

11621
19



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN

ESTABLECIMIENTO DE UN CULTIVO DE
ENTEROCITOS DE CONEJO COMO MODELO PARA
ESTUDIAR LOS EFECTOS DE *Escherichia coli*
ENTEROPATOGENA SOBRE EL CITOESQUELETO.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
PRESENTA:

VALENTÍN DE LA CRUZ TORRES

ASESOR: Dr. CARLOS GERARDO GARCÍA TOVAR
COASESOR: Dr. JOSÉ MANUEL HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

CUAUTILÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO

2003

1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.



ESTADOS UNIDOS MEXICANOS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

C. M. A. S. A.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijara,
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlan

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Establecimiento de un cultivo primario de enterococos de conejo como modelo para estudiar los efectos de Eucherichia coli enteropatógena sobre el citoesqueleto.

que presenta al pasante: Valentín de la Cruz Torres
con número de cuenta: 94510311-7 para obtener el título de:
Médico Veterinario Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlan Izcalli, Méx. a 19 de Junio de 2003

PRESIDENTE

Dr. Jorge Tórtora Pérez

VOCAL

Dr. Carlos Gerardo García Tovar

SECRETARIO

Dr. Guillermo Valdivia Anda

PRIMER SUPLENTE

M.C. H. Alejandro Martínez Rodríguez

SEGUNDO SUPLENTE

M.C. Maricruz García López

Este trabajo se realizó con el apoyo de:

Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIT): Proyecto "Análisis de proteínas relacionadas a los rearrreglos del citoesqueleto de actina durante la infección de *Escherichia coli* enteropatógena" (IN202301) y Cátedra de Investigación "Morfología Veterinaria y Biología Celular" (5.13). Sección de Ciencias Morfológicas Agropecuarias, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, U.N.A.M.

Laboratorio 19-A, Departamento de Biología Celular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, I.P.N.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DEDICATORIAS

A mis padres Carlos De La Cruz e Isabel Torres, mi tía Esperanza Torres, a mis hermanos Carlos y Guillermo.

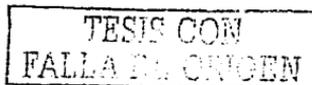
A la Familia Torres.

A Mariana González y a la Sra. Alejandra Rosales

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, U.N.A.M.

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N.

Y a la Sociedad Mexicana



AGRADECIMIENTOS

Dr. Carlos Gerardo García Tovar. Por mostrarme esta puerta a la investigación, brindarme la oportunidad de trabajar en el laboratorio y por confiar en mí al desarrollar este tema. Por su amistad, su apoyo y por su calidad como ser humano.

Dr. José Manuel Hernández Hernández. Por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme dar el primer paso en este fascinante mundo de la ciencia y la investigación. Por su gentileza, su amistad y su gran lado humano como persona.

M.C. Janneth Peralta Ramírez. Por su asesoría brindada para la realización de este trabajo. Por su paciencia, comprensión y tiempo dedicados a enseñarme y entrenarme en estos menesteres, y por brindarme su sincera amistad.

Dr. Fernando Navarro García. Por su apoyo e instrucción en la realización de este trabajo.

M. C. Armando Pérez Rangel. Por su apoyo técnico en el presente trabajo. Por su sincera y grata amistad, y por su gran lado humano.

Dra. María de Lourdes Juárez Mosqueda. Por el apoyo para realizar este trabajo en la parte de microscopía electrónica.

Biol. José Luna Muñoz. Por su colaboración en la parte correspondiente de microscopía confocal.

M.C. Carlos Ignacio Soto Zarate. Por su valiosa ayuda para realizar este trabajo en la parte de microscopía de fluorescencia. Por su apoyo, tiempo y amistad.

MVZ. Germán Garrido Fariña. Por el apoyo técnico en la elaboración del material para la parte de histología.

IBQ. Araceli Castillo Romero. Por su apoyo y gran amistad.

Armando Sánchez. Por su apoyo técnico en el presente trabajo. Y por su amable amistad.

Fortunato Mote Rodríguez. Por su apoyo técnico en el presente trabajo. Y por su agradable amistad.

Por su asesoría, grata compañía y amistad a mis otros compañeros de laboratorio Hilda Karina Ramírez, Tonatiuh Ayala, Carmen Ramírez, Gustavo Basurto y Rubén Oliver.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
Morfofisiología del Intestino Delgado.....	1
<i>Escherichia coli</i> enteropatógena.....	3
Mecanismo de Patogenia.....	3
Sistemas de Secreción Bacterianos.....	5
Citoesqueleto.....	6
Filamentos de Actina y Células Epiteliales de Intestino Delgado.....	6
Cultivo Celular.....	8
JUSTIFICACIÓN.....	8
OBJETIVOS.....	10
Objetivo General.....	10
Objetivos Específicos.....	10
MATERIALES Y METODOS.....	11
Aislamiento y Cultivo de Enterocitos.....	11
Cultivo de REPEC.....	11
Interacción de REPEC con los Enterocitos.....	11
Inmunofluorescencia.....	12
Microscopia Electrónica.....	12
RESULTADOS.....	13
Cultivo de Enterocitos.....	13
Efecto de REPEC sobre el Citoesqueleto.....	14
Microscopia Confocal.....	14
Microscopia Electrónica de Transmisión.....	23
DISCUSIÓN.....	24
CONCLUSIONES.....	26
BIBLIOGRAFÍA.....	27

INTRODUCCIÓN

Morfofisiología del Intestino Delgado

El intestino delgado es un órgano tubular que se extiende desde el píloro gástrico hasta el orificio ileal donde comienza el intestino grueso. El intestino delgado se divide en tres segmentos anatómicos: duodeno, yeyuno e ileon. El duodeno es la primera parte y es la más corta, seguido del yeyuno y finalmente el ileon (10).

El intestino delgado es el principal sitio de digestión de los alimentos y de la absorción de sus productos. El quimo que proviene del estómago es recibido en el duodeno, donde también llegan las enzimas del páncreas y la bilis del hígado, para continuar con los procesos de solubilización y digestión. Contribuyen con el proceso digestivo las enzimas localizadas en el glucocáliz de las microvellosidades de los enterocitos, en particular las sacaridasas y las dipeptidasas, pues completan la degradación de la mayor parte de los azúcares y las proteínas a monosacáridos y aminoácidos, respectivamente, que luego son absorbidos. También son absorbidos el agua y los electrólitos que llegan al intestino delgado con el quimo y las secreciones pancreáticas y hepáticas, en particular en la porción distal del intestino delgado. Las vellosidades son proyecciones digitiformes de la mucosa, que se extienden a la luz intestinal y las criptas intestinales son invaginaciones de la misma. Las microvellosidades son proyecciones de la membrana plasmática que proporcionan una amplificación de la superficie de contacto luminal. Cada célula posee varios miles de microvellosidades densamente agrupadas. Son visibles con el microscopio óptico y confieren a la región apical de la célula un aspecto estriado, denominado chapa estriada (10, 28).

Histológicamente la mucosa intestinal se compone de varios estratos: La túnica mucosa que comprende el epitelio simple columnar con exocinocitos calciformes intercalados, la lámina propia y la muscular de la mucosa, profundamente a la mucosa está la submucosa, después la muscular y externamente la serosa (Fig. 1) (10, 28).

Las células maduras del epitelio se encuentran en la superficie de las vellosidades e incluyen a los epitelocitos columnares villosos (enterocitos) y a los exocinocitos calciformes, y en el fondo se encuentran las criptas intestinales (de Lieberkuhn), exocinocitos con gránulos acidófilos (células de Paneth), endocinocitos gastrointestinales y las células M. Los enterocitos se encargan del transporte de sustancias desde la luz intestinal hacia los capilares del sistema vascular. Los enterocitos presentan complejos de unión entre ellos, con los exocinocitos calciformes y los endocinocitos gastroentéricos. Los exocinocitos calciformes se encuentran entremezclados con las demás células del epitelio intestinal. Estas células producen moco, almacenado en la célula como gránulos de mucínogeno y al microscopio este espacio se ve vacío al teñir con H-E. En microscopia electrónica de transmisión se revela la presencia de una gran acumulación de gránulos de mucínogeno en el citoplasma apical, que distiende el ápice de la célula y distorsiona la forma de las células vecinas. Los exocinocitos con gránulos acidófilos se encuentran en la base de las glándulas mucosas, estas células contienen gránulos de secreción apicales que contienen lisozima, glucoproteínas, arginina y zinc. Los productos de secreción de estas células tienen acción antibacteriana, que junto con su actividad

1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

fagocitaria de determinadas bacterias y protozoarios, sugieren una función reguladora de la flora bacteriana normal del intestino delgado. Los endocrinocitos gastrointestinales se encuentran en la porción inferior de las criptas intestinales, pero migran lentamente y se pueden encontrar en todos los niveles de las vellosidades. Estas células se encargan de la secreción hormonal para regular la fisiología gastrointestinal. Las células M representan una parte funcional del tejido linfóide asociado a la mucosa (Fig. 2) (10, 28).

