



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

**Efecto de la serotonina sobre los
filamentos de actina en células RK13**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA:

MARTHA LILIANA ROBLERO MARTÍNEZ

ASESOR:

DR. CARLOS GERARDO GARCÍA TOVAR

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2016



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.



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

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES-CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: M. en A. ISMAEL HERNANDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos **La Tesis:**

"Efecto de la serotonina sobre los filamentos de actina en células RK13"

Que presenta la pasante: **MARTHA LILIANA ROBLERO MARTINEZ**
Con número de cuenta: **30626826-3** para obtener el Título de: **Médica Veterinaria 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 ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 13 de enero de 2016.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Misael Rubén Oliver González	
VOCAL	Dr. Carlos Gerardo García Tovar	
SECRETARIO	M. en D. Olivia Adams Vázquez	
1er SUPLENTE	M. en C. Rubén Arturo Torres León	
2do SUPLENTE	M.V.Z. Fabiola Pineda Ramirez	

NOTA: Los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).
En caso de que algún miembro del jurado no pueda asistir al examen profesional deberá dar aviso por anticipado al departamento.
(Art 127 REP)
IHM/ntm*

El presente trabajo se realizó en el
Laboratorio 4 “Morfología Veterinaria y Biología Celular” de la
Unidad de Investigación Multidisciplinaria
de la FES Cuautitlán UNAM, con el apoyo de los proyectos:

“Desarrollo de habilidades y destrezas en los estudiantes de las asignaturas de
Anatomía Veterinaria Básica y Biología Celular de la carrera de MVZ para la
generación y difusión de información obtenida en procesos de elaboración de
material didáctico”

(Proyecto PAPIME CLAVE PE 204414)

y

“Morfología Veterinaria y Biología Celular”
(Proyecto PIAPIC 15).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco y dedico mi pequeño logro a mis padres, quienes han sido mi principal guía, ejemplo y apoyo. Gracias por tanta paciencia y amor que me han brindado. LOS AMO.

A mis hermanos May y Van, han sido un gran ejemplo a seguir, gracias por echarme porras en cada momento, LOS QUIERO MUCHO.

A quienes son parte de mí día a día y de mi familia, gracias Migue por el apoyo y la confianza inmensa que depositas en mí, Santy por reírte de mí, brindarme consejo y animarme siempre, Die por ser uno de mis más grandes amigos, por todo el apoyo y animo que me das. Amaury, Lalito y a las niñas (Ju, Fana, Andy) por sacarme sonrisas y hacer más ameno esto de la veterinaria, sin ustedes habría sido todo más difícil.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México en especial a la FES Cuautitlán, donde viví una gran etapa de mi vida, conocí a personas espectaculares y pude obtener conocimientos y herramientas.

Dr. Carlos Gerardo García Tovar, gracias por su tiempo, conocimiento y gran paciencia. Fue un gran guía en la realización de este trabajo.

M. en C. Francisco Rodolfo Gonzales Díaz, por el apoyo y asesoría en la fase experimental del trabajo, así como la revisión de los cultivos en la microscopia de fluorescencia, toma y arreglo de las fotografías que conforman esta tesis. Gracias por enseñarme tantas cosas, ser paciente y guiar este trabajo, su apoyo en el laboratorio fue más que importante.

Dr. José Luis Nieto Bordes por el apoyo y asesoría técnica en la realización de los cultivos celulares y en la aplicación de la técnica de fluorescencia. Gracias por el tiempo, las enseñanzas y esas risas que siempre me brindó en todo este proceso.

Dr. Rubén Oliver, M en D. Olivia Adams, M en C Rubén Torres y MVZ Fabiola Pineda por su tiempo y valiosas observaciones.

ÍNDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Antecedentes.....	12
Justificación.....	16
Hipótesis.....	17
Objetivos.....	18
Métodos.....	19
Resultados.....	23
Discusión.....	28
Conclusiones.....	33
Referencias.....	34

RESUMEN

Los filamentos de actina forman parte del citoesqueleto y resultan de la polimerización de la proteína actina, dando origen a estructuras de orden superior (haces paralelos, haces contráctiles, redes en malla y dendríticas) y existe una serie de proteínas que se unen a actina para regular su función.

Las funciones de los filamentos de actina son diversas, dan forma y soporte a las células, movimiento para desplazarse, movimiento intracelular de organelos y otros elementos y participan en las uniones intercelulares y célula-matriz extracelular. Sus funciones son reguladas a través de diferentes vías de señalización que se activan mediante diferentes estímulos extra e intracelulares, un ejemplo es la serotonina que modula la dinámica de los filamentos de actina, estabilizando o desestabilizándolos para permitir su polimerización o despolimerización. Además, existen patógenos que tienen la capacidad de modificar la dinámica de los filamentos de actina para su beneficio, entre ellos se encuentra *E.coli* enteropatógena para conejo (REPEC) que mediante un sistema de secreción tipo III introduce proteínas efectoras en la célula hospedera que alteran el comportamiento de los filamentos de actina estimulando la formación de pedestales ricos en actina en los enterocitos en donde se adhiere la bacteria para colonizar la mucosa intestinal.

El objetivo de este trabajo fue determinar los cambios en los filamentos de actina en células RK13 ocasionados por la serotonina mediante ensayos de fluorescencia directa utilizando faloidina conjugada a rodamina para marcar los filamentos. Se establecieron cultivos de células RK13 que fueron sometidos a diferentes tratamientos con serotonina y con el fin de precisar el efecto de esta hormona, se utilizó el modelo de infección con REPEC que manipula el citoesqueleto de actina. La serotonina ocasionó una disminución en la formación de las fibras de estrés evitando la polimerización de actina y en el número de pedestales en los cultivos infectados con REPEC.

INTRODUCCIÓN

La serotonina es un neurotransmisor estudiado principalmente por sus efectos en el tono muscular, metabolismo y procesos del comportamiento, actualmente su estudio se ha ido dirigiendo a los procesos que se desarrolla en el páncreas, hígado, próstata, glándula mamaria e intestino (Pai and Horseman, 2011), siendo de particular interés este último ya que aproximadamente el 95% de la serotonina se localiza en el tracto intestinal, en donde juega un papel muy importante en la peristalsis (Böttner et al., 2013).

Se sabe que a partir de diferentes estímulos las células pueden cambiar su forma, moverse, contraerse y modificar la organización interna de sus componentes, lo cual se logra a través del citoesqueleto. (Alberts et al., 2014). Existen bacterias que afectan el epitelio intestinal, dentro de las que se encuentra la *Escherichia coli* enteropatógena, (EPEC) que produce una enfermedad diarreica. Para colonizar la mucosa intestinal, EPEC afecta a los enterocitos provocando rearrreglos del citoesqueleto que conducen a una pérdida de las microvellosidades y la formación de elevaciones de membrana estructurados por la polimerización de actina, denominados pedestales, que es el sitio en donde la bacteria se asienta (Vidal, 2003; Geo et al., 2010).

Intestino Delgado

El intestino delgado es la porción más amplia del tubo digestivo, este se divide en tres porciones: la primera es el duodeno, comienza a la altura del píloro y termina en la flexura duodenoyeyunal, a partir de ahí comienza el yeyuno siendo aproximadamente dos quintas partes del intestino delgado, y finalmente el íleon, que termina en el orificio ileal a partir de donde inicia el intestino grueso (Gartner and James, 2011; Dyce et al., 2012; Ross and Pawlina, 2012).

El intestino delgado tiene como funciones la digestión y la absorción, con el fin de realizar tales funciones cuenta con extensiones que amplían su superficie de contacto (Gartner and James, 2011; Ross and Pawlina, 2012) como:

- * Pliegues intestinales con un centro de submucosa, rodeando de la mitad a dos tercios de la circunferencia de la luz intestinal. Van desde el píloro, abundan en el duodeno y disminuyen hasta el inicio del yeyuno.
- * Vellosidades, son evaginaciones digitiformes, que aumentan la superficie de la luz hasta 10 veces y la cubren completamente dándole un aspecto aterciopelado.
- * Criptas que forman invaginaciones de la mucosa intestinal, son estructuras tubulares simples que surgen de la base de las vellosidades, multiplican la superficie de 3 a 4 veces.
- * Microvellosidades de los enterocitos, amplían la superficie hasta 20 veces, cada célula posee varios miles.

La túnica mucosa del intestino delgado cuenta con un epitelio simple columnar con microvellosidades y exocrinocitos caliciformes intercalados, lámina propia y muscular de la mucosa. La lámina propia está formada por tejido conjuntivo laxo, con nódulos de tejido linfático. La muscular del órgano conformada por células musculares lisas (Gartner and James, 2011; Ross and Pawlina, 2012).

En el epitelio de la mucosa se distinguen cinco tipos celulares principales (Gartner and James, 2011; Ross and Pawlina, 2012; Campos, 2014):

- * Epiteliocitos columnares con microvellosidades (absorbentes), son las células encargadas de la absorción, son las más abundantes.
- * Exocrinocitos caliciformes, dispuestos entre los epiteliocitos columnares, son productoras de mucina, al ser secretada hacia la luz se transforma en moco.
- * Exocrinocitos con gránulos acidófilos (células de Paneth), se sitúan en la base de las criptas, de forma piramidal, mantienen la inmunidad innata mediante la secreción de sustancias antimicrobianas, metales pesados y la fagocitosis de bacterias.

