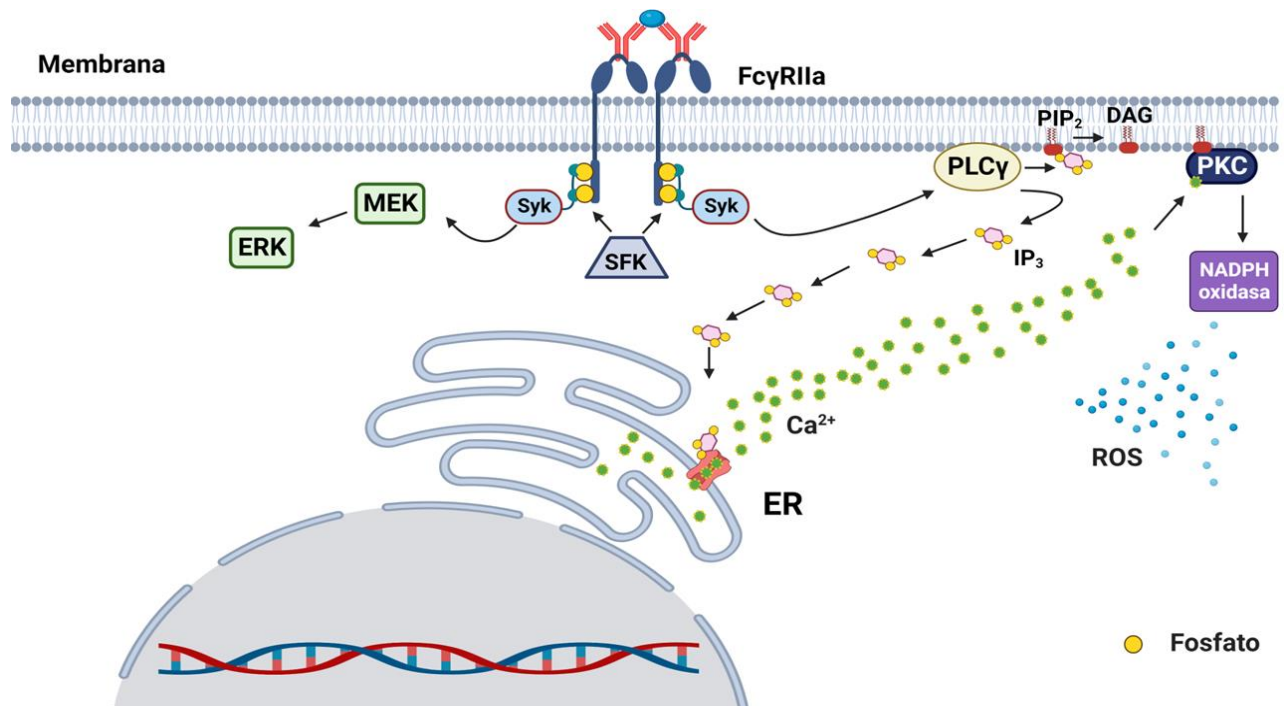
ha descrito que está unido a la membrana por un enlace glicosilfosfatidilinositol o GPI (del inglés Glycosylphosphatidylinositol) [14]. Además, diferentes reportes han demostrado que, tanto FcγRIIa como FcγRIIIb son capaces de inducir respuestas específicas en los neutrófilos [15]. Se conoce que, el FcγRIIa regula la respuesta fagocítica del neutrófilo. Además, recientemente se demostró que el FcγRIIIb es capaz de inducir la formación de NETs (Figura 2) [16; 17].



**Figura 2.** *FcγR del neutrófilo humano.* En condiciones basales el neutrófilo humano expresa tanto el FcγRIIa o CD32a como el FcγRIIIb o CD16b. Cuando el FcγRIIa se activa induce a la fagocitosis, en contraste el cuándo el FcγRIIIb se activa induce la producción de NETs en el neutrófilo humano. **Esquema creado con BioRender.com**

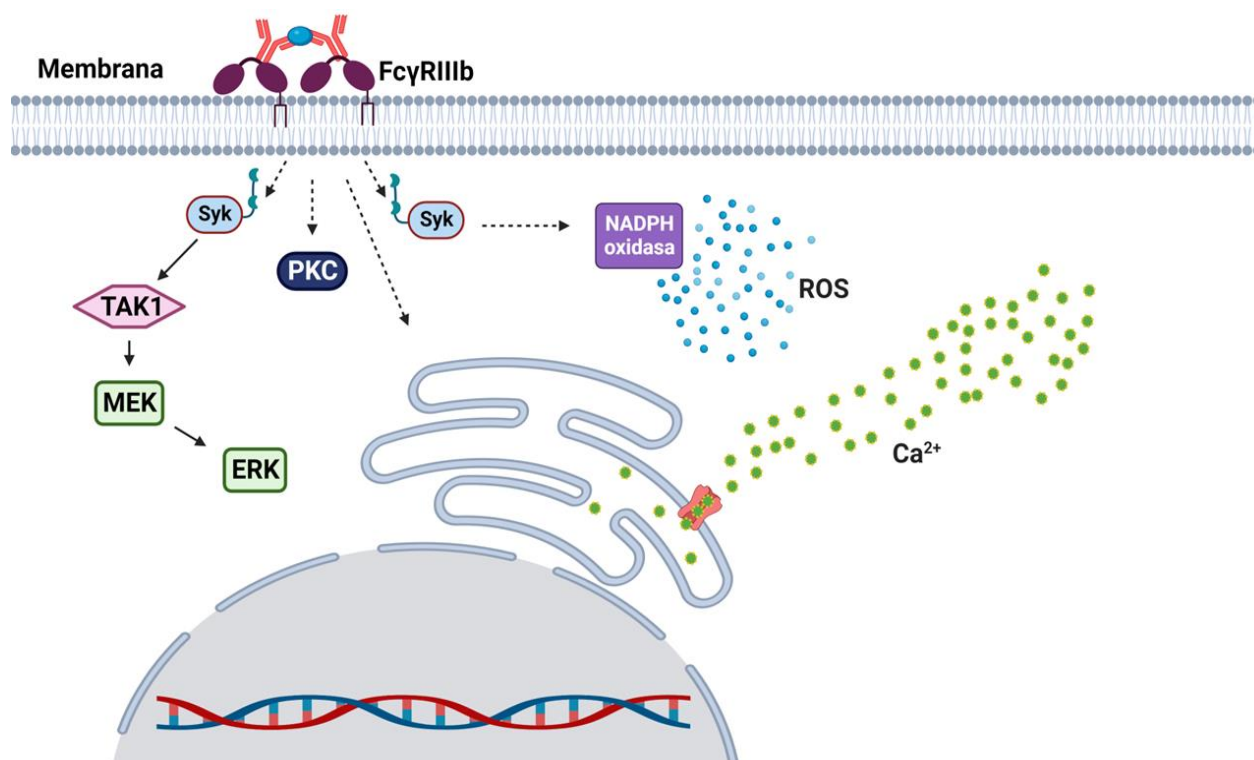
Si bien se han descrito algunas funciones activadas por los FcγR del neutrófilo humano, las vías de señalización activadas tanto por FcγRIIa como FcγRIIIb aún no se conocen con exactitud. Además, se han encontrado tanto similitudes como diferencias particulares en la vía de señalización activadas por cada FcγR del neutrófilo humano, lo que explicaría por qué inducen respuestas celulares específicas. Una vez que el FcγRIIa es activado, inicia su vía de señalización empleando las regiones ITAM incluidas en su secuencia [18; 19]. Involucrando a cinasas de la familia de SRC (SFK), se induce la fosforilación de las tirosinas incluidas en la región de ITAM, esto produce sitios de unión para Syk, lo que induce su activación [20; 21]. Posteriormente Syk puede inducir la activación de la vía MEK-ERK guiando la respuesta fagocítica en el neutrófilo [22]. Por otro lado, recientemente, se demostró que FcγRIIIb induce la activación de Syk promoviendo la fosforilación de TAK1 seguido de la activación de la vía MEK-ERK, lo que lleva a la formación de NETs. Además, se ha descrito que, tanto FcγRIIa como

FcγRIIIb son capaces de promover la producción de ROS activando el complejo NADPH-oxidasa [17; 23]. Por otro lado, tanto FcγRIIa como FcγRIIIb inducen el incremento intracelular de la concentración de calcio ( $[Ca^{2+}]_i$ ) [24]. Sin embargo, se ha sugerido que el mecanismo para inducir el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  por cada uno de los FcγR en los neutrófilos humanos podría ser distinto. Se ha demostrado que, el FcγRIIa induce la producción tanto de diacilglicerol (DAG) como de IP<sub>3</sub> (Inositol 1,4,5 trifosfato), empleando a PLCγ (del inglés Phospholipase C) lo que induce la salida de Ca<sup>2+</sup> del retículo endoplásmico. En contraste el FcγRIIIb no induce la producción de IP<sub>3</sub>, y el mecanismo por el cual induce el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  no ha sido descrito [25; 26]. Adicionalmente, se conoce que tanto el FcγRIIa como el FcγRIIIb requieren de la activación de proteínas cinasas C o PKC (del inglés Protein Kinase C), sin embargo no se ha descrito con exactitud como los FcγR del neutrófilo humano emplean a las PKC en su vía de señalización (Figura 3 y Figura 4) [17].



**Figura 3.** Vía de señalización activada por el FcγRIIa en el neutrófilo humano. El FcγRIIa es un receptor dependiente de ITAM, una vez que es activado, proteínas SFK fosforilan las tirosinas contenidas en la región ITAM. Esto produce un sitio de unión para Syk lo que induce su reclutamiento y activación. Por un lado, Syk puede inducir la activación de la vía MEK-ERK, además, Syk es capaz de mediar la activación de PLCγ. Por su parte, a partir de PIP<sub>2</sub>, PLCγ induce la producción tanto de DAG como de IP<sub>3</sub>. IP<sub>3</sub> es reconocido por su receptor canal en el retículo endoplásmico, lo que induce un flujo de Ca<sup>2+</sup> al citoplasma. Juntos, Ca<sup>2+</sup> y DAG pueden activar PKC, a su vez PKC puede mediar la activación del complejo NADPH-oxidasa, induciendo la producción de ROS. En conjunto, la vía de señalización activada por el FcγRIIa, regula la respuesta fagocítica en el neutrófilo humano. **Esquema creado con BioRender.com**





**Figura 4.** Vía de señalización activada por el FcγRIIIb en el neutrófilo humano. El FcγRIIIb es un receptor unido a la monocapa externa de la membrana plasmática por un enlace GPI y hasta el momento no se conocen subunidades asociadas que regulen su activación. Sin embargo, se sabe que una vez que el FcγRIIIb se activa, se produce la activación de Syk. Syk induce la activación de TAK1 y a su vez TAK1 regula la activación de la vía MEK-ERK. Además, se ha descrito que el FcγRIIIb, requiere la activación de PKC, induce la producción de ROS y el incremento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. En conjunto la vía de señalización activada por el FcγRIIIb, regula la producción de NETs en el neutrófilo humano. **Esquema creado con BioRender.com**

Sin embargo, las PKC son una familia de enzimas que se han catalogado en tres diferentes grupos convencionales, nuevas y atípicas. Las isoformas PKCα, PKCβI, PKCβII y PKCγ conforman el grupo de PKC convencionales (cPKC). Las isoformas PKCδ, PKCε, PKCη y PKCθ integran el grupo de las PKC nuevas (nPKC). Por último, el grupo de las PKC atípicas (aPKC) está conformado por las isoformas PKCζ y PKCι/λ. Además, se ha descrito que cada grupo de PKC difiere en su forma de activación. Las cPKC son dependientes del Ca<sup>2+</sup> y requieren tanto de fosfatidilserina (PS) como de diacilglicerol (DAG) para su activación. Las nPKC son independientes del Ca<sup>2+</sup> y requieren tanto de PS como de DAG para su activación. Por último, las aPKC son independientes del Ca<sup>2+</sup> y requieren de PS [27]. De todas las isoformas de PKC que se conocen el neutrófilo humano puede expresar las cPKC PKCα, y PKCβII, de las nPKC a PKCδ y de las aPKC a PKCζ [28; 29]. Sin embargo, no se conoce qué isoformas de PKC puede activar cada uno de los FcγR de los neutrófilos humanos. No obstante, se ha reportado que, al estimular a los neutrófilos con partículas de látex opsonizadas con IgG, se observa la

producción de ROS y en presencia de un inhibidor para PKC $\beta$  la producción de ROS disminuye [30]. Lo cual sugiere que se requiere de la actividad de PKC $\beta$  para inducir la producción de ROS inducida por los Fc $\gamma$ R de los neutrófilos humanos. Sin embargo, empleando esta metodología, no se conoce que receptor Fc $\gamma$ R regula dicha activación y no se ha descartado si otra isoforma de PKC puede estar involucrada en la activación de NADPH-oxidasa y por lo tanto en la producción de ROS. Además, experimentalmente se mostró que al utilizar un inhibidor tanto para PKC $\alpha$  como para PKC $\beta$ , se logra disminuir la formación NETs al estimular el Fc $\gamma$ R11b en el neutrófilo [17]. Por otro lado, se ha demostrado que en linfocitos T citotóxicos de ratón se requiere de la actividad de PKC $\theta$  para inducir la fosforilación de ERK [31]. Además, en la línea celular de páncreas Panc-1, se requiere de la actividad de PKC $\epsilon$  para inducir la fosforilación de ERK [32]. Sin embargo, no conocemos si los Fc $\gamma$ R emplean alguna isoforma de PKC para inducir la activación de ERK en el neutrófilo humano. Por lo tanto, el objetivo de mi trabajo fue dilucidar cuál es el papel de las isoformas de PKC en el mecanismo activado por cada uno de los Fc $\gamma$ R en el neutrófilo humano.

## **Planteamiento del problema.**

Las vías de señalización activadas por los FcγR en el neutrófilo humano no han sido descritas del todo. Sin embargo, se conoce que cada uno de los FcγR en el neutrófilo humano inducen respuestas específicas. El FcγRIIa induce la fagocitosis en el neutrófilo. En contraste, el FcγRIIIb induce la formación de NET. Por otro lado, se sabe que tanto el FcγRIIa como el FcγRIIIb puede inducir el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$ , la producción de ROS, la activación de ERK y la activación de PKC. Sin embargo, no se ha descrito que isoformas de PKC emplea cada uno de los FcγR del neutrófilo humano. Por lo tanto, en este trabajo, se estudió la posibilidad de que cada uno de los FcγR en el neutrófilo humano, activa distintas isoformas de PKC.

## **Hipótesis.**

La vía de señalización activada por cada uno de los FcγR presente en el neutrófilo humano, emplea diferentes isoformas de la familia de las PKC para mediar su vía de señalización y, por lo tanto, guiar la respuesta del neutrófilo humano.

## **Objetivo General.**

Dilucidar qué isoformas de PKC son utilizadas por cada uno de los FcγR para mediar su vía de señalización y, por lo tanto, guiar la respuesta del neutrófilo humano.

## **Objetivos particulares.**

1. Obtener una población homogénea y pura de neutrófilos humanos.
2. Estimular selectivamente cada uno de los FcγR del neutrófilo humano.
3. Medir la formación de ROS en presencia o ausencia de inhibidores específicos para PKC, posterior al entrecruzamiento selectivo de cada uno de los FcγR en el neutrófilo humano.

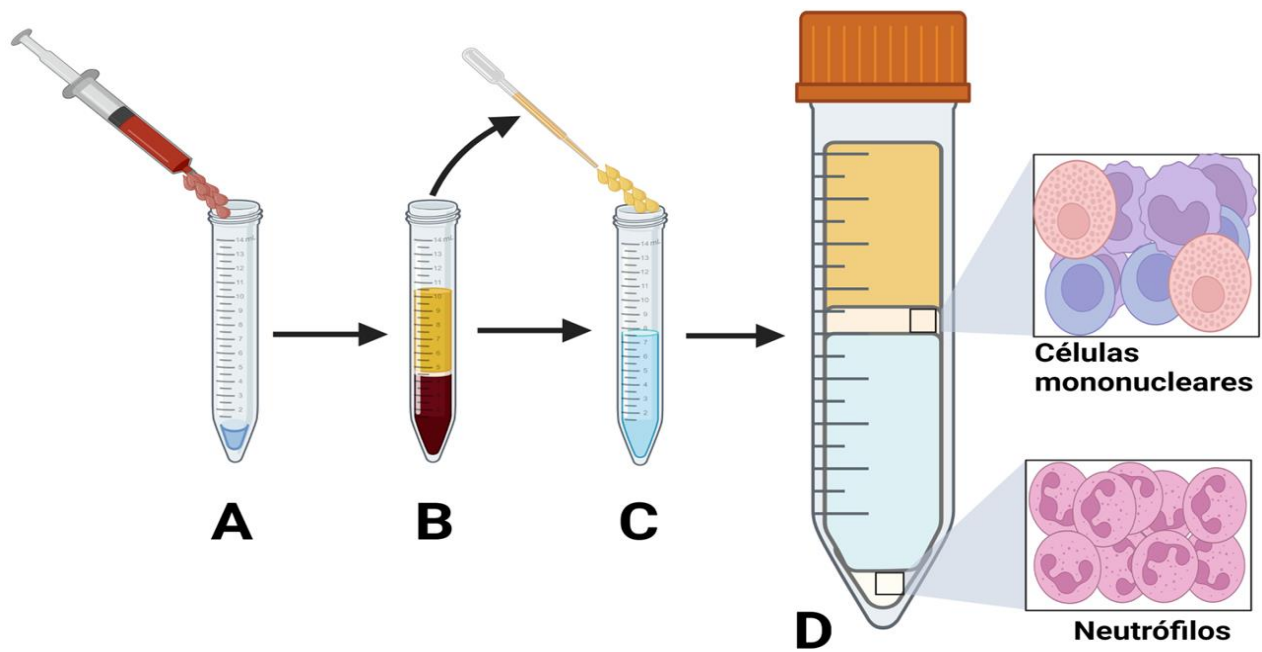
4. Estimar la fosforilación de ERK en presencia o ausencia de inhibidores específicos de PKC, posterior al entrecruzamiento selectivo de cada uno de los FcγR en el neutrófilo humano.
5. Evaluar el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  en presencia o ausencia de inhibidores específicos de PKC, posterior al entrecruzamiento selectivo de cada uno de los FcγR en el neutrófilo humano.

## **Materiales y métodos**

### Purificación de neutrófilos.

Los neutrófilos fueron purificados de sangre periférica humana proveniente de donadores adultos voluntarios por medio del método de Dextrán-Ficoll [33]. Primero, 10 ml de sangre fresca se añadieron a un tubo cónico de 15 ml, el cual contenía 0.25 ml de heparina (10 U/ml) y 2 ml de una disolución de Dextran T500 (Pharmacia Cat # 170320-01) en solución amortiguadora PBS (del inglés phosphate buffered saline). La sangre se mezcló por inversión y se dejó reposar durante 45 min a temperatura ambiente, para sedimentar los eritrocitos. El plasma rico en leucocitos, que se encuentra en la parte superior, se transfirió a un tubo cónico de 15 ml que contenía 5 ml de Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences AB Uppsala Sweden Cod # 14-1440-03). El tubo se centrifugó a 516 x g durante 20 min a 4 °C. En seguida, se eliminó el sobrenadante y el botón celular que contiene a los neutrófilos se resuspendió en 10 ml de PBS a 4 °C (frío). La suspensión celular, se transfirió a un tubo cónico de 50 ml y se centrifugó a 290 x g durante 5 min a 4 °C. Después se eliminó el sobrenadante y la pastilla celular que contiene a los neutrófilos, se resuspendió en 10 ml de PBS. Con el fin de eliminar a los eritrocitos restantes, se realizó un choque hipotónico, como se describe a continuación. La suspensión de neutrófilos se centrifugó a 290 x g durante 5 min a 4 °C y se eliminó el sobrenadante. Inmediatamente se adicionó 10 ml de disolución hipotónica a 4 °C (0.2 % de NaCl, 1 % de BSA, 20 mM de HEPES, pH= 7.4) agitando suavemente durante 1 min. En seguida, se adicionó 10 ml de disolución hipertónica a 4 °C (1.6 % de NaCl, 1 % de BSA, 20 mM de HEPES, pH= 7.4) y se mezcló por inversión. La suspensión celular se centrifugó a 290 x g durante 5 min a 4 °C y se eliminó el sobrenadante. Finalmente, los neutrófilos se resuspendieron en 10 ml de PBS a 4 °C. La suspensión

celular se mantuvo en hielo y se realizó un conteo celular con un hemocitómetro. Finalmente se realizó una tinción con Giemsa-Wright (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania #cat WG128), y se comprobó que, con este método aproximadamente el 96 % de las células fueron neutrófilos quedando alrededor del 4% de eritrocitos contaminantes.



**Figura 5.** Purificación de neutrófilos de sangre periférica humana. Para la purificación de neutrófilos se utilizó el método de Dextran-Ficol. **A)** 10 ml de sangre periférica se colocan en un tubo que contiene dextran y heparina. **B)** Posteriormente, se colecta el plasma rico en leucocitos y **C)** se transfiere a un tubo con ficoll y se centrifuga. **D)** Al terminar la centrifugación se forman diferentes fases una capa de plasma, una capa de células mononucleares, una capa de ficoll y por último el botón celular que contiene a los neutrófilos. **Esquema creado con BioRender.com**

## Marcaje de receptores con anticuerpos monoclonales.

Se colocaron  $1 \times 10^6$  neutrófilos en un tubo cónico de plástico de 1.5 ml (Axygen, Unión City CA USA), posteriormente se centrifugó a  $1,743 \times g$  durante 1 min, se eliminó el sobrenadante y se adicionó 100  $\mu$ l de una suspensión 10  $\mu$ g/ml del anticuerpo anti-FcR correspondiente en PBS (Tabla 1). Se incubó durante 20 min a 4 °C. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron dos lavados con 1 ml de PBS a 4 °C, se centrifugó a  $1,743 \times g$  durante 1 min cada lavado. Se eliminó el sobrenadante y enseguida se resuspendieron los neutrófilos en el buffer correspondiente. Los datos de los anticuerpos utilizados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Anticuerpos anti-FcR

Anticuerpo	Receptor	Marca
IV.3	Fc $\gamma$ RIIa	025-1 Medarex
3G8	Fc $\gamma$ RIIIb	028-1 Medarex

## Producción ROS

La producción de ROS se estimó detectando los cambios en la fluorescencia de neutrófilos cargados con dihidrorodamina-123 (DHR-123 #Cat. AS-85711 Anaspec, Inc Fremont, CA, USA). Se colocaron  $1 \times 10^6$  neutrófilos en un tubo cónico de plástico de 1.5 ml y se resuspendieron en 100  $\mu$ l de una disolución 15  $\mu$ M de DHR-123 en PBS. Se incubó durante 15 min a 37 °C en oscuridad. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó un lavado con 1 ml de PBS frío. Posteriormente, los neutrófilos se resuspendieron en 100  $\mu$ l del correspondiente estímulo, como se describe a continuación. Para la estimulación con el éster de forbol PMA (del inglés Phorbol 12-myristate 13-acetate), los neutrófilos se resuspendieron en una disolución 20 nM de PMA en PBS. Se incubó durante 45 min a 37 °C. Para la estimulación de Fc $\gamma$ R, los neutrófilos se resuspendieron en una suspensión del correspondiente anticuerpo anti-Fc $\gamma$ R a 10  $\mu$ g/ml en PBS. Y se incubó durante 20 min a 4 °C. Posteriormente, se realizó un lavado con PBS a 4 °C y los neutrófilos se resuspendieron en 100  $\mu$ l de una suspensión del anticuerpo F(ab')<sub>2</sub> goat anti-mouse IgG (Cat# 115-006-003 Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc. West Grove, PA, USA). Se incubó durante 45 min a 37 °C. Transcurrido el tiempo de incubación, se adicionó 250  $\mu$ l de PBS a 4 °C y la suspensión celular se mantuvo en hielo durante 2 min. Por último, la suspensión de neutrófilos se centrifugó a  $1,743 \times g$ , se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en

1 ml de una disolución 1 % de paraformaldehído (PFA) en PBS a 4 °C. La suspensión de neutrófilos se mantuvo a 4 °C y en oscuridad hasta su análisis por citometría de flujo empleando el citómetro de flujo Attune NxT (Thermo Fisher Scientific Carlsbad, CA, USA) con el láser de excitación de 488 nm y el filtro de emisión 530/30. Se realizó la adquisición de 10, 000 eventos por condición. El análisis de los datos se realizó empleando el software FlowJo™ versión 10 (Becton Dickinson; 2019; Ashland, OR, USA) de la unidad de citometría de flujo del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

#### Estimación del incremento de la concentración de Calcio intracelular.

El incremento de la concentración de calcio intracelular se estimó detectando los cambios en la fluorescencia de neutrófilos cargados con Fura-2AM (Cata# 344905 Calbiochem/EMD Millipore Billerica, MA, USA). Los neutrófilos se colocaron a una densidad  $1.5 \times 10^6$  neutrófilos por ml en un tubo cónico de plástico de 50 ml en PBS con 1.5 mM de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  y 1.5 mM de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  (PBS  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ) y se incubó durante 5 min a 37 °C. Posteriormente se adiciono Fura-2AM (concentración final 10  $\mu\text{M}$ ) y se incubó durante 5 min. Se realizó una dilución con PBS  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  a una relación de 10 veces y se incubó durante 20 min a 37 °C. Se realizó un lavado con PBS  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  a 37 °C. Los neutrófilos se resuspendieron en 6 ml de PBS  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  a 37 °C y se incubó durante 15 min a 37 °C. Se concentraron las células por centrifugación, se retiró el sobrenadante y resuspendieron los neutrófilos en PBS  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  tibio a una densidad de  $3 \times 10^6$  y se mantuvo en hielo. Los cambios en la fluorescencia fueron monitoreados utilizando un espectrofluorimetro (Perking Elmer; Waltham, MA, USA), utilizando los filtros de excitación de 340-380 nm y el filtro de emisión de 510 nm. Las mediciones se realizaron en una suspensión de neutrófilos, en agitación constante a 37 °C en un volumen total de 2 ml.

Para la estimulación con fMLF, se colocó una suspensión de  $3 \times 10^6$  neutrófilos cargados con Fura-2AM en 2 ml de PBS  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  en una cubeta de lectura del espectrofluorimetro, y se incubó a 37 °C durante 2 min. Después del tiempo de incubación, se comenzó con las lecturas del cambio de fluorescencia durante 100 s. A los 100 s de lectura, se adicionó 40  $\mu\text{l}$ , de una disolución 500 nM de fMLF en PBS  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (concentración final 10 nM). Para la estimulación de  $\text{Fc}\gamma\text{R}$ ,  $3 \times 10^6$  neutrófilos cargados con Fura-2AM, se resuspendieron en 100  $\mu\text{l}$  de una suspensión del correspondiente anticuerpo anti-FcR, a una concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$  en PBS y se incubaron a 4 °C durante 20 min. Posteriormente se realizó un lavado con PBS a 4 °C. Los neutrófilos se resuspendieron en 2 ml de PBS  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  y se transfirieron a una cubeta de lectura del

espectrofluorimetro, se incubó a 37 °C durante 2 min. Después del tiempo de incubación, se comenzó con las lecturas del cambio de fluorescencia durante 100 s. A los 100 s de lectura, se adicionó 80 µl, de una suspensión 1.3 mg/ml del anticuerpo F(ab')<sub>2</sub> goat anti-mouse IgG (concentración final 52 mg/ml), para la estimulación de los FcγR.

Después de los 300 seg de lectura se realizaron las lecturas de calibración como se describe a continuación. Se adicionaron 100 µl de una disolución de Triton X100 al 10 % y se continuo con las lecturas hasta los 350 seg. Este registro, es la fluorescencia máxima de fura-2AM. Después, se agregó 500 µl de una disolución de EGTA 250 mM y se continuo con las lecturas hasta los 400 seg. Este registro, es la fluorescencia mínima de fura-2AM. Empleando la lectura máxima y mínima se calculó la  $[Ca^{2+}]_i$ , utilizando el software FL WinLab 4.00.02 (Perking Elmer; Waltham, MA, USA).

#### Western Blot.

Los neutrofilos se lisaron con buffer RIPA (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM HEPES, 0.5 % desoxicalato de sodio, 1 % Nonidet P-40 y 10 mM 2-mercaptoethanol, pH= 7.5), que contenía un coctel de inhibidores de proteasas (Cat# Roche Basel, Switzerland) y fosfatasas (Cat#), durante 15 min a 4 °C. Los lisados celulares se centrifugaron y las proteínas fueron separadas por electroforesis en geles de SDS-PAGE 12 %. Las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de polivinilideno (PVDF. Immobilion-P; Millipore, Bedford, MA). Se incubó la membrana en buffer de bloqueo (5 % de BSA y 0.1 % de Tween 20 en PBS) durante toda la noche. Posteriormente, se adicionaron los anticuerpos primarios en buffer de bloqueo, durante una hora a temperatura ambiente, los anticuerpos primarios utilizados se describen en la tabla 3. Se lavó la membrana 6 veces con PBS que contenía 0.1 % de Tween 20 durante 5 min cada lavado. Inmediatamente después, se adicionó una suspensión 1/3000 del anticuerpo goat anti-mouse IgG o goat anti-rabbit IgG conjugado con HRP según correspondiera y se incubo una hora a temperatura ambiente. Después, se lavó la membrana 6 veces con PBS que contenía 0.1 % de Tween 20 durante 5 min cada lavado. Después, se reveló con el substrato de quimioluminiscencia (SuperSignal; Pierce, Rockford, IL) de acuerdo a las especificaciones del fabricante.



Tabla 3 Anticuerpos Primarios

Anticuerpo	Blanco	Marca
Policlonal de conejo	ERK1/2	Sc-94 Santa Cruz Biotechnology
Monoclonal de ratón	ERK1/2 Fosforilado (pY240)	Sc-7383 Santa Cruz Biotechnology

Inhibidores farmacológicos.

En algunos experimentos los neutrófilos fueron tratados 30 min con inhibidores farmacológicos, antes de realizar la estimulación. Las concentraciones e inhibidores utilizados se describen en la tabla 2.

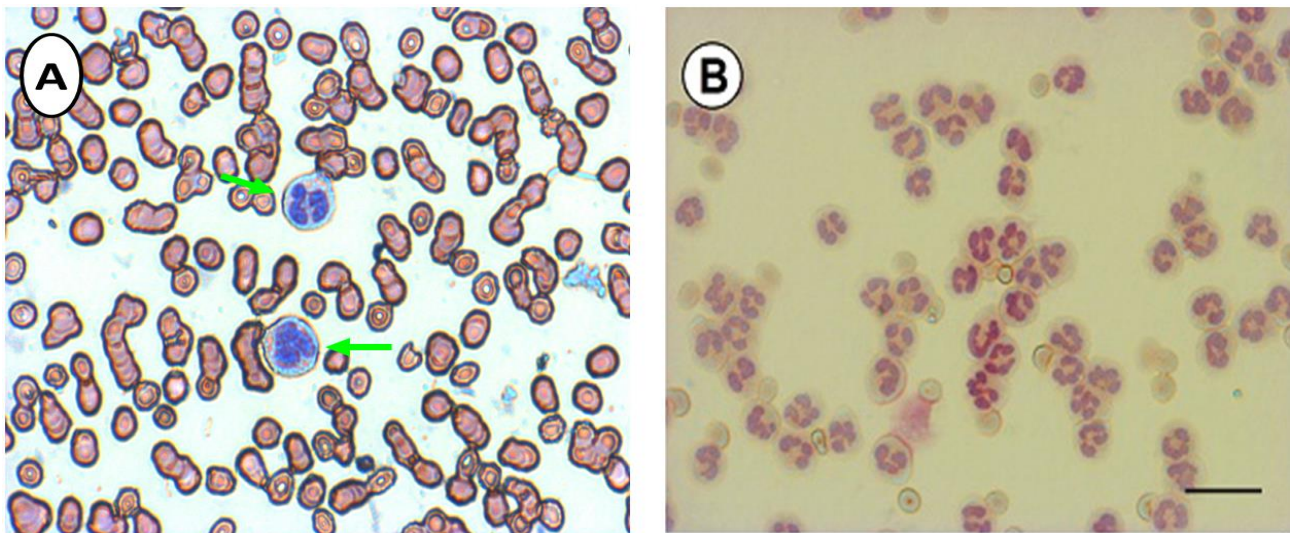
Tabla 2. Inhibidores.