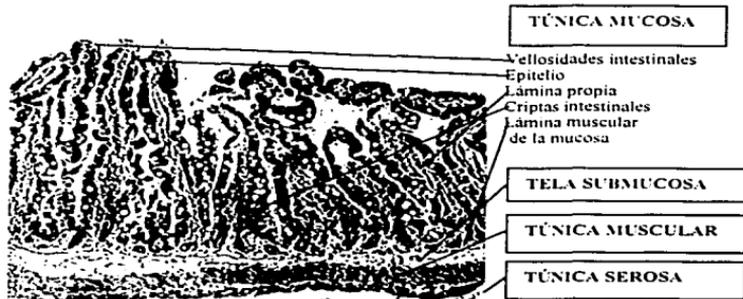


Fig. 1 Corte histológico de intestino delgado de conejo con tinción H-E visto en microscopio de luz (20X). Se indican los estratos histológicos de la pared intestinal.

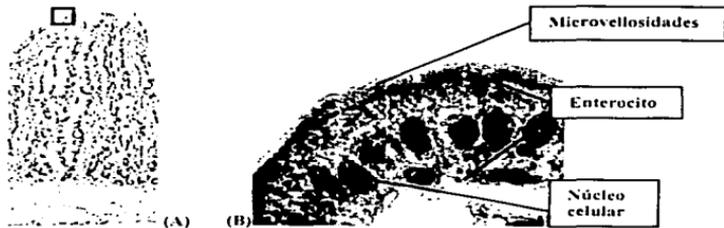


Fig. 2 A. Corte histológico de intestino delgado de conejo, teñido con H-E y visto en el microscopio de luz (20X). B. Campo observado a mayor aumento (100X) de la zona indicada en el panel A, mostrando a los enterocitos con su característica morfología de célula columnar con microvellosidades.

***Escherichia coli* enteropatógena**

Escherichia coli es una bacteria Gram-negativa y pertenece al grupo de las enterobacterias. Existen 5 patotipos de *E. coli* asociados a enfermedades diarreicas: *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) y *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC). Basado en estudios epidemiológicos se ha encontrado un sexto patotipo nombrado *Escherichia coli* de adherencia difusa (DAEC), que aun no esta bien estudiada como las otras (3).

En general *Escherichia coli* es un importante patógeno de los humanos y de los animales (30). Afecta al ganado bovino, cerdos, aves, conejos (25, 13), perros (20), y posiblemente también pollos pequeños (16). Además, la colibacilosis está considerada dentro de la lista de zoonosis de la FAO (Food and Agriculture Organization) (11).

Escherichia coli enteropatógena (EPEC) es una de las causas principales de diarrea infantil en el mundo (26). Además de diarrea profusa cursa con bajo grado de fiebre y vómito (13). En promedio, la edad de distribución en niños es de 6 meses a 2 años. EPEC puede ser aislada de individuos sanos y enfermos. La vía de transmisión es fecal-oral por manos contaminadas, alimentos o fomites contaminados que sirven como vehículos. En pacientes sintomáticos, EPEC puede ser aislada de heces dos semanas después de terminar los síntomas.

Es más común en países en vías de desarrollo y en países industrializados disminuye su frecuencia (31). En Estados Unidos y el Reino Unido esta bacteria causa frecuentes brotes de diarrea en niños. En los hospitales se presenta en brotes con una mortalidad de hasta el 50%. De hecho, brotes explosivos de diarrea por EPEC han sido reportados en las últimas dos décadas en Estados Unidos, Reino Unido, Finlandia, y otros países. En contraste, en países en desarrollo EPEC es la mayor causa de diarrea, con mayor frecuencia en niños de 6 meses de edad. Estudios en Brasil, México y Sudáfrica muestran que del 30-40% de las diarreas infantiles son atribuibles a EPEC (22).

EPEC es específica de humanos, de igual modo existen cepas patógenas para otras especies, como es la *Escherichia coli* enteropatógena de conejos (REPEC) que infecta a estos animales y se caracteriza por causar diarrea severa en gazapos y al igual que EPEC en humanos tiene especificidad de tejido (30). La infección con la cepa REPEC por vía parenteral causa la muerte del 90% de conejos recién nacidos (16).

Mecanismo de Patogenia

El mecanismo central de la patogenia de EPEC es la lesión llamada A/E (del inglés attaching and effacing que significa adherencia y destrucción), la cual se caracteriza por destruir las microvellosidades (31), y producir la formación de pedestales ricos en actina (5). Para que la EPEC realice esto se vale de la secreción de proteínas por medio del sistema de secreción tipo III llamadas Esp's (proteínas secretadas por *E. coli*) que son secretadas directamente a la célula hospedera, e incluyen EspA, EspB, EspD, EspF, EspG y Tir (13). Por otro lado las Esp's y el sistema de secreción están codificados por una isla de patogenicidad cromosomal llamada LEE (del inglés locus

of enterocyte effacement) (14). Además LEE también codifica a una proteína llamada intimina (adhesina de la membrana externa de EPEC) (13).

La interacción entre EPEC y la célula hospedera puede ser dividida en tres pasos: 1) adherencia inicial (no estrecha) de la bacteria a la célula hospedera, 2) transducción de señales dentro de esta última y, 3) la adherencia estrecha de la bacteria a la superficie de la célula. El primer paso no depende del sistema de secreción tipo III, involucra al BFP (del inglés, "bundle-forming pili", pili formador de rizos), el cual produce la adherencia inicial de la bacteria a la superficie de la célula (26). Después EspA forma un organelo filamentososo (similar al flagelo bacteriano, pero hueco, denominado "aguja") en la superficie de la bacteria, involucrado en la translocación de proteínas efectoras. EspB y EspD son insertadas en la membrana celular del enterocito donde forman un poro de translocación a través del cual las proteínas efectoras son secretadas al citosol de la célula hospedera (Fig. 3) (13).

Así, EPEC "inyecta" a Tir (del inglés "translocated intimin receptor", receptor translocado de intimina) dentro de la célula. Tir favorece su fosforilación por cinasas siguiendo su inserción dentro de la membrana de la célula afectada. La función de Tir es actuar como receptor de la molécula intimina para la adhesión de la bacteria a la superficie celular. En contraste a Tir, la intimina no es secretada por el mecanismo de secreción tipo III sino que es una proteína que forma parte de la membrana externa de la bacteria (26).

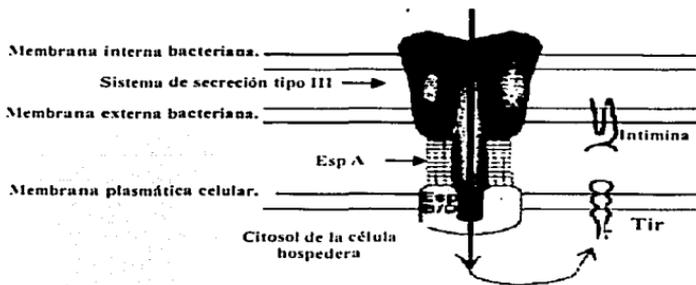


Fig. 3 Sistema de secreción tipo III de EPEC. (Tomada de Goosney et al., 2000).

Sobre la inserción de Tir en la membrana plasmática de la célula hospedera, varias proteínas del citoesqueleto son reclutadas al lugar de adhesión de EPEC. Estas incluyen alfa-actinina, ezrina, cactactina, talina, fimbrina, fosfoproteína estimulovasodilatadora (VASP), villina, proteína del síndrome neural Wiskott-Aldrich (N-WASP), y Arp2/3 (actin-related protein 2 y 3). N-WASP y el complejo Arp2/3 están relacionadas con la polimerización de actina, se asocian para formar elevaciones de la membrana celular denominados pedestales sitio en donde la bacteria se establece para colonizar el intestino (12).

