



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL

“ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO DE CULTIVO PRIMARIO
DE ENTEROCITOS PARA EL ESTUDIO DE LA INFECCIÓN CON
Escherichia coli ENTEROPATÓGENA PARA CONEJO (REPEC)”

T E S I S

P A R A O B T E N E R E L G R A D O D E

M A E S T R A E N C I E N C I A S

P R E S E N T A

INGRID PATRICIA GARRIDO BECERRIL

TUTOR:

DR. CARLOS GERARDO GARCÍA TOVAR

COMITÉ TUTORIAL:

DRA. MARÍA DE LOURDES JUÁREZ MOSQUEDA

DR. TONATIUH ALEJANDRO CRUZ SÁNCHEZ



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.

La alumna Ingrid Patricia Garrido Becerril
Recibió apoyo de beca durante sus estudios de Maestría por parte de:
CONACYT
No. de registro CVU 264558

El presente trabajo recibió el apoyo de:

Proyecto PACIVE. Morfología Veterinaria y Biología Celular. (GVC 10)

Proyecto PAPIIT. Estudio comparativo de los rearrreglos del citoesqueleto en células RK13 y enterocitos de conejo durante la infección de *Escherichia coli* enteropatógena para conejo (REPEC). (IN203106-3)

Proyecto PAPIIT. Evaluación de la actividad micótica de compuestos sintéticos y naturales sobre la estructura de las células micóticas. (IN211008-3)

Proyecto PAPIIT Perspectivas del uso del propóleo en la salud animal. (IT2238II-3)

Dr. Fernando Navarro, CINVESTAV-IPN. Donación de la cepa bacteriana utilizada en este trabajo, *Escherichia coli* enteropatógena para conejo (REPEC) O:103. E22

AGRADECIMIENTOS

Tutor principal

Dr. Carlos Gerardo García Tovar.

Por su asesoría y gran apoyo brindado para la realización de éste trabajo.

Comité Tutoral

Dra. María de Lourdes Juárez Mosqueda

Por su apoyo académico y técnico en microscopía electrónica.

Dr. Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez

Por su apoyo académico y técnico en microscopía de fluorescencia.

Jurado de Tesis

Dra. Alma Lucila Nuñez del Arco

Dra. Inda Marcela Figueroa Ochoa

Dr. Carlos Ignacio Soto Zárate

Dra. Clara Inés Alvarez Manrique

Por su apoyo, observaciones y aportaciones a éste trabajo

A G R A D E C I M I E N T O S

Por su valiosa colaboración en la realización de este trabajo:

Dr. José Luna Muñoz

Auxiliar de Investigación. Biología Celular CINVESTAV IPN

Dra. María de Lourdes Juárez Mosqueda

Profesor titular B. T.C. Def. FMVZ UNAM

M en C. Francisco Rodolfo González Díaz

Técnico Académico Laboratorios 2 y 4 de la UIM FESC UNAM

M en F. German Isauro Garrido Fariña

Técnico Académico. Profesor Titular A. T.C. Def. FESC UNAM

M en C. Crisóforo Mercado Márquez

Técnico Académico.

Responsable de la Unidad de Aislamiento y Bioterio de la UIM FESC UNAM

Dr. Fernando Navarro García

Secretario Académico CINVESTAV IPN

Dra. María Leonor Quintero Mora

Dr. Carlos Ignacio Soto Zárate

MVZ. Ma. Reyes Pichardo Molinero

M en C. Rubén Arturo Torres León

Profesores del Laboratorio 4, UIM FESC UNAM

M en C. Salvador Carlos Flores Peinado

Técnico Académico.

Responsable del área de sacrificio y cortes del taller de carnes, CEA. FESC.

MVZ. Marco Antonio Mendoza Saavedra

Técnico Académico. Laboratorio de Microbiología

Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira

DEDICATORIAS

A **Dios** por mantenerse a mi lado en cada paso de mi vida, iluminando mi camino y dándome la fe para seguir adelante.

A mis **Papás** mi infinito agradecimiento, por darme la vida, por guiarme, educarme y apoyarme, por su ejemplo y confianza, por aceptar mis decisiones aunque no siempre las entiendan y estar siempre a mi lado cuando los necesito; mis logros son todos para ustedes, los amo.

A mi **hermano** por todo tu apoyo, por tus ejemplos buenos y malos, ☺ por tu cariño. Gracias **Oscar** y **Gaby** por **Sofía**, bella inspiración, los quiero.

A todos **mis familiares** por sus enseñanzas, por creer en mí, por todas sus palabras de aliento, por estar siempre pendiente, por brindarme su ayuda y por todo el cariño que recibo de ustedes, a mis **Abuelitas** (las 3) las quiero mucho, **Abuelito** (q.e.p.d.) un logro más a para ti, estarías orgulloso lo sé.

A **Miguel Angel** por haberme puesto el ejemplo, por ser mi compañero y amigo, por luchar siempre a mi lado, por acompañarme en este viaje y ayudarme a creer que todo es posible, vamos por todo y más!, Te amo.

Al **Dr. Carlos Gerardo** por haberme aceptado como pupila, por compartir todos sus conocimientos conmigo, por su comprensión y paciencia, mi más profundo respeto y agradecimiento.

A **Rodolfo Francisco** por tu valiosa ayuda, no habría terminado sin ella, por haberme escuchado, por tus palabras, por tu frase “no te preocupes yo lo hago”, a ti y a la **Dra. Rosalba**, un placer conocerlos. ☺

A mis compañeros, pero sobre todo **amigos** de la unidad de cirugía y policlínica (actualmente en peligro de extinción ☹): **Ana Flores, Miguel Ibarra, David Ramírez, Lupita Alemán, Luis Madrigal**, saben que los admiro y los aprecio mucho.

Al mejor maestro y amigo, sin menospreciar a nadie “claro”, **Juan del Río**, se que siempre estarás ahí.

Al **Dr. Flores** por inducirme en el ámbito docente y darme sus consejos.

A todos los **profesores** que de alguna manera influyeron para que pudiera alcanzar esta meta.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** pero sobre todo a la **Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán** por ser mi casa de estudio.

A la especie animal, pero sobre todo a la ciencia, que día con día me hacen querer saber más.

A todos mil gracias!, esto es por y para ustedes.

Y porqué no....?

Para mi también, por todo el esfuerzo, por haber sido una de las etapas más difíciles, pero también más bellas de mi vida, lo considero un logro!

CONTENIDO

I. Resumen	1
II. Introducción	2
III. Antecedentes	3
1. Cultivos Celulares	3
a. Generalidades.....	3
b. Clasificación de cultivos celulares.....	4
2. <i>Escherichia coli</i> enteropatógena	6
a. Generalidades.....	6
b. Sistema de secreción tipo III.....	8
c. Formación de la lesión A/E.....	9
d. EPEC <i>en cultivos</i> celulares.....	10
3. Citoesqueleto	12
a. Generalidades	12
b. Polimerización de actina.....	13
IV. Justificación	17
V. Hipótesis	18
VI. Objetivos	19
1. Objetivo General.....	19
2. Objetivos Particulares.....	19
VI. Diseño experimental	20
VII. Materiales y Métodos	21
1. Cultivo de REPEC.....	21
2. Identificación bacteriana.....	21
3. Titulación de REPEC.....	21
4. Cultivo primario de enterocitos: técnica de eversión de intestino.....	22
5. Cultivo primario de enterocitos: técnica de disgregación enzimática..	22
6. Ensayo para determinar la viabilidad celular del modelo con azul tripán.....	23
7. Infección de los cultivos.....	23
8. Ensayos de inmunofluorescencia.....	23
9. Protocolo para microscopía electrónica de transmisión.....	24

VIII. Resultados	26
1. Identificación bacteriana.....	26
2. Cultivo primario de enterocitos.....	26
3. Determinación de la viabilidad de los enterocitos.....	30
4. Ensayos de inmunofluorescencia.....	32
5. Adhesividad bacteriana.....	35
IX. Discusión	38
X. Conclusiones	44
XI. Bibliografía	45

I. RESUMEN

Los cultivos celulares ofrecen diversas ventajas para el desarrollo de la investigación básica; la obtención de enterocitos a partir de tejido intestinal en un cultivo primario, ha sido utilizado como modelo para el estudio de los mecanismos patógenos de numerosos microorganismos, entre ellos *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC). Distintos métodos han sido desarrollados para aislar a los enterocitos con procesos laboriosos, costosos y en algunos casos poco efectivos.

En este trabajo, se describe un modelo de cultivo primario de enterocitos, aplicado al estudio de los procesos celulares involucrados en la infección por *Escherichia coli* enteropatógena para conejo (REPEC).

El trabajo consistió en obtener muestras de íleon de conejos adultos sacrificados para abasto, una vez eliminado el contenido mediante lavados con PBS, el tejido fue evertido dejando expuesta la mucosa intestinal y colocándose en cajas de cultivo adicionadas con medio DMEM, previa colocación de cubreobjetos. Las muestras fueron divididas en 2 grupos, el grupo control sin infectar y el grupo infectado con REPEC, ambos grupos se incubaron por un período de 4 h, para posteriormente retirar el tejido, y recuperar las células adheridas a los cubreobjetos para su análisis.

Con el fin de determinar si este modelo puede ser de utilidad para estudiar la infección por REPEC, se evaluó el porcentaje de viabilidad celular utilizando la técnica de azul tripán, obteniéndose 53% de viabilidad para el grupo control y 51% para el grupo infectado. Por otro lado se buscaron posibles modificaciones en la estructura del citoesqueleto, para lo cual se utilizó microscopía de fluorescencia, marcando actina con faloidina conjugada a TRITC y DNA con DAPI observándose que se mantiene la estructura de los filamentos de actina a nivel corteza celular y en las microvellosidades, así como la estructura de la citoqueratina 8/18; se observó la adherencia de bacterias en la zona apical de los enterocitos cultivados, que es el primer paso para producir infección. Ultraestructuralmente mediante microscopía electrónica de transmisión se observó la pérdida de microvellosidades, así como la formación de estructuras semejantes a pedestales. Con lo anterior concluimos que el modelo descrito, constituye una útil herramienta para el estudio de la infección con *Escherichia coli*, así como otras enterobacterias que utilizan sistemas de infección similares; facilitando con ello el proceso de aislamiento de enterocitos, disminuyendo costos y tiempos, además de contribuir con la reducción, reemplazo y refinamiento de la experimentación animal.

Palabras clave: Cultivo primario, enterocito, *Escherichia coli*, viabilidad, citoesqueleto, actina, citoqueratina, adherencia.

II. INTRODUCCIÓN

El estudio de las patogenicias bacterianas ha producido gran interés, debido al resurgimiento de viejas enfermedades, a la aparición de nuevas enfermedades y al desarrollo de resistencia a los antibióticos por parte de algunos patógenos. En este ámbito se ha encontrado que los microorganismos patógenos, desarrollan diversos e ingeniosos mecanismos para infectar a sus hospederos y causarles alguna enfermedad; uno de éstos mecanismos consiste en la habilidad que poseen muchas bacterias para intervenir en las vías de señalización celular, así como, a los componentes del citoesqueleto y de la membrana celular, para permitir la colonización e invasión de sus hospederos. (Vallance, 2000).

Es así que muchos de los trabajos recientes, se han enfocado en definir los mecanismos celulares y moleculares que utilizan los microorganismos para causar enfermedad, para lo cual se han desarrollado diversos modelos experimentales *in vitro*, que permiten estudiar los procesos de infección, dándole así una nueva apreciación a la patogenicias bacterianas. (Schüller, *et. al.*, 2009)

Las técnicas de cultivo celular como modelo se han convertido en herramientas fundamentales para la investigación básica y aplicada. Su utilidad es amplia, abarcando diversas disciplinas como la inmunología, virología, biología molecular, ingeniería genética y farmacología entre otras. (Morgan 1995)

Escherichia coli enteropatógena (EPEC), además de ser una de las principales causas de diarrea infantil, ha sido utilizada como prototipo para el estudio de patógenos intestinales que inducen la lesión de adherencia/destrucción (A/E) en las células del hospedero y constituye un modelo adecuado para realizar estudios *in vitro*. (Celli, 2000)

III. ANTECEDENTES

1. Cultivos celulares

a. Generalidades

El cultivo celular, tiene su origen en el siglo XIX, como un método para el estudio del comportamiento de las células animales libres de las variaciones sistémicas ocurridas dentro del organismo durante la homeostasis o bajo el estrés experimental. Estas técnicas iniciaron con el cultivo de fragmentos no disgregados de tejidos, los cuales restringían la mitosis de las células cultivadas y por tanto su crecimiento. Después se realizaron cultivos con fragmentos disgregados de tejidos, los cuales aumentaban el crecimiento celular en cultivo ya que se utilizaban células dispersas; esto fue un gran avance y provocó una explosiva expansión en esta área desde los años 50's (Morgan, 1995).

El cultivo celular ha sido fundamental para numerosos avances científicos alcanzados en distintas ramas de las ciencias biomédicas. En el campo de la microbiología, el cultivo celular permite estudiar las relaciones entre la célula huésped y los microorganismos intracelulares

La relación y la relevancia de los modelos *in vitro* y *ex vivo*, comparados con la situación actual de modelos *in vivo*, es esencial para entender los procesos patológicos ocasionados por algunos microorganismos de ahí la importancia de seguir desarrollando diversos modelos de investigación. (Freshney, 2005)

Actualmente se entiende por cultivo celular al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células *in vitro*, conservando al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Dependiendo del grado de preservación de la estructura del tejido o del órgano de origen y de su duración se habla de diferentes tipos de cultivos: de órganos, explantes, primarios o secundarios. (Freshney, 2005)

En biología celular, los procedimientos *ex vivo*, implican a menudo la obtención de células o tejidos de un organismo vivo para posteriormente cultivarlos en el laboratorio, bajo condiciones estériles, procurando mantenerlos viables con una mínima alteración de las condiciones naturales, hasta por 24 horas.

