



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

**EMPLEO DE DIFERENTES FIJADORES
PARA IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS
DE CITOESQUELETO MEDIANTE
INMUNOFLUORESCENCIA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

BEATRÍZ ADRIANA BAUTISTA
RAMÍREZ

ASESORES: Dra. MARÍA LEONOR QUINTERO MORA
Dr. CARLOS GERARDO GARCÍA TOVAR
MVZ. MA. REYES PICHARDO MOLINERO

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO

2011



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.

AGRADECIMIENTOS

A dios por darme la oportunidad de vivir esta etapa tan maravillosa y llena de satisfacciones.

A mis padres Ignacio Bautista Aradillas y Nicolasa Ramírez Bárcena por haberme permitido vivir a su lado

A mi suegra Estela Oropeza Legorreta por todo el gran apoyo brindado.

A mi hermano René José Luis Bautista Ramírez por todos sus consejos.

A mi familia, a mi esposo Miguel Ángel Becerra Oropeza y a mi hija Alejandra Becerra Bautista por llenarme de amor y alegría la vida.

A mis asesores Dra. Ma. Leonor Quintero Mora; Dr. Carlos Gerardo García Tovar; MVZ Ma. Reyes Pichardo Molinero, por brindarme su confianza al regalarme este proyecto.

A mis compañeros y amigos que me apoyaron en este trabajo Miryam, Rubén e Ingrid.

A los profesores que me asesoraron en algunos momentos de desesperación, Dr. Carlos Ignacio Soto Zarate y M en F Germán Isauro Garrido Fariña.

A los profesores de los laboratorios 6 y 9 de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación por ser un gran apoyo para que este trabajo se terminara satisfactoriamente.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por dejarme ser parte de esta gran institución.

A todos...

¡GRACIAS!

El presente trabajo fue apoyado por los proyectos PACIVE:

CD-05. Mejoramiento de la enseñanza de la asignatura de Biología Celular para la carrera de Médico Veterinario y Zootecnista.

GVC-10 Morfología Veterinaria y Biología Celular.

PAPIIT IN-211008. Evaluación de la actividad antimicótica de compuestos sintéticos y naturales sobre la estructura de las células micóticas.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
CITOESQUELETO.....	3
FILAMENTOS DE ACTINA.....	4
Polimerización de la actina.....	4
Nucleación de la actina.....	5
Proteínas de unión a actina (ABP).....	5
MICROTÚBULOS.....	5
Centro organizador de microtúbulos (MTOC).....	6
Proteínas asociadas a los Microtúbulos (MAP).....	7
Proteínas que favorecen la despolimerización de microtúbulos.....	7
FILAMENTOS INTERMEDIOS (F I).....	7
Ensamble y arquitectura de filamentos intermedios.....	8
Clasificación de los filamentos intermedios.....	9
ALTERACIONES DEL CITOESQUELETO.....	9
ESTUDIO DEL CITOESQUELETO.....	10
Estudio del citoesqueleto por medio de la técnica de inmunofluorescencia.....	11
Fijación.....	11
Mezclas fijadoras.....	12
Permeabilización.....	12
Bloqueo de uniones inespecíficas.....	13
Marcaje.....	13
Faloidina.....	14
Montaje.....	14
OBJETIVO GENERAL.....	16

OBJETIVOS PARTICULARES.....	16
HIPÓTESIS.....	17
JUSTIFICACIÓN.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
Reactivos.....	19
Anticuerpos.....	19
Mantenimiento de líneas celulares.....	19
Técnica de inmunofluorescencia indirecta de doble marcaje.....	20
RESULTADOS.....	21
DISCUSIÓN.....	26
CONCLUSIONES.....	29
BIBLIOGRAFÍA.....	30

RESUMEN

El citoesqueleto es una compleja red de filamentos proteicos del citoplasma que le permite a la célula eucariota adoptar gran variedad de formas, llevar a cabo movimientos direccionales y coordinados, dividirse y mover partículas en el citosol. Se constituye por tres componentes principales que son: *microfilamentos*, *microtúbulos*, y *filamentos intermedios*. Aunque los componentes del citoesqueleto parecen estacionarios en las micrografías, en realidad son estructuras muy dinámicas capaces de reorganizarse en forma drástica. El citoesqueleto es uno de los temas que se estudian de manera más activa en la biología celular actual, debido en parte, al desarrollo de técnicas que permiten buscar una estrategia morfológica, bioquímica y molecular coordinada. Una de las estrategias más importantes para el estudio del citoesqueleto es la inmunofluorescencia, ya que permite observar en forma directa los procesos moleculares y el comportamiento dinámico en las células vivas y el cultivo celular es muy adecuado como modelo para estudios en Biología Celular. En el presente estudio, se hizo la valoración de diferentes fijadores a distintos tiempos y concentraciones para identificar los elementos del citoesqueleto: microtúbulos (tubulina), vimentina y actina. Se trabajó con dos líneas celulares VERO y PK-15, que fueron procesadas por inmunofluorescencia indirecta de doble marcaje, mediante el uso de anticuerpos dirigidos contra tubulina o vimentina y faloidina rodaminada (para marcar actina), utilizando como fijadores: paraformaldehído al 1 y 4%, glutaraldehído al 1 y 4% formaldehído al 3.7%, paraformaldehído 4% con glutaraldehído 1% y fijador de Karnowsky a los tiempos de 5, 20, 60 y 120 minutos. Utilizando los fijadores solos (paraformaldehído 1% y glutaraldehído 1 y 4%) se visualizó solo una marca (tubulina, vimentina o actina), mas no ambas (tubulina-actina; vimentina-actina), con paraformaldehído 4% y formaldehído 3.7% se visualizaron ambas marcas (tubulina-actina), aclarando que, solo se observó esto con las células VERO, con las células PK-15 solo se visualizó una marca ya sea tubulina, vimentina o actina,(con estos dos fijadores a 120 y 20 minutos de fijación respectivamente) con la solución de Karnowsky se visualizó vimentina. Con las células VERO el fijador de Karnowsky permitió la visualización de actina en todos los tiempos, tubulina y vimentina no se visualizaron, con la mezcla de paraformaldehído 4% con glutaraldehído 1% durante 20 minutos se visualizo tubulina-actina, los mejores resultados solo se obtuvieron con las células VERO. Al hacer la comparación de estos fijadores se recomienda utilizar

paraformaldehído 4% durante 5 y 20 minutos, formaldehído 3.7% durante 20 y 60 minutos y la mezcla de paraformaldehído 4% con glutaraldehído 1% durante 20 minutos.

INTRODUCCIÓN

CITOESQUELETO

La capacidad de las células eucariotas de adoptar gran variedad de formas, llevar a cabo movimientos direccionales y coordinados, dividirse y mover partículas en el citosol, depende de una red de filamentos proteicos del citoplasma conocidos en conjunto como citoesqueleto (Lodish, et.al, 2005), que es una estructura sumamente dinámica que se reorganiza de manera continua a medida que la célula cambia de forma, se divide y responde a su medio ambiente. (Hughes, 2003; Karp, 2005). El interior de la célula también experimenta movimientos permanentes, y el citoesqueleto representa la maquinaria que posibilita muchos de estos movimientos intracelulares, como el traslado de orgánulos de un lugar a otro, la segregación de cromosomas en las dos células hijas durante la mitosis y la separación de las células animales durante el proceso de división celular. (Alberts, et.al., 2006).

El citoesqueleto está formado por una red de tres tipos de filamentos proteicos: *filamentos intermedios*, *microtúbulos*, y *filamentos de actina* (Fig. 1). Cada una de estas variedades de filamentos tiene diferentes propiedades mecánicas y está formada por una subunidad proteica distinta. En los tres casos, miles de subunidades se ensamblan para formar una hebra delicada de proteínas que a veces se extiende a través de toda la célula. (Alberts, 2006).

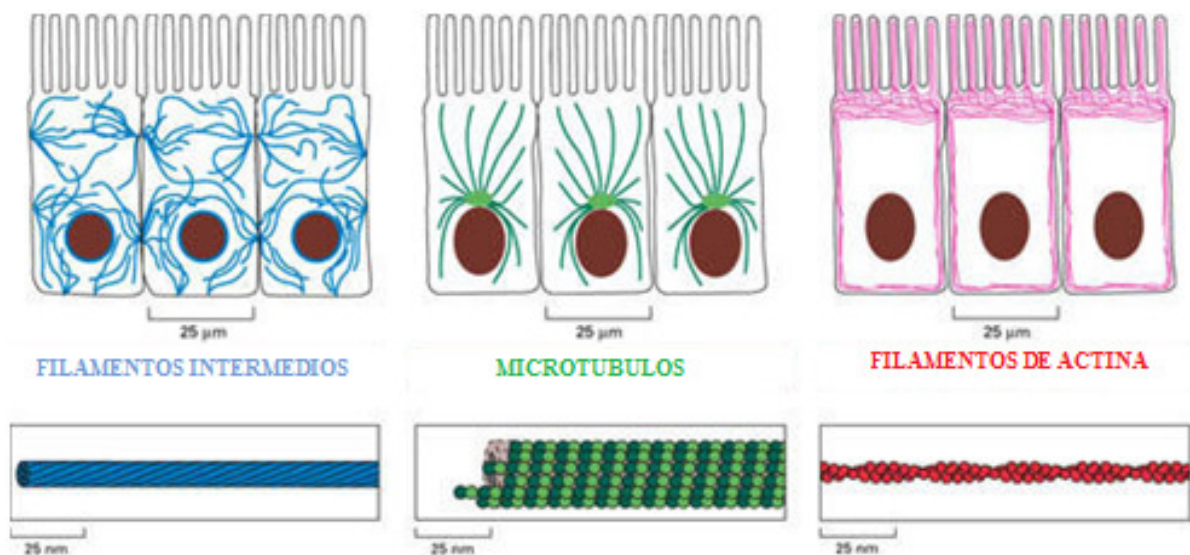


Figura1. Tipos de filamentos proteicos del Citoesqueleto. (Alberts, 2006)

FILAMENTOS DE ACTINA

Los filamentos de actina son polímeros de 7-9 nm de diámetro, la motilidad y cambio de forma de la célula se debe en gran medida al ensamblaje dinámico de esta estructura. La subunidad proteica es la actina que puede encontrarse en dos estados: uno globular (actina-G), y otro polimerizado formando filamentos (actina-F). (France, 2003; Nizard, 1991).