Inhibidor.	Molécula que inhibe.	Concentración	Marca
Gö6976.	PKC $\alpha$ y PKC $\beta$	1 $\mu$ M	Calbiochem
LY333531	PKC $\beta$	2.5 $\mu$ M	Santa Cruz Biotechnology
Rottlerina	PKC $\delta$	3 $\mu$ M	Millipore
Pseudosutrato	PKC $\zeta$	20 $\mu$ M	Merck
iSyk	Syk	1 $\mu$ M	Calbiochem

## Resultados

### Purificación de neutrófilos método de Dextran-Ficoll.

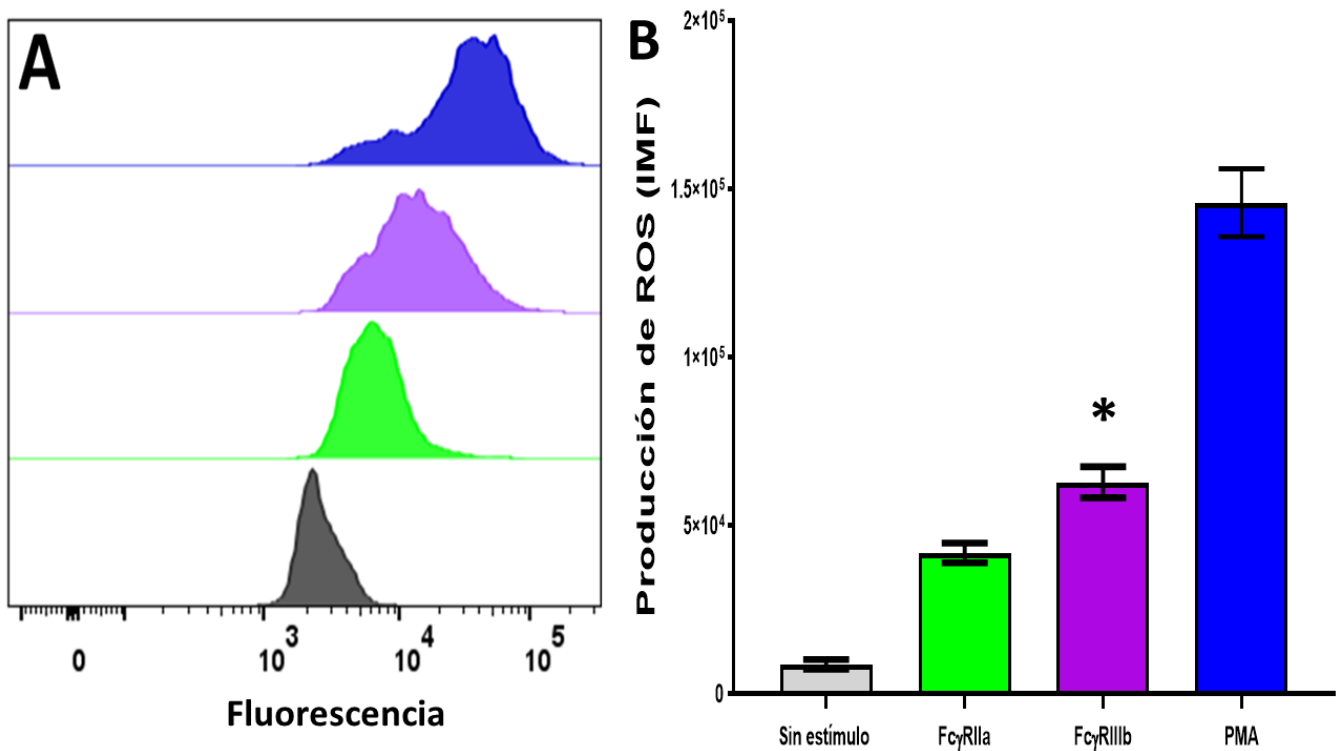
Utilizando el método de Dextran-Ficoll se purifican neutrófilos con alrededor del 96% de pureza [33]. En un frotis de sangre completa se observan solo dos neutrófilos rodeados de eritrocitos (Figura 6A). Posterior al método de purificación se observa una gran cantidad de neutrófilos (Figura 6B). Al realizar una tinción con Giemsa-Wright y realizar un análisis morfológico, se comprobó que con esta metodología alrededor del 96 % de las células purificadas son neutrófilos con alrededor de un 4 % de eritrocitos contaminantes.



**Figura 6.** Purificación de neutrófilos. **A)** Frotis de sangre completa, se observan únicamente 2 neutrófilos (flechas verdes). **B)** Neutrófilos purificados de sangre periférica por el método de Déxtran-Ficoll. Se observa una gran cantidad de neutrófilos, y una pequeña cantidad de eritrocitos contaminantes. Tinción Giemsa-Wright. La barra representa 20  $\mu\text{m}$ .

## Los FcγR inducen la producción de ROS en el neutrófilo humano.

Sabemos que los FcγRs presentes en el neutrófilo humano inducen la producción de ROS [17]. Sin embargo, se desconoce el mecanismo exacto por el cual cada FcγR induce la producción de ROS. Con el fin de dilucidar, el mecanismo por el cual los FcγR induce la producción de ROS, se entrecruzó selectivamente a cada uno de los FcγR presentes en el neutrófilo humano con anticuerpos monoclonales, y la producción de ROS se estimó, detectando los cambios en la fluorescencia de neutrófilos pretratados con dihidrorhodamina 123 (DHR-123) por citometría de flujo. Primero los neutrófilos fueron estimulados con PMA, un fuerte activador de PKC e inductor de la producción de ROS en los neutrófilos humanos [34; 35]. Como se esperaba, posterior al estímulo con PMA los neutrófilos producen de ROS (Figura 7A y Figura 7B). Además, al entrecruzar tanto con el FcγRIIa, como el FcγRIIIb, con anticuerpos monoclonales específicos, se induce la producción de ROS (Figura 7A Y Figura 7B). Además, al agrupar los datos de cuatro experimentos independientes, se observó que al entrecruzar el FcγRIIIb se producen más ROS que al entrecruzar el FcγRIIa (Figura 7B).



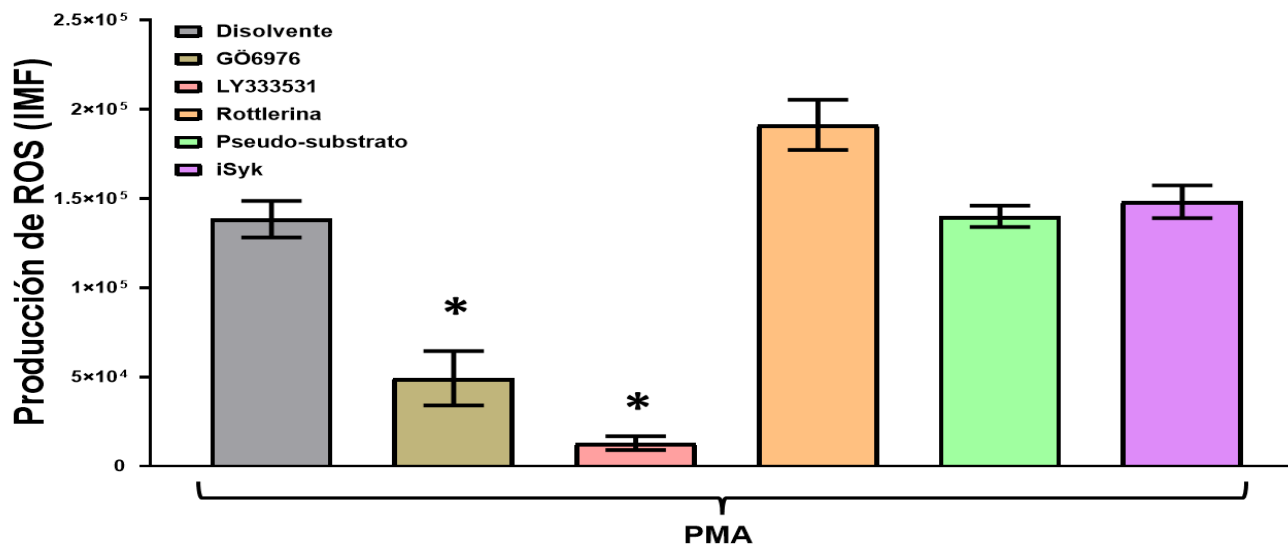
**Figura 7.** Los FcγRs del neutrófilo humano inducen la producción de ROS. **A)** De abajo hacia arriba, neutrófilos sin estímulo (histograma gris) Al estimular con PMA (histograma azul), y al estimular tanto el FcγRIIa (histograma verde) como el FcγRIIIb (histograma purpura), se induce la producción de ROS en el neutrófilo humano. Imagen representativa de 4 experimentos independientes. **B)** De izquierda a derecha, neutrófilos sin estímulo (barra gris), estimulando el FcγRIIa (barra verde), estimulando el FcγRIIIb (barra purpura), estimulando con PMA (barra azul). La grafica es el promedio de la intensidad media de fluorescencia (IMF), de cuatro experimentos independientes. ± E. E. M. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de ANOVA, seguido de una prueba de Tukey El asterisco denota la diferencia de la producción de ROS inducida por el FcγRIIIb respecto a la producción ROS inducida por el FcγRIIa.  $p \leq 0.001$ .

## **Los FcγR requieren de la activación de distintas isoformas de PKC para inducir la producción de ROS.**

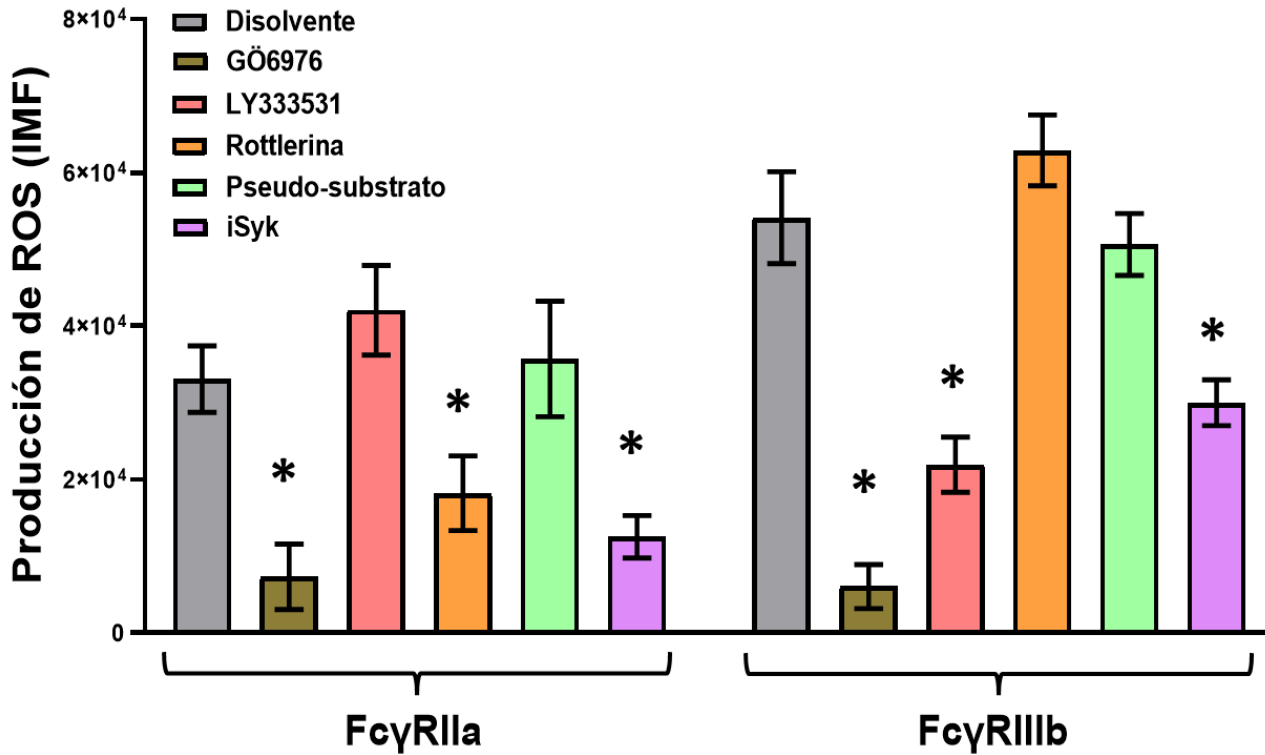
Anteriormente se demostró que, los FcγR inducen la producción de ROS (Figura 7A y Figura 7B). Además, se ha reportado que, utilizando partículas de látex opsonizadas con anticuerpos, los neutrófilos requieren de la activación de PKCβ, para inducir la producción de ROS [30]. Sin embargo, al utilizar partículas de látex opsonizadas con anticuerpos, no nos permite dilucidar cuál de los FcγRs presentes en el neutrófilo humano, induce la activación de PKCβ. Adicionalmente, se conoce que los neutrófilos humanos pueden expresar a PKCα, PKCβ, PKCδ, y a PKCζ [28; 29], y no se ha descartado que el mecanismo activado por los FcγR presentes en el neutrófilo humano, indujera la producción de ROS, activando otras isoformas de PKC. Por lo tanto, con el fin de abordar está incógnita, se entrecruzó selectivamente a cada uno de los FcγR, en presencia o ausencia de inhibidores farmacológicos para las distintas isoformas de PKC presentes en el neutrófilo humano y se estimó la producción de ROS.

Primero, al estimular los neutrófilos con PMA, en presencia del inhibidor GÖ6976, inhibidor de PKCα y PKCβ, se disminuyó la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) en alrededor de 70 %, la cual sugiere que la producción de ROS disminuyó (Figura 8). Además, al entrecruzar tanto el FcγRIIIa como el FcγRIIIb en presencia del inhibidor GÖ6976, se observó la disminución de la IMF en un 75 % y 85 % respectivamente, lo que sugiere una disminución en la producción de ROS para ambos FcγR, en presencias del inhibidor (Figura 9). Por otro lado, al estimular los neutrófilos con PMA en presencia del inhibidor LY333531, inhibidor de PKCβ, se disminuyó la la IMF en aproximadamente un 85 %, lo cual sugiere una disminución en la producción de ROS (Figura 8). Además, al entrecruzar tanto el FcγRIIIa como el FcγRIIIb en presencia de LY333531, se observó la disminución de la de la IMF en un 40 %, inducida por el FcγRIIIb y no por el FcγRIIIa, lo que sugiere una disminución en la producción de ROS, inducida por el FcγRIIIb en presencias del inhibidor (Figura 9). En conjunto, estos datos sugieren que al estimular tanto con PMA como al estimular el FcγRIIIa o el FcγRIIIb, se requiere de la activación de PKCα para inducir la producción de ROS en neutrófilos humanos (Figura 8 y Figura 9). Además, al estimular tanto con PMA como al estimular el FcγRIIIb, se requiere de la activación de PKCβ para inducir la producción de ROS en neutrófilos humano. En contraste, al entrecruzar el FcγRIIIa, no se requiere de la activación de PKCβ para inducir la producción de ROS en neutrófilos humanos (Figura 8 y Figura 9). Por otro lado, al estimular los neutrófilos con PMA en presencia del inhibidor rottlerina, inhibidor de PKCδ, no se disminuyó la IMF, lo cual sugiere que la producción de ROS no se afectó en

presencia del inhibidor (Figura 8). Además, al estimular el FcγRIIa y no al estimular el FcγRIIIb en presencia rottlerina, se observó la disminución de la IMF en un 45 %, lo cual sugiere una disminución de la producción de ROS inducida por el FcγRIIa en presencia del inhibidor (Figura 9). Estos datos sugieren que el FcγRIIa y no el PMA ni el FcγRIIIb, requiere de la activación de PKCδ para inducir la producción de ROS en los neutrófilos humanos. Adicionalmente, al estimular los neutrófilos con PMA en presencia de un pseudo-sustrato, inhibidor de PKCζ, no se disminuyó la producción de ROS (Figura 8). Además, al entrecruzar tanto el FcγRIIa como el FcγRIIIb en presencia del pseudo-sustrato, no se observó la disminución de la producción de ROS inducida tanto por el FcγRIIa como por el FcγRIIIb (Figura 9). Estos datos sugieren que, al estimular con PMA o al estimular el FcγRIIa o el FcγRIIIb, no se requiere la activación de PKCζ, para inducir la producción de ROS en neutrófilos humanos. Finalmente, al estimular los neutrófilos con PMA en presencia del inhibidor iSyk, inhibidor de Syk, como se esperaba, no se disminuyó la producción de ROS (Figura 8). Por otro lado, al entrecruzar tanto el FcγRIIa como el FcγRIIIb en presencia de iSyk, se observó la disminución de la IMF en un 60 % y 35 % respectivamente, lo cual sugiere que la producción de ROS disminuye posterior al estímulo de ambos FcγR en presencia del inhibidor (Figura 9). Por lo tanto, en conjunto estos datos sugieren que, la producción de ROS inducida por PMA no requiere de la activación de Syk. En contraste la producción de ROS inducida tanto por el FcγRIIa como por el FcγRIIIb requiere de la activación Syk en neutrófilos humanos.



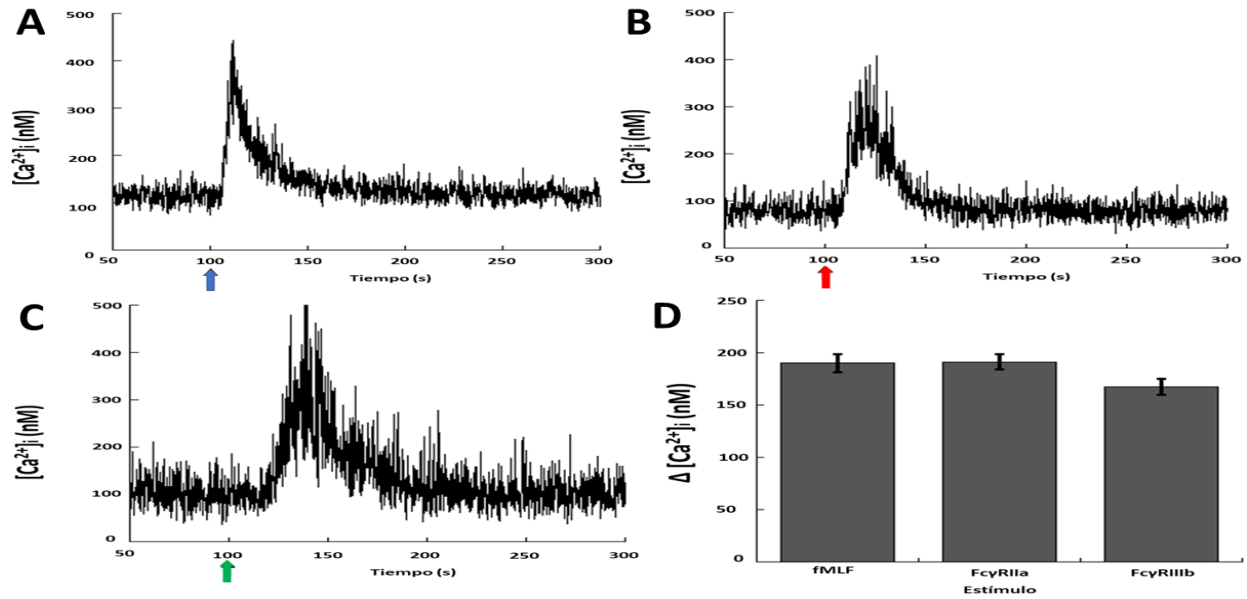
**Figura 8.** La producción de ROS inducida por PMA requiere de la activación de PKCα y PKCβ en neutrófilos humanos. La producción de ROS se estimó en neutrófilos pretratados con DHR 123. Además, los neutrófilos fueron pretratados con el disolvente, o con 1 μM de Gö6976, inhibidor de PKC α y PKCβ (**barra café**), o con 2.5 μM de LY333531, inhibidor de PKCβ (**barra rosa**), o con 3 μM de rottlerina, inhibidor de PKCδ (**barra naranja**), o con 10 μM de un pseudosustrato de PKCζ, inhibidor de PKCζ (**barra verde**), o con 1 μM de iSyk, inhibidor de Syk (**barra morada**) antes de estimular con PMA a una concentración final de 20 nM. Los datos son la media ± EEM de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de cuatro experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de ANOVA, seguido de una prueba de Tukey El asterisco denota la condición en la que existen diferencias estadísticamente significativas respecto al control ( $p < 0.001$ )



**Figura 9.** Los *FcγR* requieren de distintas isoformas de PKC para inducir la producción de ROS. La producción de ROS se estimó en neutrófilos pretratados con DHR 123. Además, los neutrófilos fueron pretratados con el disolvente, o con 1 μM de G66976, inhibidor de PKC α y PKCβ (**barra café**), o con 2.5 μM de LY333531, inhibidor de PKCβ (**barra rosa**), o con 3 μM de rottlerina, inhibidor de PKCδ (**barra naranja**), o con 10 μM de un pseudosustrato de PKCζ, inhibidor de PKCζ (**barra verde**), o con 1 μM de iSyk, inhibidor de Syk (**barra morada**) antes de entrecruzar los *FcγR*. Los datos son la media ± EEM de la intensidad media de fluorescencia (**IMF**) de cuatro experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de ANOVA, seguido de una prueba de Tukey. El asterisco denota la condición en la que existen diferencias estadísticamente significativas respecto al control ( $p < 0.001$ )

## Los FcγR inducen el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en el neutrófilo humano.

Otra función activada por los FcγRs presentes en el neutrófilo humano, es la inducción del incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  [24]. Sin embargo, se conocen algunas diferencias en el mecanismo que cada FcγR activa para inducir el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Se sabe que, el FcγRIIa induce la producción de  $IP_3$ ,  $IP_3$  se une a su receptor en el retículo endoplásmico, lo que produce el flujo de  $Ca^{2+}$  del retículo endoplásmico al citoplasma, induciendo el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$ . En contraste, el FcγRIIIb no induce la producción de  $IP_3$ . Sin embargo, se sabe que el FcγRIIIb induce el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$ . No obstante, el mecanismo exacto por el cual el FcγRIIIb induce el  $[Ca^{2+}]_i$ , es desconocido [25; 26]. Por lo tanto, con el fin de abordar esta incógnita, se estimó el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  en neutrófilos pretratados con fura-2-AM. En primer lugar, se estimuló a los neutrófilos con el tripéptido formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLF), un péptido que induce el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  mediado por un receptor acoplado a proteínas G (GPCR) [36]. Se observó el incremento inmediato de la  $[Ca^{2+}]_i$  (Figura 10A). De forma similar, al estimular el FcγRIIa se observó un incremento inmediato en la  $[Ca^{2+}]_i$  (Figura 10B). En contraste, al estimular el FcγRIIIb se observó un retardo de aproximadamente 20 segundos en el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  (Figura 10C). En conjunto, estos datos sugieren que, tanto el FcγRIIa como el FcγRIIIb son capaces de inducir el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Además, en magnitud, el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por los tres estímulos, es igual (Figura 10D). Adicionalmente, como se esperaba, la cinética del incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido tanto por el fMLF como por el FcγRIIa es muy similar, ya que se conoce que ambos receptores inducen la producción de  $IP_3$  en su vía de señalización (Figura 10A y Figura 10B). En contraste, la cinética del incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por el FcγRIIIb es más lento que el inducido tanto por fMLF como por el FcγRIIa. Esto sugiere, que las vías de señalización tanto del FcγRIIa como del FcγRIIIb, para inducir el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$ , son distintas. Sin embargo, aunque existe una diferencia en la cinética del incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducida tanto por el FcγRIIa como por el FcγRIIIb, el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  es de 200 nM aproximadamente, para ambos receptores (Figura 10D).

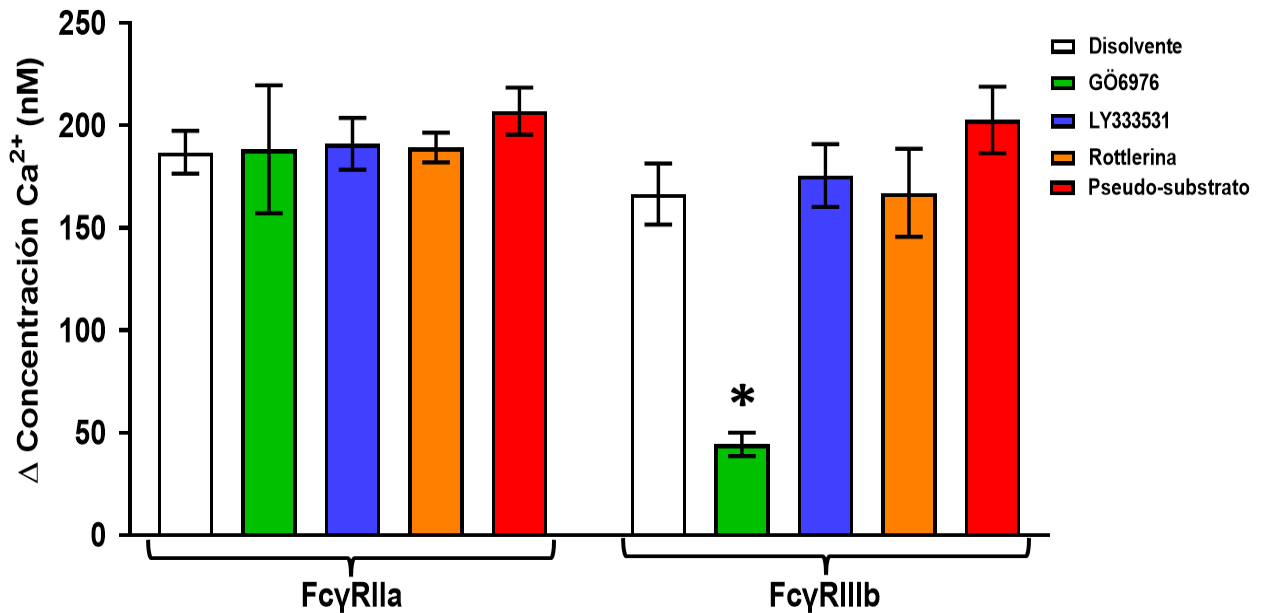


**Figura 10.** Los Fc $\gamma$ R del neutrófilo humano inducen el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ . Los neutrófilos humanos pretratados con Fura-2-AM fueron estimulados con fMLF (A), o por el entrecruzamiento del Fc $\gamma$ RIIa (B), o por el entrecruzamiento Fc $\gamma$ RIIb (C). La flecha indica el momento exacto en el que se agregó el estímulo fMLF (azul), estimulación del Fc $\gamma$ RIIa (rojo) o estimulación del Fc $\gamma$ RIIb (verde). Los cambios en la concentración intracelular de calcio ( $[Ca^{2+}]_i$ ) fueron obtenidos registrando los cambios en la fluorescencia durante 300 s. El trazo es representativo de tres experimentos independientes con resultados similares. El incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  (D) fue calculado utilizando el valor de la concentración máxima menos el valor de la concentración basal de  $Ca^{2+}$ . Los datos son la media  $\pm$  EEM del incremento de la concentración de calcio ( $\Delta [Ca^{2+}]_i$ ) de tres experimentos independientes por duplicado.



## **El incremento de la concentración de calcio intracelular inducido por el FcγRIIIb requiere de la activación de PKCα.**

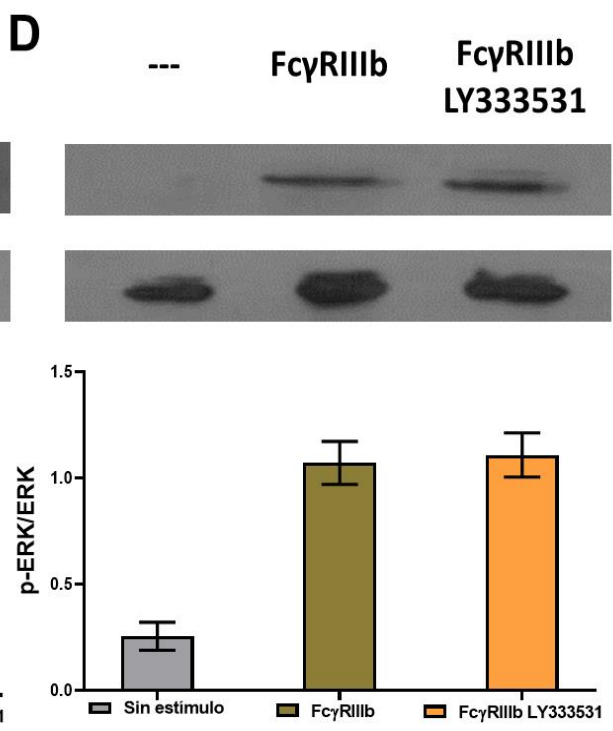
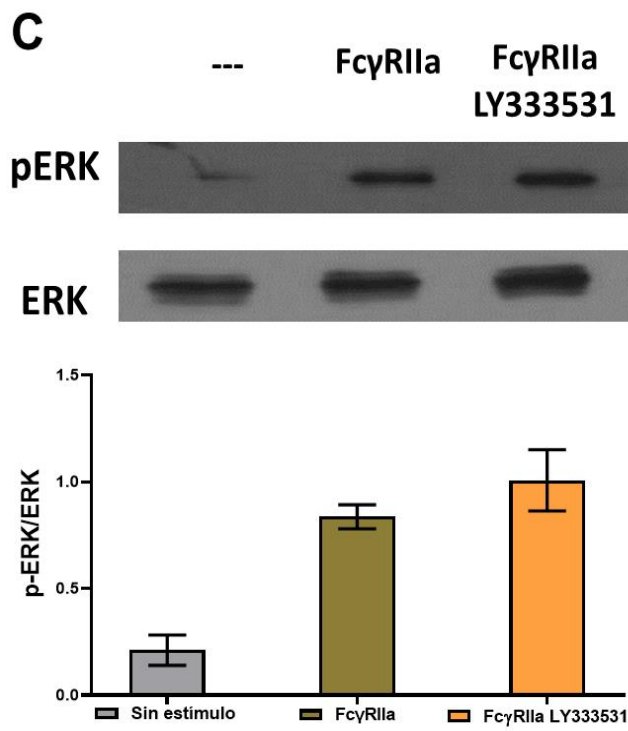
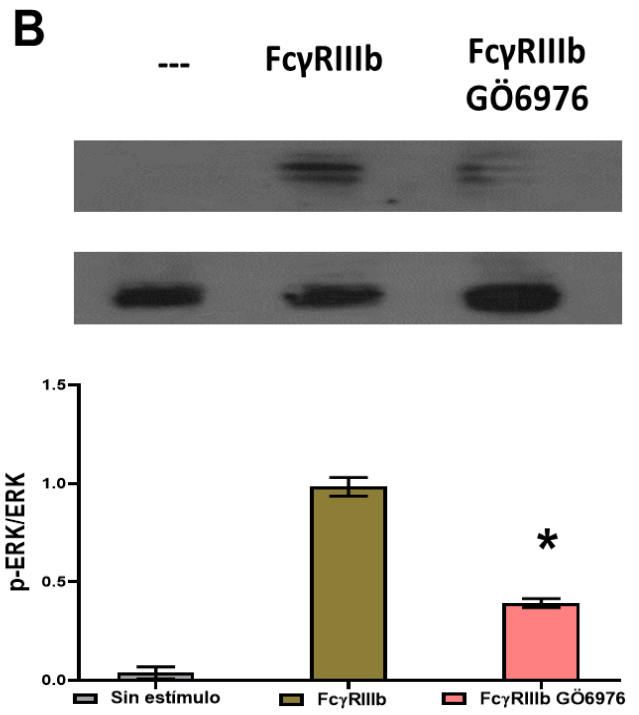
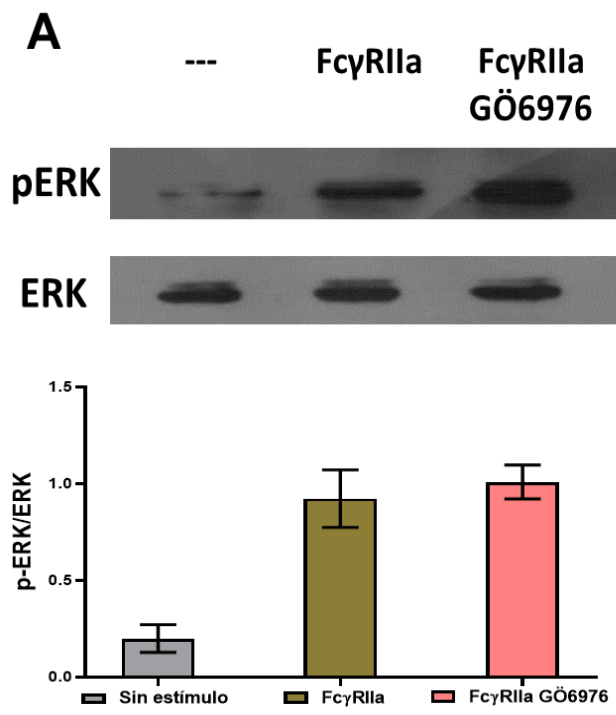
Como se mostró anteriormente, las PKC son necesarias para mediar la producción de ROS inducida por los FcγR en el neutrófilo humano (Figura 9). Además, se ha descrito que los FcγR inducen el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  (Figura 10) [24]. Sin embargo, el mecanismo activado por el cual, cada uno de los FcγR inducen el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  no ha sido descrito del todo. Por otro lado, se ha descrito que la actividad de una gran variedad de canales iónicos puede ser regulada por fosforilaciones en su secuencia de aminoácidos mediadas por múltiples cinasas, incluidas las diferentes isoformas de PKC [37]. Por lo tanto, con el fin de dilucidar la posible participación de las isoformas de PKC que expresa el neutrófilo en el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por los FcγR, se estimuló selectivamente cada uno de los FcγR en el neutrófilo humano, en presencia o ausencia de inhibidores para PKC y se estimó el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$ . En presencia de Gö6976, inhibidor tanto para PKCα como para PKCβ, se observó la disminución del incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  posterior al entrecruzamiento del FcγRIIIb y no al entrecruzamiento del FcγRIIa (Figura 11). En contraste, al entrecruzar tanto el FcγRIIa como el FcγRIIIb en presencia de LY333531, inhibidor de PKCβ, no se observó la disminución del incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  (Figura 11). De forma similar, al entrecruzar tanto el FcγRIIa como el FcγRIIIb en presencia de Rottlerin inhibidor de PKCδ, no se observó la disminución del incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  (Figura 11). Finalmente, al entrecruzar tanto el FcγRIIa como el FcγRIIIb en presencia de pseudo-sustrato inhibidor de PKCζ, no se observó la disminución del incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  (Figura 11). Por lo tanto, en conjuntos estos datos sugieren que el FcγRIIIb, requiere de la activación de PKCα para inducir el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$ . En contraste, tanto el FcγRIIa como el FcγRIIIb no requieren de la activación tanto de PKCβ, PKCδ como de PKCζ para inducir el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  (Figura 11).