- * Células M o con micropliegues, corresponden a enterocitos modificados, que cubren los grandes nódulos linfáticos de la lámina propia. Pueden fagocitar a los antígenos intraluminales, hacia la lámina propia para iniciar la respuesta inmunitaria.
- * Endocrinocitos gastrointestinales, productores de hormonas con actividad autocrina y paracrina. Entre ellas se encuentran las células enterocromafines encargadas de la secreción de serotonina.

Entre las hormonas que secretan los endocrinocitos gastrointestinales son las siguientes (Campos 2014):

- Motilina: controla el movimiento gastrointestinal.
- Colecistokinina: estimula la concentración vesicular, el flujo biliar, aumenta la secreción de enzimas pancreáticas, participa en la ingesta de líquidos.
- Péptido inhibitorio gástrico: inhibe la secreción de gastrina.
- Péptido intestinal vasoactivo: produce relajación de tracto digestivo, inhibe la secreción de gastrina pepsina y HCl, aumenta la secreción de agua y electrolitos.
- Secretina: induce la liberación pancreática de bicarbonato y agua en un pH ácido.
- Somatostatina: disminuye la digestión y la absorción de nutrientes por el tracto gastrointestinal, reduce la secreción de HCl, pepsina, gastrina, secretina, jugo intestinal y enzimas pancreáticas. Inhibe la absorción de glucosa y triglicéridos a través de la mucosa intestinal.
- Serotonina: participa en la motilidad, secreción y contracciones intestinales, inicia los reflejos peristálticos al detectar presión intraluminal.

Muchas han sido las investigaciones que describen la actividad de las células del epitelio intestinal, y la forma en que se involucran con el proceso de enfermedad, donde las células endócrinas forman un papel principal, incluso en algunas

especies se ha llegado a considerar el intestino el órgano endócrino más grande del cuerpo (Manabe et al., 2010; Whang et al., 2014).

Serotonina

El neurotransmisor serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT), es una molécula pequeña, se agrupa dentro de las aminas biógenas (Tortora and Derrickson, 2013), tiene efecto sobre trastornos de ansiedad, depresión, adicción y control de impulsos. Solamente el 2% se encuentra en el cerebro, el resto se encuentra en plaquetas, mastocitos, endocrinocitos intestinales (células enterocromafines) (Toro et al., 2010) y en el plexo mesentérico (Ganong, 2004). Como se indicó anteriormente, aproximadamente el 95% de la serotonina se localiza en el tracto intestinal, el 90% está en las endocrinocitos intestinales, en donde juega un papel muy importante en la peristalsis (Böttner et al., 2013).

La serotonina se obtiene a partir del triptófano, el cual es hidrolizado a 5-hidroxi-L-triptófano (5-HTP) por la enzima triptófano hidroxilasa (TPH-1), posteriormente es descarboxilado a serotonina por la enzima descarboxilasa de aminoácidos L-aromáticos (Nakamura et al., 2008; Toro et al., 2010). En el catabolismo de la serotonina se obtiene principalmente ácido 5-hidroindolacético por el sistema de monoaminoxidasa (Toro et al., 2010). La mayoría de las aminas biógenas generan tanto excitación como inhibición según sea el receptor presente en la sinapsis (Tortora and Derrickson, 2013).

Los receptores de la serotonina se clasifican en 7 familias dando lugar a 14 subtipos diferentes (Azmitia, 2001; Hannon and Hoyer, 2008; Ohtani et al., 2014): 5-HT₁ (1A, 1B, 1C, 1D) localizados en el hipocampo, amígdala, hipotálamo y corteza; 5-HT₂ se encuentran en la neocorteza, claustró y sistema límbico, músculo liso de órganos urinario, bronquios y útero; 5-HT₃ en nervios periféricos, hipocampo, amígdala, corteza cerebral y sustancia gelatinosa de la médula espinal; 5-HT₄ en grupos celulares en el hipocampo (Hannon and Hoyer, 2008; Toro et al 2010); 5-HT₅ subtipo A y B se localizan en la corteza cerebral, hipocampo y el cerebelo; el receptor 5-HT₆ se presenta de forma postsináptica en

el núcleo estriado, tubérculo olfatorio, núcleo accumbens y la corteza; 5HT7 presente en los vasos donde se involucra en la vasodilatación, además de estar en músculo liso de colon y el cerebro (Hannon and Hoyer, 2008). La mayoría de los receptores se unen a proteínas G (Ganong, 2004).

Los receptores 5-HT_{2A} median la agregación plaquetaria y la contracción del músculo liso, los 5-HT₃ se relacionan con el vómito, regulan la motilidad y secreción intestinal, localizados en el tracto digestivo y área postrema, los 5-HT₄ también localizados en el tubo digestivo facilitan la secreción y la peristalsis (Ganong, 2004; Hannon and Hoyer, 2008).

La serotonina tiene efectos directos sobre la proliferación, migración y crecimiento de muchos tipos celulares (Azmitia, 2001). En el cerebro, la serotonina participa en la regulación del ritmo cardíaco, apetito, agresión, actividad sensomotora, comportamiento sexual, cognición, percepción, aprendizaje, memoria y personalidad (Smythies, 2005) sueño, humor, depresión, ansiedad (Ganguly et al., 2008).

Citoesqueleto

El citoesqueleto es el soporte de las células, formado por tres tipos de filamentos, filamentos de actina o microfilamentos, microtúbulos y filamentos intermedios, cada uno se forma por diferentes proteínas y cuentan con diferentes mecanismos de organización a partir de eventos de polimerización y despolimerización de las unidades que los conforman (Alberts et al., 2014). La interacción que hay entre estos tres tipos de filamentos permite a la célula mantener o modificar su forma, dar soporte y fortaleza, la organización de su estructura interna, movimiento intracelular y de la célula como tal (migración) y realizar rearrreglos internos de acuerdo a los diferentes estímulos que reciba (Prasain and Stevens, 2009; Alberts et al., 2014).

Los filamentos intermedios son fibras proteicas gruesas y resistentes, llamados así por su diámetro de 11nm, entre los filamentos de actina y los microtúbulos, en

forma rectilínea o ligeramente curvada. Están formados por una familia de proteínas filamentosas localizadas en el citoplasma (queratinas, vimentinas y neurofilamentos) y el núcleo (láminas nucleares). Abundan en las células que soportan gran tensión mecánica como la prolongación de las células nerviosas, los epitelios y las células musculares. Son los componentes más estables del citoesqueleto (Alberts et al., 2014).

Estos filamentos forman una red que se extiende desde la envoltura nuclear hasta la membrana plasmática, e incluso, forman una malla que reviste la membrana nuclear interna para darle fortaleza (Alberts et al., 2014).

Los microtúbulos se forman de moléculas de tubulina que es una proteína globular, la unidad de polimerización de los microtúbulos es el dímero de 2 isoformas, α -tubulina y β -tubulina, estas moléculas se ensamblan en microtúbulos formando 13 protofilamentos que se unen lateralmente para formar el microtúbulo. Su función principal es la organización interna de la célula y el transporte intracelular (Alberts et al., 2014).

Los filamentos de actina están formados por subunidades proteicas de actina globular, que pueden ensamblarse y disgregarse rápidamente, son filamentos muy inestables, que al asociarse con otras proteínas pueden ser más estables. Estos filamentos son importantes para dar forma y movimiento a la célula (Alberts et al., 2014).

Filamentos de Actina

Los filamentos de actina se forman a partir de dos protofilamentos constituidos por la polimerización de los monómeros de actina globular para formar un filamento de unos 7nm de diámetro, resultado del enrollamiento de los dos protofilamentos en forma de hélice. Comparados con los microtúbulos, los filamentos de actina son más delgados, flexibles y cortos, aunque los filamentos de actina se encuentran en mayor cantidad, no suelen encontrarse aislados si no

en forma de haces paralelos, haces contráctiles, redes en malla o dendríticas, los cuales dan fortaleza a los filamentos (Alberts et al., 2014).

Los filamentos de actina son estructuras polares, con un extremo de mayor polimerización (extremo +) y otro de menor polimerización (extremo -), siendo esto esencial para su función. La polaridad de los polímeros está dada por la disposición de las subunidades asimétricas que siguen una orientación haciendo que los dos extremos sean diferentes, lo cual determina una diferencia en la velocidad de crecimiento del polímero en cada uno de sus extremos (Alberts et al., 2014).

La actina globular se une a una molécula de ATP con lo que se activa para polimerizar, una vez en el filamento hidroliza el ATP por ADP promoviendo su despolimerización. La polimerización empieza en una fase de nucleación en donde dos o tres moléculas de actina se juntan formando oligómeros a los cuales se les adicionan nuevas moléculas de actina que da lugar a la fase de elongación o crecimiento del filamento, llegando a un punto en que el filamento de actina deja de crecer manteniendo su longitud, se conoce como treadmilling, es el punto en el cual la velocidad en la que se agregan monómeros en el extremo + es igual a la velocidad en la que va perdiendo en el extremo - y por tanto el filamento está en fase de equilibrio y depende de la concentración crítica que corresponde a la concentración de monómeros de actina necesaria para la polimerización del filamento y varía entre los dos extremos, siendo mayor para el extremo - ($0.7 \mu\text{M}$) y menor para el extremo + ($0.1 \mu\text{M}$). Cuando la concentración crítica es menor que la necesaria para el extremo +, no se realiza el ensamblaje y los filamentos comenzarán a despolimerizarse (Pollard and Borisy, 2003; Alberts et al., 2014).