Una de las principales ventajas de utilizar los cultivos *ex vivo* es la capacidad de realizar pruebas o mediciones controladas que de otra manera no sería posible o ético llevar a cabo en los sujetos vivos. Los tejidos se pueden extraer en partes, o como órgano completo. (Fusenig, 1986).

Hemos de ser precavidos en cuanto a la validez de los resultados obtenidos *in vitro* respecto a lo que pueda observarse *in vivo*. Sin embargo actualmente se están realizando gran cantidad de estudios de validación de modelos *in vitro* como alternativa al desarrollo de métodos de experimentación animal.

En la actualidad, pueden cultivarse en el laboratorio células procedentes de una amplia gama de tejidos y organismos diferentes. En un principio, el objetivo principal era el estudio propiamente de las células, de cómo crecían, qué necesitaban para su crecimiento, cómo y cuando dejaban de crecer. Este tipo de estudios tiene hoy gran interés científico, en relación a investigaciones sobre el ciclo celular, el control del crecimiento de células tumorales y la modulación de la expresión genética. Otra área de gran interés se centra en la biología celular y molecular, así como en el estudio de diversas patologías.

b. Clasificación de cultivos celulares

Los cultivos de células animales se han clasificado de acuerdo a su capacidad de adherencia a una superficie determinada, pueden crecer formando monocapa o en suspensión respectivamente, lo que está muy asociado con el tipo de célula de la cual derivan; por lo general las células provenientes de órganos, crecen en monocapa; igualmente existen células que pueden crecer indistintamente tanto en monocapa como en suspensión.

El cultivo de órgano consiste en la colocación de una porción de tejido que conserve su histología durante todo el proceso experimental, en un medio con las características necesarias para su supervivencia, mediante la regulación de líquidos o gases. En un cultivo de explante se busca la obtención de células a partir de una porción de órgano extraído de un animal vivo. El cultivo de células disgregadas consiste en obtenerlas del tejido original mediante diversos procesos, entre ellos la utilización de enzimas, recibiendo así el nombre de Cultivo Primario el cual al ser sometido a procesos de transformación que le confieran la capacidad ilimitada de multiplicación, reciben el nombre de línea celular. Cuando de un Cultivo Primario se genera otro tipo de células que se puedan separar recibe el nombre de Cultivo Secundario. Un cocultivo, o cultivo organotípico es aquel cultivo en el que coexisten dos tipos de células de linajes diferentes que se pueden ser separadas (Fig. 1).

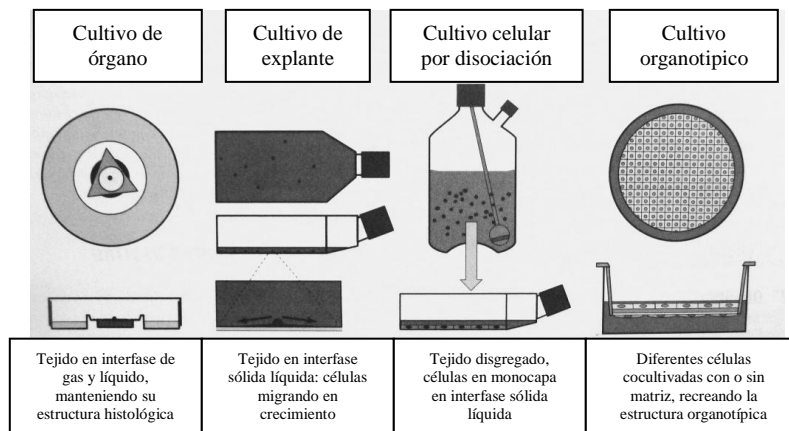


Fig. 1. Tipos de cultivo celular (Freshney 2005)

Los Cultivos Primarios tienen características especiales que los diferencian de las líneas celulares: conservan la morfología de las células del órgano del que fueron aisladas y su crecimiento *in vitro* es limitado.

Por otra parte, el crecimiento de las células en Cultivo Primario depende de la supervivencia de éstas a las diferentes técnicas de disgregación y a la capacidad de adherirse en monocapa al sustrato o de sobrevivir en suspensión. Si el cultivo primario es mantenido por pocas horas podría ocurrir un paso de selección futuro.

Algunas células son capaces de proliferar, otros tipos de células podrían sobrevivir pero no aumentar en número y otras podrían ser capaces de sobrevivir en condiciones especiales. Además el crecimiento celular va ligado al espacio del cultivo, ya que algunas células detienen su crecimiento, mientras que otras lo incrementan (Freshney, 2005).

En el caso específico de las células del epitelio intestinal, varias técnicas de cultivo primario han sido probadas como herramientas importantes para el estudio de etapas precisas relacionadas con la función intestinal, sus patologías y la diferenciación celular.

Entre los microorganismos que afectan al epitelio intestinal encontramos a *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) que es una de las bacterias más estudiadas con modelos *in vitro*, lo cual ha proporcionado mayor información acerca de su mecanismo de patogenicidad.

2. *Escherichia coli* enteropatógena

a. Generalidades

Las enfermedades diarreicas son uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial, siendo una de las causas más comunes, la infección por *Escherichia coli*. Las principales categorías de cepas diarreogénicas de *E. coli* incluyen *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), y *E. coli* enteroagregativa (EAEC). (Chen and Frankel, 2005; Rodríguez, 2002; Estrada, 2009).

En relación a esto, EPEC es una bacteria Gram-negativa que causa diarrea aguda y persistente en niños, ocasionando alta morbilidad y mortalidad en los países en desarrollo. Además del humano afecta animales como el conejo, perro, porcinos, ovinos, bovinos y ratón. (Aktan *et al.*, 2004; Nakazato *et al.*, 2004; Chen y Frankel, 2005; Krause *et al.* 2005).

A pesar de que EPEC causa una enfermedad clínica, predominantemente en niños por debajo de los 2 años, ésta también se presenta en adultos infectados con altas dosis bacterianas. Las bases para esta discriminación de edad por parte de EPEC aún no han sido bien determinadas, pero podría estar relacionada con la diferencia en susceptibilidad del intestino entre adultos y niños a ser colonizados o a la inmunidad adquirida en los adultos debido a infecciones previas. (Humphries *et al.* 2009)

La virulencia de EPEC depende primordialmente de la inducción de una lesión característica en la cual la bacteria hace contacto íntimo con la membrana plasmática del enterocito, ocasionando destrucción localizada de las microvellosidades y distorsión en la membrana de éstas células. Este contacto resulta en rearrreglos del citoesqueleto, en especial la formación de elevaciones de la membrana ricas en actina, denominadas pedestales, este proceso se conoce como lesión de adherencia y destrucción (A/E, del inglés attaching and effacing). De esta forma EPEC es una de las bacterias que desde una situación extracelular, dirige la polimerización de actina de la célula hospedera para formar los pedestales, que constituyen el sitio de asiento de las bacterias. (Mundy *et al.*, 2005; Sekiya *et al.*, 2001; Greunheid y Finlay, 2003; Chen y Frankel, 2005, Mundy R., Schuller S., 2007)

Por otro lado, se ha establecido que *Escherichia coli* enteropatógena específica de conejos (REPEC E22), tiene mecanismos de patogenicidad análogos a las cepas de EPEC del humano. Por lo tanto REPEC puede utilizarse como modelo para estudiar la patogénesis de las lesiones A/E producidas por *E. coli* tanto en el hospedero natural como en el humano. (Marches *et al.*, 2000 ; De la Cruz *et al.*, 2003, Milon *et al.*, 1999).

Para producir la lesión A/E, EPEC cuenta con un sistema de secreción tipo III (TTSS, por su siglas en inglés) que le permite introducir proteínas efectoras directamente en el citosol del enterocito. (Tampakaki *et al.*, 2004).

b. Sistema de secreción tipo III

El TTSS es un importante mediador de interacción de muchas bacterias Gram-negativas con las células animales y plantas. El TTSS forma un organelo semejante al flagelo bacteriano pero con una estructura tubular que inserta en la membrana de la célula blanco, a través de la cual la bacteria secreta sus proteínas directamente al citosol de dicha célula (de ahí que se le denomine complejo aguja). (Tampakaki *et al.*, 2004; Goonsey, *et al.*, 2001).

El TTSS de EPEC está constituido por proteínas codificadas en varios genes que se ubican en la isla de patogenicidad conocida como LEE (*locus* de eliminación del enterocito). Entre las proteínas encontramos a EspA que forma la prolongación filamentosa del complejo aguja constituyendo un tubo de translocación. Otras proteínas secretadas son EspB y EspD involucradas en la formación de un poro de translocación insertado en la membrana del enterocito y situado en el extremo del filamento de EspA, completando así el conducto llamado TTSS-translocón, a través del cual las proteínas efectoras son liberadas al citosol de la célula blanco (Marches *et al.*, 2000; Chen y Frankel, 2005; Dean *et al.*, 2009; Garmendia *et al.*, 2005).

Tir es una de las proteínas efectoras que se libera en el citoplasma, y se ancla a la membrana plasmática de las células del hospedero para actuar como receptor de una proteína de superficie bacteriana, la intimina, de ahí el nombre de Tir, (del inglés Translocated intimin receptor). A la vez Tir desencadena los rearrreglos del citoesqueleto para formar los pedestales. (Luo *et al.*, 2000; Gruenheid *et al.*, 2001; Kenny 2002; Campellone *et al.*, 2002; Dean *et al.*, 2009 y Garmendia *et al.*, 2005).

Otras proteínas efectoras secretadas por EPEC son, EspF que redistribuye proteínas importantes de las uniones estrechas, con lo que se rompe la resistencia transepitelial, EspG y EspG2 que degradan la red de microtúbulos por debajo del sitio de adhesión bacteriana. EspH modula la estructura del citoesqueleto de actina, así como la formación de filopodios durante la lesión A/E. EspZ se secreta al inicio de la infección, se acumula en zonas donde crecen los pedestales de actina y tiene efectos deletorios sobre la célula anfitriona. Map se ubica con proteínas de la mitocondria en donde altera el potencial de membrana y propicia la liberación del citocromo C e induce apoptosis. Cif que actúa como factor inhibidor del ciclo celular provocando efecto citopático. EspI que se asocia con el aparato de Golgi y cuya función no se ha aclarado. EspJ está relacionada con la transmisión del patógeno. TccP/EspFu dispara la polimerización de actina y es esencial para el reclutamiento de α -actinina, enlaza N-WASP y estimula la polimerización de actina independiente de Nck. (Hecht, 2001; Kenny, 2002; Clarke *et al.*, 2003; Dean *et al.*, 2009; Garmendia *et al.*, 2005; Caron *et al.*, 2006; Frankel, Phillips, 2008; Dean, Kenny, 2009).

c. Formación de la lesión A/E.

La formación de la lesión A/E es un proceso que se puede dividir en 4 estadios:

- 1.- Expresión del pili formador de haces, Bfp (por las siglas en inglés), de intimina y del TTSS.
- 2.- Adherencia localizada a través del Bfp y EspA, activación del TTSS y liberación de Tir y otras moléculas efectoras al citosol de la célula blanco. Tir es fosforilada y se inserta en la membrana plasmática y se activan vías de señalización causando alteraciones en el citoesqueleto.
- 3.- Se pierden los filamentos de EspA de la superficie bacteriana, la intimina se enlaza a Tir, resultando en una unión estrecha; acumulación de actina y otros elementos del citoesqueleto debajo del sitio de adhesión para *E. coli*
- 4.- Acumulación masiva de elementos del citoesqueleto que culmina con la formación de los pedestales, pérdida de la integridad de las uniones estrechas y de la función de las mitocondrias, conduciendo a pérdida de electrolitos y a la

eventual muerte celular (Fig. 2) (Moon *et al.*, 1983; Knutton *et al.*, 1987; Kenny, 2002; Sekiya *et al.*, 2001 y Clarke *et al.*, 2003).