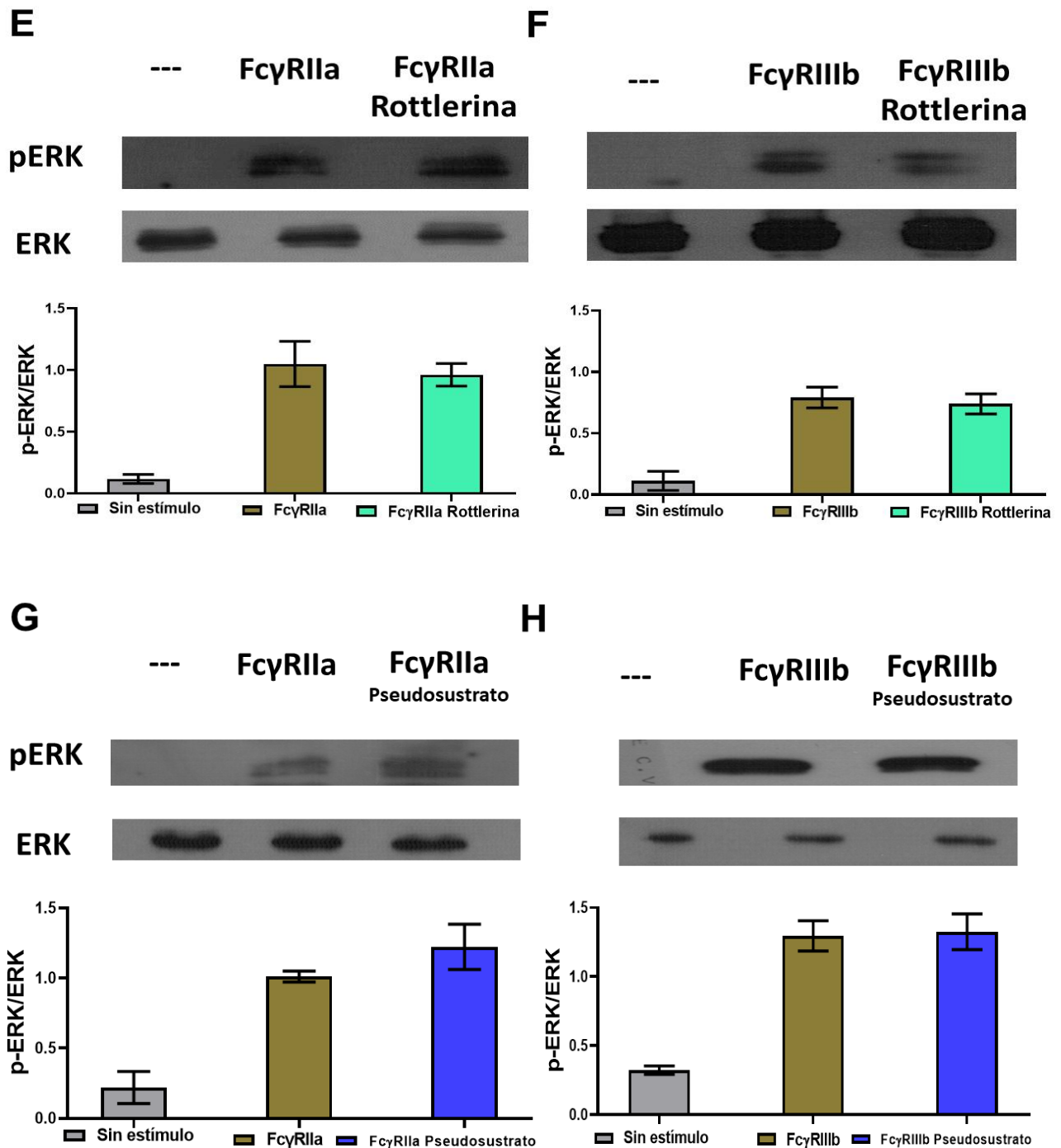


**Figura 11.** El incremento de la concentración de calcio intracelular inducido por el FcγRIIb requiere de la activación de PKCα. El incremento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> se estimó en neutrófilos pretratados con Fura-2-AM. Además, los neutrófilos fueron pretratados con el disolvente, o con 1 μM de Gö6976, inhibidor de PKC α y PKCβ (barra verde), o con 2.5 μM de LY333531, inhibidor de PKCβ (barra azul), o con 3 μM de Rottlerina, inhibidor de PKCδ (barra naranja), o con 10 μM de pseudo-substrato, inhibidor de PKCζ, antes de ser estimulados por el entrecruzamiento del FcγRIIa o por el entrecruzamiento del FcγRIIb. El incremento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> fue calculado utilizando el valor de la concentración máxima, posterior a la estimulación, menos el valor de la concentración basal de Ca<sup>2+</sup>. Los datos son la media ± EEM del Δ[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> de tres experimentos independientes por duplicado. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de ANOVA, seguido de una prueba de Tukey. El asterisco denota la condición en la que existe diferencia estadísticamente significativa respecto al control (*p*<0.001).

### **El FcγRIIIb emplea a PKCα para inducir la fosforilación de ERK.**

Se ha descrito que, otra de las funciones que pueden activar los FcγR del neutrófilo humano es promover la fosforilación de ERK [17; 22; 23]. Sin embargo, el mecanismo exacto no se ha descrito del todo. Además, se ha descrito que en los linfocitos T se requiere de la activación de PKCδ al activarse CD3, para inducir la fosforilación de ERK [31]. Adicionalmente en células Panc-1, se ha demostrado que se requiere la activación de PKCε para inducir la fosforilación de ERK [32]. Por lo tanto, para dilucidar si alguna isoforma de PKC participa en la fosforilación de ERK, posterior a la activación de los FcγR, se estimuló selectivamente tanto el FcγRIIa como el FcγRIIIb y se detectó la fosforilación de ERK por western blot. En presencia del inhibidor GÖ6976 inhibidor de PKCα y PKCβ, se observó una disminución de la fosforilación de ERK inducida por el FcγRIIIb y no por el FcγRIIa (Figura 12A y Figura 12B). Adicionalmente, en presencia del inhibidor LY333531 inhibidor de PKCβ, no se observó una disminución de la fosforilación de ERK inducida tanto por el FcγRIIIb como por el FcγRIIa, lo cual sugiere que ninguno de los FcγR del neutrófilo requiere de la activación de PKCβ para inducir la fosforilación ERK (Figura 12C y Figura 12D). Por otro lado, en presencia del inhibidor rottlerina, inhibidor de PKCδ, no se observó una disminución de la fosforilación de ERK inducida tanto por el FcγRIIIb como por el FcγRIIa, en conjunto estos datos sugieren que ninguno de los FcγR del neutrófilo requiere de la activación de PKCδ para inducir la fosforilación ERK (Figura 12E y Figura 12F). Por último, en presencia del pseudo-sustrato, inhibidor de PKCζ, no se observó una disminución de la fosforilación de ERK inducida tanto por el FcγRIIIb como por el FcγRIIa (Figura 12G y Figura 12H). Por lo tanto, en conjunto estos datos sugieren que, la fosforilación de ERK inducida por el FcγRIIa no requiere de la activación de ninguna isoforma de PKC expresada por el neutrófilo humano. En contraste, la fosforilación de ERK inducida por el FcγRIIIb requiere de la activación de PKCα en los neutrófilos humanos. Lo cual sugiere que las vías de señalización empleadas por cada uno de los FcγR del neutrófilo, para inducir la activación de ERK son distintas.





**Figura 12.** El FcγRIIb emplea a PKCα para inducir la fosforilación de ERK. Los neutrófilos humanos fueron estimulados al entrecruzar tanto el FcγRIIa o bien el FcγRIIb y se prepararon extractos de proteínas totales. Los neutrófilos fueron pretratados con 1 μM de GÖ6976, inhibidor de PKCα y PKCβ (A y B), o con el 2.5 μM LY333531, inhibidor para PKCβ (C y D), o con el rottlerin, inhibidor para PKCδ (E y F), o con el pseudosutrato, inhibidor de PKCζ (G y H). Y se realizó una electroforesis del extracto proteico en un gel de SDS-PAGE. Posteriormente, se efectuó un Western Blot para la forma fosforilada de ERK (panel superior), o para ERK total (panel inferior). Imágenes representativas de tres experimentos independientes. Los histogramas en la parte inferior son el análisis de densitometría para la relación entre pERK/ERK. Los datos son la media ± EEM de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó empleando una prueba *t* de Student. El asterisco denota la condición donde existe diferencia estadísticamente significativa respecto al control. *p*<0.0001 (B).

## Capítulo II

**El FcγRIIIb requiere de la activación del canal TRPM2 para inducir el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  en el neutrófilo humano.**

### **Antecedentes.**

Los datos obtenidos en este trabajo confirmaron que, tanto el FcγRIIa como el FcγRIIIb inducen el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  (Figura 10B y Figura 10C) [24]. Sin embargo, se ha sugerido que el mecanismo para inducir el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  de cada uno de los FcγR en los neutrófilos humanos podría ser distinto. Se ha demostrado que, el FcγRIIa induce la producción de  $IP_3$ , lo que induce la salida de  $Ca^{2+}$  del retículo endoplásmico. En contraste el FcγRIIIb no induce la producción de  $IP_3$ , y el mecanismo por el cual induce el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  no ha sido descrito [25]. Sin embargo, los datos obtenidos en este trabajo, sugieren que el FcγRIIIb requiere de la activación de PKCα para inducir el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  (Figura 11). Además, se sabe que el FcγRIIIb requiere de la activación de Syk, y de la producción de ROS empleando el complejo NADPH-oxidasa para regular sus vías de señalización [17]. Por lo tanto, es posible que el FcγRIIIb requiera de alguna de estas señales para inducir el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Por otro lado, se ha descrito que el canal TRPM2 (Transient Receptor Potential Melastatin 2) es un canal no selectivo para  $Ca^{2+}$  y puede ser expresado por los neutrófilos humanos [38; 39]. El TRPM2 es un canal perteneciente a la familia de los TRP, canales catiónicos que han sido involucrados en la percepción de diferentes estímulos como el calor, frío, el estrés mecánico, los cambios de pH y el estrés oxidativo [40; 41]. Adicionalmente, se ha descrito que, la apertura del canal TRPM2, puede ser directamente inducida por la unión directa con su ligando intracelular la ADPR (adenosine diphosphate ribose) [42]. Además, la apertura del canal TRPM2 puede ser inducida directamente por el estrés oxidativo o la acidificación intracelular [43; 44; 45]. Adicionalmente, se ha descrito que en células neuronales de la raíz del ganglio dorsal, la actividad del canal TRPM2 se incrementa en presencia de PMA, un fuerte activador de PKC [46; 47]. Por lo tanto, ya que la apertura del canal TRPM2 puede ser mediada tanto por la producción de ROS como por la activación de PKC, dos moléculas involucradas en la vía de señalización del FcγRIIIb, es posible que el FcγRIIIb requiera de la activación del canal TRPM2 para inducir el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Para probar esta hipótesis, se estimuló selectivamente cada uno de los FcγR del neutrófilo humano con anticuerpos

monoclonales, en presencia o ausencia de inhibidores para moléculas involucradas en la vía de señalización de los FcγR del neutrófilo humano, y se estimó el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$ .

### **Planteamiento del problema.**

Las vías de señalización activadas por los FcγR en el neutrófilo humano no han sido descritas del todo. Sin embargo, se ha descrito que tanto el FcγRIIIa como el FcγRIIIb inducen el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ . Además, se conoce que el FcγRIIIa y no el FcγRIIIb requiere de la producción de  $IP_3$  para inducir el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ . Además, no se conoce el mecanismo por el cual el FcγRIIIb induce el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Sin embargo, se conoce que el FcγRIIIb induce la activación tanto de PKC como la producción de ROS, dos inductores de la apertura del canal catiónico TRPM2. Por lo tanto, se investigó si el FcγRIIIb requiere de la activación del canal TRPM2 para inducir el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  en el neutrófilo humano.

### **Hipótesis.**

El FcγRIIIb requiere de la activación del canal TRPM2 para inducir el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  en los neutrófilos humanos.

### **Objetivo General.**

Dilucidar si el FcγRIIIb requiere de la activación del canal TRPM2 para inducir el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  en los neutrófilos humanos.

## **Objetivos particulares.**

1. Obtener una población homogénea y pura de neutrófilos humanos.
2. Estimular selectivamente cada uno de los FcγR del neutrófilo humano.
3. Evaluar el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  en presencia o ausencia de inhibidores específicos para el canal TRPM2, posterior al entrecruzamiento selectivo de cada uno de los FcγR en el neutrófilo humano.

## **Materiales y métodos.**

Estimación del incremento de la concentración de calcio intracelular en condiciones quelantes.

El incremento de la concentración de calcio intracelular se estimó detectando los cambios en la fluorescencia de neutrófilos cargados con Fura-2AM (Cata# 344905 Calbiochem/EMD Millipore Billerica, MA, USA). Los neutrófilos se colocaron a una densidad  $1.5 \times 10^6$  neutrófilos por ml en un tubo cónico de plástico de 50 ml en PBS con 1.5 mM de  $Cl_2Ca$  y 1.5 mM de  $Cl_2Mg$  (PBS  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ ) y se incubó durante 5 min a 37 °C. Posteriormente se adiciono Fura-2AM (concentración final 10  $\mu M$ ) y se incubó durante 5 min. Se realizó una dilución con PBS  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  a una relación de 10 veces y se incubó durante 20 min a 37 °C. Se realizó un lavado con PBS  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  a 37 °C. Los neutrófilos se resuspendieron en 6 ml de PBS  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  a 37 °C y se incubó durante 15 min a 37 °C. Se concentraron las células por centrifugación, se retiró el sobrenadante. Los neutrófilos se resuspendieron en 2 ml de una disolución 1 mM de EGTA en PBS (PBS EGTA) tibio a una densidad de  $3 \times 10^6$  y se mantuvo en hielo. Los cambios en la fluorescencia fueron monitoreados utilizando un espectrofluorimetro (Perking Elmer; Waltham, MA, USA), utilizando los filtros de excitación de 340-380 nm y el filtro de emisión de 510 nm. Las mediciones se realizaron en una suspensión de neutrófilos, en agitación constante a 37 °C en un volumen total de 2 ml.

Para la estimulación con fMLF, se colocó una suspensión de  $3 \times 10^6$  neutrófilos cargados con Fura-2AM en 2 ml de PBS EGTA en una cubeta de lectura del espectrofluorimetro, y se incubó a 37 °C



durante 2 min. Después del tiempo de incubación, se comenzó con las lecturas del cambio de fluorescencia durante 100 s. A los 100 s de lectura, se adicionó 40  $\mu$ l, de una disolución 500 nM de fMLF en PBS EGTA (concentración final 10 nM) y los cambios en la fluorescencia fueron registrados durante 300 s. Para la estimulación de Fc $\gamma$ R, 3 x 10<sup>6</sup> neutrófilos cargados con Fura-2AM, se resuspendieron en 100  $\mu$ l de una suspensión del correspondiente anticuerpo anti-FcR, a una concentración de 10  $\mu$ g/ml en PBS y se incubaron a 4 °C durante 20 min. Posteriormente se realizó un lavado con PBS a 4 °C. Los neutrófilos se resuspendieron en 2 ml de PBS EGTA y se transfirieron a una cubeta de lectura del espectrofluorimetro, se incubó a 37 °C durante 2 min. Después del tiempo de incubación, se comenzó con las lecturas del cambio de fluorescencia durante 100 s. A los 100 s de lectura, se adicionó 80  $\mu$ l, de una suspensión 1.3 mg/ml del anticuerpo F(ab')<sub>2</sub> goat anti-mouse IgG (concentración final 52 mg/ml), para la estimulación de los FcR y los cambios en la fluorescencia fueron registrados durante 300 s. Posteriormente, tanto para el estímulo con fMLF como el estímulo a cada uno de los Fc $\gamma$ R, se adicionaron 40  $\mu$ l de una disolución 100 mM de CaCl<sub>2</sub> (concentración final 4 mM) y se continuo con las lecturas hasta los 450 s.

Después de los 450 seg de lectura se realizaron las lecturas de calibración como se describe a continuación. Se adicionaron 100  $\mu$ l de una disolución de Triton X100 al 10 % y se continuo con las lecturas hasta los 500 seg. Este registro, es la fluorescencia máxima de fura-2AM. Después, se agregó 500  $\mu$ l de una disolución de EGTA 250 mM y se continuo con las lecturas hasta los 550 seg. Este registro, es la fluorescencia mínima de fura-2AM. Empleando la lectura máxima y mínima se calculó la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, utilizando el software FL WinLab 4.00.02 (Perkin Elmer; Waltham, MA, USA).

## Producción ROS

La producción de ROS se estimó detectando los cambios en la fluorescencia de neutrófilos cargados con dihidrorodamina-123 (DHR-123 #Cat. AS-85711 Anaspec, Inc Fremont, CA, USA). Se colocaron  $1 \times 10^6$  neutrófilos en un tubo cónico de plástico de 1.5 ml y se resuspendieron en 100  $\mu$ l de una disolución 15  $\mu$ M de DHR-123 en PBS. Se incubó durante 15 min a 37 °C en oscuridad. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó un lavado con 1 ml de PBS frío. Posteriormente, los neutrófilos se resuspendieron en 100  $\mu$ l del correspondiente estímulo, como se describe a continuación. Para la estimulación con el éster de forbol PMA, los neutrófilos se resuspendieron en una disolución 20 nM de PMA en PBS. Se incubó durante 45 min a 37 °C. Para la estimulación de Fc $\gamma$ R, los neutrófilos se resuspendieron en una suspensión del correspondiente anticuerpo anti-Fc $\gamma$ R a 10  $\mu$ g/ml en PBS, y se incubó durante 20 min a 4 °C. Posteriormente, se realizó un lavado con PBS a 4 °C y los neutrófilos se resuspendieron en 100  $\mu$ L de una suspensión del anticuerpo F(ab')<sub>2</sub> goat anti-mouse IgG (Cat# 115-006-003 Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. West Grove, PA, USA). Se incubó durante 45 min a 37 °C. Transcurrido el tiempo de incubación, se adicionó 250  $\mu$ l de PBS a 4 °C y la suspensión celular se mantuvo en hielo durante 2 min. Por último, la suspensión de neutrófilos se centrifugó a 1,743 x g, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de una disolución 1 % de paraformaldehído (PFA) en PBS a 4 °C. La suspensión de neutrófilos se mantuvo a 4 °C y en oscuridad hasta su análisis por citometría de flujo empleando el citómetro de flujo Attune NxT (Thermo Fisher Scientific Carlsbad, CA, USA) con el láser de excitación de 488 nm y el filtro de emisión 530/30. Se realizó la adquisición de 10, 000 eventos por condición. El análisis de los datos se realizó empleando el software FlowJo™ versión 10 (Becton Dickinson; 2019; Ashland, OR, USA) de la unidad de citometría de flujo del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

## Inhibidores farmacológicos.

En algunos experimentos los neutrófilos fueron tratados 30 min con inhibidores farmacológicos, antes de realizar la estimulación. Las concentraciones e inhibidores utilizados se describen en la tabla 3.

Tabla 3. Inhibidores.

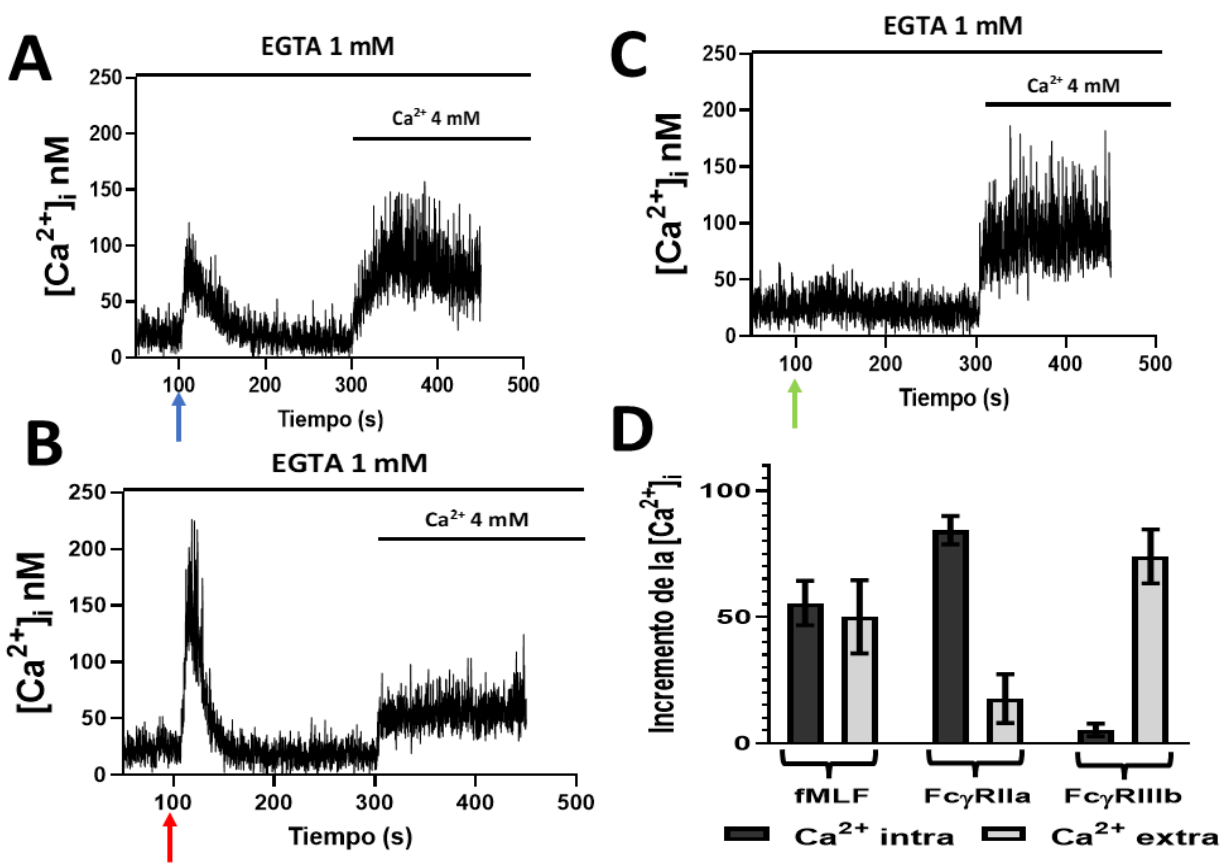
Inhibidor.	Molécula que inhibe.	Concentración	Marca
GÖ6976	PKC $\alpha$ -PKC $\beta$	1 $\mu$ M	Santa Cruz biotechnology
LLZ 1640-2	TAK1	10 nM	Calbiochem
U0126	MEK	50 $\mu$ M	Promega
iSyk	Syk	1 $\mu$ M	Calbiochem
2-APB	TRPM2	5 $\mu$ M	Santa Cruz Biotechnology
Clotrimazol	TRPM2	10 $\mu$ M	Sigma-Aldrich
Toxina Pertussis	Gi	2 $\mu$ g/ml	Calbiochem

## Resultados

Para inducir el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$ , el FcγRIIIb activa la entrada de  $Ca^{2+}$  del medio extracelular.

Como se mostró anteriormente, ambos FcγR del neutrófilo humano inducen el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  (Figura 10B y Figura 10C). Sin embargo, aunque el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por ambos FcγR es similar (Figura 10D), se observó que el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por el FcγRIIIb presentó un retardo de alrededor de entre 15 s a 20 s (Figura 10C). En contraste, el incremento inducido por el FcγRIIa es inmediato (Figura 10C). Lo que sugiere que, el mecanismo para inducir el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  de ambos FcγR es diferente. Por otro lado, se ha establecido que para el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  la célula puede emplear un mecanismo conocido como SOCE (del inglés Store Operated Calcium Entry) o entrada capacitativa de  $Ca^{2+}$  [48; 49]. Cuando una célula recibe un estímulo y el mecanismo SOCE se activa, la célula libera  $Ca^{2+}$  de depósitos internos. Enseguida, se activa un segundo flujo de  $Ca^{2+}$  proveniente del exterior de la célula. Por lo tanto, el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  es la suma del flujo de  $Ca^{2+}$  de depósitos internos y del flujo  $Ca^{2+}$  proveniente del medio extracelular [50]. Además, se ha propuesto que tanto los FcγR como el fMLF emplean el mecanismo SOCE para inducir el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  [51; 52]. Con el fin de comprobar esta idea, los neutrófilos humanos se colocaron en un medio libre de  $Ca^{2+}$  y fueron estimulados con fMLF. Como se esperaba, se observó un incremento inicial en la  $[Ca^{2+}]_i$ , seguido de un retorno a condiciones basales (Figura 13A). Posteriormente, se agregó un exceso de  $Ca^{2+}$  al medio y se observó un segundo incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  (Figura 13A). Lo que indica que se produce un flujo de  $Ca^{2+}$  del exterior al interior de la célula. De forma similar, al estimular el FcγRIIa se observó un incremento inicial en la  $[Ca^{2+}]_i$ , seguido de un retorno a condiciones basales (Figura 13B). Posteriormente, se agregó un exceso de  $Ca^{2+}$  al medio y se observó un segundo incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  (Figura 13B). En contraste, al estimular el FcγRIIIb, no se observó un incremento inicial en la  $[Ca^{2+}]_i$  (Figura 13C). Sin embargo, al agregar un exceso de  $Ca^{2+}$  al medio, se observó el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  (Figura 13C). Esto sugiere que el FcγRIIIb, no induce la movilización de  $Ca^{2+}$  de depósitos internos. En contraste, tanto el fMLF como el FcγRIIa inducen el flujo de  $Ca^{2+}$  tanto de depósitos internos como del exterior de la célula. Además, después de la estimulación con fMLF la magnitud tanto del flujo  $Ca^{2+}$  proveniente del interior de la célula como del flujo de  $Ca^{2+}$  proveniente del exterior de la célula es similar (Figura 13D). Cada componente es alrededor del cincuenta por ciento del incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  observado en neutrófilos que se mantuvieron en PBS con  $Ca^{2+}$  (Figura 10D). Por otro lado, al estimular el FcγRIIa, la magnitud del flujo

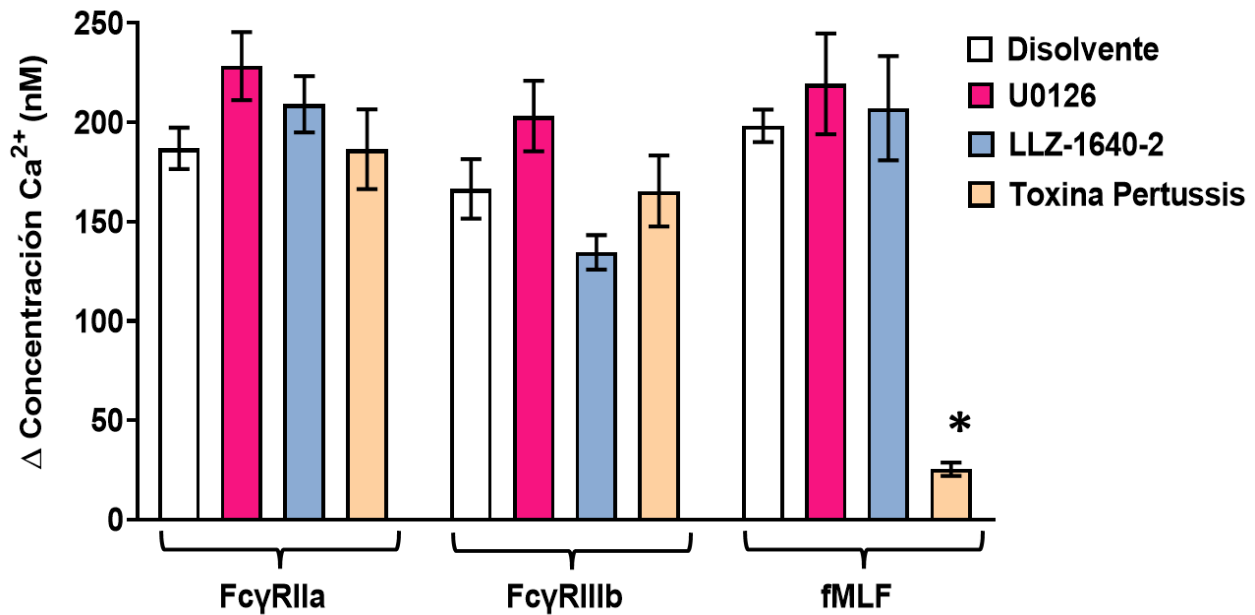
de  $\text{Ca}^{2+}$  del interior de la célula es mayor que el inducido por fMLF (Figura 13D). Además, la magnitud del flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  del exterior de la célula es menor que el inducido por fMLF (Figura 13D). Lo cual sugiere que el componente de  $\text{Ca}^{2+}$  principal, que es requerido por la estimulación del  $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$  es el componente interno (Figura 13D). En contraste, al estimular el  $\text{Fc}\gamma\text{RIIIb}$  no se observó el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  de depósitos internos. Por el contrario, el incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inducida por el  $\text{Fc}\gamma\text{RIIIb}$  proviene casi en su totalidad del flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  del exterior de la célula (Figura 13D). Por lo tanto, en conjunto mis datos sugieren que, el  $\text{Fc}\gamma\text{RIIIb}$  activa un mecanismo diferente a los demás  $\text{Fc}\gamma\text{R}$ , para inducir el incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .



**Figura 13.** El  $\text{Fc}\gamma\text{RIIIb}$  inducen la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  del medio extracelular. (A-C) Los neutrófilos pretratados con Fura-2AM, se resuspendieron en PBS que contenía 1 mM de EGTA, los cambios en la fluorescencia fueron detectados posterior a la estimulación con (A) 10 nM de fMLF (flecha azul), o por (B) la estimulación del  $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$  (flecha roja), o por (C) la estimulación del  $\text{Fc}\gamma\text{RIIIb}$  (flecha verde). Después de 300 seg de lectura se adicionó 4 mM de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  y se continuo con las lecturas hasta los 450 seg. Las flechas indican el momento en el que se realizó el estímulo. Los trazos son representativos de tres experimentos independientes con resultados similares. (D) El incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  se calculó utilizando el valor de la concentración máxima, posterior a la estimulación, menos el valor de la concentración basal de  $\text{Ca}^{2+}$ . El incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inicial, representa el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  de depósitos internos. Mientras que, el incremento posterior a la adición de 4 mM de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ , representa el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  del medio extracelular al interior de la célula. Los datos son la media  $\pm$  EEM de tres experimentos independientes.

## **El incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por el Fc $\gamma$ RIIIb no requiere de la activación tanto de TAK1 como de MEK.**

Como se mostró anteriormente, los resultados sugieren que el Fc $\gamma$ RIIIb requiere un mecanismo distinto al del Fc $\gamma$ RIIa para inducir el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  (Figura 11 y Figura 13). Además, se había descrito que en neutrófilos humanos el Fc $\gamma$ RIIIb activa tanto a TAK1 como a MEK [17; 23]. Por lo tanto, existía la posibilidad de que tanto TAK1 como MEK participaran en el mecanismo activado por el Fc $\gamma$ RIIIb para inducir el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  en el neutrófilo. Con el fin de probar esta hipótesis, los neutrófilos fueron pretratados con LLZ-1640-2, inhibidor de TAK1, o con U0126, inhibidor de MEK y posteriormente se estimuló selectivamente cada uno de los Fc $\gamma$ R del neutrófilo humano. En presencia de LLZ-1640-2, no se disminuyó el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido tanto por el Fc $\gamma$ RIIa como por el Fc $\gamma$ RIIIb (Figura 14). Igualmente, en presencia de U0126, no se disminuyó el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido tanto por el Fc $\gamma$ RIIa como por el Fc $\gamma$ RIIIb (Figura 14). Además, como se esperaba en presencia tanto de LLZ-1640-2 como de U0126, no se observó la disminución del incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por fMLF (Figura 14). Por otro lado, se sabe que el receptor para fMLF es un GPCR, además se ha descrito que un fuerte inhibidor del receptor de fMLF es la toxina Pertussis [36; 53]. Como era esperado, en presencia de toxina Pertussis, el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por fMLF disminuyó casi totalmente (Figura 14). En contraste, en presencia de toxina Pertussis, no se afectó el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido tanto por el Fc $\gamma$ RIIa como por el Fc $\gamma$ RIIIb (Figura 14). Por lo tanto, estos datos sugieren que tanto TAK1 como MEK, no son moléculas requeridas para mediar el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por el Fc $\gamma$ RIIa o por el Fc $\gamma$ RIIIb. Adicionalmente, se confirmó que los Fc $\gamma$ R del neutrófilo humano no son receptores que estén acoplados a proteínas Gi, para mediar su vía de señalización.