La dinámica de los filamentos de actina está regulada por una serie de proteínas que en conjunto se denominan Proteínas Asociadas a Actina (ABP, por sus siglas en inglés), de no tener alguna ABP los filamentos son completamente inestables y pueden despolimerizarse desde ambos extremos (Alberts et al., 2014; Gouin et al., 2005).

Dentro de estas proteínas están la timosina β -4 que se une a la ADP-actina evitando la polimerización. La profilina se une a la actina no polimerizada formando un complejo uno a uno y la activa para la polimerización, actúa como amortiguador manteniendo la concentración efectiva de actina libre a un nivel constante. Los mecanismos que afecten el complejo de la profilina-actina modificarán la polimerización de las moléculas de actina. Las proteínas de caperuza (capping) son proteínas que se unen selectivamente a uno u otro extremo de los filamentos, determinando la disposición en el citoesqueleto, y permiten que el polímero se una a otras estructuras, y así controla la adición o pérdida de subunidades por cualquiera de los dos extremos. La cofilina, es una proteína que segmenta los filamentos y favorece la despolimerización de actina, también se le conoce como factor despolimerizante de actina (ADF, por sus siglas en inglés). El complejo Arp2/3 actúa como nucleador de filamentos de actina para su polimerización, además que puede unirse a filamentos preformados y formar redes dendríticas (Alberts et al., 2014).

Asimismo existen proteínas motoras, las miosinas, que se unen a los filamentos de actina y permiten la formación de haces contráctiles o el transporte intracelular de organelos. Dentro de las estructuras formadas por actina y miosina está la sarcómera que forma la unidad morfofuncional de la contracción del músculo estriado. Dentro de las células no musculares los filamentos de actina forman haces que proporcionan soporte mecánico, expansiones citoplasmáticas y sistemas contráctiles para los movimientos celulares, los filamentos de actina pueden provocar que de la membrana celular se formen estructuras como las microespinas, filopodios y lamelipodios, que se involucran con la motilidad celular, asimismo para la fagocitosis la actina forma los pseudopodos y en el citoplasma forman haces contráctiles que cruzan el citoplasma y se denominan fibras de estrés que colaboran a dar soporte a la célula y terminan en la membrana celular en los sitios en los que la célula se une al sustrato, las adhesiones focales. Estas fibras de estrés se forman por haces antiparalelos contráctiles, estabilizados a través de ABP's como son alfa-actinina y tropomiosina. Entre los haces de actina se unen proteínas motoras, miosinas, que permiten el deslizamiento de unos

filamentos en otros produciendo la contractibilidad y tensión de las fibras de estrés (Gouin et al., 2005; Alberts et al., 2014).

Escherichia coli

E. coli pertenece a una familia grande denominada enterobacterias las cuales se encuentran en el agua, suelo, vegetación y como parte de la flora intestinal, donde son necesarias para el funcionamiento normal del proceso digestivo, producen vitamina B y K (Sánchez and Tay, 2011), es un Gram negativo que puede vivir tanto fuera como dentro del organismo siendo capaz de crecer y continuar con su metabolismo en condiciones aerobias y anaerobias (anaerobio facultativo) (Vidal, 2013). Su tamaño varía de 2 a 4 μm de longitud con forma de cocobacilo grande, no es capaz de formar esporas (Ryan and Ray, 2010).

Cuenta con los antígenos O (lipopolisacárido de la membrana o LPS), K (cápsula de polisacáridos) y H (proteína flagelar) (Ryan and Ray, 2010).

Prolifera con facilidad en medios simples, produce colonias de 2 a 5mm en medio agar y produce turbidez en caldos después de 12 a 18h, fermenta glucosa, reduce nitratos y nitritos, es negativa a oxidasa, fermenta lactosa y produce indol (Ryan and Ray, 2010).

Hace uso de *pili* para adherirse al epitelio, la mayor parte de las *E.coli* cuentan con *pili* tipo 1 o común que se une a la manosa, otras más especializadas cuentan con *pili* tipo P para unirse a células del epitelio urinario y eritrocitos del grupo sanguíneo P, y hay un tercer tipo, el *pili* formador de haces (bundle forming pilus, Bfp por sus siglas en inglés) .

E. coli se divide en seis cepas patógenas (Sánchez and Tay, 2011):

- ★ *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC): productora de diarreas en niños en países en desarrollo.
- ★ *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC): produce diarreas, su transmisión es por alimentos y agua contaminada por materia fecal.

- ★ *Escherichia coli* enteroinvasiva (ECIE): invade el epitelio del intestino grueso causando diarrea sanguinolenta.
- ★ *Escherichia coli* enterohemorrágica o verotoxigénica (ECEH): se asocia con colitis hemorrágica, síndrome urémico y púrpura trombocitopénica trombótica.
- ★ *Escherichia coli* enteroagregativa (ECEA), *Escherichia coli* de adherencia difusa (ECAD): diferentes formas de adherencia, el difuso donde las bacterias se unen al citoplasma celular y el agregativo donde las bacterias se acumulan en forma empalizada.
- ★ *Escherichia coli* uropatógena: causa de infecciones urogenitales.

***E.coli* Enteropatógena (EPEC)**

Se reconocen 12 serotipos de EPEC, constituye casi el 20% de la causa de diarrea en lactantes. La interacción de EPEC comienza al unirse a los enterocitos del intestino delgado por medio de los *pili* Bfp para dar origen a microcolonias agrupadas en la superficie del enterocito. Hay destrucción de las microvellosidades y cambio en la morfología celular con la formación de pedestales ubicados en el dominio apical de los enterocitos (Ryan and Ray, 2010; Sánchez and Tay, 2011; Vidal, 2013). El proceso mediante el cual se producen estas lesiones se conoce con el nombre lesión de adherencia y destrucción (attaching and effacing, AE, por sus siglas en inglés) y se puede dividir en 4 etapas:

1. Expresión de Bfp, de la adhesina intimina y de un sistema de secreción tipo III filamentoso (FTTSS).
2. Adherencia localizada a través de Bfp y la formación del complejo aguja formado por las proteínas EspA (que forma un filamento que alcanza a la célula blanco), EspB y EspD que forman un poro de translocación en la membrana de la célula blanco, situado en el extremo del complejo aguja.

Translocación 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. La intimina se enlaza a Tir resultando en una unión estrecha; acumulación de actina y otros elementos del citoesqueleto debajo del sitio de adhesión de las bacterias.

Acumulación masiva de elementos del citoesqueleto que culmina con la formación de pedestales, pérdida de la integridad de las uniones estrechas, de la función de las mitocondrias y apoptosis, conduciendo a la pérdida de electrolitos y a la eventual muerte celular (Ryan and Ray, 2010; Torres, 2010, Sánchez y Tay, 2011; Vidal, 2013).

ANTECEDENTES

La serotonina tiene diversos efectos en donde está implicada la dinámica de los filamentos de actina, de hecho, algunos de los receptores para la serotonina están anclados a la F-actina (Smythies, 2005).

Dentro de los efectos producidos sobre los filamentos de actina o estructuras relacionadas con los mismos, Zhang et al. (2012) realizaron un estudio con células neuronales aplásicas, sometiéndolas a tratamientos de serotonina a diferentes tiempos, encontrando que los filamentos de actina aumentaban en tamaño y tal crecimiento aumentó en tiempos mayores de exposición a serotonina. Ohtani et al. (2014) indican que en células de la corteza cerebral de ratas nonatas, al comparar el crecimiento de dendritas tras la estimulación con serotonina, observaron que las células que fueron estimuladas mantuvieron mayores crecimientos dendríticos y mencionan que esto sea debido a una mayor presencia del receptor 5-HT₂.

Los receptores 5-HT₂ actúan sobre la concentración de calcio intracelular y la acumulación de AMPc, teniendo como resultado la modificación de los mecanismos celulares estimulando los filamentos de actina cambiando la forma y

el movimiento. Puede modificar hasta en un 80% los filamentos de actina y un 40% la superficie celular (Azmitia, 2001).

Estudios realizados en cultivos de células de corazón obtenidos de ratas de cuatro días de nacidas, después de ser expuestas a serotonina durante 30 min, se determinó que había un incremento en la polimerización de actina y la permanencia de las fibras de estrés (Lee et al., 1998).

En cultivos de tejido de glándula mamaria que fueron expuestos a serotonina por cuatro horas se observó la presencia de poros, sin embargo las células mantenían sus uniones estrechas en la zonas en las que se conformaba el tejido (Pai and Horseman, 2011).