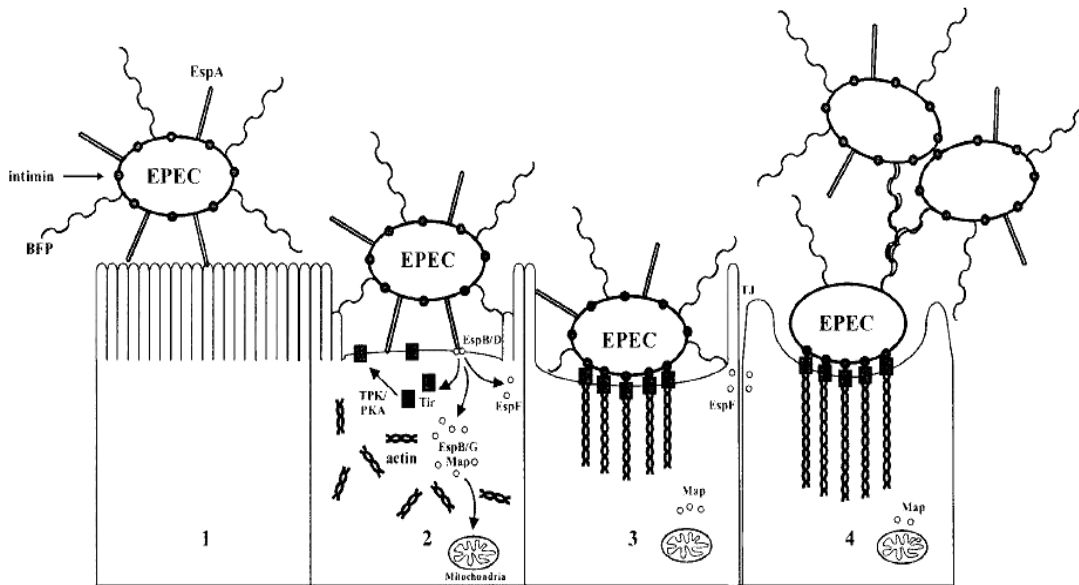


Fig.2 Fases de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena (Clarke 2003).

d. EPEC en cultivos celulares

Por años, los cultivos celulares se han utilizado como modelos de estudio para la formación de las lesiones A/E, hasta la formación de una estructura semejante a un pedestal. (Frankel and Phillips, 2008)

Una dificultad en el estudio de la infección por EPEC en un modelo *in vivo* se atribuye a que después de una infección oral, la bacteria se desarrolla de forma similar a una *E.coli* comensal, por lo tanto la población puede declinar hasta desaparecer totalmente (Girard *et al.*, 2008; Frankel, 2008, Mundy, Girard, 2006)

Alrededor del mundo sólo pocos laboratorios poseen la capacidad de estudiar las interacciones de *E. coli* con el intestino mediante modelos *in vivo*, debido al costo y la infraestructura requerida. (Girard *et al.*, 2007)

El cultivo de órganos *in vitro* de tejido intestinal humano, ha sido utilizado para estudiar la patogénesis de EPEC. Considerándose éste como un modelo más

apropiado que el modelo *in vivo*, debido a las características de su desarrollo; Knutton y cols. (1992) demostraron que EPEC aislada de casos de diarrea infantil, es capaz de producir lesiones A/E en la mucosa duodenal de un adulto, las cuales son indistinguibles de las lesiones producidas por EPEC en experimentos *in vivo*. (Hicks, Frankel, 1998 ; Schüller, 2009)

Los experimentos que utilizan cultivos celulares de epitelio intestinal y la manipulación de cepas de EPEC mediante la biología molecular, han permitido conocer los mecanismos de patogenicidad de éstos microorganismos. Sin embargo, a pesar de que dentro de las células más utilizadas en los modelos *in vitro*, para el estudio de *E. coli* patógenas, encontramos a las HEP-2, por ser células fáciles de reproducir y manipular, éstas se originan de un carcinoma no polarizado por lo tanto, no proceden de una línea de células intestinales. (Hicks, Frankel, 1998)

Otro factor que puede ser relevante en cuanto a la diferencia observada en la adhesión a células HEP-2 en un cultivo, comparado con el tejido intestinal humano cultivado (*in vitro* organ culture; IVOC, por sus siglas en inglés), es la disparidad en las membranas. Recientemente se ha demostrado que la presencia de la capa delgada del glicocálix en la superficie intacta del epitelio intestinal puede actuar como una barrera ante la adhesión bacteriana. Esta capa no está presente en las células HEP-2 además de que el epitelio intestinal presenta un borde con microvellosidades mucho más complejo.

Algunos artículos han demostrado que las cepas de EPEC interactúan de forma diferente con una muestra fresca de tejido intestinal de niños, en comparación con una línea celular cultivada. Por tanto, el IVOC ha sido validado como un buen modelo para el estudio de la patogénesis de *E. coli*, incluyendo a EPEC, *E. coli* enterotoxigénica y *E. coli* enteroagregativa. (Hicks and Frankel, 1998; Knutton y Lloyd, 1987)

Los resultados obtenidos previamente utilizando el modelo IVOC o explantes derivados del ileon terminal en modelos *ex vivo* son consistentes con las observaciones realizadas en experimentos utilizando EHEC, la cual induce también lesión A/E en diferentes sitios intestinales. (Girard *et al.*, 2008)

3. Citoesqueleto

a. Generalidades

El citoesqueleto es una red compleja de filamentos que permite a las células eucariotas organizarse espacialmente e interactuar mecánicamente con su entorno, gracias a esta red, las células pueden cambiar de forma y desplazarse de un lugar a otro, así como reordenar sus componentes internos. El citoesqueleto interviene en la división celular, conduce y dirige el tráfico intracelular de organelos, transporta materiales desde un punto de la célula a otro; sostiene la frágil membrana plasmática y proporciona el sostén mecánico que permite a la célula soportar el estrés sin ser destruida por los cambios ambientales (Alberts *et al.*, 2008). La gran variedad de funciones del citoesqueleto se deben al comportamiento de proteínas que se ensamblan formando tres tipos principales de filamentos; los filamentos intermedios (FI), los microtúbulos y los filamentos de actina. Cada tipo de filamento presenta distintas propiedades mecánicas y dinámicas, pero ciertos principios fundamentales, son comunes entre ellos. Estos principios proporcionan la base para la comprensión general sobre como trabaja el citoesqueleto (Alberts *et al.*, 2008; Pollard, 2003).

Los FI son componentes del citoesqueleto formados por la polimerización de una familia de proteínas fibrosas que resultan en redes transcelulares y son integradores mecánicos del espacio celular. Existen 2 grandes clases de FI, los nucleares y los citoplasmáticos; los FI nucleares están formados a su vez por las láminas nucleares que constituyen una malla por la cara interna de la envoltura nuclear. Los FI citoplasmáticos incluyen 3 familias de proteínas, las citoqueratinas, las vimentinas y los neurofilamentos, todos ellos formando redes filamentosas que

cruzan el citoplasma celular. La función principal de los FI es dar soporte mecánico a la célula. (Batchelor, 2004)

Los microtúbulos son estructuras filamentosas huecas formadas por la polimerización del dímero de α - y β -tubulina, proteína globular que une GTP. Toman su origen en el centrosoma (principal centro organizador de microtúbulos) y se distribuyen por todo el citoplasma. Se relacionan principalmente con la organización interna de la célula, el transporte intracelular, la formación del huso mitótico, el movimiento ciliar y flagelar.

La actina es una proteína globular que une ATP, es una de las proteínas más abundantes de la célula y se presenta en dos formas, actina-G o globular y actina-F o filamentosas. Se localiza en el citoplasma formando los filamentos de actina, principalmente estructurados en forma de red en la corteza celular o bien formando haces paralelos, como aquellos que dan soporte a las microvellosidades o haces contráctiles como por ejemplo las fibras de tensión. Se relacionan principalmente con dar forma y movimiento a la célula. (Welch y Mullins, 2002).

En los microtúbulos y en los filamentos de actina, los dímeros de tubulina o monómeros de actina se arreglan en una disposición cabeza/cola, impartiendo una polaridad molecular y definiendo así los dos extremos bioquímicamente diferentes, un extremo denominado positivo (+) y el otro extremo denominado negativo (-). En los FI los monómeros solubles tienen un arreglo antiparalelo por lo que no presentan polaridad.

b. Polimerización de actina

La polimerización de actina es el principio básico que da las características de estabilidad y dinámica a los elementos del citoesqueleto y ésta se divide en tres fases: nucleación, elongación y equilibrio. La nucleación constituye la primer etapa y en ella se forma un oligómero de monómeros de actina unidos a ATP que sirve como punto para la agregación de monómeros solubles y de esta forma el

filamento entra en la fase de elongación. En esta etapa, los monómeros unidos a ATP se incorporan en el extremo positivo del filamento, mientras que en el extremo opuesto o extremo negativo, los monómeros hidrolizan el ATP a ADP+Pi, este último es disociado pero el ADP es retenido en el monómero de actina que como consecuencia sufre un cambio de conformación y es eliminado del filamento. Una vez libre puede intercambiar ADP por ATP cuya concentración es más alta en el citoplasma celular y volver a unirse al extremo positivo. Las células en condiciones fisiológicas mantienen relativamente constante el tamaño de los filamentos de actina (fase de equilibrio) mediante un proceso cíclico de intercambio (*treadmilling*) de monómeros de actina (Pollard y Borisy, 2003). En estas condiciones fisiológicas la célula tiene una concentración estándar de actina (CS), que permite la adición de monómeros de actina en el extremo positivo y la eliminación en el extremo negativo, por lo que no se produce polimerización neta ya que ambos fenómenos quedan compensados. Para que se produzca la polimerización neta ha de existir una concentración de actina superior a la concentración crítica o mínima (CC). Como la CC del extremo positivo es menor que la CC del extremo negativo, la adición de monómeros de ATP-actina ocurre mayoritariamente en el extremo positivo y la despolimerización en el extremo negativo. Por tanto, la tasa de polimerización está en función de la cantidad de actina monomérica libre y de los extremos positivos libres. (Alberts *et al.*, 2008; Cooper y Schafer, 2000; Pollard, 1986).

Los microtúbulos polimerizan de manera similar salvo que en ellos la nucleación se lleva a cabo dentro del centrosoma a partir de los complejos anillo de γ -tubulina a partir de los cuales queda un extremo positivo libre en donde se agregan los dímeros de tubulina para la elongación de los microtúbulos.

Los FI forman dímeros paralelos los cuales polimerizan de forma antiparalela en tetrámeros que constituyen la unidad de polimerización para elongar y dar origen a los FI.

Para llevar a cabo sus funciones, existen una gran gama de proteínas que interaccionan con el citoesqueleto y se encargan de regular y modificar su estructura, como son: la proteínas que se unen a actina (por ejemplo Arp2/3, profilina, timosina, villina, miosina), las proteínas asociadas a microtúbulos (por ejemplo MAP, Tau, dineina, cinesina) y las proteínas asociadas a FI (por ejemplo plectina). (Gouin *et al.*, 2005; Welch y Mullins, 2002; Pollard, 1986)

Actualmente existe gran interés por estudiar los mecanismos moleculares subyacentes en la interacción patógeno - hospedero para conocer con detalle los mecanismos de virulencia de los patógenos y de defensa en los hospederos. Uno de los mecanismos utilizados por los patógenos es apropiarse de la maquinaria celular para su beneficio y, en este sentido, tres aspectos fundamentales en la vida celular son blanco frecuente de los patógenos: el citoesqueleto, las vías de señalización y la maquinaria genómica. (Chen, 2005, Frankel, 2004.).

Algunos microorganismos patógenos como: *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri*, *Rickettsia rickettsii*, *Yersinia spp.*, *Salmonella spp.*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Cryptosporidium parvum*, *Trypanosoma cruzi* y *Escherichia coli*, entre otros toman ventaja de los cambios dinámicos del citoesqueleto para colonizar e invadir las células del hospedero. (Gruenheid y Finlay, 2003; Vallance *et al.* 2000; Gouin *et al.*, 2005)

Estos agentes patógenos manipulan el citoesqueleto de actina para su propio beneficio. Utilizando a la actina como molécula blanco, reprograman rápida y radicalmente a la célula hospedera controlando la polimerización y despolimerización de los filamentos, con el fin de poder adherirse o internarse en las células, moverse dentro de ellas y pasar a otras contiguas. Otros cuentan con mecanismos moleculares para exportar proteínas efectoras al citoplasma de la célula y manipular el citoesqueleto de actina para interactuar extracelularmente. (Deng y Finlay, 2000; McCallum y Theriot, 2000; Gruenheid y Finlay, 2003; Gouin *et al.*, 2005; Marjomäki y Schaible, 2005).

IV. JUSTIFICACIÓN.

Escherichia coli es uno de los principales agentes etiológicos causantes de diarreas que se presentan alrededor del mundo, principalmente en infantes, de ahí la importancia de continuar investigando acerca de este microorganismo, por ser una bacteria prototipo, que se utiliza con frecuencia como modelo de infección, lo cual también puede extrapolarse para estudiar a otras enterobacterias. Si bien el mecanismo de virulencia de *E. coli* es bien conocido, aún queda mucho por investigar acerca de los mecanismos que utilizan las bacterias durante su proceso de infección, como ejemplo de ello podemos mencionar las modificaciones en la estructura del citoesqueleto de actina en las células eucariotas, conocimientos que aportarán información útil para poder desarrollar a futuro tratamientos más efectivos, además de permitirnos estudiar las funciones y mecanismos de regulación de los filamentos de actina. En este sentido, dentro del estudio de la infección con EPEC, aún no se conocen todos los mecanismos que permitan saber con detalle la dinámica de las proteínas que intervienen en los rearrreglos del citoesqueleto de actina.

Si bien la experimentación utilizando cultivos de tejido epitelial aunado a la manipulación biológica y molecular ha facilitado el entendimiento de la patogenia de los microorganismos. La creación de otros modelos de infección, son esenciales para seguir estudiando los mecanismos moleculares de las patogénesis bacterianas, los cuales pueden ser controlados y respaldar con ello los resultados que se presentan en el hospedero natural (Oliver, 2008), sin embargo se ha observado que existen diferencias entre lo que sucede en un modelo *in vitro* con relación a lo que ocurre en infecciones naturales por tanto es necesario disminuir dentro de lo posible éstas diferencias.

En otras palabras, la habilidad de desarrollar un modelo de cultivo primario a partir de un órgano, *in vitro* permitirá dirigir la investigación, realizar pruebas o mediciones controladas que de otra manera no sería posible o ético llevar a cabo

en sujetos vivos además permite realizar estudios morfológicos mediante microscopia, que nos indiquen los cambios que sufren los componentes celulares al ser infectados. De hecho el uso de estos modelos ha permitido demostrar que es posible inducir el daño estructural causado por REPEC en las células, de ahí que el cultivo de explantes de íleon de conejo puede proveer un modelo de investigación muy efectivo.

V. HIPÓTESIS

Mediante la técnica de eversión de íleon de conejo se podrá establecer un cultivo de enterocitos viables que conserven su estructura para estudiar la patogénesis de REPEC en un modelo más cercano a lo que ocurre en condiciones de infección natural.

VI. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL.