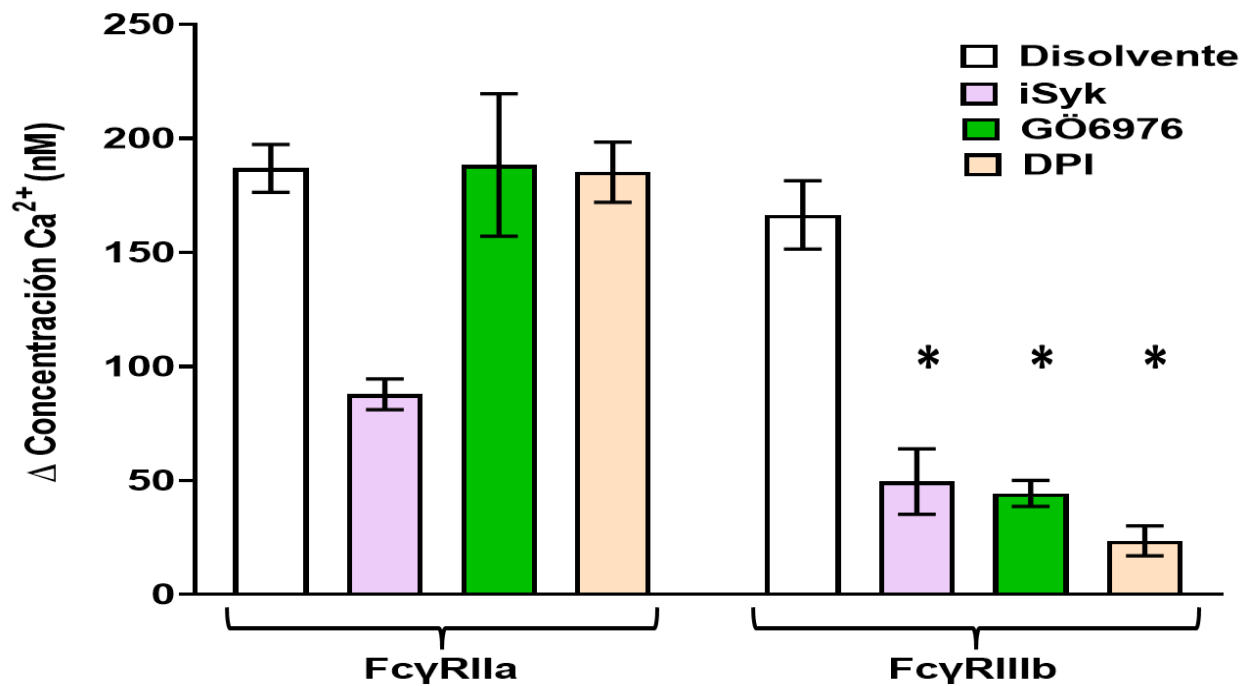


**Figura 14.** El incremento de la concentración de calcio intracelular inducido por los FcγR no requiere de la activación de MEK, TAK y de proteínas G. El incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  se estimó en neutrófilos pretratados con Fura-2-AM. Además, los neutrófilos fueron pretratados con el disolvente, o con 50  $\mu$ M de UO126, inhibidor de MEK (barra fucsia), o con 10 nM de LLZ-1640-2, inhibidor de TAK1 (barra azul), o con 2  $\mu$ g/ml de Toxina pertussis, inhibidor de proteínas G (barra rosa), antes de ser estimulados por el entrecruzamiento del FcγRIIa o por el entrecruzamiento del FcγRIIIb. El incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  fue calculado utilizando el valor de la concentración máxima, posterior a la estimulación, menos el valor de la concentración basal de  $Ca^{2+}$ . Los datos son la media  $\pm$  EEM del  $\Delta[Ca^{2+}]_i$  de tres experimentos independientes por duplicado. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de ANOVA, seguido de una prueba de Tukey. El asterisco denota la condición en la que existe diferencia estadísticamente significativa respecto al control ( $p < 0.001$ ).

**El FcγRIIIb requiere de la activación de Syk, PKCα y del complejo NADPH-oxidasa, para inducir el incremento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en el neutrófilo humano.**

Se ha reportado que el FcγRIIIb requiere de la activación de Syk y del complejo NADPH-oxidasa, para mediar su vía de señalización [17; 23]. Por lo tanto, se evaluó la posibilidad de que estas moléculas participen en el mecanismo activado por el FcγRIIIb, para inducir el incremento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en el neutrófilo humano. En presencia de iSyk, inhibidor de Syk, el incremento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> disminuyó tanto al estimular el FcγRIIa como el FcγRIIIb (Figura 15). Por otro lado, en presencia de DPI, inhibidor del complejo NADPH-oxidasa, se observó la disminución del incremento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> inducido por el FcγRIIIb y no por el FcγRIIa (Figura 15). Por último, como se había mostrado anteriormente, en presencia del inhibidor GÖ 6976, inhibidor de PKCα y PKCβ, se disminuyó el incremento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> inducido por el FcγRIIIb y no por el FcγRIIa (Figura 11 y Figura 15). En conjunto estos datos sugieren que tanto el FcγRIIa como el FcγRIIIb requieren de la activación de Syk para inducir el incremento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Además, el FcγRIIIb requiere de la activación tanto de PKCα y del complejo NADPH-oxidasa para inducir el incremento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en el neutrófilo humano.

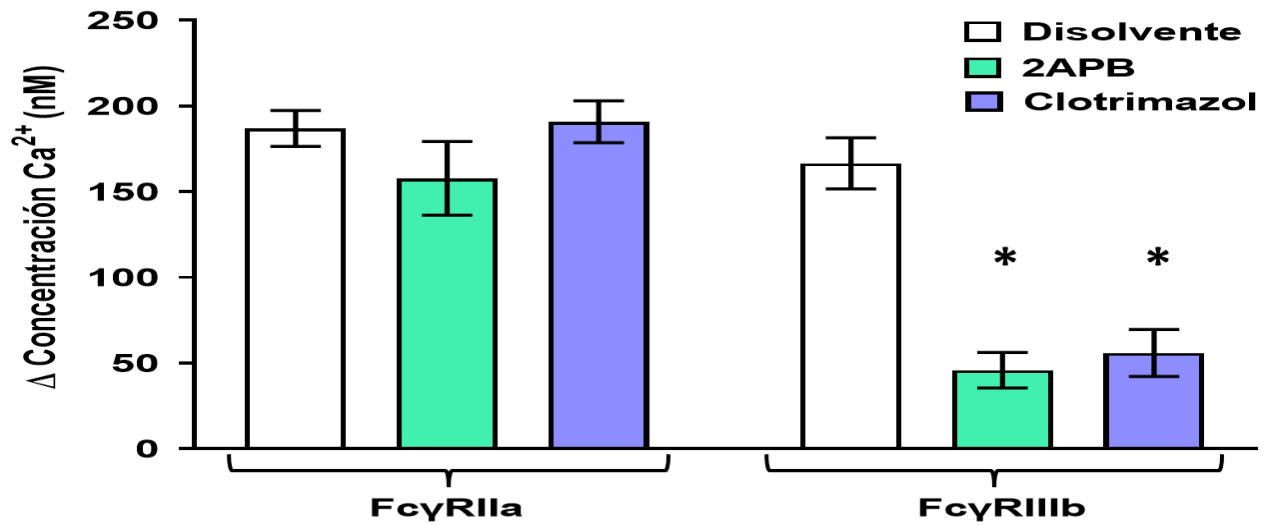




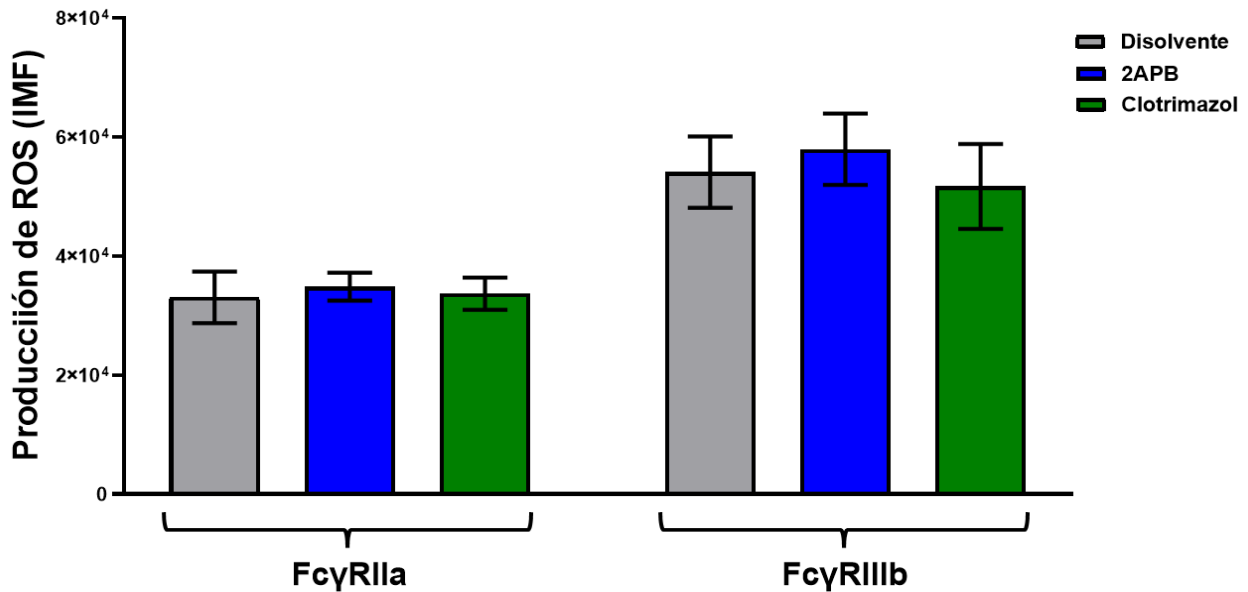
**Figura 15.** El incremento de la concentración de calcio intracelular inducido por el FcγRIIIb requiere de la activación de Syk, PKCα y el complejo NADPH-oxidasa. El incremento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> se estimó en neutrófilos pretratados con Fura-2-AM. Además, los neutrófilos fueron pretratados con el disolvente, o con 1 μM de iSyk, inhibidor de Syk (barra purpura), o con 1 μM de Gö6976, inhibidor de PKC α y PKCβ (barra verde), o con 10 μM de DPI, inhibidor del complejo NADPH-oxidasa (barra rosa), antes de ser estimulados por el entrecruzamiento del FcγRIIa o por el entrecruzamiento del FcγRIIIb. El incremento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> fue calculado utilizando el valor de la concentración máxima, posterior a la estimulación, menos el valor de la concentración basal de Ca<sup>2+</sup>. Los datos son la media ± EEM del Δ[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> de tres experimentos independientes por duplicado. El asterisco denota la condición en la que existe diferencia estadísticamente significativa respecto al control

## **El canal TRPM2 participa en el mecanismo activado por el FcγRIIIb para inducir el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en el neutrófilo humano.**

Como se mostró anteriormente el FcγRIIIb requiere tanto la activación del complejo NADPH-oxidasa como de la activación de PKCα para inducir el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  (Figura 11 y Figura 15). Por otro lado, se ha descrito que los neutrófilos pueden expresar al canal TRPM2 [38; 39]. El TRPM2 es un canal catiónico y se sabe que en células del sistema inmune la apertura del canal TRPM2 puede ser inducida directamente por la producción de ROS [43; 44]. Adicionalmente, se ha descrito que, en células neuronales de la raíz del ganglio dorsal, la actividad del canal TRPM2 se incrementa en presencia de PMA, un fuerte activador de PKC [46; 47]. Por lo tanto, se evaluó si el canal TRPM2 está involucrado en el mecanismo activado por el FcγRIIIb para inducir el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$ . El incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por cada uno de los FcγR del neutrófilo humano, fue estimado en presencia de 2-APB o clotrimazol, dos inhibidores del canal TRPM2. El incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por el FcγRIIa no disminuyó en presencia tanto de 2-APB como de clotrimazol (Figura 16). En contraste, el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por el FcγRIIIb disminuyó en presencia tanto de 2-APB como de clotrimazol (Figura 16). Por lo tanto, en conjunto mis datos sugieren que el FcγRIIIb requiere de la activación del canal TRPM2 para inducir el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  en el neutrófilo humano. Además, con la finalidad de estimar que evento ocurre primero, si la producción de ROS o el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$ , se estimó la producción de ROS en presencia o ausencia tanto de 2-APB como de clotrimazol posterior al estímulo de cada uno de los FcγR del neutrófilo humano. La producción de ROS mediada tanto por el FcγRIIa como por el FcγRIIIb no disminuyó en presencia tanto de 2-APB como de clotrimazol (Figura 17). Por lo tanto, los datos sugieren que no se requiere de la activación del canal TRPM2 para inducir la producción de ROS posterior al estímulo del FcγRIIIb. Además, como se demostró anteriormente, el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por el FcγRIIIb requiere de la activación del complejo NADPH-oxidasa (Figura 15). Por lo tanto, estos datos sugieren que el FcγRIIIb, primero induce la activación del complejo NADPH-oxidasa seguido de la activación del canal TRPM2 para mediar el flujo de  $Ca^{2+}$  al interior del neutrófilo o bien podrían ser eventos independientes.



**Figura 16.** El incremento de la concentración de calcio intracelular inducido por el FcγRIIb requiere de la activación del canal TRPM2. El incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  se estimó en neutrófilos pretratados con Fura-2-AM. Además, los neutrófilos fueron pretratados con el disolvente (barra blanca), o con 5  $\mu$ M de 2APB (barra verde) o con 1  $\mu$ M de clotrimazol (barra azul), ambos inhibidores del canal TRPM2, antes de ser estimulados por el entrecruzamiento del FcγRIIa o por el entrecruzamiento del FcγRIIb. El incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  fue calculado utilizando el valor de la concentración máxima, posterior a la estimulación, menos el valor de la concentración basal de  $Ca^{2+}$ . Los datos son la media  $\pm$  EEM del  $\Delta[Ca^{2+}]_i$  de tres experimentos independientes por duplicado. El asterisco denota la condición en la que existe diferencia estadísticamente significativa respecto al control ( $p < 0.001$ ).



**Figura 17.** La producción de ROS inducida por los FcγR del neutrófilo humano, no requiere de la activación del canal TRPM2. La producción de ROS se estimó en neutrófilos pretratados con DHR 123. Además, los neutrófilos fueron pretratados con el disolvente (barra gris), o con 5  $\mu$ M de 2APB (barra azul) o con 1  $\mu$ M de clotrimazol (barra verde), ambos inhibidores del canal TRPM2, antes de ser estimulados por el entrecruzamiento del FcγRIIa o por el entrecruzamiento del FcγRIIb. Los datos son la media  $\pm$  EEM de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de cuatro experimentos independientes.



# The Antibody Receptor Fc Gamma Receptor IIIb Induces Calcium Entry via Transient Receptor Potential Melastatin 2 in Human Neutrophils

Omar Rafael Alemán, Nancy Mora and Carlos Rosales\*

Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Sonja Vermeren,  
University of Edinburgh,  
United Kingdom

### Reviewed by:

Lin-Hua Jiang,  
University of Leeds,  
United Kingdom  
Llewelyn Roderick,  
KU Leuven, Belgium  
Maurice Bartlett Hallett,  
Cardiff University,  
United Kingdom

### \*Correspondence:

Carlos Rosales  
carosal@unam.mx

### Specialty section:

This article was submitted to  
Molecular Innate Immunity,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

**Received:** 22 January 2021

**Accepted:** 23 April 2021

**Published:** 13 May 2021

### Citation:

Alemán OR, Mora N and Rosales C  
(2021) The Antibody Receptor Fc  
Gamma Receptor IIIb Induces Calcium  
Entry via Transient Receptor Potential  
Melastatin 2 in Human Neutrophils.  
*Front. Immunol.* 12:657393.  
doi: 10.3389/fimmu.2021.657393

Human neutrophils express two unique antibody receptors for IgG, the Fc $\gamma$ R1a and the Fc $\gamma$ R11b. Fc $\gamma$ R1a contains an immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) sequence within its cytoplasmic tail, which is important for initiating signaling. In contrast, Fc $\gamma$ R11b is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked receptor with no cytoplasmic tail. Although, the initial signaling mechanism for Fc $\gamma$ R11b remains unknown, it is clear that both receptors are capable of initiating distinct neutrophil cellular functions. For example, Fc $\gamma$ R1a is known to induce an increase in L-selectin expression and efficient phagocytosis, while Fc $\gamma$ R11b does not promote these responses. In contrast, Fc $\gamma$ R11b has been reported to induce actin polymerization, activation of  $\beta$ 1 integrins, and formation of neutrophils extracellular traps (NET) much more efficiently than Fc $\gamma$ R1a. Another function where these receptors seem to act differently is the increase of cytoplasmic calcium concentration. It has been known for a long time that Fc $\gamma$ R1a induces production of inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>) to release calcium from intracellular stores, while Fc $\gamma$ R11b does not use this phospholipid. Thus, the mechanism for Fc $\gamma$ R11b-mediated calcium rise remains unknown. Transient Receptor Potential Melastatin 2 (TRPM2) is a calcium permeable channel expressed in many cell types including vascular smooth cells, endothelial cells and leukocytes. TRPM2 can be activated by protein kinase C (PKC) and by oxidative stress. Because we previously found that Fc $\gamma$ R11b stimulation leading to NET formation involves PKC activation and reactive oxygen species (ROS) production, in this report we explored whether TRPM2 is activated *via* Fc $\gamma$ R11b and mediates calcium rise in human neutrophils. Calcium rise was monitored after Fc $\gamma$  receptors were stimulated by specific monoclonal antibodies in Fura-2-loaded neutrophils. The bacterial peptide fMLF and Fc $\gamma$ R1a induced a calcium rise coming initially from internal pools. In contrast, Fc $\gamma$ R11b caused a calcium rise by inducing calcium entry from the extracellular medium. In addition, in the presence of 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) or of clotrimazole, two inhibitors of TRPM2, Fc $\gamma$ R11b-induced calcium rise was blocked. fMLF- or Fc $\gamma$ R1a-induced calcium rise was not affected by these inhibitors. These data suggest for the first time that Fc $\gamma$ R11b

aggregation activates TRPM2, to induce an increase in cytoplasmic calcium concentration through calcium internalization in human neutrophils.

**Keywords:** neutrophil, Fc gamma receptor, calcium, reactive oxygen species, PKC (protein kinase C), TRPM2 cation channel

## INTRODUCTION

Neutrophils, the most abundant leukocytes in peripheral blood, are considered the first line of defense because these cells arrive first at sites of inflammation or infection (1, 2). Once there, neutrophils display a variety of antimicrobial functions including phagocytosis (3, 4), degranulation, and formation of neutrophil extracellular traps (NET) (5). These functions can be initiated or enhanced by antibodies, in the form of immune complexes, binding to their cognate Fc receptors on the surface of the neutrophil (6). Human neutrophils express constitutively two Fc receptors for IgG, the FcγRIIa (CD32a) and the FcγRIIIb (CD16b). FcγRIIa contains an ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) sequence in its cytoplasmic tail (7), while FcγRIIIb is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked receptor, lacking a cytoplasmic tail (8). These two neutrophil antibody receptors are not only structurally different but also have been shown to induce unique cellular responses (9). FcγRIIa is the predominant Fcγ receptor mediating phagocytosis, while the contribution of FcγRIIIb to this response is minimal (10). In contrast, FcγRIIIb signaling to the neutrophil nucleus for nuclear factor activation is more efficient than FcγRIIa signaling (11). In addition, FcγRIIIb is the only Fcγ receptor capable of inducing NET formation (12, 13). Although, these reports indicate that each receptor can activate particular cell responses, the signaling capabilities of each receptor are still incompletely understood.

Early reports clearly showed that both neutrophil Fcγ receptors induce an increase in cytoplasmic  $Ca^{2+}$  concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) (14, 15). However, the mechanism for this response seems to be different for each receptor (15). FcγRIIa signals *via* its ITAM sequence to activate Syk (spleen tyrosine kinase). Syk then phosphorylates enzymes such as PI 3-K (phosphatidylinositol 3-kinase) and PLCγ (phospholipase Cγ). PLCγ produces inositoltriphosphate ( $IP_3$ ), and diacylglycerol (DAG). These second messengers cause calcium release from the endoplasmic reticulum (ER), and activation of PKC (protein kinase C), respectively (8, 16, 17). In sharp contrast, FcγRIIIb-mediated increase in  $[Ca^{2+}]_i$  does not involve  $IP_3$  formation (15), and the mechanism used by FcγRIIIb to increase  $[Ca^{2+}]_i$  is still unknown. Because FcγRIIIb is a GPI-linked receptor lacking a cytoplasmic tail and with no other subunits known to associate with it, its signaling mechanism is only partially described. Recently, it was reported that the signal pathway, activated by FcγRIIIb leading to NET formation, involves Syk, TAK1 (transforming growth factor-β-activated kinase 1), the MEK (ERK kinase)/ERK (extracellular signal-regulated kinase) cascade, activation of PKC, and activation of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-oxidase complex, which produce reactive oxygen species (ROS) (18). Therefore, it is possible that

FcγRIIIb uses some of these signaling molecules to induce an increase in  $[Ca^{2+}]_i$ .

Transient Receptor Potential Melastatin 2 (TRPM2), a nonselective  $Ca^{2+}$ -permeable membrane cation channel, is highly expressed in myeloid cells (19, 20). This receptor is a member of the TRP family of cation-selective channels that are weakly voltage-sensitive and diversely opened by temperature, mechanical force, pH, and oxidative stress (21, 22). TRPM2 can be opened through directly binding with intracellular adenosine diphosphate ribose (ADPR) (23) and can also be indirectly activated under conditions of oxidative stress (24, 25), acidification (26), and elevated intracellular  $Ca^{2+}$  (27). Additionally, in dorsal root ganglion neurons, the activity of TRPM2 is increased by the addition of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) which leads to activation of PKC (28, 29). Thus, because TRPM2 can be activated by ROS and PKC, two of the second messengers involved in the signaling pathway from FcγRIIIb leading to NET formation (18), it is possible that TRPM2 is used by FcγRIIIb to induce an increase in  $[Ca^{2+}]_i$ . In order to test this hypothesis, both FcγRIIa and FcγRIIIb were stimulated by specific monoclonal antibodies, and the increase in  $[Ca^{2+}]_i$  was measured in the presence or absence of pharmacological inhibitors. The neutrophil chemoattractant fMLF (N-formyl-methionil-leucyl-phenylalanine), and also FcγRIIa induced a rapid increase in  $[Ca^{2+}]_i$ . FcγRIIIb aggregation also induced an increase in  $[Ca^{2+}]_i$ , but this increase was delayed by several seconds. Despite both, FcγRIIa and FcγRIIIb aggregation-induced ROS production, in the presence of diphenyleneiodonium chloride (DPI), an inhibitor of the NADPH-oxidase complex (30), only the FcγRIIIb-induced increase in  $[Ca^{2+}]_i$  was reduced. Similarly, in the presence of Gö6976, an inhibitor of PKC (31, 32), only FcγRIIIb-induced increase in  $[Ca^{2+}]_i$  was reduced. In addition, 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) (33–35) and clotrimazole (36–39), inhibitors of TRPM2, reduced FcγRIIIb-induced, but not FcγRIIa-induced increase in  $[Ca^{2+}]_i$ . These data show for the first time that FcγRIIIb aggregation activates TRPM2 *via* PKC and ROS for inducing an increase in  $[Ca^{2+}]_i$  in human neutrophils.

## MATERIALS AND METHODS

### Neutrophils

Neutrophils were purified from heparinized peripheral blood collected from adult healthy volunteers following a protocol previously approved by the Bioethics Committee at Instituto de Investigaciones Biomédicas – Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Neutrophils were purified exactly as previously described (40).

## Reagents

Bovine serum albumin (BSA) was from F. Hoffmann-La Roche Ltd. (Mannheim, Germany). Gö6976, a PKC inhibitor (catalog number sc-221684); antibiotic (5Z)-7-Oxozeaenol (LLZ 1640-2), a TAK1 inhibitor (catalog number sc-202055); and 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB), a TRPM2 inhibitor (catalog number sc-201487) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). 3-(1-methyl-1H-indol-3-yl-methylene)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indole-5-sulfonamide (iSyk), a spleen tyrosine kinase (Syk) inhibitor (catalog number 574711); and fura-2-AM, a calcium indicator (catalog number 344905) were from Calbiochem/EMD Millipore (Billerica, MA, USA). UO126, a MEK inhibitor (catalog number V112A), was from Promega (Madison, WI, USA). Dihydrorhodamine123 (DHR-123) a ROS indicator (catalog number AS-85711), was from Anaspec, Inc (Fremont, CA, USA). The cOmplete™ protease inhibitor cocktail (catalog no. 11697498001) and PhosSTOP™ phosphatase inhibitor cocktail (catalog no. 04906845001) were from Roche Diagnostics (Basel, Switzerland). Diphenylethidium chloride (DPI), an NADPH-oxidase inhibitor (catalog number 300260); phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), a PKC activator (catalog number P8139); N-formyl-Met-Leu-Phe (fMLF), a potent chemotactic peptide (catalog number F6632); pertussis toxin, a G protein-coupled receptor inhibitor (41, 42) (catalog number 516560), clotrimazole, a TRPM2 inhibitor (catalog number C6019), and all other chemicals were from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

The following antibodies were used: anti-human FcγRIIa (CD32a) mAb IV.3 (43) (ATCC® HB-217) was from American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Anti-human FcγRIIIb (CD16b) mAb 3G8 (44) was donated by Dr. Eric J. Brown (University of California in San Francisco, San Francisco, CA, USA). F(ab')<sub>2</sub> goat anti-mouse IgG (catalog number 115-006-003) was from Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. (West Grove, PA, USA).

## Fluorescent Calcium Measurements

Increase of cytosolic calcium concentration was measured by detecting fluorescence changes in neutrophils loaded with Fura 2-AM as previously described (45, 46). Briefly, neutrophils were loaded with 10 μM Fura-2, washed, and resuspended ( $1.5 \times 10^6$  cell/ml) in PBS with 1.5 mM Ca<sup>2+</sup> and 1.5 mM Mg<sup>2+</sup> and kept on ice. Then, fluorescent changes of a 2-ml stirred neutrophil suspension kept at 37°C were monitored with a LS55 spectrofluorimeter (Perking Elmer; Waltham, MA, USA), using 340 and 380 nm excitation wavelengths and 510 nm emission wavelength. Calcium concentrations were calculated as described by Gryniewicz et al. (47), using the software FL WinLab 4.00.02 (Perking Elmer; Waltham, MA, USA).

For fMLF stimulation,  $3 \times 10^6$  Fura-2-loaded neutrophils in 2 ml of PBS with Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> were placed in a spectrofluorimeter cuvette and incubated at 37°C for 2 min. After that, fluorescence changes were recorded for 100 s, then 40 μl of 500 nM fMLF were added (final concentration of 10 nM). For FcγR stimulation,  $3 \times 10^6$  Fura-2-loaded neutrophils were

first resuspended in 100 μl PBS containing 10 μg/ml of the corresponding anti-FcγR antibody, and incubated on ice for 20 min. After one wash in cold PBS, neutrophils were resuspended in 2 ml PBS with Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> and transferred to a spectrofluorimeter cuvette. Fluorescence changes were recorded for 100 s, and then 80 μl of 1.3 mg/ml F(ab')<sub>2</sub> goat anti-mouse IgG (final concentration 52 μg/ml) were added to aggregate the receptors.

In some experiments, Fura-2-loaded neutrophils were resuspended in 2 ml PBS containing 1 mM of EGTA and fluorescence changes detected after various stimuli for 300 s. Then, 40 μl of 100 mM CaCl<sub>2</sub> (final concentration 4 mM) were added, and measurements continued until 450 s. Also, in some experiments, neutrophils were incubated for 30 min before stimulation, with the inhibitors LLZ 1640-2 (10 nM), UO126 (50 μM), iSyk (1 μM), DPI (10 μM), Gö6976 (1 μM), 2-APB (5 μM), clotrimazole (10 μM), or the vehicle dimethyl sulfoxide (DMSO) alone. For Pertussis toxin (2 μg/ml), neutrophils were incubated for 75 min before stimulation.

## Measurement of Reactive Oxygen Species (ROS)

ROS production was assessed by detecting fluorescence changes in neutrophils loaded with dihydrorhodamine 123 (DHR-123). Neutrophils ( $1 \times 10^6$ ) were resuspended in 100 μl of 15 μM DHR-123 in PBS and incubated for 15 min at 37°C in the dark. Neutrophils were washed with 1 ml PBS, and then resuspended in 100 μl of PBS with the corresponding stimulus as follows. For PMA, neutrophils were resuspended in PBS containing 20 nM of PMA, and then incubated at 37°C in the dark for 45 min. For FcγR stimulation, neutrophils were resuspended in PBS containing 10 μg/ml of the corresponding anti-FcγR antibody, and incubated on ice for 20 min. Next, neutrophils were washed in cold PBS, resuspended in 100 μl of PBS containing 10 μg/ml F(ab')<sub>2</sub> goat anti-mouse IgG, and incubated at 37°C in the dark for 45 min. After incubation, 250 μl cold PBS were added and cells kept on ice for 2 min. Finally, neutrophils were centrifuged and resuspended in 1% paraformaldehyde in PBS at 4°C. Neutrophils were stored cold in the dark until analyzed by flow cytometry using an Attune NxT Flow Cytometer (Thermo Fisher Scientific), with the 485 nm (excitation) and 520 nm (emission) filters. Neutrophils were gated by dot-plot analysis and 10,000 cells were acquired per sample. Data analysis was performed using the Flowjo X software (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA).

## Statistical Analysis

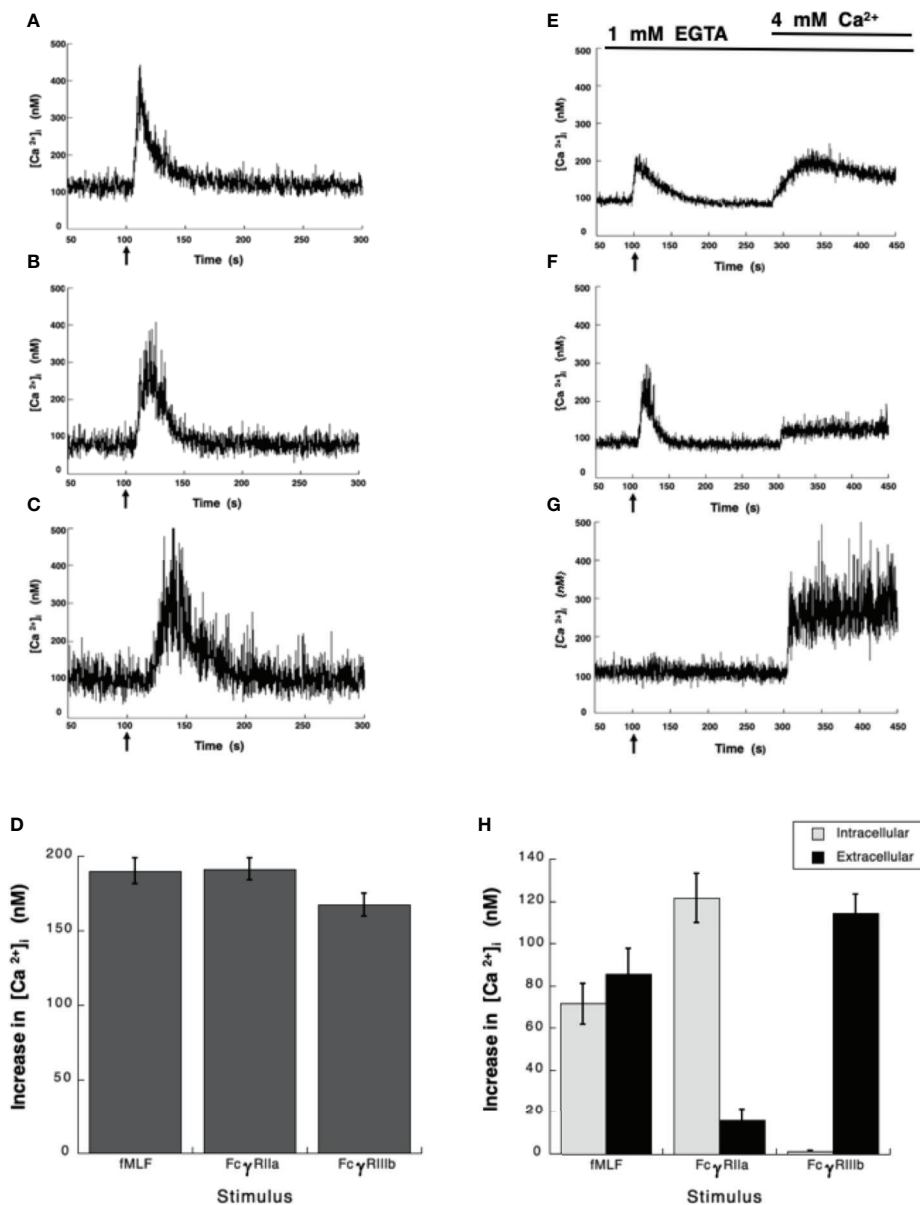
Quantitative data were expressed as mean ± standard error of mean (SEM). Single variable data were compared by paired-sample Student's t-tests using the computer program KaleidaGraph® version 4.5.2 for Mac (Synergy Software; Reading, PA, USA). Also, multiple pair-comparisons were performed using Tukey's test after ordinary one-way analysis of variance (ANOVA). Post hoc differences were considered statistically different at a value  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### Fc $\gamma$ Receptors Induce an Increase in Cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> Concentration

Neutrophils, the most abundant leukocytes in blood, display important functions for controlling infections, inflammation,

and immune responses (2, 48). Several of these functions are initiated by antibodies binding to Fc receptors (6). Although, both Fc $\gamma$  receptors on human neutrophils (Fc $\gamma$ RIIa and Fc $\gamma$ RIIb) are known to activate particular cell responses, the signaling capabilities of each receptor are still incompletely understood (9). About 30 years ago, it was already known that both neutrophil



**FIGURE 1** | Fc $\gamma$  receptors induce an increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. (A–D) Fura-2-loaded human neutrophils in PBS with Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> were stimulated with 10 nM fMLF (A), or were stimulated by aggregating Fc $\gamma$ RIIa on the cell membrane with mAb IV.3 (B), or by aggregating Fc $\gamma$ RIIb on the cell membrane with mAb 3G8 (C). (E–H) Fura-2-loaded neutrophils were resuspended in PBS containing 1 mM of EGTA and fluorescence changes detected after stimulating with 10 nM fMLF (E), or by aggregating Fc $\gamma$ RIIa (F), or by aggregating Fc $\gamma$ RIIb (G). After 300 seconds, 4 mM Ca<sup>2+</sup> was added and measurements continued until 450 seconds. Arrow indicates the moment when the stimulus was added. Changes in cytosolic calcium concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) were assessed by measuring the variations in fluorescence. Tracings are representative of three experiments with similar results. (D) Increments in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> were calculated by subtracting the baseline value from the maximum value after stimulation. (H) The initial rise in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> represents Ca<sup>2+</sup> from intracellular stores, while the rise in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> after addition of 4 mM Ca<sup>2+</sup> represents Ca<sup>2+</sup> from extracellular medium. Data are mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. Asterisks denote conditions that were statistically different from untreated cells ( $p < 0.01$ ).