La serotonina liberada por las neuronas entéricas, mastocitos de la mucosa intestinal y células enteroendocrinas, regulan las funciones del músculo liso y la absorción de agua (Nakamura et al., 2008; Bruce, 2009). De las funciones que induce la serotonina están la contracción de vasos sanguíneos, cambios en el músculo esquelético (relajación y contracción), plaquetas, células endoteliales, fibroblastos y cambios en la proliferación (Azmitia, 2001; Nakamura et al., 2008). La serotonina afecta las uniones estrechas celulares afectando también procesos como la apoptosis y las funciones de barrera en los epitelios (Pai and Horseman, 2011). Vaibhav y Horseman (2011), Lee et al., (1998) y Stull et al., (2007) reportan un remodelaje de la uniones estrechas con un aumento de la permeabilidad paracelular en epitelio intestinal, células endoteliales y de glándula mamaria, respectivamente.

Gill et al., (2008) mencionan que la serotonina en cantidades elevadas forma parte de la fisiología de la diarrea al modificar el transporte de iones, inhibiendo el intercambio de Na/H y Cl/OH, de igual forma demostraron que células de intestino con tratamientos de serotonina sufren cambios en el borde de cepillo y cambios en el citoesqueleto con una reorganización en los filamentos de actina, estos últimos aumentaron su polimerización en la presencia de serotonina.

Las células Caco-2 son células obtenidas de adenocarcinomas de colon de humano, sobre estas fueron realizados trabajos donde las células fueron expuestas a 5-HTP (precursor de serotonina) y 5-HT (serotonina), encontrando que la densidad de las microvellosidades aumentaban considerablemente con la adición de 5-HTP no así con 5-HT, también probaron en ratones, al inyectarles 5-HTP, que las células mantenían concentraciones altas de este mismo y de 5-HT, que al ser liberada esta última aumento la actividad fagocítica, siendo 5-HT la responsable. Al realizar observaciones sobre los filamentos de actina, obtuvieron que el 5-HTP genera aumentos de actina filamentosa mientras que la 5-HT no tiene ningún efecto (Nakamura et al., 2008).

El efecto de la serotonina sobre el citoesqueleto de actina por tanto es importante, en particular en los aspectos referentes a la polimerización/despolimerización que permiten los rearrreglos de los filamentos de actina afectando la forma, movimiento e incluso la estructura de la uniones estrechas lo que podría modificar el tránsito paracelular.

Por otro lado PEC induce modificaciones a nivel intracelular que provocan alteraciones en el citoesqueleto que conllevan a la formación de los pedestales y ocasiona alteraciones que repercuten con la actividad fisiológica normal de la célula intestinal, como es el aumento de secreción de electrolitos, cambios en la permeabilidad de la uniones estrechas y remodelación del dominio apical del enterocito.

Existe una cepa de EPEC que afecta al conejo (*Escherichia coli* enteropatógena para conejo, REPEC, por sus siglas en inglés) y que nos ha permitido establecer un modelo de infección *in vitro* en donde se utiliza la línea celular RK13, reproduciendo la formación de pedestales soportados por filamentos de actina, cuya polimerización es inducida por la bacteria (Vidal, 2003; Oliver et al., 2008; Peralta et al., 2008; Ruetz et al., 2012).

Se han realizado trabajos donde se evalúa la formación de los pedestales y se encontró que la bacteria, a través del sistema de secreción tipo III, introduce en la célula diferentes efectores que alteran vías de señalización para su beneficio,

provocando rearrreglos del citoesqueleto y alteraciones en las uniones estrechas (Vidal, 2003; Oliver et al., 2008; Peralta et al., 2008; Ruetz et al., 2012).

Existe una sepa de *E. coli* que produce la toxina STa que aumenta la secreción de serotonina. (Böttner et al., 2013). Por otro lado Esmaili et al. (2009) reportan que EPEC, a través de su sistema de secreción tipo III, inhibe la actividad de un transportador de serotonina (SERT) responsable de la retoma de serotonina por los enterocitos para su degradación, de esta forma EPEC conduce a una disminución en la toma de serotonina por las células intestinales, lo que podría afectar sus funciones en la mucosa intestinal, pudiendo ocasionar cambios en la absorción de iones y en la función de barrera de las uniones estrechas; de esta forma EPEC podría influir en la patogénesis de la diarrea.

JUSTIFICACIÓN

Los filamentos de actina participan en la formación de diferentes estructuras relacionadas con diversas funciones celulares, entre las que se encuentran la formación de la corteza celular, fibras de estrés, dar soporte a las microvellosidades y dar fortaleza a las uniones intercelulares tales como las uniones adherentes y las uniones estrechas, así como a las adhesiones focales.

La serotonina y las proteínas secretadas por EPEC son factores que pueden modificar las funciones celulares, en particular ocasionando rearrreglos de los filamentos de actina y es de nuestro interés conocer cuál es el efecto de la serotonina sobre los filamentos de actina en células epiteliales y su repercusión sobre las diferentes estructuras y funciones en las que participa, de ahí que este trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de la serotonina sobre los filamentos de actina en la línea celular RK13 y cómo puede influir sobre estímulos particulares que induzcan rearrreglos de los filamentos de actina para lo cual nos hemos valido del modelo de infección con la bacteria REPEC que produce rearrreglos del citoesqueleto mediante la traslocación de diferentes proteínas efectoras que alteran su estructuración y determinar la influencia de la serotonina sobre los estímulos inducidos por la bacteria para provocar dichos rearrreglos y la formación de estructuras a partir de filamentos de actina como son los pedestales o bien las fibras de estrés que en condiciones normales se forman en las células RK13.

HIPÓTESIS

La serotonina induce estímulos que ocasiona respuestas celulares, algunas de las cuales están relacionadas con rearrreglos en la organización de los filamentos de actina, ocasionando cambios en las estructuras conformadas por ellos.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Determinar los cambios en los filamentos de actina en células RK13 ocasionados por la serotonina y REPEC mediante ensayos de fluorescencia directa.

Objetivos Particulares

- Establecer un cultivo de células RK13 y reconocer la forma en que se estructuran de los filamentos de actina mediante ensayos de fluorescencia directa utilizando faloidina conjugada a rodamina para marcar los filamentos.
- Examinar los cambios en los filamentos de actina en células RK13 expuestas a serotonina.
- Estandarizar la infección de células RK13 con REPEC y reconocer la formación de pedestales soportados por filamentos de actina.

Comparar la estructura de los filamentos de actina en células RK13 infectadas con REPEC en presencia y ausencia de serotonina para establecer la influencia de esta hormona sobre los estímulos inducidos por la bacteria.

MÉTODOS

Para cumplir con los objetivos planteados, se trabajó con cultivos celulares de células RK13 divididos en 9 grupos a los que se les aplicaron diferentes tratamientos, realizando tres repeticiones (Tabla 1).

Las células se cultivaron y sometieron a los diferentes tratamientos propuestos, posteriormente se fijaron para realizar los ensayos de fluorescencia directa para marcar los filamentos de actina con faloidina conjugada con rodamina.

Tabla 1. Tratamientos aplicados a los diferentes grupos experimentales

Grupo	Serotonina	REPEC	Condiciones de cultivo
1	No	No	Cultivo control que se fijó al inicio de incubación (tiempo 0).
2	3 h	No	Fijadas después del tratamiento con serotonina.
3	7 h	No	Fijadas después del tratamiento con serotonina.
4	No	No	Cultivo control que se incubó con medio DMEM durante 3 h y posteriormente se fijó.
5	No	No	Cultivo control que se mantuvo con medio DMEM durante 7 h fijándose al final de la incubación.
6	No	4 h	Se incubó durante 3 h con medio DMEM y posteriormente se realizó la infección con REPEC por 4 h.
7	7 h	4 h	El cultivo se mantuvo las 7 h en presencia de serotonina. A la 3er. hora se infectó con REPEC y se incubó por 4 h.
8	3 h	4 h	El cultivo se incubó 3 h con serotonina, se retiró la hormona y posteriormente se realizó la infección con REPEC por 4 h.
9	3 h	No	El cultivo se incubó 3 h con serotonina, se retiró la hormona y después se mantuvo el cultivo por 4 h más en ausencia de REPEC.

Cultivo celular

Se estandarizó el cultivo de células RK13 (ATCC CCL-37, células de riñón de conejo de morfología epitelial) en el laboratorio. Las células se cultivaron en medio DMEM, suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, adicionando antibióticos (penicilina, 5000 UI y estreptomina, 5 µg/ml). Las células se mantuvieron en una incubadora a 37°C, en una atmósfera con 5% de CO₂ y 95% de humedad. Para la realización de este trabajo, las células se cultivaron en cajas que contenían cubreobjetos previamente esterilizados.

Serotonina

Para realizar los ensayos con serotonina, se utilizó una concentración de 1mM en medio de cultivo DMEM sin SFB ni antibióticos, las células se mantuvieron en incubación durante 3 y 7 h.

***E. coli* enteropatógena para conejo.**

La bacteria REPEC se creció en agar Luria-Bertani (LB) en incubadora a 37°C por 24 h, de este cultivo se tomó una colonia que se pasó en 5 ml de medio líquido LB poniéndose en incubadora a 37°C y 200 rpm por 24 h.

Antes de la infección el medio LB se centrifugó por 5 min a 3000 rpm, la pastilla se resuspendió en 2 ml de medio DMEM sin SFB, ni antibióticos y se colocó de nuevo en incubación por 2 h.

