



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTILÁN**

**IDENTIFICACIÓN DE GELSOLINA EN CÉLULAS RK-13 INFECTADAS  
CON ESCHERICHIA COLI ENTEROPATÓGENA PARA CONEJO (REPEC).**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**PRESENTA:**

**ULISES GERMAN CORTEZ NERI**

**ASESOR: M. en C. MISAEL RUBÉN OLIVER GONZÁLEZ  
CO-ASESOR: Dr. CARLOS GERARDO GARCÍA TOVAR**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

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

Identificación de gelsolina en células RK-13 infectadas con  
Escherichia coli enteropatógena para conejo (REPEC).

que presenta el pasante: Ulises German Cortez Neri  
con número de cuenta: 40301283-3 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"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 10 de Diciembre de 2008.

PRESIDENTE

MC. Misael Rubén Oliver González

VOCAL

Dr. Carlos Ignacio Soto Zárate

SECRETARIO

MC. María Magdalena Zamora Fonseca

PRIMER SUPLENTE

Dr. Guillermo Valdivia Anda

SEGUNDO SUPLENTE

Dr. Marco Antonio Muñoz Guzmán

## DEDICATORIAS

Quiero agradecer a Dios y a la Virgen de Guadalupe, que por medio del Espíritu Santo permitió que mis padres tuvieran fuerza y decisión por darles a sus hijos una educación llena de amor y trabajo cumpliendo con responsabilidad sus obligaciones, sabemos que ha habido tropiezos y errores de parte de todos pero creo que estamos en una etapa de la vida clave para corregirlos por medio de la unión entre nosotros, haciéndonos concientes de las necesidades y objetivos familiares a los cuales tenemos que darles más valor y enriquecerlos día con día. A mis hermanos les digo que me siento orgulloso de ellos ya que son ejemplo de trabajo y lucha tanto en la escuela como en su trabajo, además siempre han apoyado a mis padres en los buenos momentos así como también en los malos, aunque afortunadamente siempre han prevalecido los buenos. Me gustaría resaltar la participación de mis abuelos, tanto maternos como paternos, con especial énfasis en el lado femenino, por tener la capacidad de permitir a sus hijos conocer otro mundo, otra forma de pensar y de vivir aunque muy alejados de sus raíces pero siempre con la finalidad de hacer hombres y mujeres de bien. A mis tíos, primos, sobrinos, los cuales siempre han estado con nosotros apoyando y enriqueciendo la convivencia familiar con sus experiencias y solidaridad. Todo esto y más es mi familia, que con todo y el cáncer que aqueja hoy a la sociedad tanto corporal como espiritualmente, ésta ha logrado sobrevivir, les doy las gracias y espero que siempre sigamos juntos pero no revueltos.

A todos mis perros y gatos que convivieron toda su vida con mi familia y especialmente conmigo saben que los estimo y les agradezco por tantas experiencias hermosas que pasamos juntos.

## RECONOCIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme brindado la oportunidad de pertenecer a la máxima casa de estudios del país.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán campo 4 por haberme brindado un recinto lleno de conocimiento y experiencia para mi formación profesional.

A mi estimado profesor el Dr. Misael Rubén Oliver González por haber sido mi primer profesor durante la carrera, por haberme introducido al mundo de la ciencia y de la investigación, por compartir sus experiencias y consejos, lo considero un profesor trabajador y comprometido con la FES- Cuautitlán así como también con los ideales de la UNAM.

Al Dr. Carlos Gerardo García Tovar por el apoyo recibido tanto económicamente (a través de su proyecto y cátedra de investigación) así como también con sus ideas para desarrollar lo que hoy es esta tesis, tanto en protocolo como en métodos, siempre estaré agradecido de haber convivido con una persona como usted, con cualidad científica y comprometida con la UNAM.

Al Dr. Fernando Navarro García del Cinvestav, gracias por haberme permitido realizar una estancia de investigación en su laboratorio ya que fue pieza clave para culminar mi tesis, además le doy las gracias por haberme tenido confianza para permitirme trabajar con libertad en el mismo. También le agradezco a su equipo de trabajo. M. en C. Lucía Chávez Dueñas y al Ing. en biotecnología Jazmín Huerta Cantillo, por su gran apoyo en la aplicación de las técnicas de investigación y al alumno M. en C. Héctor Daniel Salazar González por sus consejos y respuestas a mis dudas.

Al equipo de trabajo del Centro de Investigación Multidisciplinario de la FES-Cuautitlán,  
Laboratorio 4:

Dr. Carlos Ignacio Soto Zarate

Dra. María Leonor Quintero Mora

Dr. Crisóforo Márquez Mercado

MVZ. Ma. Reyes Pichardo Molinero

Por sus consejos para realización de esta tesis y por su siempre amable compañía.

A todos mis profesores desde el kinder hasta la Universidad ya que por medio de su gran apoyo han logrado directa e indirectamente mi formación académica que hoy culmina y que espero sea para el bien de país, de los animales y de la gente que lo habita.

El alumno Ulises German Cortez Neri recibió el apoyo de beca del proyecto:  
PAPIIT IN 203106-3 “Estudio comparativo de los rearrreglos del citoesqueleto en células  
RK-13 y enterocitos de conejo durante la infección de *Escherichia coli* enteropatógena para  
conejo (REPEC)”.

El presente trabajo recibió el apoyo de:  
Proyecto PAPIIT IN 2031106-3 “Estudio comparativo de los rearrreglos del citoesqueleto en  
células RK-13 y enterocitos de conejo durante la infección de *Escherichia coli* enteropatógena  
para conejo (REPEC)”.

PACIVE CONS-105 “Morfología veterinaria y biología celular”

## ÍNDICE

	PÁGINA
• RESUMEN.....	1
• INTRODUCCIÓN.....	2
• OBJETIVOS.. .. .	6
• MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
• RESULTADOS.....	12
• DISCUSIÓN.....	28
• CONCLUSIONES.....	31
• BIBLIOGRAFÍA.....	32



## RESUMEN

El citoesqueleto es una red que le permite a la célula eucariota realizar rearrreglos internos con el fin de darle forma y resistencia. Se constituye por filamentos de actina, micronúbulos y filamentos intermedios. El citoesqueleto de actina se integra por la proteína actina y proteínas reguladoras de ésta, como gelsolina, proteína sensible a  $Ca^{2+}$  que corta y recubre el extremo de los filamentos de actina ("capping"). *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) es una bacteria Gram negativa que provoca diarrea acuosa en humanos y animales. La principal lesión histopatológica de EPEC es la lesión A/E (adherencia y borrado), que da lugar a la formación de unas estructuras ricas en actina llamadas "pedestales" como resultado de rearrreglos del citoesqueleto de actina. La cepa O103 de *E. coli* enteropatógena para conejo (REPEC) posee mecanismos de patogenicidad análogos a EPEC, por lo que se utiliza como modelo para estudiar la dinámica de proteínas asociadas al citoesqueleto de actina durante su formación y mantenimiento de los pedestales. Con la finalidad de ver si gelsolina se recluta en los pedestales y colocaliza con actina, así como iniciar el estudio de la dinámica de esta proteína durante la formación de pedestales se infectaron células RK-13 con REPEC, se tomaron muestras cada 30 min., a partir de las 2 h postinfección hasta las 5 h, después fueron procesadas por inmunofluorescencia y analizadas al microscopio confocal. Previamente a esto, se realizaron pruebas de conservación de la antigenicidad, utilizando varios fijadores a diferentes tiempos para seleccionar el que permitía visualizar mejor la marca de gelsolina y actina, también se evaluaron diferentes diluciones de los anticuerpos primario (anti-gelsolina hecho en cabra), secundario (anti-cabra hecho en cerdo) conjugado con fluoresceína y faloidina rodamina para utilizar la más adecuada. Al análisis de las células RK-13 con el microscopio de epifluorescencia, la mezcla paraformaldehído 3% con glutaraldehído 1% durante 20 min y la dilución 1:20 de los anticuerpos tanto primario como secundario, 1:100 para faloidina rodamina resultaron más adecuadas para marcar gelsolina y actina, respectivamente. Al infectar células RK13 con REPEC se observó que gelsolina se recluta a los pedestales y colocaliza con actina en todos los tiempos de infección muestreados. Se sugiere que sus funciones de corte, recubrimiento y desprendimiento de los filamentos preexistentes se están llevando a cabo con la finalidad de generar extremos libres y contribuir en la polimerización de actina-F en estos.

## INTRODUCCIÓN

El citoesqueleto de las células eucariotas es una estructura dinámica que se encuentra inmersa en el citoplasma dando lugar a una red que le da forma y resistencia a la célula, también le permite desplazarse y realizar rearrreglos internos para crecer y dividirse (2). El citoesqueleto se compone de microfilamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios. El componente del citoesqueleto de actina es la proteína homónima que representa más del 20% de todas las proteínas celulares. La actina tiene la propiedad de polimerizarse y despolimerizarse, por lo que se encuentra en dos formas: actina monomérica o actina G y la filamentososa o actina F que se forma por la polimerización de actina G. Los filamentos de actina se caracterizan por ser polares, conteniendo un extremo positivo (+) en donde la polimerización es mayor y un extremo negativo (-) en donde la polimerización es menor (18). La polimerización de actina consta de tres pasos: A) fase de nucleación: Es la asociación inicial de 3 ó 4 monómeros de actina G-ATP, formando un oligómero que representa al núcleo de polimerización, B) fase de elongación: Es la agregación de actina G-ATP en el extremo + del oligómero para formar un filamento y C) fase estacionaria: Se refiere al estado de equilibrio entre la polimerización de actina G-ATP y la despolimerización de actina G en su forma ADP del filamento (60). El mecanismo de polimerización y despolimerización de actina, le confiere la característica al citoesqueleto de ser muy dinámico. Este mecanismo es regulado por proteínas asociadas (ARPs) y de unión (ABPs) a actina (19).

Dentro de las ABPs se encuentra una proteína llamada gelsolina, la cual fue descubierta por Yin y Stossel en 1979, que se caracteriza por disolver la actina en gel en actina en sol, de ahí su nombre (63, 55). Gelsolina es una proteína monomérica de 82 kDa que se encuentra en el citoplasma de todas las células eucariotas (38), con el aumento de la concentración micromolar de calcio en el citosol, sufre cambios conformacionales y se adhiere con 4 de sus 6 dominios a la actina F provocando el corte del filamento (13, 34, 38). También posee la propiedad de quedar adherida al extremo + del filamento que ha sido cortado, a esta propiedad se le llama recubrimiento o *capping*, evitando así la agregación de actina G o la unión de fragmentos entre si y en consecuencia la elongación de los mismos (47, 53). La gelsolina que se encuentra cubriendo el extremo + de la actina F y se desprende con un proceso denominado *uncapping* dependiente de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>), generando extremos + que propician la polimerización para formar nuevos filamentos en forma rápida (8). Gelsolina juega un papel importante en células de rápido desplazamiento, como neutrófilos, macrófagos ó fibroblastos (5, 11, 61).