Fcγ receptors induce an increase in cytoplasmic  $Ca^{2+}$  concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) (15), but important differences were noted. FcγRIIa used the second messenger  $IP_3$  to induce release of  $Ca^{2+}$  from an internal pool (15), while the increase in  $[Ca^{2+}]_i$  induced by FcγRIIIb did not involve  $IP_3$  (15). Despite these early studies the mechanism used by FcγRIIIb to mobilize calcium is still unknown. Thus, in order to further explore the mechanisms of  $[Ca^{2+}]_i$  increase induced by Fcγ receptors, Fura-2-loaded neutrophils were first stimulated with the chemoattractant fMLF. In response to fMLF a rapid almost immediate increase in  $[Ca^{2+}]_i$  was observed (Figure 1A). After this rise, the  $[Ca^{2+}]_i$  then returned to basal levels (Figure 1A). Similarly, aggregation of the FcγRIIa with specific monoclonal antibodies also induced a rapid increase in  $[Ca^{2+}]_i$  (Figure 1B). Also, aggregation of the FcγRIIIb with specific monoclonal antibodies resulted in an increase in  $[Ca^{2+}]_i$  (Figure 1C). Although, the magnitude of the  $[Ca^{2+}]_i$  rise was similar with all three stimuli (Figure 1D), the FcγRIIIb-mediated increase in  $[Ca^{2+}]_i$  was delayed for about 10 to 20 seconds (Figure 1C), suggesting again that the mechanism for calcium mobilization was different between the two Fcγ receptors.

### FcγRIIIb Aggregation Induces an Increase in $[Ca^{2+}]_i$ via $Ca^{2+}$ Entry From Extracellular Medium

It is well established that fMLF-induced increase in  $[Ca^{2+}]_i$  has two components, one initial release of  $Ca^{2+}$  from internal stores followed by a subsequent influx of this cation from outside the cell by the mechanism known as store-operated calcium entry (SOCE) (49, 50). Similarly, it is believed that Fcγ receptors also display a similar mechanism for an increase in  $[Ca^{2+}]_i$  (51, 52). Thus, we sought to confirm these ideas by selectively stimulating each Fcγ receptor. Human neutrophils were placed in  $Ca^{2+}$ -free medium and then stimulated with fMLF. As expected an initial increase in  $[Ca^{2+}]_i$  was observed followed by a gradual return to basal levels around 90 seconds later (Figure 1E). At this time and excess of  $Ca^{2+}$  was added to the medium. This led to a second increase in  $[Ca^{2+}]_i$ , which represents influx of  $Ca^{2+}$  from outside the cell (Figure 1E). Similarly, in  $Ca^{2+}$ -free medium aggregation of FcγRIIa induced an increase in  $[Ca^{2+}]_i$  from internal stores that returned to basal levels after about 90 seconds (Figure 1F). When  $Ca^{2+}$  was restored to the medium a second increase in  $[Ca^{2+}]_i$  was also observed (Figure 1F), although this second rise was much smaller. This indicated that similarly to the fMLF, aggregation of FcγRIIa induced a release of  $Ca^{2+}$  from internal stores and then an influx of  $Ca^{2+}$  from outside the cell. In sharp contrast, in  $Ca^{2+}$ -free medium aggregation of FcγRIIIb did not induce any increase in  $[Ca^{2+}]_i$  (Figure 1G), suggesting that no  $Ca^{2+}$  was released from intracellular stores. When  $Ca^{2+}$  was restored to the medium an important increase in  $[Ca^{2+}]_i$  was detected (Figure 1G). After fMLF stimulation, the magnitude of the  $[Ca^{2+}]_i$  rise from internal stores was very similar to the increase in  $[Ca^{2+}]_i$  from outside the cell (Figure 1H). Each part was about half of the total increase in calcium observed in cells kept in  $Ca^{2+}$ -containing medium. For FcγRIIa stimulation, the magnitude of the  $[Ca^{2+}]_i$  rise from internal stores was similar to

the increase in  $[Ca^{2+}]_i$  induced by fMLF (Figure 1H). The  $[Ca^{2+}]_i$  rise from extracellular  $Ca^{2+}$  was smaller than the  $[Ca^{2+}]_i$  rise from internal stores (Figure 1H), suggesting that the major contribution to an increase in  $[Ca^{2+}]_i$  rise after FcγRIIa engagement was from internal stores. In contrast, the FcγRIIIb-mediated increase in  $[Ca^{2+}]_i$  was almost exclusively due to influx of extracellular  $Ca^{2+}$  (Figure 1H). These data suggested that contrary to other Fcγ receptors, FcγRIIIb induces only an influx of  $Ca^{2+}$  from outside the cell.

### FcγRIIIb-Mediated Increase in $[Ca^{2+}]_i$ Is Independent of TAK1 and MEK

After having shown that FcγRIIa and FcγRIIIb induce an increase in  $[Ca^{2+}]_i$  very differently, we sought to explore the signaling mechanisms that could help explain these differences. Previously, we have reported that FcγRIIIb signaling activates TAK1 and MEK in human neutrophils (18). Thus, we hypothesized that either TAK1 or MEK were required for the increase in  $[Ca^{2+}]_i$  induced by FcγRIIIb. LLZ 1640-2, a selective TAK1 inhibitor did not affect the increase in  $[Ca^{2+}]_i$  induced by either FcγRIIa (Figure 2A) nor FcγRIIIb aggregation (Figure 2B). Similarly, UO126, a selective MEK inhibitor did not affect the increase in  $[Ca^{2+}]_i$  induced by either Fcγ receptor (Figure 2). Additionally, as expected neither LLZ 1640-2 nor UO126 affected the increase in  $[Ca^{2+}]_i$  induced by fMLF stimulation (Figure 2C). However, since the fMLF receptor is a GPCR (53) treatment with Pertussis toxin completely blocked the increase in  $[Ca^{2+}]_i$  (Figures 2C, D). In contrast, Pertussis toxin did not affect the increase in  $[Ca^{2+}]_i$  induced by either Fcγ receptor (Figure 2D). These data strongly suggested, that TAK1 and MEK were not involved in increasing  $[Ca^{2+}]_i$  after FcγRIIa or FcγRIIIb aggregation in human neutrophils.

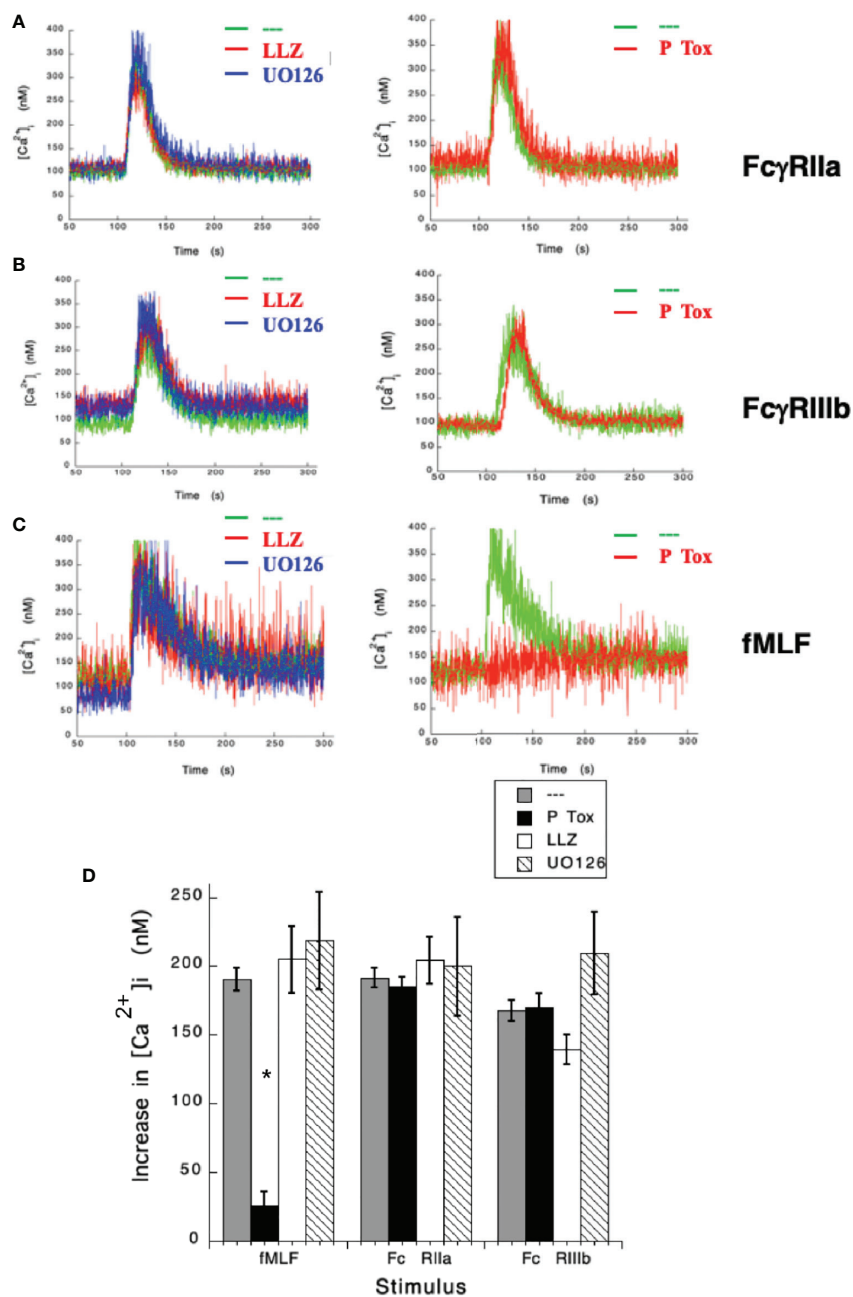
### Syk, PKC and NADPH-Oxidase Are Involved in FcγRIIIb-Mediated Increase in $[Ca^{2+}]_i$

In the past, we have reported that FcγRIIIb signaling involves Syk, PKC, and NADPH-oxidase (12, 18). Therefore, we explored the possible involvement of these signaling molecules in FcγRIIIb-mediated increase in  $[Ca^{2+}]_i$ . Treatment with iSyk, a selective Syk inhibitor, reduced the increase in  $[Ca^{2+}]_i$  induced by either FcγRIIa (Figure 3A) or FcγRIIIb aggregation (Figure 3B). Additionally, Gö6976 a selective PKC inhibitor blocked the increase in  $[Ca^{2+}]_i$  induced by FcγRIIIb but not by FcγRIIa (Figure 3). Similarly, DPI a selective NADPH-oxidase inhibitor reduced the increase in  $[Ca^{2+}]_i$  induced by FcγRIIIb but not by FcγRIIa (Figure 3). These data showed that Syk was involved in both FcγRIIa- and FcγRIIIb-mediated increase in  $[Ca^{2+}]_i$ , and suggested for the first time that FcγRIIIb signaling, but not FcγRIIa signaling to increase  $[Ca^{2+}]_i$  in human neutrophils involves both PKC and NADPH-oxidase.

### FcγRIIIb-Induced ROS Production Involves Syk and PKC

It has also been shown that NADPH-oxidase is an enzymatic complex responsible for ROS production in human neutrophils

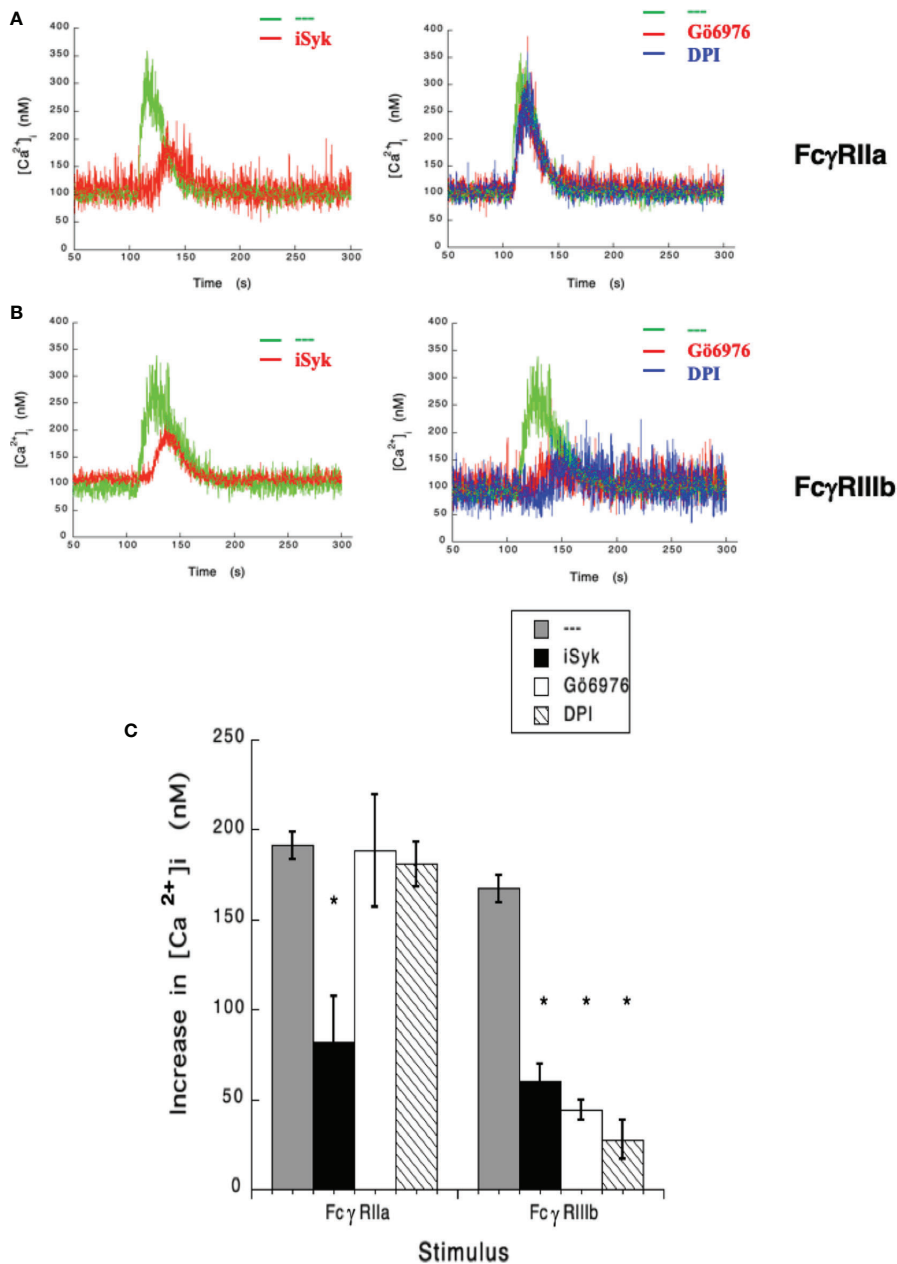




**FIGURE 2** | Fcγ receptor-mediated increase in  $[Ca^{2+}]_i$  is independent of TAK1 and MEK. Fura-2-loaded human neutrophils in PBS with  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  were left untreated (green line), or treated with 10 nM LLZ 1640-2 (LLZ) a TAK1 inhibitor, or with 50  $\mu$ M UO126, a MEK inhibitor, or with 2  $\mu$ g/ml Pertussis toxin (P Tox), before being stimulated by aggregating FcγRIIa (A), or by aggregating FcγRIIb (B), or with 10 nM fMLF (C). Arrow indicates the moment when the stimulus was added. Changes in cytosolic calcium concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) were assessed by measuring the variations in fluorescence as described in material and methods. Tracings are representative of three experiments with similar results. (D) Increments in  $[Ca^{2+}]_i$  were calculated by subtracting the baseline value from the maximum value after stimulation. Data are mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. Asterisks (\*) denote conditions that were statistically different from untreated cells ( $p < 0.01$ ).

(54, 55), and PKC is able to induce NADPH-oxidase activation (56, 57). Because, FcγRIIb signaling involves both PKC and NADPH-oxidase activation (12, 18), we explored whether FcγRIIb requires PKC to induce ROS production. Neutrophils

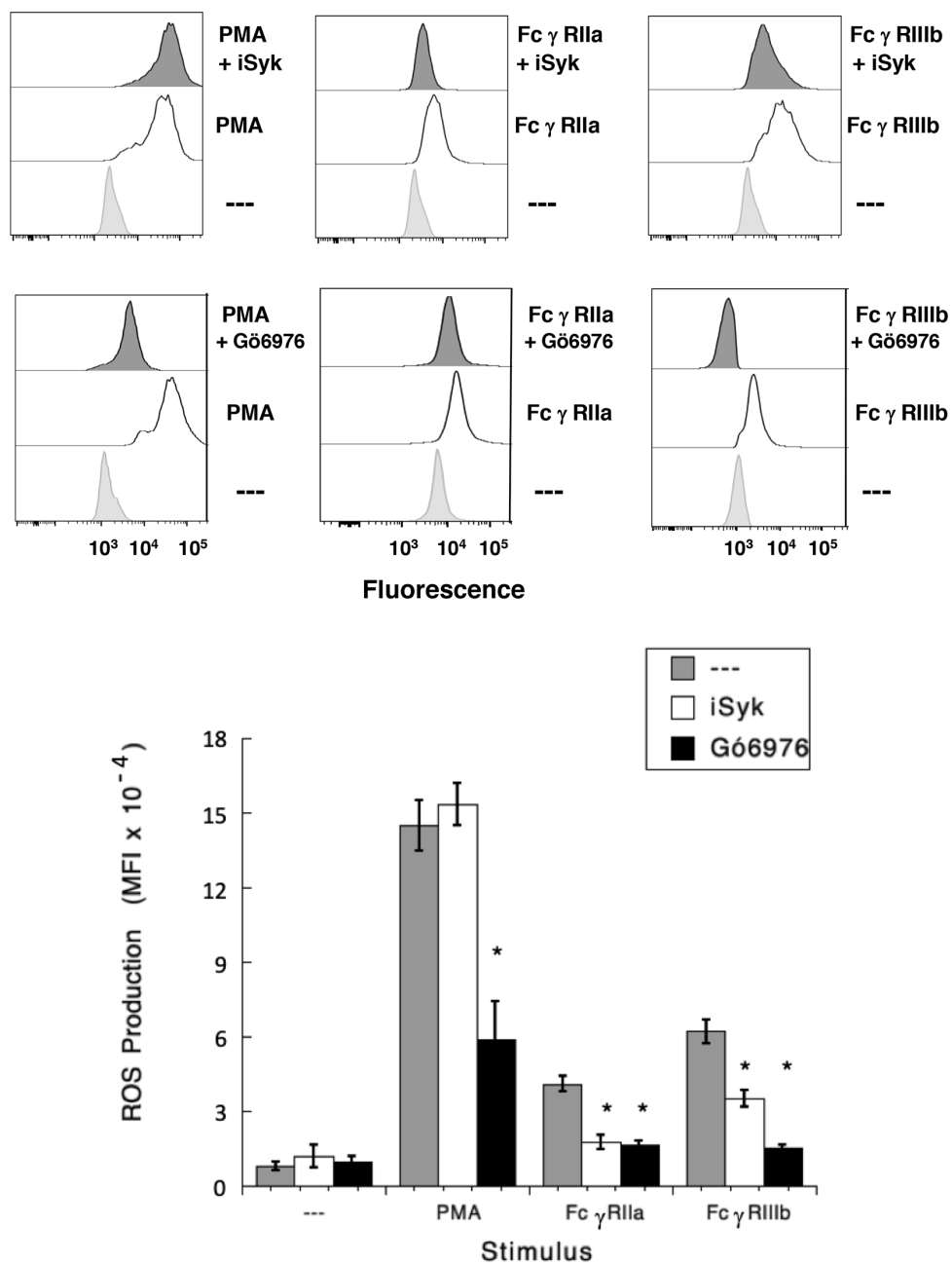
stimulated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), a strong PKC activator, produced a robust amount of ROS (Figure 4). Similarly, activation of FcγRIIa or FcγRIIb resulted in significant ROS production, although smaller than the one induced by PMA



**FIGURE 3** | FcγRIIb-mediated increase in  $[Ca^{2+}]_i$  depends on Syk, PKC and NADPH-oxidase. Fura-2-loaded human neutrophils in PBS with  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  were left untreated (green line), or treated with 1  $\mu M$  iSyk, a Syk inhibitor; 1  $\mu M$  G66976, a PKC inhibitor; 10  $\mu M$  DPI, a NADPH-oxidase inhibitor, before being stimulated by aggregating FcγRIIa (A) or FcγRIIb (B). Arrow indicates the moment when the stimulus was added. Changes in cytosolic calcium concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) were assessed by measuring the variations in fluorescence as described in material and methods. Tracings are representative of three experiments with similar results. (C) Increments in  $[Ca^{2+}]_i$  were calculated by subtracting the baseline value from the maximum value after stimulation. Data are mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. Asterisks (\*) denote conditions that were statistically different from untreated cells ( $p < 0.0001$ ).

(Figure 4). When cells were pre-treated with iSyk, a selective Syk inhibitor, PMA-induced ROS production was not affected (Figure 4). In contrast, iSyk reduced ROS production induced by either FcγRIIa or FcγRIIb (Figure 4). Also, in the presence of G66976, a selective PKC inhibitor, PMA-induced ROS production was blocked (Figure 4). Similarly, G66976

completely prevented ROS production after aggregation of FcγRIIa or FcγRIIb (Figure 4). These data suggested that FcγRIIa and FcγRIIb both activate Syk, leading to PKC activation and ROS production. However, only in FcγRIIb signaling these molecules are connected to a rise in  $[Ca^{2+}]_i$  (Figure 3C).

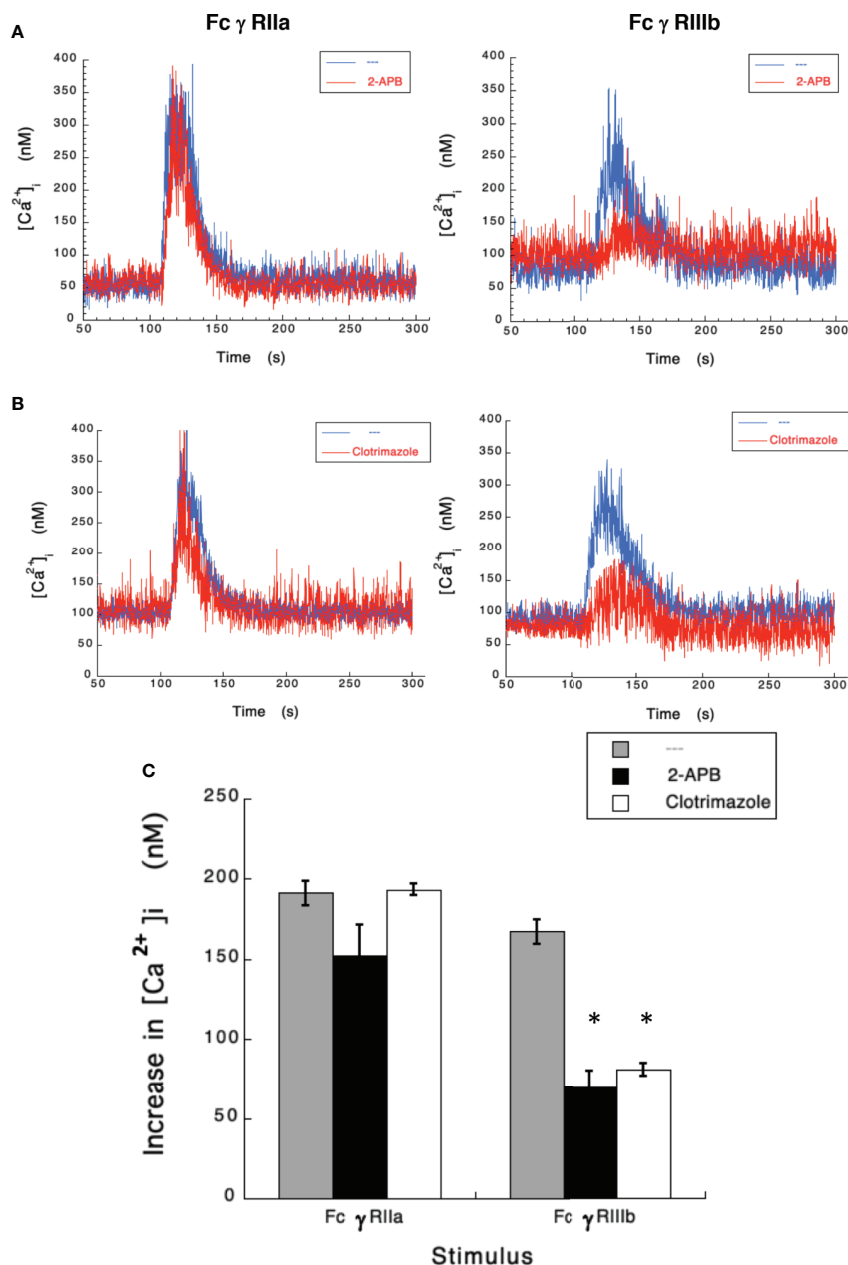


**FIGURE 4** | Fc $\gamma$ RIIb-induced ROS production involves Syk and PKC. Reactive Oxygen Species (ROS) production was assessed in dihydrorhodamine 123-loaded neutrophils by detecting fluorescence changes in flow cytometry. (Upper part) Neutrophils were left untreated (light gray), or were stimulated (white) with 20 nM PMA, or by aggregating Fc $\gamma$ RIIa, or by aggregating Fc $\gamma$ RIIb. Some neutrophils were previously treated (dark gray) with 1  $\mu$ M iSyk, a Syk inhibitor; or 1  $\mu$ M G66976, a PKC inhibitor; before being stimulated. (Lower part) Cumulative data (mean  $\pm$  SEM) of mean fluorescence intensity (MFI) from three independent experiments done in triplicate. Asterisk (\*) denote condition that statistically different from untreated cells ( $p < 0.001$ ).

## Transient Potential Receptor Melastatin 2 (TRPM 2) Mediates Fc $\gamma$ RIIb-Induced Increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>

Results presented above suggested that Fc $\gamma$ RIIb induces PKC activation and ROS production, conducting to activation of a

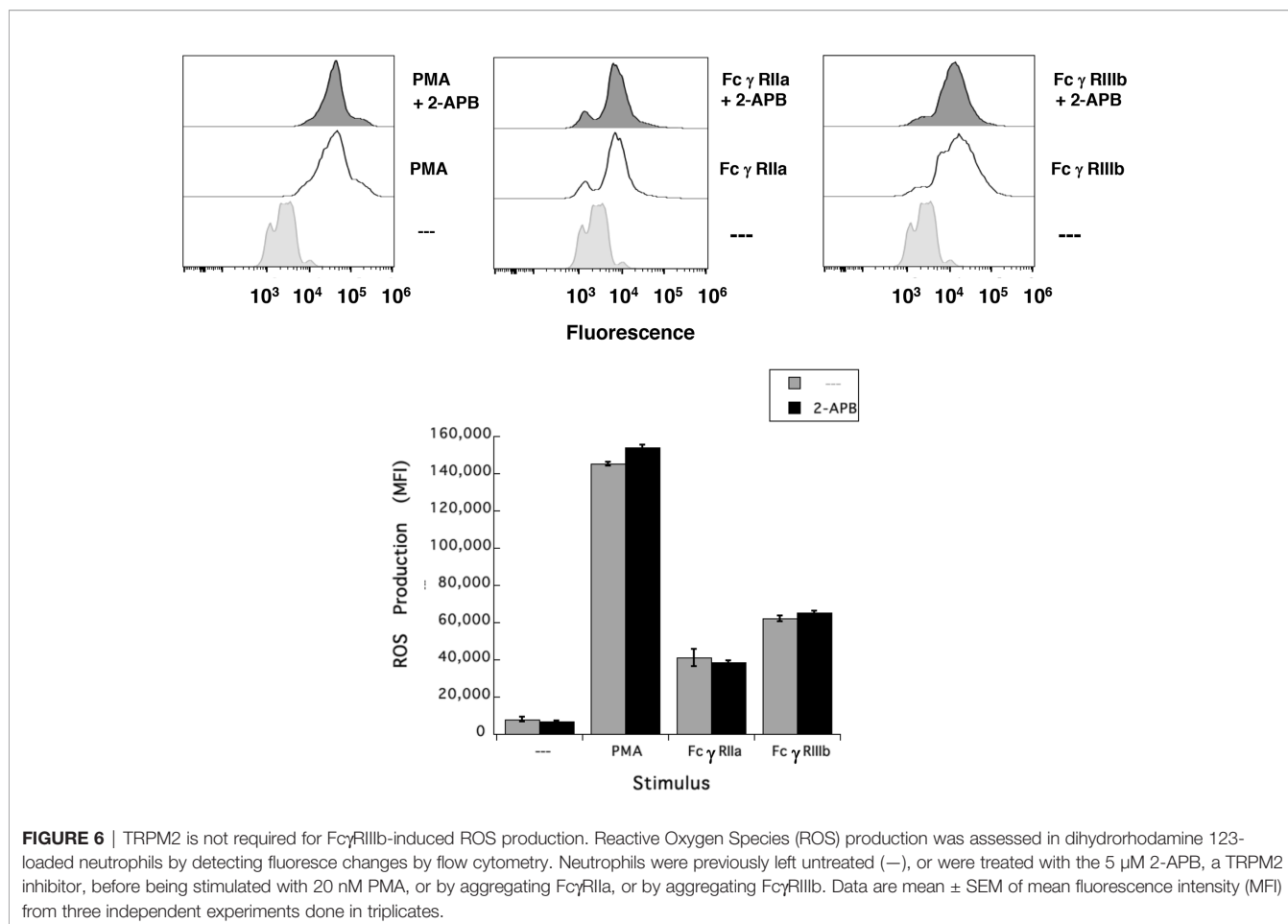
Ca<sup>2+</sup> channel that allows Ca<sup>2+</sup> influx into neutrophils. Several ion channels including different TRP family members (19, 21) could be involved in this response (58). In neutrophils several TRP channels were found to be expressed at the mRNA level by RT-PCR, including TRPC6, TRPM2, TRPV1, TRPV2, TRPV5 and TRPV6 (59). Of these channels, TRPM2 was demonstrated to



**FIGURE 5** | TRPM 2 channel mediates Fc $\gamma$ RIIb-induced increase in  $[Ca^{2+}]_i$ . Fura-2-loaded human neutrophils in PBS with  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  were left untreated (blue line), or treated (red line) with 5  $\mu$ M 2-APB (A) or with 10  $\mu$ M clotrimazole (B), two TRPM2 inhibitors, before being stimulated by aggregating Fc $\gamma$ RIIa or Fc $\gamma$ RIIb. Changes in cytosolic calcium concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) were assessed by measuring the variations in fluorescence as described in material and methods. Tracings are representative of three experiments with similar results. (C) Increments in  $[Ca^{2+}]_i$  were calculated by subtracting the baseline value from the maximum value after stimulation. Data are mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. Asterisks (\*) denote conditions that were statistically different from untreated cells ( $p < 0.0008$ ).

mobilize  $Ca^{2+}$  in granulocytes (60), and to be activated by ROS (24, 27, 61, 62) and by PKC (28, 29). Based on these observations, we then explored whether TRPM2 was involved in Fc $\gamma$ RIIb-mediated increase in  $[Ca^{2+}]_i$ . Fc $\gamma$  receptor-mediated increase in  $[Ca^{2+}]_i$  was evaluated in the presence of 2-APB (35) or clotrimazole (37), two different TRPM2 inhibitors. After Fc $\gamma$ RIIa aggregation the increase in  $[Ca^{2+}]_i$  was not affected by

the presence of 2-APB (Figure 5). In contrast, 2-APB efficiently inhibited the Fc $\gamma$ RIIb-mediated increase in  $[Ca^{2+}]_i$  (Figure 5). Similarly, the Fc $\gamma$ RIIa-mediated  $[Ca^{2+}]_i$  rise was not affected by the presence of clotrimazole (Figure 5). However, clotrimazole also efficiently inhibited the Fc $\gamma$ RIIb-mediated increase in  $[Ca^{2+}]_i$  (Figure 5). Moreover, 2-APB could not inhibit ROS production induced by PMA (Figure 6) nor by Fc $\gamma$ RIIa or



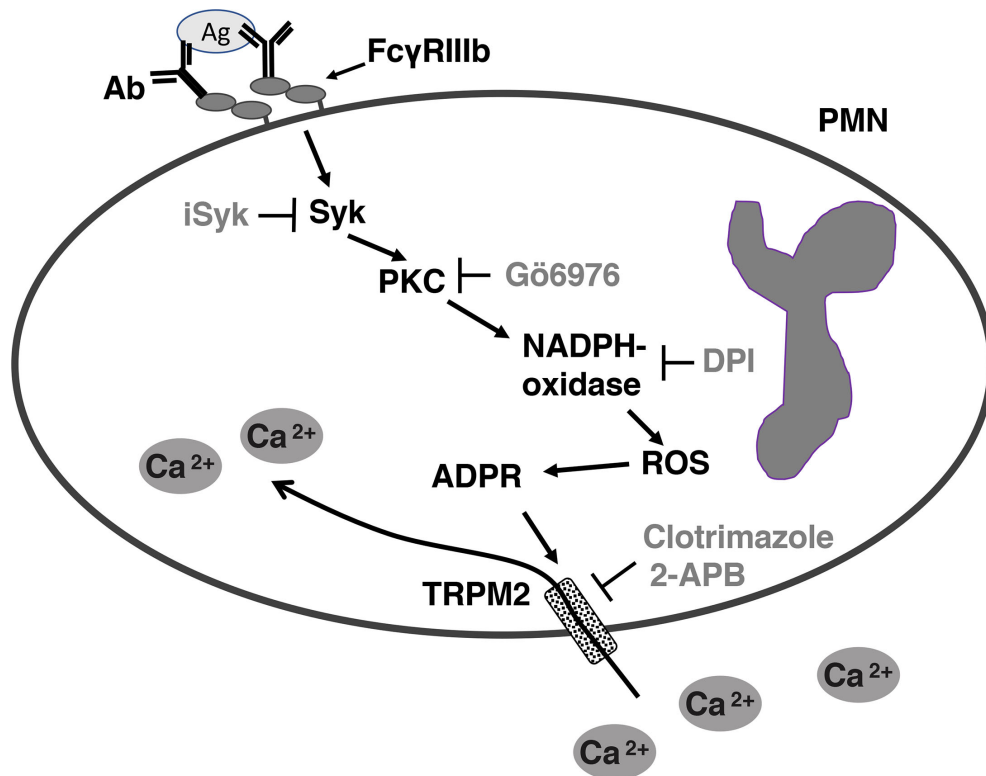
FcγRIIb (Figure 6). These data positioned production of ROS up-stream of TRPM2 activation and suggested that PKC and ROS are required for FcγRIIb-induced activation of TRPM2 to promote  $Ca^{2+}$  influx in neutrophils (Figure 7).