Para la titulación de los cultivos bacterianos se utilizó el método Nefelómetro de McFarland, a partir del cual se determinó la cantidad de bacterias utilizadas para la infección de los cultivos. El título determinado fue de 18×10^{-8} que corresponde a 15000 células bacterianas por mililitro.

La infección se realizó con 400 µl del cultivo bacteriano y las bacterias se mantuvieron en el cultivo celular por 4 h siguiendo el método previamente establecido en el laboratorio (Oliver et al., 2008).

Fluorescencia directa

Para identificar los filamentos de actina se utilizó la técnica de fluorescencia directa, utilizando como marcador faloidina conjugada a rodamina, realizando el siguiente método:

Se eliminó el medio de cultivo y las células crecidas en los cubreobjetos se fijaron con formalina acuosa al 10% en amortiguador salino de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés) durante 20 min. Posteriormente las células se permeabilizaron con el detergente Tritón X-100 al 0.5% en PBS por 5 min y los cultivos se bloquearon con albumina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés) al 1% en PBS por 20 min. Se eliminó la BSA y se adicionó la faloidina conjugada con rodamina para marcar los filamentos de actina y se dejó incubar por 20 min. Después de realizar cada paso, se hicieron 3 lavados con PBS. Finalmente se hizo un lavado con agua desionizada y se realizó el montaje de los cubreobjetos sobre portaobjetos utilizando medio de montaje UltraCruz adicionado con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) para marcar los núcleos. Las células se observaron en un microscopio de fluorescencia (Carl Zeiss, modelo Axioskop40 con epifluorescencia).

Conteo de núcleos, fibras de estrés y pedestales.

Las preparaciones se observaron en el microscopio de fluorescencia y se tomaron 10 fotos de diferentes campos por laminilla, con el objetivo 40x (cámara ccd Evolution VF marca Medio cybernatics) empleando el programa QCCapture 6.0.

Por cada campo se tomaron dos fotos, en la primera se tenían visibles los núcleos celulares y las bacterias marcados con DAPI, mientras que en la otra se observaban las fibras de estrés y los pedestales con la actina marcada con faloidina conjugada a rodamina, posteriormente se sobrepusieron las dos imágenes en una utilizando el programa ImageJ64 del Instituto Nacional de Salud del gobierno de los Estados Unidos de América. A través del mismo programa se realizaron los conteos del número de núcleos, la presencia de fibras de estrés y el número de pedestales. Para que un pedestal fuera considerado como tal, se buscaba que junto al mismo se observara la presencia de una bacteria.

Análisis Estadístico

Los datos se analizaron a través de una varianza para datos con distribución no normal por medio de la prueba Kruskal-Wallis (Siegel, 1991) empleando el paquete estadístico SYSTAT versión 13 (2014).

RESULTADOS

Las células se distribuyeron en 9 grupos experimentales como se mencionó en método (Tabla 1).

Fibras de estrés

Los grupos 1, 4, 5 son las células que no recibieron ningún tratamiento, solo varió el tiempo en el que permanecieron en el cultivo y se observó la presencia de fibras de estrés (Fig. 1, paneles A, D y E).

Los grupos 2, 3, 7, y 8, fueron tratados con serotonina y se observó una disminución en el número de células con fibras de estrés (Fig. 1, paneles B y C; Fig. 2, paneles B y C).

El grupo 9, fue tratado con serotonina durante 3 h, se le retiró la hormona y el cultivo se incubó por 4 h más sin la serotonina. Se observó la presencia de fibras de estrés de manera similar a lo observado en los grupos 1, 4, 5 y 6, que no recibieron tratamiento con serotonina (Fig. 2, panel D).

En la Figura 3 se muestra la media aritmética de los valores obtenidos del conteo de células con fibras de estrés de los 9 grupos y claramente se nota como la serotonina afectó el número de células con fibras de estrés. Los grupos 1, 4 y 5 que no fueron tratados con serotonina evidenciaron mayor número de células con fibras de estrés (14.4, 15 y 18.2, respectivamente) al compararse con los grupos 2, 3, 7 y 8 que fueron tratados con serotonina (1.1, 4.2, 7.1 y 6.3, respectivamente). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas.

Los grupos 6 y 9 no presentaron diferencias en el número de células con fibras de estrés entre ellos (12 y 10.4, respectivamente), al compararlos con los grupos 2 y 3, se observó que estos últimos, que fueron tratados con serotonina, tuvieron un menor número de células con fibras de estrés (1.1 y 4.2, respectivamente), observándose diferencias significativas.

Al comparar los grupos 6, 7 y 8, que fueron infectados con REPEC, independientemente de haber sido tratados (grupos 7 y 8) o no (grupo 6), con serotonina, no mostraron diferencias en el número de células con fibras de estrés (12, 7.1 y 6.3, respectivamente).

Pedestales

Los grupos 1, 2, 3, 4, 5 y 9 no fueron infectados, por consecuencia no se observó la presencia de pedestales (Fig. 1 y Fig. 2, panel D). Los grupos 6, 7 y 8, fueron infectados con REPEC y en todos ellos se observó la presencia de pedestales (Fig. 2, páneles A, B y C).

En la Figura 4 se muestra el promedio de pedestales por célula, los grupos infectados con REPEC (6, 7 y 8) presentaron los pedestales a diferencia de los grupos restantes (no infectados), encontrándose diferencias significativas en el número de pedestales entre los grupos con y sin REPEC. Al observar los grupos 6, 7 y 8, se nota que la serotonina afectó la formación de pedestales, notándose diferencias significativas entre el número promedio de pedestales por célula entre los grupos 6 y 8 comparados con el grupo 7. El grupo 6, el cual no fue tratado con serotonina presentó mayor número de pedestales promedio por célula (5.7 pedestales). El grupo 8, fue tratado con serotonina durante 3 h, después se retiró la hormona y se procedió a infectar con REPEC, si bien presentó un menor número de pedestales comparado con el grupo 6 (4.2 pedestales), la diferencia no fue significativa. El grupo 7 recibió tratamiento con serotonina durante todo el experimento (7 h) y se infectó con REPEC a la 3er. hora de incubación con la serotonina, el número de pedestales disminuyó de forma notable (2.7 pedestales) existiendo diferencia significativa comparado con los grupos 6 y 8.

En la Figura 1 se presentan fotografías representativas de los tratamientos con serotonina y sus controles, aplicados a los cultivos celulares en donde se pueden observar las estructuras que se evaluaron para determinar el efecto de la serotonina sobre los filamentos de actina (formación de fibras de estrés).

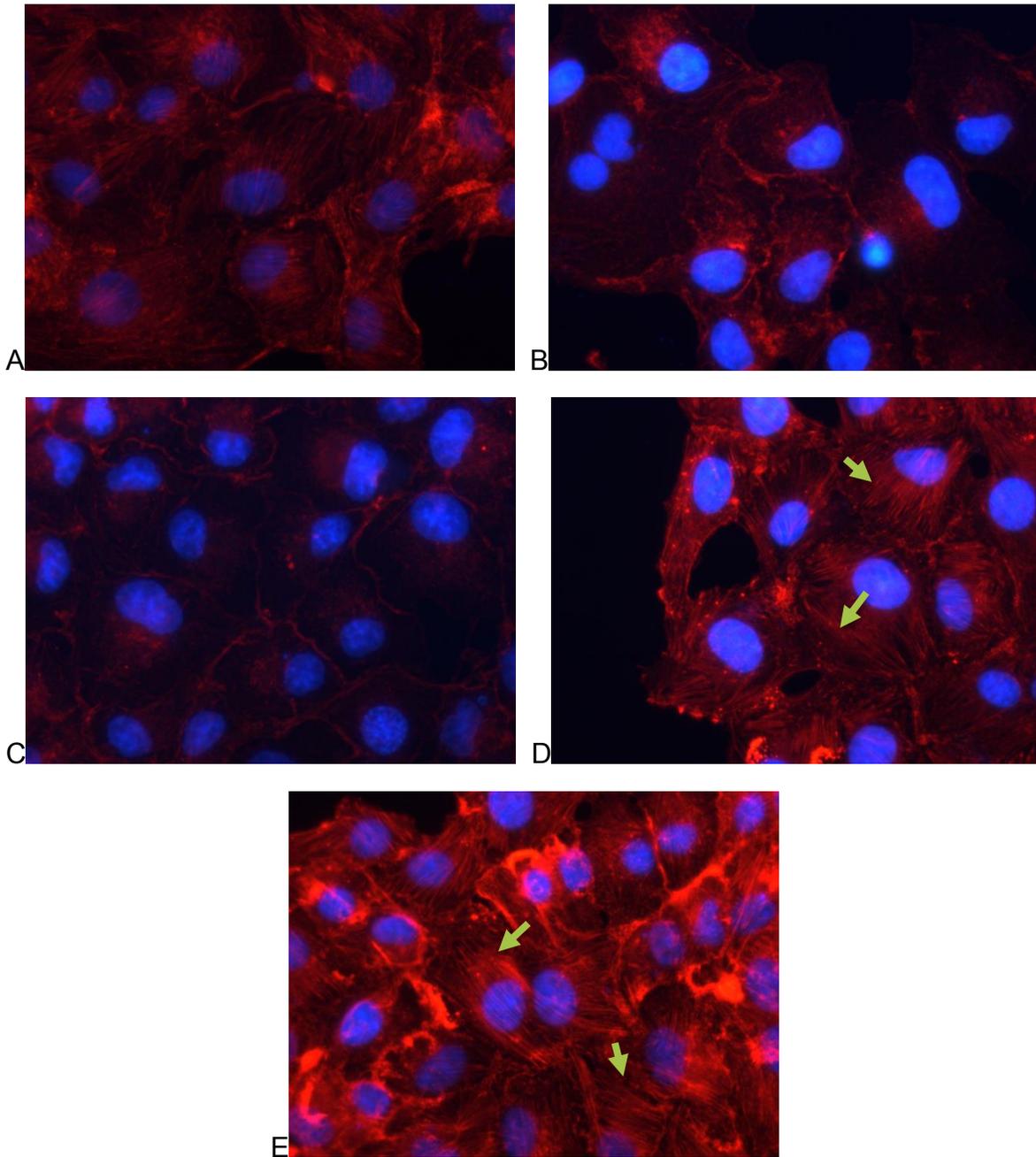


Fig. 1. Cultivos de células RK13 con los filamentos de actina marcados con falodiina conjugada a rodamina y los núcleos con DAPI.