Para que estas células puedan desplazarse es necesaria la polimerización activa de actina-G debajo de la membrana plasmática del borde director y con la propulsión de la polimerización se forman los lamelipodios, que son estructuras planas y anchas ricas en actina esenciales para el desplazamiento de la célula. El borde director es una estructura dinámica que requiere el recambio de actina F para la eficiente protrusión de la membrana celular, donde la gelsolina actúa de manera importante al coordinar sus funciones de corte y recubrimiento. En primer lugar, lleva a cabo el corte de los filamentos preexistentes lo que propicia la formación de nuevos filamentos que polimerizan para el desplazamiento de la membrana celular y en segundo lugar, genera zonas de despolimerización por medio del capping logrando el redireccionamiento del borde director (51, 52).

El citoesqueleto de actina es manipulado por bacterias patógenas para su beneficio, desencadenando mecanismos moleculares que les permiten internalizarse, desplazarse dentro de la célula hospedera y pasar de una célula a otra como por ejemplo *Listeria monocytogenes* o bien colonizar extracelularmente como lo hace *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) (28). *Listeria monocytogenes* es un patógeno intracelular Gram-positivo, caracterizado por su capacidad de inducir la polimerización de actina en uno de sus polos dando lugar a la formación de estructuras ricas en actina llamadas colas de actina que le proveen la fuerza de propulsión para desplazarse dentro de la célula hospedera y entre las células vecinas a esta. Las colas de actina son estructuras dinámicas, se han reportado la identificación de proteínas de unión a actina donde se cree que juegan un papel importante en su formación y mantenimiento. Dentro de estas proteínas se ha encontrado reclutada la gelsolina a todo lo largo de las colas y se piensa que la gelsolina lleva a cabo funciones de corte y capping que ayuda al reciclamiento de monómeros de actina y a la formación de pequeños filamentos listos para la polimerización que colaboran para el desplazamiento de la bacteria (16, 41, 42). EPEC es una bacteria Gram-negativa que causa gastroenteritis y problemas de mala absorción acompañado de diarrea acuosa persistente en individuos sanos provocando cientos de miles de muertes por año, principalmente en países subdesarrollados (48, 23). Además se han reportado cuadros diarreicos severos en animales jóvenes (lechones, gazapos, terneros, corderos, cachorros) asociados a EPEC (3, 35, 50, 64).

EPEC induce una alteración histopatológica a nivel intestinal conocida como lesión A/E (del inglés "attaching and effacing") (14).

La lesión se lleva a cabo mediante un mecanismo molecular complejo, que induce la reorganización del citoesqueleto de actina teniendo como consecuencia la destrucción de las microvelocidades y la formación de elevaciones ricas en actina llamadas "pedestales" en donde la bacteria se encuentra fuertemente adherida a la célula hospedera (26).

El mecanismo de patogenicidad de EPEC se ha caracterizado en 3 fases: 1) adherencia poco estrecha, 2) translocación de proteínas efectoras y transducción de señales, y 3) contacto íntimo y la formación del pedestal (12).

#### 1) Adherencia poco estrecha

La adherencia es el proceso inicial de la patogénesis, este puede ser separado en dos fases, la primera involucra la adherencia inicial entre las bacterias formando microcolonias mediado por el *pili* BFP (*Pil* formador de rizos) y la segunda como la adherencia de las microcolonias con la célula hospedera en un patrón conocido como adherencia localizada dependiente del flagelo (21, 49).

#### 2) Translocación de factores y transducción de señales.

La adherencia de EPEC provoca la activación de cascadas de señalización en el interior de la célula huésped que conllevan a la formación de la lesión A/E. Los genes responsables de desencadenar estos procesos se encuentran codificados en una isla de patogenicidad de 35.6 kb llamada LEE (del inglés "Locus of Enterocyte Effacement"), que codifica para las proteínas que conforman al Sistema de Secreción Tipo Tres (SSTT), la adhesina bacteriana de membrana externa llamada intimina, así como también para múltiples proteínas efectoras conocidas como Esp (del inglés "*E. coli* secreted proteins") y Tir (del inglés "translocated intimin receptor") (6, 20, 37). El SSTT le permite a EPEC secretar proteínas e inyectarlas directamente al citosol de la célula hospedera (17,32). Una vez en el citosol, Tir se inserta dentro de la membrana plasmática de la célula, exponiendo hacia el espacio extracelular un dominio conocido como TIBA (área de unión a intimina) actuando como receptor para intimina. Después de la unión de Tir con intimina, Tir es fosforilada en la tirosina 474 (Tyr474) desencadenando cascadas de señalización intracelular (59).

#### 3) Contacto íntimo y la formación del pedestal.

Una vez que Tir es fosforilado, la proteína adaptadora Nck es reclutada en el sitio de fosforilación, posteriormente Nck atrae, interacciona y activa a la proteína WASP (proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich) ésta a su vez, activa al complejo Arp 2/3, este último inicia la polimerización de actina hacia la zona donde Tir fue fosforilada provocando la adherencia con íntima de la bacteria con la célula hospedera y la formación del pedestal (27).

La polimerización activa de actina inducida por EPEC para la formación del pedestal está acompañada por el reclutamiento de otras proteínas reguladoras de actina, dentro de las cuales se ha encontrado a la gelsolina, aunque aún no se ha descrito con claridad la función de ésta en el pedestal, se cree que su función puede ser semejante a la que realiza en el borde director de las células de rápido desplazamiento y en las colas de actina de *Listeria monocytogenes*, en donde lleva a cabo funciones de *capping* y corte, que en conjunto con otras proteínas citoplasmáticas regulan la dinámica del citoesqueleto de actina (24, 57, 41).

Además de EPEC, existen otros patógenos que poseen la isla de patogenicidad LEE y tienen la capacidad de producir la lesión A/E (39, 10). Dentro de este grupo de patógenos se encuentra *Escherichia coli* enteropatógena para conejo (REPEC) la cual se considera como uno de los modelos más relevantes para el estudio de la patogénesis de EPEC y la formación de la lesión A/E en la célula hospedera (45). En nuestro laboratorio se ha logrado reproducir *in vitro* la formación de pedestales infectando células RK-13 con REPEC serotipo O103. Los mecanismos moleculares que dependen de EPEC para la formación de la lesión A/E, la destrucción de las microvellosidades, la adherencia íntima entre la bacteria y la célula hospedera, y la formación de los pedestales, han sido estudiados con detalle, pero los mecanismos moleculares del citoesqueleto de actina para la formación de los pedestales aún no han sido bien entendidos, si bien la gelsolina ya ha sido identificada en los pedestales producidos por EPEC, no se han realizado experimentos que la identifiquen en diferentes tiempos de la infección. Con el propósito de dar inicio al estudio de la dinámica de la gelsolina durante la formación de pedestales, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia para identificar gelsolina cada 30 min en células RK13 infectadas con REPEC, previamente se realizaron pruebas de conservación de la antigenicidad utilizando diferentes fijadores, mezclas de ellos a tiempos variables, así como la evaluación de dilución de los anticuerpos (Acs) y faloidina rodaminada para seleccionar la mejor opción.

## OBJETIVOS

### **Objetivo general**

Identificar subcelularmente a la proteína gelsolina en células RK-13 durante la infección por *Escherichia coli* enteropatógena para conejo (REPEC).

### **Objetivos particulares**

1. Realizar una prueba de conservación de la antigenicidad para la gelsolina y actina utilizando diferentes fijadores para seleccionar el que permita su mejor visualización.
2. Realizar pruebas con diferentes diluciones de los anticuerpos primarios (anti-gelsolina) y secundarios (anti-cabra fluoresceinado hecho en cerdo) así como de faloidina rodaminada para seleccionar la combinación que permita visualizar mejor la marca de gelsolina y actina.
3. Establecer la cinética de distribución de la gelsolina al infectar células RK-13 con REPEC por el método de inmunofluorescencia.
4. Corroborar mediante microscopía confocal, la colocalización de la marca de gelsolina con la marca de actina en los pedestales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cultivo celular:

En este trabajo se utilizaron células RK-13 provenientes de células epiteliales de riñón de conejo (ATCC-CCL37, Rockville, MD, USA), las cuales se propagaron inicialmente en Medio Mínimo Esencial (MEM) (Gibco, Grand Island, N.Y.) suplementado con: aminoácidos no esenciales 1% (Gibco), piruvato de sodio al 1% (Gibco), penicilina (100 UI/ml) , estreptomycin (100 µg/ml) (Gibco) y 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco); en cajas para cultivo celular de 60 mm x 15 mm (Corning, NY) y mantenidas en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C hasta alcanzar una confluencia del 80%. Rutinariamente las células se disgregaron con 0.5 ml de tripsina al (0.25%) (Gibco) y EDTA (J.T Baker) 10 mM en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y se resuspendieron en un volumen de 2 ml para ser contadas en un hemocitómetro de Neubauer. Para su uso experimental las células fueron sembradas en cajas de 22 x 74 mm con 8 pozos (Nalge Nunc Inc.,) a una densidad inicial de  $5 \times 10^4$  células/pozo y se incubaron a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> hasta alcanzar una confluencia del 80% (aprox. 24 horas) (25, 29, 59).

### Cultivo bacteriano

La cepa que se utilizó en este trabajo fue: E22, *Escherichia coli* enteropatógena para conejo (REPEC) O103. La cepa fue crecida en 2 ml de caldo Luria Bertoni (LB), se incubó toda la noche a 37°C en agitación a 150 rpm. Al día siguiente, el cultivo bacteriano (CB) se activó en MEM sin suplementos utilizando una dilución 1:20 y se creció a 37°C por 2 h en condiciones estáticas, posteriormente se tomó una muestra de 10 µl y se midió su densidad óptica a 600 nm de longitud de onda (D.O. <sub>600</sub>) (1, 10, 45)

La cantidad de CB inicial para infectar las células se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\# \text{ Células por pozo} \times \# \text{ de bacterias por célula (MOI)}}{5 \times 10^8 \times \text{D.O.}_{600}} \times 1000 = \mu\text{l de CB}$$

En donde:

En nuestros experimentos el número de células por pozo fue de 100,000 y se consideró una MOI de 40. La densidad óptica de 0.550 y la constante  $5 \times 10^8$  se refiere a la cantidad de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de *E. coli* con un valor de 1 en D.O. <sub>600</sub>

### Anticuerpos (Acs)

El anticuerpo primario (Ac) usado en este estudio fue el policlonal IgG anti-gelsolina producido en cabra (Goat polyclonal IgG, Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, CA) y como Ac secundario se utilizó un policlonal IgG cerdo anti-cabra conjugado con fluoresceína (Swine anti-goat IgG fluorescein conjugate, Biosource, Camarillo, CA). El citoesqueleto de actina fue marcado con faloidina acoplada a rodamina (F.R.) (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO) (24, 25).