REPEC produce, al igual que EPEC en humanos, las lesiones características de A/E en la mucosa intestinal. A diferencia de EPEC, la isla de patogenicidad (LEE) de REPEC solo está parcialmente secuenciada. La mayoría de los genes dentro de la isla están organizados dentro de cinco operones policistronicos: *LEE1*, *LEE2*, *LEE3*, *tir* y *LEE4*. Estos genes codifican a los componentes del sistema de secreción tipo III, una adhesina de membrana externa de 94 kDa homóloga a intimina (producto del gen *eae*) y a Tir, también codifica para la proteína CstI, que es una chaperona de Tir y por último a Ler, un miembro de la familia H-NS de activadores transcripcionales, mismo que regula la transcripción positiva de muchos genes dentro de LEE, así como algunos fuera de esta isla. Los genes que codifican al sistema de secreción tipo III están altamente conservados entre EPEC y REPEC, aunque existe algún grado de variabilidad en intimina y las Esp's (30).

Sistemas de Secreción Bacterianos

Escherichia coli utiliza sistemas de secreción para liberar factores de virulencia y toxinas propias de la bacteria. Los sistemas de secreción para bacterias se han dividido en 5 tipos. El primero es el sistema de secreción tipo I que está formado por tres elementos: un exportador de la membrana interna, una proteína anclada a la membrana interna que cruza el periplasma y una proteína de la membrana externa. La unión de las tres forma un canal que cruza las dos membranas y el periplasma, por donde las proteínas son secretadas. El sistema de secreción tipo II se encarga de secretar enzimas y toxinas, para que éstas pasen por la membrana interna la bacteria utiliza el sistema Sec (mecanismo que emplea un péptido señal) y después forma un complejo proteico (secretón) que forma un canal para la secreción a la superficie celular. El sistema de secreción tipo III (Fig. 3) es capaz de translocar factores antihospedero directamente dentro del citosol de las células eucariotas. El sistema de secreción tipo IV se especializa en transferir una variedad de biomoléculas de célula a célula, bacteria-bacteria (de manera similar al sistema de conjugación bacteriana) o bacteria-célula eucariote (transferencia de complejos proteína-DNA); también se utiliza para la secreción de toxinas. El sistema de secreción tipo V corresponde a la vía de secreción que utiliza autotransportadores que están formados por un péptido señal para secreción a través de la membrana interna, un dominio funcional (pasajero) y un dominio β , que se inserta en la membrana externa y forma una estructura de poro en barril- β , similar a las porinas bacterianas y a través del cual el dominio α funcional es exportado (9).

Citoesqueleto

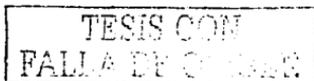
El citoesqueleto es una red de filamentos proteicos que se extienden por todo el citoplasma, cuya función esta relacionada con dar forma y movimiento a la célula. Dentro de tales funciones están por ejemplo: la contracción muscular, cambios de forma que ocurren durante el desarrollo embrionario de vertebrados, movimiento intracelular como el transporte de los organelos de un lugar a otro dentro del citoplasma, la segregación de los cromosomas durante la mitosis y el movimiento de las células sobre un sustrato (1).

La actividad del citoesqueleto depende de tres tipos de filamentos proteicos: los filamentos de actina, los microtúbulos y los filamentos intermedios. Cada tipo de filamento está formado por una subunidad proteica distinta: actina para los filamentos de actina, tubulina para los microtúbulos, y una familia de proteínas fibrosas relacionadas, como son vimentinas, neurofilamentos, queratinas o lamininas, para los filamentos intermedios. Cada uno de estos tres componentes tiene una función: los filamentos intermedios proveen a las células de fuerza mecánica, los microtúbulos son considerados como los organizadores primarios del citoesqueleto y se relacionan con transporte intracelular, finalmente los microfilamentos de actina son esenciales para muchos de los movimientos celulares, tanto de la célula como movimiento intracelular, así como de dar la forma celular (1).

La manera en que una célula eucariota esta espacialmente organizada por proteínas del citoesqueleto es mediante la polimerización de sus subunidades, en donde cada tipo de filamento es un polímero helicoidal que tiene una disposición diferente en la célula y una función distinta. En cada uno de estos tres tipos de proteínas del citoesqueleto, miles de unidades se ensamblan formando un filamento lineal, que puede ser lo suficientemente largo como para ir de un lado a otro de la célula. Estos filamentos conectan complejos proteicos y organelos de regiones distintas de la célula y actúan a modo de rieles para el transporte intracelular. Además, forman el soporte mecánico, que es especialmente importante en las células animales, que no disponen de rígidas paredes celulares externas. El citoesqueleto forma un armazón interno que mantiene el volumen celular. Sin embargo, los tres tipos de filamentos, por sí mismos, no pueden ser responsables ni de la forma ni de la longitud de la célula, dichas funciones dependen de un gran séquito de proteínas accesorias que unen los filamentos a otros filamentos y a otros componentes celulares. Las proteínas accesorias son esenciales para el control del ensamblaje de los filamentos en lugares particulares y proporcionan el motor para el movimiento intracelular a lo largo de ellos (1).

Filamentos de Actina y Células Epiteliales de Intestino Delgado

En todas las células eucariotas existe actina y constituye en promedio el 5% de la proteína total. La fuente más común de actina es el músculo esquelético donde conforma aproximadamente el 20% de su masa. Cada molécula de actina es un péptido de 375 aminoácidos de longitud y está asociada íntimamente con una molécula de ATP. Los filamentos de actina forman estructuras estables y lábiles dentro de la célula. Los filamentos estables forman el eje de las microvellosidades y son componentes cruciales del aparato contráctil de las células musculares, pero



muchos de los movimientos celulares dependen de estructuras que pueden pasar de una forma a otra. El filamento de actina es una hebra de 8 nm de diámetro, denominado actina F, formado por una doble hélice de monómeros de actina (actina G) orientados uniformemente. Es una estructura polar con dos extremos, un extremo más (también llamado extremo ancho o barbado) de crecimiento rápido y un extremo menos (también llamado extremo en punta) de crecimiento lento. Al menos existen 6 isoformas de actina en tejidos de mamíferos y se agrupan en 3 tipos dependiendo de su punto isoeléctrico, las α actinas que se encuentran en diversos tipos de músculos y las β y γ actinas que son constituyentes principales en las células no musculares. Sus secuencias de aminoácidos han sido altamente conservadas durante la evolución y todas se ensamblan en filamentos. Raramente los filamentos de actina se encuentran aislados en la célula, sino que generalmente forman agregados y haces, con puentes entrecruzados, que son mucho más fuertes que los filamentos individuales (1).

En las células epiteliales de intestino delgado, como ya se mencionó, los filamentos de actina se encuentran formando el eje de las microvellosidades y formando bandas de adhesión (*zonula adherens*) que rodean cada una de las células interactuantes, construyendo un anillo contractil de filamentos de actina, situado en la cara citoplasmática de la región membranosa implicada en la unión hacia el polo apical. Estos filamentos de actina se unen de célula a célula mediante proteínas de unión transmembrana llamadas cadherinas, cuyos dominios extracelulares se unen al dominio extracelular de una molécula de cadherina idéntica en la célula adyacente (Fig. 4) (1).

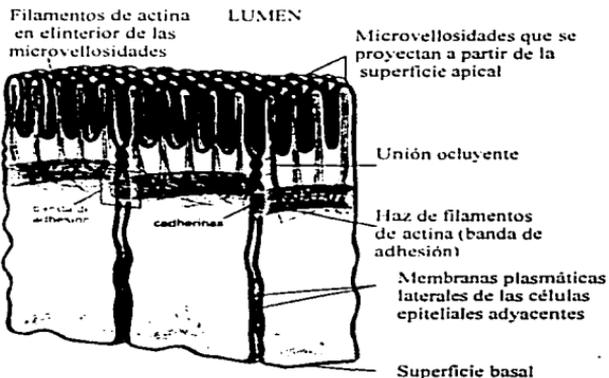


Fig. 4 Bandas de adhesión entre células epiteliales del intestino delgado y filamentos de actina en las microvellosidades. (Tomada de Alberts et al., 2002)

Cultivo Celular

El cultivo de tejidos fue conocido por primera vez a inicios del siglo XX como un método para estudiar el comportamiento de las células animales fuera de las variaciones del sistema como la homeostasis y el estrés que sufre un animal durante el experimento. El cultivo de células a partir de muestras de tejido se utilizó durante 50 años, por lo tanto no es de sorprenderse el nombre de cultivo tisular, y fue en la década de los 50's que esta área fue más explotada utilizando cultivo de células dispersas (8).