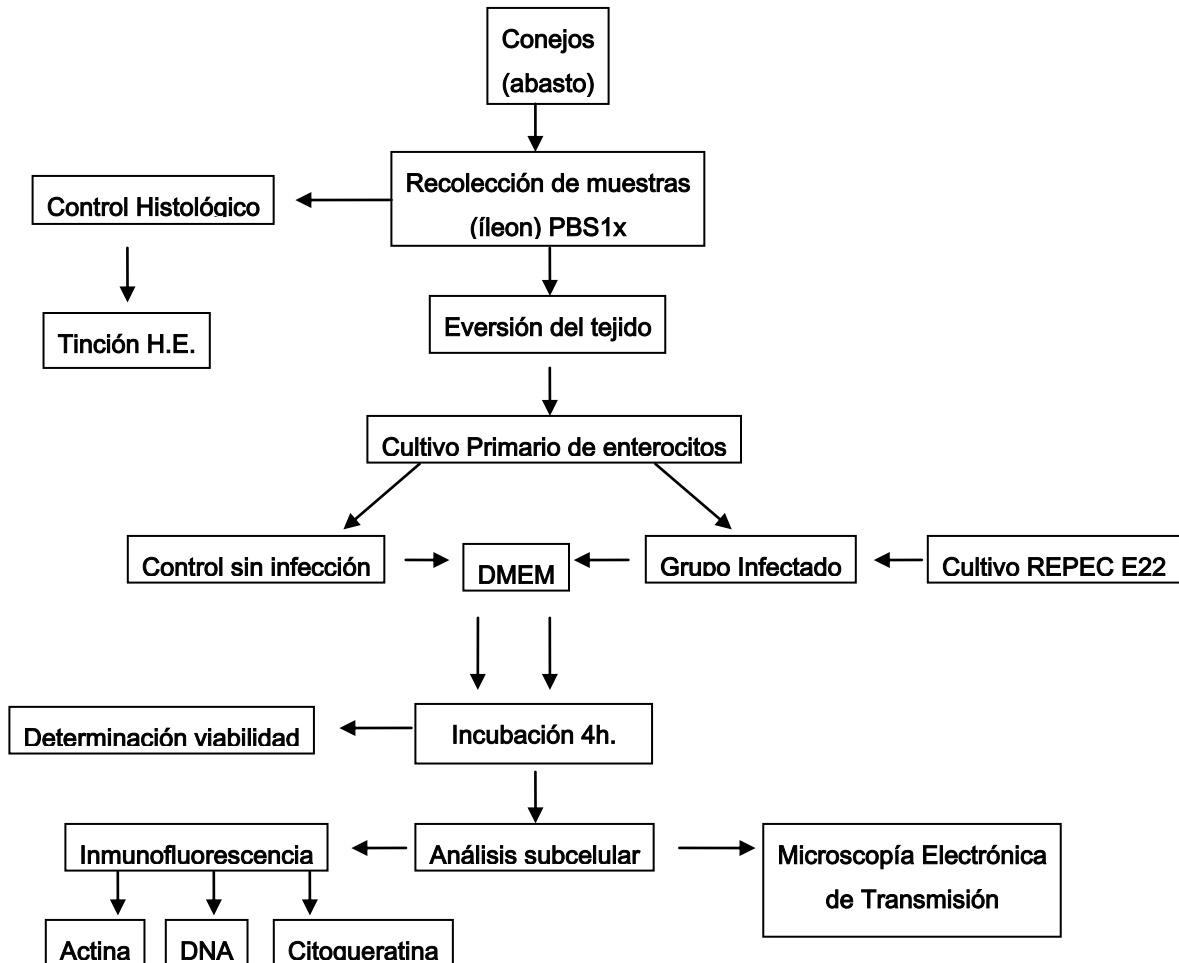
Establecer un modelo de cultivo de enterocitos mediante la técnica de eversión de íleon para estudiar la patogenia de REPEC.

2. OBJETIVOS PARTICULARES

1.- Obtener enterocitos de conejo viables en un cultivo primario a partir de segmentos de íleon evertido para el estudio de la infección por REPEC

2.- Detectar a nivel subcelular, las posibles modificaciones en la estructura del citoesqueleto, mediante microscopía de fluorescencia y microscopía electrónica de transmisión. en los enterocitos obtenidos de un cultivo primario infectados con REPEC.

VII. DISEÑO EXPERIMENTAL



VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivo de REPEC

La cepa utilizada en este trabajo fue *Escherichia coli* enteropatógena para conejo (REPEC) O:103. E22 (donada por el Dr. Fernando Navarro, CINVESTAV-IPN).

2. Identificación bacteriana

Para la identificación de *E. coli*, se llevaron a cabo en el Laboratorio de Bacteriología de la FES Cuautitlán UNAM las siguientes pruebas:

Tinción de Gram, Prueba de Catalasa, Prueba de Oxidasa, Las pruebas bioquímicas de IMViC: Citrato, Indol, Rojo Metilo y Vogues Proskauer

3. Titulación de REPEC

La titulación se llevó a cabo mediante diluciones seriadas en medio LB (Luria Bertani) y recuento en placa por sembrado en superficie, procediendo de la siguiente manera:

Una vez tipificada la bacteria, ésta fue sembrada e incubada en caja de cultivo con medio sólido LB, durante 24 hrs, a 37°C, después se tomó una muestra con asa y se colocó en 5 ml de medio líquido LB, incubándolo en agitación a 250 rpm toda la noche (ON) a 37°C, al día siguiente se realizaron diluciones seriales tomando con pipeta 0.5 ml del cultivo de REPEC para transferirlos a 4.5ml de PBS estéril, y así sucesivamente desde 10^{-1} a 10^{-10} en tubos falcon, cada una de las diluciones se sembró en caja con agar LB tomando 0.1ml, y esparciendo la muestra en todas las direcciones con ayuda de la espátula de Driglaski, se incubó a 37° C durante 12 hr.

Tras la incubación, se observaron las colonias bacterianas sobre la superficie del agar, cada colonia representa una unidad formadora de colonia (UFC), que corresponde a una célula viable.

Se seleccionó la placa de dilución en la que produjo un número de colonias cuantificables, obteniendo así una titulación de 18×10^{-9} UFC

4. Cultivo Primario de Enterocitos: técnica de eversión de intestino

Se utilizaron conejos destinados para abasto, con un peso promedio de 5 kg, los cuales fueron sacrificados por desnucamiento, en el Taller de Carnes del Centro de Enseñanza Agropecuaria de la FES Cuautitlán. Inmediatamente se obtuvo el íleon sin mesenterio colectando segmentos de 5 cm de longitud y se colocaron en tubos Falcon con PBS para ser transportados al laboratorio y ser procesados.

Se hicieron tres lavados con PBS para eliminar los restos del contenido intestinal, enseguida con ayuda de unas pinzas de Kelly y tratando de no lesionar el tejido se deslizó la pinza por la luz del intestino hasta el otro extremo, se pinzó únicamente por la orilla y se evertió el tejido para dejar expuesta la mucosa intestinal. La muestra se colocó en una caja de cultivo de 5 cm de diámetro con 5 ml de medio DMEM (Eagle modificado por Dulbeco) a la cual se le colocaron previamente 3 cubreobjetos esterilizados mediante flama directa con alcohol absoluto. Los enterocitos se desprendieron de la túnica mucosa y se mantuvieron en el medio de forma individual o en pequeños grupos. El estudio se realizó con aquellos enterocitos que se adhirieron a los cubreobjetos.

5. Cultivo primario de enterocitos: técnica de disgregación enzimática

Alternativamente se realizó este modelo de cultivo, obteniendo el intestino delgado sin mesenterio en secciones de 15 cm, se lavaron 5 veces con amortiguador salino de fosfatos (PBS, pH 7.2 a 37°C) con una jeringa y cánula. Posteriormente se incubaron en DTT 1mM en PBS por 5 min en agitación (intestino ligado). Se lavaron 2 veces y se procedió a predigerir el intestino en 5 ml de EDTA 0.2mM, 35µl de colagenasa (0.1U/ml), dispasa 0.8mg/ml en PBS por 20 min en agitación a 37°C. Se eliminó la solución de digestión y se lavó nuevamente con PBS más antibiótico, Posteriormente se hizo un corte longitudinal del intestino y se colocó en un portaobjetos para exfoliar la túnica mucosa con ayuda de otro portaobjetos, pasando el exfoliado resultante a un tubo con 10 ml de PBS, agitándolo en vortex y centrifugándolo a 700 rpm por 2 min. Se decanta el sobrenadante y la pastilla se lava con medio de cultivo DMEM adicionado con 2% de sorbitol (5 lavados hasta obtener un sobrenadante claro), centrifugando a 759 rpm por 2 min entre lavados.

Las células obtenidas se recuperaron, para resuspenderlas en 1 ó 2 ml de medio y enseguida se determinó la viabilidad celular mediante tinción con azul de tripán (Knutton, 1985; Catwright y Higgins, 1999).

6. Ensayos para determinar la viabilidad celular del modelo con azul de tripán

Con el fin de determinar la viabilidad de los enterocitos cultivados se utilizó la técnica de azul tripán para lo cual se tomaron 10 μ l del cultivo y se añadieron 90 μ l de azul de tripan al 4%. Las células se colocaron sobre un portaobjetos y se observaron al microscopio. Se realizó el conteo de células presentes en cada campo visual hasta completar un total de 100 células, en 4 repeticiones, determinando el número de células viables y el número de células muertas (teñidas de azul). Para obtener el porcentaje de viabilidad y mortalidad se consideraron las siguientes fórmulas:

- % de viabilidad celular = $(n^{\circ} \text{ de células viables} / n^{\circ} \text{ total de células}) \times 100$
- % de mortalidad celular = $(n^{\circ} \text{ total de células muertas} - n^{\circ} \text{ de células viables} / n^{\circ} \text{ total de células}) \times 100$

7. Infección de los cultivos

Del cultivo de REPEC previamente incubado en medio LB (18×10^9 UFC) se tomaron 200 μ l para inocular a los cultivos primarios de enterocitos, posteriormente se mantuvieron en incubación a 37°C, con atmósfera al 5% de CO₂ durante 4 hrs Se estableció un grupo control, el cual se mantuvo bajo las mismas condiciones pero sin infectar.

8. Ensayos de inmunofluorescencia

Para los ensayos de inmunofluorescencia (IF) se utilizaron los siguientes marcadores: faloidina conjugada con TRITC para marcar los filamentos de actina, CK 8/18 para marcar Citoqueratina, y DAPI (diamidino-2-fenilindol) para marcar DNA. Para la técnica de IF se procedió de la siguiente manera: se retiró el medio

de cultivo de las células cultivadas infectadas y no infectadas, se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4% en PBS por 20 min; después las células se permeabilizaron adicionando tritón X-100 al 0.5% en PBS durante 5 min; posteriormente se adicionó albúmina al 1% en PBS para bloquear los sitios inespecíficos, incubando por 15 min. Se procedió al marcaje de actina incubando los cultivos con faloidina rodaminada diluida 1:100 en PBS por 20 min en refrigeración con cámara húmeda. Finalmente se realizó el marcaje de DNA de los enterocitos y de las bacterias con DAPI, dejando por 5 min. Todos los pasos se realizaron a temperatura ambiente excepto en donde se indica otra cosa y entre cada paso se hicieron 2 lavados con PBS. Al término del protocolo se tomaron los cubreobjetos y se lavaron 2 veces con PBS y una vez más con agua desionizada, para enseguida hacer el montaje en portaobjetos utilizando medio de montaje especial para fluorescencia con DABCO (1,4-diazabiciclo-2,2,2-octano).

El marcaje de citoqueratina, se realiza utilizando como anticuerpo primario un anticuerpo monoclonal hecho en ratón dirigido contra CK 8/18, el cual se incubó toda la noche en refrigeración, seguido de la incubación por 3 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario (anticuerpo hecho en cabra dirigido contra IgG de ratón, conjugado a FITC) y después se incubó con la faloidina rodaminada para marcar actina, siguiendo el mismo proceso descrito anteriormente.

9. Protocolo para microscopía electrónica de transmisión

Para los ensayos de microscopía electrónica se tomaron muestras de enterocitos infectados y no infectados, se fijaron con Karnovsky a 4 °C por 24 h; después se post-fijaron con tetraóxido de osmio al 1% en PBS por una hora a temperatura ambiente y fueron lavados con el mismo amortiguador 3 veces, 5 min cada lavado. Posteriormente se realizó la deshidratación incubando las muestras en soluciones de etanol al 50%, 70%, 80%, 90% por 15 min cada una y dos veces de 15 minutos en etanol absoluto. Una vez deshidratadas se procedió a la inclusión de las muestras en resina de Spur, para la polimerización de la resina, las muestras

se colocaron en cápsulas de Beem y se incubaron en un horno a 60 por 36 h. Se hicieron cortes semifinos, se tiñeron con azul de toluidina y se observaron al microscopio óptico para elegir la zona deseada. Una vez realizado esto se procedió a obtener cortes ultrafinos de 90 nm, se colocaron en rejillas y contrastaron con citrato de plomo y acetato de uranilo para observarlos al microscopio electrónico de transmisión.

IX. RESULTADOS

1. Identificación bacteriana

Para confirmar que la bacteria utilizada correspondiera a una *E. coli* enteropatógena, se realizaron las siguientes pruebas:

Tinción de Gram, comprobándose la presencia de bacilos gram negativos

Prueba de Oxidasa obteniéndose un resultado negativo.

Prueba de Catalasa, con resultado positivo.

Pruebas bioquímicas mostrando los resultados en la tabla 1

Tabla 1. Pruebas bioquímicas realizadas para identificar a *E. coli*

Pruebas Bioquímicas	
Prueba de la Oxidasa	-
Prueba de Catalasa	+
Agar Citrato	-
Indol	+
Rojo Metilo	+
Voges Proskauer	-

2. Cultivo primario de enterocitos

Se realizó la recolección y eversión de segmentos de íleon de conejo, como se menciona en la metodología, para colocarlos en las cajas de cultivo conteniendo 5 ml de medio DMEM.

De esta primera etapa se decidió tomar una porción para incluirla en parafina, hacer cortes histológicos y teñirlos con Hematoxilina Eosina (HE) para valorar con microscopía óptica la estructura normal del tejido (Fig. 3).