Los filamentos de actina forman una densa red submembranal conocida como corteza celular que da resistencia mecánica, sirven de enlace entre proteínas transmembranales e intracitoplásmicas, también juegan un rol importante en la división celular formando el anillo de contracción durante la citocinesis, así como un papel central en la contracción muscular y dan soporte a estructuras como las microvellosidades. (Fig. 2) (Basu, 2007).

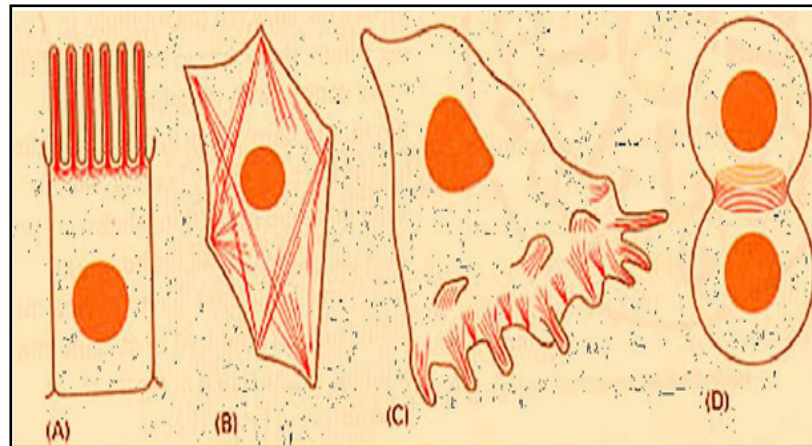


Figura 2. Estructuras que contienen actina. (Alberts, 2006)

- A. En el corazón de las microvellosidades y en la red apical.**
- B. En la corteza celular, formando las fibras llamadas de estrés y en las microespículas.**
- C. En el extremo líder de las células en movimiento.**
- D. En el anillo contráctil que separa las células después de la mitosis.**

Polimerización de la actina

Los monómeros de actina se polimerizan en un proceso dependiente de ATP para formar filamentos, que constan de dos protofilamentos enrollados helicoidalmente uno sobre otro para constituir la estructura básica del filamento de actina. La polimerización está regulada por una serie de proteínas dentro de las que cabe destacar el sistema formina-profilina. Los filamentos

de actina son elementos polarizados con un extremo de mayor polimerización (extremo más) y otro de menor polimerización (extremo menos). (Borisy, 2000; Prados, 1998).

Nucleación de la actina

Para la formación de los filamentos de actina se requiere la formación de oligómeros que actúan como núcleos de polimerización. (Pollard, 2003; Ruel, 2003). Existen proteínas relacionadas a actina (Arp) que se asocian con otras proteínas para formar el complejo Arp2/3 que actúa como núcleo para la formación de filamentos mediante su activación a través de factores de nucleación como son WASP y Cdc42. Estos complejos pueden unirse a los lados de filamentos ya existentes y polimerizar formando ramificaciones. (Mazura, 2010; Johnsson, 2010).

Proteínas de Unión a Actina (ABP por sus siglas en inglés)

Las ABPs son una serie de proteínas que interactúan con actina de forma directa o indirecta regulando su actividad, presentan una gran diversidad no sólo en sus estructuras sino también en sus mecanismos de acción, entre ellas se tiene a profilina y timosina encargadas de la dinámica de polimerización y despolimerización, la fimbrina, villina, fodrina, filamina y actina α promueven los enlaces entre diferentes microfilamentos, las integrinas y cadherinas median la interacción de los filamentos de actina con las membranas celulares y la familia de las miosinas que funcionan como motores. (Matas, 2005); la gelsolina corta y forma una caperuza en el extremo impidiendo su crecimiento o disociación y la tropomiosina que se une lateralmente a los filamentos impidiendo su despolimerización. (Román, 2008, Johnsson, 2010).

MICROTÚBULOS

Son filamentos tubulares huecos, se encuentran en casi todas las células eucariotas, forman parte de muchas estructuras diversas, como el huso mitótico de las células que se dividen y el centro de cilios y flagelos. Tienen un diámetro externo de 25 nm y pueden extenderse a lo largo y ancho de la célula. Están formadas por dos subunidades de proteínas llamadas tubulinas (α y β) que se autoensamblan para originar los microtúbulos en un proceso dependiente de GTP, originando estructuras helicoidales de 13 protofilamentos (Fig. 3). Un

extremo se conoce como extremo más (de crecimiento rápido) y el extremo contrario es el menos (de crecimiento lento). La polaridad estructural de los microtúbulos es un factor importante en el crecimiento de estas estructuras y su capacidad para participar en actividades mecánicas dirigidas. (Sulimenko, 2006). Su función está en relación con la forma de algunas prolongaciones o protuberancias celulares (axones, dendritas y axopodios), en la división de la célula y en el transporte intracelular son el riel sobre el cual las proteínas motoras transportan vesículas y moléculas grandes. (Paniagua, 2007; Gonc, 2006).

Centro organizador de microtubulos (MTOC).

Es uno de los organelos centrales en el funcionamiento de las células animales y fúngicas. La matriz del centrosoma es la responsable de la nucleación y anclaje de los microtúbulos, y es considerado el mayor centro organizador de microtúbulos, lo cual se debe a las proteínas que lo forman. La composición proteica de la matriz centrosomal es sólo parcialmente conocida e incluye una forma especial de tubulina llamada γ tubulina (la cual puede interactuar con los dímeros de tubulina α y β). La γ tubulina junto con otras proteínas forma el complejo anillo de γ tubulina que actúa como nucleador para la polimerización de los microtúbulos desde el centrosoma (Kharchenko, 2007; Gerashchenko, 2009).

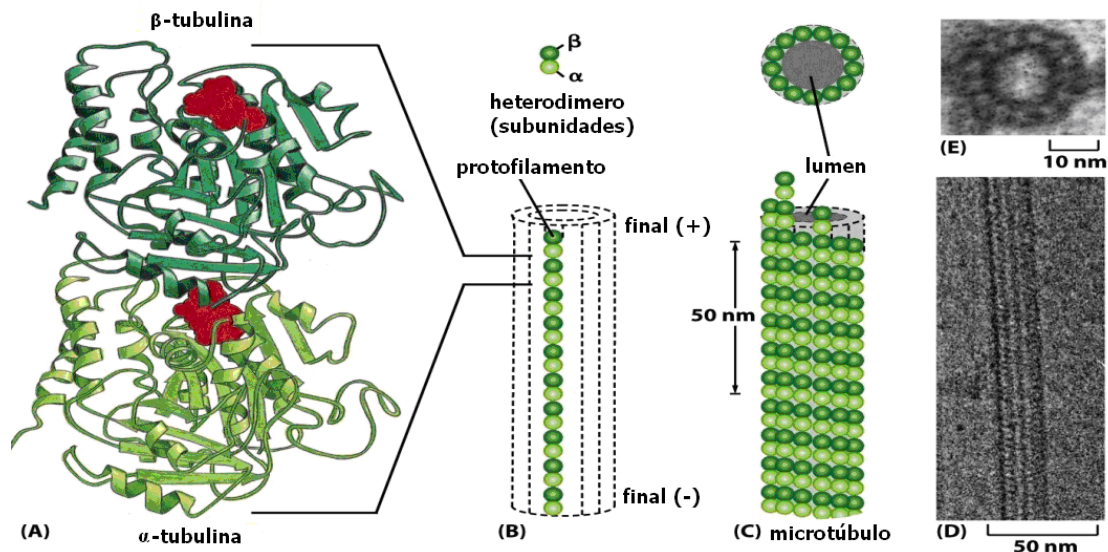


Figura 3. Estructura de los microtúbulos (Alberts, 2008)

Proteínas asociadas a los Microtúbulos (MAP).

Las MAPs colaboran en el ensamblaje de los dímeros para formar microtúbulos, también participan en la estabilización y en su relación con los microtúbulos adyacentes. Cada proteína tiene un dominio por el que se une al microtúbulo (contribuyendo a su estabilidad) y otro por el que se puede unir a otro componente citoesquelético o estructura citoplasmática. (Paniagua, 2007; Cross, 1993).

Las MAPs se clasifican en dos grupos, según su peso molecular: 1) De alto peso molecular, las MAP 1 comprenden tres proteínas diferentes, las MAP 2 se encuentran en el cuerpo celular y dendritas de neuronas donde están asociadas con filamentos intermedios, las MAP 4 aparecen en la mayoría de las células estabilizando los microtúbulos. 2) De bajo peso molecular o proteínas *tau*, su proporción es una proteína *tau* por cada seis tubulinas, se encuentran también en el axón de neuronas y establecen uniones entre microtúbulos. Otras proteínas relacionadas con los microtúbulos son las proteínas motoras cinesina y la dineína que facilitan el movimiento intracelular desplazando cargas hacia el extremo más (cinesinas) o menos (dineínas) de los microtúbulos, mismos que son utilizados como rieles. Además existe un tipo especial de dineína que conforma el esqueleto central (axonema) de los cilios y flagelos (Paniagua et.al, 2007).

Proteínas que favorecen la despolimerización de microtúbulos

Las proteínas catanina y catastrofina tienen actividad ATPasa. La catanina se une al extremo menos y despolimeriza a los microtúbulos de neuronas y en la que tiene lugar en los polos de huso durante toda la mitosis. La catastrofina se une al extremo más, desde donde separa los protofilamentos. (Alves, 1993; Paniagua, 2007).

FILAMENTOS INTERMEDIOS

Los filamentos intermedios (FI) tienen un alto grado de fuerza de tensión y su función principal consiste en conferir resistencia a las células contra el estrés mecánico asociado con el estiramiento. Estos filamentos se denominan “intermedios” porque su diámetro (alrededor de 10 nm) se encuentra entre el de los filamentos delgados de actina y los filamentos más gruesos de miosina de las células musculares lisas. Se esparcen por el citoplasma de una gran variedad de células animales y a menudo se conectan con otros tipos de filamentos del citoesqueleto por

medio de puentes de una proteína alargada llamada *plectina* que puede encontrarse en varias isoformas. Cada molécula de plectina tiene un sitio de unión para un filamento intermedio en un extremo y, según la isoforma, un sitio de unión para otro filamento intermedio, un microfilamento o un microtúbulo en el otro extremo. (Alberts, 2006; Karp, 2005).