Páneles A (grupo 1), D (grupo 4) y E (grupo 5), cultivos de células que no recibieron serotonina pero tuvieron diferentes tiempos de incubación (0, 3 y 7 h respectivamente). Páneles B (grupo 2) y C (grupo 3), cultivos de células tratadas con serotonina (3 y 7 h respectivamente). Ver método, Tabla 1. Fibras de estrés señaladas con flechas.

En la Figura 2 se presentan las fotografías representativas de los tratamientos con serotonina, REPEC y sus controles, donde se pueden observar la formación de fibras de estrés y pedestales.

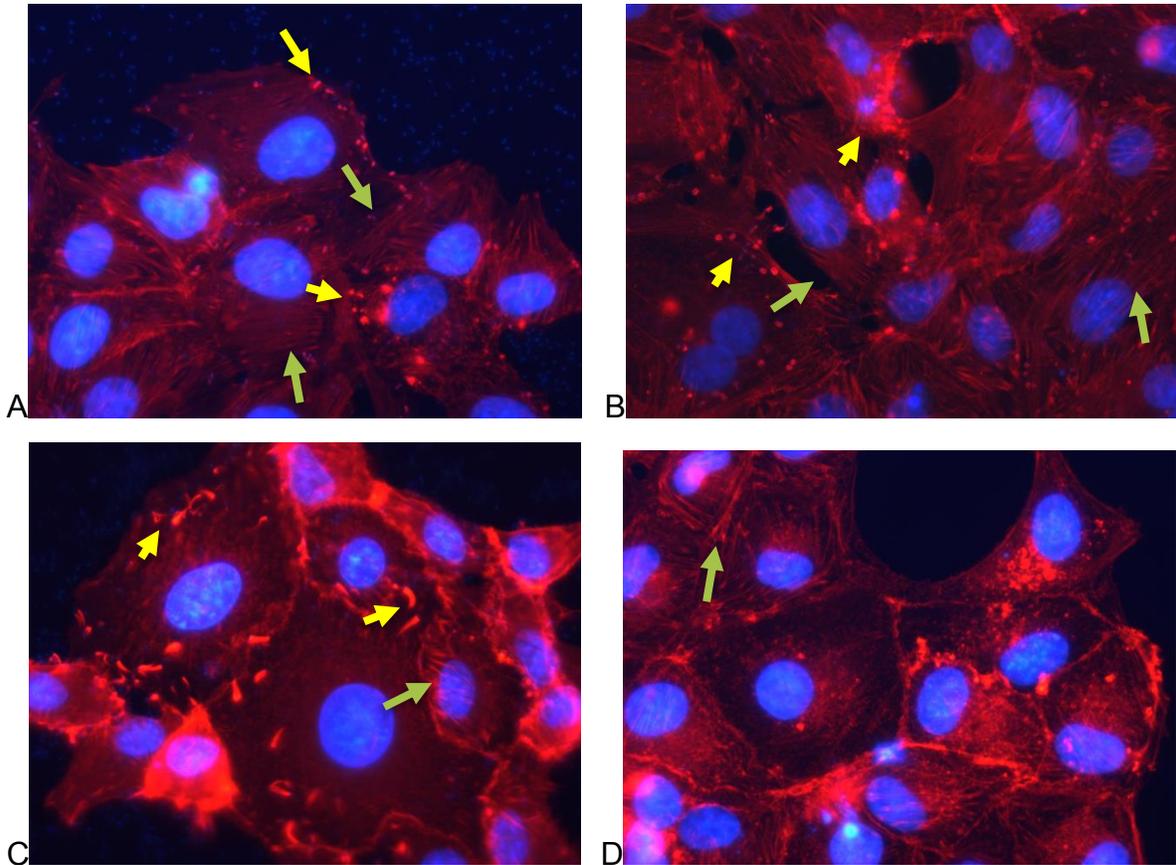


Figura 2. Cultivos de células RK13 con los filamentos de actina marcados con falodina conjugada a rodamina y los núcleos con DAPI.

Panel A (grupo 6) infectado con REPEC por 4 h. Panel B (grupo 7), tratado 7 h con serotonina e infectado con REPEC a partir de la 3er. hora de incubación. Panel C (grupo 8) incubado con serotonina 3 h, se retiró la hormona y se infectó con REPEC 4 h. Panel D (grupo 9) incubado con serotonina 3 h, se retiró la hormona y se continuó incubando 4 h sin infectar. Ver método, Tabla 1. Fibras de estrés señaladas con flechas verdes y pedestales con flechas amarillas.

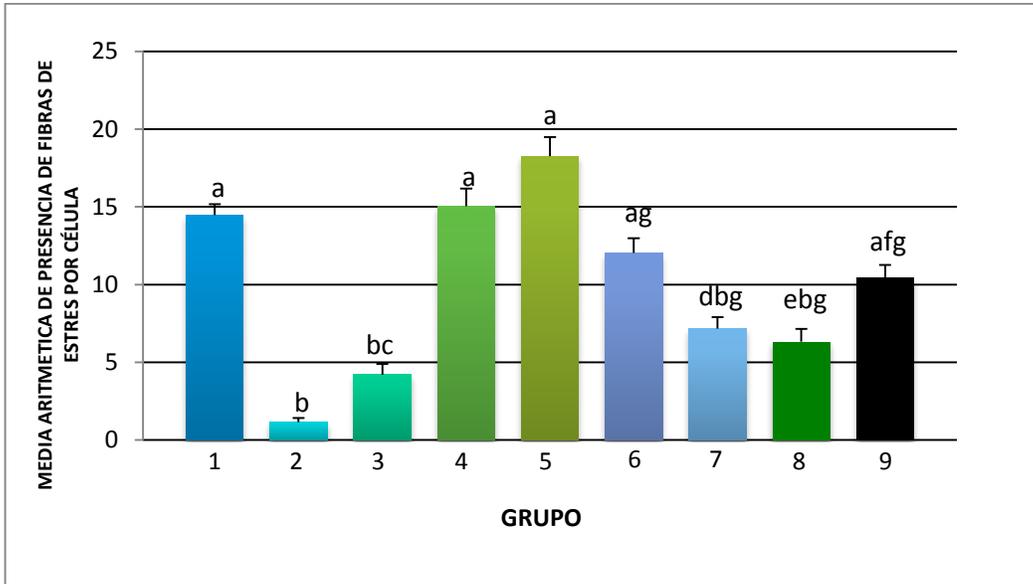


Figura 3. Gráfica en donde se indica la media aritmética de células que presentaron fibras de estrés para cada uno de los tratamientos empleados (ver método, Tabla 1). Las letras iguales no tienen diferencia significativa ($p > 0.01$) mientras que las letras diferentes si tienen diferencia significativa ($p < 0.01$).

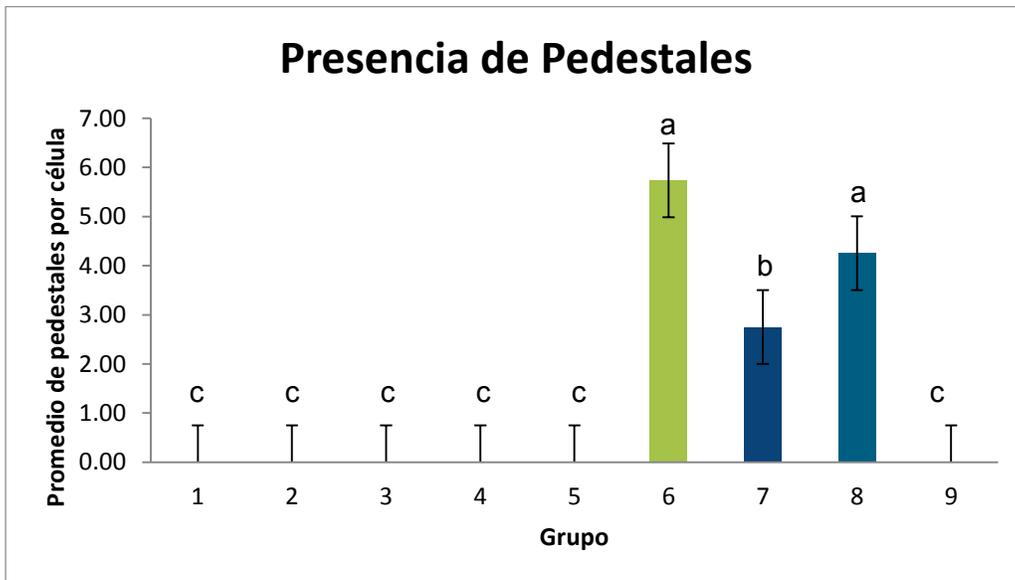


Figura 4. Gráfica en donde se indica el promedio de pedestales por célula en los diferentes tratamientos utilizados (ver método, Tabla 1). Las letras iguales no tienen diferencia significativa ($p > 0.01$) mientras que las letras diferentes si tienen diferencia significativa ($p < 0.01$).