## DISCUSSION

Neutrophils represent the most abundant leukocytes in blood and are considered the first line of defense against invading microorganisms because they are the first leukocytes to arrive at sites of inflammation and infection (63–65). At affected sites neutrophils display several antimicrobial functions (66) including degranulation, production of reactive oxygen species (ROS) (67, 68), phagocytosis (4) and the formation of neutrophil extracellular traps (NET) (5). In addition to these innate immune functions, neutrophils also participate in modulating the adaptive immune response (2). Initiation of these multiple cellular functions involves numerous receptors triggering a myriad of intracellular signaling pathways (52). In many of these pathways, changes in intracellular  $Ca^{2+}$  concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) are a prerequisite for neutrophil activation (52, 69). However, how changes in  $[Ca^{2+}]_i$  induced by the multitude of receptors expressed on these cells, control neutrophil activation

and function remains only partially understood (58, 70, 71). In the case of antibody-mediated neutrophil responses (8, 9), it has been found that both human Fcγ receptors, FcγRIIa and FcγRIIb, are capable of inducing an increase in  $[Ca^{2+}]_i$  (45, 72, 73). However, important differences on how each receptor mobilizes  $Ca^{2+}$  were reported since almost 30 years ago. While, FcγRIIa requires 1,4,5-inositol triphosphate ( $IP_3$ ) production for an increase in  $[Ca^{2+}]_i$ , the FcγRIIb-mediated increase in  $[Ca^{2+}]_i$  is independent of  $IP_3$  (15). Now in this report, we show for the first time, that in human neutrophils stimulation of FcγRIIb leads to TRPM2 activation to mediate an increase in  $[Ca^{2+}]_i$ .

Changes in  $[Ca^{2+}]_i$  are fundamental for the activation process of neutrophils (52, 69), and consequently  $Ca^{2+}$  fluxes for neutrophil responses are finely regulated in terms of temporal and spatial organization (58). In resting conditions,  $[Ca^{2+}]_i$  in neutrophils is around 100 nM, a level 10 000-fold lower than the concentration in the extracellular medium (74). Upon stimulation of neutrophils *via* various receptors such as G-protein coupled receptors (GPCRs) (75), integrins (76), or Fcγ receptors (45, 72) there is a rapid increase in  $[Ca^{2+}]_i$  caused by the release of  $Ca^{2+}$  from intracellular stores and/or by influx of extracellular  $Ca^{2+}$ . Engagement of these receptors leads to activation of phospholipase C (PLC). GPCRs mainly activate the PLCβ2 and PLCβ3 (75), while integrins and Fcγ receptors



**FIGURE 7** | Model for FcγRIIIb-mediated increase in  $[Ca^{2+}]_i$  in human neutrophils (PMN). After aggregation of FcγRIIIb by antibody (Ab)/antigen (Ag) immune complexes, on the plasma membrane of neutrophils (PMN), spleen tyrosine kinase (Syk) gets activated, leading to protein kinase C (PKC) activation. PKC is then required for nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NADPH-oxidase) activation. NADPH-oxidase, an enzymatic complex assembled on a membrane (not shown), in turn produces reactive oxygen species (ROS), which induce adenosine diphosphate ribose (ADPR) finally leading to activation of transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) channels on the plasma membrane. Activated TRPM2 allow influx of extracellular  $Ca^{2+}$  into the cell. iSyk, an inhibitor of Syk; Gö6976, an inhibitor of PKC; DPI, an inhibitor of NADPH-oxidase; 2-APB, an inhibitor of TRPM2; Clotrimazole, another inhibitor of TRPM2.

activate PLCγ1 and PLCγ2 (52, 76). PLC in turn act on phosphatidylinositol 4,5 biphosphate (PIP<sub>2</sub>) to generate diacylglycerol (DAG) and IP<sub>3</sub>. Binding of IP<sub>3</sub> to its cognate receptor (IP<sub>3</sub>R), which also functions as a nonselective Ca<sup>2+</sup> channel, localized on the membrane of the endoplasmic reticulum (ER), leads to a release of Ca<sup>2+</sup> into the cytoplasm (41, 77). The initial rapid release of Ca<sup>2+</sup> from the ER is followed by influx of Ca<sup>2+</sup> across the plasma membrane. This influx is induced by the drop in Ca<sup>2+</sup> levels inside the ER in a process that is known as store-operated calcium entry (SOCE) (78, 79). The mechanism for SOCE involves  $[Ca^{2+}]_i$  sensing proteins such as stromal interaction molecule 1 (STIM1), which migrates from the ER to the plasma membrane when intracellular stores are discharged (78). At the plasma membrane STIM1 gets together with the Ca<sup>2+</sup> channel protein Orai1 (71, 80), which allows influx of extracellular Ca<sup>2+</sup>. In addition, it has been observed that after receptor stimulation there is also a Ca<sup>2+</sup> influx that is dependent on receptor occupation by agonists and relatively store independent. This other mechanism of Ca<sup>2+</sup> entry is known as receptor-operated calcium entry (ROCE) (81, 82). The molecular mechanisms controlling these two components of Ca<sup>2+</sup> influx are still not resolved (83, 84).

Although the main mechanism for increasing  $[Ca^{2+}]_i$  in neutrophils is primarily mediated *via* IP<sub>3</sub>-dependent Ca<sup>2+</sup> release from intracellular stores followed by SOCE activation of Orai1 channels (16), there is evidence that additional ion channels *via* ROCE are also involved in calcium influx into these cells (58). This has been clearly demonstrated for fMLF stimulation. After the initial increase in  $[Ca^{2+}]_i$  a second influx of extracellular Ca<sup>2+</sup> is observed. This influx is composed predominantly by Orai1 channels which are selective for Ca<sup>2+</sup>, and also by other non-selective channels that allow entry of both Ca<sup>2+</sup> and strontium cations (Sr<sup>2+</sup>) (50). In phagocytes, the nature of Ca<sup>2+</sup> channels mediating ROCE is just beginning to be identified.

An interesting group of nonselective ion channels that may participate in ROCE mechanisms in phagocytes is the superfamily of transient receptor potential (TRP) channels (85). TRP channels are expressed in many cell types and participate in multitude of physiological and pathological processes, such as cell proliferation, differentiation, and death (21). They are particularly important as biosensors of environmental and cellular stimuli including heat, mechanical force (pressure), oxidative (redox) status, and pH (21, 22, 86). The family of TRP channels is divided in six subfamilies: the ankyrin (TRPA), the canonical (TRPC), the

melastatin (TRPM), the mucolipin (TRPML), the polycystin (TRPP) and the vanilloid (TRPV) subfamilies. Human and murine neutrophils only express members of the TRPC, TRPM and TRPV subfamilies (58), but their role in ROCE is unclear (81). In mast cells, a ROCE mechanism was described after antigen stimulation. The channel involved allowed influx of both external  $Ca^{2+}$  and  $Sr^{2+}$  to support degranulation, and was identified as TRPC5 (canonical transient receptor potential channel 5) (87). These reports opened the possibility that TRP channels may contribute to changes in  $[Ca^{2+}]_i$  after Fcγ receptor engagement in human neutrophils.

In phagocytic cells, it is clear that changes in  $[Ca^{2+}]_i$  are important for antibody-mediated cell responses such as phagocytosis (45, 72) and ROS production (67). It is generally accepted that Fcγ receptors activate a signaling cascade that involves Src family kinase-mediated phosphorylation of an ITAM sequence (7) in the cytoplasmic portion of the receptor (or its associated  $\gamma$  chains) (6, 8). The phosphorylated ITAM becomes a docking site for Syk, which in turn activates PLC $\gamma$ 1 to produce IP $_3$  (17, 52). This pathway is certainly the one used by FcγRIIIa to induce  $Ca^{2+}$  release from the ER (15). Then, a SOCE mechanism composed by STIM1 and Orai1 proteins is activated to generate a further influx of  $Ca^{2+}$  from outside the cell (16, 71). This influx of extracellular  $Ca^{2+}$  was found to be important for the intraphagosomal production of ROS during phagocytosis of opsonized yeast particles (51). We indeed found that selective aggregation of FcγRIIIa produces an increase in  $[Ca^{2+}]_i$  resulting from release of  $Ca^{2+}$  from intracellular stores (Figure 1). For FcγRIIIa it is clear that increases in  $[Ca^{2+}]_i$  involve IP $_3$ -mediated  $Ca^{2+}$  release from intracellular stores, followed by a SOCE mechanism that allows  $Ca^{2+}$  entry from outside the cell (71, 88).

For FcγRIIIb, elucidating the mechanism for initiating an increase in  $[Ca^{2+}]_i$  has been more complicated, since this receptor is expressed exclusively on human neutrophils, and it is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked receptor, lacking transmembrane and cytoplasmic domains (8, 9). Despite that initial steps in signaling for this receptor remain a mystery, it is clear that it can trigger signaling pathways leading to different neutrophil responses including activation of integrins (89), activation of transcription factors (11), and induction of NET formation (12, 13). In addition, FcγRIIIb induces an increase in  $[Ca^{2+}]_i$  (14, 45, 90), which is independent of IP $_3$  (15). For a long time, it has been assumed that the initial rise in  $[Ca^{2+}]_i$  must be due to release of  $Ca^{2+}$  from intracellular stores by another mechanism that is independent of IP $_3$ . However, no such mechanism has yet been found. Sphingosine 1 phosphate (S1P), the product of sphingosine kinase (SK) is considered to be a mediator for changes in  $[Ca^{2+}]_i$ . In neutrophils, S1P formation was dependent on ER store depletion, and inhibition of SK resulted in a reduction of  $Ca^{2+}$  influx (91). Also, in glioblastoma cells it was reported that S1P could activate the TRP channel TRPC1, leading to  $Ca^{2+}$  influx (92). In both cases, S1P was found to mediate  $Ca^{2+}$  entry into the cells and not release of  $Ca^{2+}$  from intracellular stores. Therefore, it is unlikely that S1P mediates release of  $Ca^{2+}$  from intracellular stores in neutrophils.

Now, we report that when neutrophils were in  $Ca^{2+}$ -free medium selective aggregation of FcγRIIIb did not cause any increase in  $[Ca^{2+}]_i$  (Figure 1). This result implied that the increase in  $[Ca^{2+}]_i$  was due to an influx of  $Ca^{2+}$  from outside the cell. This idea was confirmed when  $Ca^{2+}$  was restored in to the medium (Figure 1). This finding is in complete agreement with the lack of IP $_3$  production when FcγRIIIb is engaged on neutrophils (15). It also pointed to the idea that a membrane ion channel was activated in response to FcγRIIIb aggregation. In previous reports, we described that FcγRIIIb triggers a signaling cascade that involves Syk, TAK1, MEK-ERK for induction of NETosis (18). In addition, we also reported that activation of PKC and production of ROS are important for NET formation (12). Thus, we explored whether these molecules could be involved in FcγRIIIb-mediated increase in  $[Ca^{2+}]_i$ . Indeed, we found that PKC and ROS are required for the influx of  $Ca^{2+}$  induced by FcγRIIIb (Figure 3).

Based on this, we turned our attention to TRP channels which are non-selective ion channels allowing transport of  $Ca^{2+}$  (85, 93), and capable (some of them) to sense the redox status in the cell (86, 94). Human neutrophils express the TRP channels: TRPC1, TRPC3, TRPC4, TRPC6, TRPM2, TRPV1, TRPV2, TRPV4, TRPV5, and TRPV6 (58, 59). Among these receptors, only TRPM2 (transient receptor potential melastatin type 2 cation channel; previously also named as TRPC7 or LRPC2) (20, 58) is also known to be activated by PKC (28, 29), and ROS (24, 95). In addition, TRPM2 has been found to be involved in several immune functions, including clearance of bacteria (96–98), NET formation by murine neutrophils (99), activation of NLRP3 inflammasome and secretion of interleukin-1 $\beta$  (100, 101), and dendritic cell maturation and chemotaxis (102). We confirmed that TRPM2 is responsible for FcγRIIIb-mediated rise in  $[Ca^{2+}]_i$  when two inhibitors, 2-APB (33–35, 95) and clotrimazole (36–39) completely blocked FcγRIIIb-mediated rise in  $[Ca^{2+}]_i$  (Figure 5). Both inhibitors 2-APB and clotrimazole have been used to block TRPM2 in many cell systems, however they are not specific inhibitors of this channel. Therefore, the possibility remains that other TRP channels may be involved in FcγRIIIb-mediated  $Ca^{2+}$  influx. Recently, novel and potentially more specific TRPM2 inhibitors have been reported (103, 104). It would be interesting to use these novel inhibitors to confirm our conclusions. However, we feel confident that TRPM2 is in fact the channel involved because it is the only TRP channel member on human neutrophils that is activated by PKC and ROS. In fact, the mechanism of activation involves adenosine diphosphate ribose (ADPR) binding to the C-terminal domain of the receptor, which presents strong homology to the human nucleotide diphosphate linked moiety X type (Nudix) hydrolase motif 9 (NUDT9) (23, 105). The NADPH-oxidase, like the mitochondrial oxidase, is a molecular complexes vectorially arranged on a membrane such that it accepts an electron from NADPH in the cytosol and transfers it across the membrane reducing oxygen to an oxygen radical (55, 68). The NADPH-oxidase is usually assembled on the phagosomal membrane, to generate ROS into the phagosome, or on the plasma membrane to generate

extracellular ROS. Since, oxidative stress induces intracellular accumulation of ADPR it would also be interesting to confirm that aggregation of FcγRIIb indeed causes an accumulation of ADPR. It is also important to establish whether ADPR is indeed coming from activation of the NADPH-oxidase or from mitochondria in response to oxidative stress. TRPM2 gating requires in addition to ADPR, binding of  $Ca^{2+}$  (61, 106, 107). This requirement for full opening of the channel has been very nicely revealed through analysis of cryo-electron microscopy structures of human and zebrafish TRPM2 [reviewed in (108, 109)]. In the case, of FcγRIIb-mediated TRPM2 activation, we do not know if the basal  $[Ca^{2+}]_i$  is sufficient to support the full opening of the channel. In future experiments, we will eliminate intracellular calcium with BAPTA to further explore the mechanism for  $Ca^{2+}$  entry in neutrophils after FcγRIIb engagement. Also, we will look at the functional consequence of the calcium rise on particular FcRIIb-mediated neutrophil responses.

The involvement of PKC for inducing activation of TRPM2 comes from indirect studies using PMA (28, 29). In this report, we also demonstrated that indeed PKC is involved in FcγRIIb-mediated TRPM2 activation using the specific PKC inhibitor Gö6976 (Figure 3). However, the particular isoform of PKC that is required for this function remains undetermined. Human neutrophils expressed PKC isoforms from each group of PKC enzymes (110). The inhibitor Gö6976 has specificity for  $Ca^{2+}$ -dependent PKC isozymes alpha and beta (31). The most likely PKC isoform involved in this response may be PKCβ, since this isoform is an upstream mediator of NADPH-oxidase activation and was reported to be involved in NET formation (111); and we have also reported that FcγRIIb is the main Fc receptor involved in NETosis (12). Future experiments will determine whether PKCβ is actually required for FcγRIIb-mediated TRPM2 activation. Tremendous advances have taken place in the field of  $Ca^{2+}$  signaling in neutrophils in recent years. However, the literature in this area of research is rather controversial, as human and murine neutrophils and even human HL-60 cells do not always express the same ion channels on their membrane (58, 88). Thus, there is difficulty in integrating the different findings between species, and between cell lines and primary cells. Still, this field has a bright future since there are still many open questions on how calcium signals regulate neutrophil functions (70).

## REFERENCES

- Liew PX, Kubes P. The Neutrophil's Role During Health and Disease. *Physiol Rev* (2019) 99:1223–48. doi: 10.1152/physrev.00012.2018
- Rosales C. Neutrophils At the Crossroads of Innate and Adaptive Immunity. *J Leukoc Biol* (2020) 108:377–96. doi: 10.1002/JLB.4MIR0220-574RR
- Rosales C, Uribe-Querol E. Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity. *Biomed Res Int* (2017) 2017:9042851. doi: 10.1155/2017/9042851
- Uribe-Querol E, Rosales C. Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process. *Front Immunol* (2020) 11:1066. doi: 10.3389/fimmu.2020.01066
- Papayannopoulos V. Neutrophil Extracellular Traps in Immunity and Disease. *Nat Rev Immunol* (2018) 18:134–47. doi: 10.1038/nri.2017.105
- Rosales C, Uribe-Querol E. Antibody - Fc Receptor Interactions in Antimicrobial Functions. *Curr Immunol Rev* (2013) 9:44–55. doi: 10.2174/1573395511309010006

In conclusion, we have found that FcγRIIb does not induce  $Ca^{2+}$  release from intracellular stores but it does activate, via PKC and ROS, the TRPM2 channel on the plasma membrane for inducing an influx of extracellular  $Ca^{2+}$  into human neutrophils (Figure 7).

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

## ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Bioethics Committee at Instituto de Investigaciones Biomédicas – Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). The participants provided their written informed consent to participate in this study.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

OA performed most of the experiments and analyzed data. NM performed calcium measurements. CR designed the research, mentored other authors, performed statistical analysis, prepared figures, organized the references, and wrote the paper. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## FUNDING

Research was supported by grant 254434 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), Mexico, and by grant PAPIIT IN202520 from Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico.

- Underhill DM, Goodridge HS. The Many Faces of ITAMs. *Trends Immunol* (2007) 28:66–73. doi: 10.1016/j.it.2006.12.004
- Rosales C, Uribe-Querol E. Fc Receptors: Cell Activators of Antibody Functions. *Adv Biosci Biotechnol* (2013) 4:21–33. doi: 10.4236/abb.2013.44A004
- Rosales C. Fcγ Receptor Heterogeneity in Leukocyte Functional Responses. *Front Immunol* (2017) 8:280. doi: 10.3389/fimmu.2017.00280
- Rivas-Fuentes S, García-García E, Nieto-Castañeda G, Rosales C. Fcγ Receptors Exhibit Different Phagocytosis Potential in Human Neutrophils. *Cell Immunol* (2010) 263:114–21. doi: 10.1016/j.cellimm.2010.03.006
- García-García E, Nieto-Castañeda G, Ruiz-Saldaña M, Mora N, Rosales C. FcγRIIA and FcγRIIIB Mediate Nuclear Factor Activation Through Separate Signaling Pathways in Human Neutrophils. *J Immunol* (2009) 182:4547–56. doi: 10.4049/jimmunol.0801468
- Alemán OR, Mora N, Cortes-Vieyra R, Uribe-Querol E, Rosales C. Differential Use of Human Neutrophil Fcγ Receptors for Inducing



- Neutrophil Extracellular Trap Formation. *J Immunol Res* (2016) 2016:142643. doi: 10.1155/2016/2908034
13. Behnen M, Leszczyc C, Möller S, Batel T, Klinger M, Solbach W, et al. Immobilized Immune Complexes Induce Neutrophil Extracellular Trap Release by Human Neutrophil Granulocytes Via FcγRIIIb and Mac-1. *J Immunol* (2014) 193:1954–65. doi: 10.4049/jimmunol.1400478
  14. Edberg JC, Moon JJ, Chang DJ, Kimberly RP. Differential Regulation of Human Neutrophil FcγRIIa (CD32) and FcγRIIIb (CD16)-Induced  $Ca^{2+}$  Transients. *J Biol Chem* (1998) 273:8071–9. doi: 10.1074/jbc.273.14.8071
  15. Rosales C, Brown EJ. Signal Transduction by Neutrophil IgG Fc Receptors: Dissociation of  $[Ca^{2+}]_i$  Rise From IP<sub>3</sub>. *J Biol Chem* (1992) 267:5265–71. doi: 10.1016/S0021-9258(18)42761-5
  16. Clemens RA, Lowell CA. Store-Operated Calcium Signaling in Neutrophils. *J Leukoc Biol* (2015) 98:497–502. doi: 10.1189/jlb.2MR1114-573R
  17. Rosales C. Fc Receptor and Integrin Signaling in Phagocytes. *Signal Transduct* (2007) 7:386–401. doi: 10.1002/sita.200700141
  18. Alemán OR, Mora N, Cortes-Vieyra R, Uribe-Querol E, Rosales C. Transforming Growth Factor-β-Activated Kinase 1 is Required for Human FcγRIIIb-Induced Neutrophil Extracellular Trap Formation. *Front Immunol* (2016) 7:277. doi: 10.3389/fimmu.2016.00277
  19. Najder K, Musset B, Lindemann O, Bulk E, Schwab A, Fels B. The Function of TRP Channels in Neutrophil Granulocytes. *Pflugers Arch* (2018) 470:1017–33. doi: 10.1007/s00424-018-2146-8
  20. Sumoza-Toledo A, Penner R. TRPM2: A Multifunctional Ion Channel for Calcium Signaling. *J Physiol* (2011) 589:1515–25. doi: 10.1113/jphysiol.2010.201855
  21. Flockerzi V, Nilius B. TRPs: Truly Remarkable Proteins. *Handb Exp Pharmacol* (2014) 222:1–12. doi: 10.1007/978-3-642-54215-2\_1
  22. Jimenez I, Prado Y, Marchant F, Otero C, Eltit F, Cabello-Verrugio C, et al. TRPM Channels in Human Diseases. *Cells* (2020) 9:2604. doi: 10.3390/cells9122604
  23. Perraud AL, Fleig A, Dunn CA, Bagley LA, Launay P, Schmitz C, et al. ADP-Ribose Gating of the Calcium-Permeable LTRPC2 Channel Revealed by Nudix Motif Homology. *Nature* (2001) 411:595–9. doi: 10.1038/35079100
  24. Syed Mortadza SA, Wang L, Li D, Jiang LH. TRPM2 Channel-Mediated ROS-sensitive  $Ca^{2+}$  Signaling Mechanisms in Immune Cells. *Front Immunol* (2015) 6:407. doi: 10.3389/fimmu.2015.00407
  25. Wang G, Cao L, Liu X, Sieracki NA, Di A, Wen X, et al. Oxidant Sensing by TRPM2 Inhibits Neutrophil Migration and Mitigates Inflammation. *Dev Cell* (2016) 38:453–62. doi: 10.1016/j.devcel.2016.07.014
  26. Du J, Xie J, Yue L. Modulation of TRPM2 by Acidic pH and the Underlying Mechanisms for pH Sensitivity. *J Gen Physiol* (2009) 134:471–88. doi: 10.1085/jgp.200910254
  27. Hara Y, Wakamori M, Ishii M, Maeno E, Nishida M, Yoshida T, et al. LTRPC2  $Ca^{2+}$ -permeable Channel Activated by Changes in Redox Status Confers Susceptibility to Cell Death. *Mol Cell* (2002) 9:163–73. doi: 10.1016/S1097-2765(01)00438-5
  28. Nazıroğlu M. Activation of TRPM2 and TRPV1 Channels in Dorsal Root Ganglion by NADPH Oxidase and Protein Kinase C Molecular Pathways: A Patch Clamp Study. *J Mol Neurosci* (2017) 61:425–35. doi: 10.1007/s12031-017-0882-4
  29. Nazıroğlu M, Özgül C. Vitamin E Modulates Oxidative Stress and Protein Kinase C Activator (PMA)-Induced TRPM2 Channel Gate in Dorsal Root Ganglion of Rats. *J Bioenerg Biomembr* (2013) 45:541–9. doi: 10.1007/s10863-013-9524-x
  30. Keshari RS, Verma A, Barthwal MK, Dikshit M. Reactive Oxygen Species-Induced Activation of ERK and P38 MAPK Mediates PMA-induced NETs Release From Human Neutrophils. *J Cell Biochem* (2013) 114:532–40. doi: 10.1002/jcb.24391
  31. Martiny-Baron G, Kazanietz MG, Mischak H, Blumberg PM, Kochs G, Hug H, et al. Selective Inhibition of Protein Kinase C Isozymes by the Indolocarbazole Gö 6976. *J Biol Chem* (1993) 268:9194–7. doi: 10.1016/S0021-9258(18)98335-3
  32. Asehnoune K, Strassheim D, Mitra S, Yeol Kim J, Abraham E. Involvement of PKCα/β in TLR4 and TLR2 Dependent Activation of NF-κB. *Cell Signal* (2005) 17:385–94. doi: 10.1016/j.cellsig.2004.08.005
  33. Chung MK, Asgar J, Lee J, Shim MS, Dumler C, Ro JY. The Role of TRPM2 in Hydrogen Peroxide-Induced Expression of Inflammatory Cytokine and Chemokine in Rat Trigeminal Ganglia. *Neuroscience* (2015) 297:160–9. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.03.067
  34. Övey IS, Nazıroğlu M. Homocysteine and Cytosolic GSH Depletion Induce Apoptosis and Oxidative Toxicity Through Cytosolic Calcium Overload in the Hippocampus of Aged Mice: Involvement of TRPM2 and TRPV1 Channels. *Neuroscience* (2015) 284:225–33. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.09.078
  35. Togashi K, Inada H, Tominaga M. Inhibition of the Transient Receptor Potential Cation Channel TRPM2 by 2-Aminoethoxydiphenyl Borate (2-APB). *Br J Pharmacol* (2008) 153:1324–30. doi: 10.1038/sj.bjp.0707675
  36. Eisfeld J, Lückhoff A. Trpm2. *Handb Exp Pharmacol* (2007) 179:237–52. doi: 10.1007/978-3-540-34891-7\_14
  37. Hill K, McNulty S, Randall AD. Inhibition of TRPM2 Channels by the Antifungal Agents Clotrimazole and Econazole. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* (2004) 370:227–37. doi: 10.1007/s00210-004-0981-y
  38. Roberge S, Roussel J, Andersson DC, Meli AC, Vidal B, Blandel F, et al. TNF-α-Mediated Caspase-8 Activation Induces ROS Production and TRPM2 Activation in Adult Ventricular Myocytes. *Cardiovasc Res* (2014) 103:90–9. doi: 10.1093/cvr/cvu112
  39. Ham HY, Hong CW, Lee SN, Kwon MS, Kim YJ, Song DK. Sulfur Mustard Primes Human Neutrophils for Increased Degranulation and Stimulates Cytokine Release Via TRPM2/p38 MAPK Signaling. *Toxicol Appl Pharmacol* (2012) 258:82–8. doi: 10.1016/j.taap.2011.10.010
  40. García-García E, Uribe-Querol E, Rosales C. A Simple and Efficient Method to Detect Nuclear Factor Activation in Human Neutrophils by Flow Cytometry. *J Vis Exp* (2013) 74:e50410. doi: 10.3791/50410
  41. Fruman DA, Gamache DA, Ernest MJ. Changes in Inositol 1,4,5-Trisphosphate Mass in Agonist-Stimulated Human Neutrophils. *Agents Actions* (1991) 34:16–9. doi: 10.1007/BF01993225
  42. Krause KH, Schlegel W, Wollheim CB, Andersson T, Waldvogel FA, Lew PD. Chemotactic Peptide Activation of Human Neutrophils and HL-60 Cells. Pertussis Toxin Reveals Correlation Between Inositol Trisphosphate Generation, Calcium Ion Transients, and Cellular Activation. *J Clin Invest* (1985) 76:1348–54. doi: 10.1172/JCI112109
  43. Looney RJ, Abraham GN, Anderson CL. Human Monocytes and U937 Cells Bear Two Distinct Fc Receptors for IgG. *J Immunol* (1986) 136:1641–7.
  44. Fleit HB, Wright SD, Unkeless JC. Human Neutrophil Fc Gamma Receptor Distribution and Structure. *Proc Natl Acad Sci USA* (1982) 79:3275–9. doi: 10.1073/pnas.79.10.3275
  45. Rosales C, Brown EJ. Two Mechanisms for IgG Fc Receptor-Mediated Phagocytosis by Human Neutrophils. *J Immunol* (1991) 146:3937–44.
  46. Rosales C, Brown EJ. Calcium Channel Blockers Nifedipine and Diltiazem Inhibit  $Ca^{2+}$  Release From Intracellular Stores in Neutrophils. *J Biol Chem* (1992) 267:1443–8. doi: 10.1016/S0021-9258(18)45965-0
  47. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A New Generation of  $Ca^{2+}$  Indicators With Greatly Improved Fluorescence Properties. *J Biol Chem* (1985) 260:3440–50. doi: 10.1016/S0021-9258(19)83641-4
  48. Rosales C. Neutrophil: A Cell With Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? *Front Physiol* (2018) 9:113. doi: 10.3389/fphys.2018.00113
  49. Anderson R, Goolam Mahomed A. Calcium Efflux and Influx in F-Met-Leu-Phe (fMLP)-activated Human Neutrophils are Chronologically Distinct Events. *Clin Exp Immunol* (1997) 110:132–8. doi: 10.1046/j.1365-2249.1997.5051403.x
  50. Cai C, Tang S, Wang X, Cai S, Meng X, Zou W, et al. Requirement for Both Receptor-Operated and Store-Operated Calcium Entry in N-formyl-methionine-leucine-phenylalanine-induced Neutrophil Polarization. *Biochem Biophys Res Commun* (2013) 430:816–21. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.11.063
  51. Steinckwich N, Schenten V, Melchior C, Bréchart S, Tschirhart EJ. An Essential Role of STIM1, Orai1, and S100A8-A9 Proteins for  $Ca^{2+}$  Signaling and FcγR-Mediated Phagosomal Oxidative Activity. *J Immunol* (2011) 186:2182–91. doi: 10.4049/jimmunol.1001338
  52. Futosi K, Fodor S, Mócsai A. Neutrophil Cell Surface Receptors and Their Intracellular Signal Transduction Pathways. *Int Immunopharmacol* (2013) 17:638–50. doi: 10.1016/j.intimp.2013.06.034
  53. Schepetkin IA, Khlebnikov AI, Kirpotina LN, Quinn MT. Antagonism of Human Formyl Peptide Receptor 1 With Natural Compounds and Their