### Reactivos

Los fijadores fueron: Paraformaldehído 3% (Paf 3%) (Electrón Microscopy Sciences, Hatfield, PA), Glutaraldehído 1% (gluta 1%) (Merck Inc.), formaldehído 3.7% (J.T. Baker). Cloruro de calcio (Research Organic, Cleveland) (7, 24, 25, 33).



### **Comparación de fijadores como pruebas de conservación de la antigenicidad de proteínas del citoesqueleto de actina**

Se crecieron células RK-13 en cajas de 22 x 74 mm con 8 pozos, después fueron fijadas con diferentes aldehídos como glutaraldehído 1% (gluta 1%), paraformaldehído 3% (paf 3%), y formaldehído 3.7%, así como con las siguientes mezclas: paf 3% con gluta 1% y Karnovsky (paf 1% con gluta 1.5% más cloruro de calcio al 0.002 %). La fijación se realizó durante 20 min, 1 h, y 2 h. Posteriormente fueron permeabilizadas con Tritón-X100 (0.1%) en PBS durante 10 min. (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO), y se bloquearon con Albúmina Sérica Bovina (BSA) al 1% en PBS durante 30 minutos (Research Organic, Cleveland). Después se agregó el anticuerpo anti-gelsolina (1:20) en PBS, se incubó en cámara húmeda a 4 °C toda la noche, al siguiente día se agregó el anticuerpo secundario en una dilución 1:20 en PBS y se dejó 2 horas a temperatura ambiente, en seguida se marcó con actina-F con faloidina rodaminada (1:100) en PBS por 20 min. Después de cada paso las muestras se lavaron 5 veces en PBS. Finalmente, las muestras se montaron agregando Vecta Shield (Vector Laboratories, Burlingame, CA.) y cubriendo la preparación con un cubreobjetos. Las muestras fueron analizadas con un microscopio de epifluorescencia Leica DM4500 B (7, 33).

### **Prueba de diferentes diluciones de los anticuerpos primario, secundario y faloidina rodaminada.**

Se crecieron células RK-13 en cajas de 22 x 74 mm con 8 pozos, después fueron fijadas con la mezcla paf 3% con gluta 1% durante 20 minutos. Las muestras se permeabilizaron con Triton X-100 al 0.1% durante 10 min y se bloquearon con BSA al 1% por 30 min, posteriormente las muestras fueron organizadas en 7 pruebas, cada una con diferentes diluciones de los anticuerpos primario, secundario y faloidina rodaminada, estas pruebas se realizaron por triplicado (Cuadro 1).

En los grupos I y II, se utilizaron la misma dilución de faloidina rodaminada (1:100) y de anticuerpo primario (1:20) variando solo el anticuerpo secundario: 1:20 (grupo I) y 1:100 (grupo II). Para el grupo III, faloidina rodaminada se utilizó 1:100, el anticuerpo primario en 1:50 y secundario en 1:100. Grupos IV y V se usó la misma dilución de faloidina rodaminada (1:50) variando la de anticuerpo primario: 1:20, 1:50 y de anticuerpo secundario 1:20, 1:100 respectivamente. A los grupos VI y VII se les consideró como grupos control donde no se agregó anticuerpo primario, para descartar falsos positivos por parte del anticuerpo secundario. Usando una dilución 1:20 del anticuerpo secundario para ambos grupos, y solo para el grupo VI se usó faloidina rodaminada a una dilución de 1:100. En todas las muestras, el anticuerpo primario se incubó en cámara húmeda a 4 °C toda la noche, al siguiente día se agregó el anticuerpo secundario y se dejó 2 horas a temperatura ambiente, en seguida se marcó actina F incubando con faloidina rodaminada por 20 minutos, después de cada paso las muestras se lavaron 5 veces en PBS. Finalmente, las muestras se montaron agregando Vecta Shield y cubriendo la preparación con un cubreobjetos y fueron analizadas con un microscopio de epifluorescencia (36, 43, 54).

**CUADRO 1.  
PRUEBA CON DIFERENTES DILUCIONES DE ANTICUERPOS  
Y FALOIDINA RODAMINADA**

PRUEBA*	DILUCION		
	Ac Primario/ PBS	Ac Secundario/ PBS	FR/ PBS
I	1:20	1:20	1:100
II	1:20	1:100	1:100
III	1:50	1:100	1:100
IV	1:20	1:20	1:50
V	1:50	1:100	1:50
VI		1:20	1:100
VII		1:20	

Los anticuerpos primarios (anti-gelsolina hecho en cabra), secundario (anti-cabra fluoresceinado hecho en cerdo) y faloidina rodaminada se probaron a diferentes diluciones. \*Cada prueba se trabajó por triplicado.

### **Ensayos de inmunofluorescencia.**

Las células RK-13 crecidas en cajas de 22 x 74 mm con 8 pozos fueron infectadas a diferentes tiempos con los cultivos bacterianos de REPEC (MOI: 40). A partir de las 2 h de infección se tomaron muestras, con intervalos de 30 min, hasta las 5 horas y se fijaron con la mezcla Paf 3% más gluta 1% durante 20 min, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.1% en PBS durante 10 minutos y se bloquearon con BSA al 1% en PBS durante 30 minutos. Después se agregó el anticuerpo anti-gelsolina (1:20) en PBS, se incubó en cámara húmeda a 4 °C toda la noche; al siguiente día se agregó el anticuerpo secundario fluoresceinado (1:20) en PBS y se dejó 2 horas a temperatura ambiente, en seguida se adicionó faloidina rodaminada para marcar actina-F incubando por 20 min, después de cada paso las muestras se lavaron 5 veces en PBS. Finalmente, las muestras se montaron agregando Vecta Shield y cubriendo la preparación con un cubreobjetos para ser analizadas al microscopio de confocal Leica TCS SP2 y de epi fluorescencia Leica DM4500 B (24, 25, 57).

## RESULTADOS

### Prueba de fijadores en células RK13 para la marca de gelsolina.

Con la finalidad de determinar con que fijador o mezcla de fijadores se obtienen las imágenes adecuadas de células RK13 en ensayos de inmunofluorescencia de doble marcaje, se realizaron pruebas con varios fijadores a diferentes tiempos seleccionando el que mejor permita la visualización de la marca de actina y gelsolina con base en los siguientes parámetros cualitativos (Cuadro 2):

- 1) Localización intracelular del fluorocromo
- 2) Adecuada intensidad de la fluorescencia
- 3) Distribución citoplasmática de la fluorescencia para la gelsolina y visualización adecuada de las fibras de actina

CUADRO 2.

### RESULTADOS DE LA PRUEBA DE FIJACIÓN DE CÉLULAS RK-13 PARA OBSERVAR LA MARCA DE GELSOLINA Y ACTINA.

Fijador	Gelsolina			Actina		
	2h	1h	20min	2h	1h	20min
Glutaraldehído 1%	-	+	-	+/-	+/-	-
Paf 3% + Gluta 1%	+	+	+	-	+	+
Karnovsky	+	+	+	-	-	-
Paf 3%	-	-	-	+	+	+
Formaldehído 3.7%	-	-	-	+	+	+

(+) Cumplió con los 3 parámetros, (+/-) cumplió con 2 parámetros, (-) cumplió con 1 ó ninguno de los parámetros.

Los fijadores y el tiempo que dieron mejores resultados fueron la mezcla de paf 3% más gluta 1% durante 20 min (Fig. 3), ya que en estas preparaciones las células mostraron una mejor visualización de la marca de gelsolina y actina. En las muestras preparadas a las 2 horas, con gluta 1%, la mezcla de Paf 3% con Gluta 1% y Karnovsky se visualizaron claramente la marca de gelsolina, sin embargo, la marca de actina perdió definición (Fig.1). en cambio, en las muestras fijadas con formaldehído 3.7% y con paf 3% mostraron las fibras de estrés

bien definidas pero no así la marca de gelsolina (Fig. 1). A 1h de fijación, con gluta 1% y Karnovsky se observó la marca de gelsolina pero no la de actina (Fig. 2). Con formaldehído 3.7% y Paf 3% se mostró adecuadamente la marca de actina pero no la de gelsolina (Fig. 2) y con la mezcla de Paf 3% y gluta 1% se observaron ambas marcas adecuadamente (Fig. 2). A los 20 min, la fijación con gluta 1% y Karnovsky se obtuvo una visualización adecuada de la marca de gelsolina pero no de actina, con formaldehído 3.7% y paf 3% se logró observar claramente las fibras de estrés sin embargo la marca de gelsolina no se visualizó, no obstante la fijación con la mezcla de paf 3% y gluta 1% permitió la observación de actina y gelsolina (Fig. 3).

### **Diluciones de los anticuerpos y faloidina rodaminada**

Con el propósito de definir con que dilución de anticuerpo primario (anti-gelsolina), anticuerpo secundario (fluoresceinado) y faloidina rodaminada se observa adecuadamente la marca de gelsolina y actina, se prepararon muestras de células RK-13 fijándolas con paf 3% y gluta 1% durante 20 minutos, posteriormente se permeabilizaron, bloquearon y se les adicionaron los anticuerpos y la faloidina rodaminada como se muestra en el cuadro 3.

Se observó que usando la dilución 1:20 de anticuerpo primario, 1:20 de anticuerpo secundario y 1:100 de faloidina rodaminada permitió apreciar con claridad la marca de gelsolina (verde) y las fibras de estrés del citoesqueleto de actina (rojo) en microscopia confocal y de epifluorescencia (Fig. 4). Utilizando una dilución 1:20 y 1:50 de anticuerpo primario con 1:100 de anticuerpo secundario se observó una marca débil de gelsolina. Los filamentos de actina se observaron de forma clara marcándolos con una dilución 1:100 y 1:50 de faloidina rodaminada. La marca de gelsolina no se observó al utilizar solamente anticuerpos secundarios, así como tampoco la marca de actina cuando no se agregó faloidina rodaminada.

**CUADRO 3.**  
**RESULTADOS DE LA DILUCIÓN DE Ac PRIMARIO, SECUNDARIO Y**  
**FALOIDINA RODAMINADA PARA VISUALIZAR LA MARCA DE GELSOLINA Y**  
**ACTINA CÉLULAS RK-13.**

Dilución		Faloidina Rodaminada	Gelsolina	Actina
Anticuerpo				
1º	2º			
1:20	1:20	1:100	+	+
1:20	1:100	1:100	+ -	+
1:50	1:100	1:100	+ -	-
1:20	1:20	1:50	+	+
1:50	1:100	1:50	+ -	+
-	1:20	1:100	-	+
-	1:20	-	-	-

(+) La marca se observó claramente, (-) no se observó la marca y (+ -) se observó la marca débilmente.