DISCUSIÓN

En este trabajo se demostró el efecto que tiene la serotonina sobre los filamentos de actina en células RK13 y cómo esta hormona puede afectar los rearrreglos de estos filamentos inducidos por otro tipo de estímulos, como sucede en las células infectadas con REPEC.

Diversos estudios han probado el efecto de la serotonina sobre diferentes tipos celulares, donde se observa que las estructuras de actina aumentan de tamaño considerablemente con la presencia de serotonina, como lo demuestran los trabajos de Zhang et al. (2012) y Ohtani et al. (2014), en células neuronales, Lee et al., (1998) en células del corazón y Pai y Horseman, (2011) en células de glándula mamaria. Por otro lado Nakamura et al. (2008), al experimentar con células Caco encuentra que son los precursores de 5-HT los que ocasionan cambios en el citoesqueleto, y que la serotonina no causa ningún cambio sobre la actina filamentosa contrarrestando lo dicho por Gill et al., (2008) el cual afirma que la serotonina ejerce cambios en el citoesqueleto aumentando la polimerización de los filamentos de actina. En este mismo sentido Kang et al. (2013) reportan la polimerización de actina inducida por la serotonina durante el rolling de eosinófilos sobre el epitelio endotelial.

Contrario a lo anterior, en nuestro trabajo encontramos que si hay un efecto de la serotonina sobre los filamentos de actina, observamos una disminución en el número de células con fibras de estrés comparando los grupos con y sin serotonina. A este respecto Azmitia (2001) reporta la modificación de los mecanismos celulares que estimulan a los filamentos de actina cambiando la forma celular y el movimiento. Pai y Horseman (2011) reportan que la serotonina afecta las uniones estrechas celulares afectando también procesos como la apoptosis y las funciones de barrera en los epitelios, todo lo cual sugiere que la serotonina ocasiona rearrreglos de los filamentos de actina. Ganguly et al. (2008) mencionan la desestabilización de los filamentos de actina producida por la serotonina a través del receptor 5-HT_{1A} lo que permite la movilidad lateral de los receptores en la membrana. Estos trabajos coinciden con nuestros resultados en

donde la disminución en el número de células con fibras de estrés nos indica que la serotonina está induciendo rearrreglos de los filamentos de actina. Apoyándonos en el análisis estadístico de los resultados, los grupos expuestos a la serotonina (2, 3, 7 y 8), sin importar el tiempo en el tratamiento tuvieron una disminución significativa en el número de células con fibras de estrés comparado con los grupos control (1, 4, 5 y 6) que no recibieron la hormona.

El grupo 2 que permaneció con serotonina únicamente por 3 h fue el grupo que presentó un menor número de células con fibras de estrés comparado con el grupo 3 que se incubó con serotonina durante 7 h, sin existir diferencia significativa entre ambos. Esto pudo deberse a que quizá la serotonina tenga una vida media y su efecto sea solo por un tiempo determinado.

El grupo 9, al cual se le retiró el tratamiento con serotonina después de tres horas y posteriormente permaneció solo con medio de cultivo, no mostró diferencias significativas en el número de células con fibras de estrés de los grupos control sin tratamiento (1, 4 y 5), pero si se observó diferencia significativa con los grupos tratados con serotonina exclusivamente (2 y 3). A pesar de que en un inicio este grupo fue tratado con la serotonina, después de retirar la hormona las células aparentemente se comportaron como las células control sin tratamiento, pudieron contrarrestar el efecto de la serotonina formando nuevamente las fibras de estrés, aunque parece ser que el tiempo que se les dio para recuperarse no fue el suficiente para volver a alcanzar los valores de los grupos que no tuvieron tratamiento con serotonina.

Tomando en conjunto nuestros resultados y los de otros autores, se ha llegado a observar cierta contradicción en cuanto el efecto de la serotonina sobre la estabilización y desestabilización de los filamentos de actina, lo cual podría deberse al tipo de receptor que expresan las diferentes células en estudio. Esto se puede comprobar en el estudio realizado por Azmitia (2001) quien reporta que cuando la serotonina estimula al receptor 5-HT_{1A} se estabilizan los filamentos de actina y en caso contrario, el estímulo del receptor 5-HT_{2A} ocasiona su desestabilización. De ahí la importancia de realizar trabajos para determinar el tipo

de receptor que expresan las células RK13 y las vías de señalización que se activan, para comprender el efecto de la serotonina sobre este tipo de células.

En este trabajo se observó una disminución en el número de células con fibras de estrés ocasionada por la serotonina en células RK13, ahora bien, es importante determinar si la desestabilización de los filamentos de actina es debida a un bloqueo de su polimerización o favoreciendo su despolimerización, para responder a esta pregunta, se empleó el modelo de infección con REPEC, en el cual se ha demostrado que hay rearrreglos del citoesqueleto de actina con polimerización para la formación de los pedestales (Oliver et al., 2008).

Vidal, (2003); Oliver et al., (2008); Peralta et al., (2008) y Ruetz et al., (2012), establecen la interacción que hay de *E.coli* con el citoesqueleto, la cual a través de su sistema de secreción tipo III induce cambios en el citoesqueleto, ocasionando rearrreglos en los filamentos de actina formando pedestales. En nuestro laboratorio tenemos estandarizada la infección de las células RK13 con REPEC y la formación de los pedestales, lo cual se demostró en este trabajo.

En cuanto a los grupos 6, 7 y 8 que fueron infectados con REPEC y además los grupos 7 y 8 recibieron tratamiento con serotonina, no hubo diferencia significativa en el número de células con fibras de estrés. Al comparar el grupo 6 con los controles sin serotonina (grupos 1, 4 y 5) no se observaron diferencias significativas, sin embargo los grupos 7 y 8 comparados con los controles sin serotonina (grupos 1, 4 y 5) si mostraron diferencias significativas en el número de células con fibras de estrés. Tomando los datos de los grupos 6, 7 y 8, se entiende que el resultado del grupo 6 fue debido a que nunca fue expuesto a la serotonina. En el caso del grupo 8 el resultado pudiera deberse a que las células se infectaron después de retirar la serotonina, lo cual permitiría que las células se recuperaran del efecto de la serotonina (como se mencionó para el grupo 9). El resultado en el grupo 7 tal vez no era el que esperabamos debido a que las células estuvieron las 7 horas en presencia de la serotonina, aún cuando se infectaron y no mostraron una disminución significativa del número de células con fibras de estrés; la explicación para este resultado es que de alguna manera la bacteria pudo revertir

el efecto de la serotonina. Sin embargo al comparar los resultados de los grupos controles sin serotonina 1, 4 y 5, con los grupos 7 y 8 infectados con REPEC y tratados con serotonina, si se observó una disminución significativa en el número de células con fibras de estrés, lo cual nos pudiera indicar que el revertimiento del efecto de la serotonina por la bacteria solo es parcial.

Para sustentar nuestra hipótesis de que REPEC revierte el efecto de la serotonina en cuanto al número de células con fibras de estrés, si se compara en particular el grupo 3 que se mantuvo por 7 h con la serotonina, con el grupo 7 el cual tuvo serotonina por 7 h y se infectó con REPEC a la 3er. hora de incubación, el número promedio de fibras de estrés por célula fue mayor en el grupo 7, aunque estadísticamente no hubo una diferencia significativa, si se observa una tendencia a un mayor número de células con fibras de estrés, por lo que es posible sugerir que la bacteria de alguna forma bloqueó parcialmente el efecto de la serotonina sobre el citoesqueleto de actina, revirtiendo su efecto.

Por otro lado, evaluamos también la formación de pedestales. En los tres grupos que se infectaron con REPEC (6, 7 y 8) se presentó la formación de los mismos.