- Synthetic Derivatives. *Int Immunopharmacol* (2016) 37:43–58. doi: 10.1016/j.intimp.2015.08.036
54. Nauseef WM. Identification and Quantitation of Superoxide Anion: Essential Steps in Elucidation of the Phagocyte “Respiratory Burst”. *J Immunol* (2014) 193:5357–8. doi: 10.4049/jimmunol.1402580
  55. Nguyen GT, Green ER, Meccas J. Neutrophils to the ROScUE: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance. *Front Cell Infect Microbiol* (2017) 7:373. doi: 10.3389/fcimb.2017.00373
  56. Nauseef WM, Volpp BD, McCormick S, Leidal KG, Clark RA. Assembly of the Neutrophil Respiratory Burst Oxidase. Protein Kinase C Promotes Cytoskeletal and Membrane Association of Cytosolic Oxidase Components. *J Biol Chem* (1991) 266:5911–7. doi: 10.1016/S0021-9258(19)67684-2
  57. Verhoeven AJ, Leusen JH, Kessels GC, Hilarius PM, de Bont DB, Liskamp RM. Inhibition of Neutrophil NADPH Oxidase Assembly by a Myristoylated Pseudosubstrate of Protein Kinase C. *J Biol Chem* (1993) 268:18593–8. doi: 10.1016/S0021-9258(17)46669-5
  58. Immler R, Simon SI, Sperandio M. Calcium Signalling and Related Ion Channels in Neutrophil Recruitment and Function. *Eur J Clin Invest* (2018) 48:e12964. doi: 10.1111/eci.12964
  59. Heiner I, Eisfeld J, Lückhoff A. Role and Regulation of TRP Channels in Neutrophil Granulocytes. *Cell Calcium* (2003) 33:533–40. doi: 10.1016/S0143-4160(03)00058-7
  60. Heiner I, Eisfeld J, Halaszovich CR, Wehage E, Jüngling E, Zitt C, et al. Expression Profile of the Transient Receptor Potential (TRP) Family in Neutrophil Granulocytes: Evidence for Currents Through Long TRP Channel 2 Induced by ADP-ribose and NAD. *Biochem J* (2003) 371:1045–53. doi: 10.1042/BJ20021975
  61. Naziroğlu M. New Molecular Mechanisms on the Activation of TRPM2 Channels by Oxidative Stress and ADP-Ribose. *Neurochem Res* (2007) 32:1990–2001. doi: 10.1007/s11064-007-9386-x
  62. Li J, Gao Y, Bao X, Li F, Yao W, Feng Z, et al. TRPM2: A Potential Drug Target to Retard Oxidative Stress. *Front Biosci (Landmark Ed)* (2017) 22:1427–38. doi: 10.2741/4551
  63. Borregaard N. Neutrophils, From Marrow to Microbes. *Immunity* (2010) 33:657–70. doi: 10.1016/j.immuni.2010.11.011
  64. Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. The Multifaceted Functions of Neutrophils. *Annu Rev Pathol* (2014) 9:181–218. doi: 10.1146/annurev-pathol-020712-164023
  65. Fine N, Tasevski N, McCulloch CA, Tenenbaum HC, Glogauer M. The Neutrophil: Constant Defender and First Responder. *Front Immunol* (2020) 11:571085. doi: 10.3389/fimmu.2020.571085
  66. Nauseef WM, Borregaard N. Neutrophils At Work. *Nat Immunol* (2014) 15:602–11. doi: 10.1038/ni.2921
  67. Dupré-Crochet S, Erard M, Nüße O. ROS Production in Phagocytes: Why, When, and Where? *J Leukoc Biol* (2013) 94:657–70. doi: 10.1189/jlb.1012544
  68. Zeng MY, Miralda I, Armstrong CL, Uriarte SM, Bagaitkar J. The Roles of NADPH Oxidase in Modulating Neutrophil Effector Responses. *Mol Oral Microbiol* (2019) 34:27–38. doi: 10.1111/omi.12252
  69. Nunes P, Demaurex N. The Role of Calcium Signaling in Phagocytosis. *J Leukoc Biol* (2010) 88:57–68. doi: 10.1189/jlb.0110028
  70. Hann J, Bueb JL, Tolle F, Brécharde S. Calcium Signaling and Regulation of Neutrophil Functions: Still a Long Way to Go. *J Leukoc Biol* (2020) 107:285–97. doi: 10.1002/JLB.3RU0719-241R
  71. Demaurex N, Nunes P. The Role of STIM and ORAI Proteins in Phagocytic Immune Cells. *Am J Physiol Cell Physiol* (2016) 310:C496–508. doi: 10.1152/ajpcell.00360.2015
  72. Kimberly RP, Ahlstrom JW, Click ME, Edberg JC. The Glycosyl Phosphatidylinositol-Linked Fc Gamma RIII PMN Mediates Transmembrane Signaling Events Distinct From Fc Gamma RII. *J Exp Med* (1990) 171:1239–55. doi: 10.1084/jem.171.4.1239
  73. Hundt M, Schmidt RE. The Glycosylphosphatidylinositol-Linked Fc Gamma Receptor III Represents the Dominant Receptor Structure for Immune Complex Activation of Neutrophils. *Eur J Immunol* (1992) 22:811–6. doi: 10.1002/eji.1830220327
  74. Bagur R, Hajnóczky G. Intracellular  $Ca^{2+}$  Sensing: Its Role in Calcium Homeostasis and Signaling. *Mol Cell* (2017) 66:780–8. doi: 10.1016/j.molcel.2017.05.028
  75. Li Z, Jiang H, Xie W, Zhang Z, Smrcka AV, Wu D. Roles of PLC-beta2 and -Beta3 and PI3Kgamma in Chemoattractant-Mediated Signal Transduction. *Science* (2000) 287:1046–9. doi: 10.1126/science.287.5455.1046
  76. Jakus Z, Simon E, Frommhold D, Sperandio M, Mócsai A. Critical Role of Phospholipase Cgamma2 in Integrin and Fc Receptor-Mediated Neutrophil Functions and the Effector Phase of Autoimmune Arthritis. *J Exp Med* (2009) 206:577–93. doi: 10.1084/jem.20081859
  77. Streb H, Irvine RF, Berridge MJ, Schulz I. Release of  $Ca^{2+}$  From a Nonmitochondrial Intracellular Store in Pancreatic Acinar Cells by Inositol-1,4,5-Trisphosphate. *Nature* (1983) 306:67–9. doi: 10.1038/306067a0
  78. Várnai P, Hunyady L, Balla T. STIM and Orai: The Long-Awaited Constituents of Store-Operated Calcium Entry. *Trends Pharmacol Sci* (2009) 30:118–28. doi: 10.1016/j.tips.2008.11.005
  79. Scrimgeour N, Litjens T, Ma L, Barritt GJ, Rychkov GY. Properties of Orai1 Mediated Store-Operated Current Depend on the Expression Levels of STIM1 and Orai1 Proteins. *J Physiol* (2009) 587:2903–18. doi: 10.1113/jphysiol.2009.170662
  80. Lunz V, Romanin C, Frischauf I. STIM1 Activation of Orai1. *Cell Calcium* (2019) 77:29–38. doi: 10.1016/j.ceca.2018.11.009
  81. DeHaven WI, Jones BF, Petranksa JG, Smyth JT, Tomita T, Bird GS, et al. TRPC Channels Function Independently of STIM1 and Orai1. *J Physiol* (2009) 587:2275–98. doi: 10.1113/jphysiol.2009.170431
  82. Salmon MD, Ahluwalia J. Pharmacology of Receptor Operated Calcium Entry in Human Neutrophils. *Int Immunopharmacol* (2011) 11:145–8. doi: 10.1016/j.intimp.2010.11.006
  83. Putney JW, Steinckwich-Besançon N, Numaga-Tomita T, Davis FM, Desai PN, D’Agostin DM, et al. The Functions of Store-Operated Calcium Channels. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* (2017) 1864:900–6. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.11.028
  84. Lopez JJ, Jardin I, Albarrán L, Sanchez-Collado J, Cantonero C, Salido GM, et al. Molecular Basis and Regulation of Store-Operated Calcium Entry. *Adv Exp Med Biol* (2020) 1131:445–69. doi: 10.1007/978-3-030-12457-1\_17
  85. Nishida M, Hara Y, Yoshida T, Inoue R, Mori Y. TRP Channels: Molecular Diversity and Physiological Function. *Microcirculation* (2006) 13:535–50. doi: 10.1080/10739680600885111
  86. Sakaguchi R, Mori Y. Transient Receptor Potential (TRP) Channels: Biosensors for Redox Environmental Stimuli and Cellular Status. *Free Radic Biol Med* (2020) 146:36–44. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.10.415
  87. Ma HT, Peng Z, Hiragun T, Iwaki S, Gilfillan AM, Beaven MA. Canonical Receptor Potential 5 Channel in Conjunction With Orai1 and STIM1 Allows  $Sr^{2+}$  Entry, Optimal Influx of  $Ca^{2+}$ , and Degranulation in a Rat Mast Cell Line. *J Immunol* (2008) 180:2233–9. doi: 10.4049/jimmunol.180.4.2233
  88. Demaurex N, Saul S. The Role of STIM Proteins in Neutrophil Functions. *J Physiol* (2018) 596:2699–708. doi: 10.1113/JP275639
  89. Ortiz-Stern A, Rosales C. FcyRIIb Stimulation Promotes  $\beta 1$  Integrin Activation in Human Neutrophils. *J Leukoc Biol* (2005) 77:787–99. doi: 10.1189/jlb.0504310
  90. Marois L, Paré G, Vaillancourt M, Rollet-Labelle E, Naccache PH. FcyRIIb Triggers Raft-Dependent Calcium Influx in IgG-mediated Responses in Human Neutrophils. *J Biol Chem* (2011) 286:3509–19. doi: 10.1074/jbc.M110.169516
  91. Itagaki K, Hauser CJ. Sphingosine 1-Phosphate, a Diffusible Calcium Influx Factor Mediating Store-Operated Calcium Entry. *J Biol Chem* (2003) 278:27540–7. doi: 10.1074/jbc.M301763200
  92. Lepannetier S, Zanou N, Yerna X, Emeriau N, Dufour I, Masquelier J, et al. Sphingosine-1-Phosphate-Activated TRPC1 Channel Controls Chemotaxis of Glioblastoma Cells. *Cell Calcium* (2016) 60:373–83. doi: 10.1016/j.ceca.2016.09.002
  93. Gamberucci A, Giuriso E, Pizzo P, Tassi M, Giunti R, McIntosh DP, et al. Diacylglycerol Activates the Influx of Extracellular Cations in T-lymphocytes Independently of Intracellular Calcium-Store Depletion and Possibly Involving Endogenous TRP6 Gene Products. *Biochem J* (2002) 364:245–54. doi: 10.1042/bj3640245
  94. Ogawa N, Kurokawa T, Mori Y. Sensing of Redox Status by TRP Channels. *Cell Calcium* (2016) 60:115–22. doi: 10.1016/j.ceca.2016.02.009

95. Nazırođlu M. TRPM2 Cation Channels, Oxidative Stress and Neurological Diseases: Where are We Now? *Neurochem Res* (2011) 36:355–66. doi: 10.1007/s11064-010-0347-4
96. Knowles H, Heizer JW, Li Y, Chapman K, Ogden CA, Andreasen K, et al. Transient Receptor Potential Melastatin 2 (TRPM2) Ion Channel is Required for Innate Immunity Against *Listeria Monocytogenes*. *Proc Natl Acad Sci USA* (2011) 108:11578–83. doi: 10.1073/pnas.1010678108
97. Qian X, Zhao H, Chen X, Li J. Disruption of Transient Receptor Potential Melastatin 2 Decreases Elastase Release and Bacterial Clearance in Neutrophils. *Innate Immun* (2018) 24:122–30. doi: 10.1177/1753425918759181
98. Zhang Z, Cui P, Zhang K, Chen Q, Fang X. Transient Receptor Potential Melastatin 2 Regulates Phagosome Maturation and is Required for Bacterial Clearance in *Escherichia coli* sepsis. *Anesthesiology* (2017) 126:128–39. doi: 10.1097/ALN.0000000000001430
99. Tripathi JK, Sharma A, Sukumaran P, Sun Y, Mishra BB, Singh BB, et al. Oxidant Sensor Cation Channel TRPM2 Regulates Neutrophil Extracellular Trap Formation and Protects Against Pneumoseptic Bacterial Infection. *FASEB J* (2018) 32:6848–59. doi: 10.1096/fj.201800605
100. Wang L, Negro R, Wu H. TRPM2, Linking Oxidative Stress and  $Ca^{2+}$  Permeation to NLRP3 Inflammasome Activation. *Curr Opin Immunol* (2020) 62:131–5. doi: 10.1016/j.coi.2020.01.005
101. Zhong Z, Zhai Y, Liang S, Mori Y, Han R, Sutterwala FS, et al. TRPM2 Links Oxidative Stress to NLRP3 Inflammasome Activation. *Nat Commun* (2013) 4:1611. doi: 10.1038/ncomms2608
102. Sumoza-Toledo A, Lange I, Cortado H, Bhagat H, Mori Y, Fleig A, et al. Dendritic Cell Maturation and Chemotaxis is Regulated by TRPM2-mediated Lysosomal  $Ca^{2+}$  Release. *FASEB J* (2011) 25:3529–42. doi: 10.1096/fj.10-178483
103. Cruz-Torres I, Backos DS, Herson PS. Characterization and Optimization of the Novel Transient Receptor Potential Melastatin 2 Antagonist TatM2NX. *Mol Pharmacol* (2020) 97:102–11. doi: 10.1124/mol.119.117549
104. Luo X, Li M, Zhan K, Yang W, Zhang L, Wang K, et al. Selective Inhibition of TRPM2 Channel by Two Novel Synthesized ADPR Analogues. *Chem Biol Drug Des* (2018) 91:552–66. doi: 10.1111/cbdd.13119
105. Perraud AL, Takanishi CL, Shen B, Kang S, Smith MK, Schmitz C, et al. Accumulation of Free ADP-ribose From Mitochondria Mediates Oxidative Stress-Induced Gating of TRPM2 Cation Channels. *J Biol Chem* (2005) 280:6138–48. doi: 10.1074/jbc.M411446200
106. Fliegert R, Bauche A, Wolf Pérez AM, Watt JM, Rozewitz MD, Winzer R, et al. 2'-Deoxyadenosine 5'-Diphosphoribose is an Endogenous TRPM2 Superagonist. *Nat Chem Biol* (2017) 13:1036–44. doi: 10.1038/nchembio.2415
107. Yu P, Xue X, Zhang J, Hu X, Wu Y, Jiang LH, et al. Identification of the ADPR Binding Pocket in the NUDT9 Homology Domain of TRPM2. *J Gen Physiol* (2017) 149:219–35. doi: 10.1085/jgp.201611675
108. Kühn FJP. Structure-Function Relationship of TRPM2: Recent Advances, Contradictions, and Open Questions. *Int J Mol Sci* (2020) 21:6481. doi: 10.3390/ijms21186481
109. Xia S, Wang L, Fu TM, Wu H. Mechanism of TRPM2 Channel Gating Revealed by Cryo-EM. *FEBS J* (2019) 286:3333–9. doi: 10.1111/febs.14939
110. Balasubramanian N, Advani SH, Zingde SM. Protein Kinase C Isoforms in Normal and Leukemic Neutrophils: Altered Levels in Leukemic Neutrophils and Changes During Myeloid Maturation in Chronic Myeloid Leukemia. *Leuk Res* (2002) 26:67–81. doi: 10.1016/s0145-2126(01)00098-4
111. Gray RD, Lucas CD, MacKellar A, Li F, Hiersemenzel K, Haslett C, et al. Activation of Conventional Protein Kinase C (PKC) is Critical in the Generation of Human Neutrophil Extracellular Traps. *J Inflamm (Lond)* (2013) 10:12. doi: 10.1186/1476-9255-10-12

**Conflict of Interest:** The authors declare that this research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Alemán, Mora and Rosales. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## Capítulo IV

### Discusión.

Los neutrófilos son los leucocitos más abundantes en la circulación sanguínea y tienen una vida media corta de entre 8 a 12 horas, además representan la primera línea de defensa contra las infecciones. Cuando los neutrófilos son reclutados a los sitios de infección, pueden desplegar distintas estrategias para combatir a los microorganismos patógenos, como la degranulación, la fagocitosis, la producción de ROS o la formación de NETs [8]. Además, los neutrófilos pueden participar en la regulación de la respuesta inmune adaptativa secretando citocinas [54]. Para poder coordinar todas estas funciones, el neutrófilo cuenta con una gran variedad de receptores que regulan una gran cantidad de vías de señalización [55]. De los receptores más importantes en la superficie de los neutrófilos están los FcγR [7]. Los neutrófilos emplean a los FcγR para el reconocimiento y eliminación de los patógenos opsonizados con IgG [9]. De la variedad de FcγR, los neutrófilos expresan tanto el FcγRIIa como el FcγRIIIb [10; 11]. Se ha descrito que cada uno de los FcγR activa distintas respuestas celulares en el neutrófilo humano. Mientras que el FcγRIIa activa la fagocitosis el FcγRIIIb induce la producción de NET [16; 17]. Si bien se ha descrito una función celular para cada uno de los FcγR del neutrófilo humano, sus vías de señalización no se han descrito por completo. Sin embargo, se sabe que ambos FcγR en la superficie del neutrófilo humano, pueden activar PKC [17]. Las PKC son una familia de cinasas, y se ha descrito que, los neutrófilos humanos pueden expresar a las isoformas PKCα, PKCβ, PKCδ y PKCζ [28; 29]. No obstante, no se conoce que isoformas de PKC puede activar cada uno de los FcγR, en el neutrófilo humano. En este trabajo se describió por primera vez, que cada uno de los FcγR activan diferentes isoformas de PKC, para mediar cada una de sus vías de señalización.

Se ha descrito que tanto el FcγRIIa como el FcγRIIIb inducen la producción de ROS empleando el complejo NADPH-oxidasa [17; 56]. Para que el complejo NADPH-oxidasa sea funcional debe ser ensamblado. Las subunidades membranales gp91<sup>phox</sup> y p22<sup>phox</sup>, deben ensamblarse con las subunidades citosólicas p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> y la GTPasa pequeña Rac2. Una vez ensamblado, el complejo NADPH-oxidasa es capaz de producir superóxido eficientemente [57; 58]. Se ha descrito, que las distintas isoformas de la familia de las PKC son capaces de fosforilar a la subunidad citoplasmática p47<sup>phox</sup>, y así inducir el ensamblaje del complejo NADPH-oxidasa. Utilizando proteínas

recombinantes, se ha descrito que las isoformas de PKC que expresa el neutrófilo, PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ , PKC $\delta$  y PKC $\zeta$ , son capaces de fosforilar a p47<sup>phox</sup>, promoviendo que el complejo NADPH-oxidasa sea ensamblado y por lo tanto mediando la producción de superóxido [59]. En este trabajo, se describió que cada uno de los Fc $\gamma$ R del neutrófilo humano, requiere de la activación de diferentes isoformas de PKC para inducir la producción de ROS. Mientras que el Fc $\gamma$ RIIa, requiere de la activación de PKC $\alpha$  y PKC $\delta$ , el Fc $\gamma$ RIIIb requiere de la activación de PKC $\alpha$  y PKC $\beta$ , para la producción de ROS (Figura 9). Además, en este trabajo se describió que tanto el Fc $\gamma$ RIIa como el Fc $\gamma$ RIIIb requieren de la activación de Syk para producir ROS (Figura 9). Por otro lado, se describió que, al estimular a los neutrófilos con PMA se requiere de la activación de PKC $\alpha$  y PKC $\beta$  para producir ROS (Figura 8). Además, se conoce que estimulando con fMLF, los neutrófilos requieren de la activación de PKC $\delta$  para producir ROS [60]. En conjunto, estos datos sugieren que, dependiendo del estímulo los neutrófilos pueden emplear distintas isoformas de PKC para inducir la activación del complejo NADPH-oxidasa y la producción de ROS. Por otro lado, el uso diferencial de las isoformas de PKC que expresa el neutrófilo por cada uno de los Fc $\gamma$ R en el neutrófilo humano, podría explicar por qué el Fc $\gamma$ RIIIb produce más ROS que el Fc $\gamma$ RIIa (Figura 7). Además, se sabe que la producción de ROS puede localizarse dentro del fagosoma o directamente al medio extracelular [61]. Se ha descrito que la localización de la producción de ROS puede depender de la activación diferencial de las isoformas de PKC. Cuando se da la activación de PKC $\delta$  se promueve el ensamblaje del complejo NADPH-oxidasa en la membrana intracelular, por lo tanto, se da la producción intracelular de ROS. Mientras que al activarse PKC $\beta$  o PKC $\zeta$  se promueve el ensamblaje del complejo NADPH-oxidasa en la membrana celular, por lo tanto, se da la producción extracelular de ROS [62]. Por lo tanto, es posible que diferentes isoformas de PKC dirijan las subunidades citoplasmáticas del complejo NADPH-oxidasa a diferentes membranas de la célula mediando la localización de la producción de ROS. En este trabajo se describió que el Fc $\gamma$ RIIa, requiere de la activación de PKC $\alpha$  y PKC $\delta$ , el Fc $\gamma$ RIIIb requiere de la activación de PKC $\alpha$  y PKC $\beta$ , para la producción de ROS (Figura 9). Por lo tanto, es posible que el Fc $\gamma$ RIIa induzca la producción intracelular de ROS, mientras que, el Fc $\gamma$ RIIIb induzca la producción extracelular de ROS. En el futuro podría investigarse donde se da la producción de ROS mediada por cada uno de los Fc $\gamma$ R del neutrófilo humano.

Otra función importante que es activada por cada uno de los Fc $\gamma$ R en el neutrófilo humano, es el incremento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> [24]. Sin embargo, se han descrito diferencias en el mecanismo activado por cada uno de los Fc $\gamma$ R para inducir la movilización de Ca<sup>2+</sup> al citoplasma del neutrófilo. Mientras que el

FcγRIIa requiere de la producción de IP<sub>3</sub> para inducir el incremento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, el FcγRIIIb induce el incremento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> sin producir IP<sub>3</sub> [25]. En este trabajo, se describió por primera vez que el FcγRIIIb requiere de la activación tanto de PKCα como del canal TRPM2 para inducir el incremento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (Figura 11 y Figura 16). Además, tanto el FcγRIIa como el FcγRIIIb requieren de la activación de Syk para inducir el incremento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (Figura 15).

El incremento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, es un paso fundamental para regular diferentes respuestas en el neutrófilo humano como la fagocitosis y la producción de ROS [9]. Por lo tanto, el flujo de calcio al interior del neutrófilo es un mecanismo que es cuidadosamente regulado por la célula. En estado de reposo, la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en los neutrófilos humanos esta alrededor de 100 nM. Una vez que el neutrófilo es activado la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> se incrementa hasta alrededor del doble, es decir 200 nM (Figura 10). Se ha descrito que para la mayoría de los FcγR se activa PLCγ1 y PLCγ2 (del inglés Phospholipase C). PLC actúa sobre PIP<sub>2</sub> (del inglés phosphatidylinositol 4,5 biphosphate), para producir DAG e IP<sub>3</sub>. IP<sub>3</sub> se une a su receptor (IP<sub>3</sub>R) en el retículo endoplásmico. IP<sub>3</sub>R actúa como un canal no selectivo para Ca<sup>2+</sup>, por lo tanto, su activación induce la liberación de Ca<sup>2+</sup> del retículo endoplásmico al citoplasma [9]. El vaciamiento del retículo endoplásmico, es censado por la proteína STIM1 (del inglés stromal interaction molecule 1) e induce la activación de canales para Ca<sup>2+</sup>, por ejemplo, Ora1 en la membrana celular, regulando la entrada de Ca<sup>2+</sup> del exterior al interior de la célula. Este mecanismo es conocido como entrada capacitativa de Ca<sup>2+</sup> o SOCE (del inglés Store-Operated Calcium Entry) [63]. Se ha sugerido que, los FcγR emplea el mecanismo SOCE para inducir el incremento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> [51; 52].

Por otro lado, se ha descrito que el FcγRIIIb induce el incremento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, en un mecanismo independiente de la producción de IP<sub>3</sub> [25]. Por lo tanto, es posible que el FcγRIIIb active un mecanismo de regulación del incremento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, que sea independiente de la producción de IP<sub>3</sub>, es decir, un mecanismo diferente al mecanismo SOCE. Se sabe que, el mecanismo SOCE no es el único mecanismo de regulación del incremento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, existe otro mecanismo que regula el flujo de Ca<sup>2+</sup> conocido como ROCE (del inglés Receptor-Operated Calcium Entry). Además, se conoce que, el mecanismo ROCE, es independiente del vaciamiento de depósitos intracelulares y la apertura de los canales pertenecientes al mecanismo ROCE, se puede inducir por la activación de receptores en la membrana y la producción de segundos mensajeros [50].

Un grupo de canales catiónicos que pueden participar en el mecanismo ROCE, es la familia de los canales TRP (del inglés Transient Receptor Potential channels). Se ha descrito que, los canales TRP están involucrados en la percepción sensorial, y su apertura puede ser inducida por estímulos mecánicos, cambios de pH, temperatura y estrés oxidativo [41]. De la gran cantidad de canales TRP se ha descrito que, los neutrófilos humanos pueden expresar los canales TRPC1, TRPC3, TRPC4, TRPC6, TRPM2, TRPV1, TRPV2, TRPV4, TRPV5, and TRPV6 [64; 65]. Además, de estos canales catiónicos, se ha descrito que el canal TRPM2 puede ser activado por la producción de ROS y por la activación de PKC [46; 47]. Además, en el pasado se describió que el FcγRIIIb, requiere de la activación de PKC y de la producción de ROS [23]. Por lo tanto, en este trabajo se evaluó la posibilidad de que el canal TRPM2, este involucrado en el mecanismo activado por el FcγRIIIb para inducir el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$ .

En este trabajo se mostró que, en presencia de dos inhibidores para el canal TRPM2, 2APB y clotrimazol, se disminuye el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por el FcγRIIIb. Sin embargo, tanto el 2APB como el clotrimazol no logran disminuir por completo el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por el FcγRIIIb (Figura 16). Por lo tanto, existe la posibilidad de que otro u otros canales catiónicos estén involucrados, en el mecanismo activado por el FcγRIIIb para inducir el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Por ejemplo, se ha descrito que, el canal TRPV4 puede ser activado en presencia de PMA un fuerte activador de PKC [66]. Además, se ha descrito que el canal TRPV1 es capaz de activarse mediante el complejo NADPH-oxidasa y PKC [46]. Adicionalmente, se sabe que tanto el TRPV1 como el TRPV4 requieren de fosforilaciones en residuos de serina en la región carboxilo terminal para inducir su activación, los cuales son mediados por PKC [67]. Además, se ha descrito que en la región carboxilo terminal, diferentes miembros de la familia de los TRP, presentan múltiples serinas y treoninas susceptibles a fosforilación y mediar su activación, además, se ha descrito que las isoformas de PKC pueden mediar este mecanismo [68]. Por lo tanto, es posible que tanto el TRPV4 como el TRPV1, algún otro miembro de la familia de los TRP o algún otro canal catiónico participen en el mecanismo activado por el FcγRIIIb para inducir el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Actualmente, existen en el mercado fármacos que inhiben selectivamente la actividad tanto del TRPV4 como del TRPV1, por lo tanto, en el futuro podría investigarse si estos canales participan en el mecanismo activado por el FcγRIIIb para inducir el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Además, es posible que el mecanismo de activación del canal TRPM2 empleado por el FcγRIIIb, requiera de fosforilaciones en residuos de serina mediados directamente por PKC, otra posibilidad que puede investigarse en futuros estudios.

Si bien los datos obtenidos en este trabajo sugieren que la participación del canal TRPM2 en la vía de señalización activada por el FcγRIIIb (Figura 16), no se describió el mecanismo exacto por el cual el FcγRIIIb activa al canal TRPM2. Se ha descrito que la activación del canal TRPM2 puede inducirse por la acumulación de ADPR. En la región carboxilo terminal, el TRPM2 contiene una secuencia de reconocimiento de ADPR conocida como NUDT9 (del inglés nucleotide diphosphate linked moiety type hydrolase motif 9). Además, se conoce que el estrés oxidativo induce la acumulación de ADPR en el interior de la célula [69; 70; 71]. Adicionalmente, en distintos reportes y en este trabajo se demostró que el FcγRIIIb induce la producción de ROS (Figura 7) [17]. Por lo tanto, en el futuro sería importante enfocar esfuerzos para investigar si el FcγRIIIb induce la acumulación de ADPR en el neutrófilo humano y si la acumulación de ADPR induce la activación del canal TRPM2.

Por otro lado, se conoce que los receptores FcγR del neutrófilo humano, inducen la fosforilación de ERK [17; 22; 23]. Sin embargo, el mecanismo empleado por cada uno de los de los FcγR del neutrófilo humano parece ser diferente. El FcγRIIa es un receptor que contiene una secuencia ITAM, por lo tanto, al activarse, cinasas del grupo de las SFK (del inglés Src family kinase), fosforilan residuos de tirosina contenidos en la secuencia ITAM. Estas tirosinas fosforiladas, se convierten en sitios de unión para la cinasa Syk, lo cual induce su activación. Una vez activada, Syk puede inducir la activación de la vía MEK-ERK, vía crucial para regular la fagocitosis en el neutrófilo humano. Por otro lado, el FcγRIIIb es un receptor que anclado a la monocapa externa de la membrana por un enlace GPI y no se asocia a una secuencia ITAM, además, no se conocen subunidades asociadas a este receptor que regulen su vía de señalización [9]. Sin embargo, se ha establecido que el FcγRIIIb induce la activación de vías de señalización al interior del neutrófilo humano. Si bien las señales iniciales al activarse el FcγRIIIb son desconocidas, se sabe que de alguna forma el FcγRIIIb puede inducir la activación de Syk seguido de la activación de TAK1 para así activar la vía de señalización MEK-ERK, esta vía es crucial para inducir la producción de NETs en el neutrófilo humano [17; 23].

Por otro lado, se ha demostrado que en linfocitos T citotóxicos de ratón se requiere de la actividad de PKCθ para inducir la fosforilación de ERK. Además, en la línea celular de páncreas Panc-1, se requiere de la actividad de PKCε para inducir la fosforilación de ERK [31; 32]. Por lo tanto, en este trabajo se evaluó la posibilidad de que alguna de las isoformas de PKC expresadas por el neutrófilo, participen en el mecanismo empleado por cada uno de los FcγR para inducir la fosforilación de ERK.



En este trabajo se describió que el FcγRIIIb requiere de la activación de PKCα para inducir la fosforilación de ERK (Figura 11). Sin embargo, no exploramos el mecanismo exacto por el cual el FcγRIIIb emplea a PKCα para inducir la fosforilación de ERK. Se conoce, que el mecanismo requerido para la fosforilación de ERK requiere de la cinasa MEK [72; 73]. Además, se ha descrito que utilizando un inhibidor específico para MEK, se impide la fosforilación de ERK posterior a la estimulación del FcγRIIIb [23]. Para su activación, MEK requiere de la fosforilación de dos residuos de serina en su región de activación [74], y se ha descrito que diferentes activadores pueden mediar estas fosforilaciones, tales como Raf y Mos [75]. Por otro lado, se sabe que las PKC pertenecen al grupo de las serina-treonina cinasas [27], por lo tanto, es posible que el FcγRIIIb utilice a PKCα para inducir la activación de MEK y así mediar la fosforilación de ERK en el neutrófilo humano. Por otro lado, se ha descrito que el FcγRIIIb y no el FcγRIIIa induce el incremento de la fosforilación de ERK en el núcleo del neutrófilo [76]. Sin embargo, no se ha descrito el mecanismo exacto de dicho incremento. Por lo tanto, es posible que el FcγRIIIb requiera de la activación de PKCα o de alguna otra isoforma de PKC que expresa el neutrófilo, para inducir el incremento de la fosforilación de ERK en el núcleo del neutrófilo, posibilidades que puede investigarse en futuros estudios.