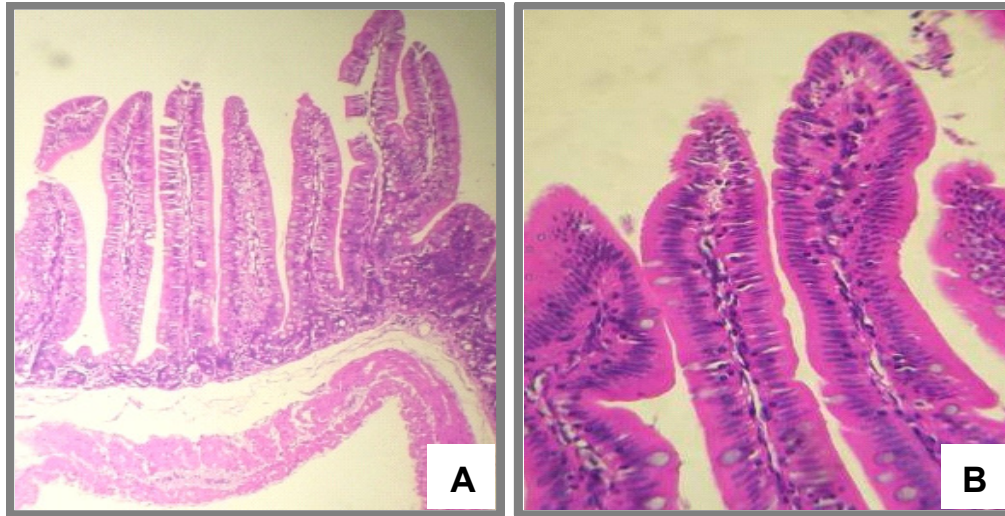


Fig. 3. Cortes de ileon teñidos con HE, vellosidades en tejido normal evertido 40x (A) Acercamiento mismo tejido 100X (B)

Una hora después de haber colocado la porción de intestino evertido, con exposición de la mucosa al medio DMEM, ésta fue observada al microscopio invertido, apreciándose las vellosidades intestinales con desprendimiento de enterocitos, los cuales conservan su estructura columnar (Fig. 4).



Figura 4. Vellosidad de ileon invertido en medio DMEM (V) Desprendimiento de enterocitos de la túnica mucosa después de 1hr de incubación. Las flechas indican los enterocitos que se desprendidos observados en microscopio invertido (100X).

Tras 4 h de incubación a partir de la colocación del ileon evertido en medio DMEM, se pudo observar un mayor número de enterocitos desprendidos de las vellosidades en comparación a la primera hora, nuevamente se procesó una muestra para teñirla con HE comprobándose una pérdida en la estructura de las vellosidades con enterocitos aislados en la periferia (Fig. 5).

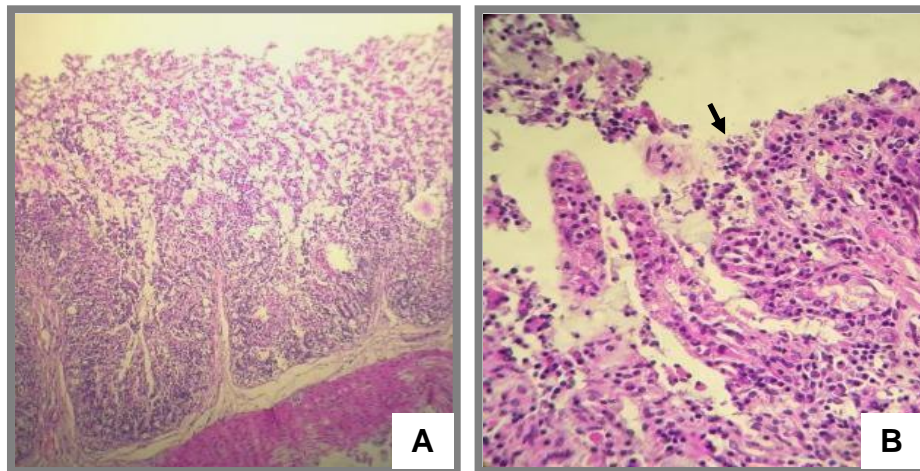


Fig 5 Cortes de ileon teñidos con HE después de 4 h de incubación con desprendimiento de enterocitos, observados con microscopia optica 10x (A). Aumento 40x, mismo tejido, enterocitos sueltos marcados con flecha (B)

Por otro lado se evaluó a los enterocitos desprendidos, después de las 4 h de incubación, notándose que conservaban su estructura morfológica ya que las células mantenían la forma columnar, con microvellosidades en el polo apical, el núcleo y citoplasma sin cambios aparentes (Fig. 6).

Después de haber observado que la integridad estructural de los enterocitos se mantenía normal a las 4hrs de incubación, se realizó el mismo procedimiento, sólo que en este caso el medio fue inoculado con 200 μ l del cultivo de REPEC para evaluarlo nuevamente, mostrando que dicha estructura se siguió conservando además de poder observar a las bacterias en el medio alrededor de las células cultivadas (Fig. 7).

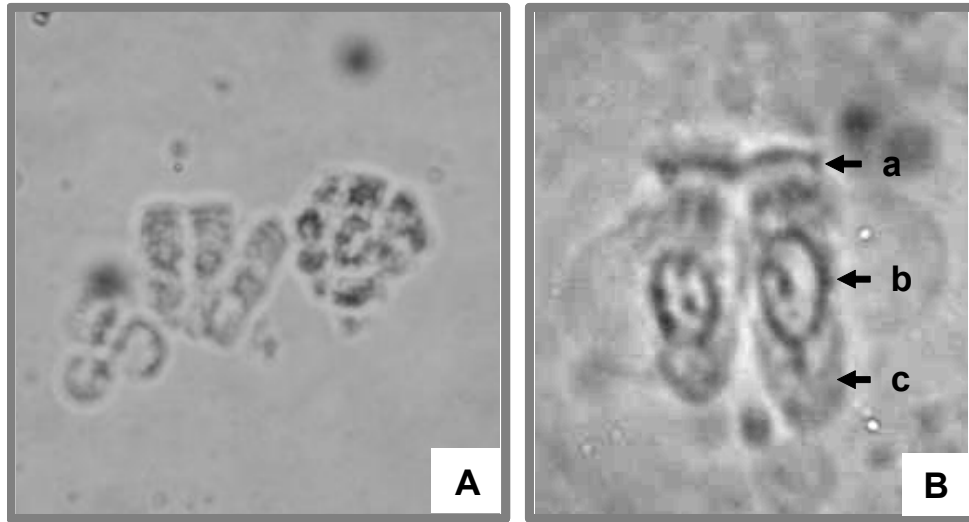


Fig. 6. Enterocitos desprendidos observados con microscopio invertido en cajas de cultivo después de 4hrs de incubación, 100x (A). Enterocitos que conservan su estructura a) zona apical con microvellosidades, b) núcleo celular, c) citoplasma celular, observados con microscopio invertido, 400x (B)

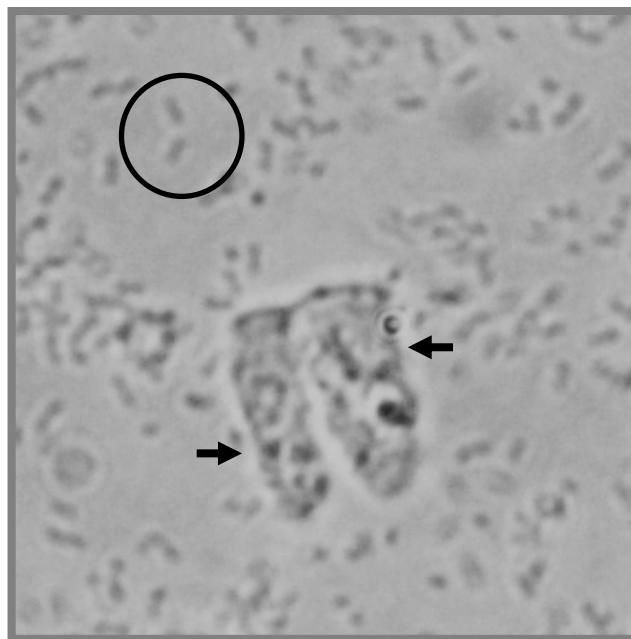


Fig. 7. Enterocitos después de 4hrs de incubación con bacteria REPEC en caja de cultivo con medio DMEM, se marcan las bacterias con un círculo y los enterocitos con flecha. 100x

3. Determinación de la viabilidad de los enterocitos

Una vez estandarizado el cultivo primario, con enterocitos que conservaban sus características estructurales tanto en células infectadas como en aquellas no infectadas, se realizaron las pruebas de viabilidad por la técnica de azul tripán.

El azul tripán es una molécula coloreada de gran peso molecular que sólo es capaz de entrar en las células que tienen alguna alteración en su membrana. Por tanto una célula viva sin alteración se observa incolora mientras que una célula muerta o con alguna alteración se observa de color azul. (Fig 8)

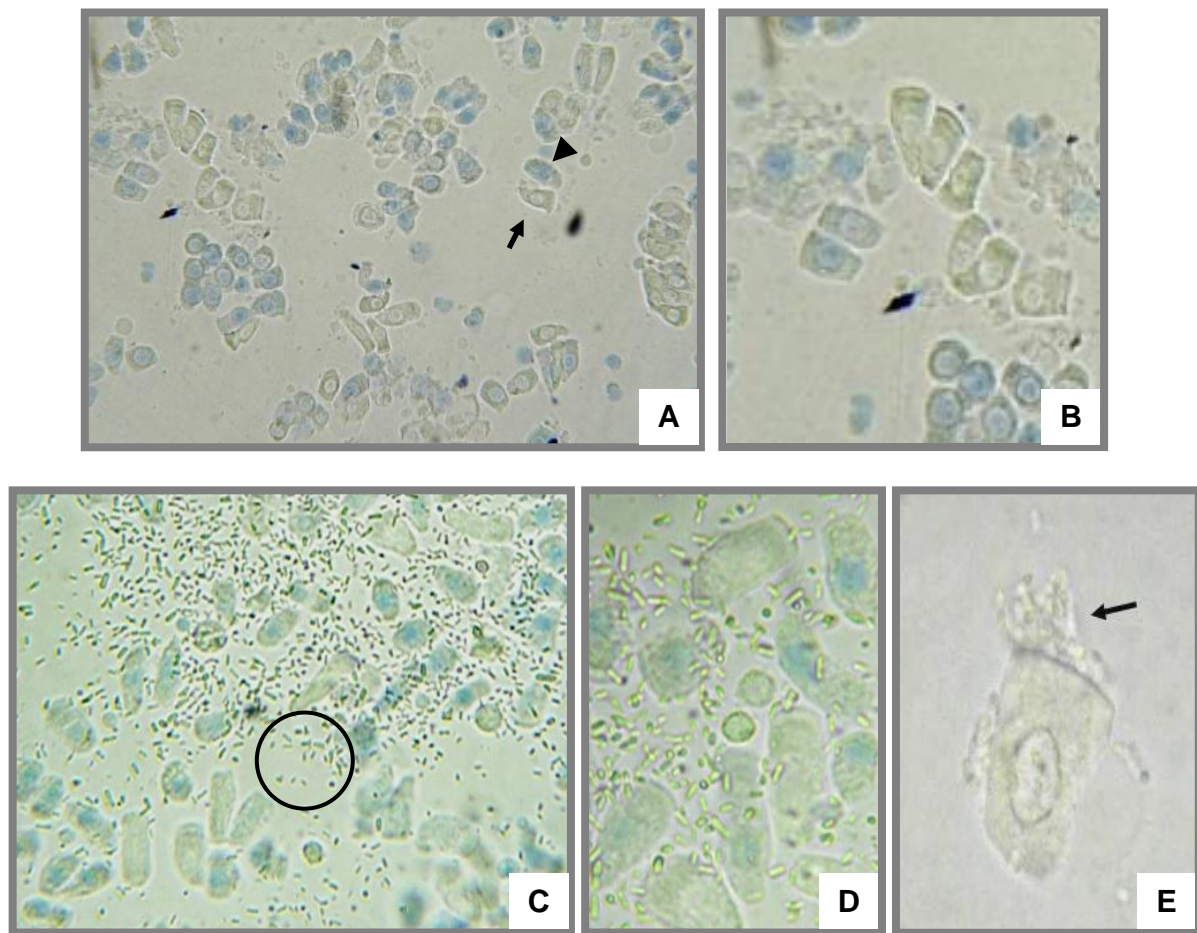


Fig 8. Cultivo primario de enterocitos de ileon de conejo sin infectar observado con microscopía óptica, expuestos al azul tripán, células vivas sin teñir (flecha), células muertas teñidas de azul (cabeza de flecha), 100x (A); misma muestra observada con aumento 200X (B); cultivo primario de enterocitos de ileon de conejo infectados con REPEC con células vivas no teñidas y células muertas teñidas de azul, observación de bacterias encerradas en círculo, 100X (C); mismo campo observación con aumento 200X (D) bacterias acumuladas en microvellosidades, señaladas con flecha 1000x(E).

En la tabla 2 se observa la viabilidad de las células después de 4 h de incubación del tejido, se llevaron a cabo 4 repeticiones bajo las mismas condiciones, el porcentaje de células vivas (53%) fue mayor al porcentaje de células muertas (47%).

Tabla 2. Promedio de células vivas comparado con el promedio de células muertas 4 h después de iniciar con el cultivo primario de enterocitos en el grupo control sin infectar.