El grupo 6 tuvo el mayor promedio de pedestales por célula comparado con los grupos 7 y 8 aunque solo hubo diferencia significativa con el grupo 7. Si bien la bacteria ocasiona rearrreglos de los filamentos de actina con la formación de pedestales, en las células tratadas con serotonina la bacteria tal vez no logró reorganizar totalmente el citoesqueleto de actina para la formación de los pedestales que se reflejó en un menor número de los mismos y que, aunque aparentemente la disminución de fibras de estrés ocasionada por la serotonina podría hacer pensar que existiera una mayor concentración de actina disponible para polimerizar, lo que facilitaría la formación de los pedestales, el efecto de la serotonina podría ser hacia el bloqueo de la polimerización de la actina lo cual se reflejó en una disminución en el número de células con fibras de estrés en las células tratadas con la serotonina (resultado observado al comparar los grupos controles sin serotonina, 1, 4 y 5, contra los grupos infectados tratados con serotonina, 7 y 8), y en una disminución en el número de pedestales en las células

infectadas con REPEC, que como se mencionó fue significativamente menor en el caso del grupo 7 (2.7 pedestales en promedio por célula) que siempre estuvo expuesto a la serotonina y con tendencia a disminuir en el grupo 8 (4.2 pedestales en promedio por célula), comparado con el grupo control 6 infectado con REPEC sin tratarse con serotonina (5.7 pedestales en promedio por célula).

CONCLUSIONES

1. Se logró establecer el cultivo de las células RK13 y se demostró la forma en que se estructura el citoesqueleto de actina, en particular la formación de fibras de estrés.
2. La serotonina provoca una disminución en el número de células con fibras de estrés.
3. Se lograron reproducir los eventos que suceden al infectar los cultivos de células RK13 con REPEC, lo que se demostró con la observación de la formación de los pedestales.
4. La serotonina afecta los rearrreglos del citoesqueleto de actina inducidos por REPEC en las células RK13 observándose una disminución en el número de células con fibras de estrés y el número promedio de pedestales por célula en los cultivos infectados.

REFERENCIAS

1. Azmitia, E. C., (2001). Modern views on an ancient chemical: Serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. *Brain Research Bulletin* 56(5): 413–424.
2. Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., (2014). *Essential cell biology*. 4th ed. CBS. Capítulo17, pp 565-592.
3. Böttner M., Barrenschee M., Hellwig I., Harde J., Egberts J. H., Becker T., Wedel T., (2013). The enteric serotonergic system is altered in patients with diverticular disease. *Gut* 62(12): 1753–62.
4. Bruce M. K., Bruce A. S., (2009). *Baney y Levy, Fisiología*. Sexta edición. Elsevier Mosmy. Barcelona, España.
5. Campos G.C., (2014). Estudio de las poblaciones celulares localizadas en el epitelio de la mucosa del intestino de la gallina doméstica (*Gallus gallus domesticus*). Universidad Nacional Autónoma de México.
6. Dyce K.M., Sack W.O. and Wensing C.J.G. (2012). *Anatomía Veterinaria*. Ed. El Manual Moderno, 4ª ed. México, pp. 784-813.
7. Esmaili A., Nazir S. F., Borthakur A., Yu, D., Turner J. R., Saksena S., Singla A., Hecht G. A., Alrefai W. A., Gill R. K., (2009). Enteropathogenic *Escherichia coli* infection inhibits intestinal serotonin transporter function and expression. *Gastroenterology* 137(6): 2074–2083.
8. Ganguly S., Pucadyil T. J., Chattopadhyay A., (2008). Actin Cytoskeleton-Dependent Dynamics of the Human Serotonin1A Receptor Correlates with Receptor Signaling. *Biophysical Journal* 95: 451–463.
9. Ganong W. F. (2004). *Fisiología médica*. 19ª edición. Manual moderno. México.
10. Gartner L. P., Hiatt J. L., (2011). *Histología básica*. Elsevier Saunders. Barcelona España. Capítulo 17, pp 241-246.
11. Gill R. K., Shen L, Turner J. R., Saksena S., Alrefai W. A., Pant N., Esmaili A., Dwivedi A, Ramaswamy K., Dudeja P. K., (2008). Serotonin Modifies Cytoskeleton and Brush Border Membrane Architecture in Human Intestinal Epithelial Cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 295(4): G700-8. doi:10.1152/ajpgi.90362.

12. Geo F. B., Karen C. Carrol., Janet S. B., Stephen A. M., Timothy A. M., (2010). Jawete, Melnick y Adelberg. Microbiología médica. 25a edición. Mc.GrawHill. México, D.F.
13. Hannon J., Hoyer D., (2008). Molecular biology of 5-HT receptors. Behavioural Brain Research 195: 198–213.
14. Kang, B. N., Ha S.G., Bahaie N. S. Hosseinkhani M. R., Ge X. N., Blumental M. N., Rao S. P., Sriramarao P. (2013). Regulation of serotonin-induced trafficking and migration of eosinophils. PlosOne 8(1): e54840. doi: 10.1371/journal.pone.0054840.
15. Lee H. Z., Lin W. C., Yeh F. T., Wu C. H., (1998). 2-Phenyl-4-quinolone prevents serotonin-induced increases in endothelial permeability to albumin. European Journal of Pharmacology 354(2-3): 205–213.
16. Manabe N., Wong B. S., Camilleri M., (2010). New-generation 5-HT₄ receptor agonists: potential for treatment of gastrointestinal motility disorders. Expert Opin Investig Drugs 19:765–75.
17. Nakamura K., Sato T., Ohashi A., Tsurui H., Hiroyuki Hasegawa H., (2008). Role of a Serotonin Precursor in Development of Gut Microvilli. The American Journal of Pathology 172(2): 333-344.
18. Ohtani A., Kozono N., Senzaki K., Shiga T., (2014). Serotonin 2A receptor regulates microtubule assembly and induces dynamics of dendritic growth cones in rat cortical neurons in vitro. Neuroscience Research, 81-82: 11–20.
19. Oliver G. R., García T. C., Juárez M. L., Navarro G. F., (2008). Infection of rabbit kidney cells (RK13) by enteropathogenic Escherichia Coli as a model to study the dynamics of actin cytoskeleton. Canadian Journal of Microbiology 54:748-757.
20. Pai V. P., Horseman N. D., (2011). Multiple cellular responses to serotonin contribute to epithelial homeostasis. PLoS ONE, 6(2).
21. Peralta R. J., Hernandez H. J. M., Manning C. R., Luna M. J., Garcia T. C., Nougayrede J. P., Oswald E., Navarro G. F., (2008). Esp F Interacts with nucleation-promoting factors to recruit junctional proteins into pedestals for pedestal maturation and disruption of paracellular permeability. Infection and Immunity 76(9): 3854-3868.

22. Pollard T.D. and Borisy G.G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112: 453-465.
23. Prasain N., Stevens T., (2009). The actin cytoskeleton in endothelial cell phenotypes. *Microvascular Research* 77: 53–63.
24. Ross M. H., Pawlina W., (2012). *Histología. Texto y atlas a color con Biología celular y Molecular. Sexta edición.* Editorial Medica Panamericana. Madrid, España. Capítulo 17, pp 586-596.
25. Ruetz T. J., Vogl A. W., Guttman J. A., (2012). Detailed examination of cytoskeletal networks within enteropathogenic *Escherichia coli* pedestals. *The Anatomical Record* 295(2): 201–207.
26. Ryan K. J., Ray C. G., (2010). *Sherris, Microbiología Médica. Quinta edición.* McGraw Hill. New York, USA. 33: 441-452.
27. Sánchez V. J., Tay Z. J., (2011). *Fundamentos de microbiología y parasitología médicas. Segunda edición.* Méndez Editores. México D.F. 21:153-156.
28. Siegel S., (1991). *Estadística no paramétrica. Tercera edición.* Trillas.
29. Smythies J., (2005). Serotonin system. *International Review of Neurobiology.* 64: 217-268.
30. Stull M. A., Pai V., Vomachka A. J., M., Marshall A. M. Jacob G. A. (2007). Mammary gland homeostasis employs serotonergic regulation of epithelial tight junctions. *PNAS* 104(42): 16708-16713.
31. Toro G. J., Yepes S. M., Palacios S. E., (2010). *Neurología. Segunda edición. Manual moderno.* Colombia. 1:30.
32. Torres L. R. A., (2010). Expresión de las proteínas actina, Arp2 y profilina a diferentes tiempos de infección por *Escherichia coli* Enteropatógena (REPEC) en células RK13. Universidad Nacional Autónoma de México.
33. Tortora G. J. Derrickson B., (2013). *Principios de anatomía y fisiología. Tercera edición.* Panamericana. Buenos Aires, Bogotá.
34. Vaibhav P. P., Horseman N.D. (2011). Multiple cellular responses to serotonin contribute to epithelial homeostasis. *Plos ONE* 6(2): e17028 doi: 10.371/journal.pone.0017028.

35. Vidal G. J., (2003). *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC): una causa frecuente de diarrea infantil. *Salud en Tabasco*, vol. 9, num 1. Secretaria de Salud del Estado de Tabasco. Villahermosa, México.
36. Whang H., Zhang S., Zhou N, Wang C., Wu X. (2014) Distribution of endocrine cells in the digestive tract of *Alligator sinensis* during the active and hibernating period. *Tissue and Cell* 46: 343-351.
37. Zhang X. F., Callen H., Van Goor D., Forscher P., (2012). Calcineurin-dependent cofilin activation and increased retrograde actin flow drive 5-HT-dependent neurite outgrowth in *Aplysia* bag cell neurons. *Molecular Biology of the cell*, 23:4833-4848.