El término de cultivo tisular también es utilizado para entenderse como cultivo de órgano y cultivo celular. El cultivo de órganos casi siempre implica un cultivo tridimensional de tejido no disgregado o de todas las características histológicas de un tejido. Cultivo celular se refiere a cultivos derivados a partir de células obtenidas de un tejido original, de una línea o cepa celular, por medio de la disgregación enzimática, mecánica o química (8).

Algunas de las investigaciones que se pueden llevar a cabo en los cultivos celulares son: actividad intracelular (transcripción de ADN y síntesis proteica); flujo intracelular (ARN, metabolitos y hormonas); interacciones entre parásitos, virus o bacterias y sus células hospederas; acción de drogas y cinética de poblaciones; interacción célula-célula (inducción embrionaria, cooperación metabólica y limitación de crecimiento, etc.) (8).

JUSTIFICACIÓN

Uno de los grandes retos en la investigación es contar con modelos experimentales que permitan reproducir los eventos que suceden dentro del organismo con resultados lo más cercano posible a lo que se observa *in vivo*. En el caso de infecciones bacterianas, ha cobrado especial interés conocer como las bacterias interaccionan con las células que invaden. REPEC produce un cuadro patológico muy similar al ocasionado por EPEC en humanos, infectando el intestino delgado de conejos destetados causando diarrea y deshidratación (32). A nivel de patogenia, también ocasiona una reorganización del citoesqueleto de actina. REPEC tiene un mecanismo de patogenicidad análogo al de EPEC en humanos, razón por la cual se ha considerado como un modelo potencial para el estudio de la patogénesis de las lesiones A/E de *E. coli* en un hospedero natural (20). Es así como los conejos infectados con REPEC proveen un excelente modelo de infección humana con EPEC. Permite hacer estudios sobre la patogenia de esta bacteria de una manera que sería muy difícil de realizar en humanos (30).

Con la obtención de cultivos de enterocitos se pueden hacer experimentos realizando infecciones con REPEC. Además proporcionan información muy cercana a lo que sucede en un animal infectado y con esto es posible conocer con más detalle la forma en que esta bacteria utiliza los mecanismos celulares para su beneficio, en especial aquellos relacionados con cambios en el citoesqueleto y entender con mayor claridad la forma en que esta bacteria coloniza el intestino, lo que podría permitir el diseño de estrategias terapéuticas. Asimismo también se tendría un modelo para realizar estudios de biología celular y molecular sobre la dinámica del citoesqueleto.

utilizando las proteínas bacterianas involucradas en los rearrreglos de los filamentos de actina que se observan durante la infección.

TESIS CON
FALLA DE ...

OBJETIVOS

Objetivo General:

Establecer un cultivo de enterocitos de conejo para utilizarlo como modelo de estudio de la infección con REPEC.

Objetivos Específicos:

- a) Estandarizar las condiciones óptimas para establecer un cultivo de enterocitos.
- b) Establecer el ciclo de infección de REPEC en el cultivo de enterocitos y detectar los rearrreglos del citoesqueleto de actina.

MATERIALES Y METODOS

Aislamiento y Cultivo de Enterocitos

Se utilizaron 15 conejos (raza Nueva Zelanda), de 2 meses de edad. Se sacrificaron por sobredosis de anestesia y se obtuvo el intestino delgado sin mesenterio. Se tomó la tercera parte del intestino para procesarlo y las otras dos terceras partes se lavaron con PBS (del inglés phosphate buffered saline, amortiguador salino de fosfatos, pH de 7.2) y se conservaron a 4°C en el mismo amortiguador para ser procesadas 24 horas después. La parte que no se conservó a 4°C, se lavó 10 veces con PBS. Posteriormente se escindió y se lavó en un tubo cónico con 10 ml de PBS y se agitó en el vortex por 10 min, continuando 4 lavados más. Terminado este paso se colocó el intestino en un portaobjetos y la túnica mucosa se exfolió con ayuda de otro portaobjetos, pasando el exfoliado resultante a un tubo con 10 ml de PBS, agitándolo en el vortex y centrifugándolo a 3220Xg por 2 min. (en cada paso se observaba al microscopio óptico la morfología de los enterocitos para asegurarse que esta se conservaba, esto se hizo a partir de aquí y hasta finalizar el cultivo, para monitorear la morfología celular). Posteriormente se decantó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 5 ml de PBS con 10 mM de EDTA más 35 µl de collagenasa dispaasa, para disgregar las células, se agitó en vortex por 1 minuto y se incubó a 37°C por 10 a 15 minutos, nuevamente se agitó en vortex por un minuto, cinco veces, para después empastillar las células centrifugando a 3220Xg por 2 minutos, el sobrenadante se decantó y la pastilla se resuspendió con medio DMEM (del inglés Dulbecco's modified Eagle's medium, medio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco), adicionado con sorbitol 2%. Se hicieron dos lavados con DMEM/sorbitol centrifugando a 113Xg entre lavados. Se sembraron los enterocitos en cajas de Petri con 6 cubreobjetos por caja, colocando 150 µl del sembrado por cubreobjetos e incubándolo a temperatura ambiente (20°C) por 10 min. Finalmente se agregaron 10 ml de medio DMEM adicionado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 0.5% de manosa, antibióticos (100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin), 10 mM de piruvato, 1 mM de aminoácidos no esenciales y 5 µg/ml de insulina. Se dejaron incubar a 37°C hasta por 14 días, en una incubadora con atmósfera de 6% de CO₂. (2, 6, 18, 19, 21, 33).

Cultivo de REPEC

A partir de una placa en donde se creció la bacteria *Escherichia coli* enteropatógena de conejo serotipo O103 se tomó una muestra de la parte más homogénea y se colocó en 5 ml de medio Luria Bertani (LB), incubando toda la noche, posteriormente se empastilló centrifugando a 3220Xg por 2 minutos, se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 5 ml de DMEM 10% adicionado con manosa 0.5%, sin antibiótico y se incubó por 4 horas más.

Interacción de REPEC con los Enterocitos

Se tomaron los cultivos de enterocitos crecidos en cubreobjetos (incubados por 2 a 7 días), se retiró el medio, se lavaron con PBS estéril y con DMEM sin antibiótico. Se tomaron tres cubreobjetos como control negativo y tres cubreobjetos se inocularon

con la bacteria REPEC O103 (1000 bacterias/célula), agregando 5 ml de medio DMEM 10% adicionado con manosa 0.5%, sin antibiótico y se dejaron incubar por 4 horas a 37°C. en atmósfera de 6% de CO₂.

Imunofluorescencia

Se hicieron ensayos de inmunofluorescencia utilizando faloidina rodaminada para marcar los filamentos de actina en las células en cultivo infectadas con la bacteria REPEC, usando como control negativo células no infectadas.

Tanto en los controles negativos como en los cultivos infectados, se retiró el medio DMEM y se fijaron con paraformaldehído al 3.5% en PBS, por 20 minutos (a partir de aquí todos los pasos se hicieron a temperatura ambiente, 20°C). Posteriormente se lavaron con PBS 5 veces. Para permeabilizar se incubaron con tritón X100 al 0.5% en PBS, por 15 min. y se lavaron de 3 a 5 veces con PBS. Después se incubaron todos los cultivos con faloidina rodaminada 1:50 en PBS, por 30 minutos y se lavaron de 3 a 5 veces con PBS. Entonces se tomaron los cubreobjetos con pinzas y se lavaron con agua desionizada, para hacer el montaje en portaobjetos utilizando gelvatol adicionado con 0.5% de p-fenilendiamina, dejando secar en oscuridad por 3 hrs. Finalmente se hicieron las observaciones al microscopio confocal (34).

Microscopia Electrónica

Las células se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en PBS, por 24 hrs. y se lavaron tres veces con PBS, centrifugando a 1800Xg por 3 minutos entre cada lavado, eliminando el sobrenadante y resuspendiendo la pastilla. Se hicieron tres lavados más con agua bidestilada, centrifugando a 1800Xg, por 3 minutos entre cada lavado, eliminando el sobrenadante y resuspendiendo la pastilla. La pastilla resultante del último lavado se resuspendió en tetróxido de osmio al 1% y se incubó por 1 hr., después se centrifugó a 1800Xg por 3 minutos, se eliminó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en alcohol para iniciar el proceso de deshidratación. Se inicia incubando con alcohol al 30% por 10 min. y se continuó incubando a concentraciones ascendentes de alcohol, 50%, 70%, 80%, 90% y 95% por 10 minutos en cada uno y finalmente se resuspendió e incubó dos veces en alcohol absoluto por 20 minutos. Después de esto, la muestra se resuspendió en 3 partes de alcohol absoluto y una de resina Spurr, incubando por 2 horas. Se centrifugó a 1800Xg por 3 min, el sobrenadante se eliminó y la pastilla se resuspendió en una solución de 2 partes de alcohol absoluto y 2 de la resina Spurr y se incubó por 2 horas. Se centrifugó a 1800Xg por 3 minutos, el sobrenadante se eliminó y la pastilla se resuspendió en una solución de 1 parte de alcohol absoluto y 3 de la resina Spurr y se incubó por 2 horas. Se centrifugó a 1800Xg por 3 minutos, se eliminó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en resina Spurr pura y se incubó por 2 horas. Se repitió este paso incubando con la resina Spurr 1 hora. La muestra con la resina se pasó a cápsulas de plástico y se dejó incubar por 36 horas a 60°C. Una vez que traguó la resina, se retiró la cápsula y se hicieron cortes finos para ser contrastados con citrato de plomo y acetato de uranilo. Se hicieron las observaciones al microscopio electrónico de transmisión Jeol (80 kV).