Repeticiones	Células vivas control	Células muertas control
1	57	43
2	53	47
3	40	60
4	62	38
Promedio	53	47

Al mismo tiempo y con el fin de determinar si había diferencias en la viabilidad celular observada entre el cultivo infectado y el no infectado, se evaluaron de la misma manera con la técnica de azul tripán. En la tabla 3 se observa el porcentaje de células vivas 4 h después de ser infectadas con REPEC y mantenidas en incubación, se realizaron también 4 repeticiones bajo las mismas condiciones y para este caso, el porcentaje de células vivas (51%) siguió siendo mayor en comparación al porcentaje de células muertas (49%). Pudimos notar que aún 4 h después de la obtención de enterocitos a partir del cultivo primario infectado el porcentaje de viabilidad fue similar al de las células sin infectar.

Con el fin de determinar comparativamente la eficiencia del método de cultivo primario a partir de ileon evertido para obtener mejor viabilidad celular, se trabajó también el método de cultivo primario con la técnica de colagenasa/disypasa (ver métodos) para la obtención de enterocitos, resultando una viabilidad promedio del 20% aún sin haber infectado las células. Lo anterior nos permitió demostrar que el método propuesto en este trabajo es de utilidad además de obtener un porcentaje de viabilidad mayor, debido posiblemente a que la manipulación celular es

considerablemente menor en el método de ileon evertido que en el método por disgregación enzimática.

Tabla 3. Promedio de células vivas comparado con el promedio de células muertas 4 h después de iniciar con el cultivo primario de enterocitos en el grupo infectado.

Repeticiones	Células vivas infección	Células muertas infección
1	43	57
2	55	45
3	64	36
4	42	58
Promedio	51	49

4. Ensayos de inmunofluorescencia

Para confirmar a nivel subcelular los resultados observados mediante microscopía óptica sobre el mantenimiento de integridad morfológica de los enterocitos cultivados, se llevó a cabo el marcaje de proteínas de citoesqueleto. Para esto se repitió nuevamente el cultivo primario de los enterocitos trabajándose una muestra no infectada y otra infectada con REPEC. Con el fin de observar los filamentos de actina se realizó el marcaje de actina con faloidina rodaminada y el DNA con DAPI. Como puede notarse en la figura 11 en los enterocitos no infectados (A y C) y de los enterocitos infectados con REPEC (E y G), observados por microscopía de epifluorescencia, muestra claramente la presencia de actina en las microvellosidades y en la corteza celular y la presencia de las bacterias en la periferia celular con predilección hacia la zona apical.

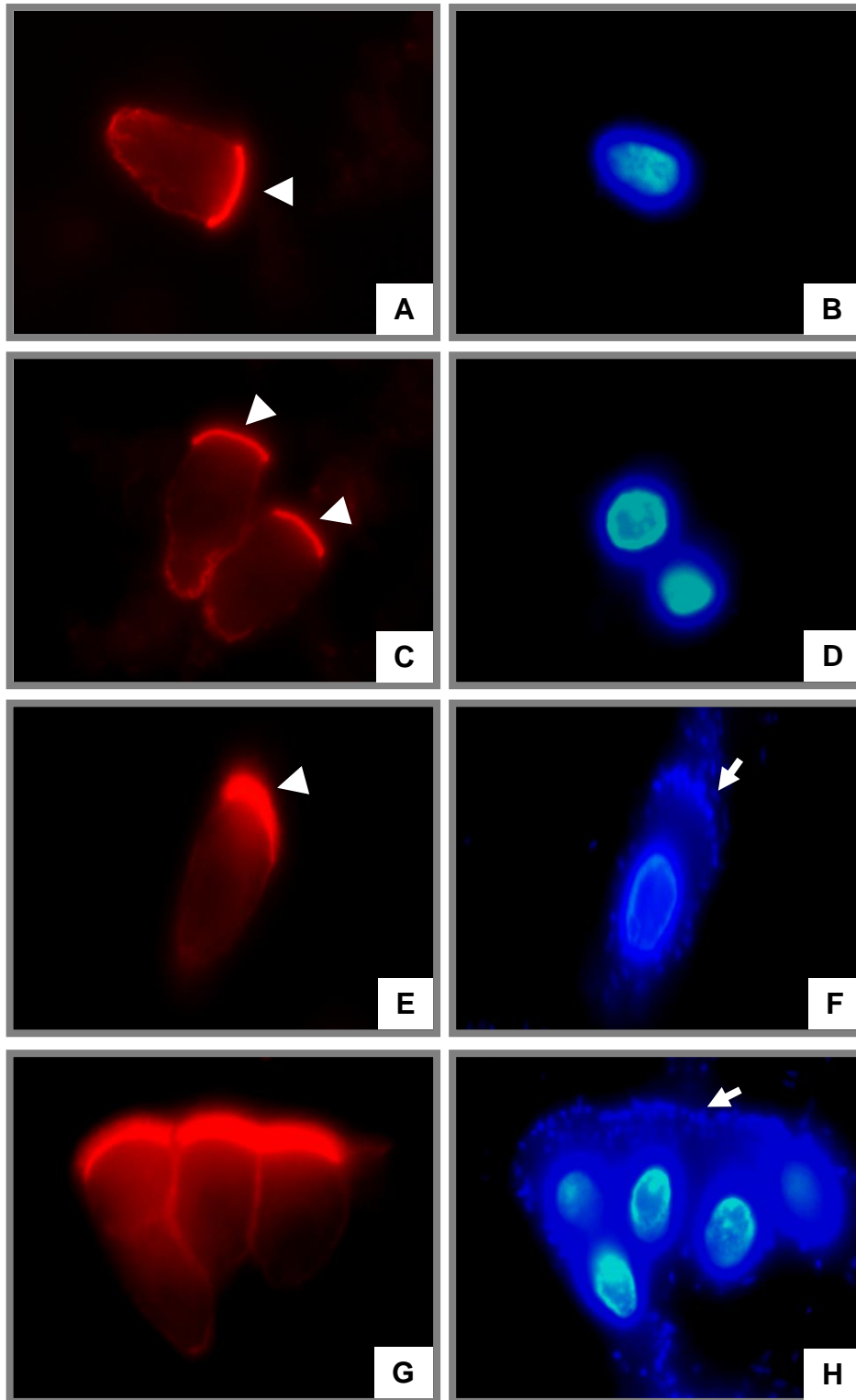


Fig. 11. Enterocitos de ileon de conejo de un cultivo primario sin infectar (A, B, C y D) y de un cultivo primario infectado con REPEC (E, F, G y H).

Las imágenes de la izquierda corresponden a enterocitos con filamentos de actina marcados con faloidina rodamina, resaltan las microvellosidades en el polo apical (cabeza de flecha). Las imágenes de la derecha corresponden a las mismas células de la izquierda con marcaje de DNA

con DAPI, se observan las bacterias acumuladas (flechas).. Microscopía de epifluorescencia, 1000X.

Estos resultados se confirmaron al hacer el análisis con microscopía confocal observando que la marca de actina corresponde a su localización en microvellosidades y corteza celular al hacer la superposición de imágenes (Fig 12).

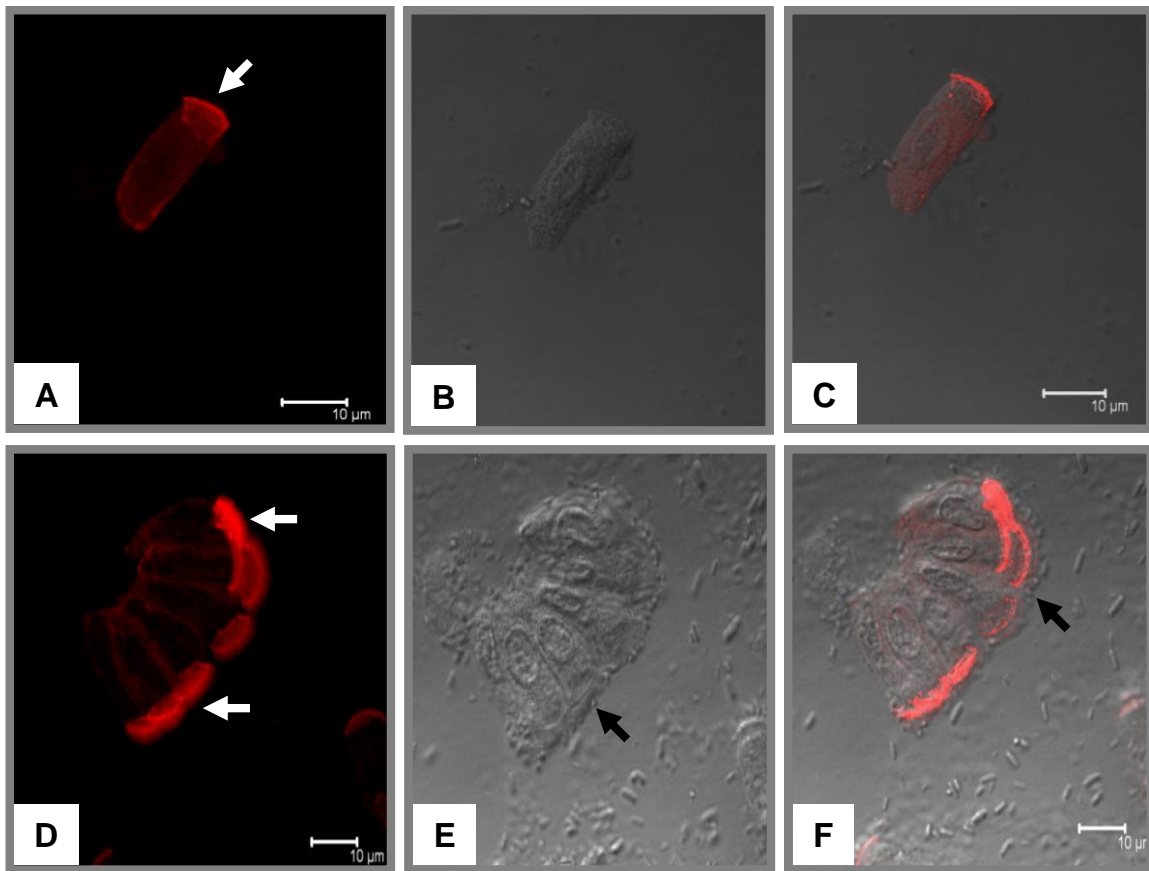


Fig. 12. Enterocitos de ileon de conejo de un cultivo primario infectados con REPEC. A y D. Filamentos de actina marcados con faloidina rodaminada. B y E. Contraste de fases de las células correspondientes en A y D. Los paneles C y F muestran las imágenes superpuestas (A+B y D+E). Microscopía confocal, 1000X.

Otra de las proteínas evaluadas para confirmar que los enterocitos del cultivo primario conservan su estructura, fueron las citoqueratinas (CK8/18). En la figura 13 se puede apreciar la marca que corresponde a la observada en enterocitos de

un corte de ileon en donde también se realizó la marca de CK8/18 (A) comparando con la marca obtenida en los cultivos primarios usando el mismo anticuerpo (B).

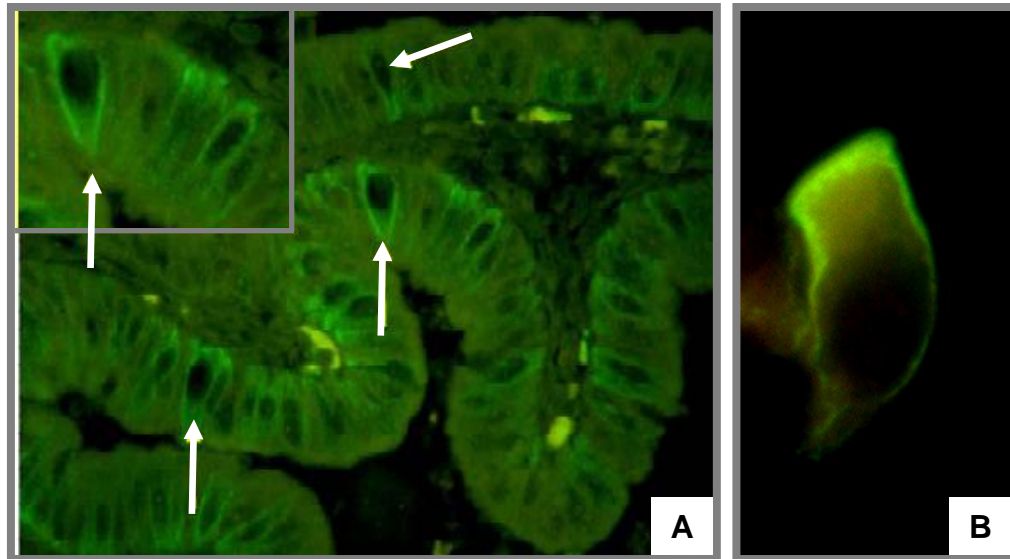


Fig. 13 Marca de citoqueratina 8/18 en tejido intestinal normal de conejo enterocitos marcados con flechas (A), marca de citoqueratina en enterocito obtenido a partir de cultivo primario con tejido evertido (B)

5. Adhesividad bacteriana

Para confirmar la adhesividad bacteriana a los enterocitos se hizo el marcaje del DNA celular y bacteriano con DAPI y se evaluaron mediante microscopía de epifluorescencia. En la figura 11 se nota claramente el núcleo de los enterocitos marcado con DAPI y en los cultivos infectados se aprecia también el DNA bacteriano de color azul, apreciándose a las bacterias adheridas a su superficie (Fig. 11, páneles F y H). Finalmente se hizo la sobreposición de imágenes que corroboró la adhesión de las bacterias a los enterocitos marcados con la faloidina rodaminada mediante microscopia confocal (Figs. 12, páneles C y F).

Otro método utilizado para evaluar la adhesividad bacteriana a los enterocitos fue la microscopía de Nomansky en donde se observaron las bacterias estrechamente unidas a la superficie del enterocito (Fig 14).