#### Reclutamiento a los pedestales y colocación de gelsolina con actina durante la infección por REPEC.

Con la finalidad de ver la distribución de gelsolina durante la formación de pedestales en la infección de células RK-13 con REPEC se prepararon muestras en diferentes tiempos postinfección.

A las 2 horas de infección se observaron pedestales de 2.77  $\mu\text{m}$  de longitud (en promedio), a lo largo de los cuales se observó marca positiva para gelsolina (verde), además se vio colocación con actina (rojo) como se muestra en la Fig. 5. A las 2.5 horas de infección se observaron pedestales de 5.78  $\mu\text{m}$  de longitud a lo largo de los cuales se observó reclutamiento de gelsolina, además también se vio colocación con actina (Fig. 6).

A las 3 horas de infección se identificaron pedestales de 4.24  $\mu\text{m}$  de longitud (en promedio) a lo largo de los cuales se observó el reclutamiento de gelsolina (verde) y que ésta colocaliza con actina (rojo) como se muestra en la Fig. 7. A las 3.5 horas de infección se observaron pedestales de 5.38  $\mu\text{m}$  de longitud a lo largo de los cuales se observó reclutamiento de gelsolina, además también se observó colocación con actina (Fig. 8).

A las 4 horas de infección se observaron pedestales de 5.23  $\mu\text{m}$  de longitud a lo largo de los cuales se observó marca positiva para gelsolina (verde), además se vio colocalización con actina (rojo) como se muestra en la Fig. 9. A las 4.5 horas de infección se observaron pedestales de 5.29  $\mu\text{m}$  de longitud a lo largo de los cuales se observó reclutamiento de gelsolina, además también se vio colocalización con actina (Fig. 10). A las 5 horas de infección se observaron pedestales de 8.41  $\mu\text{m}$  de longitud a lo largo de los cuales se observó marca positiva para gelsolina (verde), además se vio colocalización con actina (rojo) como se muestra en la Fig. 11.

## ANÁLISIS USANDO DIFERENTES TIEMPOS DE FIJACIÓN Y DILUCIONES DE LOS ANTICUERPOS\*

**Figura 1. Prueba de conservación de la antigenicidad con distintos fijadores durante 2 h.** Células RK13 fueron fijadas por 2h con los fijadores y mezclas de fijadores en estudio, gluta 1%, mezcla de paf 3% más gluta 1%, Karnovsky, paf 3% y formaldehído 3.7%. Se marcó gelsolina con anticuerpos policlonales y actina con faloidina rodamina.

**Figura 2. Prueba de conservación de la antigenicidad con distintos fijadores durante 1 h.** En este experimento las células RK13 fueron fijadas por 1 h con los mismos fijadores y mezclas usados en el experimento anterior. También se marcó gelsolina con anticuerpos policlonales y actina con faloidina rodamina.

**Figura 3. Prueba de conservación de la antigenicidad con distintos fijadores durante 20 min.** Para completar el estudio, células RK13 fueron fijadas solo por 20 min con los fijadores en estudio. Se marcó igual gelsolina y actina y se analizaron las muestras por epifluorescencia.

**Figura 4. Estudio comparativo de diferentes diluciones de los anticuerpos y faloidina rodamina.** Células RK-13 fueron fijadas con la mezcla de paf 3% más gluta 1% durante 20 min. Cada muestra se incubó con diferentes diluciones de anticuerpo primario, secundario y faloidina rodamina. Al microscopio de epifluorescencia se observó que la dilución 1:20 de Ac primario y secundario con 1:100 de faloidina rodamina se mostró adecuadamente la marca de gelsolina y actina, a diferencia de la dilución 1:50 de Ac primario y 1:100 de Ac secundario donde se observó pobremente la marca de gelsolina. La marca de actina se ve con claridad al utilizar faloidina rodamina con una dilución 1:50 y 1:100. Al agregar sólo el anticuerpo secundario se observó un fondo oscuro lo que indica que no se presenta reacciones inespecíficas del anticuerpo secundario.

\*Las imágenes correspondientes a estas figuras se presentan en las siguientes páginas, se anotan aquí los pies de figura debido al tamaño en que se presentan las mismas con el fin de poder observar con claridad los resultados.



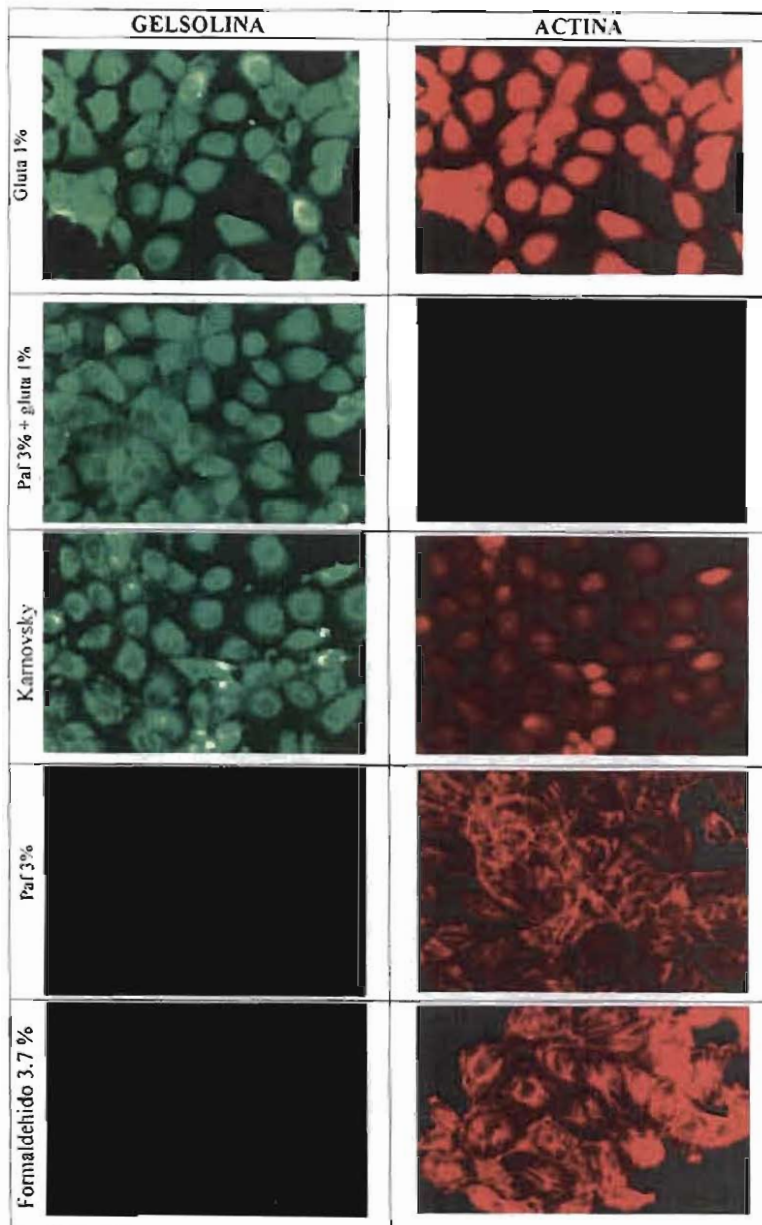


Figura 1. Prueba de conservación de la antigenicidad con distintos fijadores durante 2 h. Ver pie de figura en la página 16.

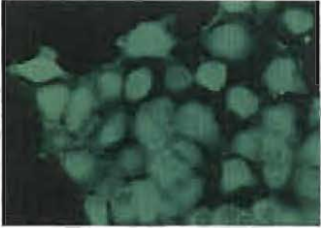







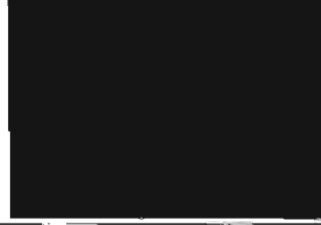

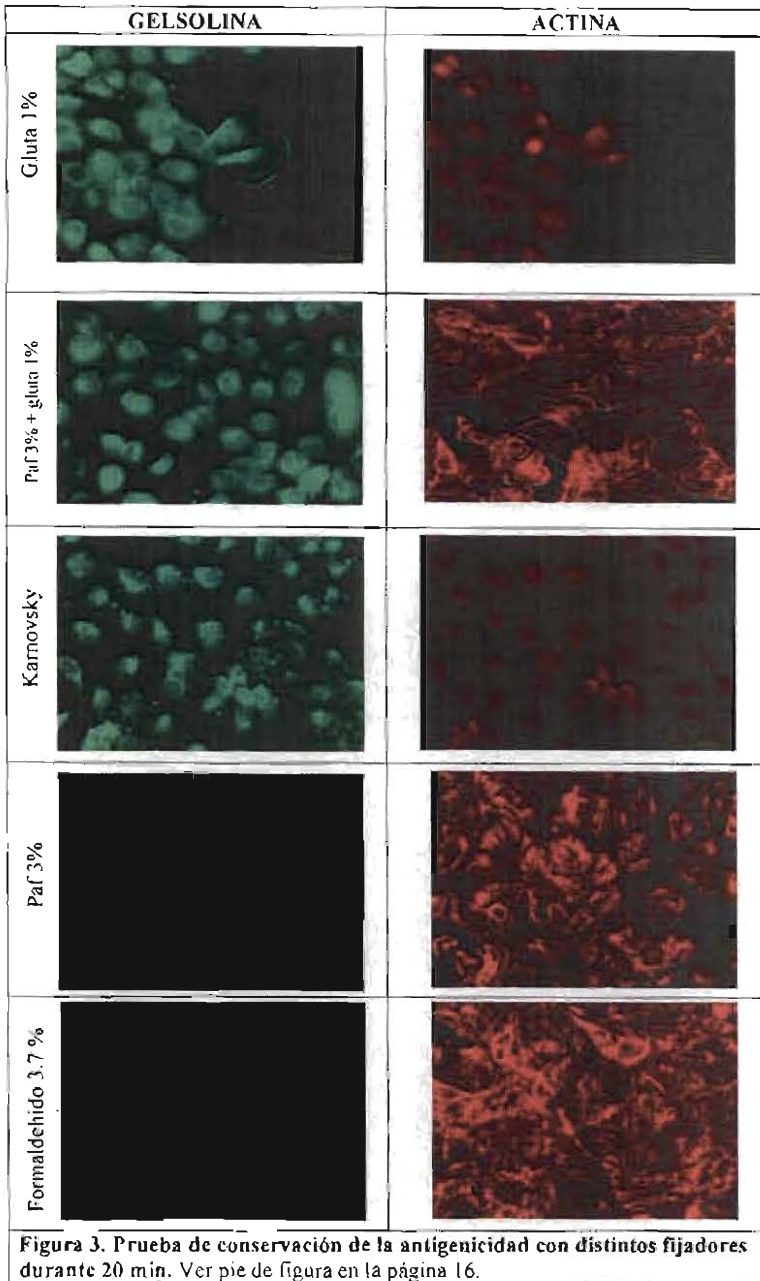
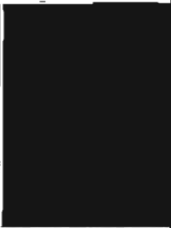