RESULTADOS

Cultivo de Enterocitos

Se realizó la estandarización de la técnica de cultivo para enterocitos, basada en reportes previos (2, 6, 18, 19, 21, 33). Para esto se realizaron varios ensayos hasta obtener las células en cultivo, a las que se les hizo la caracterización morfológica.

El primer paso fue el aislamiento de los enterocitos por medio de gradientes sin obtener resultados satisfactorios, se intentó aislar por medio de incubación con collagenasa en agitación constante y tampoco se obtenían enterocitos en cantidades adecuadas. Finalmente se obtuvieron los enterocitos exfoliando la mucosa intestinal con un portaobjetos, seguida de disgregación con collagenasa dispasa.

Durante todo el proceso, se observó que se conservarían las características morfológicas de los epitelioцитos columnares vilosos (enterocitos), principalmente se monitoreó el borde apical con microvellosidades (Fig. 5 C, D y E, flechas). Como control se comparó la estructura de los enterocitos aislados con aquellos de los cortes histológicos de las muestras antes de procesarlas para el cultivo (Fig. 5 A y B).

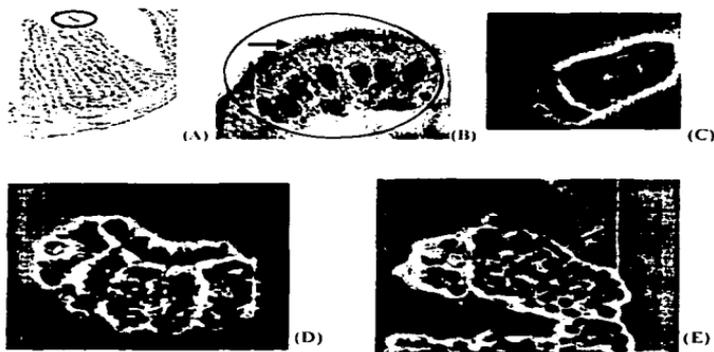


Fig. 5 Aislamiento de enterocitos para cultivo (microscopio de contraste de fases). A Corte histológico teñido con H-E (20x); B Amplificación del área marcada en el panel A (100x); C. Enterocitos exfoliados del intestino antes de disgregar enzimáticamente, obtenidos individualmente; D. Similar al panel C pero obtenidos en pequeños grupos (40x); E. Similar a panel C pero obtenidos en grupos grandes (20x). La flecha señala las microvellosidades en el borde apical

Una vez que se consiguió el cultivo de los enterocitos, se procedió a evaluar su viabilidad para lo cual se hicieron los cultivos y dejaron incubarse a diferentes tiempos. Se obtuvieron preparaciones con una viabilidad promedio de 7 días y en algunos casos hasta de 14 días (Fig. 6).

Debido a que en cada cultivo solo se utilizaba parte del intestino, con el fin de conocer la viabilidad de las muestras para ser almacenadas y cultivadas posteriormente se conservó una parte de la muestra no utilizada durante 24 horas a 4°C, para posteriormente obtener los cultivos de enterocitos. Se obtuvieron los cultivos sin notar diferencias en la caracterización morfológica entre estos cultivos y aquellos realizados con el intestino recién obtenido del animal (Fig. 7), por lo que, en caso de requerirse una mayor cantidad de cultivos, esta podría ser una alternativa.



Fig. 6 Enterocitos de conejo de 7 días de cultivo vistos al microscopio óptico invertido, se muestra una célula aislada (A) y un grupo de células (B) (40x).

Efecto de REPEC sobre el Citoesqueleto

Microscopía Confocal

En las células no infectadas se observó que éstas mantenían su morfología característica, resaltando que no se notó ningún cambio en las microvellosidades (Fig. 8C). En las células infectadas se observaron cambios consistentes en rearrreglos del citoesqueleto con una aparente elongación de las microvellosidades (Fig. 8D). Como controles para evaluar las células en cultivo, cada imagen de fluorescencia se acompaña de su contraparte observada por la técnica de Nomarski (1) (Fig. 8 A y B).

Las microvellosidades de las células infectadas sufren un aparente engrosamiento y elongación, que da un aspecto de desarreglo o desorden (Fig. 9), a diferencia de los controles negativos en donde se observa el borde apical más delgado (Fig. 10 A, flecha). A nivel del borde basolateral se distingue una línea de actina tanto en el control no infectado como en las células infectadas, dicha línea se observa más delgada y menos marcada en las células infectadas (Fig. 10 A y C, cabeza de flecha), y en algunas células infectadas se llegaron a notar condensaciones de actina a nivel del citoplasma que eran más marcadas que en las células no infectadas (Fig. 10 C).

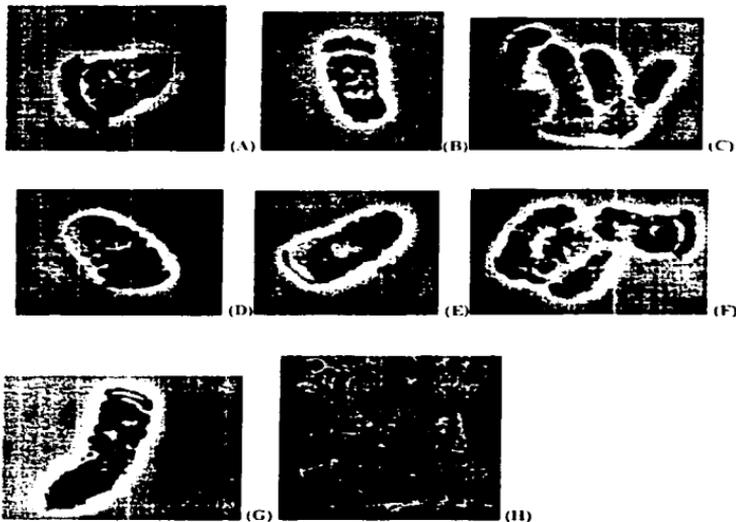


Fig. 7 Enterocitos exfoliados de intestino de conejo conservado 24 hrs a 4°C, vistos en microscopio de contraste de fases (40X). Se muestran diferentes enterocitos aislados (A, B, D, E y G) y otros en grupos (C y F). H. El mismo cultivo visto e menor aumento (20X).

Asimismo, en las células infectadas se llegó a observar un aumento de la marca de actina por debajo del borde apical (Fig. 11 C, flecha) a diferencia de lo observado en los controles no infectados (Fig. 11 A, flecha).

En una ampliación de la figura 11C se puede observar con más detalle el borde apical y se nota el aumento de la marca de actina por debajo del mismo (flecha Fig. 12 C). Con la ampliación de esta figura también se puede valorar el desarreglo de las microvellosidades (Fig. 12).

En el citoplasma de las células infectadas se alcanzan a distinguir filamentos y puntos de condensación de actina (Fig. 13-A). En un corte óptico de la misma célula se observa que estas fibras y condensaciones de actina se sitúan en la superficie dorsal (Fig. 13-B).

También se muestra una serie de cortes ópticos hechos con el microscopio confocal de las células infectadas para observar la distribución de la actina. En todos se observó el patrón aparentemente elongado de las microvellosidades, pero la condensación de actina a nivel de citoplasma y membrana basolateral era más marcado en el corte más dorsal (Fig. 14B) y a partir de este se notaba una disminución (Fig. 14C-G).

En la imagen ampliada de la célula de la figura 14 se logró observar a las microvellosidades aparentemente alargadas, con un aspecto de desarreglo (flechas Fig. 15).