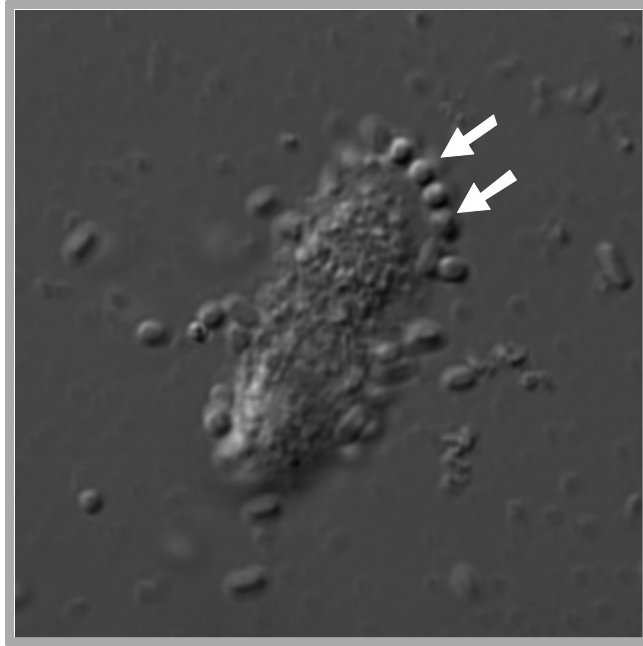


Fig. 14. Enterocito infectado con REPEC observado mediante la técnica de interferencia de contraste de Nomansky en donde se observan a las bacterias que permanecen adheridas a la superficie del enterocito (flechas).

La observación ultraestructural de las muestras de cultivos primarios no infectados e infectados con REPEC mediante microscopía electrónica de transmisión, demostró que las bacterias se adhieren a los enterocitos, encontrándose en algunos sitios la destrucción de las microvellosidades y la formación de estructuras que podrían considerarse como pedestales (Fig. 15).

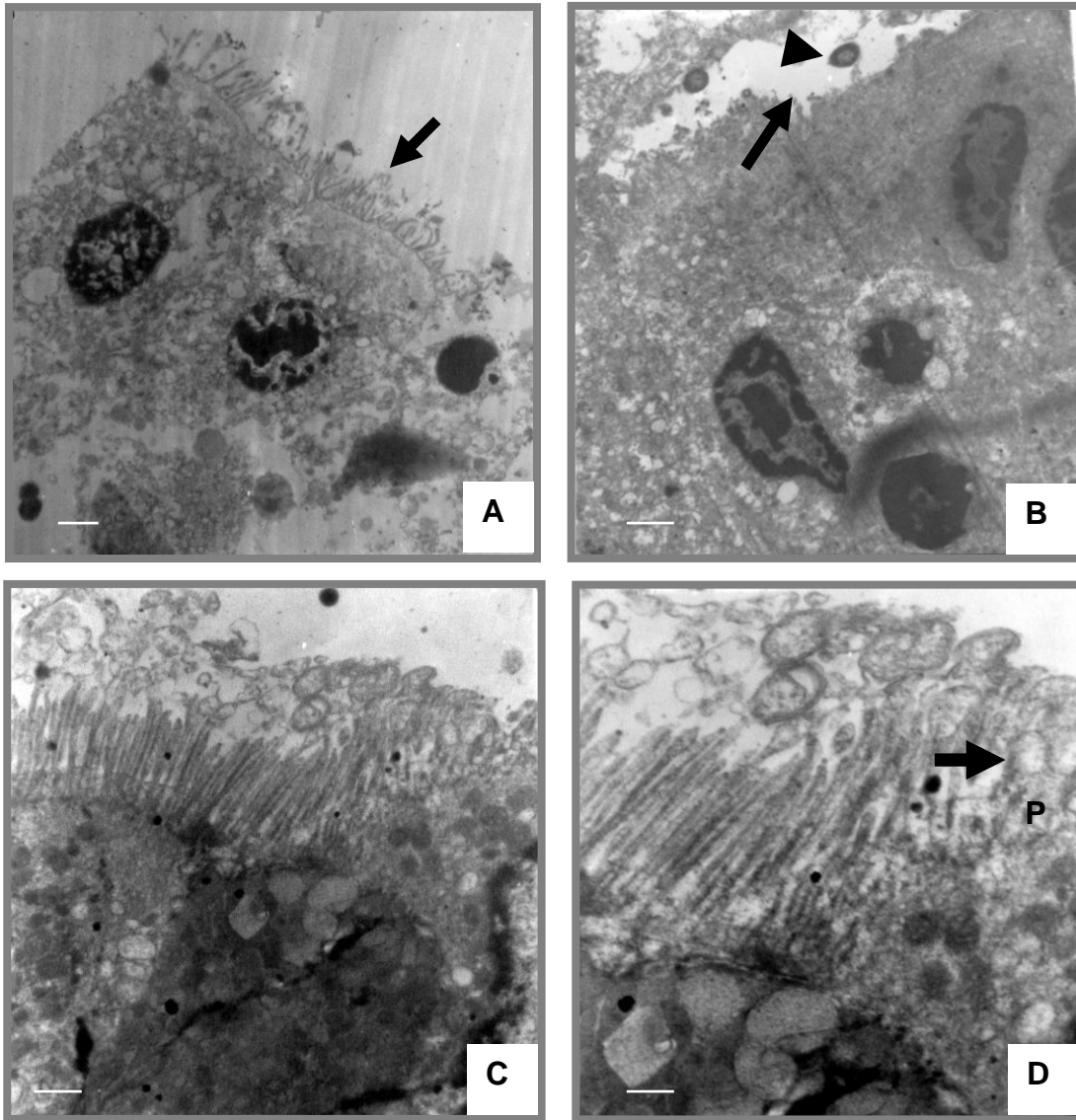


Fig. 15 Microscopía electrónica de transmisión: Enterocitos obtenidos del cultivo primario sin infectar, se observan aún las microvellosidades (flecha)(A); Enterocitos obtenidos de cultivo primario con infección, se observan las bacterias (cabeza de flecha y la pérdida de microvellosidades (flecha) (B). Enterocitos en infección que aún conservan microvellosidades(C), A mayor aumento se aprecian estructuras semejantes a un pedestal (marcado con P), en donde se asientan las bacterias (flecha) (D). Barra 1.7 μm

X. DISCUSIÓN

En años recientes, se ha puesto una considerable atención en el estudio del mecanismo de adhesión de EPEC a las células epiteliales (Knutton, 1992). Con el fin de seguir estudiando estos procesos a nivel celular y molecular, se han desarrollado numerosos modelos de infección; en este trabajo se describe por primera vez un cultivo de tejido intestinal evertido con el fin de obtener enterocitos en cultivo primario para ser utilizados como modelo de infección por REPEC, el cual representa diversas ventajas entre las que destacan: que no es necesario disponer de un bioterio que reúna los elementos obligatorios para el confort de los animales en experimentación, no representa costos de alimentación de dichos animales, no requiere del uso de un quirófanos, no es necesaria la compra de animales con características estrictamente similares, además de darle utilidad a las vísceras de conejo de abasto, las cuales no suelen ser consumidas, evitando a su vez el desperdicio de la canal para la obtención de muestras.

En la actualidad la mayoría de los reportes corresponden a estudios de infección con cultivos de líneas celulares que se llevan a cabo en una gran variedad de células entre las que encontramos a las 3T3 (porcino); Nck 1, Nck 2 (embrionarias); RK13 (conejo), CaCo, T84 (células de carcinoma de colon humano); Hep2, etc. (Schuller, 2009; Girard, 2008). Sin embargo se ha observado que existen diferencias entre lo que sucede en un modelo *in vitro* en relación a lo que ocurre en infecciones naturales, es por ello que se vuelve necesario tratar de hacer modelos reproducibles que se apeguen lo más posible a los procesos que se dan en los organismos vivos. (Hicks, 1998)

Considerando esto último, dentro de los modelos utilizados para el estudio de los mecanismos de infección por *E.coli*, nos encontramos que la mayoría de ellos requieren animales vivos los cuales son infectados, sometidos a un estrés prolongado, para después recuperar las muestras para su estudio, el tiempo requerido para la obtención de resultados suele ser largo, las condiciones de experimentación llegan a ser difíciles de replicar, se requiere de ciertos materiales

que pueden llegar a ser muy costosos además de un control específico del mecanismo de infección según el modelo, etc. También se ha trabajado con la utilización de explantes intestinales de animales o humanos, los cuales son obtenidos con ayuda de fórceps especiales para la toma de biopsias mediante un proceso de endoscopia, exponiendo la superficie epitelial sobre sostenedores especiales fabricados de poliestireno los cuales restringen el área de superficie empleada para reproducir la infección con EPEC. (Humpries, 2009; Hicks, 1998; Mundy, 2007 y Girard, 2007). Por otro lado está el modelo de asa ligada, en el cual por medio de una laparotomía abdominal en un animal vivo, se aísla un segmento de intestino, que se liga en dos puntos con una sutura, posteriormente se inocula con bacterias y se procede al cierre de la incisión, se espera el tiempo necesario para producir la infección y se sacrifica o se espera a que el animal experimental muera para finalmente recuperar el segmento intestinal previamente ligado, este segmento se procesa en el laboratorio para obtener células mediante exfoliación para su análisis. Otro modelo consiste en la obtención de enterocitos a partir de biopsias de humano, de las cuales las células son aisladas mediante la quelación del tejido con EDTA (Knutton, 1987).

Todos estos métodos implican trabajar con animales vivos o bien las complicaciones relacionadas con la obtención de muestras directamente de seres humanos, adquiridas únicamente bajo su consentimiento; es así que la habilidad de desarrollar un modelo de cultivo primario a partir de un órgano "*in vitro*", con tejido de animales adultos permite redirigir la investigación hacia un método menos complicado en el que se puedan realizar pruebas o mediciones controladas, que de otra manera no sería posible o ético llevar a cabo en sujetos vivos; además permite realizar observaciones microscópicas que nos indican los cambios que sufren los componentes celulares al ser infectados. A partir de estos modelos se ha demostrado que es posible inducir el daño estructural causado por REPEC en las células, de ahí que el cultivo de explantes de ileon de conejo pueda proveer un buen modelo de investigación (Girard, 2008; Hicks, 1998).

Con el fin de mantener muestras de tejido intestinal viable, para realizar pruebas de infección con REPEC, se han utilizado métodos similares a los reportados por otros autores utilizando cultivo de órganos *in vitro* y técnicas de disgregación celular por medio de la utilización de enzimas y/o exfoliación. (Humpries, 2009; Mundy, 2007 y Girard, 2008).

Girard 2008, reportó por primera vez un modelo de cultivo de órgano modificado (mIVOC), el cual consideró como una herramienta importante para el estudio de la infección con bacterias entéricas.

Nuestro método ofrece la ventaja de una mínima utilización de materiales y reactivos, en comparación con los procesos que se han descrito tanto en el modelo IVOC o mIVOC, como en el cultivo primario de enterocitos por disgregación enzimática. Además de la sencillez en la metodología con una mínima manipulación del tejido desde la toma de muestra hasta el proceso de incubación, el ahorro de tiempo en el procesamiento de las muestras así como en el periodo total de incubación.

La obtención de enterocitos aislados y viables nos permite tener un panorama más completo del proceso infeccioso, lo más parecido a lo que sucede en el hospedero natural por tanto un factor de suma importancia para validar el uso de nuestro modelo fue la viabilidad obtenida en los enterocitos; los resultados obtenidos fueron del 53 % en cultivos sin infectar y de 51% en cultivos infectados, lo cual consideramos aceptable ya que el número de células que pueden ser estudiadas por separado es considerable, los resultados de viabilidad en este modelo fueron mejores a los obtenidos al tratar de reproducir uno de los modelos previamente descritos, por disgregación celular por métodos enzimáticos, en el que obtuvimos una viabilidad promedio del 25%.

Knutton en 1985 reportó una viabilidad del 90% utilizando la quelación por EDTA, manejando tiempos de 30 minutos y con un tiempo de infección máximo de 2hrs.

Su método consistió en tomar biopsias de adultos voluntarios y transportados al laboratorio en hielo, con medio MEM (Medio esencia mínimo) buferado con HEPES, incubando a 37°C en rotación, para después centrifugar y obtener los enterocitos.

Además de contabilizar la viabilidad de los enterocitos obtenidos, se evaluó la integridad de la estructura celular realizando la observación del citoesqueleto mediante el marcaje de actina y citoqueratinas. Se logró determinar la integridad de estos elementos mediante microscopía de fluorescencia, además se realizaron ensayos tanto en cultivos infectados con REPEC como no infectados.

Cabe destacar que en el grupo infectado pudimos observar un ligero aumento en la fluorescencia, hacia la zona apical de los enterocitos, esto debido probablemente a los cambios provocados por REPEC en el citoesqueleto; por otro lado, la evaluación de citoqueratina nos permitió reafirmar que la estructura del enterocito permanece aún después de 4hrs de incubación comparándolo con el marcaje en un corte de tejido normal. Los enterocitos obtenidos en el método de cultivo descrito en este trabajo mantienen su estructura interna lo que se relaciona con la viabilidad observada y por tanto es posible proponer que el modelo de cultivo descrito podrá ser utilizado para evaluar cambios en el citoesqueleto ocasionados por la bacteria ya que como es sabido EPEC produce una lesión de adherencia y destrucción durante su infección y esta se caracteriza por la pérdida localizada de microvellosidades y la adherencia íntima de la bacteria a la superficie del enterocito; por lo tanto se producen cambios en la reorganización del citoesqueleto de actina y de otras proteínas como son las citoqueratinas para la futura formación de una estructura semejante a un pedestal (Bridger, 2010).

La viabilidad de los enterocitos y el mantenimiento de su estructura nos permite establecer un modelo de cultivo primario sencillo y acceder más fácilmente a la investigación de la interacción de la bacteria *E. coli* con células de la mucosa intestinal, con ayuda de técnicas microscópicas en periodos de tiempo cortos.