Ensamble y arquitectura del filamento intermedio

La organización de los filamentos intermedios (fig. 4) comienza con la formación de dímeros proteicos. Dos proteínas se asocian de forma paralela, es decir, con los extremos amino y carboxilo hacia el mismo lado para formar un dímero, dos dímeros se asocian de forma antiparalela para dar un tetrámero, los tetrámeros se asocian cabeza con cola para dar largas fibras que además, se asocian lateralmente para dar un protofilamento, Cuatro protofilamentos enrollados helicoidalmente sobre sí mismos, originan protofibrillas, la asociación de 4 protofibrillas produce finalmente un filamento intermedio. (Alberts, 2006). A diferencia de los filamentos de actina y los microtúbulos, los FI nos tienen polaridad y sus unidades estructurales no son proteínas globulares sino filamentosas.

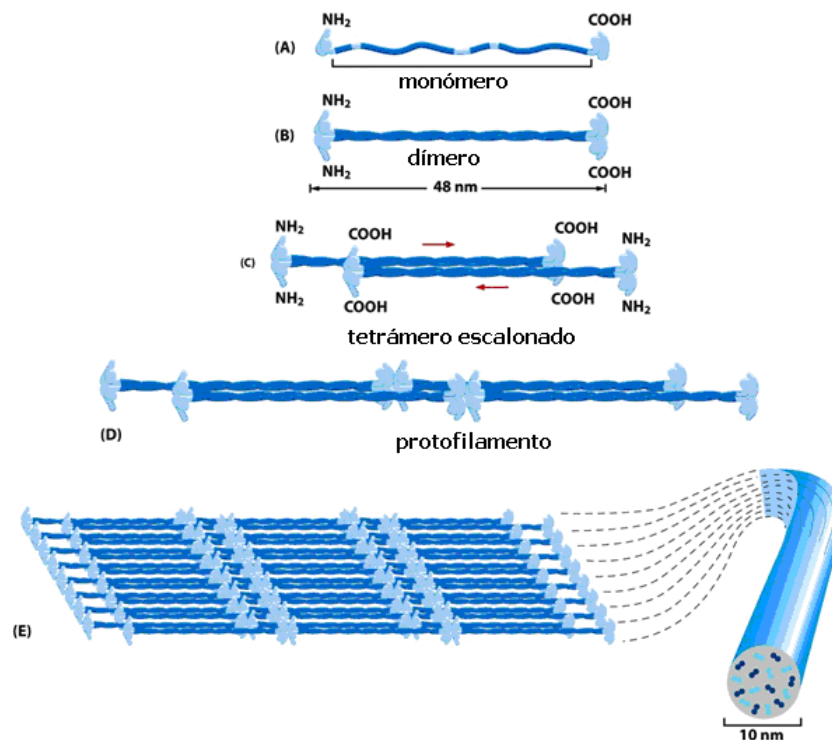


Figura. 4 Ensamble y arquitectura los filamentos intermedios (Karp, 2005)

Clasificación de los filamentos intermedios

Existe una familia de proteínas que pertenecen a los FI y que se clasifican en citoplasmáticos (queratinas, vimentinas y proteínas relacionadas, y neurofilamentos) y nucleares (láminas nucleares). En la figura 5 se presenta la clasificación de los FI y ejemplos de su localización.

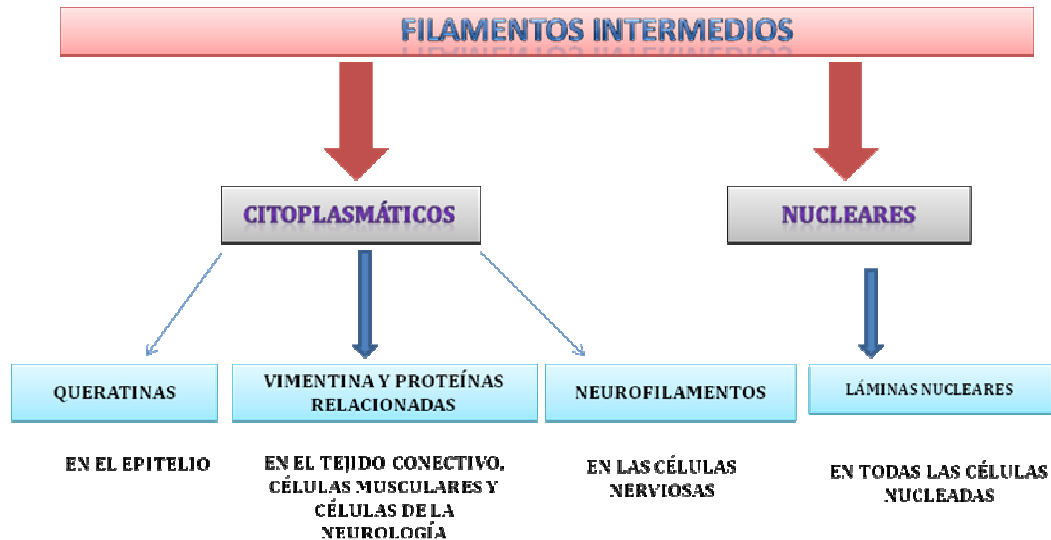


Figura 5. Clasificación y localización de los filamentos intermedios.

ALTERACIONES DEL CITOESQUELETO

- **Degeneración general del citoesqueleto:**

En el encéfalo de pacientes con enfermedad de Alzheimer se forman ovillos de degeneración neurofibrilar, que contienen proteínas asociadas a microtúbulos (llamadas proteínas *tau*) y otras asociadas a neurofilamentos. Se desintegra el citoesqueleto neuronal.

- **Microfilamentos**

Las citocalasina B impide la polimerización de los filamentos de actina.

La faloidina (del hongo *Amanita phalloides*) impide la despolimerización de los filamentos actina.

- **Microtúbulos**

La colchicina y los alcaloides de Vinca impiden el ensamblaje de los microtúbulos.

El síndrome del cilio inmóvil se debe a ausencia de brazos de dineína en los dobletes ciliares.

Los cilios del tracto respiratorio y los espermatozoides son inmóviles.

Otros defectos en los cilios (ausencia de par central o de radios) también impiden la motilidad ciliar y causan el mismo efecto.

- **Filamentos Intermedios**

En el humano más de 50 enfermedades están asociadas con mutaciones en los genes que codifican los filamentos intermedios. En particular modificaciones de las Queratinas provocan graves enfermedades de la epidermis:

Epidermolisis Bulbosa. Producida por la falta o defecto de las queratinas 5 ó 14. Se observa la citolisis del estrato basal y formación de ampollas.

Hiperqueratosis Epidermolítica. Producida por la falta o defecto de las queratinas 1 ó 10. Se observa citolisis y engrosamiento de los estratos espinoso y córneo.

Queratoma Epidermolítico Palmoplantar. Producida por la falta o defecto de la queratina 9. Es una variante de la enfermedad anterior pero ubicada exclusivamente en la palma de la mano y planta del pie.

Proliferación excesiva de neurofilamentos se observa en neuronas motoras espinales y corticales en enfermedades neuromusculares degenerativas como la esclerosis lateral amiotrófica y la atrofia muscular espinal infantil (enfermedad de Werdnig).

Filamentos de desmina alterados aparecen en cardiopatías congénitas.

Proliferación excesiva de vimentina se observa en el cristalino de ratones transgénicos con cataratas. (Paniagua, 2007)

ESTUDIO DEL CITOESQUELETO

El citoesqueleto es uno de los temas que se estudian de manera más activa en la biología celular actual debido al desarrollo de técnicas que permiten buscar una estrategia morfológica, bioquímica y molecular coordinada para conocer su estructura en condiciones normales, así como la función de cada uno de sus componentes. Como resultado se sabe mucho de las familias de proteínas que conforman el citoesqueleto, su organización, sus actividades motrices y su dinámica. Para el estudio del citoesqueleto se utilizan algunas técnicas como: la microscopia de fluorescencia, el uso de la video microscopía y los rayos láser para pruebas de motilidad *in vitro*, y el uso de células con expresión genética alterada. (Diéguez, et.al. 2008). Estos avances en la tecnología han tenido gran impacto en la observación de organismos procariontes y eucariotes. (Ramos, 2008; López, 2006).

Las técnicas de cultivo celular se han convertido en herramientas fundamentales para la investigación básica y aplicada, por lo que las líneas celulares son objeto de un intenso

estudio, abarcando diversas disciplinas como la inmunología, virología, biología celular, biología molecular, ingeniería genética y farmacología. (Molina, 2004; Boccaccio, 2007).

Estudio del citoesqueleto por medio de la técnica de inmunofluorescencia.

Se refiere a un conjunto de técnicas empleadas para la detección de un antígeno en células o tejidos, mediante el uso de fluorocromos conjugados a anticuerpos, las más utilizadas son: Inmunofluorescencia Directa e Indirecta. (Alberts, 2008; Roitt, 2000).

El método directo se basa en que el anticuerpo primario es acoplado a un fluorocromo y pueden detectarse diferentes antígenos.

En el método indirecto, se añade primero un anticuerpo primario sin marcar contra el antígeno; posteriormente se añade un anticuerpo secundario marcado contra el anticuerpo primario.

Los pasos a realizar en una técnica de inmunofluorescencia indirecta son: Fijación, permeabilización, bloqueo de uniones inespecíficas, anticuerpo primario, anticuerpo secundario y montaje. (Arrate, 2003)

Fijación

El proceso de fijación ha de cumplir un doble objetivo: conservar la estructura intracelular lo más intacta posible y la del antígeno, que ha de seguir siendo reconocido por el anticuerpo. Por lo tanto, es un método destinado a facilitar la obtención de preparaciones duraderas que conserven su estructura morfológica y química. Y que permita realizar posteriormente, los procedimientos de marcaje, identificación e interpretación, que contribuyen al conocimiento profundo de la morfología, función y alteraciones en los diversos procesos patológicos. Existen diferentes tipos de agentes fijadores, divididos básicamente en: solventes orgánicos y agentes entrecruzantes, estos también llamados fijadores que actúan por reticularización de las proteínas. (Arrate, 2003).