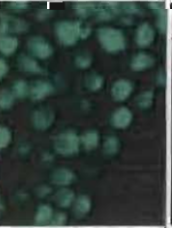


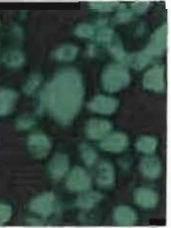
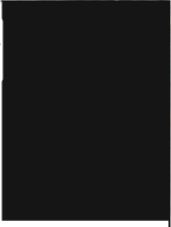






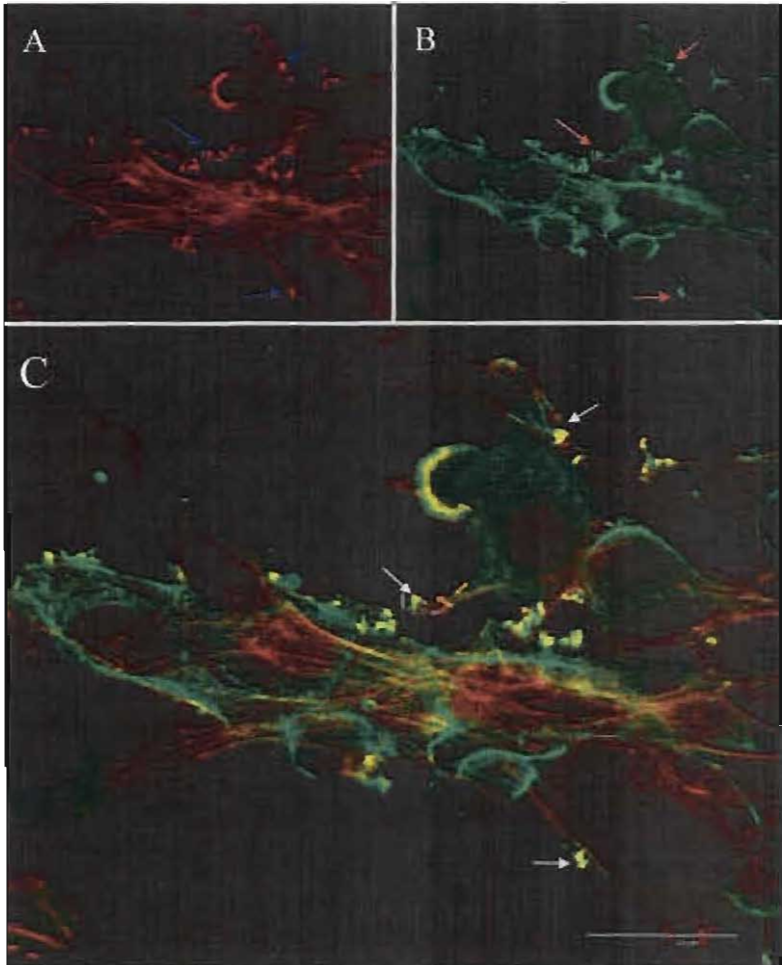
	GELSOLINA	ACTINA
Gluta 1%		
Paf 3% + gluta 1%		
Karnovsky		
Paf 3%		
Formaldehido 3.7%		

Figura 2. Prueba de conservación de la antigenicidad con distintos fijadores durante 1 h. Ver pie de figura en la página 16.

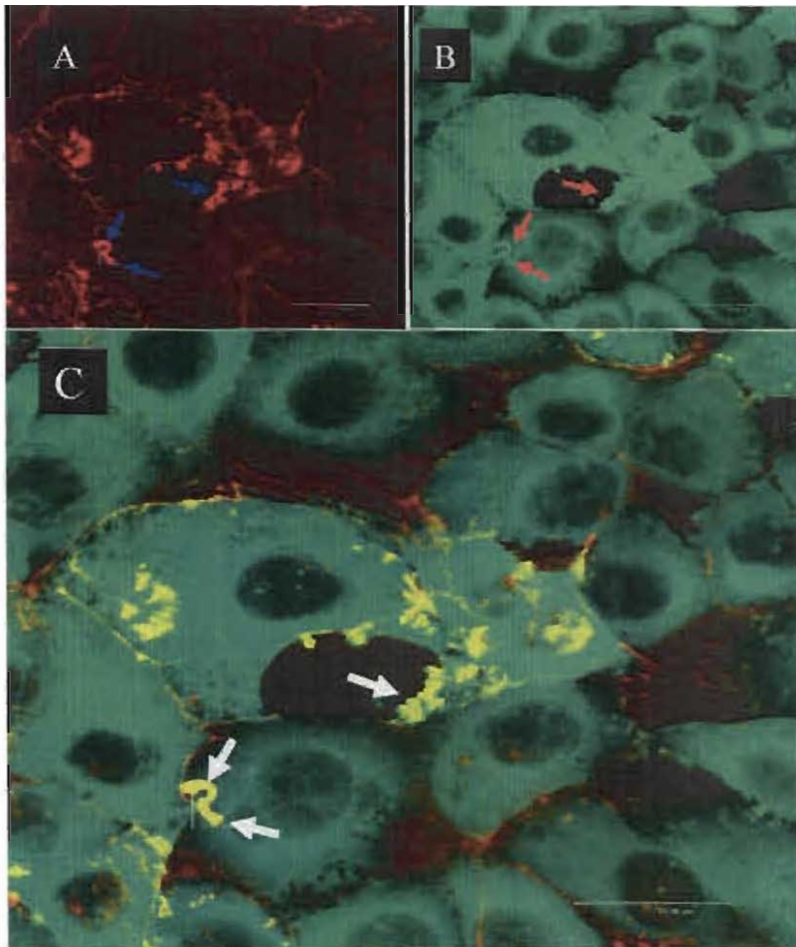


<b>Figura 4. Comparación de diluciones de anticuerpos y faloidina rodaminada. Ver pie de figura en la página 16.</b>	Dilución Ac secundario 1:20	Dilución Ac secundario 1:20	Dilución Ac primario 1:50 y Ac secundario 1:100	Dilución Ac primario y secundario 1:20	Dilución Ac primario 1:50 y Ac secundario 1:100	Dilución Ac primario 1:20 y Ac secundario 1:100	Dilución Ac primario y secundario 1:20	GELSOLINA
								
Sin Faloidina Rodaminada	Dilución Faloidina rodaminada 1:100	Dilución Faloidina rodaminada 1:50	Dilución Faloidina rodaminada 1:50	Dilución Faloidina rodaminada 1:100	Dilución Faloidina rodaminada 1:100	Dilución Faloidina rodaminada 1:100	Dilución Faloidina rodaminada 1:100	ACTINA
								



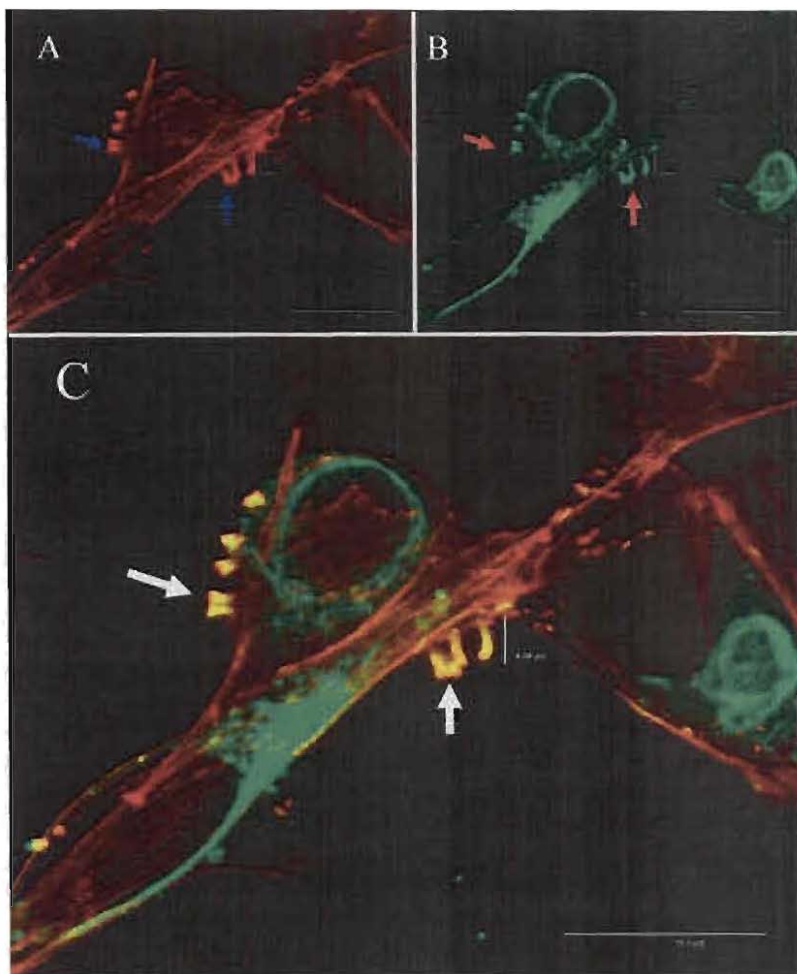
**Figura 5. Análisis de la localización de actina y gelsolina en células RK-13, 2 h después de ser infectadas con REPEC.**

Cultivos de células RK-13 fueron infectados con REPEC durante 2 h, posteriormente se prepararon las muestras para inmunofluorescencia como se describe en la metodología. (A) Pedestales ricos en actina (flechas azules) (B) Marca de gelsolina en pedestales (flechas rojas). (C) Imagen sobrepuesta de A y B donde se observa la colocalización de la marca de gelsolina con la marca de actina en los pedestales (flechas blancas). Microscopía confocal, 120 $\times$ .