En este trabajo se describió por primera vez, que cada FcγR activa diferentes isoformas de PKC, sin embargo, no se describió el mecanismo por el cual los FcγR activan cada una de las isoformas de PKC que emplean para regular su vía de señalización. Las isoformas de PKC que expresa el neutrófilo humano son PKCα, PKCβ, PKCδ y PKCζ. Las cuales se sabe tienen diferentes mecanismos de activación. PKCα y PKCβ son dependientes de Ca<sup>2+</sup> y requieren de DAG para su activación. La PKCδ es independiente del Ca<sup>2+</sup> pero requiere de DAG para lograr activarse. Por último, la PKCζ es independiente de Ca<sup>2+</sup> y requiere de fosfatidilserina para su activación [27; 28]. Como se describió anteriormente, el FcγRIIIa requiere de la activación tanto de PKCα como de PKCδ para inducir la producción de ROS (Figura 9). Se ha reportado que el FcγRIIIa induce la producción de IP<sub>3</sub> [25], IP<sub>3</sub> es reconocido por su receptor canal en el retículo endoplásmico, lo cual provoca el flujo de Ca<sup>2+</sup> proveniente del retículo endoplásmico. Por otro lado, se sabe que la PLC (del inglés Phospholipase C) produce tanto IP<sub>3</sub> como DAG a partir de fosfatidilinositol 4,5 bifosfato [9]. Por lo tanto, es posible que el mecanismo empleado por el FcγRIIIa para activar a PKCα sea la producción de DAG y el flujo de Ca<sup>2+</sup>. Por otro lado, la producción de DAG podría inducir la activación de PKCδ. Además, en este trabajo se describió que el FcγRIIIb induce la activación tanto de PKCα como de PKCβ para inducir la producción de ROS (Figura 9). Sin embargo, se ha descrito que el FcγR no induce la producción de IP<sub>3</sub> [25], por lo

tanto, es posible que el FcγRIIIb no induzca la producción de DAG. Además, se ha descrito que el FcγRIIIb puede inducir el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  independiente de la producción de  $IP_3$ . Por otro lado, en este trabajo se describió que el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por el FcγRIIIb requiere de la activación de PKCα (Figura 11). Por lo tanto, es posible que el FcγRIIIb induzca la activación tanto de PKCα como de PKCβ por un mecanismo independiente tanto de DAG y el flujo de  $Ca^{2+}$ . Además, se sabe que los FcγR pueden inducir la activación de Syk, la activación de Syk puede inducir la activación de PLCγ induciendo la producción de DAG e  $IP_3$ .  $IP_3$  induce el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  y juntos DAG y  $Ca^{2+}$  pueden inducir la activación de PKC, por lo tanto, existe una relación indirecta de Syk con PKC. Sin embargo, se ha reportado que en células cebadas al activar el FcεRI la activación tanto de PKCα como de PKCβ es mediada por fosforilación en residuos de tirosina empleando Syk [77; 78]. Y se sabe que el FcγRIIIb requiere de la activación de Syk para mediar su vía de señalización [17; 23] Por lo tanto, es posible que el FcγRIIIb induzca la activación tanto de PKCα como de PKCβ fosforilando residuos de tirosina empleado a Syk, posibilidad que puede investigarse en futuros estudios.

Por último, una de las limitantes más importantes que se presentan en el campo de la transducción de señales de los FcγR del neutrófilo humano es su tiempo de vida media muy corta que va de las 8 a las 12 horas en el torrente sanguíneo [8], lo cual dificulta la manipulación genética de estas células en el laboratorio. Por otro lado, hasta la fecha no existen modelos animales o líneas celulares que asemejen la expresión de los FcγR del neutrófilo humano, lo que presenta otra dificultad en el estudio de la vía de señalización medida por estos receptores en el neutrófilo. Una alternativa es la línea celular de leucemia promielocítica humana HL-60, la cual expresa de forma constitutiva a el FcγRIIa, sin embargo, no expresa al FcγRIIIb [79]. Por lo tanto, las células HL-60, representan un buen candidato para el diseño de un modelo experimental de los FcγR del neutrófilo humano.

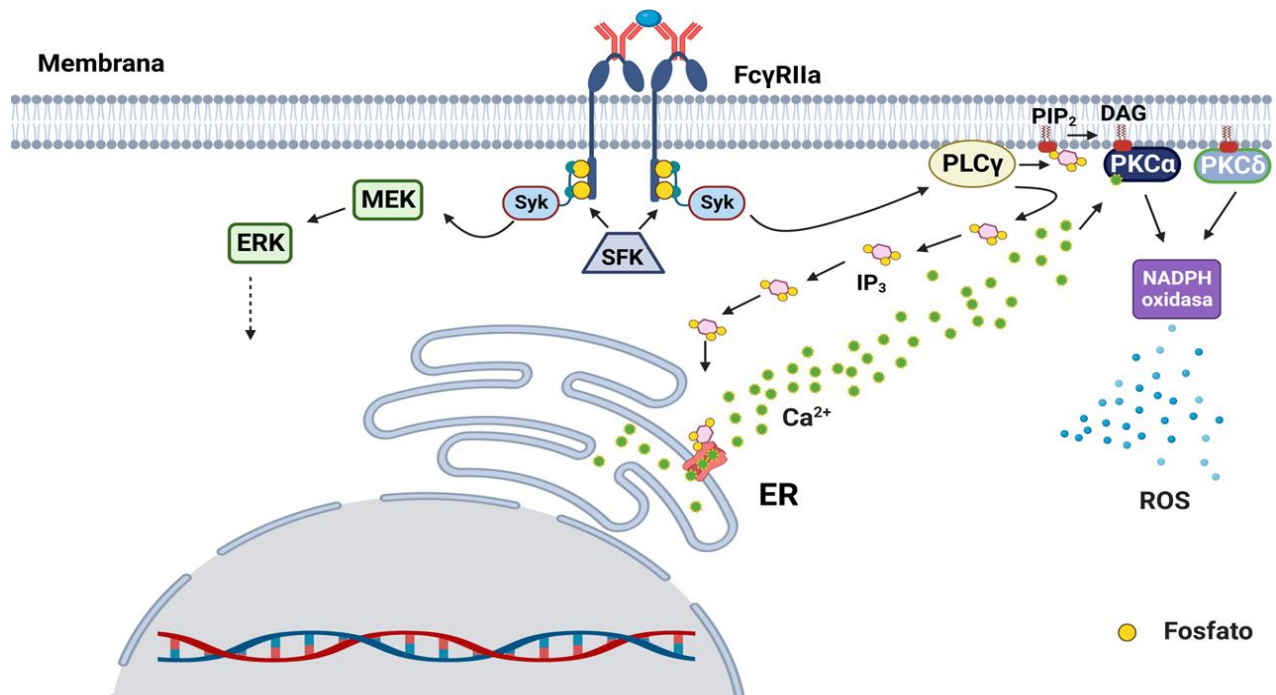
## Capítulo V

### Conclusión y perspectivas.

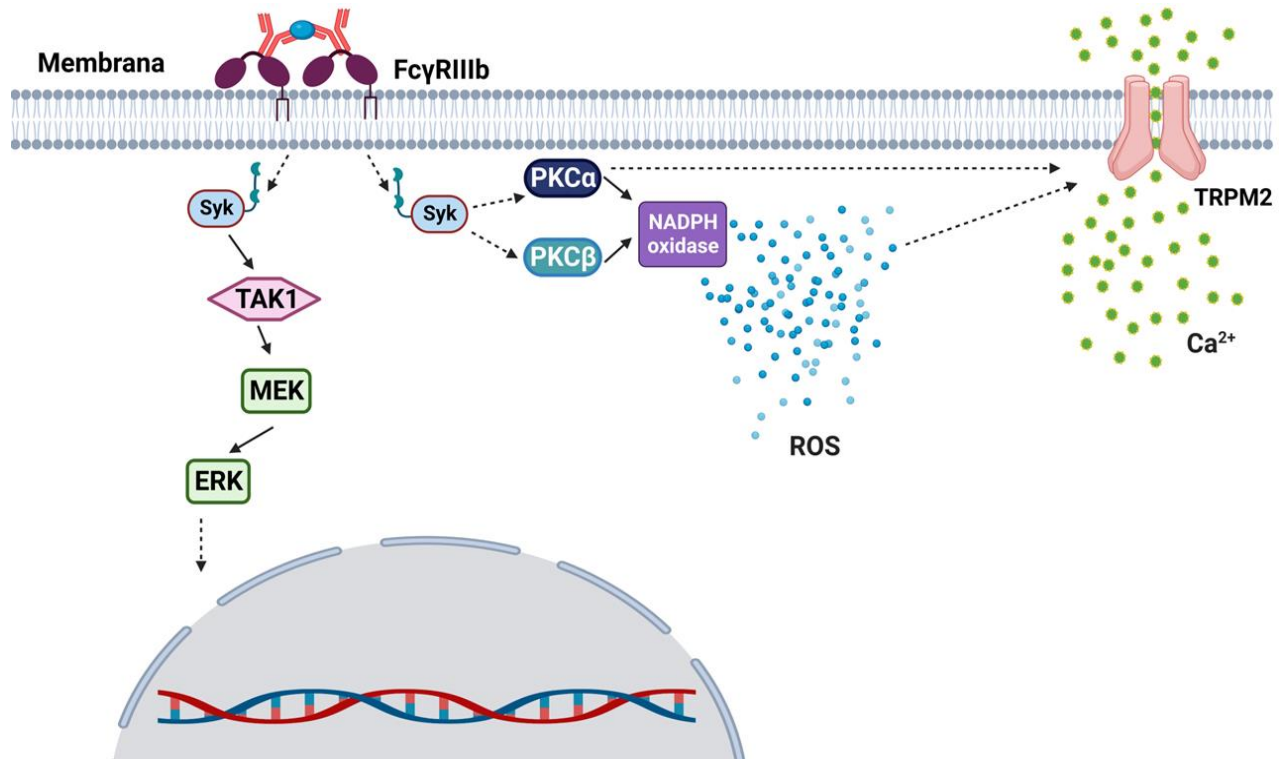
En este trabajo se mostró por primera vez que los FcγR presentes en el neutrófilo emplean diferencialmente a las PKC. El FcγRIIa requiere de la activación tanto de PKCα como de PKCδ para inducir la producción de ROS. En contraste el FcγRIIIb requiere tanto de la activación de PKCα como de PKCβ para inducir la producción de ROS (Figura 18 y Figura 19). Esto abre la posibilidad de que cada uno de los FcγR del neutrófilo, induzca la producción de ROS en diferentes localizaciones de la célula. Esta posibilidad puede investigarse empleando la reducción del citocromo C y leyendo la absorbancia a 550nm. Además, los datos obtenidos en este trabajo, sugieren que el FcγRIIIb requiere de la activación de PKCα para inducir la fosforilación de ERK ((Figura 18 y Figura 19). Como se describió anteriormente, no se exploró el mecanismo exacto por el cual el FcγRIIIb emplea a PKCα para inducir la fosforilación de ERK. Empleando anticuerpos monoclonales específicos para la forma fosforilada de PKCα y empleando la batería de inhibidores utilizados en este trabajo, se podría comenzar a dilucidar el mecanismo exacto por el cual, el FcγRIIIb emplea a PKCα para inducir la fosforilación de ERK. Además, anteriormente se describió que el FcγRIIIb y no el FcγRIIa induce el incremento de la fosforilación de ERK en el núcleo del neutrófilo, por lo tanto, es posible que el FcγRIIIb requiera de la activación de PKCα u otra isoforma de PKC, para inducir el incremento de la fosforilación de ERK en el núcleo del neutrófilo. Aislado los núcleos del neutrófilo y empleando inhibidores para PKC en un futuro se podría investigar si el FcγRIIIb requiere de la activación de alguna isoforma de PKC para inducir el incremento de la fosforilación de ERK en el núcleo del neutrófilo.

Adicionalmente, los datos obtenidos en este trabajo sugieren que el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por el FcγRIIIb requiere de la activación tanto del canal TRPM2 como de PKCα (Figura 19). Además, como se mostró anteriormente el FcγRIIIb requiere de la activación de PKCα para inducir la fosforilación de ERK. Lo cual sugiere una posible relación entre el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  y la fosforilación de ERK en la vía de señalización activada por el FcγRIIIb. Esta posibilidad puede investigarse en el futuro eliminando el  $Ca^{2+}$  del medio extracelular y estimando la fosforilación de ERK. Por otro lado, utilizando inmunoprecipitaciones y espectrometría de masas, se podría investigar en futuros estudios si el FcγRIIIb emplea a PKCα u otra isoforma de PKC para activar directamente al

canal TRPM2. Además, los datos obtenidos en este trabajo, sugieren que es posible que tanto el FcγRIIa como el FcγRIIIb activen de forma distinta a cada una de las PKC empleadas en su correspondiente vía de señalización. Por lo tanto, con el fin de investigar esta incógnita, se pueden utilizar en conjunto inhibidores de la vía de señalización de los FcγR y anticuerpos monoclonales específicos para las formas fosforiladas de cada una de las isoformas de PKC, que activan cada uno de los FcγR del neutrófilo. Adicionalmente, es importante investigar si cada una de las isoformas de PKC que activa cada uno de los FcγR del neutrófilo, participan tanto en la fagocitosis como en la producción de NETs. Por otro lado, también podría investigarse en el futuro si la formación de NETs activada por el FcγRIIIb requiere de la activación del canal TRPM2. En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo, refuerzan la idea de que cada FcγR inducen vías de señalización distintas, lo que podría explicar por qué cada uno de los FcγR induzcan respuestas celulares diferentes en el neutrófilo humano (Figura 18 y Figura 19).



**Figura 18.** Modelo propuesto de la vía de señalización activada por el FcγRIIa en el neutrófilo humano. El FcγRIIa es un receptor dependiente de ITAM, una vez que es activado, proteínas SFK fosforilan las tirosinas contenidas en la región ITAM. Esto produce sitio de unión para Syk lo que induce su reclutamiento y activación. Por un lado, Syk puede inducir la activación de la vía MEK-ERK, además, Syk es capaz de mediar la activación de PLCγ. Por su parte, a partir de PIP<sub>2</sub>, PLCγ induce la producción tanto de DAG como de IP<sub>3</sub>. IP<sub>3</sub> es reconocido por su receptor canal en el retículo endoplásmico, lo que induce un flujo de Ca<sup>2+</sup> al citoplasma. Juntos, Ca<sup>2+</sup> y DAG pueden activar PKCα, además, DAG puede activar a PKCδ. Juntos PKCα y PKCδ, puede mediar la activación del complejo NADPH-oxidasa, induciendo la producción de ROS. **Esquema creado con BioRender.com**



**Figura 19.** Modelo propuesto de la vía de señalización activada por el FcγRIIIb en el neutrófilo humano. El FcγRIIIb es un receptor unido a la monocapa externa de la membrana plasmática por un enlace GPI y hasta el momento no se conocen subunidades asociadas que regulen su activación. Sin embargo, se sabe que una vez que el FcγRIIIb se activa, se produce la activación de Syk. Syk induce la activación de TAK1 y a su vez TAK1 regula la activación de la vía MEK-ERK. Además, en este trabajo se describió que el FcγRIIIb, requiere la activación tanto de PKCα como de PKCδ, para inducir la producción de ROS. Por otro lado, se describió que el FcγRIIIb requiere de la activación del canal TRPM2 para inducir el incremento de la [Ca<sup>2+</sup>]. **Esquema creado con BioRender.com**

## Literatura

- [1] Y. Sun, T. Huang, L. Hammarstrom, and Y. Zhao, The Immunoglobulins: New Insights, Implications, and Applications. *Annual review of animal biosciences* 8 (2020) 145-169.
- [2] Y.M. Wen, and Y. Shi, Immune Complex Vaccination. *Current topics in microbiology and immunology* 423 (2019) 95-118.
- [3] X. Li, A.W. Gibson, and R.P. Kimberly, Human FcR polymorphism and disease. *Current topics in microbiology and immunology* 382 (2014) 275-302.
- [4] M. Daeron, Fc receptors as adaptive immunoreceptors. *Current topics in microbiology and immunology* 382 (2014) 131-64.
- [5] A. Wieland, and R. Ahmed, Fc Receptors in Antimicrobial Protection. *Current topics in microbiology and immunology* 423 (2019) 119-150.
- [6] E. Chalayer, B. Gramont, F. Zekre, R. Goguyer-Deschaumes, L. Waeckel, L. Grange, S. Paul, A.W. Chung, and M. Killian, Fc receptors gone wrong: A comprehensive review of their roles in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmunity reviews* 21 (2022) 103016.
- [7] M. Daeron, Fc receptor biology. *Annual review of immunology* 15 (1997) 203-34.
- [8] P.X. Liew, and P. Kubes, The Neutrophil's Role During Health and Disease. *Physiological reviews* 99 (2019) 1223-1248.
- [9] C. Rosales, Fcγ Receptor Heterogeneity in Leukocyte Functional Responses. *Frontiers in immunology* 8 (2017) 280.
- [10] P. Bruhns, B. Iannascoli, P. England, D.A. Mancardi, N. Fernandez, S. Jorieux, and M. Daeron, Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* 113 (2009) 3716-25.
- [11] C. Rosales, Neutrophils at the crossroads of innate and adaptive immunity. *Journal of leukocyte biology* 108 (2020) 377-396.
- [12] H.B. Fleit, S.D. Wright, and J.C. Unkeless, Human neutrophil Fc γ receptor distribution and structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79 (1982) 3275-9.
- [13] T.W. Huizinga, F. van Kemenade, L. Koenderman, K.M. Dolman, A.E. von dem Borne, P.A. Tetteroo, and D. Roos, The 40-kDa Fc γ receptor (FcγRII) on human neutrophils is essential for the IgG-induced respiratory burst and IgG-induced phagocytosis. *Journal of immunology* 142 (1989) 2365-9.
- [14] M.J. Fernandes, E. Rollet-Labelle, G. Pare, S. Marois, M.L. Tremblay, J.L. Teillaud, and P.H. Naccache, CD16b associates with high-density, detergent-resistant membranes in human neutrophils. *The Biochemical journal* 393 (2006) 351-9.
- [15] N. Tsuboi, K. Asano, M. Lauterbach, and T.N. Mayadas, Human neutrophil Fcγ receptors initiate and play specialized nonredundant roles in antibody-mediated inflammatory diseases. *Immunity* 28 (2008) 833-46.
- [16] S. Rivas-Fuentes, E. Garcia-Garcia, G. Nieto-Castaneda, and C. Rosales, Fcγ receptors exhibit different phagocytosis potential in human neutrophils. *Cellular immunology* 263 (2010) 114-21.
- [17] O.R. Aleman, N. Mora, R. Cortes-Vieyra, E. Uribe-Querol, and C. Rosales, Differential Use of Human Neutrophil Fcγ Receptors for Inducing Neutrophil Extracellular Trap Formation. *Journal of immunology research* 2016 (2016) 2908034.

- [18] A. Getahun, and J.C. Cambier, Of ITIMs, ITAMs, and ITAMis: revisiting immunoglobulin Fc receptor signaling. *Immunological reviews* 268 (2015) 66-73.
- [19] D.M. Underhill, and H.S. Goodridge, The many faces of ITAMs. *Trends in immunology* 28 (2007) 66-73.
- [20] S. Bournazos, and J.V. Ravetch, Fc $\gamma$  receptor pathways during active and passive immunization. *Immunological reviews* 268 (2015) 88-103.
- [21] M.S. Mansueto, A. Reens, L. Rakhilina, A. Chi, B.S. Pan, and J.R. Miller, A reevaluation of the spleen tyrosine kinase (SYK) activation mechanism. *The Journal of biological chemistry* 294 (2019) 7658-7668.
- [22] K.R. McLeish, J.B. Klein, P.Y. Coxon, K.Z. Head, and R.A. Ward, Bacterial phagocytosis activates extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase cascades in human neutrophils. *Journal of leukocyte biology* 64 (1998) 835-44.
- [23] O.R. Aleman, N. Mora, R. Cortes-Vieyra, E. Uribe-Querol, and C. Rosales, Transforming Growth Factor-beta-Activated Kinase 1 Is Required for Human Fc $\gamma$ RIIIb-Induced Neutrophil Extracellular Trap Formation. *Frontiers in immunology* 7 (2016) 277.
- [24] J.C. Edberg, J.J. Moon, D.J. Chang, and R.P. Kimberly, Differential regulation of human neutrophil Fc $\gamma$ RIIa (CD32) and Fc $\gamma$ RIIIb (CD16)-induced Ca<sup>2+</sup> transients. *The Journal of biological chemistry* 273 (1998) 8071-9.
- [25] C. Rosales, and E.J. Brown, Signal transduction by neutrophil immunoglobulin G Fc receptors. Dissociation of intracytoplasmic calcium concentration rise from inositol 1,4,5-trisphosphate. *The Journal of biological chemistry* 267 (1992) 5265-71.
- [26] Z. Shen, C.T. Lin, and J.C. Unkeless, Correlations among tyrosine phosphorylation of Shc, p72syk, PLC-gamma 1, and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> flux in Fc gamma RIIA signaling. *Journal of immunology* 152 (1994) 3017-23.
- [27] A. Altman, and K.F. Kong, Protein Kinase C Enzymes in the Hematopoietic and Immune Systems. *Annual review of immunology* 34 (2016) 511-38.
- [28] N. Balasubramanian, S.H. Advani, and S.M. Zingde, Protein kinase C isoforms in normal and leukemic neutrophils: altered levels in leukemic neutrophils and changes during myeloid maturation in chronic myeloid leukemia. *Leukemia research* 26 (2002) 67-81.
- [29] R.D. Gray, C.D. Lucas, A. MacKellar, F. Li, K. Hiersemenzel, C. Haslett, D.J. Davidson, and A.G. Rossi, Activation of conventional protein kinase C (PKC) is critical in the generation of human neutrophil extracellular traps. *Journal of inflammation* 10 (2013) 12.
- [30] L.V. Dekker, M. Leitges, G. Altschuler, N. Mistry, A. McDermott, J. Roes, and A.W. Segal, Protein kinase C-beta contributes to NADPH oxidase activation in neutrophils. *The Biochemical journal* 347 Pt 1 (2000) 285-9.
- [31] L.G. Puente, J.S. He, and H.L. Ostergaard, A novel PKC regulates ERK activation and degranulation of cytotoxic T lymphocytes: Plasticity in PKC regulation of ERK. *European journal of immunology* 36 (2006) 1009-18.
- [32] G.Z. Racz, A. Szucs, V. Szlavik, J. Vag, B. Burghardt, A.C. Elliott, and G. Varga, Possible role of duration of PKC-induced ERK activation in the effects of agonists and phorbol esters on DNA synthesis in Panc-1 cells. *Journal of cellular biochemistry* 98 (2006) 1667-80.
- [33] S. Kremserova, and W.M. Nauseef, Isolation of Human Neutrophils from Venous Blood. *Methods in molecular biology* 2087 (2020) 33-42.

- [34] T.C. Barnes, M.E. Anderson, S.W. Edwards, and R.J. Moots, Neutrophil-derived reactive oxygen species in SSc. *Rheumatology* 51 (2012) 1166-9.
- [35] L.C. Rodrigues, D.G. Cerri, C.M. Marzocchi-Machado, R.D. Cummings, S.R. Stowell, and M. Dias-Baruffi, Detection of Reactive Oxygen Species in Human Neutrophils Under Various Conditions of Exposure to Galectin. *Methods in molecular biology* 2442 (2022) 549-564.
- [36] J. Karlsson, J. Bylund, C. Movitz, L. Bjorkman, H. Forsman, and C. Dahlgren, A methodological approach to studies of desensitization of the formyl peptide receptor: Role of the read out system, reactive oxygen species and the specific agonist used to trigger neutrophils. *Journal of immunological methods* 352 (2010) 45-53.
- [37] K.D. Gada, and D.E. Logothetis, PKC regulation of ion channels: The involvement of PIP(2). *The Journal of biological chemistry* 298 (2022) 102035.
- [38] K. Najder, B. Musset, O. Lindemann, E. Bulk, A. Schwab, and B. Fels, The function of TRP channels in neutrophil granulocytes. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 470 (2018) 1017-1033.
- [39] A. Sumoza-Toledo, and R. Penner, TRPM2: a multifunctional ion channel for calcium signalling. *The Journal of physiology* 589 (2011) 1515-25.
- [40] V. Flockerzi, and B. Nilius, TRPs: truly remarkable proteins. *Handbook of experimental pharmacology* 222 (2014) 1-12.
- [41] I. Jimenez, Y. Prado, F. Marchant, C. Otero, F. Eltit, C. Cabello-Verrugio, O. Cerda, and F. Simon, TRPM Channels in Human Diseases. *Cells* 9 (2020).
- [42] A.L. Perraud, A. Fleig, C.A. Dunn, L.A. Bagley, P. Launay, C. Schmitz, A.J. Stokes, Q. Zhu, M.J. Bessman, R. Penner, J.P. Kinet, and A.M. Scharenberg, ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature* 411 (2001) 595-9.
- [43] S.A. Syed Mortadza, L. Wang, D. Li, and L.H. Jiang, TRPM2 Channel-Mediated ROS-Sensitive Ca(2+) Signaling Mechanisms in Immune Cells. *Frontiers in immunology* 6 (2015) 407.
- [44] G. Wang, L. Cao, X. Liu, N.A. Sieracki, A. Di, X. Wen, Y. Chen, S. Taylor, X. Huang, C. Tirupathi, Y.Y. Zhao, Y. Song, X. Gao, T. Jin, C. Bai, A.B. Malik, and J. Xu, Oxidant Sensing by TRPM2 Inhibits Neutrophil Migration and Mitigates Inflammation. *Developmental cell* 38 (2016) 453-62.
- [45] J. Du, J. Xie, and L. Yue, Modulation of TRPM2 by acidic pH and the underlying mechanisms for pH sensitivity. *The Journal of general physiology* 134 (2009) 471-88.
- [46] M. Naziroglu, Activation of TRPM2 and TRPV1 Channels in Dorsal Root Ganglion by NADPH Oxidase and Protein Kinase C Molecular Pathways: a Patch Clamp Study. *Journal of molecular neuroscience : MN* 61 (2017) 425-435.
- [47] M. Naziroglu, and C. Ozgul, Vitamin E modulates oxidative stress and protein kinase C activator (PMA)-induced TRPM2 channel gate in dorsal root ganglion of rats. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 45 (2013) 541-9.
- [48] R. Anderson, and A. Goolam Mahomed, Calcium efflux and influx in f-met-leu-phe (fMLP)-activated human neutrophils are chronologically distinct events. *Clinical and experimental immunology* 110 (1997) 132-8.
- [49] C. Cai, S. Tang, X. Wang, S. Cai, X. Meng, W. Zou, and F. Zou, Requirement for both receptor-operated and store-operated calcium entry in N-formyl-methionine-leucine-phenylalanine-induced neutrophil polarization. *Biochemical and biophysical research communications* 430 (2013) 816-21.



- [50] M.D. Salmon, and J. Ahluwalia, Pharmacology of receptor operated calcium entry in human neutrophils. *International immunopharmacology* 11 (2011) 145-8.
- [51] N. Steinckwich, V. Schenten, C. Melchior, S. Brechard, and E.J. Tschirhart, An essential role of STIM1, Orai1, and S100A8-A9 proteins for Ca<sup>2+</sup> signaling and FcγR-mediated phagosomal oxidative activity. *Journal of immunology* 186 (2011) 2182-91.
- [52] R.A. Clemens, and C.A. Lowell, Store-operated calcium signaling in neutrophils. *Journal of leukocyte biology* 98 (2015) 497-502.
- [53] R.D. Plaut, K.M. Scanlon, M. Taylor, K. Teter, and N.H. Carbonetti, Intracellular disassembly and activity of pertussis toxin require interaction with ATP. *Pathogens and disease* 74 (2016).
- [54] M.A. Cassatella, N.K. Ostberg, N. Tamassia, and O. Soehnlein, Biological Roles of Neutrophil-Derived Granule Proteins and Cytokines. *Trends in immunology* 40 (2019) 648-664.
- [55] K. Futosi, S. Fodor, and A. Mocsai, Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *International immunopharmacology* 17 (2013) 638-50.
- [56] W. Tian, X.J. Li, N.D. Stull, W. Ming, C.I. Suh, S.A. Bissonnette, M.B. Yaffe, S. Grinstein, S.J. Atkinson, and M.C. Dinauer, Fc γ R-stimulated activation of the NADPH oxidase: phosphoinositide-binding protein p40phox regulates NADPH oxidase activity after enzyme assembly on the phagosome. *Blood* 112 (2008) 3867-77.
- [57] S.A. Belambri, L. Rolas, H. Raad, M. Hurtado-Nedelec, P.M. Dang, and J. El-Benna, NADPH oxidase activation in neutrophils: Role of the phosphorylation of its subunits. *European journal of clinical investigation* 48 Suppl 2 (2018) e12951.
- [58] A. Karlsson, and C. Dahlgren, Assembly and activation of the neutrophil NADPH oxidase in granule membranes. *Antioxidants & redox signaling* 4 (2002) 49-60.
- [59] A. Fontayne, P.M. Dang, M.A. Gougerot-Pocidallo, and J. El-Benna, Phosphorylation of p47phox sites by PKC α, β II, δ, and ζ: effect on binding to p22phox and on NADPH oxidase activation. *Biochemistry* 41 (2002) 7743-50.
- [60] C. Matron, A. Chakravarti, I. Allaeys, and P.E. Poubelle, PKC-δ controls the fMLF-induced overproduction of superoxide by neutrophils. *Free radical biology & medicine* 48 (2010) 207-15.
- [61] G.T. Nguyen, E.R. Green, and J. Meccas, Neutrophils to the ROScue: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 7 (2017) 373.
- [62] J. Bylund, K.L. Brown, C. Movitz, C. Dahlgren, and A. Karlsson, Intracellular generation of superoxide by the phagocyte NADPH oxidase: how, where, and what for? *Free radical biology & medicine* 49 (2010) 1834-45.
- [63] J.A. Rosado, R. Diez, T. Smani, and I. Jardin, STIM and Orai1 Variants in Store-Operated Calcium Entry. *Frontiers in pharmacology* 6 (2015) 325.
- [64] R. Immler, S.I. Simon, and M. Sperandio, Calcium signalling and related ion channels in neutrophil recruitment and function. *European journal of clinical investigation* 48 Suppl 2 (2018) e12964.
- [65] I. Heiner, J. Eisfeld, and A. Luckhoff, Role and regulation of TRP channels in neutrophil granulocytes. *Cell calcium* 33 (2003) 533-40.
- [66] H.C. Fan, X. Zhang, and P.A. McNaughton, Activation of the TRPV4 ion channel is enhanced by phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 284 (2009) 27884-27891.
- [67] H. Peng, U. Lewandrowski, B. Muller, A. Sickmann, G. Walz, and T. Wegierski, Identification of a Protein Kinase C-dependent phosphorylation site involved in sensitization of TRPV4 channel. *Biochemical and biophysical research communications* 391 (2010) 1721-5.

- [68] O. Voolstra, J.P. Bartels, C. Oberegelsbacher, J. Pfannstiel, and A. Huber, Phosphorylation of the *Drosophila* transient receptor potential ion channel is regulated by the phototransduction cascade and involves several protein kinases and phosphatases. *PloS one* 8 (2013) e73787.
- [69] R. Fliegert, A. Bauche, A.M. Wolf Perez, J.M. Watt, M.D. Rozewitz, R. Winzer, M. Janus, F. Gu, A. Rosche, A. Harneit, M. Flato, C. Moreau, T. Kirchberger, V. Wolters, B.V.L. Potter, and A.H. Guse, 2'-Deoxyadenosine 5'-diphosphoribose is an endogenous TRPM2 superagonist. *Nature chemical biology* 13 (2017) 1036-1044.
- [70] P. Yu, X. Xue, J. Zhang, X. Hu, Y. Wu, L.H. Jiang, H. Jin, J. Luo, L. Zhang, Z. Liu, and W. Yang, Identification of the ADPR binding pocket in the NUDT9 homology domain of TRPM2. *The Journal of general physiology* 149 (2017) 219-235.
- [71] A.L. Perraud, C.L. Takanishi, B. Shen, S. Kang, M.K. Smith, C. Schmitz, H.M. Knowles, D. Ferraris, W. Li, J. Zhang, B.L. Stoddard, and A.M. Scharenberg, Accumulation of free ADP-ribose from mitochondria mediates oxidative stress-induced gating of TRPM2 cation channels. *The Journal of biological chemistry* 280 (2005) 6138-48.
- [72] R. Ullah, Q. Yin, A.H. Snell, and L. Wan, RAF-MEK-ERK pathway in cancer evolution and treatment. *Seminars in cancer biology* 85 (2022) 123-154.
- [73] S. Katz, R. Boland, and G. Santillan, Modulation of ERK 1/2 and p38 MAPK signaling pathways by ATP in osteoblasts: involvement of mechanical stress-activated calcium influx, PKC and Src activation. *The international journal of biochemistry & cell biology* 38 (2006) 2082-91.
- [74] C.F. Zheng, and K.L. Guan, Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues. *The EMBO journal* 13 (1994) 1123-31.
- [75] R.J. Davis, Transcriptional regulation by MAP kinases. *Molecular reproduction and development* 42 (1995) 459-67.
- [76] E. Garcia-Garcia, and C. Rosales, Nuclear factor activation by FcγR in human peripheral blood neutrophils detected by a novel flow cytometry-based method. *Journal of immunological methods* 320 (2007) 104-18.
- [77] Y. Kawakami, J. Kitaura, L. Yao, R.W. McHenry, Y. Kawakami, A.C. Newton, S. Kang, R.M. Kato, M. Leitges, D.J. Rawlings, and T. Kawakami, A Ras activation pathway dependent on Syk phosphorylation of protein kinase C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (2003) 9470-5.
- [78] M.Y. Chang, D.Y. Huang, F.M. Ho, K.C. Huang, and W.W. Lin, PKC-dependent human monocyte adhesion requires AMPK and Syk activation. *PloS one* 7 (2012) e40999.
- [79] J. Wightman, M.S. Roberson, T.J. Lamkin, S. Varvayanis, and A. Yen, Retinoic acid-induced growth arrest and differentiation: retinoic acid up-regulates CD32 (Fc γR2) expression, the ectopic expression of which retards the cell cycle. *Molecular cancer therapeutics* 1 (2002) 493-506.