

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL**

Unidad Zacatenco
Departamento de Biomedicina Molecular

**“Participación de la miosina 1g en la internalización
del BCR y en la pinocitosis de antígeno por
linfocitos B de ratón”**

TESIS
que presenta

QFB. NOÉ HERMINIO VÉLAZQUEZ RECINOS

Para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

En la especialidad de
BIOMEDICINA MOLECULAR

Director de Tesis:
Dr. Leopoldo Santos Argumedo

CIUDAD DE MÉXICO
2017

Febrero,

DIRECTOR

Dr. Leopoldo Santos Argumedo

Jefe e Investigador Titular del Departamento de
Biomedicina Molecular.

CINVESTAV - IPN

ASESORES

Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete

Dr. Michael Schnoor

Investigadores Titulares del Departamento de
Biomedicina Molecular.

CINVESTAV - IPN

Dr. José Luis Maravillas Montero

Investigador Asociado "C" de Tiempo Completo

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DEL DR. LEOPOLDO SANTOS ARGUMEDO DEL DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR PERTENECIENTE AL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL (CINVESTAV - IPN).

DURANTE LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO SE CONTÓ CON EL APOYO DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT), CON EL NÚMERO DE PROYECTO:255053, Y EL NÚMERO DE BECARIO:340609.

SE AGRADECE AL DR. HECTOR ROMERO RAMÍREZ Y AL M EN C. VICTOR HUGO ROSALES GARCÍA POR LA AYUDA BRINDADA DURANTE LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO, ASÍ COMO AL M.V.Z. RICARDO GAXIOLA CENTENO Y AL TÉCNICO ESPECIALIZADO DE BIOTERIO VICTOR MANUEL GARCÍA GÓMEZ POR EL APOYO PROFESIONAL CON EL USO Y EL MANEJO DE LOS ANIMALES UTILIZADOS DURANTE EL DESARROLLO DE ESTA TESIS.

AGRADECIMIENTOS

A **mis padres**, por su cariño, por ser los mejores consejeros y la mejor guía, por su apoyo en mis decisiones, por estar siempre a mi lado para motivarme a continuar en los momentos de dificultad y por educarme para ser la persona que hoy soy.

A **mis hermanos**, por su apoyo incondicional, por el cariño que me brindan, y por acompañarme durante toda mi vida.

Al **Dr. Leopoldo Santos Argumedo**, por brindarme su amistad, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por compartirme sus conocimientos y su dirección durante la realización de este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio, **Alberto Girón, Zaydita Piedra, Pamela Domínguez, Ivan Meza, Carolina Moreno, Orestes López, Laura Manzanares, Erick Sánchez, Kaleb Mondragon, Miguel Baños, Zuleima Pérez, Héctor Romero y Rodrigo Cervantes**, por todos los consejos brindados durante este trabajo y por su amistad.

A mis amigos, **Freddy Mazariegos, Monse Avila, José Ovando, Misael Velázquez, Alfonso Velázquez, Leonardo Trujillo, Pedro Nova y Pedro Avila**, por que siempre estuvimos compartiendo buenos y malos momentos durante esta etapa, y por que sigamos coincidiendo mucho más tiempo.

A **Lenin Estudillo**, por que me ofreció su amistad desde mi llegada al laboratorio, y esa amistad ha perdurado, por los consejos profesionales y personales que me compartió.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	10
RESUMEN.....	12
SUMMARY.....	13
I. INTRODUCCIÓN.....	14
1.1.- Linfocitos B como células presentadoras de antígenos.....	14
1.2.- Captura antigénica mediada por los linfocitos B.....	15
1.2.1.- Internalización del antígeno a través del BCR.....	16
1.2.2.- Fagocitosis por los linfocitos B.....	16
1.2.3.- Pinocitosis de los linfocitos B.....	17
1.3 Miosinas.....	18
1.3.1.- Miosinas de clase I.....	20
1.3.2.- Miosinas de clase I en células del sistema Inmunológico.....	21
1.3.3.- Miosina 1g.....	23
1.3.4.- Función de la miosina 1g en los linfocitos B.....	24
1.3.5.- Miosina 1g en la captura antigénica de los linfocitos B.....	25
II. JUSTIFICACIÓN.....	26
III. HIPOTESIS.....	27
IV. OBJETIVOS.....	27
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
VI. RESULTADOS.....	33
VII. DISCUSIÓN.....	49
VIII. CONCLUSIONES.....	52
IX. PERSPECTIVAS.....	53
X. BIBLIOGRAFÍA.....	54

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Estructura de las miosinas de clase I y II.....	19
Figura 2.- Estructura de las miosinas de clase I.....	20
Figura 3.- Expresión de las miosinas de clase I en las poblaciones celulares del sistema inmunológico.....	21
Figura 4.- Expresión de la miosina 1g en el tejido inmunitario.....	22
Figura 5.- Estructura de la miosina 1g.....	23
Figura 6.- Genotipificación de los ratones deficientes de la miosina 1g.....	33
Figura 7.- Medición de la internalización del BCR mediante citometría de flujo.....	35
Figura 8.- Análisis por citometría de flujo de la participación de la miosina 1g en la internalización del BCR.....	36
Figura 9.- Medición de la internalización del BCR mediante microscopía confocal.....	37
Figura 10.- Análisis de la participación de la miosina 1g en la internalización del BCR por microscopía confocal.....	38
Figura 11.- Medición de la pinocitosis de linfocitos B por citometría de flujo...	40
Figura 12.- Analisis por citometría de flujo de la participación de la miosina 1g en la pinocitosis de linfocitos B.....	41
Figura 13.- Pinocitosis de las células B mediante microscopía confocal.....	42
Figura 14.- Análisis de la participación de la miosina 1g en la pinocitosis de linfocitos B por microscopía confocal.....	43
Figura 15.- Análisis de las vesículas pinocíticas de los linfocitos B WT y Myo1g ^{-/-}	44
Figura 16.- Análisis de las vesículas pinocíticas de los linfocitos B activados..	45

Figura 17.- Cinética de la pinocitosis de OVA por los linfocitos B deficientes de la miosina 1g, mediante citometría flujo.....	47
Figura 18.- Cinética de la pinocitosis de OVA por los linfocitos B deficientes de la miosina 1g, mediante microscopía confocal.....	48

ABREVIATURAS

ATP	Adenosintrifosfato
AP-2	Proteína Adaptadora 2
APC's	Células profesionales presentadoras de antígeno
ARP 2/3	Proteínas relacionadas con actina 2/3
B 7.6	Anticuerpo dirigido contra la inmunoglobulina M
BCR	Receptor de linfocitos B
CD	Cumulo de diferenciación.
CDC42	Proteína 42 del control de la división celular
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FBS	Suero fetal bovino
GTP	Guanosintrifosfato
IL	Interleucina
Ig	Inmunoglobulina
kDa	kiloDalton
LPS	Lipopolisacarido
µg	Microgramos
µL	Microlitros
mL	Mililitros
MHC-II	Complejo principal de histocompatibilidad clase II
Myo1	Miosinas de clase 1
NIM-R1	Anticuerpo dirigido contra CD90
OVA	Ovoalbúmina
PI3K	Fosfatidilinositol 3 cinasa.
PAK1	Serina – treonina proteína cinasa
PH	Dominio de homología a pleckstrina
PE	Ficoeritrina
PFA	Paraformaldehído
siRNAs	RNA pequeño de interferencia
SH3	Dominio de homología a Src

TH	Dominio de homología a cola.
tfnR	Receptor de transferrina
WT	Silvestre

RESUMEN

Las miosinas son proteínas motoras, que mediante la hidrólisis del ATP, generan una fuerza mecánica que les permite desplazarse sobre los filamentos de actina. Se han descrito 18 clases de miosinas, dentro de las cuales se encuentran las miosinas de clase I, que están expresadas principalmente en células hematopoyéticas. En los humanos y en los ratones existen ocho genes que codifican para ocho miosinas de clase I. Estas ocho miosinas de clase I se clasifican en miosinas de cola larga, que comprende a la Myo1e y la Myo1f, y las miosinas de cola corta, dentro de las cuales encontramos a la Myo1a, la Myo1b, la Myo1c, la Myo1d, la Myo1g y la Myo1h. La Myo1g se ha descrito por ser la proteína motora que se expresa exclusivamente en el tejido hematopoyético, principalmente en linfocitos T y B [33]. La miosina 1g ha sido estudiada tanto en líneas celulares y en células primarias, describiendo su principal función es el mantenimiento de la tensión de la membrana plasmática, donde sirve como puente entre el citoesqueleto de actina y la membrana plasmática. Además se ha determinado que las células B deficientes de miosina 1g, aisladas de bazo de ratón, tienen mayor capacidad endocítica que células B de ratones silvestres, esto después de mezclar a estas células con FITC-*Staphylococcus aureus*, y analizar por citometría de flujo y microscopía confocal la cantidad ingerida de esta bacteria [45]. Dado que no se han evaluado la implicación de la miosina 1g en los otros mecanismos por los cuales las células B pueden ingerir a los antígenos, que es la internalización del BCR y la pinocitosis, nosotros decidimos estudiarla. Se demostró, que en la ausencia de la miosina 1g, los linfocitos B de ratón conservan la misma capacidad de internalizar al antígeno por el BCR comparado con los linfocitos B de ratones silvestres. Sin embargo, cuando analizamos la capacidad pinocítica, las células B de los ratones deficientes de la miosina 1g, que fueron activadas con LPS + IL-4, ingerían mayor cantidad del antígeno soluble.

SUMMARY

Myosins are motor proteins, which, through the hydrolysis of ATP, generate a mechanical force that allows them to move on the actin filaments. Eighteen classes of myosin have been described, within which class I myosins are found, which are expressed mainly in hematopoietic cells. In humans and mice there are eight genes coding for eight class I myosins. These eight class I myosins are classified into long-tail myosin, comprising Myo1e and Myo1f, and short-tailed myosins within of which we find the Myo1a, Myo1b, Myo1c, Myo1d, Myo1g and Myo1h. Myo1g has been described as the motor protein that is exclusively expressed in hematopoietic tissue, mainly in T and B lymphocytes [33]. Myo1g has been studied in both cell lines and primary cells, describing its main function is the maintenance of plasma membrane tension, where it serves as a bridge between the actin cytoskeleton and the plasma membrane. In addition, it has been determined that 1g myosin-deficient B cells, isolated from mouse spleen, have greater endocytic capacity than B cells from wild mice, this after mixing these cells with FITC-Staphylococcus aureus, and analyzed by flow cytometry and Confocal microscopy the ingested amount of this bacterium [45]. Since the involvement of myosin 1g in the other mechanisms by which B cells can ingest the antigens, which is the internalization of BCR and pinocytosis, we have decided to study it. It was demonstrated that in the absence of myosin 1g, mouse B lymphocytes retain the same ability to internalize the antigen by BCR compared to B lymphocytes from wild mice. However, when we analyzed pinocytic capacity, B cells from 1g myosin-deficient mice, which were activated with LPS + IL-4, ingest more of the soluble antigen.

I.- INTRODUCCIÓN.

1.1.- Linfocitos B como células presentadoras de antígenos.

Las células profesionales presentadoras de antígenos (APCs) capturan al antígeno mediante fagocitosis, pinocitosis de fase fluida o endocitosis. Una vez dentro de las células, el antígeno es procesado, cargado sobre el complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHC II), y presentado a linfocitos T CD4. La capacidad de las células B para presentar antígenos a las células T CD4 fue reconocido hace más de cuatro décadas, pero se consideraron menos eficaces que las células dendríticas o macrófagos debido a su menor capacidad para absorber el antígeno de forma no específica. En contraste, el reconocimiento del antígeno a través del BCR es hasta 10.000 veces mejor. La interacción del BCR con el antígeno conduce no sólo a la captura de antígenos y la entrega de antígenos a los compartimentos MHCII, sino que también inicia la señalización y la activación de los linfocitos B [1,2,3].

Esto, a su vez, influye en el estado de activación de las células B y su capacidad de involucrar la ayuda de las células T CD4. La naturaleza del antígeno y la fuerza de interacción (afinidad) con el BCR son por lo tanto características esenciales que determinan si el antígeno procesado puede ser presentado eficientemente a las células T CD4. Aquí, revisamos los pasos secuenciales requeridos para el reconocimiento e internalización del antígeno por el BCR, así como los otros mecanismos de captura antigénica de las células B, como la fagocitosis y la pinocitosis, ya que es un proceso clave durante la respuesta inmune adaptativa [4,5,6].

1.2.- Captura antigénica mediada por los linfocitos B.

En los humanos y en los ratones, las células B se generan en la médula ósea y, después de pasar por varios controles de desarrollo, migran al bazo donde se diferencian en células B naive maduras. Las células B maduras recirculan a través del torrente sanguíneo y migran a los órganos linfoides secundarios, como el bazo y los ganglios linfáticos, que proporcionan el microambiente estructural y químico necesario para que las células B encuentren antígenos y se conviertan en células B completamente activadas [7,8].

Las células B pueden encontrar antígenos grandes que están unidos a la superficie de células vecinas, como los macrófagos, las células dendríticas foliculares (FDC) o las células dendríticas (DC) [9]. Así también pueden encontrar a pequeños antígenos solubles, debajo de 70 kDa, que tienen acceso a los ganglios linfáticos a través de los vasos linfáticos aferentes y pueden pasar directamente a los folículos primarios donde se encuentran las células B [10]. Se ha sugerido que la entrada de estos antígenos es a través de pequeños poros localizados en la región del seno subcapsular de los ganglios linfáticos o que puede darse por simple difusión [11].

Los antígenos pequeños pueden ser adquiridos de manera soluble por el BCR de los linfocitos B, también pueden ser capturados mediante pinocitosis.