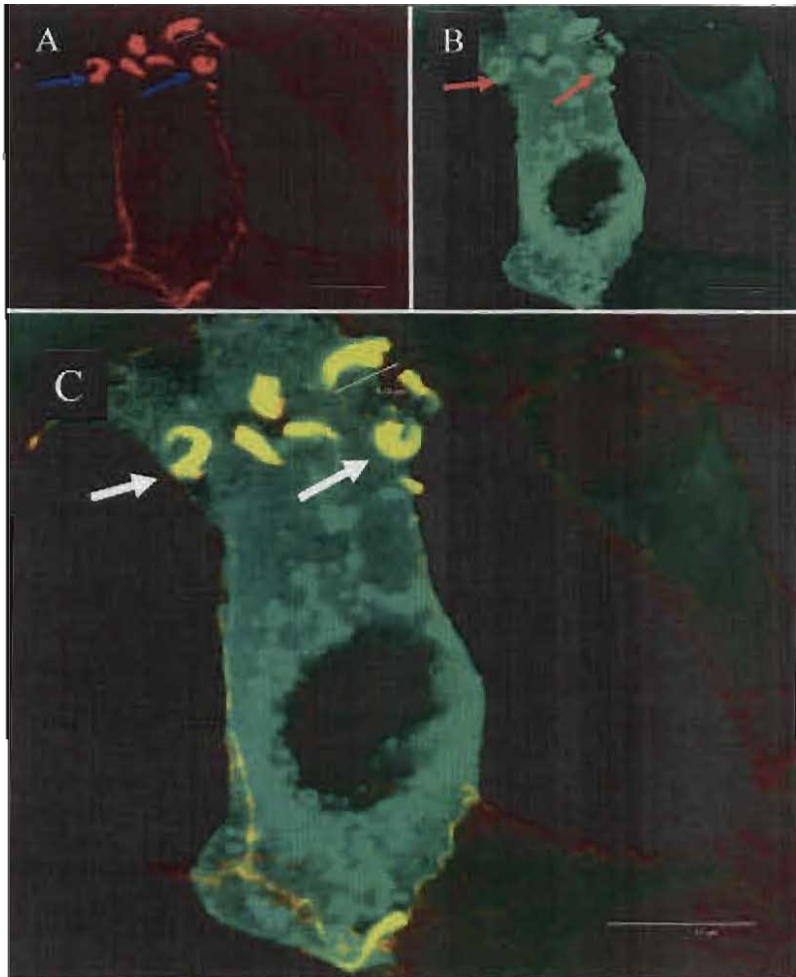
**Figura 6. Análisis de la localización de actina y gelsolina en células RK-13, 2.5 h después de ser infectadas con REPEC.**

Cultivos de células RK-13 fueron infectados con REPEC durante 2.5 h, luego se prepararon las muestras para inmunofluorescencia como se describe en la metodología. (A) Pedestales ricos en actina (flechas azules). (B) Marca de gelsolina en pedestales (flechas rojas). (C) Imagen sohrepuesta de A y B donde se observa la colocalización de la marca de gelsolina con la marca de actina en los pedestales (flechas blancas). Microscopía confocal, 120 $\times$ .



**Figura 7. Análisis de la localización de actina y gelsolina en células RK-13, 3 h después de ser infectadas con REPEC.**

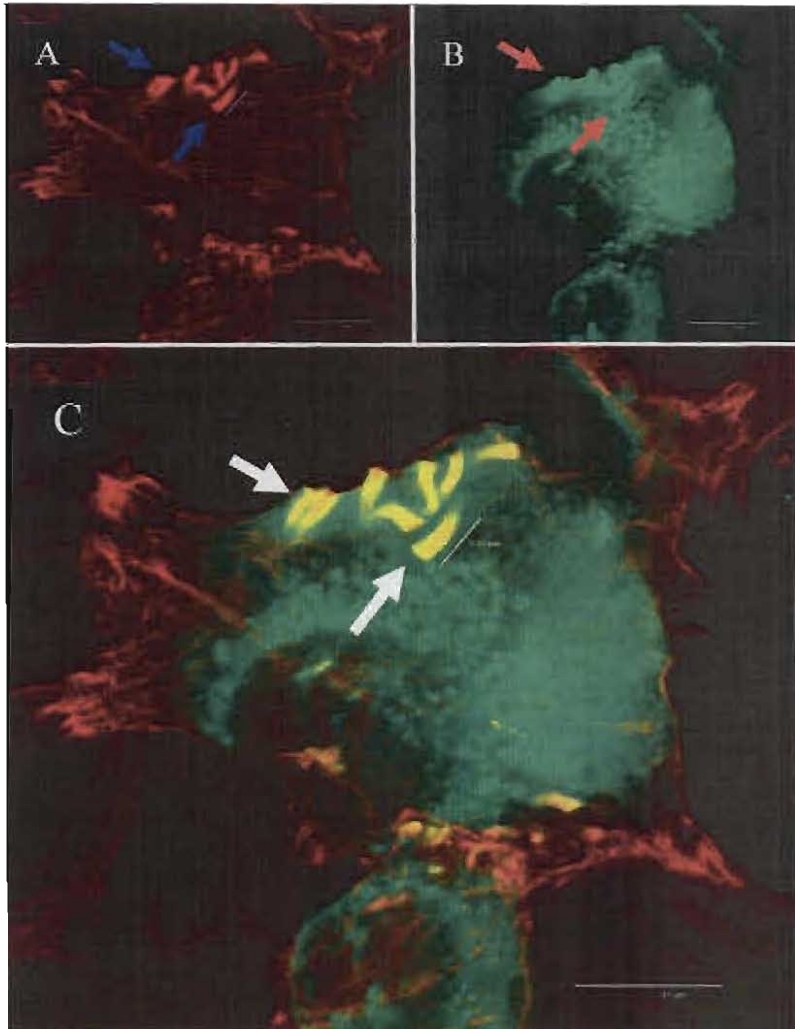
Cultivos de células RK-13 fueron infectados con REPEC durante 3 h, seguido de esto se prepararon las muestras para inmunofluorescencia como se describe en la metodología. (A) Pedestales ricos en actina (flechas azules). (B) Marca de gelsolina en pedestales (flechas rojas). (C) Imagen superpuesta de A y B donde se observa la colocalización de la marca de gelsolina con la marca de actina en los pedestales (flechas blancas) Microscopía confocal, 240x.



**Figura 8. Análisis de la localización de actina y gelsolina en células RK-13, 3.5 h después de ser infectadas con REPEC.**

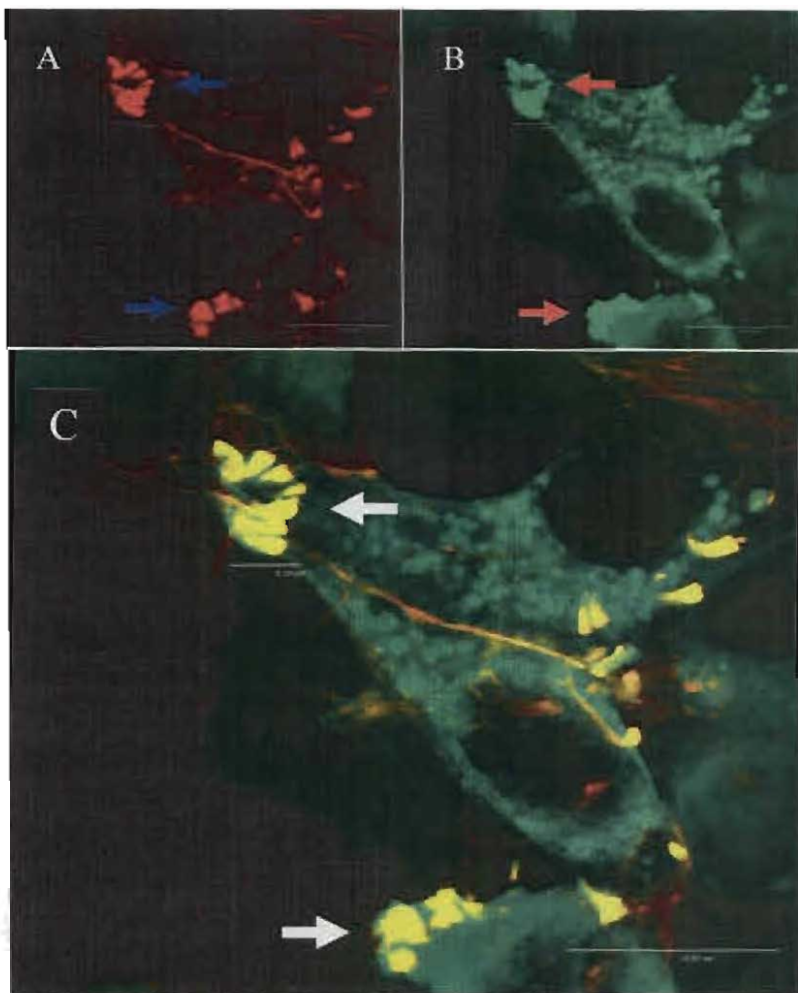
Cultivos de células RK-13 fueron infectados con REPEC durante 3.5 h, en seguida se prepararon las muestras para inmunofluorescencia como se describe en la metodología. (A) Pedestales ricos en actina (flechas azules). (B) Marca de gelsolina en pedestales (flechas rojas). (C) Imagen superpuesta de A y B donde se observa la colocalización de la marca de gelsolina con la marca de actina en los pedestales (flechas blancas). Microscopio confocal, 240x.





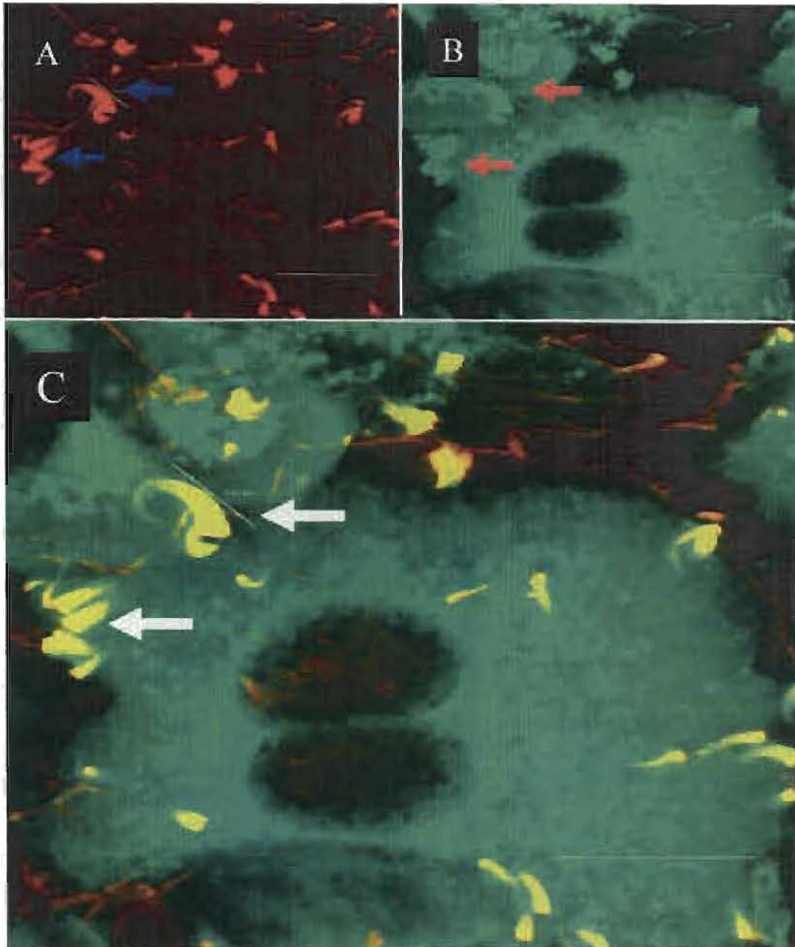
**Figura 9. Análisis de la localización de actina y gelsolina en células RK-13, 4 h después de ser infectadas con REPEC.**

Cultivos de células RK-13 fueron infectados con REPEC durante 4 h, después de lo cual se prepararon las muestras para inmunofluorescencia como se describe en la metodología. (A) Pedestales ricos en actina (flechas azules). (B) Marca de gelsolina en pedestales (flechas rojas). (C) Imagen sobrepuesta de A y B donde se observa la colocalización de la marca de gelsolina con la marca de actina en los pedestales (flechas blancas). Microscopía confocal, 240x.