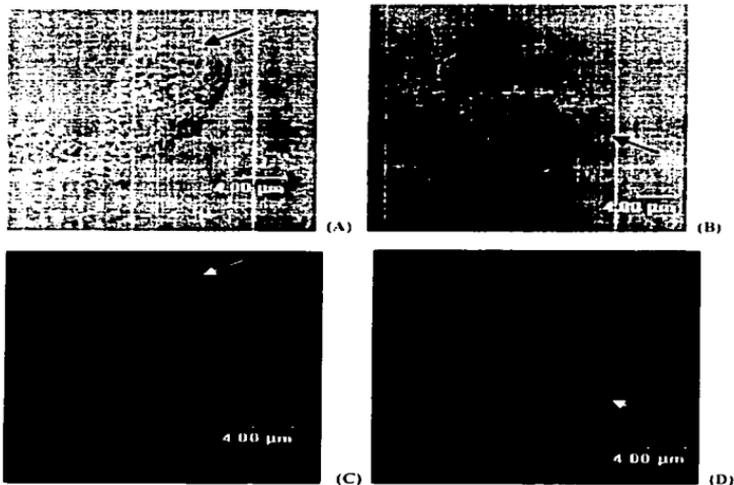


Fig. 8 Cultivo de enterocitos de conejo marcados con faloidina rodamina, vistos con microscopio confocal (100x). A. Enterocito no infectado visto mediante la técnica de Nomarski; B. Enterocito infectado (4 horas) visto mediante la técnica de Nomarski. C. Enterocito no infectado marcado con faloidina rodamina. D. Enterocito infectado marcado con faloidina rodamina. Las flechas señalan el borde apical.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

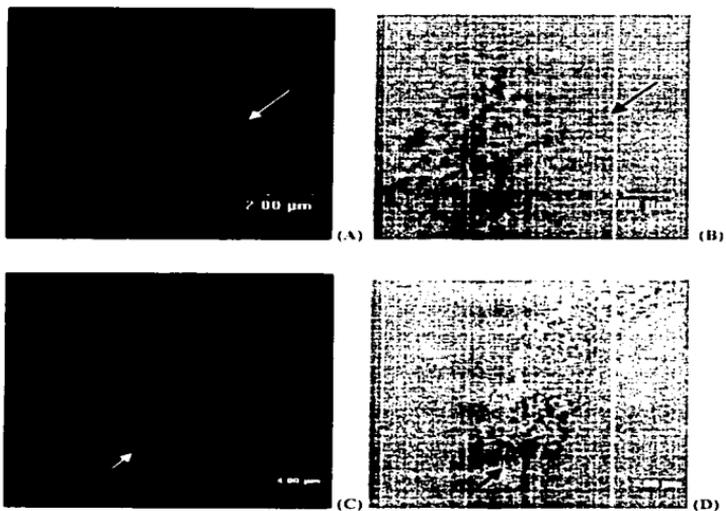


Fig.9. Cultivo de enterocitos de conejo infectados con REPEC (4 horas) marcados con faloidina rodamina, vistos con microscopio confocal (100x). A y C. Enterocitos marcados con faloidina rodamina, B y D. Imágenes de las mismas células usando la técnica de Nomarski. Las flechas indican el borde apical.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

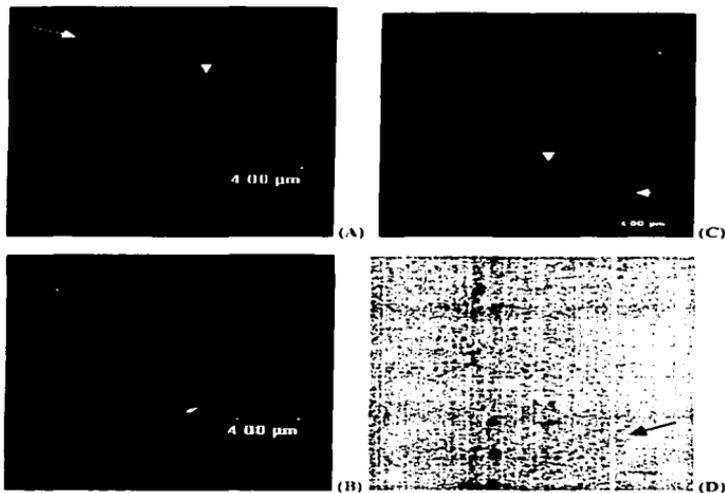


Fig. 10. Enterocitos de conejo en cultivo, marcados con faloidina rodamina. vistos con microscopio confocal (100x). A. Enterocito no infectado, C. Enterocito infectado con REPEC (4 horas). B y D. Enterocitos correspondientes a los paneles A y C, respectivamente, usando la tecnica de Nomarski. Las flechas indican el borde apical y las cabezas de flecha señalan el borde basolateral

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

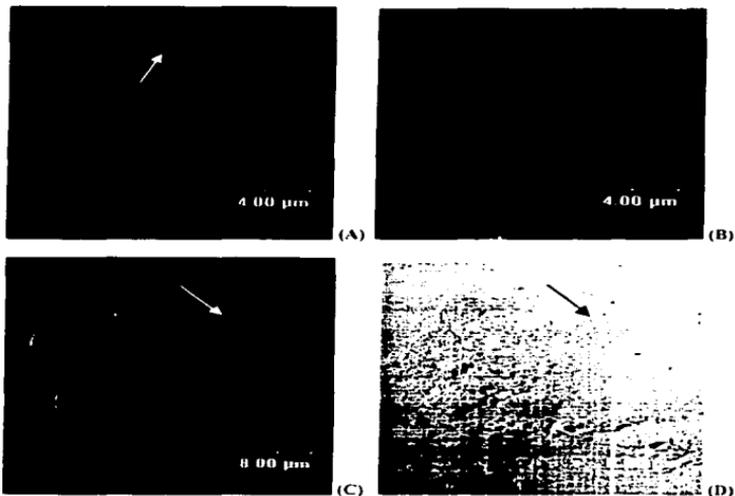


Fig. 11 Cultivo de enterocitos de conejo marcados con faloidina rodaminada, vistos con microscopio confocal (100X). A. Enterocito no infectados marcado con faloidina rodaminada (100X), C. Enterocitos infectados (4 horas) con REPEC marcados con faloidina rodaminada (100X) B y D. Imágenes de las células correspondiente a los paneles A y C respectivamente, utilizando la técnica de Nomarski.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

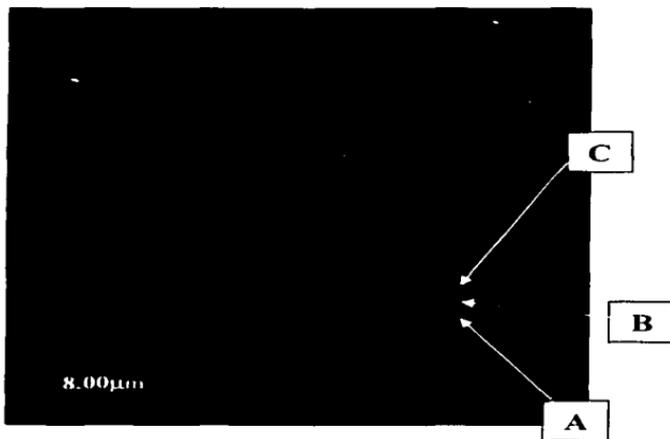


Fig. 12 Ampliación de la figura 11C. Las células muestran la aparente elongación de las microvelosidades (A) a partir del borde apical (B) y aumento de la marca de actina debajo del mismo (C)

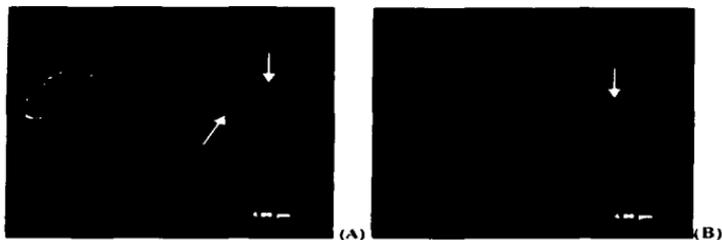


Fig. 13 Cultivo de eritrocitos de conejo infectados con REPEC (4 horas) y marcados con faloidina rodamina, vistos con microscopio confocal (100x). A. Imágenes obtenidas por el microscopio confocal; B. Corte óptico vertical. Las flechas marcan los filamentos de actina citoplasmáticos y las condensaciones en la superficie dorsal.