Algunos de los primeros procedimientos de fijación consistían en una breve inmersión en ácidos o solventes orgánicos como el alcohol. Los procedimientos actuales suelen comprender aldehídos activos, particularmente el formaldehído, glutaraldehído y paraformaldehído, que establecen enlaces covalentes con los grupos amino libres presentes en las proteínas y forman puentes cruzados entre sí y con las proteínas adyacentes. Esto da como resultado la formación

de una delgada malla que mantiene la estructura interna celular y la cohesión tisular. El formaldehído se utiliza a concentraciones próximas al 4 %, es un fijador ampliamente usado por la buena preservación del tejido, actúa como conservante, produce poca retracción tisular, es un buen fijador para lípidos, es compatible con la mayoría de las tinciones histológicas, incluidas las de inmunocitoquímica e hibridación de ácidos ribonucleicos. Normalmente se usa en solución tamponada e isotónica. El glutaraldehído se usa a una proporción de entre el 0,5 y el 3 %, tiene una alta capacidad para preservar la estructura celular, por lo que es el fijador de referencia para observación de ultraestructuras celulares con el microscopio electrónico, pero hay que tener cuidado con su baja penetración tisular y puede producir retracciones. Se usa en soluciones tamponadas isotónicas. El Paraformaldehído, se utiliza en concentraciones próximas al 4%, es un fijador de membrana y componentes citoplasmáticos (Alzola, 2005). El procedimiento de fijación es un factor muy importante para la visualización de las proteínas al realizar ensayos de inmunofluorescencia (Javois, 1994; Riederer, 1989).

Mezclas fijadoras

La mayor parte de los procesos de fijación usan distintas sustancias fijadoras, bien mezcladas en solución acuosa inicial o utilizadas sucesivamente en el tiempo. Con ello se aprovechan las ventajas de cada una de ellas y se pueden contrarrestar sus desventajas. Hay multitud de formas de usar los diferentes fijadores, tanto en sus componentes como en las proporciones de éstos, dependiendo de las necesidades posteriores, es decir, qué tipo de tejido se desea fijar y qué queremos ver de dicho tejido. Algunas de las mezclas que se utilizan en las técnicas histológicas de rutina son las mezclas con formaldehído, glutaraldehído y paraformaldehído, por ejemplo, la solución fijadora de Karnovsky que es una mezcla de paraformaldehído 1% con glutaraldehído 1.5% más Cloruro de Calcio al 0.002 %, estas mezclas se utilizan de acuerdo al tipo de tejido que se utiliza y también al tipo de técnica que se realiza. (Ross, 2005)

Permeabilización

Tras la fijación, la membrana plasmática debe ser tratada para permitir la tinción de estructuras intracelulares (núcleo, citoplasma). Esto se consigue mediante el tratamiento con disolventes orgánicos o con detergentes que alteran la integridad de las membranas

permitiendo la entrada de sondas fluorescentes o anticuerpos. Sin embargo estos deben ser utilizados con precaución ya que existen componentes intracelulares (proteínas de citoesqueleto) que pueden ser extraídos mediante el tratamiento con detergentes a pesar que han sido fijados. Por ello, es importante buscar el detergente más suave y la concentración adecuada para que permita la entrada de una zona fluorescente sin afectar los componentes de la célula. Principalmente se utilizan tres detergentes para realizar protocolos de tinción: con orden creciente de poder extractivo son la saponina, Tritón X-100 y el SDS. El Tritón usado en concentraciones comprendidas entre el 0.05 y el 1% es el más usado para técnicas de inmunofluorescencia ya que permeabiliza eficazmente las membranas celulares sin afectar las interacciones proteína-proteína. (Montengua, 2009)

Bloqueo de uniones inespecíficas

Este paso tiene la doble función de bloquear los radicales libres reactivos presentes en la muestra, de manera natural o introducidos como consecuencia de la fijación y saturar las uniones de los anticuerpos con proteínas. (Arrate, 2003)

Los agentes bloqueantes que más se utilizan son: la albumina de suero bovino (BSA), ovoalbúmina, caseína (o una solución de leche desnatada), gelatina o suero normal obtenido de las especies del animal en el que se han obtenido los anticuerpos marcados con fluorescencia. Las soluciones proteicas se suelen utilizar en concentraciones de entre el 1 y 10%. (Montengua, 2009)

Marcaje

Anticuerpo primario y secundario

Son las inmunoglobulinas presentes en el suero sanguíneo y líquidos corporales que se unen específicamente al antígeno. (Bengtsson, 2008; Roitt, 2000).

Son utilizados como herramientas para localizar antígenos específicos en las células ya que al estar conjugados con algún fluorocromo, pueden ser detectados mediante el uso de microscopios equipados con una fuente de luz que permita detectarlos, tal es el caso de los microscopios de fluorescencia que proyectan una luz que excita a los fluorocromos, los cuales fluorescen emitiendo luz a una longitud de onda diferente y que se puede observar como focos luminosos en la muestra. Los tipos de fluorocromos son diversos y variados, entre ellos se

encuentra la fluoresceína y la rodamina. Cada fluorocromo tiene un espectro de emisión y excitación característico. La longitud de onda de excitación corresponde a la energía que absorbe una sustancia, en este caso un fluorocromo, y la longitud de onda de emisión corresponde a la energía que emite (que da una señal), la fluoresceína se excita con luz azul a 490nm y emite a 514nm dando una señal de color verde, la rodamina se excita con luz verde a 500nm y emite a 540nm dando una señal de color rojo. (Roitt I., 2000).

Faloidina

Es una micotoxina del grupo de las falotoxinas producida por el hongo *Amanita phalloides*, su estructura es la de un heptapéptido bicíclico, en la inmunofluorescencia se utiliza como un marcador. La actividad de la faloidina depende de la concentración en que se encuentra en las células. A bajas concentraciones y en el citoplasma, agrupa la actina poco polimerizada o libre y la agrega en pequeños polímeros, sin interferir con las fibras de estrés; a niveles mayores, induce contracción celular, se fija en los lados de los filamentos de actina y los estabiliza notablemente. (Diéguez, 2008; Cooper, 1087).

En la bibliografía se reportan diferentes metodologías que permiten poner en evidencia uno o varios de los componentes del citoesqueleto, sin embargo, cada uno de los autores emplea diferentes tipos de fijadores y en diferentes condiciones. En trabajos realizados previamente en el laboratorio se ha observado que no todos los fijadores permiten obtener buenas imágenes al emplear anticuerpos dirigidos contra las diferentes proteínas del citoesqueleto (Cortés, et.al. 2009).

Montaje

A la hora de elegir el medio de montaje adecuado a la preparación hay que tener en cuenta varios parámetros: 1) el índice de refracción del medio ha de ser equivalente al del medio de inmersión del objetivo para evitar aberraciones esféricas. 2) debe tener el pH adecuado a la emisión óptima del fluorocromo que se esté utilizando. 3) se debe añadir algún agente antifadig (antidesteñimiento) que prevenga el decaimiento de la fluorescencia. 4) la consistencia no debe afectar a la estructura de la muestra, los medios secos tienen el inconveniente de que pueden aplastar la muestra, mientras que los medios acuosos pueden no fijar bien el cubreobjetos. En caso de utilizar medios de montaje acuosos, es importante sellar

bien las preparaciones para que no se muevan durante la observación. El sellador más utilizado es la laca de uñas. Después del montaje, en caso de que las muestras no puedan ser observadas en ese momento las muestras deben almacenarse a 4°C protegidas de la luz para maximizar la vida de la fluorescencia. (Montengua, 2009)

OBJETIVO GENERAL

Realizar el estudio comparativo de diferentes métodos de fijación mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta de doble marcaje para observar los elementos del citoesqueleto en cultivos celulares.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Estandarizar el cultivo de las líneas celulares PK-15 y VERO en relación con su apariencia.
2. Realizar los métodos de fijación empleando los siguientes reactivos: paraformaldehído, paraformaldehído-glutaraldehído, glutaraldehído, formaldehído y fijador de Karnowsky, variando concentraciones y tiempos en cada fijador.
3. Mediante la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta de doble marcaje utilizar anticuerpos dirigidos contra Actina, Tubulina y Vimentina
4. Hacer la valoración morfológica de la integridad de los componentes celulares Actina, Tubulina y Vimentina, utilizando un microscopio de fluorescencia, registrando los resultados con ayuda de cámara digital.

HIPÓTESIS

El tratamiento con diferentes fijadores variando concentración y tiempos y usando mezclas, dará como resultado la distinción de las proteínas de citoesqueleto, observando de mejor o menor calidad su integridad.

JUSTIFICACIÓN

En trabajos previos en el laboratorio de morfología veterinaria y biología celular, para el estudio de las técnicas de inmunofluorescencia se han utilizado diferentes fijadores para poder evidenciar los componentes del citoesqueleto de diversas líneas celulares, sin embargo estos procedimientos de fijación no se habían realizado con tantas variaciones.

Con la finalidad de encontrar el fijador adecuado, su concentración y tiempo de fijación, y evitar invertir tiempo previo a las experimentaciones posteriores, se propuso hacer estos ensayos y así estandarizar las condiciones de fijación bajo las cuales se obtiene la visualización óptima de dichos componentes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Los fijadores utilizados fueron: paraformaldehído 1 y 4%, glutaraldehído 1 y 4%, formaldehído 3.7%, solución de paraformaldehído 4% con glutaraldehído 1% y fijador de Karnovsky (paraformaldehído 1%, glutaraldehído 1.5% y cloruro de calcio 0.002 %) (J. T. BAKER).

Anticuerpos (Acs)

Los anticuerpos primarios (Ac) usados en este estudio fueron: Ac Policlonal IgG anti-tubulina y Ac Policlonal IgG anti-vimentina (ZYMED), ambos producidos en ratón y como Ac secundario se utilizó un Ac Policlonal IgG cabra anti-ratón conjugado con fluoresceína (Santa Cruz Technology). El citoesqueleto de actina fue marcado con faloidina conjugada a rodamina (Sigma-Aldrich).

Mantenimiento de líneas celulares

En el presente trabajo se utilizaron células PK-15 provenientes de células epiteliales de riñón de cerdo (ATCC-CCL33, Rockville, MD, USA) y VERO provenientes de células epiteliales de riñón del mono verde (ATCC-CCL81, Rockville, MD, USA), las cuales se pusieron en crecimiento utilizando medio de cultivo DMEM (medio Eagle modificado por Dulbecco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco) y penicilina (100 UI/mL), estreptomycin (100 µg/mL) (Gibco). Las células fueron crecidas en cajas para cultivo celular de 90 mm (Corning, NY) y mantenidas en una incubadora a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

Las células eran cultivadas hasta obtener un crecimiento con un 80% de confluencia, momento en el cual se hacía un pase celular, que consistía en desechar el medio de la caja, se agregaba 0.5 ml de una solución de tripsina 0.5% y EDTA 0.53mM, se incubaban durante 5 minutos o hasta que las células se observaran separadas, por pipeteo se despegaban las células de la caja y se dividían en 3 cajas, a las que se les agregaban 10 mL de medio DMEM suplementado con 5% de SFB y antibióticos.