**Figura 10. Análisis de la localización de actina y gelsolina en células RK-13, 4.5 h después de ser infectadas con REPEC.**

Cultivos de células RK-13 fueron infectados con REPEC durante 4.5 h, tras lo cual se prepararon las muestras para inmunofluorescencia como se describe en la metodología. (A) Pedestales ricos en actina (flechas azules) (B) Marca de gelsolina en pedestales (flechas rojas). (C) Imagen sobrepuesta de A y B donde se observa la colocalización de la marca de gelsolina con la marca de actina en los pedestales (flechas blancas). Microscopía confocal, 240x.



**Figura 11. Análisis de la localización de actina y gelsolina en células RK-13, 5 h después de ser infectadas con REPEC.**

Cultivos de células RK-13 fueron infectados con REPEC durante 5 h, posteriormente se prepararon las muestras para inmunofluorescencia como se describe en la metodología. (A) Pedestales ricos en actina (flechas azules) (B) Marca de gelsolina en pedestales (flechas rojas). (C) Imagen sobrepuesta de A y B donde se observa la colocalización de la marca de gelsolina con la marca de actina en los pedestales (flechas blancas). Microscopía confocal, 240x.

## DISCUSIÓN

La fijación es un factor importante para la visualización de las proteínas al realizar ensayos de inmunofluorescencia (36, 54). Las pruebas de conservación de la antigenicidad en células utilizando diferentes fijadores y tiempos de fijación son muy útiles, en este caso, permitió elegir el fijador y el tiempo más adecuado para visualizar la marca de gelsolina y actina en la misma preparación. Para nuestros experimentos la mezcla de fijadores utilizada fue paf 3% con gluta 1% durante 20 min. En comparación con lo reportado por otras investigaciones donde para identificar las mismas proteínas se utilizaron distintas concentraciones de otros fijadores como paraformaldehído 3% (29) y 4% (44), formaldehído 3% (4). La fijación óptima depende de distintos factores como la concentración del fijador y el tiempo de fijación, también es importante considerar la temperatura ambiente y el manejo post-fijación de la muestra (43). Los resultados obtenidos al fijar células con un solo fijador como gluta 1% solo permitió la visualización de la marca de gelsolina pero no de actina. Por otra parte la fijación con paf 3% y formaldehído 3.7 % si permitió la visualización de los filamentos de actina pero no de gelsolina. Se ha reportado que al utilizar un solo fijador es más frecuente que se provoquen cambios conformacionales en las proteínas y/o bloquear el acceso del reactivo con los epítopes antigénicos logrando así falsos negativos (36). Los fijadores anteriores tienen limitaciones, por ello han sido probados en muchas combinaciones, algunas han demostrado ser excelentes fijadores como es en el caso de la mezcla paf 3% con gluta 1% en tiempos de 20 min y 1 h de fijación utilizadas en este trabajo (46), sin embargo es importante mencionar que la misma mezcla con un tiempo de fijación de 2 h no permitió visualizar la marca de actina pero si la de gelsolina, igual que los resultados obtenidos con la mezcla de Karnovsky en sus diferentes tiempos, reafirmando la idea de que el tiempo de fijación y el tipo de fijador si influye para la adecuada observación de las proteínas celulares. A lo largo de diferentes investigaciones, se ha observado que son múltiples los factores que pueden afectar la visualización de las proteínas en ensayos de inmunofluorescencia y hasta el momento no se ha logrado entender con certeza el mecanismo por medio del cual los fijadores influyen sobre la visualización de las proteínas (7, 33). Por ello se recomienda llevar a cabo pruebas de conservación de la antigenicidad con diferentes fijadores y mezclas de estos a distintas proporciones para estandarizar las condiciones bajo las cuales se obtiene la visualización óptima de la proteína a estudiar.

Por otra parte, después de la infección de RK-13 por REPEC, ésta induce la formación de elevaciones ricas en actina llamadas pedestales, justo por debajo de la superficie de contacto íntimo (31), esto hace que este modelo sea útil para estudiar los mecanismos de patogenicidad bacterianos involucrados en la formación de pedestales (1, 45, 56). Estas elevaciones están constituidas por filamentos de actina y también por proteínas reguladoras de ésta, como la gelsolina (30). Goosney y col., observaron que la gelsolina es reclutada en los pedestales a las 5 h de infección; con la finalidad de estudiar la dinámica de actina en tiempos más tempranos, se infectaron células RK-13 con REPEC, se tomaron muestras a diferentes tiempos de la infección y al ser procesadas por inmunofluorescencia de doble marcaje se observó a las 2 horas de infección una marca intensa de gelsolina en toda la extensión de los pedestales que se mantuvo constante en el transcurso de las diferentes muestras hasta las 3 horas de infección, es importante resaltar que la marca de gelsolina colocalizó con la de actina en los pedestales durante todo el tiempo estudiado. Lo cual sugiere que la gelsolina puede estar llevando a cabo alguna función en el pedestal. La gelsolina, es una proteína sensible a  $Ca^{2+}$  de distribución citoplasmática, cumple con la función de cortar filamentos de actina, realizar el recubrimiento por el extremo + de los filamentos cortados y generar extremos listos para la polimerización al momento de desprenderse de estos, asimismo puede actuar como un factor nucleador para la formación de nuevos filamentos de actina (15, 40, 62). Se ha sugerido que al reclutarse en el sitio de adhesión de EPEC, la gelsolina promueve, por medio del corte de los filamentos preexistentes, la formación de pequeños filamentos listos para la polimerización que dan origen al pedestal y mantienen su estructura (22, 24). Tanto los pedestales formados por EPEC como las colas de actina de *Listeria monocytogenes* son estructuras que se considera semejantes entre sí, en términos de composición y dinámica (57). Se ha reportado que en experimentos *in vivo* e *in vitro*, la gelsolina es reclutada en las colas de actina entre las 3 y 5 h después de la infección de la bacteria en la célula hospedera, mostrando un patrón de distribución similar al observado en los pedestales de nuestros experimentos utilizando el modelo de infección RK-13/REPEC, así como también en los reportados por Goosney (24), utilizando el modelo de infección HeLa/EPEC, en los que se observa localizada a todo lo largo de los pedestales y colas de actina (41).

Estas investigaciones sugieren que la función de la gelsolina en las colas de actina se basa en su naturaleza intrínseca, combinando sus funciones de corte de actina-F, recubrimiento y desprendimiento de los mismos para la formación de nuevos filamentos cuya finalidad es regular la polimerización de actina durante el desplazamiento de la bacteria (41, 42).

La función de la gelsolina en los pedestales no ha sido aclarada, sin embargo los indicios de otras investigaciones en conjunto con los resultados obtenidos en estos experimentos, en los que se muestra el reclutamiento de gelsolina en el pedestal durante la infección de REPEC en células RK-13 y la colocación de ésta con la marca de actina en todos los tiempos de infección muestreados, sugieren que probablemente la gelsolina regula el citoesqueleto de actina inmerso en el pedestal combinando sus funciones de corte de actina-F, recubrimiento y desprendimiento de los mismos, con lo cual genera nuevos filamentos que en conjunto con otras proteínas mantienen la dinámica intrínseca del pedestal.

## CONCLUSIONES

- a. El fijador y el tiempo de fijación que permitió la visualización adecuada de la marca de gelsolina y actina en células RK13 fue la mezcla de paf al 3% con gluta 1% por 20 min.
- b. Las diluciones 1:20 de los anticuerpos primario y secundario, así como, 1:100 de faloidina rodaminada utilizados en este trabajo proporcionaron las condiciones bajo las cuales se obtuvo la mejor visualización de ambas marcas en células RK13.
- c. La gelsolina es reclutada a los pedestales ricos en actina formados durante la infección de las células RK-13 con REPEC en todos los tiempos muestreados.
- d. La marca de gelsolina colocalizó con la marca de actina en los pedestales sugiriendo la participación de gelsolina en la formación y mantenimiento de los mismos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Adams LM, Simarons CP, Rezman L, Strugnell RA, Robins-Browne RM. Identification and characterization of a K88- and CS31A-Like operon of a rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* strain which encodes fimbriae involved in the colonization of rabbit intestine. *Infect Immun* 1997; 65: 5222-5230.
2. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 4<sup>th</sup> ed. New York: Garland Science, 2002.
3. An H, Fairbrother JM, Désautels C, Mabrouk T, Dugourd D, Harel J. Presence of the LEE (Locus of Enterocyte Effacement) in pig attaching and effacing *Escherichia coli* and characterization of *eae*, *espA*, *espB*, and *espD* genes of PEPEC (pig EPEC) strain 1390. *Microbial Path* 2000; 28: 291-300.
4. Arora PD, Janney PA, McCulloch CAG. A role for gelsolin in stress fiber-dependent cell contraction. *Exp Cell Res* 1999; 250: 155-167.
5. Arora PD, McCulloch CA. Dependence of fibroblast migration on actin severing activity of gelsolin. *J Biol Chem* 1996; 271: 20516-20523.
6. Blocker A, Holden D, Cornelis G. Type III secretion systems: what is the translocator and what is translocated?. *Cell Microbiol* 2000; 2: 387-390
7. Bowers B, Maser M. *Artifacts in fixation for transmission electron microscopy, in artifacts in biological electron microscopy*. New York: Plenum, 1988.
8. Burnick LD, Urosev D, Irobi E, Narayan K, Robinson RC. Structure of the N-terminal half of gelsolin bound to actin: roles in severing, apoptosis and FAF. *EMBO J* 2004; 23:2713-2722.
9. Campellone KG, Leong JM. Tails of two Tirs: actin pedestal formation by enteropathogenic *E.coli* and enterohemorrhagic *E.coli* O157-H7. *Curr Opin Microbiol* 2003; 6:82-90.