1.2.1.- Internalización del antígeno a través del BCR

La unión del antígeno al receptor de las células B (BCR) inicia una serie de eventos de señalización, que terminan en la endocitosis del complejo ligando receptor en vesículas recubiertas de clatrina. Este tipo de captura antigénica mediada por clatrina es el mecanismo mejor caracterizado para la entrada de antígeno a la célula.

La clatrina es un complejo proteico formado por tres cadenas ligeras y tres cadenas pesadas que constituyen una unidad llamada "el triskelion" (triskelion) de clatrina. Este complejo es reclutado a la membrana plasmática por proteínas adaptadoras. Una de estas proteínas adaptadoras, es el complejo AP-2, formado por cuatro subunidades (α , β_2 , μ_2 y σ_2). El complejo AP-2 interactúa con clatrina, a través de la subunidad β_2 , y estimula su polimerización generando una malla de clatrina que cubre la vesícula. Durante el ensamble progresivo de clatrina en la membrana, ésta va adquiriendo curvatura hasta que se forma la vesícula endocítica. La fisión de la vesícula cubierta con clatrina es controlada por la GTPasa dinamina. Se ha propuesto que la dinamina actúa como una mecano-enzima la cual usa la hidrólisis de GTP para generar la fuerza necesaria para estrangular el cuello y escindir las vesículas de la membrana [12, 13, 14].

1.2.2.- Fagocitosis por los linfocitos B

La fagocitosis se define como la ingestión de partículas con un tamaño superior a $0,5 \mu\text{M}$ realizada por células especializadas como son macrófagos, células dendríticas y células B, eliminando la mayor parte de bacterias del organismo. La fagocitosis también requiere de una importante activación de la membrana plasmática formando las copas fagocíticas por donde se

internaliza el ligando. Una de las características más importantes de la fagocitosis es que es un proceso dirigido estrictamente por el reconocimiento específico entre el ligando y receptor [15]. Entre los factores implicados en la internalización se encuentran las proteínas de unión a actina como Arp2/3, Rho GTPasas (Rac1, Cdc42 o RhoA), fosfolípidos y cinasas como PI3K. Durante la fagocitosis, la dinamina es un factor crítico para la escisión del fagosoma y la liberación del mismo al citoplasma celular donde comenzará su maduración vesicular [16].

1.2.3.- Pinocitosis de los linfocitos B.

A diferencia de las otras vías de endocitosis, la macropinocitosis involucra la remodelación de grandes extensiones de la membrana plasmática a través de cambios en el citoesqueleto de actina lo que culmina con la internalización de fluido en grandes vacuolas llamadas macropinosomas [17]. Éste es un proceso transitorio, comúnmente inducido por factores de crecimiento que activan receptores de tirosina cinasa, promoviendo cascadas de señalización que inducen cambios en el citoesqueleto de actina y en la membrana plasmática.

Entre las proteínas involucradas en el proceso de regulación de la macropinocitosis se encuentran las GTPasas Rac y Cdc42 las cuales activan a la cinasa PAK1 encargada de regular la dinámica del citoesqueleto de actina [18]. Además, PAK1, es necesaria para que se cierre el macropinosoma. Además, agentes que alteran la polimerización del citoesqueleto de actina y mutantes dominantes negativas de Rac, Cdc42 o PAK1, afectan este mecanismo de endocitosis [19,20].

1.3.- Miosinas.

Existen tres grandes superfamilias de proteínas motoras: miosinas, cinesinas y dineinas. La primera, las miosinas, actúan como motores moleculares sobre los filamentos de actina, mientras que las últimas dos, ejercen la misma función sobre los microtúbulos. La actividad motora de las miosinas se debe a la actividad ATPasa que poseen, por lo tanto, hidrolizan ATP e inmediatamente inducen un cambio conformacional para generar la fuerza mecánica y su posterior desplazamiento sobre los filamentos de actina [21,22].

Mediante análisis filogenéticos se han definido 35 clases de miosinas en diferentes organismos eucariontes [23]. Las miosinas de tipo I y II son las más abundantes, las mejores estudiadas, y están presentes en casi todas las células eucariotas. Las miosinas de tipo II, también llamadas miosinas “convencionales”, participan en la contracción muscular y la citocinesis celular. Las miosinas de tipo I, o “no convencionales”, están involucradas en las interacciones citoesqueleto-membrana [24].

Las miosinas son complejos formados por una o dos cadenas pesadas; que varían en longitud según sea el tipo y subtipo, y en el número de cadenas ligeras que se le pueden asociar.

Las cadenas pesadas se caracterizan por contener tres regiones bien definidas; región motora, de cuello y de cola [23]. La región motora o cabeza, que es la más conservada entre las miosinas, tiene la capacidad de unirse a filamentos de actina, hidrolizar ATP y generar la fuerza mecánica necesaria para el movimiento. En la región de cuello, donde encontramos uno o más motivos ricos en isoleucina y glutamina (motivos IQ) que le confiere sitios de unión a las cadenas ligeras, como la calmodulina o una cadena ligera tipo calmodulina, y sirve como palanca para el movimiento del dominio motor. Por último, la región de cola, que varía dramáticamente entre las diferentes clases de miosinas, y dota a cada una de ellas de su función específica. Las miosinas de clase II contienen secuencias “coiled coil” que le permiten dimerizar y formar moléculas de dos cadenas pesadas, y por lo tanto miosinas de dos cabezas (Fig.1) [22, 25, 26].

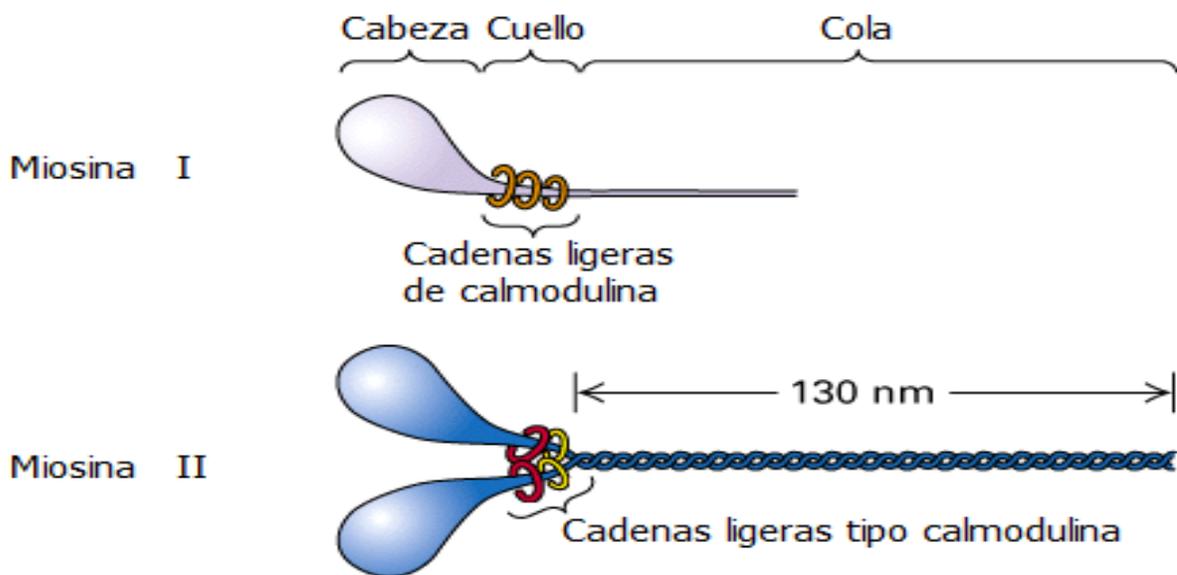


Figura 1.- Estructura de las miosinas de clase I y II. En estas dos miosinas se muestran las regiones compartidas que poseen; cabeza, cuello y cola, que forman la cadena pesada. Además, se esquematiza el sitio de interacción de las cadenas ligeras, calmodulina o cadenas ligeras tipo calmodulina, con la región del cuello [27].

1.3.1.- Miosinas de clase I.

Las miosinas de clase I son pequeñas proteínas motoras que constan de una cadena pesada de 110 – 140 Kda [22], y a diferencia de las miosinas de clase II, no dimerizan. En el dominio N-terminal encontramos la región motora o “cabeza”, en la región de cuello pueden existir de 2 a 6 dominios IQ [IQXXRGXXR], y en la región de cola encontramos dominios de homología a cola [TH, del inglés Tail Homology], que van de TH1 a TH3. El dominio TH1 se caracteriza por tener una secuencia rica en aminoácidos básicos, y está implicada en la unión de fosfoinosítidos pertenecientes a las membranas, y esto se debe gracias al dominio PH (dominio de homología a pleckstrina) que contiene. El dominio TH2 es rico en residuos de glicina, alanina, glutamina y prolina. Por último, el dominio TH3 o dominio SH3, permite la interacción proteína – proteína, uniéndose específicamente a proteínas que contienen residuos ricos en prolina. Las miosinas de clase I que contienen los tres dominios TH se han llamado miosinas de “cola larga”, mientras que las miosinas que cuentan con un dominio TH1 se han denominado miosinas de “cola corta” (Fig.2) [28, 29].

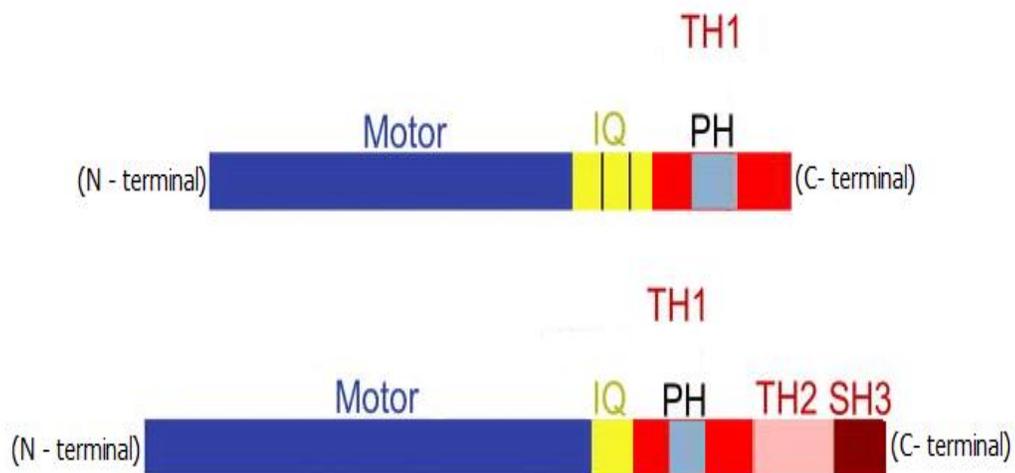


Figura 2.- Estructura de las miosinas de clase I. Se muestra la estructura de las miosinas de clase I de cola corta en la parte superior y de cola larga en la parte inferior, así como los dominios característicos de cada una de ellas [30].

En el ser humano y en el ratón, existen ocho genes diferentes que codifican a las ocho cadenas pesadas de las miosinas de clase I. Las miosinas de cola corta, incluyen a Myo1a, Myo1b, Myo1c, Myo1d, Myo1g y Myo1h, y las miosinas de cola larga son Myo1e y Myo1f [31].

1.3.2.- Miosinas de clase I en células del sistema inmunológico.

Mediante análisis por microarreglos se ha determinado la expresión de miosinas de clase I en las células del sistema inmunológico (Fig. 3), donde se puede observar que las miosinas Myo1c, Myo1e, Myo1f y Myo1g se expresan abundantemente en estas células de origen hematopoyético [31].

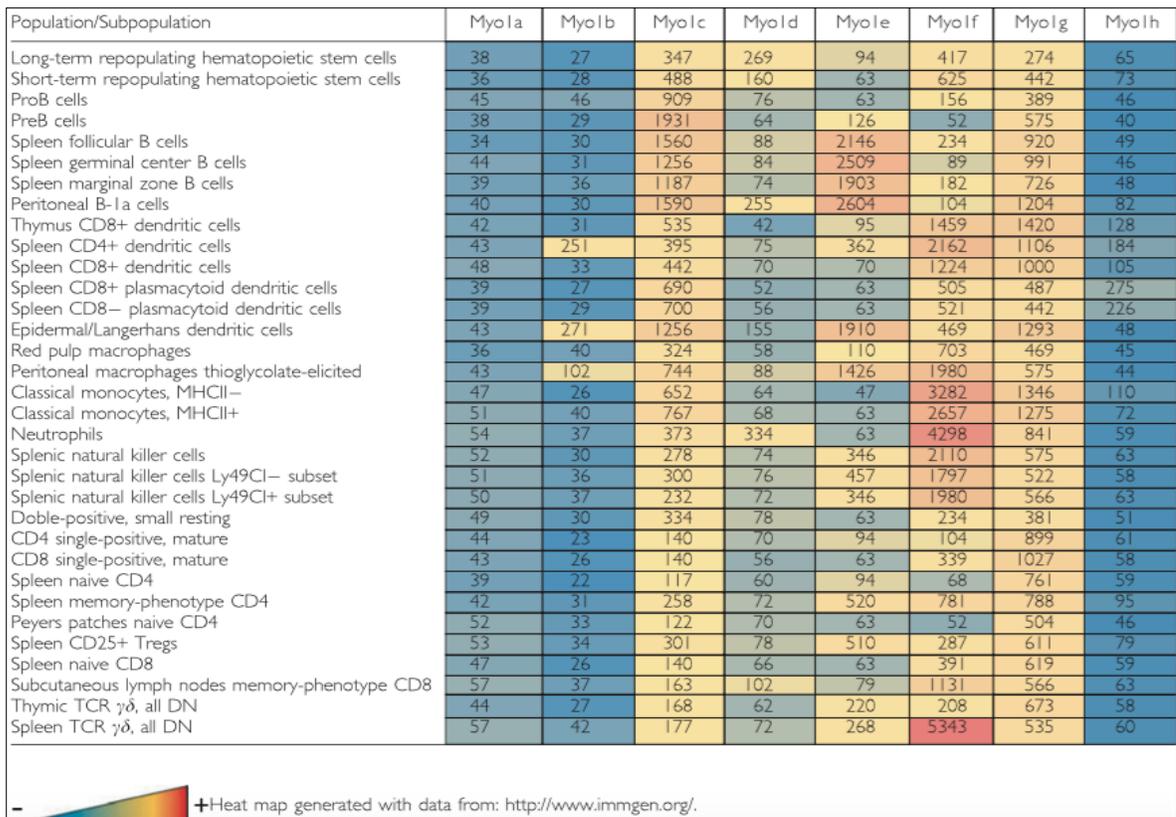


Figura 3.- Expresión de las miosinas de clase I en las poblaciones celulares del sistema inmunológico. Se muestra, mediante un mapa de calor, la expresión del RNA mensajero de las miosinas de clase I en células del sistema hematopoyético [23].