Técnica de inmunofluorescencia indirecta de doble marcaje

Se colocaron 8 cubreobjetos de 18 mm (previamente esterilizados por calor húmedo) en el fondo de una caja de cultivo, haciendo la siembra de células para permitir su propagación sobre ellos. Una vez que tuvieron la confluencia de 40 ó 50% en cada cubreobjetos, se retiró el medio de cultivo y se procedió a fijarlos. Las soluciones fijadores utilizadas se anotan en la tabla 1.

Tabla 1. Fijadores utilizados y concentraciones empleadas.

FIJADORES	CONCENTRACIÓN
Paraformaldehído	1%, 4%
Glutaraldehído	1%, 4%
Paraformaldehído-Glutaraldehído	4% (paf); 1% (gluta)
Formaldehído	3.7%
Karnowsky	1X

Los cubreobjetos se incubaron en cada una de las soluciones fijadores a los tiempos de: 5, 20, 60 y 120 minutos. Posteriormente fueron permeabilizadas con Tritón-X100 al 0.1% en PBS durante 5 minutos y se bloquearon con albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS durante 30 minutos. Después se agregaron los anticuerpos primarios, anti-tubulina (en dilución 1:100 en PBS) o anti-vimentina (en dilución 1:10 en PBS), se incubó en cámara húmeda a 4°C toda la noche, al siguiente día se agregó el anticuerpo secundario policlonal IgG cabra anti- ratón (en dilución 1:20 en PBS) y se incubó 2 horas a temperatura ambiente. En seguida se marcó la actina con faloidina rodaminada (en dilución de 1:150 en PBS) y se incubó por 20 min a temperatura ambiente. Después de cada paso las muestras se lavaron 3 veces en PBS y el último lavado se hizo con agua desionizada. Finalmente, las muestras se montaron agregando solución para montaje (Ultra CruzTM) sobre el portaobjetos, se colocaron los cubreobjetos con la preparación, se permitió que la solución para montaje difundiera y se eliminaron las burbujas. Se dejaron secar por 30 a 60 minutos y se almacenaron a 4°C. (García, 2001; Muñiz, 2005).

Las muestras fueron analizadas con un microscopio de fluorescencia ZEISS AXIOSKOP 40 Nr 3311000009; lámpara HBO 50/Ac mbq 52 ac. Las imágenes fueron capturadas con la cámara Evolution VF cooled color Media Cybernetics SN: Q25079; con el programa QCapture Pro 6.0. *Las muestras se manejaron por duplicado.

RESULTADOS

Se realizó el ensayo de inmunofluorescencia indirecta de doble marcaje en dos líneas celulares: VERO y PK-15 para visualizar tubulina-actina y vimentina-actina, utilizando distintos fijadores a diferentes concentraciones y tiempos (ver método, tabla 1), haciendo una valoración de:

1. Integridad de la célula (estructura general de la célula).
2. Integridad del citoesqueleto (estructura particular de los filamentos).
3. Fondo (presencia de fluorescencia no específica).

Calificando en porcentaje de acuerdo a la valoración observada, 100% si se observan los tres parámetros valorados, 65% si se observan dos, 35% si se observa uno y 0% si no se observa ninguno. A continuación se presenta una muestra representativa de diferentes preparaciones que ejemplifican estos parámetros.

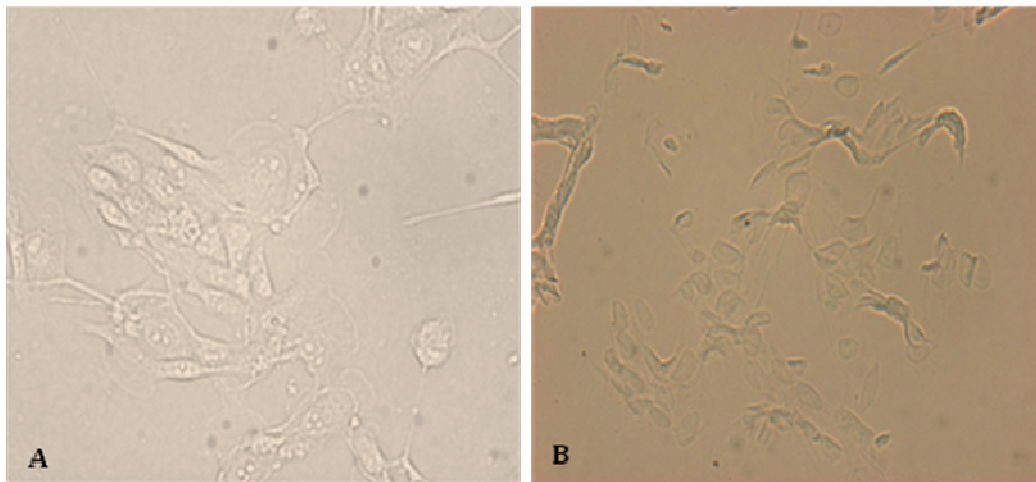


Figura 6. Inmunofluorescencia de células VERO y PK-15; A) Células PK-15 sin fluorescencia fijadas con mezcla de paraformaldehído 4% con glutaraldehído 1% durante 20 minutos; B) Células VERO sin fluorescencia fijadas con paraformaldehído 4% durante 5 minutos

En las preparaciones mostradas en la figura 6 se visualiza la integridad de la célula (estructura general de la célula).

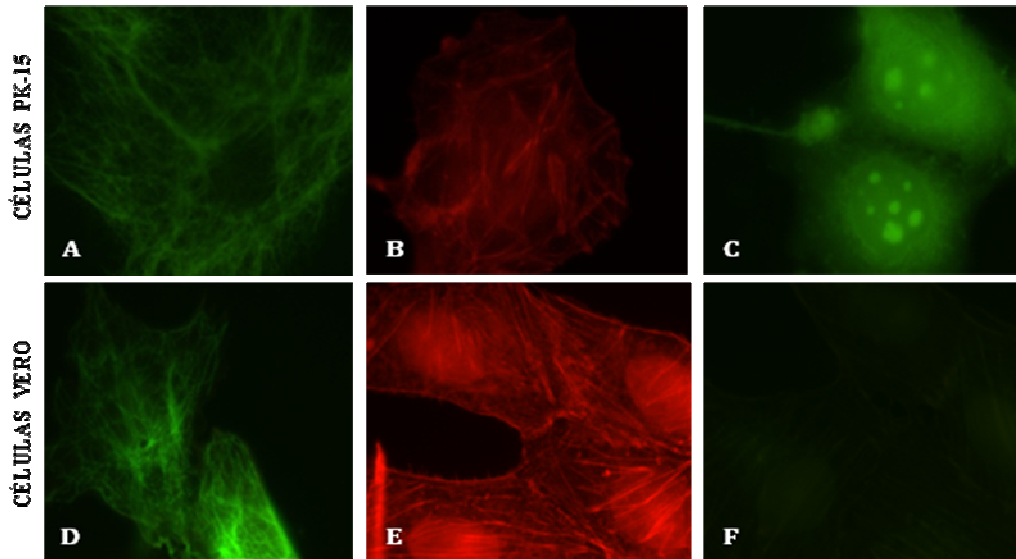


Figura 7. Inmunofluorescencia de células VERO y PK-15; A) Vimentina de células PK-15 fijadas con glutaraldehído 4% durante 20 min; B) Filamentos de Actina de células PK-15 fijadas con paraformaldehído 4% durante 20 minutos; C) Vimentina de células PK-15 fijadas con paraformaldehído 1% durante 5 min; D) Microtúbulos de células VERO fijadas con glutaraldehído 1% durante 5 min; E) Filamentos de Actina de células VERO fijadas con formaldehído 3.7% durante 5 min; F) Vimentina de células VERO fijadas con solución de Karnowsky durante 60min.

En las preparaciones mostradas en la figura 7 en (A, B, D y E) se visualizan los tres parámetros, en (C y F) solo se visualizan dos parámetros: la integridad de la célula (estructura general de la célula) y el fondo (presencia de fluorescencia no específica), en el cual se observa que no presentan fluorescencia no específica.

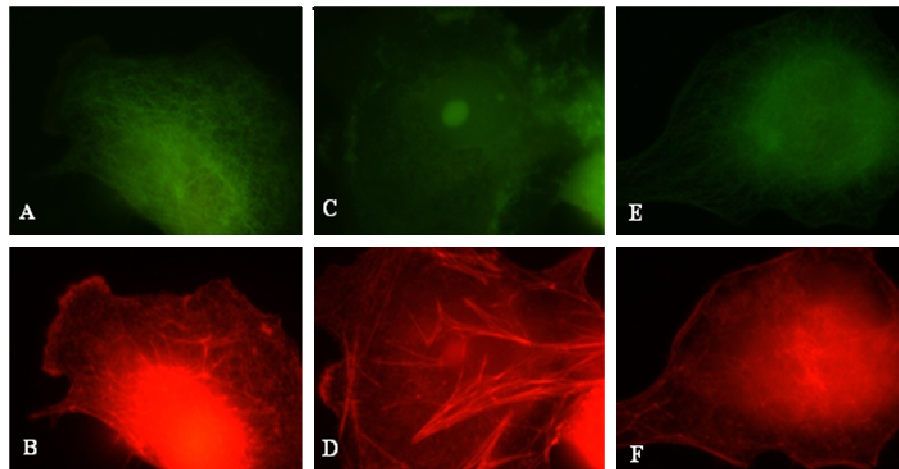


Figura 8. Inmunofluorescencia de células PK-15; A) Microtúbulos y B) Filamentos de Actina de células fijadas con paraformaldehído 4% durante 120 minutos; C) Vimentina y D) Filamentos de Actina de células fijadas con glutaraldehído 1% durante 60 minutos; E) Microtúbulos y F) Filamentos de Actina de células fijadas con mezcla de paraformaldehído 4% con glutaraldehído 1% durante 20 minutos.

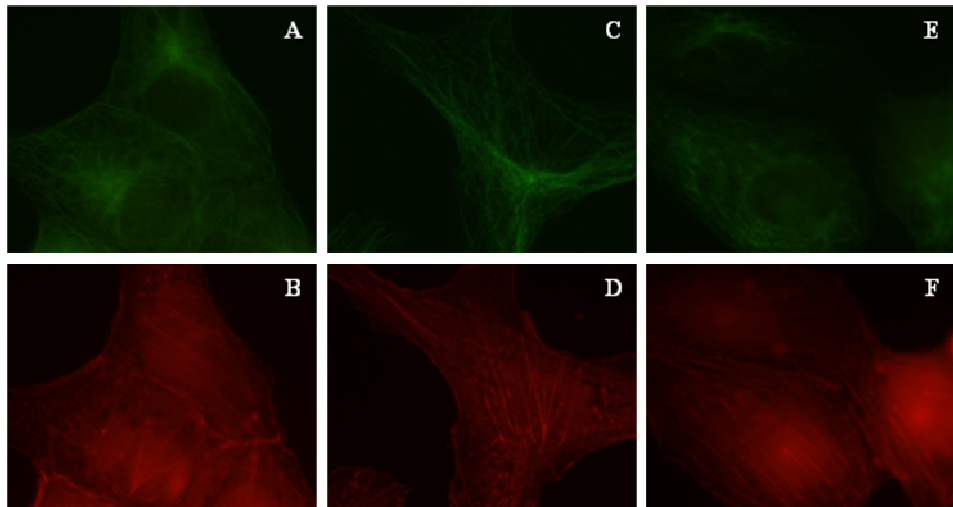


Figura 9. Inmunofluorescencia de células VERO; A) Microtúbulos y B) Filamentos de Actina de células fijadas con mezcla de paraformaldehído 4% con glutaraldehído 1% durante 20 minutos; C) Microtúbulos y D) Filamentos de Actina de células fijadas con paraformaldehído 4% durante 20 minutos; E) Vimentina y F) Filamentos de Actina de células fijadas con solución de Karnowsky durante 120 minutos.

Tabla 2. Resultados representativos de las preparaciones realizadas para las células PK-15 y VERO (Figuras 8 y 9).

Línea celular	Fijador, concentración y Tiempo	Parámetros	Porcentaje (%)
PK-15 Figura 8	(A y B) paraformaldehído 4%, 120 minutos. (C y D) glutaraldehído 1%, 60 minutos. (E y F) mezcla de paraformaldehído 4% con glutaraldehído 1%, 20 minutos.	(A y B) Integridad de la célula y Fondo. (C) Integridad de la célula y Fondo. (D) Los 3 parámetros. (E y F) Integridad de la célula y Fondo.	A) 65% B) 65% C) 65% D) 100% E) 65 % F) 65 %
VERO Figura 9	(A y B) mezcla de paraformaldehído 4% con glutaraldehído 1%, 20 minutos. (C y D) paraformaldehído 4%, 20 minutos. (E y F) Karnowsky 120 minutos	(A y B) Los 3 parámetros. (C y D) Los 3 parámetros. (E y F) Los 3 parámetros.	A) 100% B) 100% C) 100% D) 100% E) 100% F) 100%

En las tablas 3 a 6 se presentan los resultados obtenidos en las células PK15 y VERO en experimentos de IFI de doble marcaje para identificar microtúbulos o vimentina junto con actina, utilizando los fijadores glutaraldehído (1% ó 4%), paraformaldehído (1% ó 4%), formaldehído (3.7%), mezcla de paraformaldehído (4%) más glutaraldehído (1%) y solución de Karnowsky (paraformaldehído 1% con glutaraldehído 1.5% más Cloruro de Calcio al 0.002 %). Los tiempos de incubación empelados para cada fijador fueron de 5, 20, 60 y 120 min. En cada caso se hizo la evaluación tanto de: 1) Integridad de la célula, 2) Integridad del citoesqueleto y 3) La presencia de fluorescencia inespecífica. Calificando en porcentaje de acuerdo a la valoración observada.

Tabla 3. Resultados de las células PK-15 para la marca de microtúbulos-actina

FIJADOR TIEMPOS (MIN)	MICROTUBULOS (TUBULINA)				FILAMENTOS DE ACTINA			
	5	20	60	120	5	20	60	120
Glutaraldehído 1%	65%	65%	65%	65%	65%	65%	65%	65%
Glutaraldehído 4%	65%	65%	65%	65%	100%	100%	100%	65%
Paraformaldehído 1%	65%	65%	100%	100%	100%	100%	100%	65%
Paraformaldehído 4%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Formaldehído 3.7%	65%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Mezcla	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Karnowsky 1X	65%	65%	100%	100%	65%	100%	100%	100%

(100%) Cumplió con 3 parámetros, (65%) cumplió con 2 parámetros, (35%) cumplió con un parámetro y 0% no cumplió con ninguno.

Tabla 4. Resultados de las células PK-15 para la marca de Vimentina-actina

FIJADOR TIEMPOS (MIN)	VIMENTINA				FILAMENTOS DE ACTINA			
	5	20	60	120	5	20	60	120
Glutaraldehído 1%	65%	65%	65%	100%	100%	100%	100%	100%
Glutaraldehído 4%	65%	65%	65%	65%	65%	100%	65%	65%
Paraformaldehído 1%	100%	65%	100%	65%	65%	100%	100%	100%
Paraformaldehído 4%	100%	65%	100%	65%	100%	100%	100%	100%
Formaldehído 3.7%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Mezcla	65%	65%	65%	65%	100%	100%	100%	100%
Karnowsky 1X	100%	100%	100%	100%	65%	100%	100%	100%

(100%) Cumplió con 3 parámetros, (65%) cumplió con 2 parámetros, (35%) cumplió con un parámetro y 0% no cumplió con ninguno.

Tabla 5. Resultados de las células VERO para la marca de microtúbulos-actina

FIJADOR TIEMPOS (MIN)	MICROTUBULOS (TUBULINA)				FILAMENTOS DE ACTINA			
	5	20	60	120	5	20	60	120
Glutaraldehído 1%	65%	65%	100%	100%	65%	65%	100%	100%
Glutaraldehído 4%	65%	65%	65%	65%	65%	65%	100%	65%
Paraformaldehído 1%	65%	65%	65%	65%	65%	100%	100%	100%
Paraformaldehído 4%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Formaldehído 3.7%	65%	100%	100%	65%	100%	100%	100%	100%
Mezcla	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Karnowsky 1X	65%	65%	65%	65%	65%	100%	100%	100%

(100%) Cumplió con 3 parámetros, (65%) cumplió con 2 parámetros, (35%) cumplió con un parámetro y 0% no cumplió con ninguno.

Tabla 6. Resultados de las células VERO para la marca de vimentina-actina

FIJADOR TIEMPOS (MIN)	VIMENTINA				FILAMENTOS DE ACTINA			
	5	20	60	120	5	20	60	120
Glutaraldehído 1%	65%	65%	65%	65%	65%	65%	100%	100%
Glutaraldehído 4%	65%	65%	65%	65%	65%	100%	100%	100%
Paraformaldehído 1%	65%	65%	65%	65%	65%	65%	100%	100%
Paraformaldehído 4%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Formaldehído 3.7%	100%	65%	100%	65%	100%	100%	100%	100%
Mezcla	65%	65%	65%	65%	100%	100%	100%	100%
Karnowsky 1X	65%	100%	100%	65%	100%	100%	100%	100%

(100%) Cumplió con 3 parámetros, (65%) cumplió con 2 parámetros, (35%) cumplió con un parámetro y 0% no cumplió con ninguno.

DISCUSIÓN

En este caso, se trabajaron fijadores y tiempos de incubación para observar la marca de tubulina y actina; vimentina y actina en la misma preparación. Utilizar diferentes fijadores y tiempos de fijación es muy importante para preservar los constituyentes celulares lo más intactos posible. (Arrate, 2003; Riederer, 1989). Estudios realizados por otros autores se enfocaron en la identificación de otras proteínas como queratinas, gelsolina WASP y ARP2/3, donde utilizaron paraformaldehído 3% (Guttman, 2002; Lu, 1997; Casais, 2008), glutaraldehído 2.5% (Weber, 1978) y formaldehído 3% (Aurora, 1999) obteniendo buenos resultados y demostrando que estos fijadores se pueden utilizar a diferentes concentraciones. También es importante considerar la temperatura ambiente y el manejo post-fijación de las muestras (Larsson, 1988). En otros modelos de estudio donde se pretendió extraer el contenido lipídico de las células, así como, la visualización de microtúbulos utilizando metanol, acetona en frío y paraformaldehído 4%, obtuvieron como resultado que, el metanol y la acetona en frío resultaron muy agresivos para la extracción del contenido lipídico, pero el paraformaldehído 4% no, sin embargo, para la visualización de microtúbulos no fue el más adecuado, pues no permitió visualizar con claridad a estos. (Deanna, 2003; Thompson, 1984).

Los resultados obtenidos en este trabajo al fijar células con un solo fijador como glutaraldehído 1 y 4% solo permitió la visualización de la marca de actina, (no en todos los tiempos de fijación), pero no se observaron microtúbulos ni vimentina, sin embargo en ambas líneas (VERO y PK-15) la integridad de estas no se visualizó y con paraformaldehído 1% solo permitió la visualización de la marca de vimentina en las dos líneas celulares. Aunque el paraformaldehído 4% resultó uno de los mejores fijadores en algunas preparaciones no se observaron ambos marcajes, pues cuando se visualizaron microtúbulos, la actina no se visualizó y viceversa, o había marca de actina y microtúbulos un poco apagada. Vimentina se marcó un tanto apagada, sin embargo la actina (de esa preparación vimentina-actina) si se visualizó. El glutaraldehído no se considera muy adecuado en ensayos de inmunofluorescencia, debido a que este incrementa la autofluorescencia, sin embargo a bajas concentraciones (0.5%) permite la visualización de microtúbulos, pero en ensayos de microscopía electrónica da mejores resultados. (Weber, 1978). Por otra parte la fijación con formaldehído 3.7 % permitió la visualización de los filamentos de actina y tubulina pero no de

vimentina. Se ha reportado que al utilizar un solo fijador es más frecuente que se provoquen cambios conformacionales en las proteínas y/o bloquean el acceso del reactivo con los epítomos antigénicos logrando así falsos negativos. El formaldehído no conserva microtúbulos en gran cantidad, sin embargo, a veces es necesario el uso de formaldehído y aceptar la morfología de los microtúbulos en poca cantidad. (Javois, 1994).

Los fijadores anteriores han sido probados en muchas combinaciones, algunas han demostrado ser excelentes fijadores como es en el caso de la mezcla paraformaldehído 3% con glutaraldehído 1% en tiempos de 20 y 60 minutos de fijación (Cortés, 2009; Martínez, 1987) y con la mezcla paraformaldehído 4% con glutaraldehído 1% en tiempos de 20 minutos en este trabajo, sin embargo, es importante mencionar que la misma mezcla con un tiempo de fijación de 5 minutos y 120 minutos no permitió visualizar la marca de microtúbulos pero si la de actina, no siendo igual con vimentina pues en ese caso solo se observó la marca de actina en los cuatro tiempos, igual que los resultados obtenidos con la mezcla de la solución de Karnowsky en sus diferentes tiempos solo se visualizó la marca de actina, reafirmando la idea de que el tiempo de fijación y el tipo de fijador si influye para la adecuada observación de las proteínas celulares.

Se ha observado que son múltiples los factores que pueden afectar la visualización de las proteínas en ensayos de inmunofluorescencia, como la preservación de la estructura celular, las propiedades de las distintas proteínas del citoesqueleto, los anticuerpos que se utilizarán, soluciones y detergentes que pueden afectar dramáticamente la preservación de células, y el hecho de que algunos anticuerpos se unen al antígeno sólo en condiciones de fijación específica, que hasta el momento no se ha logrado entender con certeza el mecanismo por medio del cual los fijadores influyen sobre la visualización de las proteínas (Bowers, 1988; Hyat, 1981; Chao-Kuen, 2008). En diversos estudios se hacen pruebas con diferentes anticuerpos policlonales, monoclonales y mezclas de ellos, en donde demuestran las ventajas y desventajas de cada uno, poniendo en evidencia la fijación como un factor crucial, debido a que hay algunos fijadores que interfieren en la inmunorreactividad de la mayoría de los anticuerpos. (Thompson, 1984).

Este trabajo se realizó con la finalidad de encontrar las condiciones óptimas de fijación para la visualización de algunas de las proteínas del citoesqueleto, sin embargo, al observar las tablas

se puede notar la gran variación que existe en los resultados para cada línea celular dependiendo del fijador empleado y de los tiempos de incubación utilizado.

Cabe mencionar que en todos los casos la integridad de la célula, así como el fondo (no hubo fluorescencia inespecífica) se visualizo adecuadamente, en algunos casos aunque se visualizaban las marcas de microtubulos o vimentina con actina estas no eran muy claras como en otras preparaciones o simplemente no se marcaron, por lo que a ninguna preparación se le califico con 35% y 0%.

CONCLUSIONES

- a) La estandarización del cultivo de las líneas celulares PK-15 y VERO permite visualizar una buena apariencia en las células y mantener una confluencia del 80% para su manipulación
- b) El utilizar diferentes fijadores y mezclas de estos variando los tiempos y concentraciones de fijación permite encontrar el fijador adecuado para cada línea celular.
- c) Es importante mantener en estrictas condiciones tanto de almacenamiento como las diluciones adecuadas de los anticuerpos primario y secundario, así como la faloidina rodaminada para lograr un buen marcaje de las proteínas en cuestión.
- d) Al hacer la comparación de estos fijadores se pueden visualizar los elementos del citoesqueleto de las células VERO con los fijadores paraformaldehído 4% durante 5 y 20 minutos, formaldehído 3.7% durante 20 y 60 minutos y la mezcla de paraformaldehído 4% con glutaraldehído 1% durante 20 minutos. Mientras que para las células PK-15 se pueden visualizar las marcas de los filamentos de actina con glutaraldehído 1% durante 20 minutos, paraformaldehído 4% en 20, 60 y 120 minutos, formaldehído 3.7% en todos los tiempos y vimentina con paraformaldehído 1% durante 5 minutos.

De acuerdo a las predicciones se encontró que para las células VERO permitió visualizar principalmente la marca de microtúbulos y actina, vimentina un poco apagada. Para las células PK-15 y otras líneas celulares que se requiera de su análisis se tendría que considerar repetir estas variaciones o bien probar con los fijadores a esas concentraciones y tiempos que en este trabajo permitieron la visualización de dichas marcas.

BIBLIOGRAFIA

1. Agudelo Piedad Flórez, Marcos Restrepo, María Amparo Lotero **Evaluación de la prueba de inmunofluorescencia indirecta para el diagnóstico de leptospirosis humana**. Instituto Colombiano de Medicina Tropical, Instituto de Ciencias de la Salud (ICMT-CES), Biomédica Sabaneta, Colombia; 26; 216-23; 2006.
2. Alberts Bruce, Bray Dennis, Raff Martín, Roberts Keith, Watson James D.; **Molecular Biology of The Cell**; 5th edition; Garland Science Ed.; New York, USA; Pag. 586-589 y 965-1052; 2008.
3. Alberts Bruce, Bray Dennis, Hoplan Karen; Johnson Alexander; Lewis Julian, Raff Martín, Roberts Keith, Walter Peter; **Introducción a la biología celular**; 2ª edición; Ed. Pnamericana; Pag. 22 y 573-607; 2006.
4. Alves de Matos Antonio Pedro, Carvalho Zilda G; **African swine fever virus interaction with microtubules**; Biol Cell 78, 229-234 Elsevier, Paris (1993).
5. Alzola Ricardo; **Curso de Histología, Embriología y teratología, guía de estudio: Técnicas Histológicas**; Facultad de Ciencias Veterinarias Departamento de Ciencias Biológicas 2001.
6. Aurora PD, Janmey PA, McCulloch CAG. **A role for gelsolin in stress fiber-dependent cell contraction**. Exp Cell Res 1999; 250: 155-167.
7. Arrate Mallabiabarrena; **Métodos de Fijación, Métodos de permeabilización, Inmunofluorescencia, Montaje de las muestras**; Laboratorio de Microscopía; Departamento de Ciencias Experimentales y de la Salud; Universidad Pompeu Fabra; (2003)
8. Basu Roshni and Chang Fred; **Shaping the actin cytoskeleton using microtubule tips**; Current Opinion in Cell Biology 2007, 19:88–94
9. Bengtsson Dominique, Sowa Kordai M, Salanti Ali, Jensen Anja, Joergensen Louise, Turner Louise, Theander Thor G and Arnot David E; **A method for visualizing surface-exposed and internal PfEMP1 adhesion antigens in *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes**; *Malaria Journal* 2008, 7:101.

10. Boccaccio Graciela, D'Alessio Gottifredi Cecilia, Vanesa, Depino Amaicha , Martínez Tosar Leandro, Balboa Luciana, Leishman Claudia; **Química Biológica II A Organización y Función Celular, Respuesta celular a estrés: formación de gránulos de estrés, 2007.**
11. Brown Anthony, Yan Li, Theresa Slaughter and Mark M. Black; **Composite microtubules of the axon: quantitative analysis of tyrosinated and acetylated tubulin along individual axonal microtubules;** Journal of Cell Science 104, 339-352 (1993).
12. Bowers B, Maser M. **Artifacts in fixation for transmission electron microscopy, in artifacts in biological electron microscopy.** New York: Plenum, 1988.
13. Casais Rosa, González Molleda Lorenzo, Ángeles Machín, Gloria del Barrio, García Manso Alberto, Dalton Kevin P., Coto Ana, Martín Alonso José Manuel, Prieto Miguel, Parra Francisco; **Structural and functional analysis of virus factories purified from *Rabbit vesivirus*-infected Vero cells;** Virus Research 137 (2008) 112–121.
14. Chao-Kuen Lai, King-Song Jeng, Keigo Machida, and Michael M. C. Lai; **Association of Hepatitis C Virus Replication Complexes with Microtubules and Actin Filaments Is Dependent on the Interaction of NS3 and NS5A;** JOURNAL OF VIROLOGY, Sept. 2008, p. 8838–8848 Vol. 82, No. 17
15. Citoesqueleto," Enciclopedia Microsoft® Encarta® 2008.
16. Cooper JA; **Effects of Cytochalasin and Phalloidin on Actin.** *J. Cell Biol.* **105** (4): 1473-1478. (1987)
17. Cortés Neri Ulises Germán. MVZ. **Identificación de gelsolina en células RK-13 infectadas con *Escherichia coli* enteropatógena para conejo (REPEC).** FES-Cuautitlán UNAM. Trabajo concluido con votos aprobatorios del jurado designado, pendiente la presentación de examen profesional. (2009).
18. Cross Daniel, Vial Clarisa and Ricardo B. Maccioni; **A tau-like protein interacts with stress fibers and microtubules in human and rodent cultured cell lines;** Journal of Cell Science 105, 51-60 (1993).

19. Deanna D. Donato and Dawn L. Brasaemle **Fixation Methods for the Study of Lipid Droplets by Immunofluorescence Microscopy**; *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* Volume 51(6): 773–780, 2003
20. Diéguez Francisco Lázaro; **Implicación de los filamentos de actina en la arquitectura, homeostasis y tráfico de salida del aparato de Golgi y estudio de la formación y degradación de un agresoma de actina**; tesis doctoral; universidad de Barcelona; Barcelona 2008.
21. Dráberová Eduarda and Dráber Pavel; **A microtubule-interacting protein involved in coalignment of vimentin intermediate filaments with microtubules**; *Journal of Cell Science* 106, 1263-1273 (1993)
22. Draber Pavel, Draberova Eduarda, Linhartova Irena and Viklicky Vladimir; **Differences in the exposure of C- and N-terminal tubulin domains in cytoplasmic microtubules detected with domain-specific monoclonal antibodies**; *Journal of Cell Science* 92, 519-528 (1989)
23. France Carlier Marie, Wiesner Sebastian, Le Clainche Christophe, Pantaloni Dominique; **Actin-based motility as a self-organized system: mechanism and reconstitution in vitro** *C. R. Biologies* 326 (2003) 161–170
24. García Tovar C. G. **Localización celular y subcelular de la distrofina de 71 kDa “founder sequense” (Dp71f) en encéfalo de rata**. Tesis de doctorado en biología celular, CINVESTAV-IPN. (2001).
25. Gary G Borisy and Tatyana M Svitkina†; **Actin machinery: pushing the envelope**. *Current Opinion in Cell Biology* 2000, 12:104–112.
26. Gerashchenko Maxim V., Chernoiivanenko Ivan S., Moldaver Marianna V., Minin Alexander A.; **Dynein is a motor for nuclear rotation while vimentin IFs is a “brake”**; *Cell Biology International* 33 (2009) 1057e1064.
27. Gianni Piperno, Michel LeDizet, and Xiao-jia Chang; **Microtubules Containing Acetylated α -Tubulin in Mammalian Cells in Culture** *The Journal of Cell Biology*, Volume 104, 289-302, February 1987.
28. Gonc Alves Estela Maria , Ventura Cláudio Angelo , Yano Tomomasa, Rodríguez Macedo Maria Lgia, Genari Selma Candelaria; **Morphological and growth**

- alterations in Vero cells transformed by cisplatin;** Cell Biology International 30 (2006) 485 e 494.
29. Gundersen Gregg G. and Cook Tiffani A.; **Microtubules and signal transduction**
Current Opinion in Cell Biology 1999, 11:81–94.
30. Guttman JA, Janmey P, Vogt W. **Gelsolin-evidence for a role in turnover of junction-related actin filaments in Sertoli cells.** J Cell Sci 2002; 115: 499-505.
31. Hazel W. Wilkinson and Bonnie J. Brake; **Formalin-Killed Versus Heat-Killed Legionella pneumophila Serogroup Antigen in the Indirect Immunofluorescence Assay for Legionellosis;** JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Nov. 1982, p. 979-981 Vol. 16, No. 5
32. Hughes Fulford M.; **Function of the cytoskeleton in gravisensing during spaceflight;** Advances in Space Research, Vol. 32, No. 8, pp. 1585-1593.2003.
33. Hugon J. S., Ibarra C., Valenti G. and Bourguet J.; **Microtubules and actin microfilaments in the amphibian bladder granular cells;** *Biology of the Cell*, 66 (1989) 77-84
34. Hyat MA. **Fixation for electron microscopy.** New York: Academic Press, 1981
35. Javois LC. **Immunocytochemical methods and protocols.** Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 1994.
36. Johnsson Anna Karin, Karlsson Roger; **Microtubule dependent localization of profiling ImRNA to actin polymerization sites in serum-stimulated cells;** European Journal of Cell Biology 89 (2010) 394–401.
37. Jos L.V. Broers, Emiel A.G. Peeters, Helma J.H. Kuijpers, Jorike Endert, Carlijn V.C. Bouten, Cees W.J. Oomens, Frank P.T. Baaijens and Frans C.S. Ramaekers; **Decreased mechanical stiffness in LMNA2/2cells is caused by defective nucleocytoskeletal integrity: implications for the development of laminopathies;** Human Molecular Genetics, 2004, Vol. 13, No. 21 (pag 7)
38. Karp Gerald; **Biología Celular y Molecular, Conceptos y Experimentos;** 4ª Edición; Editorial McGraw-Hill; México Pag 358-421; 2005.
39. Kharchenko Marianna V., Akseyonov Alexander A., Melikova Maria M., Kornilova Elena S.; **Epidermal growth factor (EGF) receptor endocytosis is accompanied by**

- reorganization of microtubule system in HeLa cells**; Cell Biology International 31 (2007) 349 e 359.
40. Koshi Rachel, Mustafa Yardulak and Perry Marta E.; **Vimentin, cytokeratin 8 and cytokeratin 18 are not specific markers for M-cells in human palatine tonsils** J. Anat. (2001) 199, pp. 663-674.
 41. Larsson LI. **Immunocytochemistry: Theory and practice**. CRC, Boca Raton, FL, 1988
 42. Lippincott Schwartz Jennifer; **Cytoskeletal proteins and Golgi dynamics**; Current Opinion in Cell Biology 1998, 10:59-59.
 43. Lodish; Berk; Matsudira; Kaiser; Scott; Zipursky; Darnell. **Biología celular y molecular**; 5ª edición; Editorial Panamericana; Pag173-178; 2005.
 44. López Lluch Guillermo **Cuaderno de prácticas de Biología**; Curso 2006-07 Área de Biología Celular; Universidad Pablo de Olavide
 45. Lu M, Witke W, Kwiatkowski DJ, Kosik KS. **Delayed retraction of filopodia in gelsolin null mice**. J Cell Biol 1997; 138: 1279-1287.
 46. Martínez Hernández A. **Methods for electron immunohistochemistry**. Meth Enzymol 1987; 145: 103-113.
 47. Matas Guadix Olga B.; **Dinámica de la actina y tráfico de membranas asociado al complejo de Golgi; papel regulador de RHOA, RAC1, y CDC42**; Tesis doctoral, Universidad de Barcelona, Mayo de 2005.
 48. Mathew G. Lyman and Lynn W. Enquist; **Herpesvirus Interactions with the Host Cytoskeleton; Minireview**; Journal of Virology, Vol. 83, No. 5, p. 2058–2066 Mar. 2009.
 49. Mazura Antonina Joanna, Gremm Dagmar, Dansranjavín Temuujin , Litwin Monika , Jockusch Brigitte M., Wegner Albrecht , Weeds Alan G. , Mannherz Hans Georg; **Modulation of actin filament dynamics by actin-binding proteins residing in lamellipodia**; European Journal of Cell Biology 89 (2010) 402–413
 50. Montuenga Luis, J.Francisco, Ruiz Esteban, Calvo Gonzalez Alfonso; **Técnicas en Histología y Biología Celular**; Ed. Elsevier Masson; Pags 190-193, España, 2009

51. Molina Nora Beatriz, Minvielle Marta Cecilia, Basualdo Juan Angel; **Células RK13: Influencia de la concentración de suero fetal bovino en el tiempo de duplicación;** Acta Bioquím Clín Latinoam 2004; 38 (4): 477-80
52. Morgan Sara J. Darling David C.; Cultivo de células animales; Editorial Acribia; 2009; págs. 1-5, 37-46.
53. Muñiz Hernández Saé, Sirenia González Pozos, Mónica Mondragón Castelán, Dr. Ricardo Mondragón Flores; **Caracterización de los cambios estructurales en el citoesqueleto de MDCK durante la interacción con el parásito *Toxoplasma gondii*;** Departamento de Bioquímica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados-IPN. México D.F. Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C; Oaxaca, Oaxaca; 2005.
54. Nizard Carine and Decloitre Franotse; **Disorganization of microfilaments and microtubules induced by tumor promoters in normal and initiated hepatocytes.** *Biology of the Cell, Volume 73, Issues 2-3, 1991, Page 14a*
55. Paniagua Gómez; Álvarez Ricardo; **Biología celular, Capítulo 6 citoesqueleto;** 3^a edición; Editorial Mcgraw-Hil; 2007.
56. Pollard Thomas D., and Borisy Gary G. **Cellular Motility Driven by Assembly and Disassembly of Actin Filaments;** Cell, Vol. 112, 453–465, February 21, 2003.
57. Prados J.; Melguizo C.; Marchal J. A.; Vélez C; Álvarez, L. & Aranega, A. **Estudio inmunohistoquímico de los cambios en la expresión de la α -actinina durante el desarrollo cardiaco de pollo.** *Rev. Chil. Anat., 16(2):255-261, 1998.*
58. Ramírez JM, Triviño A, Ramírez AI, Salazar JJ, García Sánchez J. **Immunohistochemical study of human retinal astroglia.** Vision Res; 34: 1.935-1.946; 1994.
59. Ramos García Silvia L., Arreola Cruz Alma A., Galván Mendoza Iván J., Mouriño Pérez Rosa R.; **Microscopía confocal para la observación *in vivo* del citoesqueleto celular y proteínas asociadas en hongos filamentosos;** Departamento de Microbiología. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada
60. Riederer BM. **Antigen preservation test for immunocytochemical detection of cytoskeletal proteins: influence of aldehyde fixatives.** J Histochem Cytochem 1989; 37: 675-681.

61. Roitt Ivan, Brostoff Jonathan, Male David; **Inmunología**; 5^a edición ; Editorial Harcourt; 2000 pag 383-386.
62. Román Álvarez Patricia, Barajas Torres, Gutiérrez Venegas Carolina Gloria, Contreras Marmolejo Luis Arturo; **Aggregatibacter actinomycetemcomitans lipopolysaccharide affects human gingival fibroblast cytoskeletal organization**; Cell Biology International 32 (2008) 417e426.
63. Ross, M.H., Kaye, G.I., Pawlina, W.; **Histología. Texto y atlas color con biología celular y molecular**. Editorial Médica Panamericana. Madrid; 2005.
64. Ruel Cary A. and Patrick Ryan; **A role for glycoprotein C in pseudorabies virus entry that is independent of virus attachment to heparan sulfate and which involves the actin cytoskeleton**; Virology 307 (2003) 12–21.
65. Sánchez C., Diaz Nido J., Avila J.; **Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function**; Progress in Neurobiology 61 (2000) 133-168.
66. Silverman Gavriela R. V. and A. Forer; **Evidence that actin and myosin are involved in the poleward flux of tubulin in metaphase kinetochore microtubules of crane-fly spermatocytes**; Journal of Cell Science 113, 597-609 (2000).
67. Subhojit Roy, Pilar Coffee, George Smith, Ronald K. H. Liem, Scott T. Brady, and Mark M. Black; **Neurofilaments Are Transported Rapidly But Intermittently in Axons: Implications for Slow Axonal Transport**; The Journal of Neuroscience, September 15, 2000, 20(18):6849–6861.
68. Sulimenko Vadym, Draberova Eduarda, Sulimenko Tetyana, Macurek Libor, Vera Richterova, Petr Draber,† and Pavel Draber; **Regulation of Microtubule Formation in Activated Mast Cells by Complexes of α -Tubulin with Fyn and Syk Kinases1**; The Journal of Immunology, 176: 7243–7253 (2006).
69. Thompson William C., David J. Asai, and Darrel H. Carney; **Heterogeneity among Microtubules of the Cytoplasmic Microtubule Complex Detected by a Monoclonal Antibody to Alpha Tubulin**; The Journal of cell biology volume 98 March 1984 1017-1025.

70. Weber Klaus, Peter C. Rathke, and Mary Osborn; **Cytoplasmic microtubular images in glutaraldehyde-fixed tissue culture cells by electron microscopy and by immunofluorescence microscopy**; Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 75, No. 4, pp. 1820-1824, Cell Biology, April 1978.