10. Cantey JR, Blake RK. Diarrhea due to *Escherichia coli* in the rabbit: a novel mechanism. *J Infect Dis* 1977; 135: 454-462.
11. Cheng F, Shen J, Luo X, Jiang H, Chen K. Steered molecular dynamics simulations on the "tails helix latch" hypothesis in the gelsolin activation process. *J Biophysical* 2002; 83: 753-762.
12. Chen HD, Frankel G. Enteropathogenic *Escherichia coli*. unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiology Reviews* 2005; 29: 83-98.
13. Chumnarnsilpa S, Loonchanta A, Xue B, Choe H, Urosev D, Robinson RC. Calcium Ion exchange in crystalline gelsolin. *J Mol Biol* 2006; 357: 773-782.
14. Clarke SC, Haigh RD, Freestone PP, Williams PH. Virulence of Enteropathogenic *Escherichia coli*, a Global Pathogen. *Clinical Microbiologic Reviews* 2003; 16(3): 365-378.
15. Cooper JA, Bryan J, Schwab III B, Frieden C, Loftus DJ, Elson EL. Microinjection of gelsolin into living cells. *J Cell Biol* 1987; 104: 491-50.
16. Cossart P, Boquet P, Normark S, Rappuoli R. Cellular microbiology. 2<sup>nd</sup> ed. Washington DC: American Society for Microbiology, 2005.
17. Daniell SJ, Kocsis E, Morris E, Knutton S, Booy FP, Frankel G. 3D structure of EspA filaments from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 2003; 49: 301-308.
18. Darnell J, Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Kreiger M *et al*. *Biologia Celular y Molecular*. 5<sup>a</sup> ed. Buenos Aires-Argentina: Médica Panamericana, 2005.
19. DosRemedios CG, Chhabra D, Kekic I, Dedova V, Tsubakihara M, Berry DA *et al*. Actin Binding Proteins : Regulation of Cytoskeleton Microfilaments. *Physiol Rev* 2003; 83 : 433-473.
20. Elliott SJ, Wainwright LA, McDaniel TK, Jarvis KG, Deng Y, Kaper JB *et al*. The complete sequence of the Locus of Enterocyte Effacement (LEE) from Enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol Microbiol* 1998; 28: 1-4.

21. Fernandes PJ, Guo Q, Donnenberg MS. Functional consequences of sequence variation in bundling, the Enteropathogenic *Escherichia coli* type IV pilin protein. *Infect Immun* 2007; 75:4687-4696.
22. Garmendia J, Frankel G, Crepin VF. Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infect Immun* 2005; 73: 2573-2585.
23. Girard F, Batsson I, Frankel GM, Harel J, Fairbrother JM. Interaction of enteropathogenic and shiga toxin-producing *Escherichia coli* and porcine intestinal mucosa: role of intimin and Tir in adherence. *Infect Immun* 2005; 73: 6005-6016.
24. Goosney DL, DeVinney R, and Finlay BB. Recruitment of Cytoskeletal and Signaling Proteins to Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Pedestals. *Infect Immun* 2001; 69(5): 3315-332.
25. Goosney DL, DeVinney R, Pfluetzner RA, Frey EA, Strynadka NC, Finlay BB. Enteropathogenic *E. coli* translocated intimin receptor, Tir, interacts directly with  $\alpha$ -actinin. *Curr Biol* 2000; 10:735-738.
26. Goosney DL, Knoechel DG, Finlay BB. Enteropathogenic *E. coli*, *Salmonella* and *Shigella* masters of the host cell cytoskeletal exploitation. *Emerg Infect Dis* 1999; 5: 216-223.
27. Gruenheid S, De Vinney R, Bladt F, Goosney D, Gelkop S, Gish GD *et al.* Enteropathogenic *E. coli* Tir binds Nck to initiate actin pedestal formation in host cells. *Nature Cell Biol* 2001; 3:856-859.
28. Gruenheid S, Finlay BB. Microbial pathogenesis and cytoskeletal function. *Nature* 2003; 422: 775-781.
29. Guttman JA, Janney P, Vogt W. Gelsolin-evidence for a role in turnover of junction-related actin filaments in Sertoli cells. *J Cell Sci* 2002; 115: 499-505.

30. Hardwidge PR, Rodriguez-Escudero I, Goode D, Donohoe S, Eng J, Finlay BB. Proteomic analysis of the intestinal epithelial cell response to enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 2004; 279: 20127-20136.
31. Hayward RD, Leong JM, Koronakis V, Campellone KG. Exploiting pathogenic *Escherichia coli* to model transmembrane receptor signaling. *Nature* 2006; 4: 358-370.
32. Hueck CJ. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62: 379-433.
33. Hyat MA. Fixation for electron microscopy. New York: Academic Press, 1981.
34. Irobi E, Burtnick LD, Urosev D, Narayan K, Robinson RC. From the first to the second domain of gelsolin: a common path on the surface of actin?. *FEBS Letters* 2003; 552: 86-90.
35. Janke BH, Francis DH, Collins JE, Libal MC, Zeman DH, Johnson DD. Attaching and effacing *Escherichia coli* infections in calves, pigs, lambs, and dogs. *J Vet Diagn Invest* 1989; 1: 6-11.
36. Javois LC. Immunocytochemical methods and protocols. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 1994.
37. Kenny B, Jepson M. Targeting of an enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) effector protein to host mitochondria. *Cell Microbiol* 2000; 2: 579-590.
38. Kiselar JG, Janney PA, Almo SC, Chance MR. Visualizing the Ca<sup>2+</sup>-dependent activation of gelsolin by using synchrotron footprinting. *PNAS* 2003; 100: 3942-3947.
39. Krejany EO, Grant TH, Bennett-Wood V, Adams LM, Robins-Browne RM. Contribution of plasmid-encoded fimbriae and intimin to capacity of rabbit-specific enteropathogenic *Escherichia coli* to attach to and colonize rabbit intestine. *Infect Immun* 2000; 68: 6472-6477.
40. Kwiatkowski DJ. Functions of gelsolin: motility, signaling, apoptosis, cancer. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 103-108.

41. Laine RO, Phaneuf KL, Cunningham CC, Kwiatkowski D, Azuma T, Southwick FS. Gelsolin, a protein that caps the barbed ends and severs actin filaments, enhances the actin-based motility of *Listeria monocytogenes* in host cells. *Infect Immun* 1998; 66: 3775-3782.
42. Larson L, Arnaudeau S, Gibson B, Li W, Krause R, Southwick F. Gelsolin mediates calcium-dependent disassembly of *Listeria* actin tails. *PNAS* 2005; 102: 1921-1926.
43. Larsson LI. *Immunocytochemistry: Theory and practice*. CRC, Boca Raton, FL, 1988.
44. Lu M, Witke W, Kwiatkowski DJ, Kosik KS. Delayed retraction of filopodia in gelsolin null mice. *J Cell Biol* 1997; 138: 1279-1287
45. Marches O, Boullier S, Mainil J, Charlier G, Raymond I, Pohl P, Boury M *et al*. Role of Tir and intimin in the virulence of rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* serotype O103:H2. *Infect Immun* 2000; 68:2171-2182.
46. Martinez-Hernandez A. *Methods for electron immunohistochemistry*. *Meth Enzymol* 1987; 145: 103-113.
47. McGough AM, Staiger CJ, Min JK, Simonetti KD. The gelsolin family of actin regulatory proteins: modular structures, versatile functions. *FEBS Letters* 2003; 552:75-81.
48. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11:142-201.
49. Nougayrède JP, Fernandes PJ, Donnenberg MS. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. *Cell Microbiol* 2003; 5:359-372.
50. Pearson GR, Watson CA, Hall GA, Wray C. Natural infection with an attaching and effacing *Escherichia coli* in the small and large intestines of a calf with diarrhoea. *Vet Rec* 1989; 124: 297-299.
51. Pollard TD, Borisy GG. Cellular Motility Driven by Assembly and Disassembly of Actin Filaments. *Cell* 2003. 112:453-465.
52. Pollard TD. The cytoskeleton, cellular motility and the reductionist agenda. *Nature* 2003; 422: 741-745.

53. Pope B, Way M, Weeds AG. Two of the three actin-binding of gelsolin bind to the same subdomain of actin. FEBS 1991; 280: 70-74.
54. Riederer BM. Antigen preservation test for immunocytochemical detection of cytoskeletal proteins: influence of aldehyde fixatives J Histochem Cytochem 1989; 37: 675-681.
55. Roustan C, Ferjani I, Maciver SK, Fattoum A, Rebière B, Benyamín Y. Calcium-induced conformational changes in the amino-terminal half of gelsolin. FEBS Letters 2007; 581: 681-686.
56. Rycke J, Comtet E, Chalareng C, Boury M, Tasca C, Milon A. Enteropathogenic *Escherichia coli* O103 from rabbit elicits actin stress fibers and focal adhesions in HeLa epithelial cells, cytopathic effects that are linked to an analog of the locus of enterocyte effacement. Infect Immun 1997; 65: 2555-2563.
57. Shaner NC, Sanger JW, Sanger JM. Actin and Alpha-actinin dynamics in the adhesion and motility of EPEC and EHEC on host cells. Cell Motil Cytoskeleton 2005; 60: 104-120.
58. Silacci P, Mazzolai L, Gauci C, Stergiopoulos N, Yin HL, Hayoz D. Gelsolin superfamily proteins: key regulators of cellular functions. Cell Mol Life Sci 2004; 61: 2614-2620.
59. Vidal JE, Cantizales-Román A, Gutiérrez-Jiménez J, Navarro-García F. Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. Salud pública de México 2007; 49: 376-386.
60. Welch MD, Mullins RD. Cellular control of actin nucleation Annu Rev Cell Dev Biol 2002; 18: 247-288.
61. Witke W, Sharpe AH, Hartwig JH, Azuma T, Stossel TP, Kwiatkowski DJ. Hemostatic, inflammatory, and fibroblast responses are blunted in mice lacking gelsolin. Cell 1995; 81: 41-51.
62. Yin HL, Hartwig JH, Maruyama K, Stossel TP. Ca<sup>2+</sup> control of actin filament length J Biol Chem 1981; 256: 9693-9697.

63. Yin HL, Stossel TP. Control of cytoplasmic actin gel-sol transformation by gelsolin, a calcium-dependent regulatory protein. *Nature* 1979; 281: 583-585.
64. Zhu C, Harel J, Jacques M, Desautels C, Donnenberg MS, Beaudry M, Fairbrother JM. Virulence properties and attaching-effacing activity of *Escherichia coli* O45 from swine postweaning diarrhea. *Infect Immun* 1994; 62: 4153-4159.