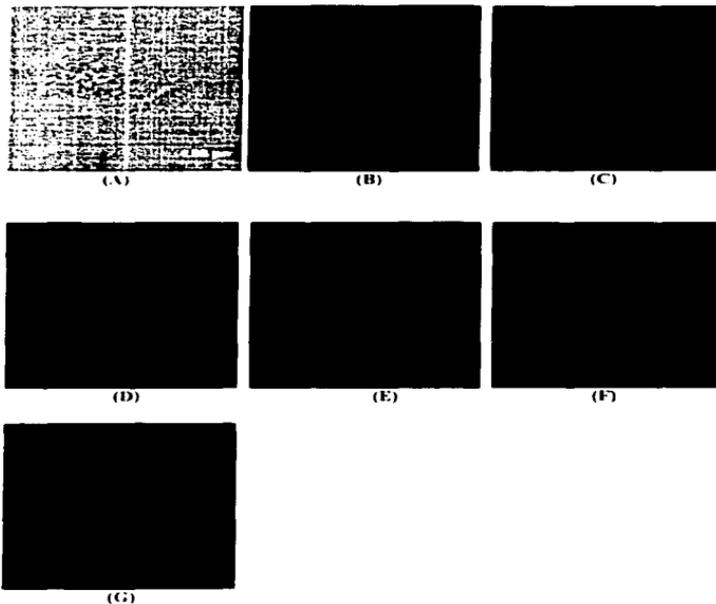


Fig. 14 Cortes ópticos de un enterocito (corresponde a la Fig. 8D) infectado con REPEC (4 hrs) y marcado con faloidina rodaminada, vistos con microscopio confocal (100x). A. Visualización de la célula usando la técnica de Nomarski; B - G, cortes ópticos.

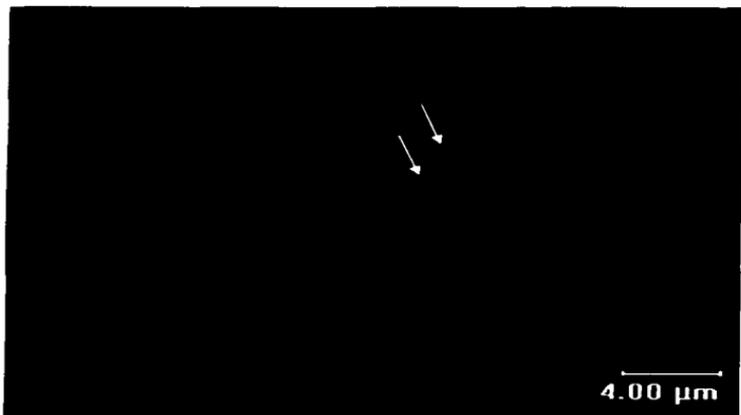


Fig. 15 Enterocito de la Fig 14, amplificado, en el que se puede observar un aparente elongamiento y desarreglo de las microvellosidades en el borde apical de la célula

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Microscopía Electrónica de Transmisión

Para corroborar los cambios ocasionados por REPEC en los enterocitos cultivados, se hicieron ensayos de microscopía electrónica de transmisión y se observó la formación de pedestales debajo de las bacterias adheridas al borde apical de las células en cultivo (Fig. 16 A y B).



Fig. 16. Microscopía electrónica de transmisión de un cultivo de enterocitos infectados con REPEC por 4 hrs. Se muestran dos células diferentes (A y B) y en cada una se marca a la bacteria (b) y al pedestal (p).

DISCUSIÓN

Se estandarizó la técnica para realizar los cultivos a partir de enterocitos de conejo para el estudio de los rearrreglos de actina ocasionados por REPEC. Se demostró que esta bacteria produce cambios similares a los observados en células infectadas con EPEC en humanos, tales como la interacción de la bacteria REPEC con los enterocitos cultivados y la observación de la formación de pedestales, lo que valida este modelo para el estudio de la patogenia de EPEC. La mayoría de los estudios sobre la interacción de REPEC con la célula hospedera se han reportado en líneas celulares como HEP-2 (Robins-Browne y col. 1994), HeLa (Jean De Rycke y col. 1997, Nougayrède y col. 1999, y Nougayrède y col. 2001) y RK13 (Marchés y col. 2000) o bien en estudios realizados sobre cortes histológicos de intestino de conejo infectado (Heczko y col. 2001).

Con relación al cultivo existen artículos sobre aislamiento de enterocitos en ratas (Evans y col. 1992), ratones (Macartney y col. 2000), puercos (Spencer y col. 1994), vacas (Föllmann y col. 2000) y en conejos se encuentra al menos el reporte de Cartwright y col. (1999), quien cultivó enterocitos para estudiar el ensamblaje y secreción de quilomicrones.

El aislamiento de las células de intestino para obtener cultivos, es en general similar, independientemente de la especie. En la mayoría de estos estudios, para disgregar las células del tejido se hace una incubación a 37°C, con agitación y utilización de métodos enzimáticos. Al seguir esta metodología se observó que cuando las células se disgregan por medios enzimáticos e incuban a 37°C se obtenía una pobre cantidad de células, además de que no había adhesión y se redondeaban perdiendo su morfología.

Por lo anterior, se hizo una modificación de acuerdo a la reportada por Massey-Harroche y col. (1998), que consiste en hacer raspados de las células del tejido. Aunque esta técnica no se reporta en los artículos relacionados con cultivos primarios, en este trabajo se hicieron las exfoliaciones con un portaobjetos para separar la túnica mucosa intestinal, procurando que las células sufrieran el menor daño posible. El resultado de esta modificación fue positivo, lo que se pudo corroborar al observar las células y notar que conservaban su morfología, además se obtuvieron gran cantidad de células, las que una vez separadas del intestino, se disgregaron enzimáticamente para obtener un mayor aislamiento entre ellas. Las células aisladas son similares a las obtenidas en los cultivos de enterocitos realizados por Cartwright y col. (1999).

Con respecto a la adhesión de los enterocitos en este tipo de cultivo, comúnmente se utiliza una matriz extracelular, como el matrigel (Macartney y col. 2000). Al seguir los protocolos reportados en la literatura, pero eliminando la matriz se observó que las células no se adherían y las que lo hacían se despegaban con facilidad. La modificación que se hizo al preincubar las células en el medio de cultivo a temperatura ambiente, sobre el cubreobjetos, por 10 minutos, mejoró de manera notable la adhesión de células, tanto en cantidad como en tipo celular, ya que de las células que se adherían, la mayor parte eran enterocitos. Esta modificación permite descartar células que no corresponden a enterocitos, lo anterior se comprobó mediante caracterización morfológica de las células que permanecieron adheridas. También se

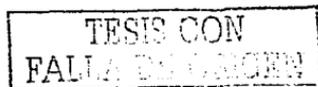
notó que una vez adheridas las células a los cubreobjetos, ya no se adherían más células durante el tiempo que permanece el cultivo en incubación.

Para la preparación de los cultivos, tampoco se utilizaron los aditivos que se reportan en otros artículos. De acuerdo a la metodología empleada, únicamente se utilizó DMEM con SFB, manosa, penicilina-estreptomicina, piruvato, aminoácidos no esenciales e insulina, lo cual representa otra ventaja en cuanto a costos. Por otro lado, el tiempo de vida de los cultivos fue de hasta 14 días, lo cual es adecuado para llevar experimentos relacionados a estudios con REPEC o para experimentar en otras líneas de investigación.

Una alternativa observada durante la elaboración de los cultivos fue la de procesar la mitad del intestino y la otra mitad conservarla a 4°C en PBS durante 24 horas. Esto sería recomendable cuando no se utiliza toda la muestra durante la elaboración de los cultivos. Los cultivos obtenidos son similares y permiten aprovechar de mejor manera las muestras de un animal.

Los rearrreglos del citoesqueleto de actina observados en este trabajo, como son la aparente elongación y desarreglo de las microvellosidades, el aumento en la marca de fluorescencia en el borde apical de células infectadas y disminución de la misma en la membrana basolateral, así como el incremento en la marca de actina por debajo del borde apical, con escasas y delgadas fibras o filamentos de actina en el citoplasma, no se pudieron comparar con otros trabajos debido a que estos últimos se han realizado en líneas celulares que no son específicas de intestino delgado y carecen de microvellosidades. Por otro lado, el patrón de los filamentos de actina marcados con faloidina en las células no infectadas, solo se observa el borde apical y en la membrana basolateral, lo que concuerda con el estudio sobre anexinas realizado por Massey-Harroche y col. (1998) en el que se utilizaron células de ayuno de conejo. No hay reportes de experimentos de infección de REPEC en cultivos de enterocitos y tampoco sobre los rearrreglos del citoesqueleto de actina inducidos por REPEC en este tipo de cultivos.