De estas cuatro miosinas expresadas en células del sistema inmunológico, las miosinas Myo1c, Myo1e y Myo1f se expresan en otros tejidos del cuerpo, como son; hígado, riñón, pulmón, sistema digestivo, cerebro, etc., tanto en el humano como en el ratón. Sin embargo, la miosina 1g es la proteína motora de clase I que tiene una expresión específica en células del sistema hematopoyético (Fig. 4). Se ha detectado en diferentes tejidos del sistema inmunológico como son el timo, los nódulos linfáticos y el bazo, y tiene una expresión abundante en los linfocitos T y B. Sin embargo, no se ha encontrado en otros tejidos [32].

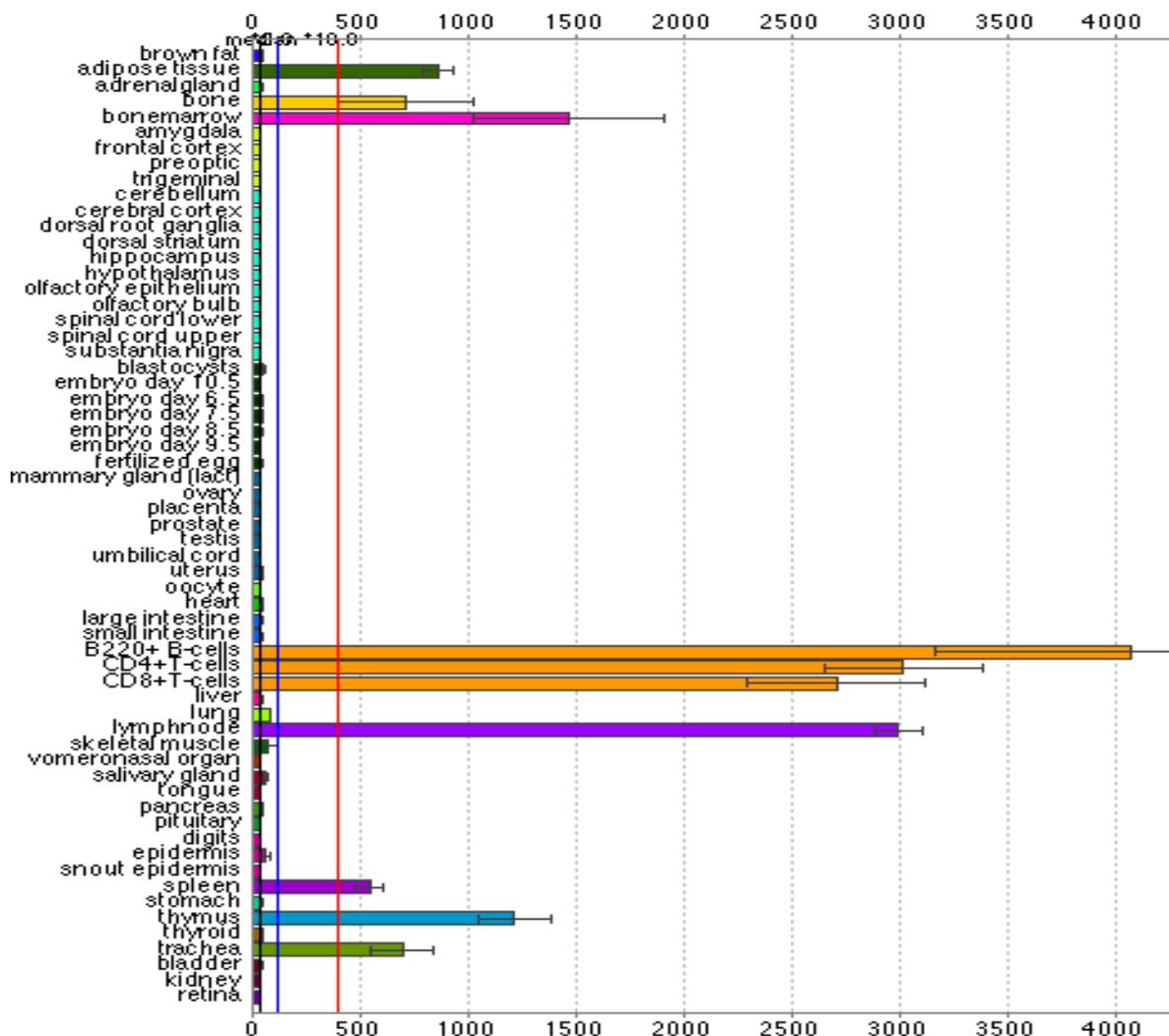


Figura 4.- Expresión de la Miosina 1g en el tejido inmunitario. Mediante la gráfica de transcriptoma de la Myo1g se puede observar que el RNA mensajero tiene una expresión específica en el sistema inmunológico [32].

Debido a estos datos de expresión, y otros los cuales se exponen más adelante, es que estamos interesados en estudiar el papel de la Myo1g en los linfocitos B.

1.3.3.- Miosina 1g.

La miosina 1g (Myo1g) es una miosina monomérica de clase I (Fig. 5) que comprende: un dominio motor en la región N-terminal; una región reguladora (cuello) que contiene dos motivos IQ para la unión de calmodulina; y en la región C-terminal el dominio de cola, que permite la asociación con fosfatidilinositol 3,4 bifosfato y fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato, a través del sitio de homología a pleckstrina (PH). El gen que codifica para esta miosina está localizado en el cromosoma 11 en el ratón, y en el cromosoma 7 en el humano [33].

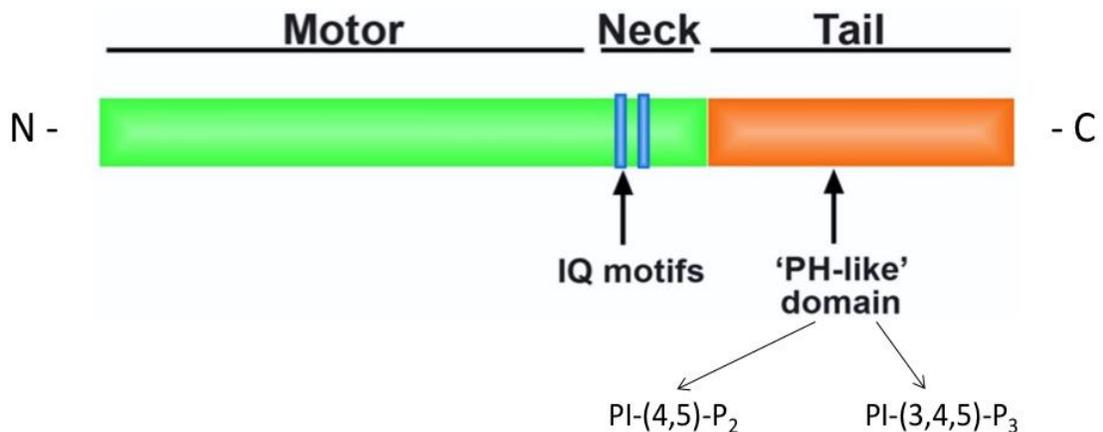


Figura 5.- Estructura de la Miosina 1g. La estructura de la miosina 1g comienza de la región N-terminal con el dominio motor, seguido por el dominio regulador, donde encontramos dos motivos IQ, y finaliza con el dominio de la cola en la región C-terminal, en el cual se encuentra el sitio de homología a pleckstrina [33].

1.3.4.- Función de la miosina 1g en los linfocitos B.

Como hemos dicho anteriormente, la Myo1g ha sido identificada como una miosina exclusiva de las células hematopoyéticas, se expresa abundantemente en las células B y en las células T activadas [34], donde se ha encontrado, mediante ensayos de inmunofluorescencia, que se localiza en la membrana plasmática y se encuentra particularmente enriquecida en las microvellosidades.

Aunque se sabe poco acerca de la Myo1g, se ha identificado que esta proteína motora está implicada en el mantenimiento de la tensión membranal de las células donde se expresa. El uso de siRNAs específicos para la Myo1g, ha demostrado que la elasticidad de la membrana de células T disminuye en respuesta a la deficiencia de esta proteína motora [35].

La formación de extensiones de membrana como son los pseudópodos, los filipodios, los lamelipodios o las microvellosidades, son dependientes de la tensión de membrana. En las células B de los ratones deficientes de la Myo1g se ha demostrado que el tamaño de estas microestructuras se ve afectado, comparado con las células B de los ratones silvestres, demostrando que esta proteína participa en el mantenimiento de la rigidez de la membrana de estas células [36].

Se ha demostrado que la Myo1g se une a los fosfoinosítidos y por lo tanto puede tener una función en el transporte vesicular de los endosomas [33].

Por otro lado, la Myo1g ha sido encontrada en las balsas de lípidos de los neutrófilos y de los linfocitos T de humanos [37]. La Myo1g se ha encontrado en las balsas de lípidos (purificadas por gradientes de sacarosa) de los linfocitos B activados, por lo tanto, la Myo1g podría participar en el reclutamiento de receptores y de moléculas de señalización para establecer complejos supramoleculares que inducen la activación y diferenciación de las células B.

Se ha observado que en las células B deficientes de la Myo1g existe un incremento en la internalización de la transferrina [Tfn], lo que indica que una menor tensión de la membrana plasmática incrementa la internalización de este ligando soluble [36].

1.3.5.- Miosina 1g en la captura antigénica de los linfocitos B.

Se ha determinado que las células B deficientes de la miosina 1g, aisladas de bazo de ratón, tienen mayor capacidad endocítica que las células B de ratones silvestres, esto después de mezclar a estas células con FITC-*Staphylococcus aureus*, y analizar por citometría de flujo y microscopía confocal la cantidad ingerida de esta bacteria [36].

Debido a que la Myo1g participa en la fagocitosis de las células B, es para nosotros importante determinar si esta proteína motora está involucrada en la internalización del BCR y en la pinocitosis de antígenos solubles.

II.- JUSTIFICACIÓN

Las miosinas de clase I son proteínas motoras que se expresan abundantemente en los humanos y en el ratón, se ha determinado que la Myo1g tiene una expresión preferencialmente hematopoyética, principalmente en los linfocitos.

Hasta el momento se ha visto que la ausencia de la Myo1g afecta la endocitosis del linfocito B. Por lo tanto es importante estudiar si la Myo1g participa en la internalización del BCR y en la pinocitosis de los linfocitos B de ratón.

III.- HIPÓTESIS

La Myo1g participa en la internalización del BCR y en la pinocitosis de los linfocitos B.

IV.- OBJETIVOS

4.1.- Objetivo General

- Evaluar la participación de la Myo1g en la captura antigénica de los linfocitos B.

4.2.- Objetivos específicos.

- Evaluar la participación de la Myo1g en la internalización del BCR.
- Evaluar si la Myo1g está involucrada en la pinocitosis de los linfocitos B.

V.- MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1.- Animales.

Para el presente trabajo se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6; silvestres (WT) y ratones deficientes de la Miosina 1g ($Myo1g^{-/-}$). Estos ratones fueron utilizados de 8 - 12 semanas para todos los experimentos. Los ratones fueron producidos en el bioterio del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Todos los procedimientos con estos animales se ajustaron al reglamento del Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) y a la norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 “ Consideraciones Técnicas para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio”.

5.2.- Extracción del DNA.

Se utilizó tejido de la cola de los ratones para extraer el DNA. Se colocó el tejido en 75 μ L de buffer de lisis alcalina (NaOH 25mM, EDTA 0.2 mM, pH 12) y se calentó a 95°C durante 30 minutos, posteriormente se enfrió a 4°C durante 10 minutos. Finalmente se le adicionó 75 μ L de buffer de neutralización (Tris-HCL 40 mM, Ph 5).

5.3.- Genotipificación de los ratones.

Para la genotipificación se utilizaron 4 μ L de DNA extraído de tejido de la cola de los ratones para realizar una PCR punto final. Los ratones $Myo1g^{-/-}$ se genotipificaron utilizando el juego de iniciadores (“Forward”:

CTATACTACGACTATACTACAAGAC y “Reverse”:
 AGAGAATGAGGCAGTCTAACAAAGCATTGA) que nos da un amplicon de
 330 pares de bases (pb) que corresponde al gen sin deleción, y el par de
 iniciadores (“Forward”: CTATACTACGACTATACTACAAGAC y “Reverse”:
 TGTCCATGTACTTGCCAAAG) que nos da un amplicon de 470 pb que
 corresponde al gen deletado. Las condiciones de la reacción fueron:

94°C	10 min.	} 35 ciclos.
94°C	30 seg.	
58°C	30 seg.	
72°C	30 seg.	
72°C	10 min.	
4°C	∞	

5.4.- Aislamiento de los linfocitos B.

Para enriquecer las células B que fueron utilizadas en el trabajo se sacrificaron ratones de 8 a 12 semanas de edad, a estos ratones de les extirpó el bazo y se maceró; las células obtenidas se separaron mediante un gradiente de densidad con Ficoll - Hypaque para aislar las células mononucleares. Posteriormente para enriquecer la población de linfocitos B, se realizó un “panning” durante 1 hora en cajas de Petri recubiertas con el anticuerpo anti-CD90 (NIM-R1).

5.5.- Activación de los linfocitos B.

Para activar, las células B se incubaron en 1mL de RPMI 1640 (Life Technologies) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) que contiene: LPS de *Escherichia coli* O55:B5 a 50 µg/mL (Sigma) y 10 U/ml de IL-4 (R&D Systems, Minneapolis, MN) por 48 horas a 37°C.

5.6.- Captura antigénica por los linfocitos B.

Para evaluar la captura antigénica por los linfocitos B se utilizó como antígeno la ovoalbúmina (OVA) o un anticuerpo monoclonal dirigido contra el BCR (B 7.6) acoplado a la ovoalbúmina [OVA – B7.6] para determinar la captura de antígeno mediada por pinocitosis e internalización del BCR respectivamente.

5.6.1.- Internalización mediada por el BCR

Para determinar la captura de antígeno mediada por internalización del BCR; se utilizaron 1×10^6 células B de ratones silvestres o de ratones deficientes de la miosina 1g; en reposo o estimuladas [LPS + IL-4]. Las células fueron mezcladas con OVA – B7.6 [5 μ g] durante 30 min a 37°C. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS frío, fijadas con PFA 2% y permeabilizadas con 300 μ L de saponina 0.1% por 15 min. Las células fueron lavadas con 1 mL PBS y después se le agregó 1 μ L de un anticuerpo de anti-OVA, hecho en conejo, y se dejó incubar durante 20 minutos en hielo. Las células fueron lavadas con 1 mL de saponina 0.01% y se les agregaron 50 μ L de un anticuerpo secundario contra la IgG de conejo [anti-IgG] marcado con PE, a una dilución 1:400. La mezcla se dejó incubando en hielo por 20 min. Finalmente, las células fueron lavadas con 2 mL de PBS. Para citometría, las células fueron resuspendidas en 300 μ L de PBS y leídas en el citometro BD LSRFortessa. Para el confocal, las células fueron adheridas en un cubre objetos, previamente tratado con 100 μ L de poli-L-Lisina [Sigma] al 10%, y montadas con 3 μ L de Vecta-Shield.

5.6.2.- Pinocitosis de los linfocitos B

Para evaluar la capacidad pinocítica de los linfocitos B; se utilizaron 1×10^6 células B de ratones silvestres o de ratones deficientes de la miosina 1g, en reposo o estimuladas [LPS + IL-4]. Las células fueron mezcladas con OVA [5 μ g] durante 30 min a 37°C. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS frío, fijadas con PFA 2% y permeabilizadas con 300 μ L de saponina 0.1% por 15 min. Las células fueron lavadas con 1 mL de PBS y después se les agregó 1 μ L de un anticuerpo anti-OVA, hecho en conejo, el cual se dejó incubar durante 20 minutos en hielo. Las células fueron lavadas con 1 mL de saponina 0.01% y se les agregaron 50 μ L de un anticuerpo secundario contra la IgG de conejo [anti-IgG] marcado con PE, a una dilución 1:400. La mezcla se dejó incubando en hielo por 20 min. Finalmente, las células fueron lavadas con 2 mL de PBS. Para citometría, las células fueron resuspendidas en 300 μ L de PBS y leídas en el citómetro BD LSRFortessa. Para la microscopía confocal, las células fueron adheridas en un cubre objetos, previamente tratado con 100 μ L de poli-L-Lisina [Sigma] al 10%, y montadas con 3 μ L de Vecta-Shield.

VI.- RESULTADOS.

6.1.- Genotipificación de los ratones deficientes de la miosina 1g ($Myo1g^{-/-}$).

Para la genotipificación de las diferentes cepas de ratones; silvestre, $Myo1g^{-/-}$ y OTII, se realizaron diferentes PCR's de punto final como se describió anteriormente en la metodología.

Para la cepa $Myo1g^{-/-}$ utilizando los iniciadores [1.- CTATACTACGACTATACTACAAGAC, y 2.- AGAGAATGAGGCAGTCTAACAAAGCATTGA] nos genera un amplicón de 330 pares de bases (pb), que corresponde al gen sin delección, mientras que el par de iniciadores [1.- CTATACTACGACTATACTACAAGAC y 3.- TGTCCATGTACTTGCCAAAG] nos da un amplicón de 470 pb que corresponde al gen deletado (Fig. 6).

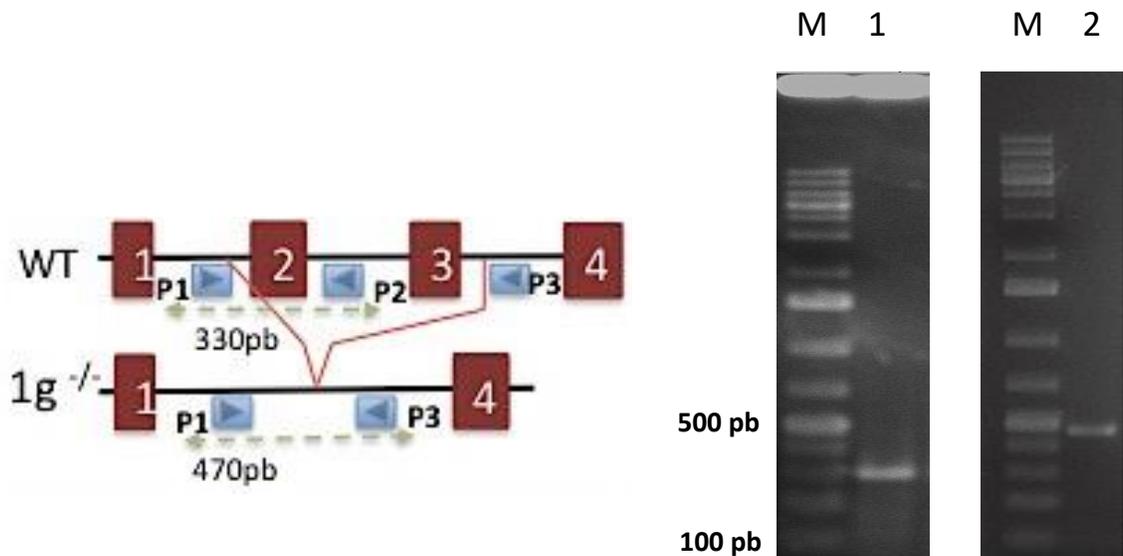


Figura 6.-Genotipificación de los ratones deficientes de la $Myo1g$. Esquema representativo de la alineación de los juegos de primers 1-2 en el gen WT de $Myo1g$ que flanquean al exón dos dando un amplicado de 330 pb [carril 1], y la alineación de los primers 1-3 en el gen $Myo1g^{-/-}$ debido a la pérdida de la secuencia del exón 2 y 3 dando un amplicado de 470 pb [carril 2].

6.2.- Participación de la Myo1g en la internalización del BCR de los linfocitos B.

Para analizar si miosina 1g posee alguna función durante la internalización del BCR se realizó el siguiente experimento; 1×10^6 de células B de ratones silvestres o de ratones que no expresan la Myo1g; en reposo o activadas [LPS + IL-4], fueron mezcladas con el conjugado **B7.6 – OVA**. Para cuantificar la internalización del BCR se realizó la tinción de OVA, a los 30 minutos de exponerlo al conjugado, y fue evaluada por citometría de flujo (sobre la región CD19⁺), y mediante microscopía confocal. Para medir la endocitosis del BCR se usaron dos condiciones, la primera; donde se realizó la tinción de OVA en células que fueron previamente permeabilizadas con saponina al 0.1%, para detectar la cantidad de B7.6 – OVA que se encuentra sobre la superficie de la membrana y dentro de la célula, y la segunda; células que no fueron permeabilizadas, para cuantificar la que yace solo en la superficie, y finalmente se resta el valor de las células con la OVA superficial a las células que fueron permeabilizadas, y poder calcular solo la cantidad de OVA que sólo se encuentra dentro del linfocito B. Partiendo de este principio se muestra por citometría, sobre la región CD19⁺, la cantidad de OVA total en la célula B (Fig.7). Al analizar los datos de OVA dentro del linfocito B, de tres experimentos independientes, las células B silvestres o deficientes de miosina 1g, en condiciones de reposos y activadas, no mostraron diferencia significativa en la captura del antígeno mediante la internalización del BCR (Fig. 8).

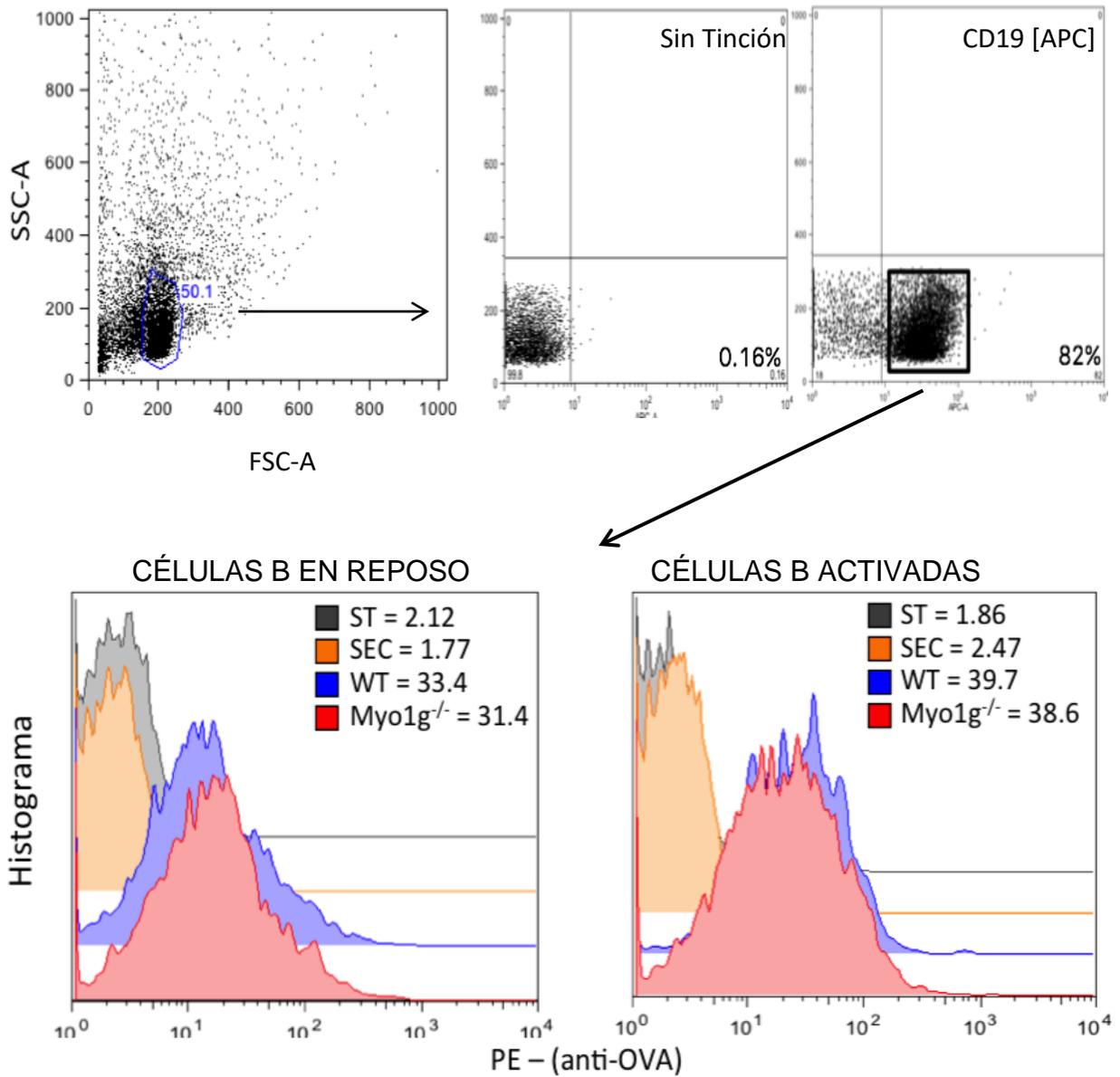
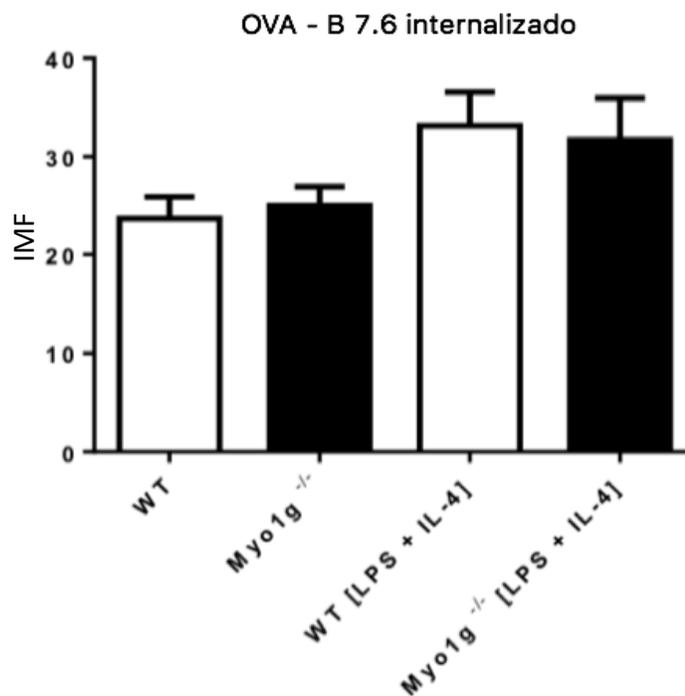
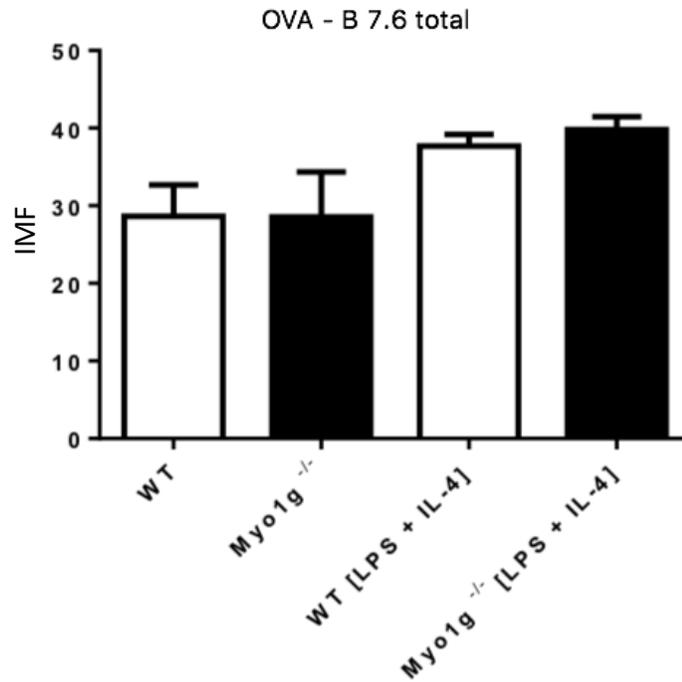


Figura 7.- Medición de la Internalización del BCR mediante citometría de flujo.

Se muestran las células B enriquecidas por panning mediante la tinción de la molécula CD19, y de esta región se midió la cantidad de OVA al interior de linfocitos B de ratones silvestres y linfocitos B de ratones deficientes de la Myo1g mediante la intensidad media de fluorescencia [IMF] del fluoroforo Ficoeritrina [PE]. También se muestra la fluorescencia de los tubos sin tinción [ST] y utilizando solo el anticuerpo secundario [SEC].



n=3

Figura 8.- Análisis por citometría de flujo de la participación de la Myo1g en la internalización del BCR. Después de inducir la internalización del BCR con el conjugado [OVA – B7.6] se determinó que los linfocitos B deficientes de la miosina 1g, en reposo o activadas, no presentan alteración en esta función comparado con las células silvestres [p = 0.9801] [p = 0.6694] respectivamente.

Para confirmar estos datos y poder observar la internalización del BCR de las células WT o deficientes de la Myo1g, en reposo o activadas, se hizo un análisis por microscopía confocal. Las células B incubadas con el conjugado B 7.6 – OVA fueron adheridas a un cubreobjetos recubierto con poli-L-lisina, posteriormente fueron montadas con Vecta-Shield y se visualizaron en el microscopio confocal OLIMPUS. Se pueden apreciar las vesículas internalizadas de los linfocitos B mediante la tinción de OVA en las células WT o deficientes de la Myo1g, en reposo o activadas; así como en las células que no fueron permeabilizadas (Fig.9). Después de hacer el análisis de las imágenes, arrojadas por el microscopio confocal, no se observaron diferencias significativas entre la internalización del BCR, medida por la intensidad media de fluorescencia de los pixeles, de células B WT o deficientes de la miosina 1g, tanto en las condiciones de reposo o activadas con LPS + IL-4 (Fig. 10), tal como nos había mostrado la citometría.

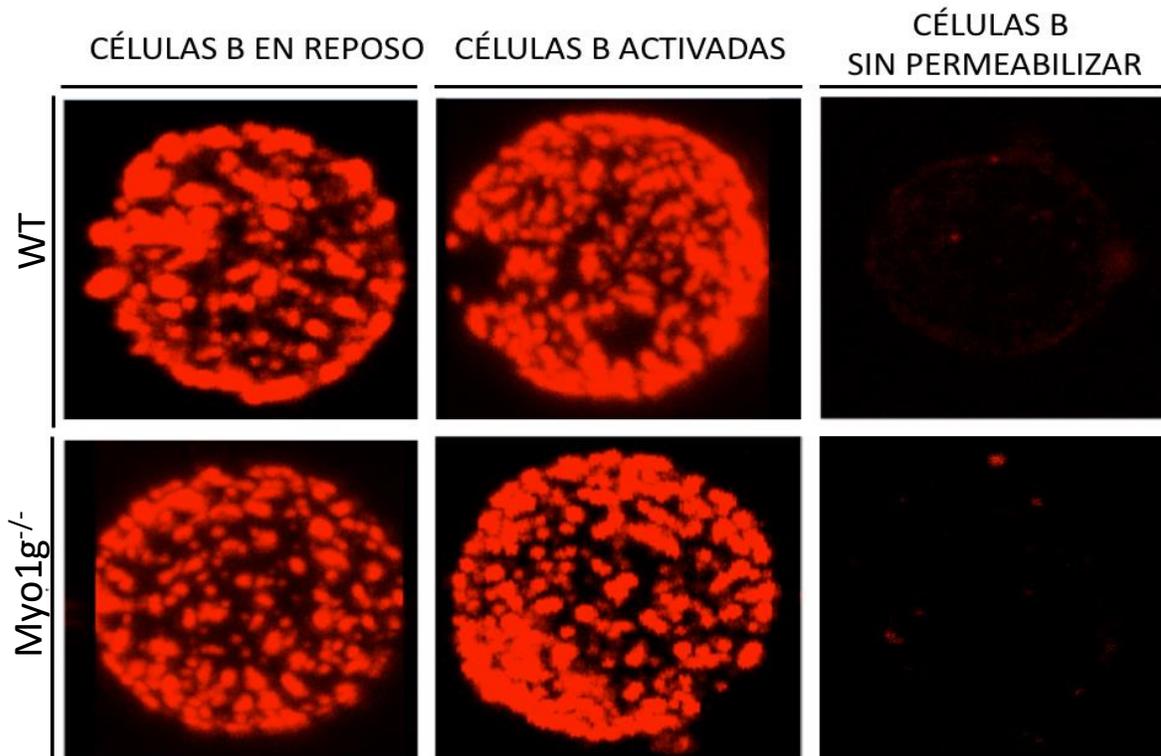


Figura 9.- Medición de la internalización del BCR mediante microscopía confocal. Se muestra la internalización del BCR mediante la tinción de OVA de las células B WT y deficientes de Miosina 1g, en reposos y activadas, así también se muestran las células B sin permeabilizar.

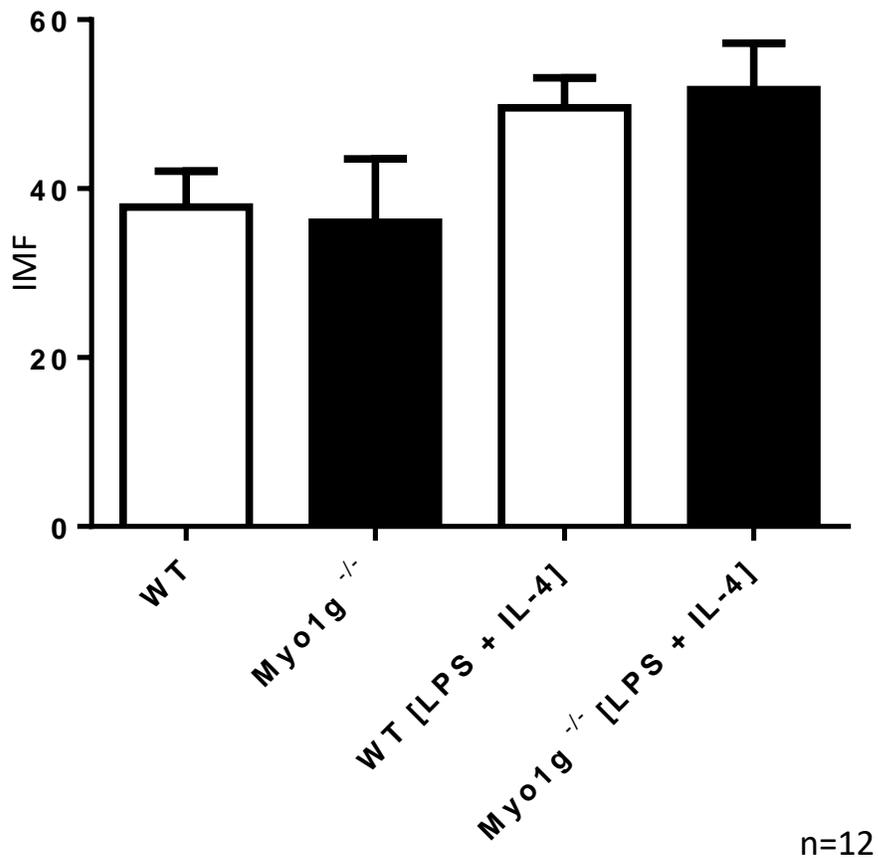


Figura 10.- Análisis de la participación de la Myo1g en la internalización del BCR por microscopía confocal. Se determinó que los linfocitos B deficientes de miosina 1g, en reposo y activados, no presentan defectos en la internalización del BCR comparado con las células silvestres, con un valor de $p = 0.7326$ y $p = 0.6006$ respectivamente.

6.3.- Participación de la Myo1g en la pinocitosis de antígeno por los linfocitos B.

Para ver si la Myo1g participa en la pinocitosis de linfocitos B de ratón, se realizó un experimento donde 1×10^6 células B de bazo, en reposo o activadas [LPS + IL-4], fueron mezcladas con OVA durante 30 minutos. La medición se realizó a través de la tinción de OVA, y fue analizada mediante citometría de flujo (sobre la región CD19⁺) y por microscopía confocal. Al igual que el experimento anterior, donde se utilizó el conjugado, se hicieron las dos condiciones para cuantificar la cantidad neta de OVA dentro del linfocito B. Se pudo observar por citometría de flujo, sobre la región CD19⁺, la cantidad de OVA total en los linfocitos B (Fig. 11). Después de hacer el análisis, mediante la IMF, las células B silvestres o deficientes de miosina 1g, en condiciones de reposo, no mostraron diferencias en la captura de antígeno [fig. 7]; sin embargo, en las células deficientes de miosina 1g, que fueron activadas durante 48 horas con LPS e IL-4, presentaron una mayor capacidad pinocítica comparada con las células silvestres activadas (Fig. 12).

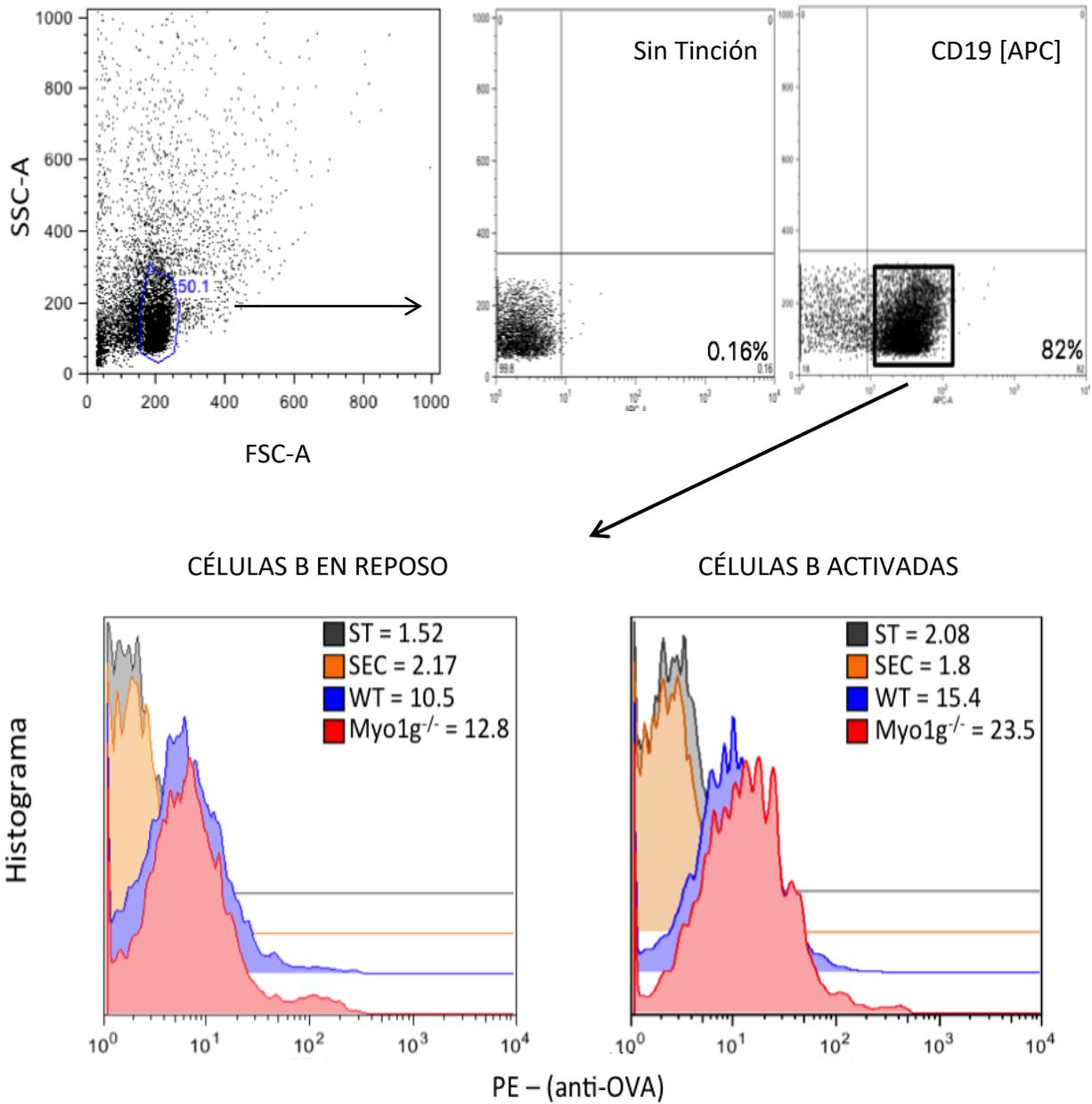


Figura11.- Medición de la pinocitosis de linfocitos B por citometría de flujo. Se muestran las células de la región CD19⁺, de esta región se midió la cantidad de OVA al interior de los linfocitos B silvestres [WT] y Myo1g^{-/-} mediante la intensidad media de fluorescencia [IMF] del fluoroforo PE. También se muestra la fluorescencia de los tubos sin tinción [ST] y utilizando solo el anticuerpo secundario [SEC].

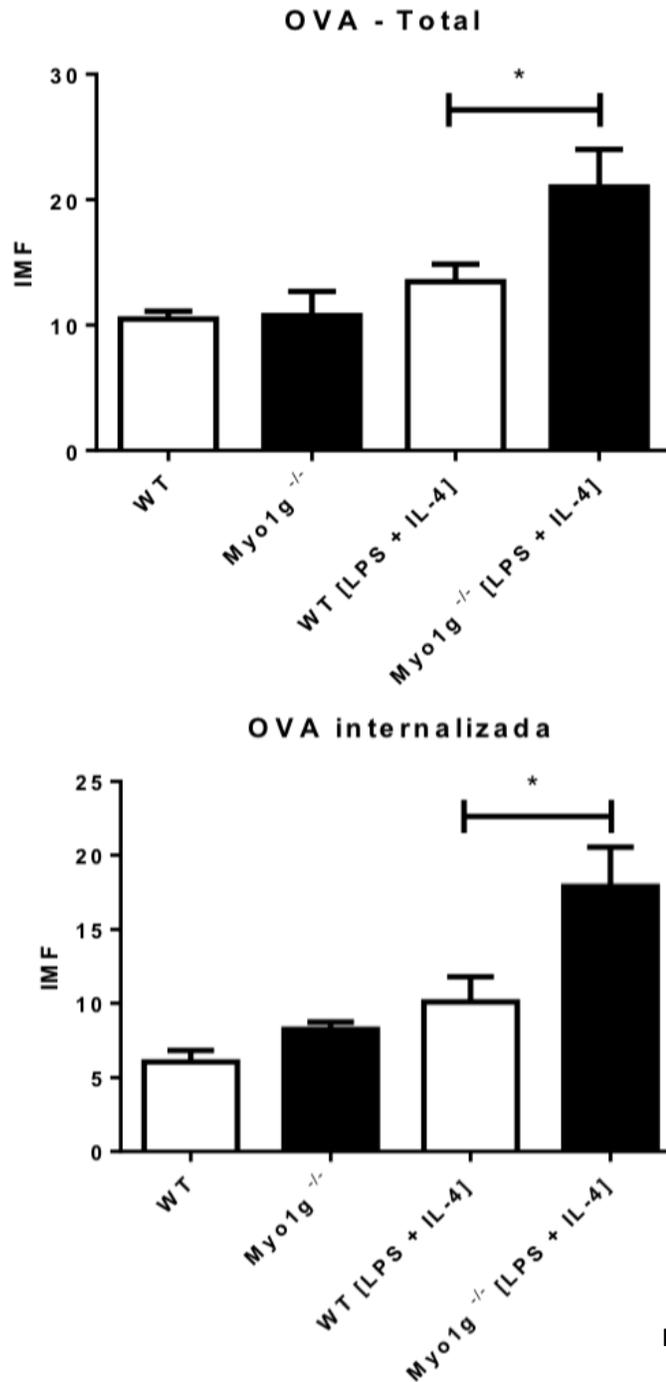


Figura 12.- Análisis por citometría de flujo de la participación de la Myo1g en la pinocitosis del linfocito B. Posterior a la pinocitosis de OVA en los linfocitos B, se determinó que las células deficientes de miosina 1g en reposo no presentan defectos en esta función comparado con las células silvestres [$p = 0.138$]. Sin embargo, al analizar las células activadas, se encontró que los linfocitos B de los ratones deficientes de la Myo1g tienen mayor capacidad pinocítica que las células WT [$p = 0.0128$].

Para confirmar estas observaciones se hizo un análisis por microscopía confocal. Las células B incubadas con OVA fueron adheridas a un cubreobjetos recubierto con poli-L-lisina, posteriormente se montaron con Vecta-Shield y se visualizaron en el microscopio OLIMPUS. Al igual que los datos de citometría, el análisis por microscopía confocal (Fig. 13), no arroja diferencia significativa en la capacidad pinocítica de las células B de los ratones silvestres y de los ratones deficientes de la miosina 1g en la condición de reposo, mientras que las células B deficientes de la miosina 1g, que fueron activadas con LPS + IL-4 tienen una mayor captura de OVA que las células silvestres (Fig.14).

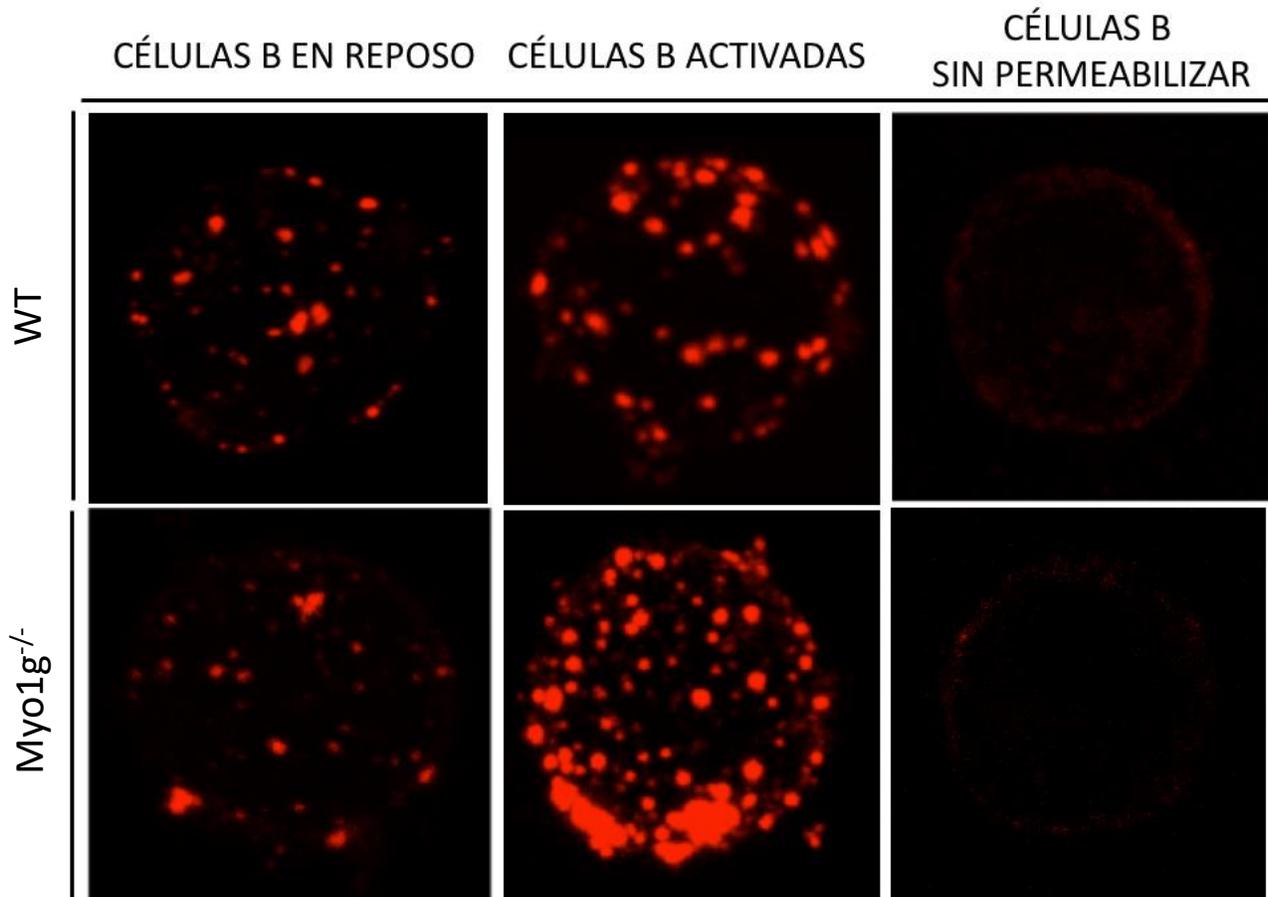


Figura 13.- Pinocitosis de las células B mediante microscopía confocal. Se muestra la pinocitosis mediante la tinción de OVA de las células B deficientes de Miosina 1g y de las permeabilizar.

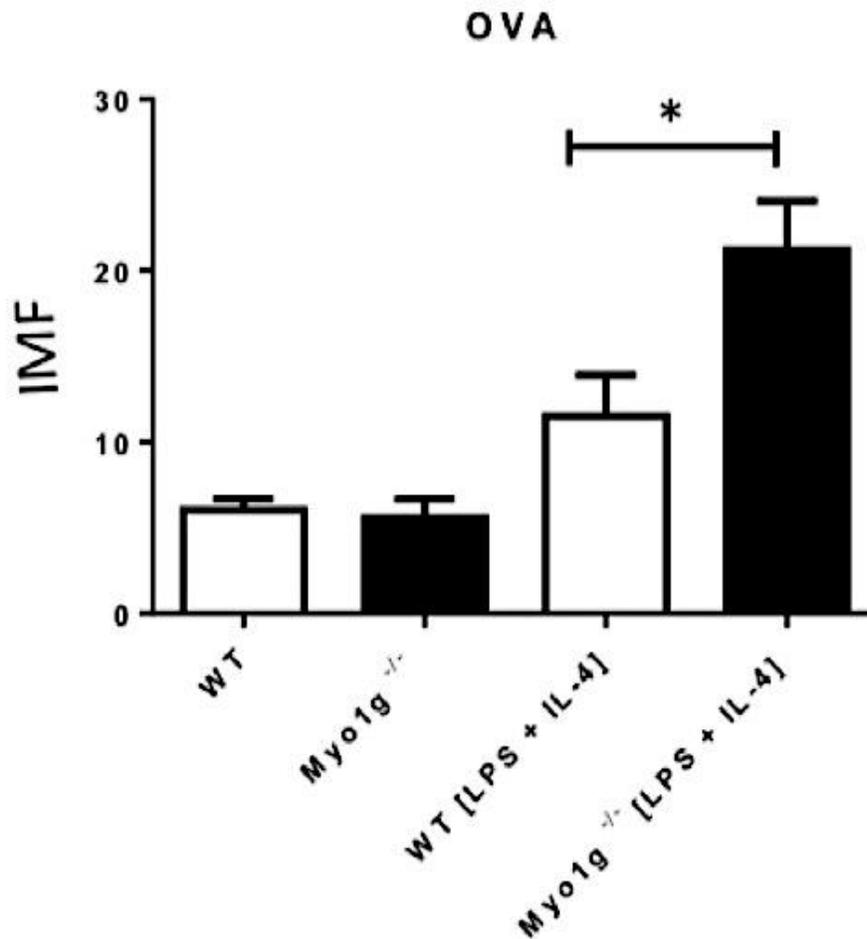


Figura 14.- Análisis de la participación de la Myo1g en la pinocitosis del linfocito B por microscopía confocal. Después de inducir la pinocitosis de OVA en los linfocitos B, se determinó que células deficientes de la miosina 1g en reposo no presentan defectos en esta función comparado con las células silvestres [p = 0.5408]. Sin embargo, al analizar las células activadas se observó que los linfocitos B de los ratones deficientes de la Myo1g tienen mayor capacidad pinocítica que las células WT [p = 0.0106].

Al determinar que los linfocitos B deficientes de la miosina 1g, activados con LPS e IL-4, presentan una mayor capacidad pinocítica comparada con las células silvestres (Fig.9), se analizaron las vesículas, de las imágenes de confocal, contando su número y la IMF en cada célula (Fig.15).

Se analizó el número de vesículas dentro de los linfocitos B WT y los deficientes de miosina 1g, observando que las células sin esta proteína motora tienen mayor número de pinosoma (Fig.16). Así mismo, se cuantificó la IMF de las vesículas, encontrando que el linfocito B deficiente de miosina 1g tiene una mayor cantidad de fluorescencia, comparado con las células B de ratones silvestres (Fig. 16). Esto nos podría indicar que las células B, sin la Myo1g, capturan la OVA mucho más rápido, y que el tamaño del pinosoma quizá es de mayor tamaño.

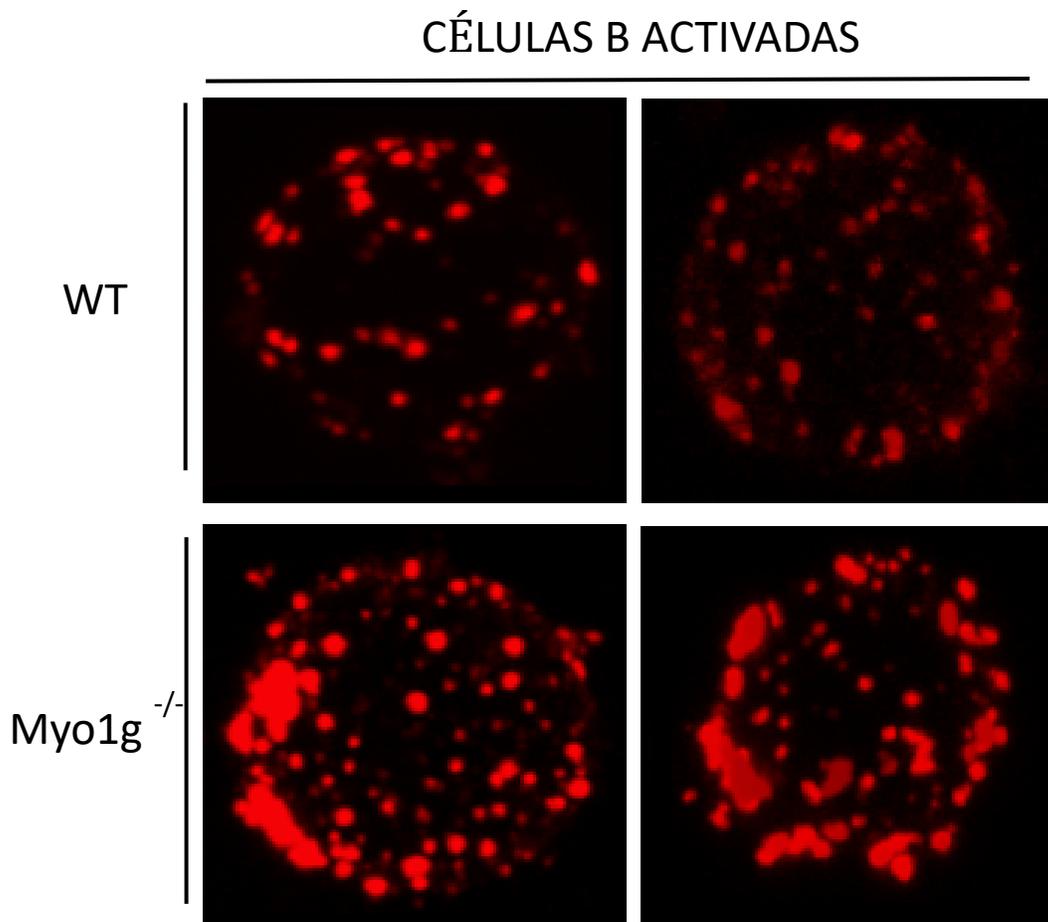


Figura 15.- Análisis de las vesículas pinocíticas de los linfocitos B WT y Myo1g^{-/-}. Se muestra el análisis de vesículas pinocíticas de células B activadas [LPS + IL-4] en los ratones deficientes de la miosina 1g y en los ratones silvestres.

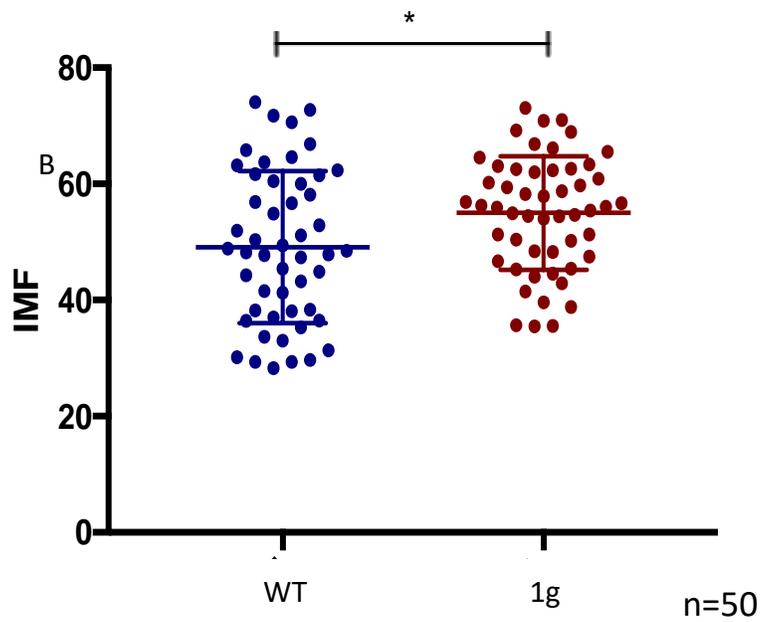
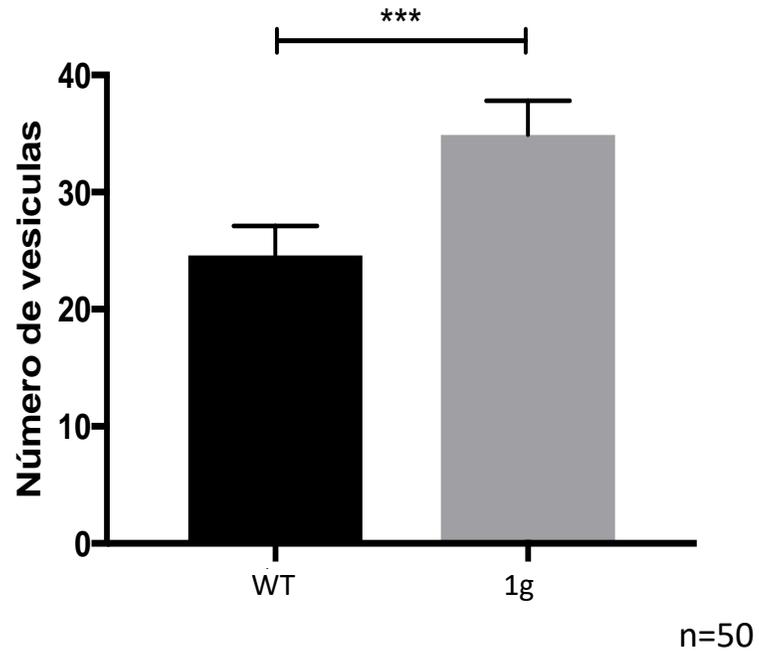


Figura 16.- Análisis de las vesículas pinocíticas de los linfocitos B activados. Análisis de la IMF [A] y número de las vesículas [B] en los linfocitos B activados incubados con OVA durante 30 min.

6.4.- Cinética de la pinocitosis de la ovoalbúmina por los linfocitos B de los ratones deficientes de la miosina 1g.

Después de analizar los resultados previos, y con el objetivo de continuar evaluando el incremento que observamos en la pinocitosis por las células B de los ratones deficientes de la miosina 1g, se procedió a realizar una cinética de la pinocitosis de la OVA a diferentes concentraciones. Las células B de los ratones deficientes de la miosina 1g, y las células B de los ratones silvestres, que fueron previamente activadas durante 48 horas (LPS + IL-4), se incubaron con 5, 0.5 y 0.05 microgramos de OVA. Las células se cosecharon a los 15, 30 y 60 minutos para evaluar la OVA que fue pinocitada mediante la tinción con el anticuerpo anti-OVA como fue descrito anteriormente. Las células se analizaron por citometría de flujo (sobre la región CD19⁺). Se observó, como se había determinado anteriormente, que las células B de ratones deficientes de la miosina 1g, capturan mayor cantidad de antígeno por pinocitosis comparada con las células B de ratones silvestres (Fig 17). Los mismo resultados de esta cinética fueron validados mediante microscopía confocal, donde se observa claramente el incremento de la pinocitosis de la ovoalbúmina por las células B de los ratones deficientes de la miosina 1g (Fig. 18).

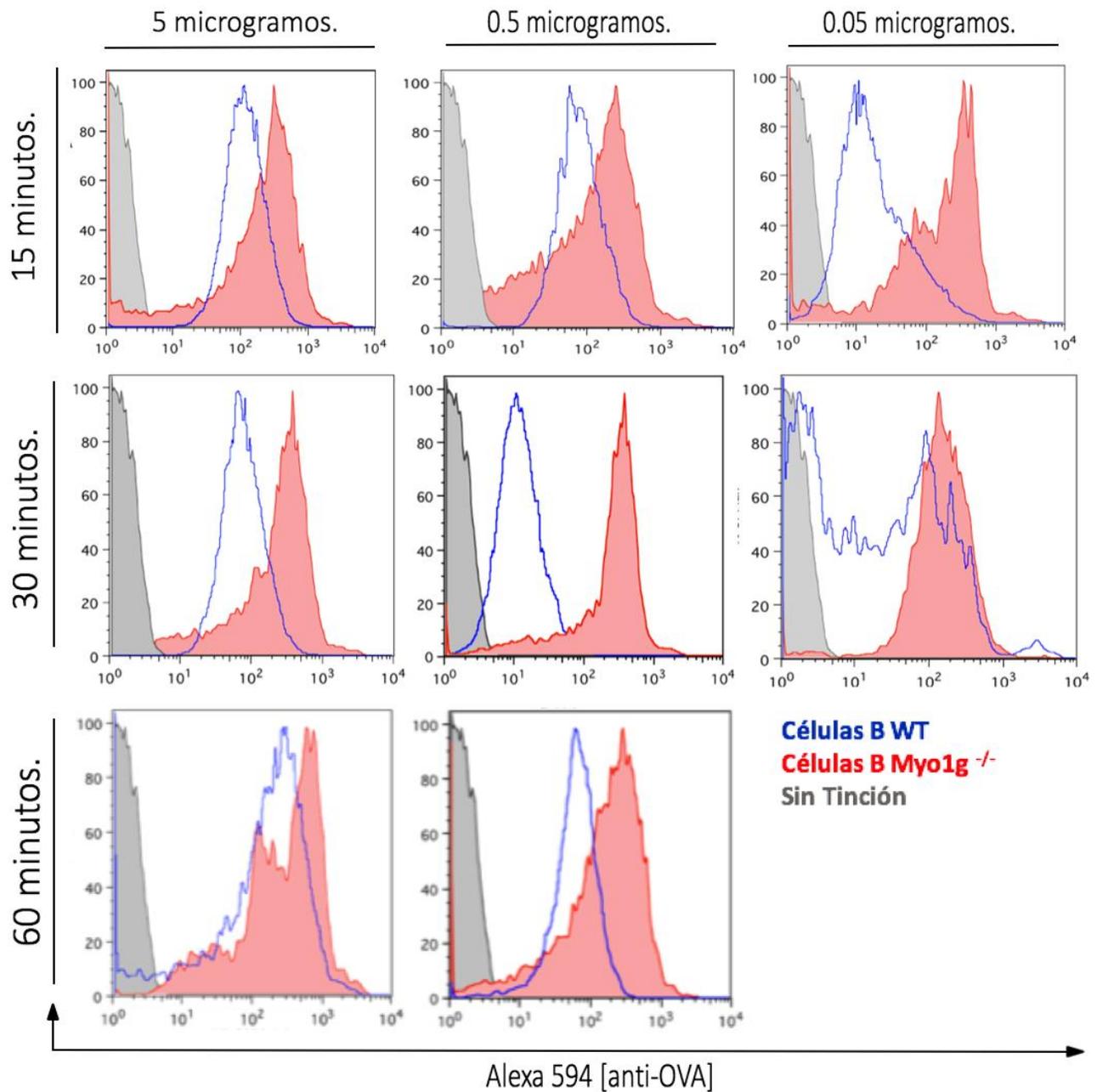


Figura 17.- Cinética de la pinocitosis de OVA por los linfocitos B de los ratones deficientes de la miosina 1g mediante citometría de flujo. Se muestra la pinocitosis de la OVA, mediante citometría de flujo, por los linfocitos B de ratones deficientes de miosina 1g, comparada con la de los linfocitos B de ratones silvestres.

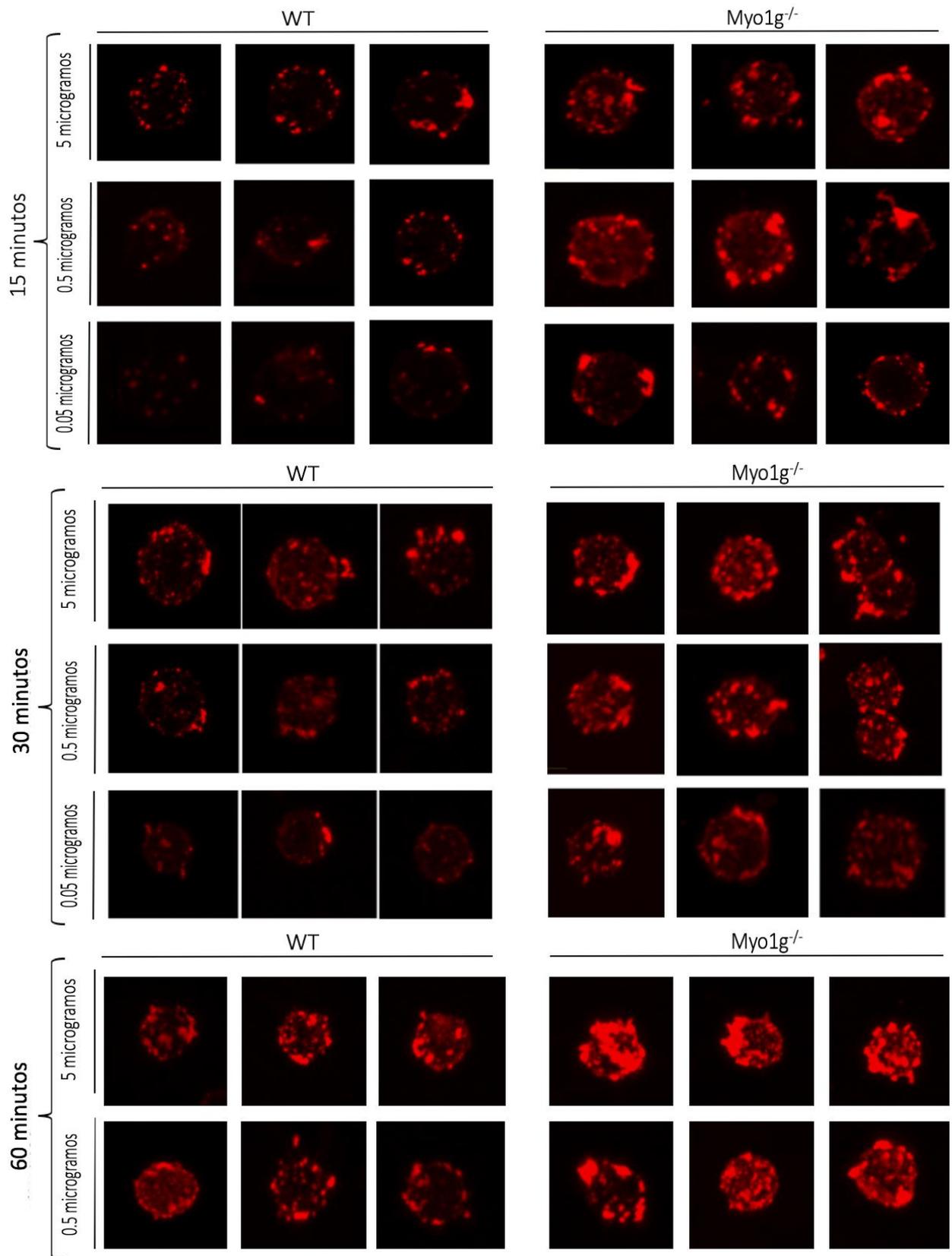


Figura 18.- Cinética de la pinocitosis de OVA por los linfocitos B de los ratones deficientes de la miosina 1g mediante microscopía confocal. Se muestra la pinocitosis de la OVA, mediante microscopía confocal, por los linfocitos B de ratones deficientes de miosina 1g, comparada con la de los linfocitos B de ratones silvestres.

VII.- DISCUSIÓN.

Las miosinas son proteínas motoras presentes en las células, utilizan la hidrólisis del ATP para desplazarse sobre los filamentos de actina. Dentro de esta familia de miosinas se encuentran las miosinas de clase I, las cuales se expresan ampliamente en las células hematopoyéticas. Hasta la fecha se conocen ocho miembros de esta familia, MyoIa, Ib, Ic, Id, Ie, If, Ig y Ih. La MyoIg es una miosina de cola corta que se expresa abundantemente en células B y T; sin embargo, se sabe poco acerca de la función que realizan estas proteínas.

La miosina Ig ha sido estudiada tanto en líneas celulares y en células primarias, describiendo su principal función, el mantenimiento de la tensión de la membrana plasmática, donde sirve como puente entre el citoesqueleto de actina y la membrana plasmática. Este concepto se originó debido a que su localización es principalmente en la membrana plasmática. Su deficiencia aumenta la elasticidad membranal de las células Jurkat [35]. Además de esto, también se ha reportado que la MyoIg se une a la membrana plasmática a través de su dominio TH1 [33].

En este estudio nos preguntamos cómo se encontraba la captura antigénica de linfocitos B deficientes de MoIg, para ello medimos la internalización del BCR y la capacidad pinocítica de estas células. Al analizar la internalización del BCR mediante el uso de un anti-BCR acoplado a OVA [B 7.6 – OVA] encontramos que las células B, en reposo o activadas con LPS + IL-4, silvestres o deficientes de la MyoIg no presentaban diferencias significativas en este fenómeno. Los resultados obtenidos eran de esperarse, ya que se sabe que la disminución de la tensión de membrana correlaciona con una mayor capacidad endocítica, sin embargo, se ha reportado que los linfocitos B después de ser tratados con anti-BCR (como en nuestro experimento),

incrementa la rigidez de la membrana, llevándonos a recuperar la tensión membranal. De la misma manera, se sabe que un incremento en la tensión de la membrana inhibe el desarrollo de protuberancias membranales durante el “spreading” en fibroblastos [Gauthier et al., 2011]. Teniendo esto en cuenta, se ha medido el “spreading” en células B deficientes de la Myo1g sobre placas recubiertas con anti-BCR y no se ha encontrado una diferencia respecto a las células silvestres [37]. Esto confirma que la internalización del BCR no es dependiente de la tensión de membrana, o que tras el estímulo del receptor, el linfocito B recupera la rigidez en la membrana.

Por otra parte, también se analizó la participación de la Myo1g durante la pinocitosis del linfocito B. La pinocitosis se describe como una forma de endocitosis a gran escala, este proceso morfológico es dependiente de la actina. En este estudio evaluamos la capacidad pinocítica de las células B deficientes de la Myo1g, en las células en reposo se observó que no existía diferencias comparado con las células silvestres. Sin embargo, cuando las células B fueron estimuladas con LPS + IL-4, promoviendo una mayor captura antigénica, se observó que las células deficientes de Myo1g contenían mucha más cantidad de OVA en su interior. La fagocitosis, al igual que la pinocitosis, es también un proceso que depende de la polimerización de actina. Al igual que nuestros resultados, existen datos donde se mide la fagocitosis de *S. aureus* – FITC y de microperlas fluorescentes de poliestireno, donde los linfocitos B murinos del bazo o del peritoneo, deficientes de la miosina 1g, tienen mayor capacidad fagocítica comparada con las células B silvestres [23]. Estas observaciones nos dicen que la fagocitosis es un proceso que dependen de la tensión de membrana, con lo cual podemos concluir que la pinocitosis de las células B también depende de la rigidez de la membrana de la célula y al disminuir este parámetro se observa una mayor captura del antígeno soluble.

Para hacer un análisis más detallado de las células B deficientes de la miosina 1g, las cuales se observaron que ingieren más antígeno, se analizó el número de vesículas y la IMF de ellas. Como se observó en la figura 16, las células B de los ratones deficientes de la miosina 1g tienen un mayor número de pinosomas, también se observa una mayor IMF. Estos resultados nos indicarían, que las células B provenientes de los ratones deficientes de la miosina 1g ingieren más rápido y quizá el pinosoma puede ser un poco más grande, al ingerir al antígeno OVA,

Para continuar evaluando la pinocitosis por los linfocitos B, se realizó una cinética, esto con el objetivo de observar si el incremento en la ingesta del antígeno por las células B deficientes de la miosina 1g, comparada con las células B de los ratones silvestres, se mantenía como en los resultados previos. Tal como esperábamos, al analizar la pinocitosis de ovoalbúmina, mediante citometría de flujo y por microscopía confocal, pudimos ver claramente que las células B de los ratones deficientes de la miosina 1g ingieren mayor cantidad de antígeno soluble, desde los 15, 30 y 60 minutos, a diferentes concentraciones de ovoalbúmina.

VIII.- CONCLUSIÓN.

- La internalización del Receptor de Células B no se ve afectada con la ausencia de la miosina 1g.
- La pinocitosis de moléculas solubles por las células B se incrementa cuando la miosina 1g no está presente.

IX.- PERSPECTIVAS.

- Realizar tinciones para observar si la miosina 1g colocaliza a los sitios donde están pinocitando los linfocitos B.
- Realizar ensayos de presentación antigénica para evaluar si la miosina 1g está involucrada en esta función en los linfocitos B.

X.- REFERENCIAS.

1.- Michael Dustin. (2002). The immunological synapse. *Arthritis Research and Therapy*. 4; 119-125.

2.- Balbino Alarcón, David Mestre and Nuria Martín. (2011). The immunological synapse: a cause or consequence of T-cell receptor triggering. *Immunology*, 133; 420-425.

3.- Maria-Isabel Yuseff, Paolo Pierobon, Anne Reversat and Ana-Maria Lennon-Duménil. (2013). How B cells capture, process and present antigens: a crucial role for cell polarity

4.- Naomi E Harwood and Facundo D Batista. (2010). Antigen presentation to B cells. *Biology Reports* 2010, 2:87

5.- Xinjian Chen and Peter E. Jensen. (2008). The role of B lymphocytes as antigen-presenting cells. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 56, 77–83

6.- Parker D. C. (1993): T cell-dependent B cell activation. *Annu. Rev. Immunol.*, 11, 331–360.

7.- Bertrand, F. E. et al. (2000). Microenvironmental influences on human B-cell development. *Immunol. Rev.* 175, 175–186.

8.- von Andrian, U. H. & Mempel, T. R. (2003). Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nature Rev. Immunol.* 3, 867–878.

9.- Batista, F. D., Iber, D. & Neuberger, M. S. (2001). B cells acquire antigen from target cells after synapse formation. *Nature* 411, 489–494.

10.- Carrasco, Y. R. & Batista, F. D. (2007). B cells acquire particulate antigen in a macrophage-rich area at the boundary between the follicle and the subcapsular sinus of the lymph node. *Immunity* 27, 160–171.

11.- Suzuki, K., Grigороva, I., Phan, T. G., Kelly, L. M. & Cyster, J. G. (2009). Visualizing B cell capture of cognate antigen from follicular dendritic cells. *J. Exp. Med.* 206, 1485–1493.

12.- Cocucci, E., Aguet, F., Boulant, S., & Kirchhausen, T. (2012). The first five seconds in the life of a clathrin-coated pit. *Cell*, 150(3), 495-507.

13.- Jung, N., & Haucke, V. (2007). Clathrin-mediated endocytosis at synapses. *Traffic*, 8(9), 1129-1136.

14.- Ford, M. G., Mills, I. G., Peter, B. J., Vallis, Y., Praefcke, G. J., Evans, P. R.,

& McMahon, H. T. (2002). Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature*, 419(6905), 361- 366.

15.- Carrasco YR, Batista FD. (2007). B cells acquire particulate antigen in a macrophage-rich area at the boundary between the follicle and the subcapsular sinus of the lymph node. *Immunity*; 27:160–171.

16.- Spencer A. Freeman Sergio Grinstein. (2014). Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. *Immunological Reviews* 0105-2896

17.- Damke H, Baba T, van der Bliek AM, Schmid SL. (1995). Clathrin-independent pinocytosis is induced in cells overexpressing a temperature-sensitive mutant of dynamin. *J Cell Biol*; 131: 69–80.

18.- Jet Phey Lim and Paul A Gleeson. (2011). Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunology and Cell Biology*, 89, 836–843

19.- Lewis WH.(1991). Pinocytosis. *John Hopkins Hosp Bull*; 49: 17–27.

20.- Haigler HT, McKanna JA, Cohen S. (1979). Rapid stimulation of pinocytosis in human carcinoma cells A-431 by epidermal growth factor. *J Cell Biol*; 83: 82–90.

21.- Arnau S. Pedrós, Xavier G. Bové, et al. (2014). Evolution and Classification

of Myosins, a Eukaryotic Whole-Genome Approach. *Genome Biol. Evol.*, 6, 290-305.

22.- Katy C. Liu y Richard E. cheney. (2012). Myosins in Cell Junctions.

23.- José L. Maravillas and Leopoldo S. Argumedo. (2012). The myosin family: unconventional roles of actin-dependent molecular motors in immune cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 91, 35-46.

24.- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. (2000). *Molecular Cell Biology*. New York, WH Freeman, 4th edition.

25.- Mira Krendel, Mark S. Mooseker. (2005). Myosins: Tails (and Heads) of Functional Diversity. *Physiology*, 20, 239-251.

26.- James R Sellers. (2000). Myosins: a diverse superfamily. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1496, 1, 3-22.

27.- <http://es.slideshare.net/citoesqueleto>.

28.- Barbara Barylko, Derk D. Binns, Joseph P. Albanesi. (2000). Regulation of the enzymatic and motor activities of myosin I. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1496, 1, 23-35.

29.- Berg J. S., Powell B. C., Cheney R. E. (2001). A millennial myosin census. *Mol. Biol. Cell*. 12, 780-794.

30.- Russell E, McConnell Matthew J, Tyska. (2010). Leveraging the membrane – cytoskeleton interface with myosin-1. Department of Cell and Developmental Biology, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN 37205, USA. [Volume 20, Issue 7](#), p418–426.

31.- Heng TS, Painter MW. The Immunological Genome Project. (2008). Networks of gene expression in immune cells. *Nat Immunol*.9:1091–1094.

32.mhttp://symatlas.gnf.org/SymAtlas/symcard?type=Expression&chartType=&oid=40519166&dataset=Mouse+GeneAtlas+GNF1M,+gcRMA&reporter=gnf1m07830_a_at

33.- Dart AE, Tollis S, Bright MD, Frankel G, Endres RG. (2012). The motor protein myosin 1G functions in FcγR-mediated phagocytosis. *J Cell Sci*. 125; 6020–6029.

34.- Patino-Lopez G, Aravind L, Dong X, Kruhlak MJ, Ostap EM, Shaw S. (2010). Myosin 1G is an abundant class I myosin in lymphocytes whose localization at the plasma membrane depends on its ancient divergent pleckstrin homology (PH) domain (Myo1PH). *J Biol Chem*. 285:8675–8686.

35.- Olety B, Walte M, Honnert U, Schillers H, Bahler M. (2010). Myosin 1G (Myo1G) is a haematopoietic specific myosin that localises to the plasma membrane and regulates cell elasticity. *FEBS Lett*. 584:493–499.

36.- O. Lopez-Ortega, E. Ovalle-Garcia, Ortega-Blake, A. Antillo, B. Chavez-Munguia, G. Patiño Lopez, R. Fragoso-Soriano and L. Santos-Argumedo. (2016) Myo1g Is An Active Player in Maintaining Cell Stiffness in B-Lymphocytes. *Cytoskeleton*, May 2016 73:258–268.

37.- Linkermann A, Gelhaus C, Lettau M, Qian J, Kabelitz D, Janssen O. (2009). Identification of interaction partners for individual SH3 domains of Fas

ligand associated members of the PCH protein family in T lymphocytes.
Biochim Biophys Acta. 1794:168–176.