La adhesión de la bacteria a la superficie de la mucosa intestinal es actualmente reconocida como un evento importante en la patogénesis de las enfermedades diarreicas (Mundy 2007). Batt en 1987 demostró que el cultivo de órgano de explantes de ileon de conejo provee un modelo adecuado para la investigación del daño causado por REPEC al intestino delgado. Los estudios ultraestructurales, permitieron identificar las anomalías producidas en el borde de cepillo que caracterizan a esta infección, observaron mediante microscopía óptica cierto grado de adherencia de bacteria REPEC a las células de la mucosa intestinal, principalmente en la porción del ileon. (Bardiau, 2010).

En nuestro estudio demostramos la presencia de REPEC en la periferia de los enterocitos después de 4hrs de infección, la cual fue observada en las muestras haciendo marcaje de actina y DNA con inmunofluorescencia, además de las observaciones realizadas mediante microscopía confocal y mediante el uso de la técnica de Nomarsky. Hicks (1996) reportó que la adherencia dependía del tiempo de exposición a la infección, ya que en algunos casos no observó claramente la adherencia bacteriana, sin embargo en otros con una incubación de hasta 8 hrs, presentó las estructuras denominadas pedestales. Con el fin de corroborar nuestros resultados sobre adhesión bacteriana, se hicieron ensayos de microscopía electrónica de transmisión; en las imágenes obtenidas logramos observar la adherencia de la bacteria, en algunos casos se pudo apreciar la pérdida de microvellosidades y aún la formación de una estructura semejante a un pedestal.

Investigar el mecanismo de polimerización de actina con medios experimentales dependerá no sólo de modelos de infección artificiales en cultivos de líneas celulares, sino que deberá extenderse al estudio de la interacción de la bacteria con la producción de la lesión A/E en las superficies de la mucosa intestinal, utilizando también modelos *in vivo* o mediante estudios *ex vivo* como sería el cultivo primario o de órganos (Frankel, 2008). En este sentido se han creado diversos modelos con el fin de poder recrear y reproducir los eventos que suceden

en forma natural durante una infección y el método de cultivo de tejido intestinal evertido propuesto en este trabajo podrá ser de utilidad para este fin y a futuro podrá ser empleado para encontrar los posibles mecanismos en los cuales se pueda intervenir para bloquear los procesos naturales de la infección y de esta forma crear nuevas estrategias para evitar la infección y favorecer la destrucción bacteriana, con mayor especificidad.

XI. CONCLUSIONES

1. En este trabajo establecimos un modelo de cultivo primario de enterocitos mediante una técnica de explante con eversión de mucosa intestinal.
2. Logramos una viabilidad del 51% para los enterocitos infectados y cultivados mediante la técnica propuesta en este trabajo.
3. Demostramos que la integridad morfológica de los enterocitos se mantenía al observar cultivos en los que se marcó actina y citoqueratinas 8/18 notando que se conservaba la estructura y localización subcelular de estas proteínas.
4. Comprobamos que estos cultivos son adecuados para realizar estudios futuros sobre el mecanismo de infección de REPEC ya que mediante microscopía de fluorescencia, microscopía confocal, técnica de Nomansky y microscopía electrónica de transmisión observamos la adhesividad de las bacterias a los enterocitos en cultivo primario a las 4hrs de infección.
5. Se evitó el grave problema de la heterogeneidad de las muestras asociada al uso de animales, sin olvidar las motivaciones éticas respecto al sacrificio de animales de experimentación lo cual conlleva a economizar en el uso de reactivos o drogas, pues los cultivos se realizan en volúmenes reducidos, asegurando un acceso directo a los procesos celulares.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Aktan I., Springings KA., La Rogione RM., Faul-Kren LM., Priba GA and Woodward MJ. (2004). Characterisation of attaching-effacing *Escherichia coli* isolated from animals at slaughter in Englan and Wales. *Vet. Microbiol.* Vol 102 Issues 1-2: 43-53.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2008). *Molecular Biology of The Cell*. Fifth edition. Garland Science Taylor and Francis Group. New York, USA.
- Bardiau M, Szalo M, Mainil JG., (2010). Initial adherence of EPEC, EHEC and VTEC to host cells. *Veterinary Research*, Sep-Oct;41(5):57.
- Batchelor M, Guignot J, Patel A, Cummings N, Cleary J, Knutton S, Holden DW, Connerton I, Frankel G. (2004). Involvement of the intermediate filament protein cytokeratin-18 in actin pedestal formation during EPEC infection. *EMBO Rep* 5(1):104-110.
- Bridger PS, Mohr M, Stamm I, Fröhlich J, Föllmann W, Birkner S, Metcalfe H, Werling D, Baljer G, Menge C. (2010). Primary bovine colonic cells: a model to study strain-specific responses to *Escherichia coli*. *Vet Immunol Immunopathol.* Sep 15;137(1-2):54-63. Epub 2010 Apr 24.
- Campallone KG., Giese A., Tipper DJ. and Leong JM. (2002). A tyrosine-phosphorylated 12-amino-acid sequence of enteropathogenic *Escherichia coli* Tir binds thr host adaptor protein Nck and is required for Nck localization to actin pedestals. *Mol. Microbiol.* 43:1227-1241.
- Caron E, Crepin VF, Simpson N, Knutton S, Garmendia J and Frankel G (2006). Subversion of actin dynamics by EPEC and EHEC. *Curr. Op. Microbiol.* 9:40-45.
- Cartwright IJ, Higgins JA. (1999). Isolated rabbit enterocytes as a model cell system for investigations of chylomicron assembly and secretion. *Journal of Lipid Research.* 40(7):1357-1365.

- Celli J, Deng W, Finlay BB. (2000). Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) attachment to epithelial cells: exploiting the host cell cytoskeleton from the outside. *Cell Microbiol*, 2(1):1-9.
- Chen, H., Bernstein, B. W. and Bamberg, J. R. (2000). Regulating Actinfilament dynamics in vivo. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 19-23.
- Chen HD. and Frankel G. (2005). Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiol. Rev.* 29:83-98.
- Clarke SC., Haugh RD., Freestone PPE. and Williams PH. (2003). Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 16:365-378.
- Cooper JA, Schafer DA., 2000 Control of actin assembly and disassembly at filament ends. *Current Opinion of Cell Biology.* Feb;12(1):97-103. Review.
- De la Cruz T.,V. (2003) Establecimiento de un cultivo de enterocitos de conejo como modelo para estudiar los efectos de *Escherichia coli* enteropatógena sobre citoesqueleto. Tesis profesional. FES Cuautitlán. UNAM.
- Dean P, Kenny B. (2009). The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli*: ganging up on the host cell, *Current Opinion Microbiology* Feb;12(1):101-9. Epub 2009 Jan 12. Review
- Deng J. and Finlay BB. (2000). Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) attachment to epithelial cells: exploiting the host cell cytoskeleton from the outside. *Cel Microbiol.* 2(1): 1-9.
- Estrada G. T, Lopez S. C, Thompson B R, Abonce M, Lopez H. D, Santos JI, Rosado JL, DuPont HL, Long KZ. (2009). Association of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes with infection and diarrhea among Mexican children and association of atypical enteropathogenic *E. coli* with acute diarrhea. *J. Clin. Microbiology* 47:93-98.
- Frankel G., Knutton S. (2004) Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. *Microbiology.* 150(Pt 3):527-38.

- Frankel G., Phillips AD. (2008). Attaching effacing *Escherichia coli* and paradigms of Tir-triggered actin polymerization: getting off the pedestal. *Cell Microbiol.* 10(3):549-556.
- Freshney I. R. (2005). *Culture of animal cells: a manual of basic techniques*, 4a Ed. Wiley – Liss USA. Cap. 1.
- Garmendia J, Frankel G, Crepin VF. (2005). Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infection and Immunity.* 73(5):2573-2585.
- Girard, F., Frankel G., Phillips A. D., Cooley W., Weyer, U., Dugdale, A. H., Woodward M. J., y La Ragione R. M. (2008). Interaction of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 with mouse intestinal mucosa. *FEMS Microbiol. Lett.* 283:196-202.
- Goosney D.L., De Vinney R. y Finlay BB. (2001). Recruitment of cytoskeletal and signaling proteins to enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* pedestals. *Infect Immun.* 69:3315-3322.
- Gouin E., Welch MD. and Cossart P. (2005). Actin-based motility of intracellular pathogens. *Current Opinion in Microbiology.* 8:35-45.
- Gruenheid S. and Finlay BB. (2003). Microbial pathogenesis and cytoskeletal function. *Nature.* Vol 422: 775-781.
- Gruenheid S., De Vinney R., Bladt F., Goosney D., Gelkop S. and Gish GD. (2001). Enteropathogenic *E. coli* Tir binds Nck to initiate actin pedestal formation in host cells. *Nature Cell Biol.* 3:856-859.
- Hecht G. (2001). Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions. VII. Enteropathogenic *Escherichia coli*: physiological alterations from an extracellular position. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 281:G1-G7.
- Hicks S, Candy D., Phillips A. (1996) Adhesion of Enteroaggregative *Escherichia coli* to Pediatric Intestinal Mucosa. *Infection and Immunity* 64:11 pp.4751-4760.

- Hicks S., Frankel G., Kaper J. (1998). Role of Intimin and Bundle-Forming Pili in Enteropathogenic *Escherichia coli* Adhesion to Pediatric Intestinal Tissue. 66:4 p. 1570 - 1578.
- Humphries R., Whaterhouse C., Mulvey. (2009) Interactions of Enteropathogenic *Escherichia coli* with Pediatric and Adult Intestinal Biopsy Specimen during Early Adherence. Infection and Immunity 77:10 p 4463-4468
- Kenny B. (2002). Mechanism of action of EPEC type III effector molecules. Int J Med Microbiol. 291(6-7):469-477.
- Knutton S, Lloyd DR, McNeish AS. (1987) Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. Infect Immun;55:69-77.
- Knutton S, Shaw R., Bhan M., et al, (1992).)Infection and Immunity Ability of Enteroagregative *Escherichia coli* Strains to Adhere in vitro to Human Intestinal Mucosa 60:5 p.2083-2091.
- Krause G., Zimmerman S and Beutin L. (2005). Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin - (*eae*) gene positive *Escherichia coli* types. Veterinary Microbiology. 106(1-2): 87-95.
- Luo Y., Frey EA., Pfuetzner RA., Creagh AL., Knoechel DG., Haynes CA., Finlay BB. and Strynadka. (2000). Crystal structure of enteropathogenic *Escherichia coli* intimin-receptor complex. *Nature*. 405:1073-1077.
- Marchès O., Neugayrede JP., 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. Infect. Immun. 8(4):2171-2182
- Marjomäki V and Schaibe UE. (2005). Microbial strategies to exploit host cells. Meeting on Spatial and Temporal Dynamics of the Endomembrane System. EMBO reports. 6: 408-412.
- Mc Callun SJ. and Theriot JA. (2000). Bacterial manipulation of the host cell cytoskeleton. In Cellular Microbiology (Cossart P., Boquet P. Normark S.

And Rappuoli R, editors). ASM Press, Eashington DC USA. Edition. Chapter 10, pp.171-191.

- Milon A., Oswald E and De Rycke. (1999). Rabbit EPEC: a model for the study of enteropathogenic *Escherichia coli* Vet. Res. 30:203-219.
- Moon, HW., Whipp SC., Argenzio, RA., Levine, MM. and Gianella, RA. (1983) Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbits intestines. *Infect Immun.* 41: 1340-1351
- Morgan DC, Darling SJ., (1995) Cultivo de células animales. Zaragoza: Ed. Acribia; 1995.
- Mundy, R., Girard F., FitzGerald, A.J. y Frankel G. (2006). Comparison of colonization dynamics and pathology of mice infected with enteropathogenic *Escherichia coli*, enterohaemorrhagic E. coli and *Citrobacter rodentium*. *FEMS Microbiol. Lett.* 265:126-132.
- Mundy, R., MacDonald t. t., Dougan, G., Frankel G. y Wiles S. (2005). *Citrobacter rodentium* of mice and man. *Cell. Microbiol.* 7:1697-1706.
- Mundy R., Schüller S., Girard F., et al., (2007) Functional studies of intimin *in vivo* and *ex vivo* : implications for host especificity and tissue tropism. 153: 959-967.
- Nakazato G., Gyles C., Ziebell K., Kler R.; et. al. (2004). Attaching and effacing *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil: characteristics and serotypic relationship to human enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *Vet. Microbio.* 101(4):269-277.
- Oliver R., García T.C., Juárez M.L, et.al. (2008) Infection of rabbit kidney cells (RK13) by enteropathogenic *Escherichia coli* as a model to study the dynamics of actin cytoskeleton. *Can. J. Microbiol.* 54:748-757.
- Pollard TD. and Borisy GG. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell.* 112:453-465
- Rodríguez AG. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública Mex.* 44:464-475.

- Schüller S., Lucas M., Kaper j., et al. (2009) The *ex vivo* response of human intestinal mucosa to enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Cell Microbiology* 11(3): 521-530.
- Schüller, S., Chong Y., Lewin J., Kenny B, Frankel G. y Phillips A. D. (2007). Tir phosphorylation and Nck/N-WASP recruitment by enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* during *ex vivo* colonization of human intestinal mucosa is different to cell culture models. *Cell. Microbiol.* 9:1352-1364.
- Sekiya K., Ohishi M., Ogino T., Tamano K., Sasakawa C. and Abe A. (2001). Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:11638-11643.
- Tampakaki A P., Fadouloglou VE., Gazi AD., Panopoulus NJ and Kokkinidis M. (2004). Conserved features of type III secretion. *Cellular Microbiology.* 6(9): 805-816
- Vallance BA., Finlay BB. (2000). Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1;97(16):8799-8806.
- Welch MD. and Mullins RD. (2002). Cellular Control of actin nucleation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18:247-288.