A partir de los resultados obtenidos, se propone que la aparente elongación de las microvellosidades, el desarreglo de las mismas, así como el aumento de la marca de actina en el borde apical, en comparación a lo observado en las células no infectadas, se puede atribuir al efecto de REPEC sobre el citoesqueleto de actina, que incluye su reclutamiento en dirección al borde apical del enterocito para formar los pedestales. Estos rearrreglos se confirmaron por microscopía electrónica de transmisión en donde se demostró la presencia de dichos pedestales producidos por REPEC en los enterocitos de conejo en cultivo. La formación de pedestales ocasionados por REPEC en células del intestino de conejo también fue reportado por Heezko y col. (2000) pero en un estudio realizado en cortes de tejido de intestino de conejo infectado con esta bacteria, que coincide con la formación de pedestales formados en infecciones con REPEC en humanos (Knutton, 1995).

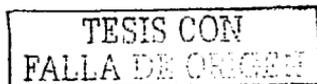


CONCLUSIONES

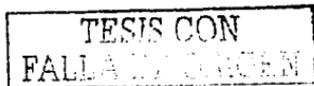
1. Se logró obtener un cultivo de enterocitos de conejo y se hizo la caracterización morfológica de las células.
2. Se estableció el ciclo de infección de REPEC en el cultivo de enterocitos y se demostró que REPEC produce rearrreglos del citoesqueleto de actina que incluyen la aparente elongación de las microvellosidades y su desarreglo, así como la formación de pedestales.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Walter P. (2002) Molecular Biology of the Cell. Chapter 4, 16 and 19. 4th. Ed. Edit. Garland Science, USA.
- 2- Cartwright I. J. and Higgins, J. A. (1999) Isolated rabbit enterocytes as a model cell system for investigations of chylomicron assembly and secretion. *Journal of lipid research*. 40: 1357-1365
- 3- Czczulin J. R., Whittam T. S., Henderson I. R., Navarro-Garcia F., and Nataro J. P. (1999) Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. 67: 2692-2699
- 4- De Rycke J., Comtet E., Chalareng C., Boury M., Tascia C. and Milon A. (1997) Enteropathogenic *Escherichia coli* O103 from Rabbit Elicits Actin Stress Fibers and Focal Adhesions in HeLa Epithelial Cells. Cytopathic Effects That Are Linked to an Analogue of the Locus of Enterocyte Effacement. *Infection and Immunity*. 65: 2555-2563
- 5- DeVinney R., Knoechel D. G. and Finlay B. (1999) Enteropathogenic *Escherichia coli*: cellular harassment. *Microbiology*. 2: 83-88
- 6- Evans G. S., Flint N., Somers A. S., Eyden B. and Potten C. S. (1992) The development of a method for the preparation of rat intestinal epithelial cell primary cultures. *Journal of Cell Science*. 101: 219-231
- 7- Föllmann W., Weber S. and Birkner S. (2000) Primary cell cultures of bovine colon epithelium: isolation and cell culture of colonocytes. *Toxicology in Vitro*. 14: 435-445
- 8- Freshney R. I. (2000) Culture of animal cells. Fourth edition, USA.
- 9- Gauthier A. and Finlay B. (2001) Bacterial pathogenesis: the answer to virulence is in the pore. *Current Biology* 11: R264-R267
- 10- Geneser F. (2000) Histología. Capitulo 2 y 18. Tercera edición, Editorial Médica Panamericana, México D. F.
- 11- Gil A. and Samartino L. (2000) Zoonosis en los sistemas de producción animal de las áreas urbanas y periurbanas de América Latina. *Food and Agriculture Organization*, Livestock Information and Policy Branch, AGAL.
- 12- Goosney D., DeVinney R. and Finlay B. (2001) Recruitment of Cytoskeletal and Signaling Proteins to Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Pedestals. *Infection and Immunity*. 69: 3315-3322



- 13- Goosney D., Gruenheid S. and Finlay B. (2000) Gut Feelings: Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) Interactions with the Host. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 16: 173-189
- 14- Hezcko U., Abe A. and Finlay B. (2000) In vivo interactions of rabbit enteropathogenic *Escherichia coli*: O103 with its host: an electron microscopic and histopathologic study. *Microbes and Infection*, 2: 5-16
- 15- Hezcko U., Carthy C. M., O'Brien B. A. and Finlay B. (2001) Decreased Apoptosis in the Ileum and Ileal Peyer's Patches: a Feature after Infection with Rabbit Enteropathogenic *Escherichia coli*: O103. *Infection and Immunity*, 69: 4580-4589
- 16- Huang L., Mittal B., Sanger J. W. and Sanger J. M. (2002) Host Focal Adhesion Protein Domains That Bind to The Translocated Intimin Receptor (Tir) of Enteropathogenic *Escherichia coli*: (EPEC). *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 52: 255-265
- 17- Knutton S. (1995) Cellular responses to enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Bioscience Reports*, 15: 469-479
- 18- Knutton S., Lloyd D. R., Candy D. C. A. and McNeish A. S. (1985) Adhesion of Enterovirulent *Escherichia coli* to Human Small Intestinal Enterocytes. *Infection and Immunity*, 48: 824-831
- 19- Macartney K., Baumgart D., Carding S., Brubaker J. and Ofit P. (2000) Primary Murine Small Intestinal Epithelial Cells, Maintained in Long-Term Culture, Are Susceptible to Rotavirus Infection. *Journal of Virology*, 74: 5597-5603
- 20- Marchès O., Nougayrède J-P., Boullier S., Mainil J., Charlier G., Raymond I., Pohl P., Boury M., De Rycke J., Milon A. and Oswald E. (2000) Role of Tir and Intimin in the Virulence of Rabbit Enteropathogenic *Escherichia coli* Serotype O103:H2. *Infection and Immunity*, 68: 2171-2182.
- 21- Massey-Harroche D., Mayran N. and Maroux S. (1998) Polarized localizations of annexins I, II, VI and XIII in epithelial cells of intestinal, hepatic and pancreatic tissues. *Journal of Cell Science*, 111: 3007-3015.
- 22- Nataro J. P. and Kaper J. B. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11: 142-201
- 23- Nougayrède J-P., Boury M., Tascia C., Marchès O., Milon A., Oswald E., and De Rycke J. (2001) Type III secretion-dependent cell cycle block caused in HeLa cells by enteropathogenic *Escherichia coli*: O103. *Infection and Immunity*, 69: 6785-6795
- 24- Nougayrède J-P., Marchès O., Boury M., Mainil J., Charlier G., Pohl P., De Rycke J., Milon A. and Oswald E. (1999) The long-term cytoskeletal rearrangement induced by rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* is Esp dependent but intimin independent. *Molecular Microbiology*, 31: 19-30



- 25- Olfert E. D., Cross B. M. and McWilliam A. A. (1998) Manual sobre el cuidado y uso de los animales de experimentación. CCPA, Ontario Canadá, 2da. Edición. Vol. 1, <http://www.ccaac.ca>
- 26- Pascale C. (2000) Cellular Microbiology. Chapter 1.6 and 13. Ed. Washington, USA.
- 27- Robins-Browne R. M., Tokhi A. M., Adams L. M., Bennett-Wood V., Moisisidis A. V., Krajany E. O. and O'Gorman L. E. (1994) Adherence characteristics of attaching and effacing strains of *Escherichia coli* from rabbits. *Infection and Immunity*. 62: 1584-1592
- 28- Ross M. and Romrell L. J. (1997) Histología texto y atlas a color. 3ra. edición. Editorial Médica Panamericana México D. F.
- 29- Spencer R. J. and Chesson A. (1994) The effect of *Lactobacillus spp.* on the attachment of enterotoxigenic *Escherichia coli* to isolated porcine enterocytes. *Journal of Applied Bacteriology*. 77: 215-220
- 30- Tauschek M., Strugnell R. A. and Robins-Browne R. M. (2002) Characterization and evidence of mobilization of the LEE pathogenicity island of rabbit-specific strains of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. 44: 1533-1550
- 31- Trabulsi L., Keller R. and Tardelli T. (2002) Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases*. 8: 508- 513
- 32- Vallance B. A. and Finlay B. (2000) Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97: 8799-8806
- 33- Warford M. (1994) Glutamine metabolism in rat small intestine: synthesis of three-carbon products in isolated enterocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1200: 73-78
- 34- Willingham M. C., (1985) Pastan I. An atlas of immunofluorescence in cultured cells. Ed. Academic Press Inc. United Kingdom.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN