



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS  
BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

"ACTIVACIÓN DE FAGOCITOSIS Y FACTORES  
NUCLEARES POR RECEPTORES Fc EN  
NEUTRÓFILOS HUMANOS"

T E S I S

Que para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

SELMA CELINA RIVAS FUENTES

Director de Tesis

Dr. CARLOS ROSALES LEDEZMA



MEXICO, D.F. 2011



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.

**Los hombres hacen su propia historia,  
pero no la hacen a su libre arbitrio, bajo circunstancias elegidas por  
ellos mismos, sino con aquellas circunstancias con las que se  
encuentran directamente,  
que existen y transmite el pasado\* .**

---

\*K. Marx. El dieciocho brumario de Luis Bonaparte

## **JURADO ASIGNADO**

**Presidente: Dr. Arturo Edgar Zenteno Galindo**

**Secretario: Dr. Carlos Rosales Ledezma**

**Vocal: Dr. Edmundo de Ibis Lamoyi Velázquez**

**Vocal: Dra. Martha Robles Flores**

**Vocal: Dra. Guadalupe Reyes Cruz**

**Esta tesis se realizó en el Instituto de Investigaciones  
Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México,  
dentro del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas -  
UNAM**

**TUTOR DE TESIS**

**Dr. Carlos Rosales Ledezma**

## FINANCIAMIENTO

**La Universidad Nacional Autónoma de México** apoyó mis estudios de doctorado con el complemento de beca DEGEP. También me otorgó el financiamiento de una estancia de investigación en Francia en el año 2004, bajo el programa PAEP\*.

**El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** apoyó mis estudios de doctorado (beca 169 963). Así mismo, me otorgó el financiamiento de una estancia de investigación en Francia, bajo el Programa de Cooperación Internacional: SEP-CONACyT-ANUIES-Ecos, en el año 2006.

**El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** apoyó el presente trabajo mediante el donativo 48573-M.

\* Realicé esta estancia de investigación, como una actividad académica dentro de mi plan de estudios de doctorado. Durante la estancia trabajé en un proyecto de investigación que se concretó en la publicación del siguiente artículo:

Nadif R, Mintz M, **Rivas-Fuentes S**, Jedlicka A, Lavergne E, Rodero M, Kauffmann F, Combadière C y Kleeberger SR (2006) Polymorphisms in chemokine and chemokine receptor genes and the development of coal workers' pneumoconiosis. *Cytokine* **33**, 171-178.

## **DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS**

Esta tesis está dedicada a mis papás, Laura Fuentes y Marcio Rivas Solís, quienes me han apoyado durante toda la vida para cumplir con las metas que me he propuesto. Han sido siempre un ejemplo para mí, por su integridad y su gran calidad humana. Gracias por regalarme la maravillosa familia que tengo.

Esta tesis representa la decisión obligada de dejar atrás cinco años y medio de mucho trabajo (académico y experimental) y la decisión libre de empezar todo de nuevo. En este sentido quisiera agradecer a las personas que participaron de forma favorable en esta etapa.

Agradezco profundamente a José Trangol y a Silvana Pertúz por su apoyo invaluable en momentos muy difíciles del doctorado. A mi tío, Octavio Rivas Solís le agradezco también su apoyo durante este periodo.

Agradezco al Dr. Carlos Rosales Ledezma por aceptarme como parte de su equipo de trabajo, por todas las cosas que aprendí en su laboratorio y bajo su tutoría. Al Dr. Erick García García porque participó de forma activa en la dirección de este proyecto de investigación, por sus valiosos comentarios y por todo lo que me enseñó sobre los neutrófilos. Al Dr. Adolfo García-Saíenz por aceptar formar parte de mi comité tutorial.

A los Doctores Christophe Combadière y Philippe Deterre, por todo lo que aprendí en sus laboratorios, en las dos estancias de investigación que realicé durante mis estudios de doctorado. También estoy muy agradecida por

el apoyo que me brindaron, mismo que fue determinante para que yo pudiera concluir este doctorado.

Agradezco a la M. en IBB. Nancy Mora por todo el apoyo técnico brindado durante el desarrollo de este proyecto de investigación. A la M. en C. Georgina Nieto por haber realizado los experimentos con el anticuerpo 7.5.4 y con los inhibidores: piceatannol, wortmanina y estaurosporina. Al estudiante de maestría Victor Salas por haberme apoyado con las repeticiones de las mediciones de calcio y por su invaluable amistad. A Lupita Díaz por su ayuda en el laboratorio. Al M. en C. Ignacio Martínez, técnico del laboratorio contiguo, por su gran disposición de ayudarme siempre, lo que demuestra su gran compromiso con la Institución y con la investigación. Aunque no forma parte de esta historia, quiero reconocer ampliamente al M. en C. Ramsés Chavéz, porque hace algunos años me entrenó en el uso del citómetro de flujo. Este instrumento que fue esencial en el desarrollo del presente trabajo.

Agradezco a la Dra. María del Carmen Navarro, por todo el apoyo que me ha brindado en mi desarrollo profesional. Finalmente, quiero agradecer a Alfonso Salgado, Guillermo Gómez, Guillermo Aquino, Mónica Arles e Itzel Benítez por alentarme a concluir la escritura de esta tesis.



# INDICE

LISTA DE FIGURAS .....	3
LISTA DE TABLAS .....	3
LISTA DE ABREVIATURAS.....	4
RESUMEN .....	6
ABSTRACT .....	8
INTRODUCCIÓN .....	9
Neutrófilos e Inflamación.....	9
Receptores Fc .....	12
Fagocitosis .....	17
ANTECEDENTES.....	20
JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	22
HIPÓTESIS .....	23
OBJETIVO GENERAL .....	23
OBJETIVOS PARTICULARES.....	23
MATERIAL Y METODOS.....	25
Aislamiento de neutrófilos.....	25
Tinción extracelular de receptores Fc.....	26
Preparación de microesferas de látex para el ensayo de fagocitosis .....	27
Recubrimiento de microesferas con los anticuerpos monoclonales.....	28
Preparación de Pansorbin® para el ensayo de fagocitosis .....	29
Marcaje de Pansorbin® con isotiocianato de fluoresceína.....	29
Recubrimiento de Pansorbin-FITC con los anticuerpos.....	30

<b>Fagocitosis en fase líquida.....</b>	<b>30</b>
<b>Tratamientos con inhibidores para ensayos de fagocitosis .....</b>	<b>31</b>
<b>Tratamiento con interferón gamma.....</b>	<b>32</b>
<b>Activación de Factores Nucleares .....</b>	<b>32</b>
<b>Liberación de calcio intracelular con Fura-2.....</b>	<b>34</b>
<b>ESTADÍSTICA .....</b>	<b>35</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>36</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>51</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>56</b>
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>57</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>58</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>61</b>

## LISTA DE FIGURAS

1. Estructura de los receptores Fc $\gamma$ humanos.....	13
2. Vía general de señalización de los receptores Fc $\gamma$ de activación .....	16
3. Fagocitosis activada por receptores Fc $\gamma$ .....	19
4. Estrategia experimental para la activación específica de los receptores Fc $\gamma$ .....	24
5. Expresión de receptores Fc $\gamma$ en neutrófilos humanos.....	36
6. El receptor Fc $\gamma$ RIIA activa eficientemente la fagocitosis en neutrófilos humanos.....	37
7. La fagocitosis del receptor Fc $\gamma$ RIIA se incrementa en forma dosis dependiente al nivel de recubrimiento de las partículas con el anticuerpo IV.3.....	38
8. El receptor Fc $\gamma$ RIIIB activa fagocitosis en neutrófilos humanos.....	39
9. La fagocitosis del receptor Fc $\gamma$ RIIIB se incrementa en forma dosis dependiente al nivel de recubrimiento de las partículas con el anticuerpo 3G8.....	40
10. Moléculas involucradas en la fagocitosis de receptor Fc $\gamma$ RIIA en neutrófilos humanos.....	41
11. Moléculas involucradas en la fagocitosis de receptor Fc $\gamma$ RIIIB en neutrófilos humanos.....	41
12. El receptor Fc $\gamma$ RI es inducido con INF- $\gamma$ en neutrófilos humanos.....	42
13. El receptor Fc $\gamma$ RI no activa la fagocitosis en neutrófilos humanos.....	44
14. La expresión de los receptores Fc $\gamma$ RIIA y Fc $\gamma$ RIIIB no son alteradas por el tratamiento con INF- $\gamma$ en neutrófilos humanos.....	45
15. El tratamiento con INF- $\gamma$ promueve un aumento inespecífico de la fagocitosis en neutrófilos humanos.....	46
16. Fc $\gamma$ RI induce la liberación de calcio intracelular en neutrófilos .....	47
17. Fc $\gamma$ RI no induce la aparición de pERK en el núcleo de neutrófilos.....	48
18. La fagocitosis de Pansorbin es facilitada por los receptores Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RIIA en neutrófilos humanos.....	49
19. La fagocitosis de Pansorbin facilitada por el receptor Fc $\gamma$ RI se abate con un pre-tratamiento con BSA.....	50

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Anticuerpos utilizados en la tinción extracelular de receptores Fc $\gamma$ y en los protocolos de estimulación.....	26
<b>Tabla 2.</b> Inhibidores farmacológicos utilizados en los ensayos de fagocitosis.....	31

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ADCC:** Del inglés “antibody-dependent cellular cytotoxicity”

**CD:** Del inglés “cluster of differentiation”

**CR3:** Receptor del factor C3 del complemento

**DAG:** Diacilglicerol

**ERK:** Cinasa activada por mitógenos

**FcR:** Receptores Fc

**FITC:** Isotiocianato de Fluoresceína

**GPI:** Glicofosfatidilinositol

**ICAM:** Del Inglés “Intercellular adhesion molecule”

**Ig:** Inmunoglobulina

**IL:** Interleucina

**INF- $\gamma$ :** Interferón gamma

**IP3:** Fosfatidilinositol 1,4,5 tri-fosfato

**PI3K:** Fosfatidilinositol 3- cinasa

**PKC:** Proteína cinasa C

**PLC:** Fosfolipasa C

**ICAM:** Del inglés “Intercellular Adhesion Molecule”

**ITAM:** Del inglés “Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif”

**ITIM:** Del inglés “Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif”

**kDa:** Kilodaltones

**NK:** Células asesinas naturales

**NF- $\kappa$ B:** Factor nuclear kappa B

**SFB:** Suero fetal bovino

**Syk:** Del Inglés "Spleen Tyrosine kinase"

**TNF:** Factor de necrosis tumoral

**X:** Se refiere a la presencia de cualquier aminoácido excepto cisteína

# INTRODUCCIÓN

## Neutrófilos e Inflamación

Los neutrófilos son los leucocitos más abundantes en sangre periférica y constituyen la primera línea de defensa del sistema inmune <sup>[1]</sup>. Presentan generalmente un núcleo trilobulado, por lo que también se les denomina células polimorfonucleares (PMN). Los neutrófilos se derivan de un progenitor pluripotencial mieloide, que reside en la médula ósea. Son células de vida corta, terminalmente diferenciadas y presentan una alta tasa de apoptosis espontánea que se modifica por la acción de citocinas <sup>[2]</sup>. Los neutrófilos son muy importantes en la eliminación de microorganismos, de tal forma que no es sorprendente que su número en sangre se incremente durante los procesos infecciosos. Los neutrófilos son de gran importancia en la inmunidad, y llevan a cabo numerosas funciones como son: fagocitosis, estallido respiratorio, degranulación, y producción y liberación de citocinas <sup>[1]</sup>. La actividad microbicida de los neutrófilos está dada por la acción de metabolitos tóxicos de oxígeno, de enzimas y de péptidos antimicrobianos. La enzima superóxido dismutasa cataliza la producción de  $H_2O_2$  a partir del  $O_2^-$  producido por el sistema del NADPH oxidasa, a partir de  $H_2O_2$  se produce ácido hipocloroso, un potente microbicida, en una reacción catalizada por la enzima mieloperoxidasa <sup>[1, 3]</sup>. Los neutrófilos presentan en su citoplasma gránulos que se fusionan con la membrana plasmática y con la vacuola fagocítica tras la activación del neutrófilo. La fusión de los gránulos permite liberar péptidos antimicrobianos como las defensinas y un potente arsenal de enzimas digestivas e hidrolíticas que facilitan la destrucción del patógeno, como: mieloperoxidasa, proteinasa-3, colagenasa, gelatinasa, elastasa y metaloproteasas. Algunas de estas enzimas como la proteinasa-3 y las

metaloproteasas tienen un papel relevante en la regulación de la respuesta inflamatoria. La proteinasa-3 es un activador de las citocinas proinflamatorias  $TNF\alpha$  e  $IL1-\beta$  <sup>[1]</sup>. Las metaloproteasas son enzimas que degradan los componentes de la matriz extracelular y que activan quimiocinas <sup>[4]</sup>. Por otro lado, los neutrófilos orquestan la respuesta inflamatoria, ya que son importantes productores de quimiocinas y citocinas, moléculas que reclutan y activan a otros tipos celulares. Los neutrófilos secretan citocinas como:  $TNF\alpha$ ,  $IL-1\beta$  e  $IL-10$  y quimiocinas como:  $CXCL8$ ,  $CCL3$ ,  $CCL4$  y  $CXCL10$  <sup>[5]-[6]</sup>.

En un proceso inflamatorio, las células efectoras de la circulación son reclutadas al sitio donde se han generado señales de alarma por la presencia de un patógeno y/o por daño tisular. Los neutrófilos son el primer tipo celular que es reclutado y participan en el reclutamiento de los otros tipos celulares mediante la liberación de precursores inflamatorios, citocinas y quimiocinas. La migración celular es dirigida básicamente por gradientes de moléculas quimioatrayentes <sup>[7]</sup> e involucra el paso de los leucocitos a través de las uniones intercelulares de las células endoteliales para llegar al tejido donde se han generado señales de daño. A este proceso que se le denomina transmigración endotelial y se lleva a cabo mediante la interacción entre moléculas de adhesión del leucocito y del endotelio activado. Es un proceso complejo y para su estudio se ha postulado un modelo de transmigración endotelial de cuatro pasos. Al primer paso se le denomina rodamiento; en este paso los leucocitos interaccionan con el endotelio por uniones débiles mediadas por selectinas, que son glicoproteínas que tienen dominios extracelulares tipo lectinas que unen carbohidratos. El segundo paso es la activación celular y es mediado por quimiocinas, estas moléculas se unen a receptores de siete pases transmembranales acoplados a proteínas G, estos receptores se encuentran en la membrana celular de los leucocitos <sup>[8]</sup>. La activación por quimiocinas facilita la activación de otras moléculas importantes en el proceso de transmigración endotelial, como las integrinas <sup>[9]</sup>. Al tercer paso se le ha denominado arresto

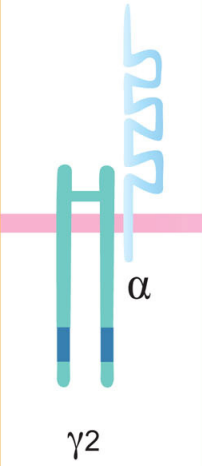
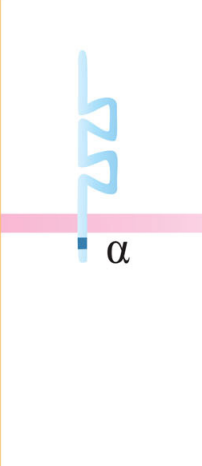
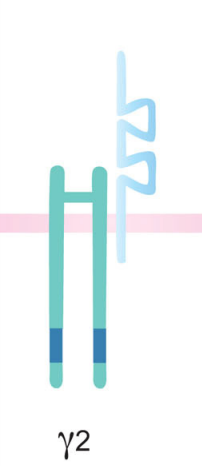

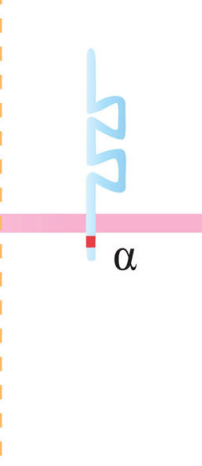
y es llevado a cabo por integrinas y por sus ligandos. Las integrinas son glicoproteínas de membrana que median la adhesión celular firme entre el leucocito y el endotelio activado. Las integrinas se activan por estímulos quimioatrayentes y por los estímulos del paso de rodamiento. Una vez activadas, las integrinas adquieren la capacidad para unir a sus ligandos. El neutrófilo expresa las integrinas: CD18/CD11b (Mac-1) y CD18/CD11a (LFA-1) y las moléculas de adhesión intercelular ICAM-1 e ICAM-2. Al cuarto paso, se denomina diapédesis y es regulado por quimiocinas. En este paso la célula adopta una forma que facilita su migración a través de las uniones inter-endoteliales hacia el tejido inflamado. La célula se polariza en un frente celular y una fase retrasada, los receptores de quimiocinas se acumulan en el frente celular y guían a las células hacia el tejido inflamado a través de gradientes de concentración de quimiocinas <sup>[8, 10]</sup>. En neutrófilos la extravasación y migración hacia el tejido inflamado también depende de la interacción de receptores Fc $\gamma$  con complejos inmunes <sup>[11]</sup>. Una vez que los neutrófilos han alcanzado los tejidos dañados o infectados son activados mediante el reconocimiento de opsoninas, que se unen a receptores específicos presentes en la membrana celular y conducen a la activación celular. Los neutrófilos expresan una gran variedad de receptores que reconocen opsoninas, como los receptores de complemento y los receptores Fc, estos últimos reconocen la porción constante de los anticuerpos <sup>[3]</sup>.



## Receptores Fc

Los receptores Fc son glicoproteínas de membrana que unen la porción cristalizable (Fc) de las inmunoglobulinas. Se clasifican de acuerdo al tipo de inmunoglobulina que unen. En humano se han descrito receptores Fc que unen IgA, IgE e IgG, los cuales se nombran  $Fc\alpha$ ,  $Fc\epsilon$  y  $Fc\gamma$ , respectivamente <sup>[12]</sup>.

La activación de los los receptores  $Fc\gamma$  conduce a respuestas celulares importantes en la inmunidad como: fagocitosis, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, estallido respiratorio, degranulación, producción y secreción de citocinas <sup>[13]</sup>. En mamíferos se han identificado cuatro diferentes clases de receptores  $Fc\gamma$ :  $Fc\gamma$ RI (CD64),  $Fc\gamma$ RII (CD32),  $Fc\gamma$ RIII (CD16) y  $Fc\gamma$ RIV <sup>[14]</sup>. Los receptores  $Fc\gamma$  humanos están constituidos por una cadena  $\alpha$  y en algunos casos por cadenas intracelulares accesorias. La cadena  $\alpha$  de los receptores  $Fc\gamma$ R se compone de una región extracelular (que presenta dominios tipo inmunoglobulina), de una región transmembranal y de una región citoplásmica. El receptor  $Fc\gamma$ IIIB es la excepción ya que sólo se encuentra unido a membrana por un residuo de glicofosfatidilinositol <sup>[15]</sup>. Los receptores  $Fc\gamma$  señalizan a través de dominios de señalización ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) ó ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif) <sup>[16]</sup>. Estos dominios están presentes en la región intracelular de la cadena  $\alpha$  ó en sus cadenas accesorias. En la figura 1 se presentan los detalles estructurales de los receptores  $Fc\gamma$  humanos.

Estructura					
	γ2	α	γ2	α-GPI	α
Receptor	FcγRI	FcγRIIA	FcγRIIIA	FcγRIIIB	FcγRIIB
Nombre Sistemático	CD64	CD32	CD16A	CD16B	CD32
Principal anticuerpo que reconoce	IgG1 e IgG3	IgG1	IgG1 e IgG3	IgG e IgG3	IgG1
Afinidad por el anticuerpo	Alta (Kd ~10 <sup>-9</sup> M)	Baja (Kd >10 <sup>-7</sup> M)	Baja (Kd >10 <sup>-6</sup> M)	Baja (Kd >10 <sup>-6</sup> M)	Baja (Kd >10 <sup>-7</sup> M)
Distribución Celular	Macrófagos, Neutrófilos, Eosinófilos, Células dendríticas.	Macrófagos, Neutrófilos, Células cebadas, Eosinófilos, Plaquetas, Células dendríticas.	Macrófagos, Células cebadas, Basófilos, Células NK, Células dendríticas.	Neutrófilos	Macrófagos, Neutrófilos, Células cebadas, Eosinófilos, Células dendríticas, Células B.
Funciones	Fagocitosis. Estallido respiratorio. Inducción de muerte microbiana.	Fagocitosis. Degranulación (Eosinófilos).	Inducción de citotoxicidad mediada por anticuerpos.	Inducción de muerte microbiana. Activación de Genes.	No fagocitosis. Inhibición de actividad celular.

**Figura 1. Estructura de los receptores Fc $\gamma$  humanos.** Los receptores F $\gamma$  humanos están constituidos por una cadena  $\alpha$ , en general esta cadena se compone de una región extracelular con dominios tipo inmunoglobulina, de una región transmembranal y de una región citoplásmica. La cadena  $\alpha$  de los receptores Fc $\gamma$ RIIA y Fc $\gamma$ RIIB contiene en su porción intracelular dominios de señalización ITAM e ITIM. Los receptores Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RIIIA, presentan el dominio de señalización ITAM en sus cadenas accesorias  $\gamma$ . La excepción es el receptor Fc $\gamma$ IIIB que sólo se encuentra unido a membrana por un residuo de GPI. En la figura se presenta: ITAM en azul oscuro e ITIM en rojo. Figura basada en las referencias 17 y 18.

Funcionalmente existen dos clases de receptores Fc, los receptores de activación y los de Inhibición <sup>[13]</sup>. Los receptores Fc de activación inducen señales mediante la fosforilación de sus secuencias ITAM, mientras que los receptores Fc de inhibición lo hacen fosforilando motivos ITIM, lo que induce la unión de fosfatasa y promueve respuestas inhibitoras <sup>[14]</sup>.

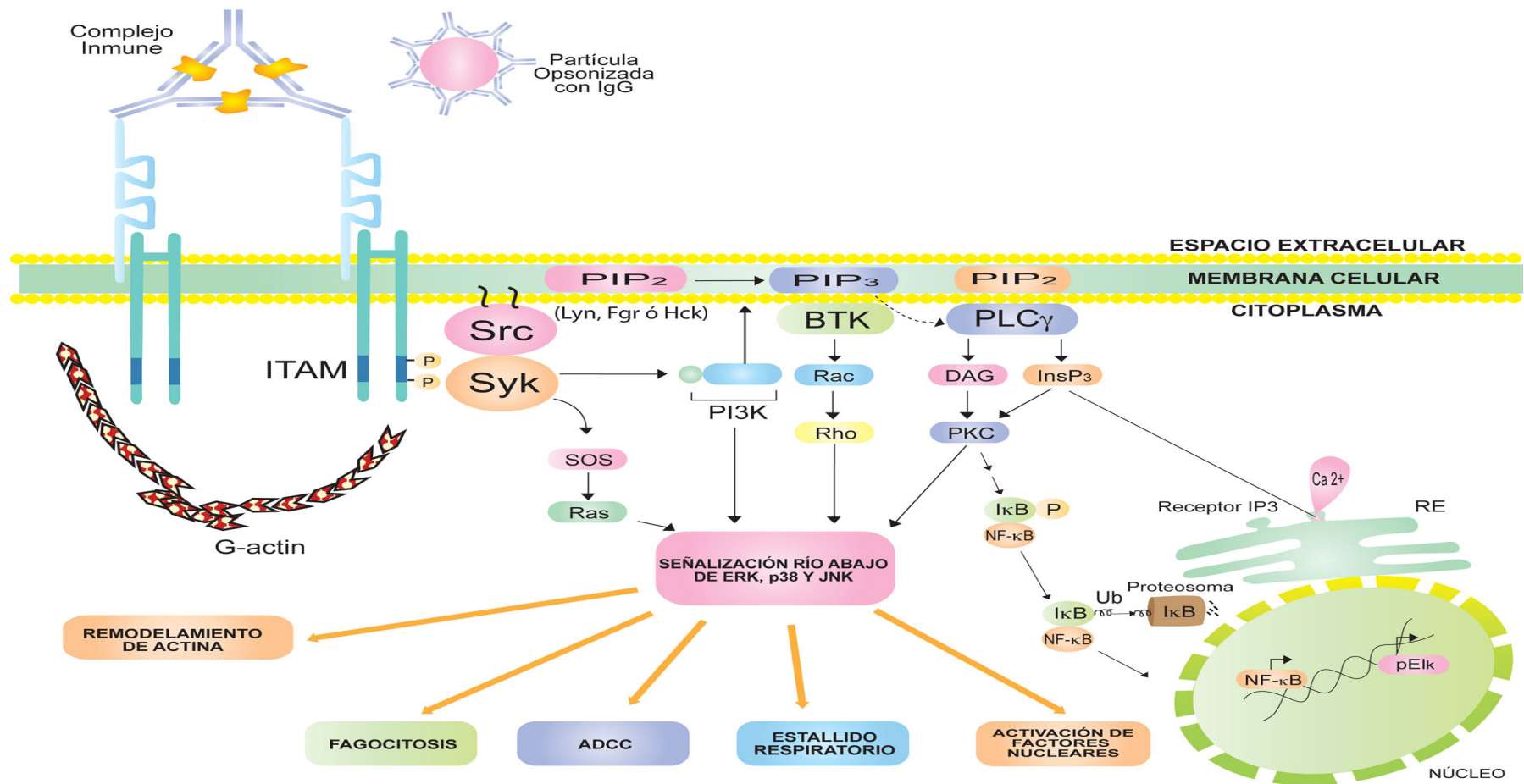
Algunos miembros de la familia de receptores Fc tienen importantes funciones en la inmunidad adaptativa, sobre todo en relación a su expresión y función en células presentadoras de antígeno. Los receptores Fc $\gamma$  participan en la presentación de antígeno <sup>[19]</sup> y en la maduración de las células dendríticas <sup>[20]</sup>. En células B, la activación del receptor Fc $\gamma$ RIIB es un regulador negativo de la activación del BCR <sup>[21, 22]</sup>. Por lo anterior se postula que el Fc $\gamma$ RIIB podría ser importante también en el mantenimiento de la tolerancia periférica <sup>[14]</sup>.

Los receptores Fc $\gamma$  unen de forma específica IgG, que es la inmunoglobulina más abundante en el suero y una fuerte inductora de la cascada del complemento. Estos receptores participan en la inflamación asociada a enfermedades autoinmunes <sup>[23]</sup>. Los receptores Fc $\gamma$  son expresados en el sistema hematopoyético, en leucocitos humanos se han descrito tres clases de receptores Fc $\gamma$ : Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RII (CD32) y Fc $\gamma$ RIII (CD16) <sup>[14]</sup>. Son codificados por diferentes genes y existen variantes de algunos de ellos. Los receptores Fc $\gamma$  se expresan de manera diferencial de acuerdo al tipo celular <sup>[24]</sup>. En algunos casos la expresión de estos receptores depende o es regulada por las condiciones de activación celular. Un ejemplo de lo anterior es el receptor Fc $\gamma$ RI que se expresa constitutivamente en monocitos y macrófagos, mientras que en neutrófilos es inducible con interferón gamma <sup>[25]</sup> y con el factor estimulador de colonias granulocíticas <sup>[26]</sup>. Los receptores Fc $\gamma$  difieren en su afinidad por IgG y en su estructura molecular <sup>[12]</sup>. Estos receptores reconocen de forma preferencial ciertos isotipos de IgG. El receptor Fc $\gamma$ RI une principalmente IgG1 e IgG3 (Kd~ 10<sup>-9</sup> M) <sup>[13]</sup>. El receptor Fc $\gamma$ RIIA

une principalmente IgG1 ( $K_d \sim 10^{-7}$  M) y el receptor  $Fc\gamma RIIIB$  une principalmente IgG3 ( $K_d \sim 10^{-6}$  M). Probablemente estas diferencias en la afinidad y en la especificidad por subclases de IgG estén relacionadas con las diferencias en la estructura presentadas por los receptores  $Fc\gamma$  (ver Figura 1).

### **Mecanismos generales de señalización de los receptores $Fc\gamma$**

Los receptores  $Fc\gamma$  señalizan mediante la activación de secuencias ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activating motif) o ITIM (Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) presentes en la parte intracelular de la cadena  $\alpha$  ó en sus cadenas asociadas  $\gamma$  o  $\xi$ . Los receptores  $Fc\gamma$  se activan por su unión a complejos inmunes o a partículas opsonizadas. Estos ligandos entrecruzan a los receptores e inducen la fosforilación de tirosinas de sus dominios ITAM por cinasas de la familia Src como: Lyn, Fgr o Hck. El dominio ITAM fosforilado recluta y activa a la cinasa Syk, esta cinasa tiene dominios  $SH_2$  que se unen a residuos fosforilados de tirosina. Syk activada inicia entonces una cascada de señalización basada en la fosforilación de fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) <sup>[16]</sup>, y de moléculas río arriba de las GTPasas pequeñas de la familia Ras. PI3K fosforila lípidos de membrana para generar fosfatidil-inositol-3 fosfato ( $PIP_3$ ), que sirve de sitio de anclaje de las tirosin cinasas de Bruton (BTK) a través de sus dominios de homología a plextrina (PH). BTK unida a  $PIP_3$  activa a la fosfolipasa C gamma ( $PLC\gamma$ ), esta enzima hidroliza al fosfatidil-inositol-bifosfato ( $PIP_2$ ) y genera los segundos mensajeros: diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato ( $InsP_3$ ). El DAG activa a la proteína cinasa C (PKC) que a su vez activa la señalización de las MAPK cinasas. Por otro lado, el  $InsP_3$  se une a su receptor en el retículo endoplásmico e induce la liberación de calcio intracelular. Por su parte, las cinasas BTK y Syk también activan moléculas río arriba de las GTPasas pequeñas Rac y Ras, las cuales son reguladoras del remodelamiento del citoesqueleto y de la activación de MAPK cinasas, que a su vez están involucradas en la activación de diversas respuestas funcionales <sup>[13], [17] [27]</sup> (ver figura 2).



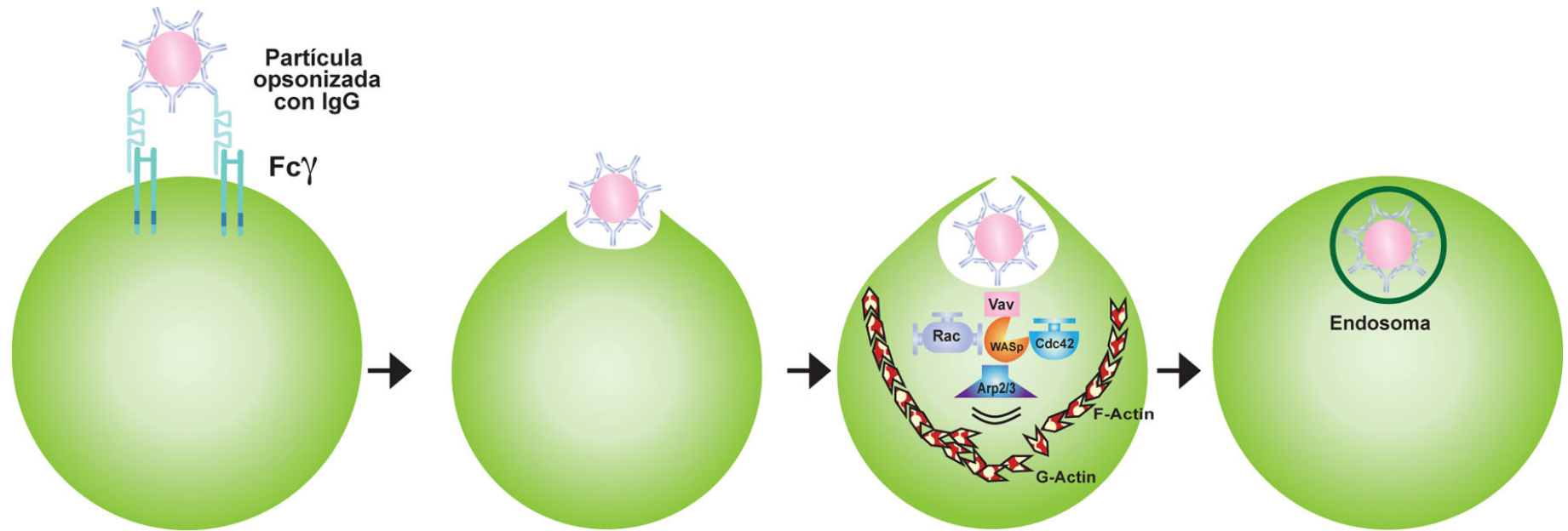
**Figura 2. Vía general de señalización de los receptores Fc $\gamma$  de activación.** Los receptores Fc $\gamma$  se activan por su unión a complejos inmunes o a partículas opsonizadas. Estos ligandos entrecruzan a los receptores e inducen la fosforilación de tirosinas de sus dominios ITAM por quinasas de la familia Src. El ITAM fosforilado recluta y activa a Syk, que inicia entonces una cascada de señalización basada en la fosforilación de fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K), y de moléculas río arriba de las GTPasas pequeñas de la familia Ras. PI3K fosforila lípidos de membrana para generar fosfatidilinositol-3 fosfato (PIP<sub>3</sub>), este lípido sirve de sitio de anclaje de las tirosin quinasas de Bruton (BTK), que unidas a PIP<sub>3</sub> activan a la fosfolipasa C gamma (PLC $\gamma$ ). Esta enzima hidroliza a fosfatidilinositol-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) y genera los segundos mensajeros diacilglicerol (DAG) e Inositol trifosfato (InsP<sub>3</sub>). DAG activa a la proteína quinasa C (PKC) y activa la señalización de las MAPK cinasas. Adicionalmente, InsP<sub>3</sub> se une a su receptor en el retículo endoplásmico e induce la liberación de calcio intracelular. Por otro lado, BTK y Syk también activan cinasas río abajo de Rac y Ras, que inducen el remodelamiento del citoesqueleto, y la activación de ERK y p38, estas últimas involucradas en la activación de diversas respuestas funcionales. Figura basada en las referencias: 13, 17 y 27.

# Fagocitosis

La fagocitosis es el proceso celular que se encarga de la ingestión de partículas de un diámetro mayor a  $0.5 \mu\text{M}$ . En organismos multicelulares la fagocitosis es un mecanismo importante para la protección contra patógenos, la remodelación tisular y para la eliminación de células muertas. En vertebrados superiores este proceso celular se lleva a cabo por muchos tipos celulares. Sin embargo, sólo los neutrófilos y macrófagos expresan en su membrana celular receptores fagocíticos especializados que les permiten fagocitar partículas de forma altamente eficiente <sup>[12, 28]</sup>, por lo que a estos tipos celulares se les denomina fagocitos profesionales. Algunos receptores fagocíticos reconocen determinantes moleculares que forman parte de la superficie celular de los microorganismos y otros reconocen moléculas séricas solubles cuya función es recubrir a los patógenos, a estas moléculas se les conoce con el nombre genérico de opsoninas e incluyen a los componentes de la cascada del complemento: C3b y C3bi y a las subclases de inmunoglobulina IgG1, IgG2 e IgG3. Se han descrito tres clases de receptor de complemento: CR1, CR3 y CR4. Los receptores CR3 ( $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ ) y CR4 ( $\alpha\text{X}\beta$ ) son miembros de la subfamilia  $\beta\text{2}$  de integrinas.

El proceso de fagocitosis involucra el reconocimiento molecular de la partícula que será fagocitada por receptores específicos presentes en la membrana celular de los fagocitos. Lo anterior activa vías de señalización que regulan el remodelamiento de la membrana celular del fagocito para formar una estructura denominada copa fagocítica y la formación de proyecciones de la membrana celular cuya función es englobar a la partícula e internalizarla en endosomas (Figura 3). La polimerización del citoesqueleto de actina está regulada por las GTPasas pequeñas de la familia Rho: Rac y Cdc42 y por factores intercambiadores de nucleótidos como Vav. Durante la activación de receptores  $\text{Fc}\gamma$ , Vav es reclutada y activa a Rac, que una vez activado recluta al factor promotor de nucleación de actina (conocido por

sus siglas en inglés como WASP)<sup>[29]</sup>, que recluta al complejo de nucleación de filamentos de actina Arp 2/3. La partícula opsonizada se engloba completamente y se internaliza en un organelo denominado endosoma. Posteriormente se lleva a cabo la maduración del endosoma. Este proceso consiste en la fusión del endosoma con vesículas lisosomales que contienen proteínas microbicidas, especies reactivas de oxígeno e hidrolasas que facilitan la destrucción de las partículas internalizadas<sup>[30]</sup>.



**Figura 3. Fagocitosis activada por receptores Fc $\gamma$ .** Este tipo de fagocitosis inicia con la unión de una partícula opsonizada con IgG a los receptores Fc $\gamma$ , induciendo su entrecruzamiento y la activación de vías de señalización basadas en la fosforilación de moléculas y en la activación de segundos mensajeros (ver figura 2). Un fagocito activado presenta cambios importantes en su membrana celular y forma estructuras llamadas copa fagocítica y pseudópodo. La formación de estas estructuras es dependiente del remodelamiento del citoesqueleto de actina. La polimerización del citoesqueleto de actina está regulada por las GTPasas pequeñas de la familia Rho: Rac y Cdc42, y por factores intercambiadores de nucleótidos como Vav. Durante la activación de receptores Fc $\gamma$ , Vav es reclutada y activa a Rac, que una vez activado recluta al factor promotor de nucleación de actina (conocido por sus siglas en inglés como WASP), el cual recluta al complejo de nucleación de filamentos de actina Arp 2/3. El pseudópodo se extiende y engloba completamente a la partícula opsonizada. La partícula opsonizada se internaliza en un organelo denominado endosoma.. Figura basada en: *García et al, 2005. Chapter 1. Diversity in Phagocytic Signaling., pag. 13.*



## RESUMEN

Los receptores  $Fc\gamma$  se activan por su unión a complejos inmunes o partículas opsonizadas. Se sabe que los receptores  $Fc\gamma$  tienen una participación importante en la inflamación asociada a enfermedades autoinmunes. En modelos murinos de glomerulonefritis y la artritis reumatoide los receptores  $Fc\gamma$  expresados en neutrófilos no tienen funciones redundantes. En este trabajo se exploraron las propiedades fagocíticas individuales de los receptores  $Fc\gamma$  expresados en neutrófilos humanos y adicionalmente se evaluaron otras respuestas funcionales asociadas a la activación de estos receptores, como la aparición de la enzima ERK fosforilada en el núcleo de las células y la movilización de calcio intracelular. Se evaluó la capacidad de los neutrófilos para fagocitar partículas de látex y bacterias Gram positivas *S. aureus*, recubiertas con los anticuerpos monoclonales 32.2, IV.3 y 3G8, que unen de forma específica a los receptores  $Fc\gamma RI$ ,  $Fc\gamma RIIA$  y  $Fc\gamma RIIIB$ , respectivamente. La capacidad de inducir fagocitosis y la aparición de la enzima ERK fosforilada en el núcleo de las células, se evaluaron por citometría de flujo. Los ensayos de movilización de calcio intracelular se hicieron con el indicador fluorescente de calcio Fura-2. Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que el receptor más efectivo en inducir fagocitosis en neutrófilos humanos es el receptor  $Fc\gamma RIIA$ . El receptor  $Fc\gamma RIIIB$  es poco eficiente para fagocitar. Sin embargo, es muy efectivo para inducir la aparición de ERK fosforilada en el núcleo. El receptor  $Fc\gamma RI$  no fue capaz de activar la fagocitosis de partículas de látex, pero sí de *S. aureus*.  $Fc\gamma RI$  tampoco fue capaz de inducir la aparición de ERK fosforilada en el núcleo, pero sí fue efectivo para inducir movilización de calcio intracelular. En conclusión, en neutrófilos humanos los receptores  $Fc\gamma$  tienen respuestas funcionales no redundantes. El  $Fc\gamma RIIA$  es el receptor fagocítico, el  $Fc\gamma RIIIB$  manda señales

preferentemente al núcleo y el Fc $\gamma$ RI parece requerir de señales extra para poder mediar fagocitosis.

## ABSTRACT

Fc $\gamma$  receptors are activated by their aggregation on the cell membrane. This aggregation is induced by binding to immune complexes or opsonized particles. It is known that Fc $\gamma$  receptors play a significant role in the inflammation associated with autoimmune diseases such as glomerulonephritis and rheumatoid arthritis. In murine models of these diseases Fc $\gamma$  receptors expressed in neutrophils have non-redundant functions. In this work, we explored the properties of individual phagocytic Fc $\gamma$  receptors expressed on human neutrophils by evaluating several functional responses associated with activation of these receptors. We evaluated the appearance of phosphorylated ERK enzyme in the nucleus of cells, intracellular calcium mobilization, and phagocytosis. For phagocytosis, neutrophils were presented with latex particles and bacteria, opsonized with monoclonal antibodies 32.2, IV.3 and 3G8. These antibodies specifically bind to receptors Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA, and Fc $\gamma$ RIIIB, respectively. The phagocytic capacity and the appearance of phosphorylated ERK in nucleus were evaluated by flow cytometry. Intracellular calcium mobilization assays were made with the calcium fluorescent indicator Fura-2. The best phagocytic receptor in human neutrophils was the Fc $\gamma$ RIIA. Fc $\gamma$ RIIIB receptor was less efficient in inducing phagocytosis, but was very effective in inducing the appearance of phosphorylated ERK at the nucleus. Fc $\gamma$ RI did not mediate phagocytosis of latex particles, but promotes phagocytosis of *S. aureus* bacteria. Thus, this receptor seems to require extra signals to mediate phagocytosis. Fc $\gamma$ RI was also unable to induce the appearance of phosphorylated ERK in the nucleus, but it was effective in inducing intracellular calcium mobilization. In conclusion, human neutrophil Fc $\gamma$  receptors have non-redundant functional responses. The phagocytic receptor is the Fc $\gamma$ RIIA. Fc $\gamma$ RIIIB preferably sends signals to the nucleus and the Fc $\gamma$ RI appears to require extra signal to mediate phagocytosis.

## JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aunque se postulan vías de señalización generales para los receptores  $Fc\gamma$  <sup>[13]</sup>, se ha demostrado que no necesariamente son iguales en monocitos, macrófagos y neutrófilos <sup>[32]</sup>. Se sabe que las respuestas funcionales de los receptores  $Fc\gamma$  varían de acuerdo al tipo celular, pero también podrían variar de acuerdo al tipo de receptor  $Fc\gamma$  que se este activando en una célula en particular y también podría influir en la respuesta el estado de activación celular. Estudios en modelos murinos de enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide y glomerulonefritis, muestran que los receptores  $Fc\gamma RIIA$  y  $Fc\gamma RIIIB$  de neutrófilos inducen respuestas celulares diferenciales en estas enfermedades <sup>[38]</sup>. De tal forma que es importante realizar estudios para explorar las respuestas funcionales de estos receptores tras su activación individual en neutrófilos humanos.

## ANTECEDENTES

En general se ha aceptado que todos los receptores Fc $\gamma$  median la fagocitosis. Esta generalización proviene de experimentos de expresión de receptores Fc $\gamma$  en líneas celulares. Cuando las células COS-1 se transfectan con el cDNA que codifica a los Fc $\gamma$ Rs, las células adquieren capacidades fagocíticas <sup>[31]</sup>. En la actualidad se reconoce que la activación de los receptores Fc $\gamma$  promueve diversas respuestas celulares además de la fagocitosis. Si bien, se han identificado las vías de señalización generales que activan los receptores Fc $\gamma$  para inducir las respuestas celulares <sup>[13]</sup>, se ha demostrado también que existen diferencias en cuanto a los requerimientos moleculares de señalización, por ejemplo entre los fagocitos profesionales y no profesionales <sup>[32, 33]</sup>. Los fagocitos profesionales, además de PKC requieren de PI3K y ERK para la inducción de fagocitosis, mientras que en monocitos, estas cinasas no son necesarias para inducir esta función por activación de los receptores Fc $\gamma$  <sup>[32]</sup>. La activación de los receptores Fc $\gamma$  por su unión a complejos inmunes, es importante en la inflamación asociada a enfermedades autoinmunes como: glomerulonefritis, artritis reumatoide y lupus eritematoso <sup>[34-37]</sup>. En un modelo de inducción de glomerulonefritis por IgG, se observó que los ratones deficientes en la cadena gamma común (que es necesaria para la expresión de los receptores Fc $\gamma$  de activación murinos) son protegidos para el desarrollo de esta enfermedad, y que la expresión transgénica selectiva en neutrófilos de los receptores humanos Fc $\gamma$ RIIA y Fc $\gamma$ RIIIB es suficiente para restaurar la susceptibilidad al desarrollo de glomerulonefritis <sup>[38]</sup>. Por otro lado, se determinó en un modelo de deposición de complejos inmunes en vasculatura que los receptores Fc $\gamma$ RIIA y Fc $\gamma$ RIIIB promueven el reclutamiento de neutrófilos, pero que sólo el receptor Fc $\gamma$ RIIA está implicado en el daño a tejido <sup>[38]</sup>. Lo anterior sugiere que en neutrófilos los receptores Fc $\gamma$ RIIA y Fc $\gamma$ RIIIB inducen

respuestas celulares no redundantes. De tal forma que es relevante realizar estudios para explorar las respuestas funcionales específicas de los receptores  $Fc\gamma$  en neutrófilos humanos. Los neutrófilos humanos expresan de forma constitutiva los receptores  $Fc\gamma$ RIIA y  $Fc\gamma$ RIIIB mientras que la expresión del receptor  $Fc\gamma$ RI es inducible por estimulación con  $INF\gamma$  ó G-CSF [25, 39]. Los receptores  $Fc\gamma$ RIIA y  $Fc\gamma$ RIIIB no tienen un gen homólogo en ratón, el receptor  $Fc\gamma$ RIIIB sólo se expresa en neutrófilos humanos [13]. Aunque el receptor  $Fc\gamma$ RIIIB sólo se encuentra unido a la membrana por un residuo de GPI y no cuenta con cadenas accesorias, se ha demostrado claramente que este receptor es funcional, ya que su estimulación induce flujo de calcio, estallido respiratorio, polimerización de actina, fagocitosis y activación de factores nucleares [33, 40-42]. Los receptores  $Fc\gamma$ RI y  $Fc\gamma$ RIIA activan la fagocitosis de células dendríticas humanas cultivadas de sangre periférica[43]. Adicionalmente, se ha observado que los macrófagos de ratones deficientes de  $Fc\gamma$ RI presentan disminuida la fagocitosis [44].

## **HIPOTESIS**

La activación específica de los receptores Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA y Fc $\gamma$ RIIIB induce respuestas diferenciales en neutrófilos humanos.

## **OBJETIVO GENERAL**

Analizar la activación de los receptores Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIIB en neutrófilos humanos, mediante ensayos de fagocitosis, movilización de calcio intracelular y de aparición de la enzima ERK fosforilada en el núcleo de las células.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

### **Objetivo 1**

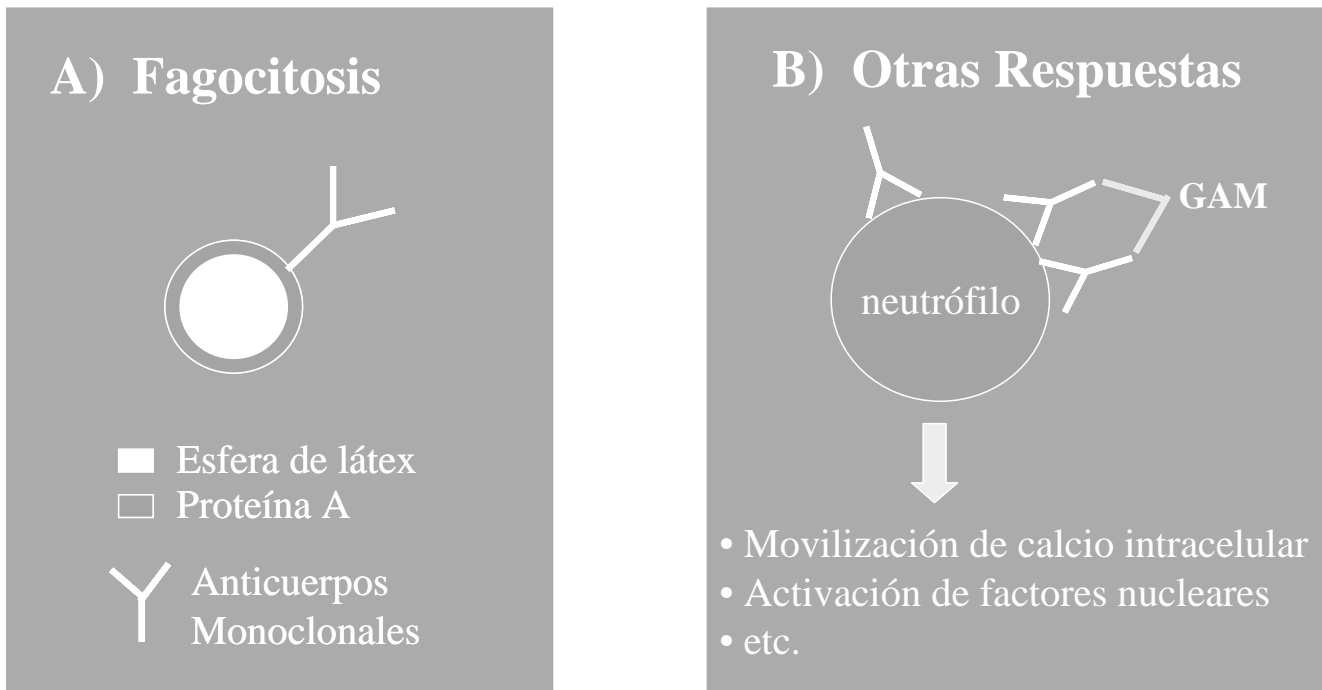
Analizar la actividad fagocítica individual de los receptores Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIIB en neutrófilos humanos con esferas de látex y con bacterias Gram positivas *S. aureus*, recubiertas con los anticuerpos monoclonales 32.2, IV.3 y 3G8.

### **Objetivo 2**

Determinar la participación de las cinasas: Src, Syk, MEK, PI3K, PKC y BTK en la fagocitosis de los receptores Fc $\gamma$  expresados en neutrófilos humanos, mediante el uso de inhibidores farmacológicos.

### **Objetivo 3**

Evaluar la aparición de la enzima ERK fosforilada en el núcleo de las células y la movilización de calcio intracelular inducida por la activación de los receptores Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA y Fc $\gamma$ RIIIB.



**Figura 4. Estrategia experimental para la activación específica de receptores  $Fc\gamma$ .** A) Para los ensayos de fagocitosis se utilizaron esferas de látex fluorescentes recubiertas con proteína A y con anticuerpos monoclonales específicos para un receptor  $Fc\gamma$  en particular. B) Para inducir activación de factores nucleares y la movilización de calcio, los neutrófilos se trataron con anticuerpos monoclonales específicos para un receptor  $Fc\gamma$  en particular y posteriormente con el fragmento  $f(ab')_2$  de un anticuerpo secundario contra IgG de ratón.



## **MATERIAL Y METODOS**

### **Aislamiento de neutrófilos.**

Los PMN se obtuvieron a partir de sangre periférica de donadores sanos. Cada 10 ml de sangre se colectaron en un tubo con 250  $\mu$ l de heparina (1000 U/ml) y 2 ml de una solución de dextrán T500 al 6% (Amersham Biosciences, Amersham, UK) diluido en PBS. La sangre se mezcló suavemente y se dejó reposar durante 45 min para que los eritrocitos se sedimenten. Posteriormente, se colectó el plasma y se depositó cuidadosamente sobre 5 ml de Ficoll Paque<sup>TM</sup> Plus (Amersham Biosciences ). Los tubos se centrifugaron a 600 x g en una centrífuga Sorvall modelo RT 6000D durante, 20 min a 4° C. Transcurrido el tiempo de centrifugación los tubos se decantaron, los PMN se encuentran en la pastilla celular. Los eritrocitos remanentes se lisaron, resuspendiendo los PMN por 1 min en 5 ml de una solución hipotónica (0.2% NaCl, 1% BSA y 20mM Hepes, pH 7.4). Posteriormente se agregaron 5 ml de una solución hipertónica (1.6% NaCl, 1% BSA, 20mM Hepes, pH 7.4), para equilibrar a una solución salina isotónica. Las células se sedimentaron por centrifugación a 350 x g durante 5 min y se lavaron con 10 ml de PBS. Los PMN totales se contaron en una cámara de Neubauer y se ajustaron a una concentración de  $10^7$  células/ml en PBS para ser utilizados posteriormente.

## Tinción extracelular de receptores Fc

Se colocaron de  $0.1 - 0.5 \times 10^6$  PMN por cada condición de tinción. Los PMN fueron centrifugados a  $3099 \times g$  en una microcentrífuga Eppendorf 5418 durante 1 min. Los sobrenadantes se absorbieron cuidadosamente y los PMN fueron resuspendidos en 100  $\mu$ l de buffer de FACS (0.5% BSA, 1% sacarosa en PBS, pH 7.4) enfriado en hielo. Posteriormente, a los PMN se les agregó el anticuerpo primario correspondiente (ver tabla 1) a una concentración final de 10  $\mu$ g/ml y la mezcla se incubó en hielo durante 20 min. Transcurrido este tiempo las células se lavaron dos veces con 300  $\mu$ l de buffer de FACS. Después del último lavado, la pastilla celular se resuspendió en 50  $\mu$ l de una dilución 1/500 de anticuerpo secundario fluoresceinado. Los PMN se incubaron con el anticuerpo secundario durante 10 min en hielo. Posteriormente los PMN se lavaron dos veces y se fijaron con una solución de paraformaldehído al 1%, para ser evaluados en el citómetro FACScan (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Las muestras fueron analizadas usando el programa CellQuest versión 3.3.

**Tabla 1. Anticuerpos utilizados en la tinción extracelular de receptores Fc $\gamma$  y en los protocolos de estimulación.**

Nombre del anticuerpo	Especificidad	Tipo de anticuerpo	Isotipo	Fuente
32.2	Fc $\gamma$ RI	Monoclonal	IgG1	Medarex (Annandale,NJ)
IV.3	Fc $\gamma$ RIIA	Monoclonal	IgG2b	Medarex (Annandale,NJ)
3G8	Fc $\gamma$ RIIIB	Monoclonal	IgG1	Medarex (Annandale,NJ)
Anti GST (B-14)	Glutation-S-Transferasa	Monoclonal	IgG1	Santa Cruz (CA)
F(ab') <sub>2</sub> anti IgGs	IgG de ratón	Policlonal de cabra		Cappel (Aurora, OH)
FITC- F(ab') <sub>2</sub> anti IgGs	IgG de ratón	Policlonal de cabra		Cappel (Aurora, OH)

## **Preparación de microesferas de látex para el ensayo de fagocitosis**

Las microesferas de látex fluorescentes de un diámetro de 4.5  $\mu\text{M}$  se obtuvieron de Polysciences (Warrington, PA). Previo a los experimentos de fagocitosis, las microesferas fueron recubiertas con proteína A (Sigma, St. Louis, MO) por adsorción. La proteína A une la porción Fc de IgG. Posteriormente, las microesferas se recubrieron con los anticuerpos monoclonales para los receptores: Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA y Fc $\gamma$ RIIIB (ver tabla 1) o con el anticuerpo contra Glutati6n-S-Tranferasa B-14 (Santa Cruz Biotechnolgy, Santa Cruz, CA) que se utiliz6 como anticuerpo control y en adelante es referido como anti-GST.

**Preparaci6n de microesferas con prote6na A.** En un tubo eppendorf de 1.5 ml se colocaron  $10^8$  microesferas. Las microesferas se lavaron 3 veces con 1 ml de 6cido b6rico (0.1M pH 8.5). Cada vez se centrifugaron a 16873 x g durante 1 min y se removió el sobrenadante por aspiraci6n. Posteriormente, las part6culas se resuspendieron en un volumen de 500  $\mu\text{l}$  de 6cido b6rico (0.1M pH 8.5) y se les adicion6 200  $\mu\text{g}$  de prote6na A. Las microesferas se incubaron toda la noche a temperatura ambiente, protegidas de la luz y en agitaci6n rotatoria. Posteriormente, las microesferas se centrifugaron a 16873 x g durante 10 min. El sobrenadante se retir6 por aspiraci6n y las microesferas se resuspendieron en 500 $\mu\text{l}$  de 6cido b6rico (0.1M pH 8.5) conteniendo 10 mg/ml de BSA. Las microesferas se incubaron durante 30 min en agitaci6n rotatoria. Posteriormente, las microesferas se centrifugaron a 16873 x g, durante 5 min, se retir6 el sobrenadante y se resuspendieron en 500  $\mu\text{l}$  de 6cido b6rico. Este procedimiento se repiti6 2 veces m6s. Finalmente, las microesferas se lavaron con una soluci6n de BSA (10 mg/ml) en PBS y se resuspendieron en 1.25 ml de esta soluci6n para ajustarlas a  $10^8$  microesferas/ml.

**Recubrimiento de las microesferas con los anticuerpos monoclonales.** Las microesferas preparadas con proteína A se repartieron en tubos eppendorf. A cada tubo se le agregó el anticuerpo monoclonal correspondiente, a la concentración final indicada en cada experimento. Las microesferas se incubaron en agitación rotatoria, a 4° C durante un tiempo mínimo de 2 h. Transcurrido este tiempo, las microesferas se centrifugaron a 16873 x g durante 5 min. Posteriormente, se lavaron 2 veces con 500 µl de la solución de PBS-BSA y se ajustaron a una concentración de 10<sup>8</sup> microesferas/ml.

## **Preparación de Pansorbin® para el ensayo de fagocitosis**

El Pansorbin® es una suspensión comercial de la bacteria *Staphylococcus aureus*, inactivada por calor y fijada en formalina. Esta bacteria tiene en su superficie proteína A y por lo tanto es capaz de unir anticuerpos.

### **Marcaje de Pansorbin® con isotiocianato de fluoresceína**

Se centrifugaron 200 µl de la suspensión de Pansorbin® (Calbiochem; San Diego, CA) a 16873 x g durante 1 min. El sobrenadante se eliminó por aspiración al vacío y las células se lavaron 2 veces, adicionando 1 ml de PBS. Posteriormente, la pastilla celular se rompió por agitación en un aparato vortex y se le agregó 1 ml de etanol (enfriado a -20°C) para permeabilizar las células mientras se continuaba con la agitación. Las células resuspendidas fueron incubadas a -20 °C durante 1 h. Transcurrido este tiempo, las células se sedimentaron por centrifugación a 16873 x g y se lavaron con 1ml de PBS. Posteriormente, se resuspendieron en un buffer de carbonato (0.1M, pH 9.6) conteniendo 5 mg/ml de Fluoresceín-Isotyocyanate-Dextran (SIGMA, Chemical Co; St. Louis, MO). El Pansorbin® se incubó a 37°C y en agitación, durante toda la noche. Para remover el FITC no unido, la suspensión de Pansorbin® se lavó 2 veces con PBS. Las partículas totales de Pansorbin® fluoresceinado (Pansorbin-FITC) se cuantificaron en una cámara de Neubauer, utilizando un microscopio de fluorescencia. El Pansorbin-FITC se resuspendió a una concentración de 10<sup>9</sup> partículas/ml en PBS conteniendo azida de sodio al 0.1% y fue almacenado a 4°C protegido de la luz hasta su uso.

## **Recubrimiento de Pansorbin-FITC con los anticuerpos**

Se tomaron  $1 \times 10^8$  partículas de pansorbin-FITC, se centrifugaron a  $16873 \times g$  y se lavaron dos veces con 1 ml de PBS. Posteriormente  $0.25 \times 10^8$  partículas se resuspendieron en 300  $\mu$ l de PBS conteniendo los anticuerpos monoclonales correspondientes a una concentración final de 20  $\mu$ g/ml de anticuerpo y se incubaron 2 h, a  $4^\circ\text{C}$  en agitación rotatoria. Posteriormente se lavaron las partículas dos veces con 500  $\mu$ l de PBS se resuspendieron a una densidad de  $10^8$  partículas/ml.

## **Fagocitosis en fase líquida**

A un tubo eppendorf conteniendo 85  $\mu$ l de buffer de fagocitosis (PBS pH 7.4, 1% de albúmina sérica humana, 2 mM de  $\text{CaCl}_2$  y 1.5% mM  $\text{MgCl}_2$ ) enfriado en hielo, se le agregan 10  $\mu$ l de PMN ( $1 \times 10^7$  células/ml) y 3.5  $\mu$ l de microesferas fluorescentes o Pansorbin-FITC. Los tubos se mezclaron suavemente y se incubaron en un baño maría a  $37^\circ\text{C}$  durante 30 min. Transcurrido este tiempo se detiene la fagocitosis incubando las células en hielo durante 3 min. Posteriormente las células se centrifugaron a  $3099 \times g$  durante 1 min, el sobrenadante se retiró cuidadosamente y la pastilla celular se resuspendió en 100  $\mu$ l de una solución de tripsina fría al 0.25% (Gibco-Invitrogen) y se incubó a  $4^\circ\text{C}$  durante 15 min. Posteriormente, la tripsina se inactivó con 500  $\mu$ l de buffer MACS (2mM EDTA, 0.5% BSA en PBS pH 7.4). Finalmente, los PMN fueron centrifugados a  $3099 \times g$  durante 1 min y fueron fijados con 300  $\mu$ l de paraformaldehído al 1 % en PBS. Las muestras se analizaron con un citómetro FACScan (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) con el programa CellQuest (versión 3.3). Los PMN se evaluaron con respecto a dos parámetros: el porcentaje de PMN fluorescentes y la intensidad de la fluorescencia media de la población. La integración de dichos parámetros se presenta como Rendimiento Fagocítico.

## Tratamientos con inhibidores para ensayos de fagocitosis

En algunos experimentos de fagocitosis, se utilizaron inhibidores farmacológicos de las moléculas de señalización que clásicamente han sido involucradas en la vía general de activación de los receptores Fc $\gamma$ . Antes del ensayo de fagocitosis, los PMN se trataron con los inhibidores que se presentan en la tabla 2, en la misma tabla se presentan las condiciones que fueron utilizadas para cada inhibidor.

**Tabla 2. Inhibidores farmacológicos utilizados en los ensayos de fagocitosis**

<b>Inhibidor</b>	<b>Especificidad</b>	<b>Condiciones Usadas</b>	<b>Fuente</b>
PP2	Cinasas de la familia Src	<b>30 <math>\mu</math>M, 15 min, 37°C</b>	Calbiochem (San Diego, CA)
Piceatannol	Syk/ZAP70	<b>50 <math>\mu</math>M, 30 min, 37°C</b>	Calbiochem (San Diego, CA)
PD98059	MEK	<b>50 nM, 30 min, 4°C</b>	New England Biolabs (Beverly, MA)
Wortmanina	PI3K	<b>50 <math>\mu</math>M, 30 min, 4°C</b>	Calbiochem (San Diego, CA)
Staurosporine	PKC	<b>2.5 nM, 30 min, 4°C</b>	Sigma Chemical Co.
LFM-A13	BTK	<b>100 <math>\mu</math>M, 30 min, 37°C</b>	Calbiochem (San Diego, CA)

## **Tratamiento con interferón gamma**

Los PMN se resuspendieron a una concentración de  $3 \times 10^6$  células/ml en medio RPMI 1640 (Gibco-Invitrogen, CA) suplementado con 10% de SFB, 20 mM de glutamina, 50 U/ml de penicilina y 50  $\mu\text{g/ml}$  de estreptomicina. Posteriormente los PMN se sembraron en placas de cultivo de seis pozos (2 ml/pozo) y se trataron con INF- $\gamma$  (Endogen, Pierce Biotechnology, Rockford, IL) a una concentración final de 15 ng/ml ó 60 ng/ml, o sólo con medio. Posteriormente, los PMN fueron incubados durante 5 ó 22 horas a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5 % de CO<sub>2</sub>.

## **Activación de factores nucleares**

Los PMN ( $3 \times 10^6$  por condición) se resuspendieron en una solución de PBS con los anticuerpos monoclonales correspondientes a una concentración final de 10  $\mu\text{g/ml}$  y se incubaron en hielo durante 30 min. Posteriormente, los PMN se lavaron dos veces con 1 ml de PBS y se resuspendieron en 300  $\mu\text{l}$  de PBS conteniendo 60  $\mu\text{g/ml}$  del fragmento F(ab')<sub>2</sub> del anticuerpo entrecruzador goat anti-mouse IgG (Cappel 55468) y se incubaron a 37°C durante 30 min. Transcurrido este tiempo, las células se sedimentaron por centrifugación a 3099 x g durante 1 min y el botón celular se congeló en un baño de hielo seco y etanol. Posteriormente, los núcleos se aislaron con una solución hipotónica como se describe a continuación. La pastilla celular se resuspendió en 100  $\mu\text{l}$  de buffer hipotónico frío (10 mM de HEPES, 10 mM de KCl, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> y 1 mM de DTT; pH 7.9). Los núcleos se centrifugaron a 775 x g durante 10 min. Se removió cuidadosamente el sobrenadante y los núcleos se fijaron durante 20 min en hielo con 100  $\mu\text{l}$  de paraformaldehído frío al 4%. Posteriormente, los núcleos fueron teñidos para citometría de flujo. Los núcleos se centrifugaron 1 min a 1743 x g, el sobrenadante se removió cuidadosamente y los núcleos se



incubaron 10 min en hielo en 100  $\mu$ l de una solución permeabilizadora (tritón X-100 al 0.1%, paraformaldehído al 4% en PBS). Posteriormente, los núcleos se centrifugaron 1 min a 1743 x g, la pastilla celular se resuspendió en 500  $\mu$ l de la solución de bloqueo fría (suero fetal bovino al 4% en PBS), los núcleos se incubaron en esta solución durante 20 min en hielo. Posteriormente, los núcleos se sedimentaron por centrifugación y se resuspendieron en 100  $\mu$ l de la solución de bloqueo conteniendo el anticuerpo primario (2.5  $\mu$ g/ml) correspondiente y se incubaron en hielo durante 20 min. Posteriormente los núcleos se lavaron con 800  $\mu$ l de PBS con 4% de suero fetal bovino y fueron posteriormente incubados en 100  $\mu$ l de suero fetal bovino conteniendo 30  $\mu$ g/ml del anticuerpo secundario fluoresceinado (ver tabla 1). Los PMN se incubaron con el anticuerpo secundario en hielo 20 min. Posteriormente se lavaron y se fijaron con 400  $\mu$ l de paraformaldehído al 1 % en PBS. Las muestras se analizaron en un citómetro FACScan con el programa CellQuest (versión 3.3). Los PMN se evaluaron con respecto a la intensidad de la fluorescencia media de la población.

## **Liberación de calcio intracelular con Fura-2**

Los PMN se centrifugaron 5 min a 400 x g. Posteriormente se resuspendieron a una concentración de  $10^8$  células/ml en buffer de carga (PBS pH 7.4,  $\text{CaCl}_2$  and  $\text{MgCl}_2$  1.5 mM), y se incubaron a 37°C, durante 5 min. Posteriormente se adicionó Fura-2/AM a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  y los PMN fueron incubados otros 5 min. Transcurrido este tiempo, la suspensión celular fue diluida 10 veces con buffer de carga (precalentado a 37°C) y los PMN fueron incubados otros 20 min. Posteriormente los PMN se lavaron con buffer de carga dos veces y se resuspendieron a una concentración de  $10^7$  células/ml. Los PMN se colocaron en hielo, se les adicionó el anticuerpo primario correspondiente (ver tabla 1) a una concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$  y se incubaron en hielo durante 10 min. Transcurrido este tiempo los PMN se lavaron y resuspendieron en buffer de carga a una concentración de  $10^6$  células/ml. Posteriormente,  $2 \times 10^6$  células se transfirieron a una celda del espectrofluorómetro y se indujo el entrecruzamiento de receptores con el anticuerpo  $\text{F(ab')}_2$  anti IgG de ratón de Cappel (Aurora, OH) a una concentración final de 40  $\mu\text{g/ml}$ . Los cambios en la fluorescencia se monitorearon en un espectrofluorómetro Perkin Elmer LS55 (Waltham, MA). La concentración de calcio se calculó con el programa de Perkin Elmer FL Winlab, versión 4.00.02.

## **RENDIMIENTO FAGOCÍTICO**

La fagocitosis por los PMN se evaluó con respecto a dos parámetros: el porcentaje de PMN fluorescentes y la intensidad de la fluorescencia media de la población. La integración de dichos parámetros se presenta como Rendimiento Fagocítico, y se calculó mediante la siguiente ecuación:

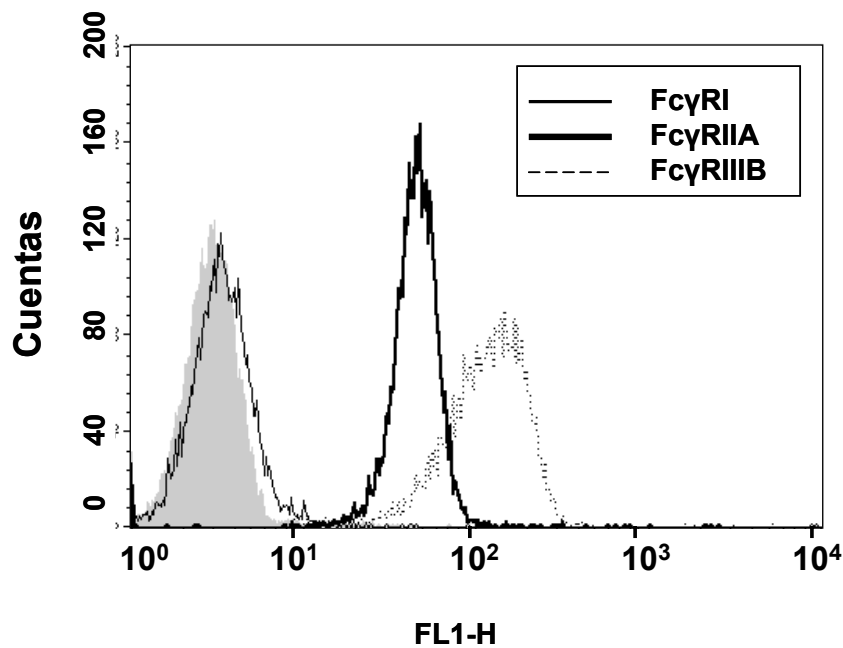
$$\text{Rendimiento Fagocítico} = \frac{(\% \text{ de células positivas}) (\text{Intensidad de fluorescencia media})}{100}$$

## **ESTADÍSTICA**

Los datos se compararon con una prueba t de Student de datos no pareados y con varianza diferente. La prueba se realizó con el programa estadístico KaleidaGraph versión 4 (Synergy Software; Reading, PA). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas aquellas con un valor de  $p \leq 0.05$ .

## RESULTADOS

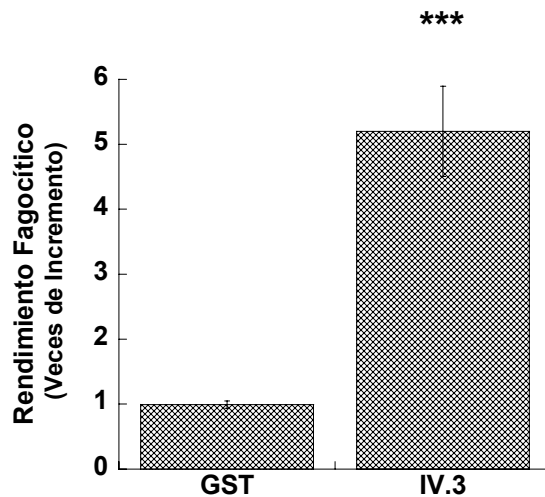
En la figura 5 se muestra la expresión basal de los receptores  $Fc\gamma$  en neutrófilos humanos. Como se observa en el histograma, los receptores  $Fc\gamma RIIA$  y  $Fc\gamma RIIIB$  expresan constitutivamente. La expresión del receptor  $Fc\gamma RI$  se detectó algunas veces, pero siempre con una expresión mínima.



**Figura 5. Expresión de receptores  $Fc\gamma$  en neutrófilos humanos.**

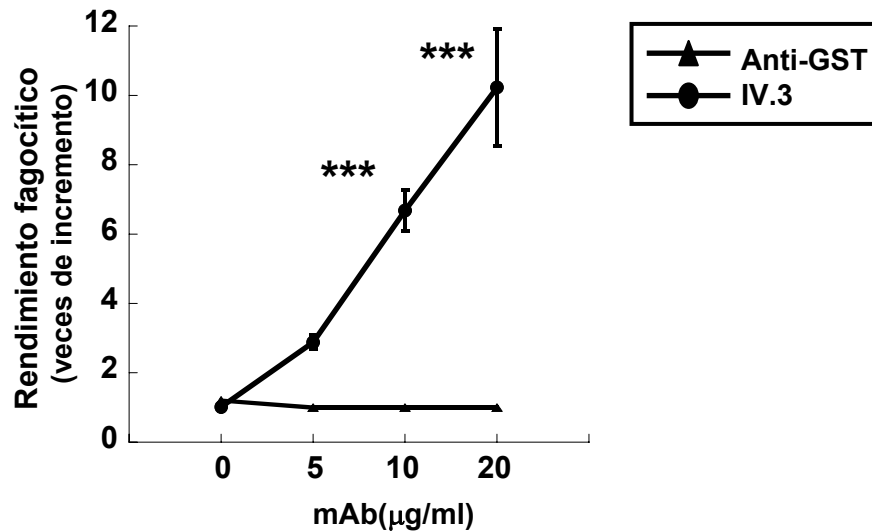
PMN de donadores sanos fueron teñidos con los anticuerpos monoclonales 32.2, IV.3 y 3G8. En gris se presenta la fluorescencia del anticuerpo secundario sólo. Se muestra la expresión de los receptores  $Fc\gamma RI$  (línea delgada),  $Fc\gamma RIIA$  (línea gruesa) y  $Fc\gamma RIIIB$  (línea discontinua). Las muestras se analizaron por citometría de flujo. Se muestra una tinción representativa de más de 10 determinaciones independientes.

Para determinar la fagocitosis específica mediada por los receptores  $Fc\gamma RIIA$  y  $Fc\gamma RIIIB$ , los neutrófilos se probaron para fagocitar microesferas de látex recubiertas con los anticuerpos monoclonales IV.3, 3G8 ó con un anticuerpo irrelevante que se utilizó para determinar la fagocitosis basal. El rendimiento fagocítico se calculó como se indica en materiales y métodos. Los datos que aquí se presentan están reportados como veces de incremento con respecto a la fagocitosis basal. Como se muestra en la figura 6, el receptor  $Fc\gamma RIIA$  es efectivo para activar fagocitosis, ya que la fagocitosis de microesferas recubiertas con el anticuerpo IV.3 se incrementó más de cinco veces con respecto a la fagocitosis de partículas recubiertas con el anticuerpo control (anti GST).



**Figura 6. El receptor  $Fc\gamma RIIA$  activa eficientemente la fagocitosis en neutrófilos.** PMN humanos se usaron para fagocitar microesferas de látex fluorescentes recubiertas con 10  $\mu\text{g/ml}$  del anticuerpo monoclonal IV.3. La fagocitosis fue evaluada por citometría de flujo. El rendimiento fagocítico se calculó como se indica en materiales y métodos y se presenta como veces de incremento en relación a la condición control (anti-GST). Los asteriscos denotan condiciones que son estadísticamente diferentes al control. Los resultados son promedios de 11 experimentos independientes. \*\*\* ( $p < 0.002$ ).

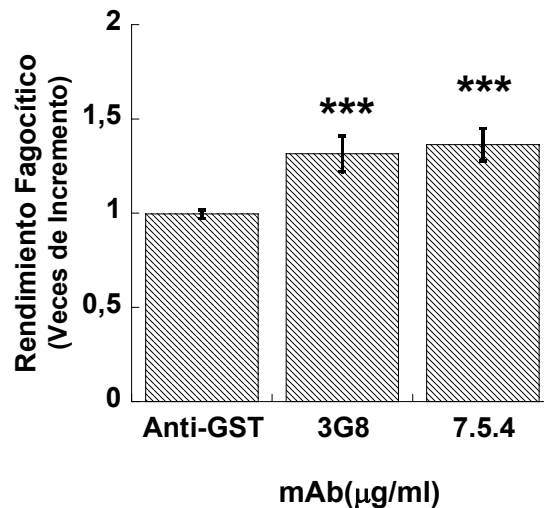
Posteriormente, los neutrófilos se pusieron a fagocitar microesferas de látex recubiertas con dosis mayores del anticuerpo IV.3. Se observa que un aumento en la dosis de recubrimiento de las microesferas favorece la activación de la fagocitosis por el receptor  $Fc\gamma RIIA$  (Figura 7). Cuando las microesferas se recubren con dosis de anticuerpo de 20  $\mu\text{g/ml}$  la fagocitosis activada por el receptor  $Fc\gamma RIIA$  se incrementa hasta diez veces.



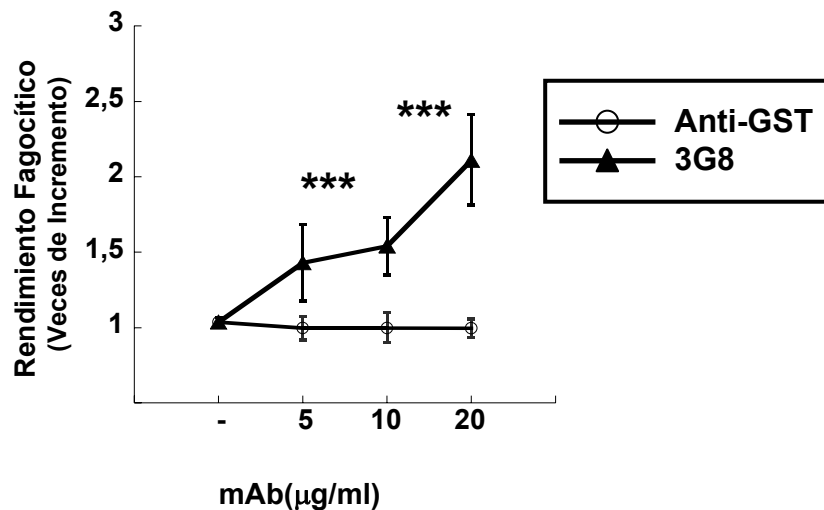
**Figura 7. La fagocitosis del receptor Fc $\gamma$ RIIA se incrementa en forma dosis dependiente al nivel de recubrimiento de las partículas con el anticuerpo IV.3.** PMN humanos se utilizaron para fagocitar microesferas de látex fluorescentes recubiertas con concentraciones crecientes de anti-GST ó del anticuerpo monoclonal IV.3 (que se une específicamente al receptor Fc $\gamma$ RIIA). La fagocitosis fue evaluada por citometría de flujo. El rendimiento fagocítico se presenta como veces de incremento en relación a la condición control (anti-GST). Los asteriscos denotan condiciones que son estadísticamente diferentes al control. \*\*\* ( $p < 0.002$ ). n=6.

Aunque el nivel de expresión del receptor Fc $\gamma$ RIIIB en neutrófilos humanos es mayor que el del receptor Fc $\gamma$ RIIA (Figura 5), la fagocitosis de las microesferas recubiertas con el anticuerpo específico para el receptor Fc $\gamma$ RIIIB (3G8) mostró un incremento sólo de 1.3 veces en relación a la fagocitosis basal. El incremento en la fagocitosis de microesferas recubiertas con el anticuerpo 3G8 fue pequeño constante y significativo estadísticamente (Figura 8). Para resolver si el receptor Fc $\gamma$ RIIIB es capaz de mediar la fagocitosis o no, se hicieron experimentos con microesferas recubiertas con el anticuerpo 7.5.4, otro anticuerpo

monoclonal dirigido contra el receptor Fc $\gamma$ RIIIB. Los resultados obtenidos con el anticuerpo 7.5.4 fueron similares a los obtenidos con el anticuerpo 3G8 (Figura 8). Adicionalmente, se realizaron experimentos de fagocitosis con microesferas recubiertas con dosis crecientes del anticuerpo 3G8 (Figura 9), para evaluar si esto incrementaba la fagocitosis como sucedió con el anticuerpo IV.3. Como se observa en la figura 9, aún con microesferas recubiertas con dosis mayores de anticuerpo, la fagocitosis activada por el receptor Fc $\gamma$ RIIIB siguió es mínima en relación a los resultados obtenidos con el receptor Fc $\gamma$ RIIA. La fagocitosis con microesferas recubiertas con dosis de 20  $\mu$ g/ml del anticuerpo 3G8 se incrementó 2.2 veces en relación a la fagocitosis de las microesferas control. Los resultados mostrados aquí indican que el receptor Fc $\gamma$ RIIIB es capaz de activar fagocitosis, pero es ineficiente en relación al receptor Fc $\gamma$ RIIA.



**Figura 8. El receptor Fc $\gamma$ RIIIB activa fagocitosis en neutrófilos.** PMN humanos se usaron para fagocitar microesferas de látex fluorescentes recubiertas con 10  $\mu$ g/ml de los anticuerpos monoclonales para el receptor Fc $\gamma$ RIIIB: 3G8 ó 7.5.4 ó del control anti-GST. La fagocitosis fue evaluada por citometría de flujo. El rendimiento fagocítico se calculó como se indica en materiales y métodos y se presenta como veces de incremento en relación a la condición control (anti-GST). Los asteriscos denotan condiciones que son estadísticamente diferentes al control. Los resultados son promedios de 24 determinaciones independientes. \*\*\* ( $p < 0.004$ ).

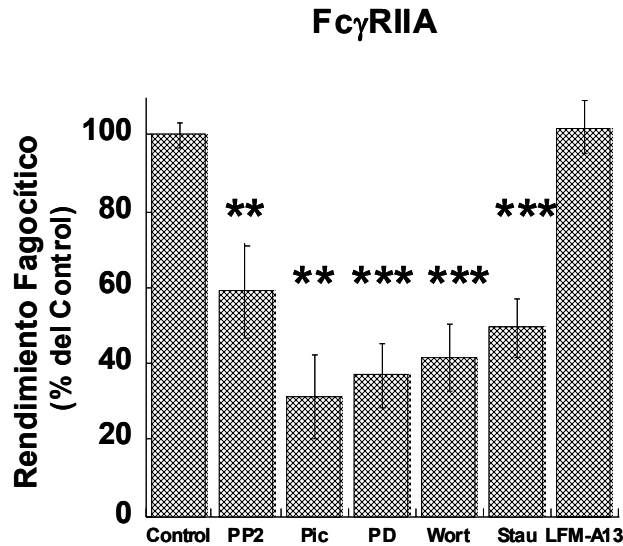


**Figura 9. La fagocitosis del receptor Fc $\gamma$ RIIB se incrementa en forma dosis dependiente al nivel de recubrimiento de las partículas con el anticuerpo 3G8.** PMN se usaron para fagocitar microesferas de látex fluorescentes recubiertas con concentraciones crecientes del anticuerpo monoclonal 3G8 dirigido contra el receptor Fc $\gamma$ RIIB, ó del anticuerpo anti-GST. La fagocitosis fue evaluada por citometría de flujo. El rendimiento fagocítico se presenta como veces de incremento en relación a la condición control (anti-GST). Los asteriscos denotan condiciones que son estadísticamente diferentes al control. \*\*\* ( $p < 0.004$ ).  $n=6$ .

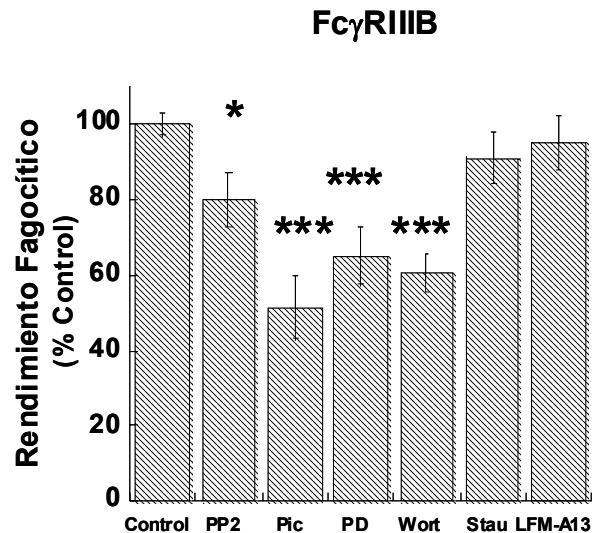
Para evaluar si existen diferencias en cuanto a los requerimientos de señalización de la fagocitosis activada por los receptores Fc $\gamma$ RIIA y Fc $\gamma$ RIIB, utilizando inhibidores farmacológicos de las moléculas de señalización que clásicamente se han asociado a la señalización de los receptores Fc $\gamma$  como: Src, Syk, MEK, PI3K, PKC y BTK.

Como se observa en la figura 10, la fagocitosis activada por el receptor Fc $\gamma$ RIIA disminuyó con el tratamiento con inhibidores de las cinasas: Src, Syk, MEK y PI3K. Dosis de 100  $\mu$ M del inhibidor LFM-A13 no modificaron la fagocitosis activada por el receptor Fc $\gamma$ RIIA. La activación de la fagocitosis del receptor Fc $\gamma$ RIIB muestra un patrón de inhibición parecido al del receptor Fc $\gamma$ RIIA (Figura 11).





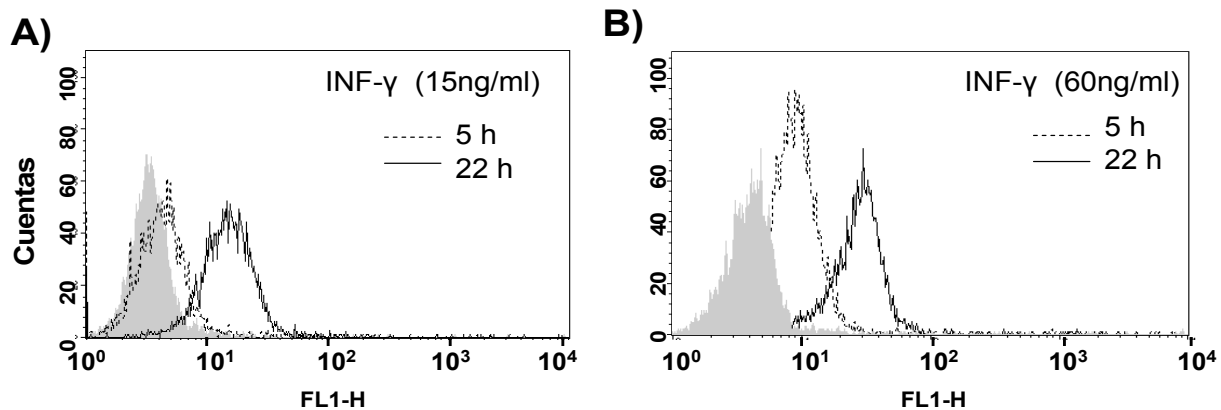
**Figura 10. Moléculas involucradas en la fagocitosis de receptor FcγRIIA en neutrófilos humanos.** Los PMN fueron tratados con inhibidores de las cinasas: Src, Syk, MEK, PI3K, PKC y BTK (PP2, Piceatannol, LY294002, PD98059 y LFM-A13, respectivamente), los inhibidores se utilizaron como se indica en la tabla 2, de la sección de materiales y métodos. Posteriormente los PMN se usaron para fagocitar microesferas de látex fluorescentes recubiertas con 10 µg/ml del anticuerpo IV.3. La fagocitosis se evaluó por citometría de flujo. El rendimiento fagocítico se presenta normalizado en relación a la condición control (dimetilsulfóxido). Los asteriscos denotan condiciones que son estadísticamente diferentes al control. \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ), \*\*\* ( $p < 0.0001$ ). (A)  $n=6-9$ .



**Figura 11. Moléculas involucradas en la fagocitosis del receptor FcγRIIIB en neutrófilos humanos.** Los PMN fueron tratados con inhibidores de las cinasas: Src, Syk, MEK, PI3K, PKC y BTK (PP2, Piceatannol, LY294002, PD98059 y LFM-A13, respectivamente), los inhibidores se utilizaron como se indica en la tabla 2, de la sección de materiales y métodos. Posteriormente los PMN se usaron para fagocitar microesferas de látex fluorescentes recubiertas con 10 µg/ml del anticuerpo 3G8. La fagocitosis fue evaluada por citometría de flujo. El rendimiento fagocítico se presenta normalizado en relación a la condición control (dimetilsulfóxido). Los asteriscos denotan condiciones que son estadísticamente diferentes al control. \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ), \*\*\* ( $p < 0.0001$ ). (B)  $n=6-24$ .

El receptor  $Fc\gamma RI$  es capaz de inducir la fagocitosis en células dendríticas y macrófagos, en estos tipos celulares la expresión de este receptor es constitutiva. Los neutrófilos humanos no expresan constitutivamente este receptor, por lo que para probar su capacidad para activar fagocitosis primero es necesario inducir su expresión.

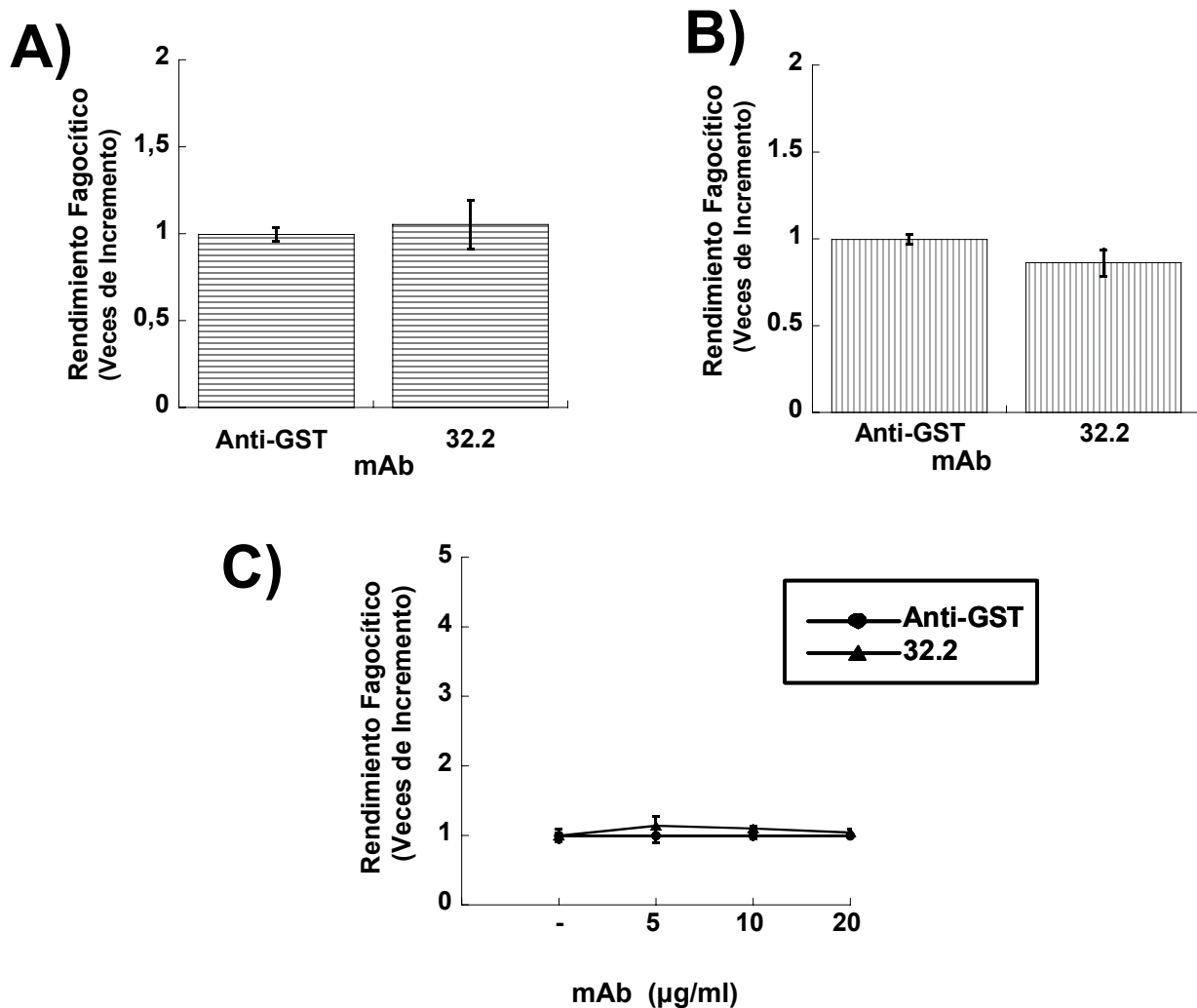
La expresión del receptor  $Fc\gamma RI$  se indujo incubando los neutrófilos con 15 y 60 ng/ml de  $INF-\gamma$  durante 5 y 22 h. Como se observa en la figura 12, ambos tratamientos fueron efectivos para inducir la expresión del receptor  $Fc\gamma RI$  desde las 5 h de tratamiento.



**Figura 12. El receptor  $Fc\gamma RI$  es inducido con  $INF\gamma$  en neutrófilos.** PMN fueron tratados con 15 ng/ml de  $INF\gamma$  (A) ó con 60 ng/ml de  $INF\gamma$  (B) durante 5 y 22 horas. Posteriormente los PMN fueron teñidos para el receptor  $Fc\gamma RI$  con el anticuerpo monoclonal 32.2. Las muestras se analizaron por citometría de flujo. En gris se presenta la fluorescencia del anticuerpo secundario sólo. Se muestra la expresión de los receptores  $Fc\gamma RI$  a las 5 horas (línea discontinua) y a las 22 horas (línea sólida). Se muestra una tinción representativa de más de 5 determinaciones independientes.

Posterior al tratamiento con 60 ng/ml de  $INF-\gamma$ , los neutrófilos se utilizaron en experimentos de fagocitosis con microesferas recubiertas con el anticuerpo monoclonal 32.2. Como se observa en la figura 13 (inciso B), los neutrófilos fueron incapaces de fagocitar estas partículas. Lo anterior se podría deber a una activación celular debida a un efecto

generalizado del tratamiento con  $\text{INF-}\gamma$ . De tal forma que fue importante realizar experimentos de fagocitosis con neutrófilos tratados con una dosis menor de  $\text{INF-}\gamma$ . Sin embargo, como se observa en la figura 13 (inciso A), la fagocitosis de partículas no se incrementó en relación a las microesferas recubiertas con el anticuerpo control. Para descartar que el receptor  $\text{Fc}\gamma\text{RI}$  requiriera de un mayor grado de entrecruzamiento para activar la fagocitosis, se hicieron experimentos con dosis crecientes de recubrimiento de la partícula (Figura 13C). En todas las condiciones probadas el  $\text{Fc}\gamma\text{RI}$  fue incapaz de activar la fagocitosis

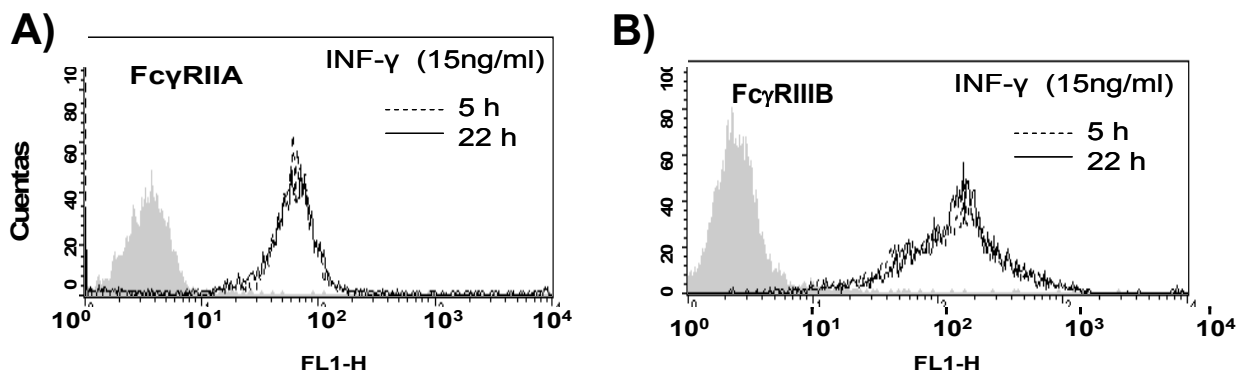


**Figura 13. El receptor FcγRI no activa la fagocitosis en neutrófilos humanos.**

Los PMN se trataron con 15 ng/ml (A) o 60 ng/ml (B) de INF- $\gamma$  durante 22 h y posteriormente se usaron en experimentos de fagocitosis de partículas de látex fluorescentes recubiertas con 10  $\mu$ g/ml del anticuerpo monoclonal 32.2 ó del anticuerpo control anti-GST. Adicionalmente, los PMN se usaron para fagocitar partículas de látex fluorescentes recubiertas con dosis crecientes del anticuerpo 32.2 ó del anti-GST (C). La fagocitosis fue evaluada por citometría de flujo. El rendimiento fagocítico se calculó como se indica en materiales y métodos. Los resultados se presentan como veces de incremento en relación a la condición control (anti-GST). Los resultados son promedios. (A) n=8, (B) n=4 y (C) n= 6.

Es probable que las funciones de los receptores  $Fc\gamma$  se modifiquen con el estado de activación celular, de tal forma que quisimos evaluar el efecto del tratamiento con  $INF-\gamma$  en cuanto a expresión del receptor y en cuanto a sus capacidades fagocíticas.

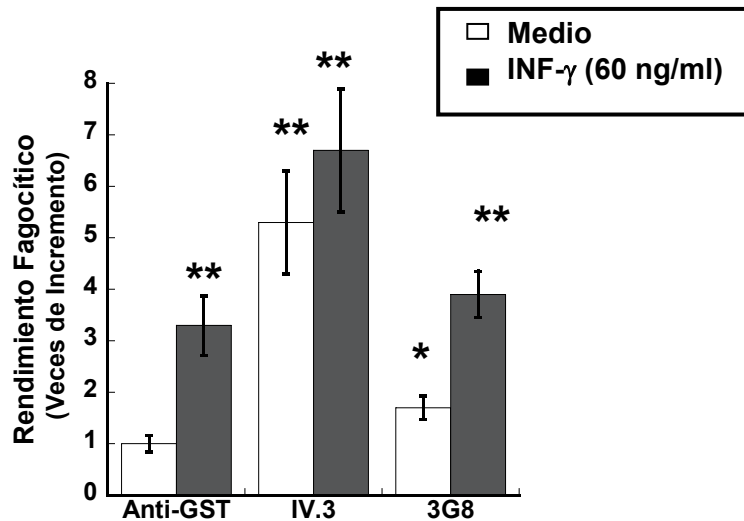
La activación del neutrófilo con  $INF-\gamma$  no alteró la expresión de los receptores  $Fc\gamma RIIA$  y  $Fc\gamma RIIB$  (Figura 12). Dado que el estado de activación celular podría afectar la capacidad fagocítica de los receptores  $Fc\gamma RIIA$  y  $Fc\gamma RIIB$ , fue de nuestro interés evaluar la fagocitosis de PMN después del tratarlos con  $INF-\gamma$ .



**Figura 14. La expresión de los receptores  $Fc\gamma RIIA$  y  $Fc\gamma RIIB$  no son alteradas por el tratamiento con  $INF-\gamma$ .** Los PMN fueron tratados 60 ng/ml de  $INF-\gamma$  durante 5 ó 22 horas. Los PMN fueron posteriormente teñidos con el anticuerpo IV.3 (A) y 3G8 (B), para examinar la expresión de los receptores  $Fc\gamma RIIA$  y  $Fc\gamma RIIB$ , respectivamente. En gris se presenta la fluorescencia del anticuerpo secundario sólo. Las muestras se analizaron por citometría de flujo. Se muestra una tinción representativa de más de 5 determinaciones independientes.

Como se observa en la figura 14, el tratamiento con  $INF-\gamma$  no afectó la fagocitosis del receptor  $Fc\gamma RIIA$ . Sin embargo, la fagocitosis de partículas recubiertas con el anticuerpo 3G8 (anti  $Fc\gamma RIIB$ ) y la fagocitosis de partículas recubiertas con el anticuerpo anti-GST se incrementaron con el tratamiento de  $INF-\gamma$  (Figura 15). Este aumento generalizado de

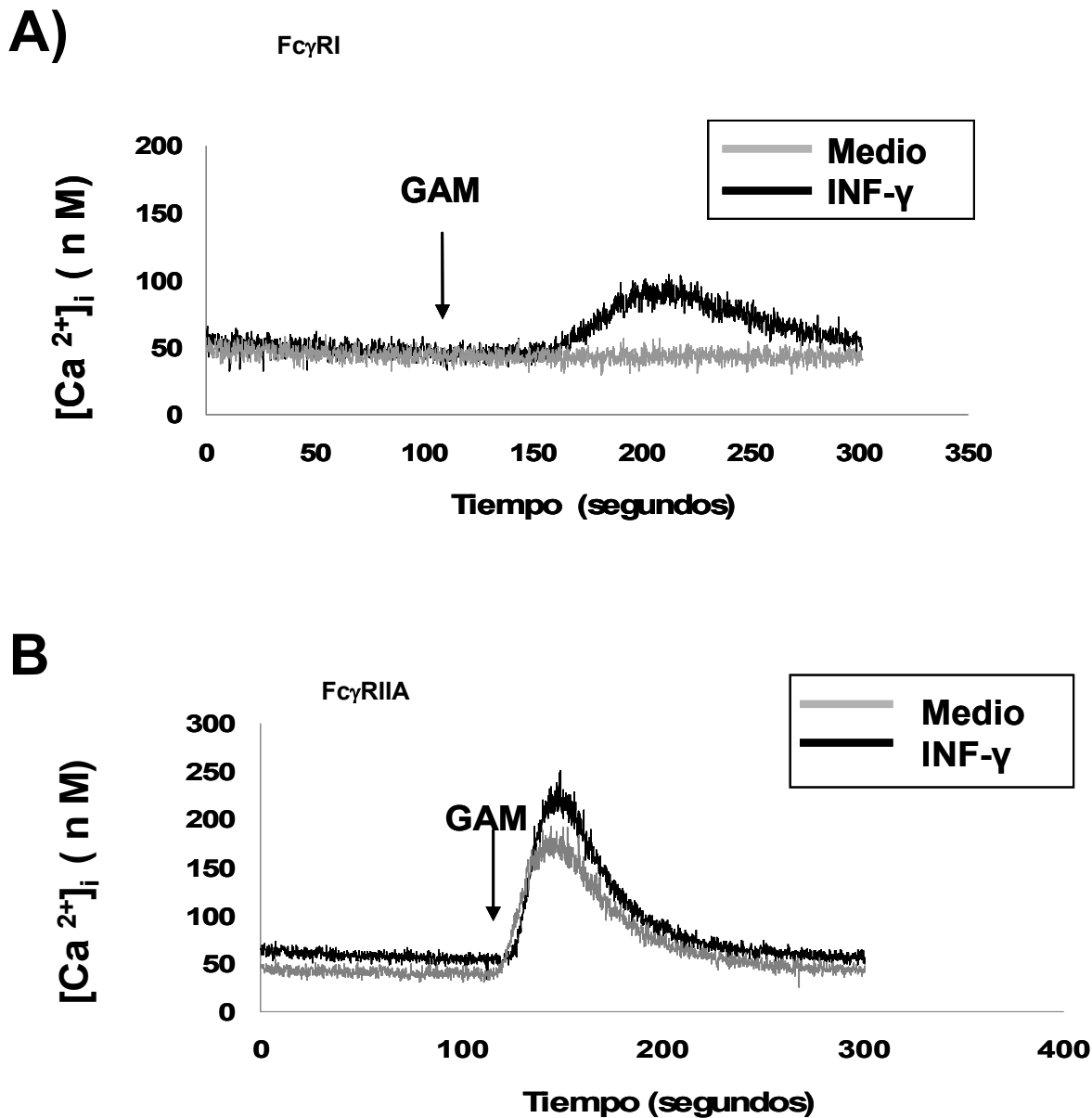
fagocitosis no se puede atribuir a ningún receptor en particular y representa un aumento inespecífico de la capacidad fagocítica de las células debido a la estimulación generalizada del  $\text{INF-}\gamma$ .



**Figura 15. El tratamiento con  $\text{INF-}\gamma$  promueve un aumento inespecífico de la fagocitosis en neutrófilos humanos.** PMN se trataron con medio (en barras abiertas) o con 60 ng/ml de  $\text{INF-}\gamma$  (en barras negras) durante 22 horas. Entonces, los PMN se usaron para fagocitar partículas de látex fluorescentes recubiertas con 10  $\mu\text{g/ml}$  de los anticuerpos 32.2, 3G8 ó del anticuerpo control anti-GST. La fagocitosis fue evaluada por citometría de flujo. El rendimiento fagocítico se calculó como se indica en materiales y métodos. Se presentan como veces de incremento en relación a la condición control (anti-GST). Los resultados son promedios de 12 repeticiones. Los asteriscos denotan condiciones que son estadísticamente diferentes del control (células en medio ingiriendo partículas recubiertas con anti-GST). \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ).

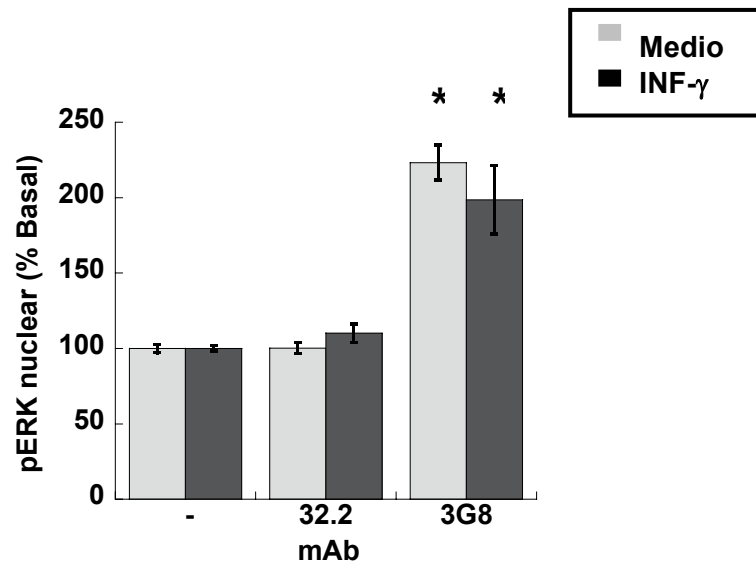
Porque el receptor  $\text{Fc}\gamma\text{RI}$  no mostró actividad fagocítica, fue importante probar la funcionalidad del receptor para inducir otras respuestas celulares como la liberación de calcio intracelular y así como su capacidad para activar la aparición e ERK fosforilado en el núcleo. Para los experimentos de liberación de calcio, los neutrófilos se cargaron con el indicador Fura-2/AM para medir los cambios en la concentración de calcio intracelular. Posteriormente se probó la capacidad de los receptores  $\text{Fc}\gamma\text{RI}$  y  $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}$  para inducir la liberación de calcio

después de su entrecruzamiento. Como se observa en la figura 16, ambos receptores fueron capaces de inducir la liberación de calcio intracelular.



**Figura 16. Fc $\gamma$ RI induce la liberación de calcio intracelular en neutrófilos.** Los PMN se trataron con medio (línea gris), o con 15 ng/ml de INF- $\gamma$  durante 22 horas (línea negra). Posteriormente, los PMN fueron tratados con 10  $\mu$ g/ml de los anticuerpos 32.2 (Figura A) ó IV.3 (Figura B). Después de esto, los PMN fueron cargados con el indicador Fura-2 y los receptores Fc $\gamma$  fueron entrecruzados con 40  $\mu$ g/ml del Fragmento F(ab')<sub>2</sub> de un anticuerpo anti-ratón (GAM). La adición del anticuerpo entrecruzador es indicada en los gráficos con una flecha. Se muestran gráficos representativos de 3 determinaciones independientes.

Por otro lado, recientemente se ha demostrado que los receptores  $Fc\gamma RIIA$  y  $Fc\gamma RIIB$  inducen la aparición en el núcleo de ERK fosforilada en neutrófilos humanos, por lo que en este trabajo se investigó si la activación del receptor  $Fc\gamma RI$  también puede inducir esta respuesta (Figura 17).

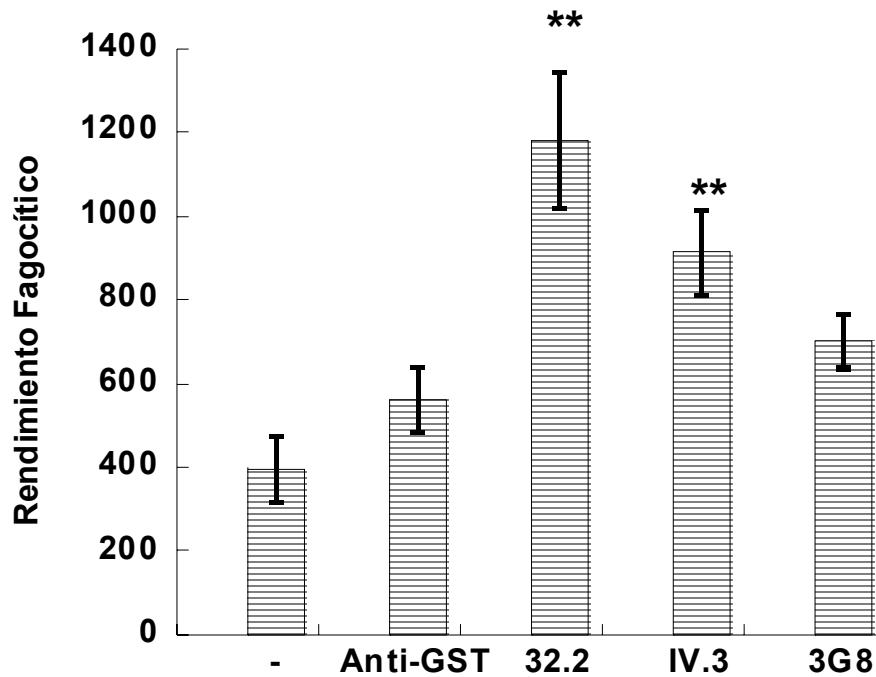


**Figura 17.  $Fc\gamma RI$  no induce la aparición de ERK fosforilada en el núcleo de neutrófilos.** Los PMN se trataron con 15 ng/ml de  $INF\gamma$  durante 22 horas. Posteriormente, fueron estimulados por el entrecruzamiento de los receptores  $Fc\gamma RI$  y  $Rc\gamma RIIB$ , utilizando los anticuerpos monoclonales 32.2 y 3G8, y un segundo anticuerpo entrecruzador. Los núcleos de los PMN fueron extraídos como se describe en materiales y métodos. Posteriormente fueron teñidos fluorescentemente para citometría de flujo con un anticuerpo anti pERK. Los resultados fueron normalizados con respecto a la condición basal. Los resultados son promedios de más de 20 determinaciones. Los asteriscos denotan condiciones que son estadísticamente diferentes con respecto al basal. \* ( $p < 0.02$ ).

El receptor  $Fc\gamma RI$  es efectivo para la movilización de calcio, pero no induce fagocitosis ni tampoco la activación de Erk nuclear. Para investigar si este receptor tiene una participación de colaboración con otros receptores se evaluó la fagocitosis de partículas más complejas por los diferentes receptores  $Fc\gamma$ . En este trabajo utilizamos Pansorbin<sup>®</sup>, una suspensión comercial de *Staphylococcus aureus*, que fue recubierto con los anticuerpos 32.2, IV.3, 3G8

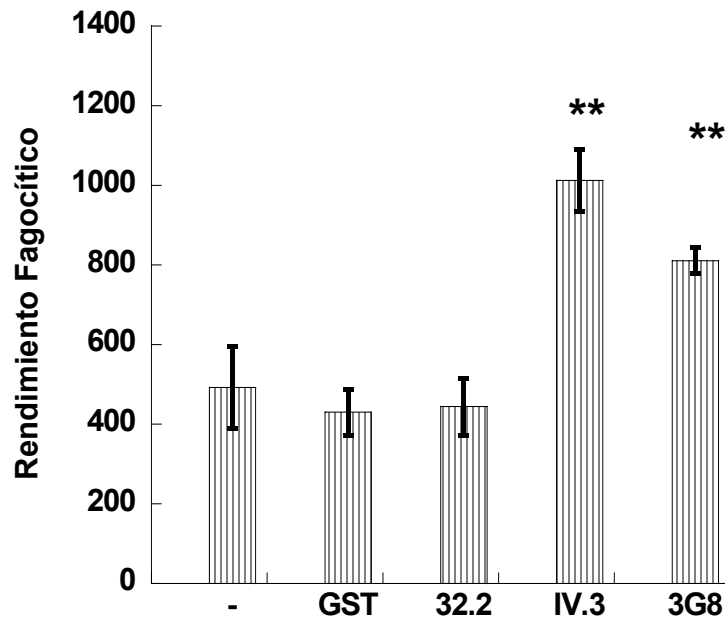


y anti-GST. La fagocitosis de Pansorbin<sup>®</sup> recubierto con un anticuerpo irrelevante y con el anticuerpo 3G8 (anti Fc $\gamma$ RIIB) aumentó ligeramente, pero este aumento no fue significativamente diferente de la fagocitosis de Pansorbin<sup>®</sup> sin recubrir (Figura 18). En cambio el Pansorbin<sup>®</sup> recubierto con el anticuerpo IV.3 (anti Fc $\gamma$ RIIA) aumentó de forma significativa (Figura 18).



**Figura 18. La fagocitosis de Pansorbin es facilitada por los receptores Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RIIA en neutrófilos humanos.** Los PMN se trataron con 60 ng/ml de INF- $\gamma$  durante 22 horas. Posteriormente se usaron para fagocitar partículas de látex fluorescentes sin recubrir o recubiertas con los anticuerpos 32.2, IV.3, 3G8 ó anti-GST (control). La fagocitosis fue evaluada por citometría de flujo. El rendimiento fagocítico se calculó como se indica en materiales y métodos. Los resultados son el promedio de 10-15 determinaciones. Los asteriscos denotan condiciones que son estadísticamente diferentes del control (células en medio ingiriendo partículas recubiertas con anti-GST. \*\* (p< 0.01).

Sorprendentemente, el Pansorbin recubierto con el anticuerpo 32.2 (anti Fc $\gamma$ RI) fue el mas eficientemente fagocitado. De tal forma que el receptor Fc $\gamma$ RI podría estar involucrado en la fagocitosis de partículas complejas. Con la finalidad de disminuir la complejidad de las partículas Pansorbin<sup>®</sup>, es recubierto y posteriormente bloqueado con una solución de BSA se abate la fagocitosis mediada por el receptor Fc $\gamma$ RI como se puede ver en la figura 19.



**Figura 19. La fagocitosis de Pansorbin facilitada por el receptor Fc $\gamma$ RI se abate con un pre-tratamiento con BSA.** Los PMN se trataron con 60 ng/ml de INF- $\gamma$  durante 22 horas. Posteriormente se usaron para fagocitar partículas recubiertas con los anticuerpos 32.2, IV.3, 3G8 ó anti-GST (control), o sin recubrir. Las partículas se recubrieron en una solución bloqueadora conteniendo 10 mg/ml de BSA. La fagocitosis fue evaluada por citometría de flujo. El rendimiento fagocítico se calculó como se indica en materiales y métodos. Los resultados son el promedio de 2 determinaciones independientes por triplicado. Los asteriscos denotan condiciones que son estadísticamente diferentes del control (células en medio ingiriendo partículas recubiertas con anti-GST. \*\* ( $p < 0.05$ ).

## DISCUSIÓN

La activación de los receptores  $Fc\gamma$  de fagocitos es importante en la eficiente eliminación de patógenos extracelulares. Por otro lado, la activación de receptores  $Fc\gamma$  por complejos inmunes es importante tanto en el reclutamiento <sup>[45]</sup> como en la activación celular que conduce a daño de tejido en la inflamación asociada a enfermedades autoinmunes <sup>[38]</sup>. Dada su importancia en el correcto funcionamiento del sistema inmune, no resulta sorprendente la gran cantidad de estudios que se han enfocado a la biología de los receptores  $Fc\gamma$ , principalmente en definir su estructura y las respuestas funcionales que inducen tras su activación en conjunto. El hecho de que diferentes miembros de la familia de receptores  $Fc\gamma$  se expresen al mismo tiempo en la membrana celular de los leucocitos y de que los receptores  $Fc\gamma$  se unan con diferente afinidad a los diversos isotipos de IgG, es sugerente de que en ciertas patologías pudiera existir una activación específica de un receptor en particular de acuerdo al isotipo predominante de IgG que se esté produciendo. Estudios recientes en modelos murinos de autoinmunidad sugieren que los receptores  $Fc\gamma$  inducen respuestas diferentes en el mismo tipo celular. Lo anterior podría dar sentido biológico a la diversidad de receptores  $Fc\gamma$  y a su perfil de expresión en diferentes poblaciones de leucocitos. En un modelo de inducción de glomerulonefritis por IgG se observó que los ratones deficientes en la cadena  $Fc\gamma$ , están protegidos contra el desarrollo de esta enfermedad y que la expresión selectiva en neutrófilos de los receptores  $Fc\gamma RIIA$  y  $Fc\gamma RIIIB$  es suficiente para restaurar la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad <sup>[38]</sup>. En un modelo de acumulación de complejos inmunes en vasculatura se determinó que aunque los receptores  $F\gamma RIIA$  y  $Fc\gamma RIIIB$  promueven el reclutamiento de neutrófilos sólo el receptor

Fc $\gamma$ RIIA está implicado en el daño a tejido [38]. Lo anterior deja claro que la activación de los neutrófilos a través de sus receptores Fc $\gamma$  es importante para el daño a tejido en las enfermedades autoinmunes y sugiere que la activación de los receptores Fc $\gamma$ RIIA y Fc $\gamma$ RIIB en neutrófilos de ratón conduce a respuestas celulares no redundantes. Por todo lo anterior, nos interesó evaluar la activación individual de los receptores Fc $\gamma$  en neutrófilos humanos.

En esta tesis se analizó la activación de la fagocitosis, que es la respuesta celular clásica de los receptores Fc $\gamma$ ; la inducción de flujo de calcio, que es un requisito para llevar a cabo respuestas celulares importantes como: adhesión, degranulación y reorganización del citoesqueleto de actina; y la activación de la cinasa ERK. La activación de factores de transcripción por receptores Fc $\gamma$  es una función poco explorada y sin embargo muy importante en el proceso inflamatorio, ya que es un punto de regulación para la secreción de quimiocinas y citocinas, moléculas que son clave en el reclutamiento y en la activación celular.

Para lograr la activación específica de receptores Fc $\gamma$  se utilizó un panel de anticuerpos monoclonales específicos para cada uno de los receptores Fc de activación expresados en el neutrófilo humano. En los experimentos de fagocitosis estos anticuerpos se unieron a través de su fragmento Fc a perlas de látex ó a *Staphylococcus aureus*. Los resultados obtenidos aquí indican que en neutrófilos humanos el receptor Fc $\gamma$ RIIA es altamente efectivo para mediar la función de fagocitosis lo anterior es concordante con reportes previos [46] [47]. La fagocitosis mediada por el receptor Fc $\gamma$ RIIA se incrementó cinco veces sobre el control cuando la partícula de látex se recubrió con una dosis de anticuerpo de 10  $\mu$ g/ml. Adicionalmente, la fagocitosis del receptor Fc $\gamma$ RIIA se incrementó hasta diez veces cuando

se utilizaron mayores dosis de anticuerpo para recubrir la partícula de látex, siguiendo en un comportamiento dependiente de la dosis. Esto se puede explicar porque las partículas recubiertas con más anticuerpo entrecruzarían a más receptores  $Fc\gamma$  y por lo tanto se incrementaría la respuesta fagocítica.

El receptor  $Fc\gamma RIIIB$  induce fagocitosis específicamente, ya que las partículas recubiertas con dos anticuerpos específicos para el receptor  $Fc\gamma RIIIB$  (3G8 y 7.5.4) se fagocitaron de forma equivalente y porque el aumento en el nivel de recubrimiento de las partículas de látex incrementó la fagocitosis en un comportamiento dependiente de la dosis. Dado que el receptor  $Fc\gamma RIIIB$  no tiene un dominio transmembranal y sólo se encuentra unido a la membrana celular por un residuo de glicofosfatidilinositol, evidentemente este receptor depende de su asociación con otras moléculas para señalar e inducir flujo de calcio, estallido respiratorio y unión a complejos inmunes como ha sido bien reportado <sup>[45, 48]</sup>. En la actualidad, no se ha definido la asociación del receptor  $Fc\gamma RIIIB$  con otros receptores que le permitan señalar. Sin embargo, se ha propuesto que podría estar interactuando con miembros de la familia de integrinas e incluso con otros receptores Fc. Por lo anterior, fue de nuestro interés inhibir farmacológicamente elementos de señalización y comparar los requerimientos de señalización de los receptores  $Fc\gamma RIIA$  y  $Fc\gamma RIIIB$ . Los resultados presentados en este trabajo indican que los receptores  $Fc\gamma RIIA$  y  $Fc\gamma RIIIB$ , utilizan las cinasas de Src, SyK, MEK, PI3K para la inducción de fagocitosis. Lo anterior se apega al modelo vigente de señalización por ITAMs <sup>[14]</sup>, aunque es importante subrayar que el patrón de susceptibilidad a la inhibición farmacológica fue diferente entre estos dos receptores. El receptor  $Fc\gamma RIIA$  fue más susceptible que el receptor  $Fc\gamma RIIIB$  a la inhibición de dichas cinasas, lo anterior abre la posibilidad de que el receptor  $Fc\gamma RIIIB$  use vías alternas para su

señalización. Las Btk son cinasas citoplasmáticas de la familia de cinasas de Tec que regulan la actividad de las MAPK cinasas [49]. Están involucradas en muchas respuestas funcionales como la proliferación y el ensamblaje de actina [49]. Las cinasas de Tec participan en la señalización de las células B y en neutrófilos humanos se ha reportado que las cinasas Tec están involucradas en la inducción de degranulación y flujo de calcio por el receptor Fc $\gamma$ RIIIB. Por lo anterior fue de nuestro interés evaluar la participación de la familia Tec en la activación de fagocitosis. Nuestros resultados indican que estas cinasas no participan en la fagocitosis activada por los receptores Fc $\gamma$ RIIA y Fc $\gamma$ RIIIB. La inhibición de la cinasa PKC con estaurosporina inhibió la fagocitosis del receptor Fc $\gamma$ RIIA y no afectó la del receptor Fc $\gamma$ RIIIB, aunque se propone que este inhibidor es específico para PKC a concentraciones por debajo de 2.5 nM, tomamos el dato de la inhibición de PKC con reserva, dado a ha sido ampliamente descrito su efecto sobre varias cinasas.

Para estudiar la fagocitosis del receptor Fc $\gamma$ RI, se indujo su expresión con interferón gamma. El tratamiento no afectó la expresión de los receptores Fc $\gamma$ RIIA y Fc $\gamma$ RIIIB [39], ni su capacidad fagocítica. Aunque el tratamiento es efectivo para la inducción del receptor Fc $\gamma$ RI, este receptor fue incapaz de activar fagocitosis, utilizando el sistema de inducción específica de fagocitosis con microesferas de látex. Sin embargo, la activación de este receptor fue efectiva para inducir el aumento de la concentración de calcio intracelular [39].

Recientemente se ha descrito que el receptor Fc $\gamma$ RIIIB induce la activación de factores nucleares tan importantes como NF $\kappa$ B, el cual coordina la transcripción de quimiocinas y citocinas, moléculas clave en la migración y activación celular. Adicionalmente, se sabe que neutrófilos murinos secretan IL-10 en respuesta a infecciones con bacterias Gram negativas

y a micobacteria <sup>[6]</sup>. Previamente se ha demostrado que los receptores Fc $\gamma$ RIIA y Fc $\gamma$ RIIIB son capaces de inducir la translocación nuclear de ERK fosforilada y de NF- $\kappa$ B <sup>[33]</sup>, siendo mucho más efectivo en esta función celular el receptor Fc $\gamma$ RIIIB <sup>[33]</sup>. En este estudio, fue de nuestro interés determinar si el receptor Fc $\gamma$ RI es también capaz de inducir esta respuesta celular. El receptor Fc $\gamma$ RI, tampoco fue capaz de inducir la presencia de ERK fosforilada en el núcleo. Adicionalmente, sería importante evaluar si Fc $\gamma$ RIIIB induce la activación de otros factores nucleares como NF- $\kappa$ B, que regulan la transcripción de citocinas y quimiocinas, que son importantes en el reclutamiento celular en un proceso inflamatorio.

Dado que el estado de activación celular puede modificar el proceso de fagocitosis, fue importante evaluar la fagocitosis de partículas complejas, como la bacteria *Staphylococcus aureus*. En este trabajo utilizamos Pansorbin<sup>®</sup> que es una suspensión comercial de *Staphylococcus aureus*. El Pansorbin<sup>®</sup> fue opsonizado con los anticuerpos monoclonales específicos para cada uno de los receptores Fc $\gamma$ . En estos experimentos, el tratamiento con interferón gamma aumentó considerablemente la fagocitosis independiente de receptores Fc. Interesantemente, y en contraste con los resultados obtenidos con las microesferas de látex, encontramos que el receptor Fc $\gamma$ RI fue el más efectivo para mediar la fagocitosis de Pansorbin<sup>®</sup>. El uso de partículas de látex disminuye la interferencia de la activación de otras moléculas presentes en la membrana celular de un patógeno. Estos receptores podrían estimularse por elementos presentes en la superficie de la partícula a fagocitar. De tal manera que a diferencia del receptor Fc $\gamma$ RIIA, que media la fagocitosis de forma autónoma, el receptor Fc $\gamma$ RI podría requerir de la colaboración de otros receptores para mediar esta función biológica. Como una aproximación inicial para contestar esta nueva pregunta, la solución de Pansorbin<sup>®</sup> comercial se recubrió con los anticuerpos en una solución

bloqueadora de BSA. Lo anterior con la finalidad de disminuir la complejidad molecular de la superficie de *Staphylococcus aureus*. Cuando se probaron estas partículas en ensayos de fagocitosis se abatió completamente la fagocitosis del receptor Fc $\gamma$ RI. Nuestros datos muestran que la activación específica del receptor Fc $\gamma$ RI no es suficiente para inducir fagocitosis en neutrófilos humanos y sugieren la colaboración de otro receptor. Son necesarios estudios adicionales para demostrar si el receptor Fc $\gamma$ RI está colaborando con otro receptor para mediar la fagocitosis.

## **CONCLUSIONES**

En neutrófilos humanos los receptores Fc $\gamma$  tienen respuestas funcionales no redundantes. El Fc $\gamma$ RIIA es el receptor fagocítico, el Fc $\gamma$ RIIIB manda señales preferentemente al núcleo y el Fc $\gamma$ RI parece requerir de señales extra para poder mediar fagocitosis.



## **CONCLUSIONES**

En neutrófilos humanos los receptores  $Fc\gamma$  tienen respuestas funcionales no redundantes. El  $Fc\gamma RIIA$  es el receptor fagocítico, el  $Fc\gamma RIIB$  manda señales preferentemente al núcleo y el  $Fc\gamma RI$  parece requerir de señales extra para poder mediar fagocitosis.

## PERSPECTIVAS

Definir el papel de la familia PKC en la fagocitosis inducida por estos receptores, utilizando una nueva generación de fármacos de forma adicional a la estaurosporina. Este fármaco clásicamente se ha utilizado para inhibir la actividad de PKC, sin embargo, a concentraciones superiores de 2.5 nM, presenta efectos inhibitorios sobre otras cinasas como PKA, PKG, Lyn y SyK.

Investigar la activación diferencial de receptores  $Fc\gamma$  en la inducción de otras respuestas funcionales como estallido respiratorio, podría ser interesante en el contexto de estudio de la participación individual de esta familia de receptores en la destrucción de tejido que se da durante la inflamación asociada a enfermedades autoinmunes.

El hecho de que el receptor  $Fc\gamma$ RI active la fagocitosis de Pansorbin<sup>®</sup>, pero no de partículas de látex, cuando ambas moléculas fueron recubiertas con un anticuerpo específico para el reconocimiento del receptor  $Fc\gamma$ RI (32.2), abre dos nuevas hipótesis de trabajo: 1) El receptor  $Fc\gamma$ RI requiere de la activación de otro receptor para sustentar la fagocitosis, o 2) La activación del receptor  $Fc\gamma$ RI facilita la fagocitosis de otro receptor. La identificación de este receptor y sus mecanismos de señalización abre camino a un nuevo proyecto de investigación. El tema de la colaboración de receptores para producir respuestas celulares diferenciales se ha puesto sobre la mesa desde hace varios años. En el campo de estudio de los receptores  $Fc\gamma$ , se han propuesto colaboraciones entre los receptores  $Fc\gamma$ RIIIA y  $Fc\gamma$ RIIIB para que este último aunque carece de dominio intracelular sea capaz inducir respuestas celulares, ó entre el receptor  $Fc\gamma$ RIIIB y miembros de la familia de integrinas <sup>[12]</sup>. De tal forma que sería interesante, estudiar las moléculas involucradas en facilitar la fagocitosis y la activación del receptor  $Fc\gamma$ RI. La fagocitosis por este receptor, sería especialmente importante en infecciones con un perfil elevado de interferón  $\gamma$ .

## BIBLIOGRAFÍA

1. Burg ND y Pillinger MH (2001) The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity. *Clin Immunol* **99**, 7-17.
2. von Vietinghoff S y Ley K (2008) Homeostatic regulation of blood neutrophil counts. *J Immunol* **181**, 5183-5188.
3. Dale DC, Boxer L y Liles WC (2008) The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood* **112**, 935-945.
4. Moser B, Wolf M, Walz A y Loetscher P (2004) Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol* **25**, 75-84.
5. Scapini P, Lapinet-Vera JA, Gasperini S, Calzetti F, Bazzoni F y Cassatella MA (2000) The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev* **177**, 195-203.
6. Zhang X, Majlessi L, Deriaud E, Leclerc C y Lo-Man R (2009) Coactivation of Syk kinase and MyD88 adaptor protein pathways by bacteria promotes regulatory properties of neutrophils. *Immunity* **31**, 761-771.
7. Foxman EF, Campbell JJ y Butcher EC (1997) Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis. *J Cell Biol* **139**, 1349-1360.
8. Zarbock A y Ley K (2008) Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium. *Am J Pathol* **172**, 1-7.
9. Chan JR, Hyduk SJ y Cybulsky MI (2003) Detecting rapid and transient upregulation of leukocyte integrin affinity induced by chemokines and chemoattractants. *J Immunol Methods* **273**, 43-52.
10. Maghazachi AA (2000) Intracellular signaling events at the leading edge of migrating cells. *Int J Biochem Cell Biol* **32**, 931-943.
11. Shashidharamurthy R, Hennigar RA, Fuchs S, Palaniswami P, Sherman M y Selvaraj P (2008) Extravasations and emigration of neutrophils to the inflammatory site depend on the interaction of immune-complex with Fcγ receptors and can be effectively blocked by decoy Fcγ receptors. *Blood* **111**, 894-904.
12. Rosales C (2007) Fc receptor and integrin signaling in phagocytes. *Signal Transduction* **7**, 386-401.
13. Ravetch JV y Bolland S (2001) IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol* **19**, 275-290.
14. Nimmerjahn F y Ravetch JV (2006) Fcγ receptors: old friends and new family members. *Immunity* **24**, 19-28.
15. Selvaraj P, Rosse WF, Silber R y Springer TA (1988) The major Fc receptor in blood has a phosphatidylinositol anchor and is deficient in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Nature* **333**, 565-567.
16. Ibarrola I, Vossebeld PJ, Homburg CH, Thelen M, Roos D y Verhoeven AJ (1997) Influence of tyrosine phosphorylation on protein interaction with FcγRIIIa. *Biochim Biophys Acta* **1357**, 348-358.
17. Nimmerjahn F y Ravetch JV (2008) Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol* **8**, 34-47.
18. Mora NyR, C. (2009) Funciones de receptores Fc en mecanismos de defensa y regulación inmunológica. *Revista de Investigación Clínica* **61**, 313-326.
19. Regnault A, Lankar D, Lacabanne V, Rodriguez A, Thery C, Rescigno M, Saito T, Verbeek S, Bonnerot C, Ricciardi-Castagnoli P y Amigorena S (1999) Fcγ receptor-mediated

- induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J Exp Med* **189**, 371-380.
20. Dhodapkar KM, Kaufman JL, Ehlers M, Banerjee DK, Bonvini E, Koenig S, Steinman RM, Ravetch JV y Dhodapkar MV (2005) Selective blockade of inhibitory Fcγ receptor enables human dendritic cell maturation with IL-12p70 production and immunity to antibody-coated tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2910-2915.
  21. Nakamura K y Cambier JC (1998) B cell antigen receptor (BCR)-mediated formation of a SHP-2-pp120 complex and its inhibition by Fc gamma RIIB1-BCR coligation. *J Immunol* **161**, 684-691.
  22. Daeron M, Latour S, Malbec O, Espinosa E, Pina P, Pasmans S y Fridman WH (1995) The same tyrosine-based inhibition motif, in the intracytoplasmic domain of Fc gamma RIIB, regulates negatively BCR-, TCR-, and FcR-dependent cell activation. *Immunity* **3**, 635-646.
  23. Takai T (2002) Roles of Fc receptors in autoimmunity. *Nat Rev Immunol* **2**, 580-592.
  24. McKenzie SE y Schreiber AD (1998) Fc gamma receptors in phagocytes. *Curr Opin Hematol* **5**, 16-21.
  25. Cassatella MA, Flynn RM, Amezaga MA, Bazzoni F, Vicentini F y Trinchieri G (1990) Interferon gamma induces in human neutrophils and macrophages expression of the mRNA for the high affinity receptor for monomeric IgG (Fc gamma R-I or CD64). *Biochem Biophys Res Commun* **170**, 582-588.
  26. Repp R, Valerius T, Sandler A, Gramatzki M, Iro H, Kalden JR y Platzer E (1991) Neutrophils express the high affinity receptor for IgG (Fc gamma RI, CD64) after in vivo application of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* **78**, 885-889.
  27. Hayden MS y Ghosh S (2008) Shared principles in NF-κB signaling. *Cell* **132**, 344-362.
  28. Garcia-Garcia E & Rosales C (2001) Fc receptor signaling during phagocytosis. In *Activating and inhibitory immunoglobulin-like receptors* (Cooper MD, Takai T y Ravetch JV), pp. 165-174. Springer-Verlag, Tokyo.
  29. Coppolino MG, Krause M, Hagendorff P, Monner DA, Trimble W, Grinstein S, Wehland J y Sechi AS (2001) Evidence for a molecular complex consisting of Fyb/SLAP, SLP-76, Nck, VASP and WASP that links the actin cytoskeleton to Fcγ receptor signalling during phagocytosis. *J Cell Sci* **114**, 4307-4318.
  30. Desjardins M (2003) ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions. *Nat Rev Immunol* **3**, 280-291.
  31. Indik ZK, Hunter S, Huang MM, Pan XQ, Chien P, Kelly C, Levinson AI, Kimberly RP y Schreiber AD (1994) The high affinity Fcγ receptor (CD64) induces phagocytosis in the absence of its cytoplasmic domain: The gamma subunit of FcγRIIIA imparts phagocytic function to FcγRI. *Exp Hematol* **22**, 599-606.
  32. Garcia-Garcia E, Rosales R y Rosales C (2002) Phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase are recruited for Fc receptor-mediated phagocytosis during monocyte-to-macrophage differentiation. *J Leukoc Biol* **72**, 107-114.
  33. García-García E, Nieto-Castañeda G, Ruiz-Saldaña M, Mora N y Rosales C (2009) FcγRIIA and FcγRIIB mediate nuclear factor activation through separate signaling pathways in human neutrophils. *J Immunol* **182**, 4547-4556.
  34. Clynes R y Ravetch JV (1995) Cytotoxic antibodies trigger inflammation through Fc receptors. *Immunity* **3**, 21-26.
  35. Nakamura A, Yuasa T, Ujike A, Ono M, Nukiwa T, Ravetch JV y Takai T (2000) Fcγ receptor IIB-deficient mice develop Goodpasture's syndrome upon immunization with type IV collagen: a novel murine model for autoimmune glomerular basement membrane disease. *J Exp Med* **191**, 899-906.

36. McGaha TL, Sorrentino B y Ravetch JV (2005) Restoration of tolerance in lupus by targeted inhibitory receptor expression. *Science* **307**, 590-593.
37. Cross A, Bakstad D, Allen JC, Thomas L, Moots RJ y Edwards SW (2005) Neutrophil gene expression in rheumatoid arthritis. *Pathophysiology* **12**, 191-202.
38. Tsuboi N, Asano K, Lauterbach M y Mayadas TN (2008) Human neutrophil Fcγ receptors initiate and play specialized nonredundant roles in antibody-mediated inflammatory diseases. *Immunity* **28**, 833-846.
39. Hoffmeyer F, Witte K y Schmidt RE (1997) The high-affinity Fc gamma RI on PMN: regulation of expression and signal transduction. *Immunology* **92**, 544-552.
40. Edberg JC, Moon JJ, Chang DJ y Kimberly RP (1998) Differential regulation of human neutrophil FcγRIIa (CD32) and FcγRIIIb (CD16)-induced Ca<sup>2+</sup> transients. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 8071-8079.
41. Edberg JC, Salmon JE y Kimberly RP (1992) Functional capacity of Fc gamma receptor III (CD16) on human neutrophils. *Immunologic Research* **11**, 239-251.
42. Salmon JE, Browle NL, Edberg JC y Kimberly RP (1991) Fcγ receptor III induces actin polymerization in human neutrophils and primes phagocytosis mediated by Fcγ receptor II. *J Immunol* **146**, 997-1004.
43. Fanger NA, Wardwell K, Shen L, Tedder TF y Guyre PM (1996) Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J Immunol* **157**, 541-548.
44. Ioan-Facsinay A, de Kimpe SJ, Hellwig SMM, van Lent PL, Hofhuis FMA, van Ojik HH, Sedlik C, da Silveira SA, Gerber J, de Jong YF, Roozendaal R, Aarden LA, van der Berg WB, Saito T, Mosser D, Amigorena S, Izui S, van Ommen J-GB, van Vugt M, van de Winkel JGJ y Verbeek JS (2002) FcγRI (CD64) contributes substantially to severity of arthritis, hypersensitivity responses, and protection from bacterial infection. *Immunity* **16**, 391-402.
45. Coxon A, Cullere X, Knight S, Sethi S, Wakelin MW, Stavrakis G, Luscinskas FW y Mayadas TN (2001) Fc gamma RIII mediates neutrophil recruitment to immune complexes. a mechanism for neutrophil accumulation in immune-mediated inflammation. *Immunity* **14**, 693-704.
46. Swanson JA y Hoppe AD (2004) The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Leukoc Biol* **76**, 1093-1103.
47. Garcia-Garcia E y Rosales C (2005) Adding complexity to phagocytic signaling: Phagocytosis-associated cell responses and phagocytic efficiency. In *Molecular Mechanisms of Phagocytosis* (Rosales C), pp. 58-71. Landes Bioscience/Springer Science, Georgetown, Texas.
48. Fernandes MJG, Lachanc G, Paré G, Rollet-Labelle E y Naccache PH (2005) Signaling through CD16b in human neutrophils involves the Tec family of tyrosine kinases. *Journal of Leukocyte biology* **78**, 524-532.
49. Zemans RL y Arndt PG (2009) Tec kinases regulate actin assembly and cytokine expression in LPS-stimulated human neutrophils via JNK activation. *Cell Immunol* **258**, 90-97.



## Fc $\gamma$ receptors exhibit different phagocytosis potential in human neutrophils

Selma Rivas-Fuentes<sup>b,1</sup>, Erick García-García<sup>c</sup>, Georgina Nieto-Castañeda<sup>d</sup>, Carlos Rosales<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

<sup>b</sup> Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

<sup>c</sup> Department of Biological Sciences, University of Alberta, CW-405 Biological Sciences Building, Edmonton, AB, Canada T6G 2E9

<sup>d</sup> Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 20 January 2010

Accepted 9 March 2010

Available online 15 March 2010

#### Keywords:

Leukocyte

Neutrophil

Fc receptor

Phagocytosis

Signal transduction

### ABSTRACT

In neutrophils, two receptors for IgG antibodies, namely Fc $\gamma$ RIIA and Fc $\gamma$ RIIIB are constitutively expressed, and a third one, Fc $\gamma$ RI, can be upregulated by interferon- $\gamma$ . Whether Fc $\gamma$ RIIIB is capable of triggering phagocytosis by itself is still controversial. The main role of Fc $\gamma$ RI has not been clearly established in these cells. To address this problem, neutrophils were treated with interferon- $\gamma$ , and then phagocytosis mediated by each type of Fc $\gamma$  receptor was evaluated by flow cytometry. Fc $\gamma$ RIIA was the most efficient receptor for phagocytosis. Fc $\gamma$ RIIIB could mediate phagocytosis but much less efficiently than Fc $\gamma$ RIIA. Both Fc $\gamma$ RIIA- and Fc $\gamma$ RIIIB-mediated phagocytosis were blocked by inhibitors of Src family kinases, Syk, PI 3-K, and ERK. In contrast, interferon- $\gamma$ -induced Fc $\gamma$ RI was not able to mediate phagocytosis. Also, Fc $\gamma$ RI did not activate ERK in the nucleus, but was however able to stimulate an efficient calcium rise. These data show that different neutrophil Fc $\gamma$  receptors possess different phagocytosis capabilities: Fc $\gamma$ RIIA and Fc $\gamma$ RIIIB, but not Fc $\gamma$ RI, promote phagocytosis.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Neutrophils (PMN) are the most abundant circulating leukocytes in mammals [1,2]. At the onset of an inflammatory process neutrophils are rapidly recruited to sites of infection, where they act as the first line of defense against invading pathogens [3–5]. Cell activation, through various membrane receptors, is also required for the initiation of the several defense mechanisms displayed by neutrophils; including phagocytosis, respiratory burst, release of various microbicidal molecules by degranulation, and production of pro-inflammatory cytokines [6–8].

Phagocytosis and cytokine production by neutrophils can be initiated by immune complexes binding to members of the Fc receptor family for immunoglobulin G molecules [9], namely Fc $\gamma$ RIIA and Fc $\gamma$ RIIIB, which are constitutively expressed on these cells. In addition, Fc $\gamma$ RI can also be upregulated in neutrophils by interferon- $\gamma$  [10,11]. Human Fc $\gamma$ RIIA (CD32) is composed of a single polypeptide chain bearing an immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) on its cytoplasmic domain [12]. This ITAM

confers on Fc $\gamma$ RIIA the ability to initiate signaling events that regulate cell responses, including phagocytosis, cytokine production, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, and the respiratory burst [12]. Fc $\gamma$ RIIIB (CD16B) is present exclusively on neutrophils and it is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked receptor, lacking transmembrane and cytoplasmic domains [9,12]. Though signaling molecules associated with Fc $\gamma$ RIIIB are still unknown, several reports show that Fc $\gamma$ RIIIB can initiate signaling events leading to calcium transients [13–15], actin polymerization [16], activation of integrins [17], and nuclear factor activation [18,19]. Fc $\gamma$ RI (CD64) is a high affinity receptor for IgG and is associated with a dimer of gamma chains (also named Fc $\gamma$  chains) [20]. Each  $\gamma$  chain contains an ITAM that is required for receptor signaling [9,12].

In neutrophils, Fc $\gamma$ RIIA induces primarily IgG-mediated phagocytosis [21–23] and Fc $\gamma$ RIIIB signals mainly to the nucleus for nuclear factor activation [18,19]. Although not present in resting neutrophils, Fc $\gamma$ RI is upregulated in these cells at sites of inflammation, where cells get exposed to interferon- $\gamma$  [10,11]. Fc $\gamma$ RI is thought to be a phagocytic receptor because it was able to mediate phagocytosis when transfected in COS-1 cells [24], and because macrophages from transgenic mice for the human Fc $\gamma$ RI presented phagocytosis of particles coated with receptor-specific bifunctional antibodies [20]. Also, thioglycollate-elicited macrophages from Fc $\gamma$ RI-deficient mice showed very poor phagocytosis [25]. Fc $\gamma$ RI was also found to mediate phagocytosis in human dendritic cells [26], and these cells were more efficient than monocytes for T cell

\* Corresponding author at: Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Apdo. Postal 70228, Cd. Universitaria, México D.F. 04510, Mexico. Fax: +52 52 55 5622 3369.

E-mail addresses: [carosal@servidor.unam.mx](mailto:carosal@servidor.unam.mx), [carosal@correo.biomedicas.unam.mx](mailto:carosal@correo.biomedicas.unam.mx) (C. Rosales).

<sup>1</sup> Present address: Laboratorio de Investigación en Enfermedades Reumáticas, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INER), Mexico.

activation when antigen was targeted specifically to Fc $\gamma$ RI [27]. In neutrophils, it has been reported that Fc $\gamma$ RI mainly activates the respiratory burst response [10] and promotes cell-mediated tumor-cell killing [28]. There are not reports on the phagocytic capacity of Fc $\gamma$ RI in interferon- $\gamma$ -stimulated neutrophils. To address this problem, neutrophils were treated with interferon- $\gamma$ , and then phagocytosis mediated by each type of Fc $\gamma$  receptor was evaluated by flow cytometry. We found that Fc $\gamma$ RIIA was the most efficient receptor for phagocytosis. Its phagocytic activity was not modified by interferon- $\gamma$  and was blocked by inhibitors of Src family kinases, Syk, PI 3-K, and ERK. Fc $\gamma$ RIIIB could mediate phagocytosis but much less efficiently than Fc $\gamma$ RIIA. Fc $\gamma$ RIIIB-mediated phagocytosis was also not modified by interferon- $\gamma$  and was blocked by inhibitors of Src family kinases, Syk, PI 3-K, and ERK. In contrast to the other Fc $\gamma$  receptors, Fc $\gamma$ RI was upregulated by interferon- $\gamma$  and was not able to mediate phagocytosis, nor to activate ERK in the nucleus. However, Fc $\gamma$ RI was able to induce a normal calcium rise. In addition, Fc $\gamma$ RI increased phagocytosis of Pansorbin<sup>®</sup> (*Staphylococcus aureus*) specifically-targeted to Fc $\gamma$ RI, indicating a cooperative effect on phagocytosis mediated by Fc $\gamma$ RI and other receptors. These data clearly show that different neutrophil Fc $\gamma$  receptors possess different phagocytosis capabilities. In neutrophils, Fc $\gamma$ RIIA and Fc $\gamma$ RIIIB, but not Fc $\gamma$ RI, promote phagocytosis. In turn, Fc $\gamma$ RI activates a signaling pathway leading to calcium rise.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents

The following antibodies were used: anti-human Fc $\gamma$ RI (CD64) mAb 32.2 (catalog No. 021-1), anti-human Fc $\gamma$ RII (CD32) mAb IV.3 (catalog No. 025-1), and anti-human Fc $\gamma$ RIII (CD16) mAb 3G8 (catalog No. 028-1) were from Medarex (Annandale, NJ). Anti-Fc $\gamma$ RIII (CD16) mAb 7.5.4 [29] was donated by Dr. Jean-Luc Teillaud (INSERM 255, University Pierre & Marie Curie, Paris, France). Rabbit polyclonal anti-ERK (catalog No. sc-94), anti-phospho-ERK (pTyr204) (catalog No. sc-7383), and mAb anti-GST (catalog No. sc-138) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). F(ab')<sub>2</sub> goat anti-mouse IgG (catalog No. 55468) and FITC-conjugated F(ab')<sub>2</sub> goat anti-mouse IgG (catalog No. 55522) were from Cappel (Aurora, OH). Interferon  $\gamma$  (catalog No. R-IFNG-50) was from Endogen (Pierce Biotechnology, Inc.; Rockford, IL). The Syk inhibitor Piceatannol, the PI 3-K inhibitor Wortmannin, the Src family kinase inhibitor PP2, and the Tec family kinase inhibitor LFM-A13, were all from Calbiochem (San Diego, CA). The MEK inhibitor PD98059 was obtained from New England Biolabs (Beverly, MA). Protein A (catalog No. PG 031) and all other chemicals were from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO).

### 2.2. Cells

Peripheral blood human neutrophils (PMN) were purified from healthy donors as previously described [30]. PMN were incubated at  $3 \times 10^6$  cell/mL with 15 ng/mL interferon  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) in RPMI-1640 medium (Gibco-Invitrogen; Carlsbad, CA) with 10% fetal calf serum, 20 mM Glutamine, and 50 U/mL Penicillin and 50  $\mu$ g/mL Streptomycin for 5 or 22 h at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

### 2.3. FACS

Fluoresce staining of membrane receptors for analysis by flow cytometry was performed exactly as described [31].

### 2.4. Phagocytic targets

Fluorescent carboxylated latex beads (4.5  $\mu$ m in diameter) (catalog No. 16592) were from Polysciences (Warrington, PA), and prepared exactly as described [31]. Fluorescein-labelled Pansorbin<sup>®</sup> (*S. aureus* cells) was prepared and then opsonized as follows: 200  $\mu$ L of Pansorbin<sup>®</sup> suspension (Calbiochem; San Diego, CA) were centrifuged at 16873g, for 1 min and washed twice with 1 mL of PBS. The cell pellet was broken by vortexing and was resuspended in 1 mL ice-cold ethanol with continuous vortexing. The cell suspension was incubated at -20 °C for 1 h. The Pansorbin<sup>®</sup> suspension was then centrifuged at 16873g for 1 min, washed with 1 mL of PBS, and resuspended in 1 mL 0.1 M carbonate buffer (pH 9.6) containing 5 mg/mL Fluorescein-Isocyanate-Dextran (catalog No. FD-705; Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO). This suspension was incubated in a rotator, overnight at 37 °C. Then, the Pansorbin<sup>®</sup> suspension was washed twice with PBS and resuspended at  $1 \times 10^9$  particles/mL in PBS. For opsonization,  $1 \times 10^8$  particles of FITC-Pansorbin<sup>®</sup> were centrifuged at 16873g for 1 min, resuspended in 300  $\mu$ L PBS containing 20  $\mu$ g/mL of the corresponding mAb, and incubated in a rotator for 2 h at 4 °C. Finally, the Pansorbin<sup>®</sup> suspension was washed twice with PBS and resuspended at  $1 \times 10^8$  particles/mL in PBS.

### 2.5. Phagocytosis assays

Neutrophil phagocytosis assays were performed in the fluid phase as previously described [31]. Briefly, after gating-out of the phagocytic targets, phagocytosis was analyzed in two components: percent of positive cells (cells internalizing at least one fluorescent particle), and phagocytic score (proportion of positive cells times the mean fluorescent intensity of the positive cell population). In assays involving inhibitors: PP2 (30  $\mu$ M), Piceatannol (50  $\mu$ M), Wortmannin (50 nM), LFM-A13 (100  $\mu$ M), or PD98059 (50  $\mu$ M), the phagocytic score of cells treated with only the solvent dimethyl sulfoxide (DMSO) was considered 100%. Changes in this score induced by the inhibitors were plotted as a percentage of the basal level.

### 2.6. Analysis of nuclear factor activation by flow cytometry

Nuclear activation of ERK by flow cytometry was performed exactly as described [19].

### 2.7. Fluorescent calcium measurements

Neutrophils were loaded with Fura-2/AM (Calbiochem; San Diego, CA) and cytosolic calcium concentration calculated as previously described [15,32,33]. Briefly, PMN at  $1 \times 10^7$  cell/mL in PMB with 1.5 mM Ca<sup>2+</sup> and 1.5 mM Mg<sup>2+</sup>, were incubated with the corresponding mAb on ice for 10 min. Next, cells were washed and resuspended at  $1 \times 10^6$  cell/mL, and  $2 \times 10^6$  PMN were transferred to a cuvette. Receptor cross-linking was then induced by adding 40  $\mu$ g/mL F(ab')<sub>2</sub> goat anti-mouse IgG at 37 °C. Fluorescence changes were monitored with a Perkin Elmer (Waltham, MA) LS55 spectrofluorimeter, and calcium concentration calculated with the Perkin Elmer FL WinLab software, version 4.00.02.

### 2.8. Statistical analysis

Data were compared by unpaired-sample Student's *t*-tests using the computer program KaleidaGraph<sup>®</sup> version 3.6.2 for Mac (Synergy Software; Reading, PA). Differences were considered statistically significant when *p* values < 0.05.

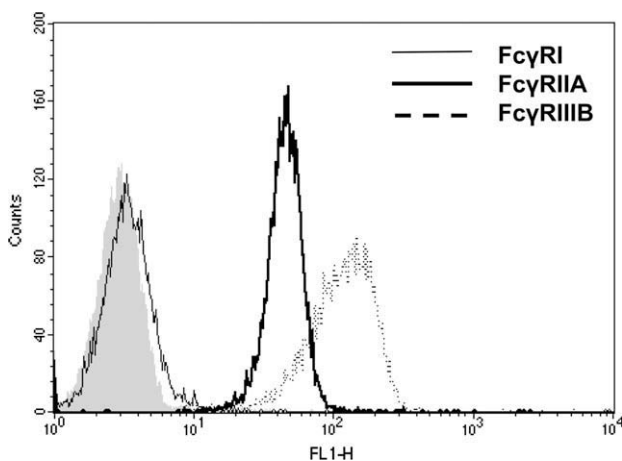
### 3. Results

#### 3.1. Fc $\gamma$ RIIA mediates efficient phagocytosis in neutrophils

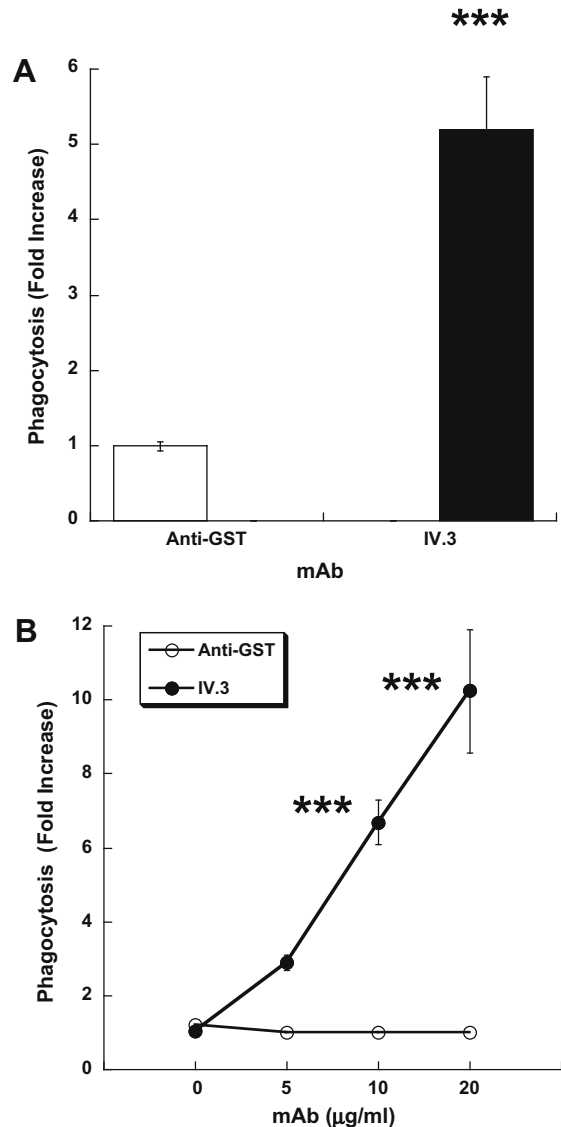
The receptors Fc $\gamma$ RIIA and Fc $\gamma$ RIIIB are constitutively expressed on human neutrophils (Fig. 1), while the receptor Fc $\gamma$ RI is barely detectable on these cells (Fig. 1). Although Fc $\gamma$ RIIA is expressed in fewer amounts than Fc $\gamma$ RIIIB (Fig. 1), it can mediate very efficient phagocytosis (Fig. 2). Fc $\gamma$ RIIA-specific phagocytosis augmented with increasing concentrations of the opsonizing antibody IV.3 (Fig. 2B). When latex beads were opsonized with an irrelevant antibody against GST, phagocytosis did not increase (Fig. 2B). The most abundant Fc $\gamma$ RIIIB was also capable of mediating phagocytosis, although much less efficiently than Fc $\gamma$ RIIA (Fig. 3). Two different monoclonal antibodies specific for Fc $\gamma$ RIIIB, namely 3G8 and 7.5.4, induced similar phagocytosis of opsonized latex beads (Fig. 3A). With increasing concentrations of opsonizing anti-Fc $\gamma$ RIIIB antibody phagocytosis efficiency augmented significantly (Fig. 3B). Fc $\gamma$ RIIA signaling is mediated by the ITAM sequence within its cytoplasmic tail and involves signaling molecules such as Src family tyrosine kinases (SFK), Syk, and PI 3-K [34]. Accordingly, Fc $\gamma$ RIIA-mediated phagocytosis was blocked by inhibitors for SFK, Syk, PI 3-K, MEK, and serine/threonine protein kinases (Fig. 4A), but not by inhibitors for Tec family kinases (Fig. 4A). Fc $\gamma$ RIIIB has been shown to possess unique signaling capabilities, not shared by other Fc $\gamma$  receptors [18]. Nonetheless, Fc $\gamma$ RIIIB-mediated phagocytosis was also blocked by inhibitors for SFK, Syk, PI 3-K, and MEK (Fig. 4B), but not by inhibitors for serine/threonine protein kinases or Tec family kinases (Fig. 4B). This suggests that both Fc $\gamma$ RIIA and Fc $\gamma$ RIIIB use a similar phagocytosis mechanism in neutrophils.

#### 3.2. Interferon- $\gamma$ upregulates Fc $\gamma$ RI on neutrophils

In order to explore the phagocytosis capacity of Fc $\gamma$ RI in neutrophils, these cells were first treated with interferon- $\gamma$ . A small dose of interferon- $\gamma$ , 15 ng/mL upregulated expression of Fc $\gamma$ RI by 22 h (Fig. 5A). With this amount of interferon- $\gamma$ , a small increase on Fc $\gamma$ RI expression could be detected by 5 h (Fig. 5A). A higher dose of interferon- $\gamma$ , 60 ng/mL, resulted in higher levels of Fc $\gamma$ RI both at 5 h and 22 h of treatment (Fig. 5B). Treatment with interferon- $\gamma$  did not affect expression of Fc $\gamma$ RIIA (Fig. 5C), nor Fc $\gamma$ RIIIB (Fig. 5D).



**Fig. 1.** Fc $\gamma$  receptor expression on human neutrophils. Human neutrophils were fluorescence-stained with secondary antibody only (gray area), for Fc $\gamma$ RI (CD64) with the specific mAb 32.2 (thin line), for Fc $\gamma$ RIIA (CD32A) with the specific mAb IV.3 (thick line), or for Fc $\gamma$ RIIIB (CD16B) with the specific mAb 3G8 (dashed line). Fluorescence intensity was then analyzed by flow cytometry. Histograms are representative of more than 10 determinations.

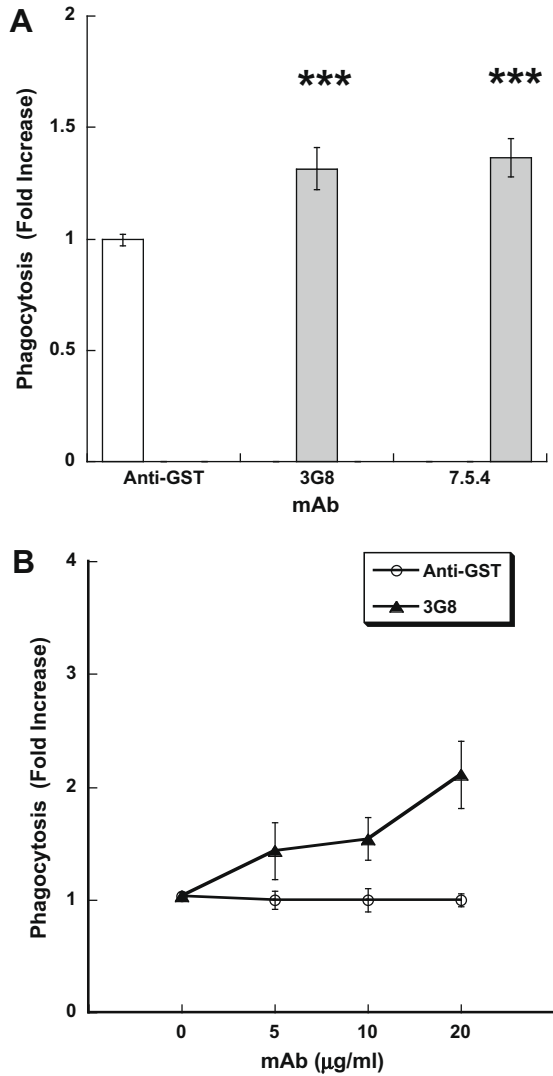


**Fig. 2.** Fc $\gamma$ RIIA mediates efficient phagocytosis by human neutrophils. (A) Neutrophils were mixed with fluorescence latex particles opsonized with anti-GST antibody, or anti-Fc $\gamma$ RIIA mAb IV.3. Cells were allowed to ingest the particles for 30 min. Phagocytosis was then quantified by flow cytometry. (B) Phagocytosis of latex particles opsonized with increasing concentrations of anti-GST, or anti-Fc $\gamma$ RIIA mAb IV.3. Data are means  $\pm$  SEM. Asterisks denote conditions that are statistically different from control anti-GST antibody (A), or 0  $\mu$ g/mL antibody (B), \*\*\*( $p < 0.002$ ). (A)  $n = 11$ , (B)  $n = 6$ .

#### 3.3. Fc $\gamma$ RI does not mediate phagocytosis by neutrophils

Interferon- $\gamma$ -treated neutrophils were mixed with latex particles opsonized with the specific anti-Fc $\gamma$ RI mAb 32.2 and allowed to ingest the particles. Neutrophils treated with either a low (Fig. 6A) or a high dose of interferon- $\gamma$  (Fig. 6B) were not capable of Fc $\gamma$ RI-mediated phagocytosis. Fc $\gamma$ RI-mediated phagocytosis was not detected even at very high doses of anti-Fc $\gamma$ RI mAb 32.2 opsonization (Fig. 6C). Phagocytosis mediated by Fc $\gamma$ RIIA and Fc $\gamma$ RIIIB was not affected by interferon- $\gamma$  treatment (Fig. 7). Fc $\gamma$ RIIA-mediated phagocytosis was maximum and equally efficient in control neutrophils and interferon- $\gamma$  treated neutrophils (Fig. 7). In contrast, Fc $\gamma$ RIIIB-mediated phagocytosis was increased about threefold in interferon- $\gamma$  treated neutrophils (Fig. 7), but this level of phagocytosis was not different from the one obtained with particles opsonized with control anti-GST antibody (Fig. 7).



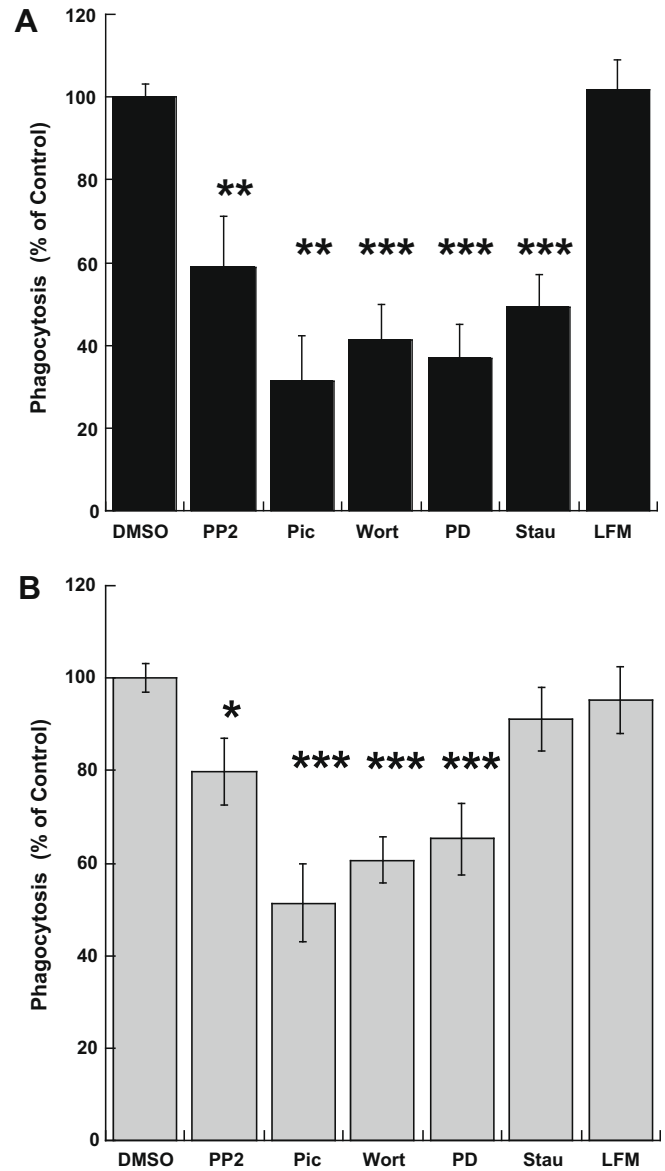


**Fig. 3.** FcγRIIIB mediates poor phagocytosis by human neutrophils. (A) Neutrophils were mixed with fluorescence latex particles opsonized with anti-GST antibody, anti-FcγRIIIB mAb 3G8, or anti-FcγRIIIB mAb 7.5.4. Cells were allowed to ingest the particles for 30 min. Phagocytosis was then quantified by flow cytometry. (B) Phagocytosis of latex particles opsonized with increasing concentrations of anti-GST antibody, or anti-FcγRIIIB mAb 3G8. Asterisks denote conditions that are statistically different from control anti-GST antibody (A), or 0 µg/mL antibody (B), \*\*\*( $p < 0.004$ ). (A)  $n = 24$ , (B)  $n = 6$ .

in interferon-γ-stimulated neutrophils. Thus, upon interferon-γ treatment, neutrophils presented a general increase in phagocytosis efficiency that was not specific for any particular receptor.

**3.4. FcγRI does not activate nuclear phosphorylation of ERK, but activates intracellular calcium rise in neutrophils**

Because FcγRI was not phagocytic in interferon-γ-treated neutrophils, we wondered whether FcγRI could signal to the nucleus for activation of nuclear factors, as it has been proposed for other Fc receptors in neutrophils [18,19]. Cross-linking FcγRI with the specific mAb 32.2 did not induce phosphorylation of ERK in the nucleus (Fig. 8). In contrast, cross-linking FcγRIIIB induced, as expected, a robust phosphorylation of ERK in the nucleus (Fig. 8). This response was not affected by treatment of interferon-γ (Fig. 8). The lack of FcγRI-mediated phagocytosis or activation of ERK was not due an incapacity of this receptor for signaling, since cross-linking FcγRI induced a normal calcium rise (Fig. 9) Treat-

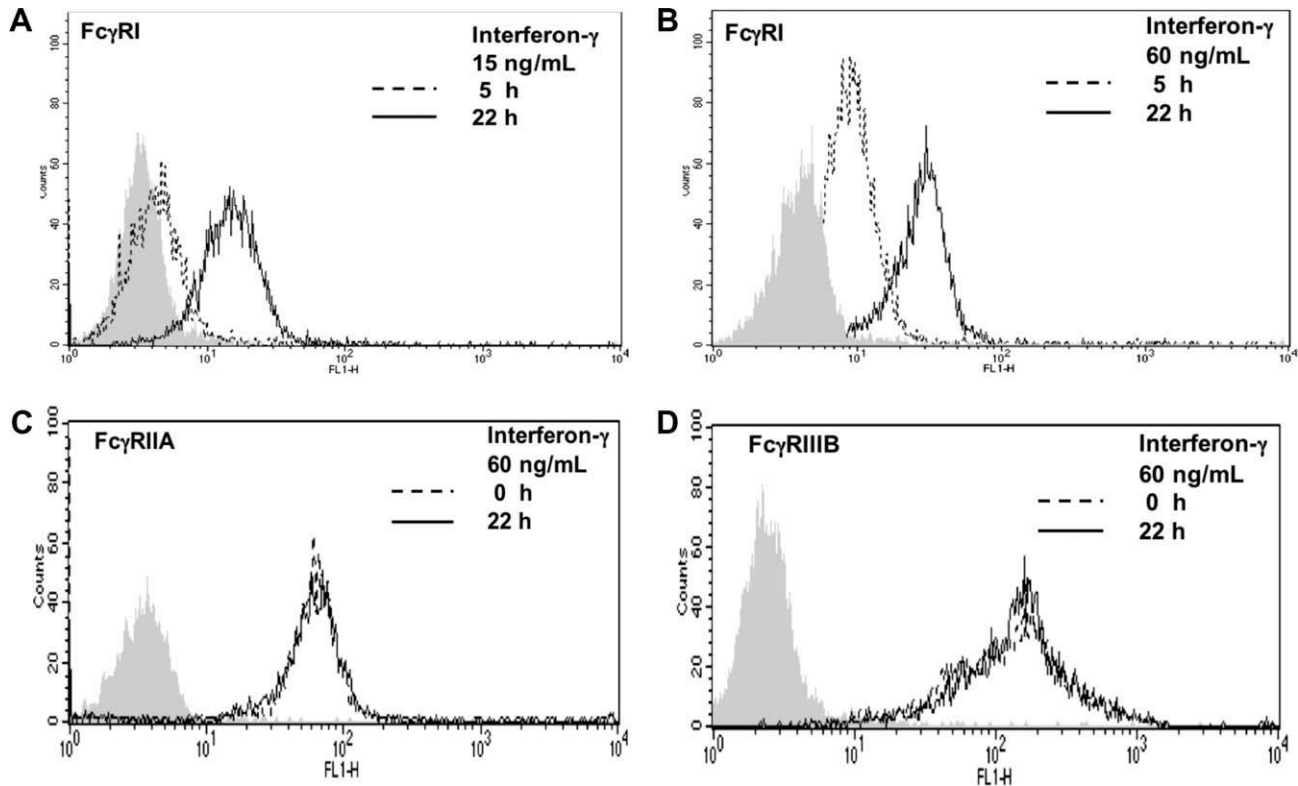


**Fig. 4.** FcγRIIA and FcγRIIIB phagocytosis requires SFK, Syk, PI 3-K, and MEK. Neutrophils were treated with only the solvent (DMSO), 30 µM PP2, 50 µM piceatannol (Pic), 50 nM wortmannin (Wort), 50 µM PD98059 (PD), 2.5 nM staurosporine (Stau), or 100 µM LFM-A13 (LFM) before ingesting (A) IV.3-opsonized, or (B) 3G8-opsonized fluorescent latex particles. Phagocytosis was then quantified by flow cytometry. Data are means ± SEM. Asterisks denote conditions that are statistically different from DMSO control, \*( $p < 0.05$ ), \*\*( $p < 0.01$ ), \*\*\*( $p < 0.001$ ). (A)  $n = 6-9$ , (B)  $n = 6-24$ .

ment of interferon-γ did not affect the calcium rise induced by cross-linking other Fcγ receptors (data not shown).

**3.5. FcγRI increases phagocytosis of Pansorbin® (S. aureus) in neutrophils**

Because FcγRI was not phagocytic in interferon-γ-treated neutrophils, we wondered whether FcγRI could facilitate phagocytosis of a more complex particle. Pansorbin® (*S. aureus* cells) was efficiently ingested by interferon-γ-treated neutrophils (Fig. 10). Opsonization of Pansorbin® with an irrelevant antibody (anti-GST) did not affect phagocytosis. However, phagocytosis of Pansorbin® opsonized with anti-FcγRI mAb 32.2 increased almost three-fold to levels similar to those obtained with Pansorbin®



**Fig. 5.** Fc $\gamma$ RI is upregulated by interferon- $\gamma$  on human neutrophils. Human neutrophils treated with (A) 15 ng/mL or (B) 60 ng/mL interferon- $\gamma$  for 5 h (dashed line) and 22 h (solid line), were fluorescence-stained with secondary antibody only (gray area), or with the specific anti-Fc $\gamma$ RI (CD64) mAb 32.2. (C and D) Neutrophils treated with 60 ng/mL interferon- $\gamma$  for 0 h (dashed line) or for 22 h (solid line), were fluorescence-stained with secondary antibody only (gray area), or with the specific anti-Fc $\gamma$ RIIA (CD32A) mAb IV.3 (C), or with the specific anti-Fc $\gamma$ RIIIB (CD16B) mAb 3G8 (D). Fluorescence intensity was then analyzed by flow cytometry. Histograms are representative of more than 5 determinations.

opsonized with anti-Fc $\gamma$ RIIA mAb IV.3 (Fig. 10). This suggested that Fc $\gamma$ RI although not phagocytic by itself, might be able to potentiate phagocytosis mediated by other types of receptors.

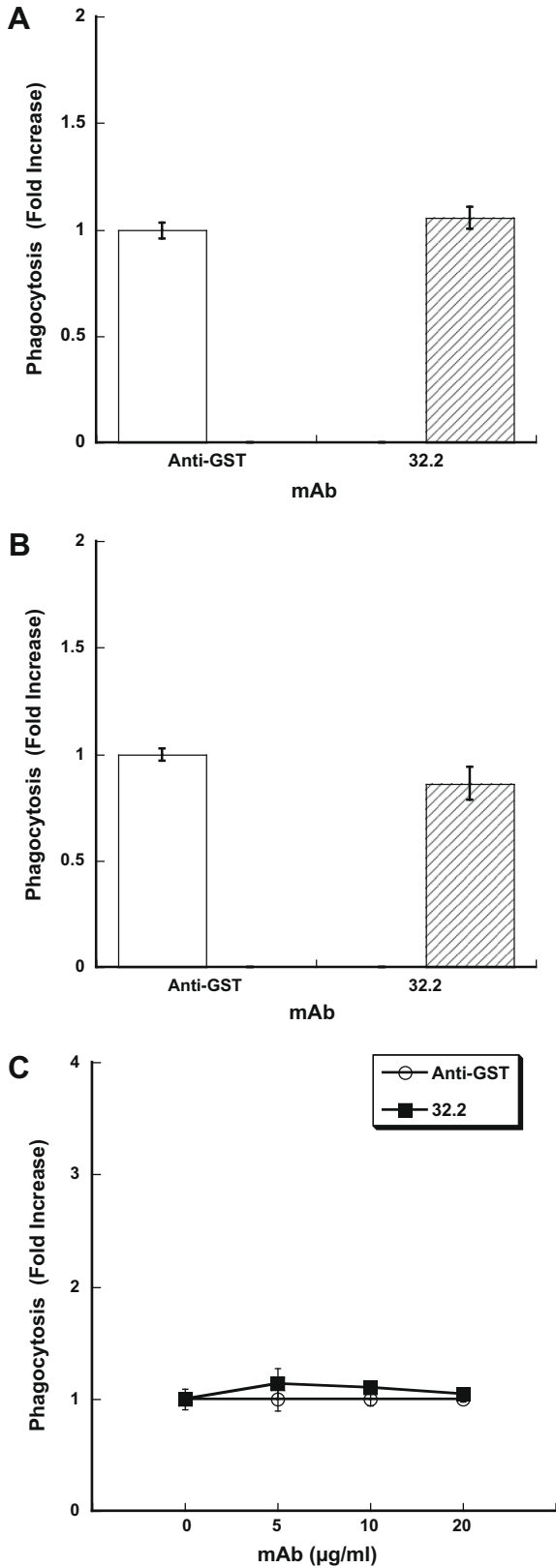
#### 4. Discussion

Phagocytosis, respiratory burst, release of microbicidal molecules by degranulation, and production of cytokines by neutrophils can be initiated by immune complexes binding to members of the Fc receptor family for immunoglobulin G molecules [6–8]. Fc $\gamma$ RIIA and Fc $\gamma$ RIIIB, are constitutively expressed on neutrophils [9], while Fc $\gamma$ RI can also be upregulated in these cells by interferon- $\gamma$  [10,11]. In neutrophils, Fc $\gamma$ RIIA induces primarily IgG-mediated phagocytosis [21–23] and Fc $\gamma$ RIIIB signals mainly to the nucleus for nuclear factor activation [18,19]. In contrast, it is not clear which neutrophil functions are mediated preferentially by Fc $\gamma$ RI. Here, we have found that, in contrast to the other Fc $\gamma$  receptors, Fc $\gamma$ RI was not able to mediate phagocytosis. Fc $\gamma$ RI did not activate ERK in the nucleus, but was however able of inducing a normal calcium rise. Fc $\gamma$ RIIA was, on the other hand, the most efficient receptor for phagocytosis. Its phagocytic activity was not modified by interferon- $\gamma$  and was blocked by inhibitors of Src family kinases, Syk, PI 3-K, and ERK. Fc $\gamma$ RIIIB could by itself mediate phagocytosis, although much less efficiently than Fc $\gamma$ RIIA. Fc $\gamma$ RIIIB-mediated phagocytosis was also not modified by interferon- $\gamma$  and was blocked by inhibitors of Src family kinases, Syk, PI 3-K, and ERK.

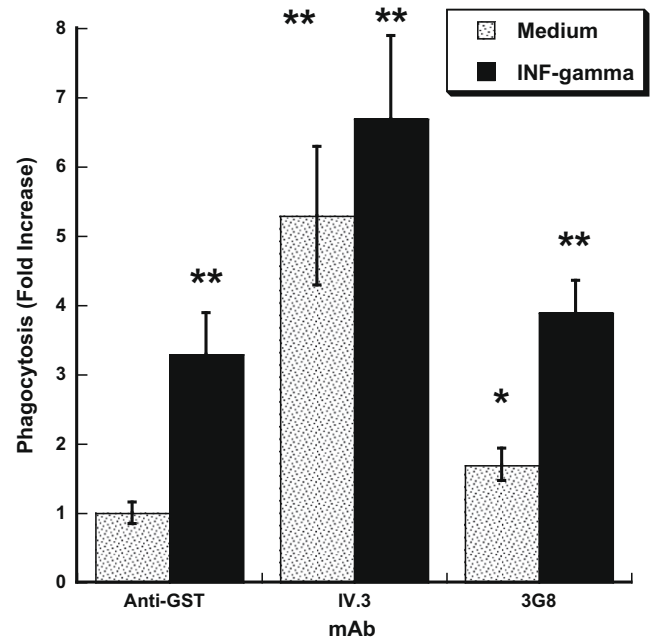
Our finding that Fc $\gamma$ RI is not capable of mediating phagocytosis by itself in neutrophils is intriguing. Fc $\gamma$ RI is thought to be a phagocytic receptor because it was able to mediate phagocytosis when transfected in COS-1 cells [24], and because macrophages from

transgenic mice for the human Fc $\gamma$ RI presented phagocytosis of particles coated with receptor-specific bifunctional antibodies [20]. Also, thioglycollate-elicited macrophages from Fc $\gamma$ RI-deficient mice showed very poor phagocytosis [25]. Fc $\gamma$ RI was also found to mediate phagocytosis in human dendritic cells [26], and these cells were more efficient than monocytes for T cell activation when antigen was targeted specifically to Fc $\gamma$ RI [27]. In neutrophils, there are not reports on the phagocytic ability of Fc $\gamma$ RI in interferon- $\gamma$ -stimulated neutrophils. As indicated above, interferon- $\gamma$ -stimulated neutrophils were not able to phagocytose via Fc $\gamma$ RI. Because interferon- $\gamma$ -treated neutrophils clearly upregulate Fc $\gamma$ RI and augment their overall phagocytic capacity [35], it has been assumed that this receptor is phagocytic in these cells. However, our data using receptor specific phagocytic targets indicates that this function of Fc $\gamma$ RI is absent in human neutrophils. This receptor is capable of signaling to the cell interior as shown by the detectable increase in intracellular calcium concentration ([10] and Fig. 9).

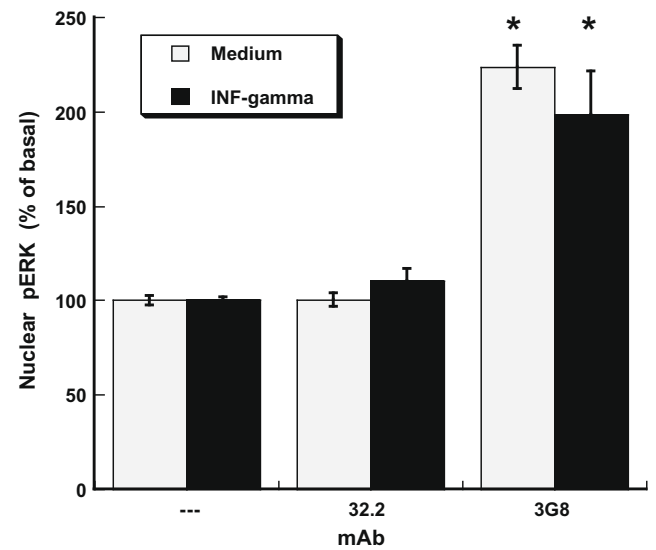
Fc $\gamma$ RIIA phagocytic activity was not modified by interferon- $\gamma$  and was blocked by inhibitors of Src family kinases, Syk, PI 3-K, ERK, and serine/threonine protein kinases. These data confirms what is known about Fc $\gamma$ RIIA signaling [21,34,36] accordingly to the model for ITAM-containing immunoreceptor signaling [37]. Similarly, Fc $\gamma$ RIIIB-mediated phagocytosis was also not modified by interferon- $\gamma$  and was blocked by inhibitors of Src family kinases, Syk, PI 3-K, and ERK, but not of serine/threonine protein kinases. The fact that phagocytosis by this receptor involves all these enzymes is interesting because Fc $\gamma$ RIIIB is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked receptor, lacking transmembrane and cytoplasmic domains [9,12], and no signaling molecules associated with Fc $\gamma$ RIIIB have been described. Some reports show that



**Fig. 6.** FcγRI does not mediate phagocytosis by neutrophils. Human neutrophils treated with (A) 15 ng/mL or (B) 60 ng/mL interferon-γ for 22 h, and then were mixed with fluorescence latex particles opsonized with anti-GST antibody, or with anti-FcγRI mAb 32.2. Cells were allowed to ingest the particles for 30 min. Phagocytosis was then quantified by flow cytometry. (C) Phagocytosis of latex particles opsonized with increasing concentrations of anti-GST, or anti-FcγRI mAb 32.2. Data are means ± SEM. (A) n = 8, (B) n = 4, (C) n = 6.

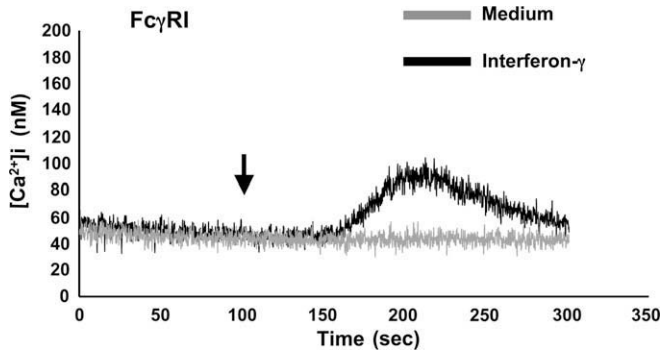


**Fig. 7.** Interferon-γ promotes receptor-unspecific phagocytosis enhancement by neutrophils. Human neutrophils treated with medium only (gray) or with 60 ng/mL interferon-γ (black) for 22 h, were then mixed with fluorescence latex particles opsonized with anti-GST antibody, or with anti-FcγRIIA mAb IV.3, or with anti-FcγRIIIB mAb 3G8. Cells were allowed to ingest the particles for 30 min. Phagocytosis was then quantified by flow cytometry. Data are means ± SEM, of 12 repetitions. Asterisks denote conditions that are statistically different from control (cells in medium and ingesting anti-GST-opsonized particles), \*( $p < 0.05$ ), \*\*( $p < 0.01$ ).

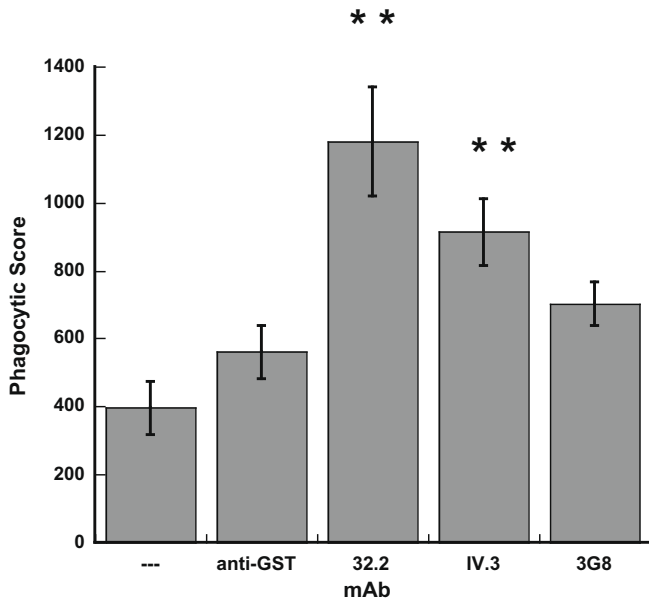


**Fig. 8.** FcγRI does not induce phosphorylation of ERK in the nucleus of neutrophils. Nuclei isolated from interferon-γ-treated neutrophils were fluorescence-stained for phosphorylated ERK (pERK) after cells were activated by cross-linking FcγRI with mAb 32.2, or FcγRIIIB with mAb 3G8. Fluorescence intensity was analyzed by flow cytometry as described. Data are means ± SEM of more than 20 determinations. Asterisks denote conditions that are statistically different from control, \*( $p < 0.02$ ).

FcγRIIIB can initiate signaling that resembles FcγRIIA signaling [38], other reports show that signaling by these two receptors may be different [13,17,19], and also unique signaling capabilities have been shown to be associated with FcγRIIIB [19]. Here we show that, at least for phagocytosis, both receptors require the



**Fig. 9.** Fc $\gamma$ RI induces a calcium rise in neutrophils. Human neutrophils treated with medium only (gray line) or with 15 ng/mL interferon- $\gamma$  for 22 h, were loaded with fura-2. Next, neutrophils were treated with 10  $\mu$ g/mL anti-Fc $\gamma$ RI mAb 32.2, and receptors were cross-linked by the addition of 40  $\mu$ g/mL F(ab') $_2$  goat anti-mouse IgG (arrow). The increase in intracellular calcium concentration ([Ca $^{2+}$ ] $_i$ ) was calculated by measuring the variation in fluorescence of fura-2. Calcium tracings are representative of three different experiments with similar results.



**Fig. 10.** Fc $\gamma$ RI and Fc $\gamma$ RIIA are engaged for phagocytosis of antibody-opsonized Pansorbin $^{\text{®}}$ . Human neutrophils treated with 15 ng/mL interferon- $\gamma$  for 22 h were mixed with fluorescein-labelled Pansorbin $^{\text{®}}$  opsonized with nothing (–), anti-GST antibody, anti-Fc $\gamma$ RI mAb 32.2, anti-Fc $\gamma$ RIIA mAb IV.3, or anti-Fc $\gamma$ RIIIB mAb 3G8. Cells were allowed to ingest the particles for 30 min. Phagocytosis was then quantified by flow cytometry. Data are means  $\pm$  SEM of 10–15 determinations. Asterisks denote conditions that are statistically different from control, \*\*( $p < 0.01$ ).

same initial signaling molecules. This suggests that Fc $\gamma$ RIIIB is a receptor with the potential to initiate various signaling pathways leading to different cell responses, while still lacking an obvious intracellular signaling domain.

In contrast to the other Fc $\gamma$  receptors, Fc $\gamma$ RI did not mediate phagocytosis at all. This receptor was also not able to activate ERK in the neutrophil nucleus as Fc $\gamma$ RIIIB does ([18] and Fig. 8). Therefore the main role for Fc $\gamma$ RI in interferon- $\gamma$ -treated neutrophils may be activation of the respiratory burst response [10] or activation of cell-mediated tumor-cell killing [28]; both calcium-dependent cellular functions [39–42]. However, when the phagocytic target was a complex particle, such as Pansorbin $^{\text{®}}$  (*S. aureus* cells) opsonized with the anti-Fc $\gamma$ RI mAb 32.2, phagocytosis was clearly enhanced (Fig. 10). Thus, Fc $\gamma$ RI might still be able to facilitate phagocytosis mediated by other types of receptors.

In conclusion, the different neutrophil Fc $\gamma$  receptors present different phagocytic capacity. Fc $\gamma$ RIIA is the most efficient receptor for phagocytosis. Its phagocytic activity is not modified by interferon- $\gamma$ . Fc $\gamma$ RIIIB can mediate phagocytosis less efficiently than Fc $\gamma$ RIIA, and its phagocytic activity is also not modified by interferon- $\gamma$ . Phagocytosis mediated by both receptors is blocked by inhibitors of Src family kinases, Syk, PI 3-K, and ERK. In contrast, Fc $\gamma$ RI does not mediate phagocytosis and is not able to activate ERK in the neutrophil nucleus, but it can enhance phagocytosis of Pansorbin $^{\text{®}}$  (*S. aureus*), indicating a cooperative effect on phagocytosis mediated by this Fc $\gamma$ RI and other receptors.

## Acknowledgments

We thank Nancy Mora for her excellent technical assistance, and Victor Salas for performing the calcium measurements. This work was supported by Grant 48573-M from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), Mexico, and by Grant IN212308 from Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Selma Rivas-Fuentes was a recipient of a scholarship from CONACyT (No. 169 963) and from Dirección General de Estudios de Posgrado, UNAM. She was also funded for a scientific visit to France by the SEP-CONACyT-ANUIES-Ecos program.

## References

- [1] J.J. Gallin, I.M. Goldstein, R. Snyderman, *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*, Raven Press, Ltd., New York, 1988.
- [2] T.W.J. Huizinga, D. Roos, A.E.G.K. von dem Borne, Neutrophil Fc-gamma receptors: a two way bridge in the immune system, *Blood* 75 (1990) 1211–1214.
- [3] E.L. Becker, The short and happy life of neutrophil activation, *J. Leukoc. Biol.* 47 (1990) 378–389.
- [4] K.J. Johnson, J. Varani, J.E. Smolen, Neutrophil activation and function in health and disease, *Immunol. Ser.* 57 (1992) 1–46.
- [5] C. Rosales, E.J. Brown, Neutrophil collaboration in the immune response, in: J.G. Wheeler, J.S. Abramson (Eds.), *The Neutrophil*, Oxford University Press, New York, 1993, pp. 23–62.
- [6] N.D. Burg, M.H. Pillinger, The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity, *Clin. Immunol.* 99 (2001) 7–17.
- [7] G.P. Downey, T. Fukushima, L. Fialkow, T.K. Waddell, Intracellular signaling in neutrophil priming and activation, *Semin. Cell Biol.* 6 (1995) 345–356.
- [8] P. Scapini, J.A. Lapinet-Vera, S. Gasperini, F. Calzetti, F. Bazzoni, M.A. Cassatella, The neutrophil as a cellular source of chemokines, *Immunol. Rev.* 177 (2000) 195–203.
- [9] J.V. Ravetch, Fc receptors, in: W.E. Paul (Ed.), *Fundamental Immunology*, fifth ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2003, pp. 631–684.
- [10] F. Hoffmeyer, K. Witte, R.E. Schmidt, The high-affinity Fc gamma RI on PMN: regulation of expression and signal transduction, *Immunology* 92 (1997) 544–552.
- [11] L.Y. Pan, D.B. Mendel, J. Zurlo, P.M. Guyre, Regulation of the steady state level of Fc gamma RI mRNA by IFN-gamma and dexamethasone in human monocytes, neutrophils, and U-937 cells, *J. Immunol.* 145 (1990) 267–275.
- [12] J.V. Ravetch, S. Bolland, IgG Fc receptors, *Annu. Rev. Immunol.* 19 (2001) 275–290.
- [13] J.C. Edberg, J.J. Moon, D.J. Chang, R.P. Kimberly, Differential regulation of human neutrophil Fc $\gamma$ RIIA (CD32) and Fc $\gamma$ RIIIB (CD16)-induced Ca $^{2+}$  transients, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 8071–8079.
- [14] M.J.G. Fernandes, G. Lachanc, G. Paré, E. Rollet-Labelle, P.H. Naccache, Signaling through CD16b in human neutrophils involves the Tec family of tyrosine kinases, *J. Leukoc. Biol.* 78 (2005) 524–532.
- [15] C. Rosales, E.J. Brown, Signal transduction by neutrophil IgG Fc receptors: dissociation of [Ca $^{2+}$ ] $_i$  rise from IP $_3$ , *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 5265–5271.
- [16] J.E. Salmon, N.L. Browle, J.C. Edberg, R.P. Kimberly, Fc $\gamma$  receptor III induces actin polymerization in human neutrophils and primes phagocytosis mediated by Fc $\gamma$  receptor II, *J. Immunol.* 146 (1991) 997–1004.
- [17] A. Ortiz-Stern, C. Rosales, Fc $\gamma$ RIIIB stimulation promotes  $\beta$ 1 integrin activation in human neutrophils, *J. Leukoc. Biol.* 77 (2005) 787–799.
- [18] E. García-García, G. Nieto-Castañeda, M. Ruiz-Saldaña, N. Mora, C. Rosales, Fc $\gamma$ RIIA and Fc $\gamma$ RIIIB mediate nuclear factor activation through separate signaling pathways in human neutrophils, *J. Immunol.* 182 (2009) 4547–4556.
- [19] E. García-García, C. Rosales, Nuclear factor activation by Fc $\gamma$ R in human peripheral blood neutrophils detected by a novel flow cytometry-based method, *J. Immunol. Meth.* 320 (2007) 104–118.
- [20] M.J. van Vugt, A.F. Heijnen, P.J. Capel, S.Y. Park, C. Ra, T. Saito, J.S. Verbeek, J.G. van de Winkel, FcR gamma-chain is essential for both surface expression and function of human Fc gamma RI (CD64) in vivo, *Blood* 87 (1996) 3593–3599.

- [21] E. Garcia-Garcia, C. Rosales, Signal transduction in Fc receptor-mediated phagocytosis, *J. Leukoc. Biol.* 72 (2002) 1092–1108.
- [22] J.A. Swanson, A.D. Hoppe, The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis, *J. Leukoc. Biol.* 76 (2004) 1093–1103.
- [23] E. Garcia-Garcia, C. Rosales, Adding complexity to phagocytic signaling: phagocytosis-associated cell responses and phagocytic efficiency, in: C. Rosales (Ed.), *Molecular Mechanisms of Phagocytosis*, Landes Bioscience/Springer Science, Georgetown, Texas, 2005, pp. 58–71.
- [24] Z.K. Indik, S. Hunter, M.M. Huang, X.Q. Pan, P. Chien, C. Kelly, A.I. Levinson, R.P. Kimberly, A.D. Schreiber, The high affinity Fc $\gamma$  receptor (CD64) induces phagocytosis in the absence of its cytoplasmic domain: the gamma subunit of Fc $\gamma$ RIIIA imparts phagocytic function to Fc $\gamma$ RI, *Exp. Hematol.* 22 (1994) 599–606.
- [25] A. Ioan-Facsinay, S.J. de Kimpe, S.M.M. Hellwig, P.L. van Lent, F.M.A. Hofhuis, H.H. van Ojik, C. Sedlik, S.A. da Silveira, J. Gerber, Y.F. de Jong, R. Roozendaal, L.A. Aarden, W.B. van der Berg, T. Saito, D. Mosser, S. Amigorena, S. Izui, J.-G.B. van Ommen, M. van Vugt, J.G.J. van de Winkel, J.S. Verbeek, Fc $\gamma$ RI (CD64) contributes substantially to severity of arthritis, hypersensitivity responses, and protection from bacterial infection, *Immunity* 16 (2002) 391–402.
- [26] N.A. Fanger, K. Wardwell, L. Shen, T.F. Tedder, P.M. Guyre, Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells, *J. Immunol.* 157 (1996) 541–548.
- [27] N.A. Fanger, D. Voigtlaender, C. Liu, S. Swink, K. Wardwell, J. Fisher, R.F. Graziano, L.C. Pfefferkorn, P.M. Guyre, Characterization of expression, cytokine regulation, and effector function of the high affinity IgG receptor Fc $\gamma$ RI (CD64) expressed on human blood dendritic cells, *J. Immunol.* 158 (1997) 3090–3098.
- [28] M. van Egmond, A.B. van Spriel, H. Vermeulen, G. Huls, E. van Garderen, J.G.J. van de Winkel, Enhancement of polymorphonuclear cell-mediated tumor cell killing on simultaneous engagement of Fc $\gamma$ RI (CD64) and Fc $\alpha$ RI (CD89), *Cancer Res.* 61 (2001) 4055–4060.
- [29] F. Vely, N. Gruel, J. Moncuit, O. Cochet, H. Rouard, S. Dare, J. Galon, C. Sautes, W.H. Fridman, J. Teillaud, A new set of monoclonal antibodies against human Fc $\gamma$ RII (CD32) and Fc $\gamma$ RIII (CD16): characterization and use in various assays, *Hybridoma* 16 (1997) 519–528.
- [30] E. Garcia-Garcia, G. Sanchez-Mejorada, C. Rosales, Phosphatidylinositol 3-kinase and ERK are required for NF- $\kappa$ B activation, but not for phagocytosis, *J. Leukoc. Biol.* 70 (2001) 649–658.
- [31] E. García-García, E.J. Brown, C. Rosales, Transmembrane mutations to Fc $\gamma$ RIIA alter its association with lipid rafts: implications for receptor signaling, *J. Immunol.* 178 (2007) 3048–3058.
- [32] E. Garcia-Garcia, R. Rosales, C. Rosales, Phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase are recruited for Fc receptor-mediated phagocytosis during monocyte to macrophage differentiation, *J. Leukoc. Biol.* 72 (2002) 107–114.
- [33] C. Rosales, E.J. Brown, Two mechanisms for IgG Fc receptor-mediated phagocytosis by human neutrophils, *J. Immunol.* 146 (1991) 3937–3944.
- [34] C. Rosales, Fc receptor and integrin signaling in phagocytes, *Signal Transduct.* 7 (2007) 386–401.
- [35] D.E. Schiff, J. Rae, T.R. Martin, B.H. Davis, J.T. Curnutte, Increased phagocyte Fc $\gamma$ RI expression and improved Fc $\gamma$  receptor-mediated phagocytosis after in vivo recombinant human interferon- $\gamma$  treatment of normal human subjects, *Blood* 90 (1997) 3187–3194.
- [36] T. Joshi, J.P. Butchar, S. Tridandapani, Fc $\gamma$  receptor signaling in phagocytes, *Int. J. Hematol.* 84 (2006) 210–216.
- [37] S. Fodor, Z. Jakus, A. Mócsai, ITAM-based signaling beyond the adaptive immune response, *Immunol. Lett.* 104 (2006) 29–37.
- [38] F.Y. Chuang, M. Sassaroli, J.C. Unkeless, Convergence of Fc $\gamma$ RIIA and Fc $\gamma$ RIIIB signaling pathways in human neutrophils, *J. Immunol.* 164 (2000) 350–360.
- [39] S. Bréchar, E.J. Tschirhart, Regulation of superoxide production in neutrophils: role of calcium influx, *J. Leukoc. Biol.* 84 (2008) 1223–1237.
- [40] B.S. Edwards, H.A. Nolla, R.R. Hoffman, Resolution of adhesion- and activation-associated components of monoclonal antibody-dependent human NK cell-mediated cytotoxicity, *Cell. Immunol.* 144 (1992) 55–68.
- [41] R. Gavioli, S. Spisani, A.L. Giuliani, S. Traniello, Dual mechanism in induction of human neutrophil cytotoxicity: activation of protein kinase C and elevation in intracellular calcium, *Clin. Exp. Immunol.* 80 (1990) 247–251.
- [42] P. Koolwijk, J.G. van de Winkel, L.C. Pfefferkorn, C.W. Jacobs, I. Otten, G.T. Spierenburg, B.J. Bast, Induction of intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization and cytotoxicity by hybrid mouse monoclonal antibodies. Fc $\gamma$ RII regulation of Fc $\gamma$ RI-triggered functions or signaling?, *J. Immunol.* 147 (1991) 595–602.