



## La epistemología de la imaginación en el aprendizaje de la microbiología celular

Oliver González M. R.<sup>a</sup>, Soto Zárate C. I.<sup>a</sup>, García Tovar C. G.<sup>a</sup>, Garrido Fariña G.<sup>a</sup>, Rodríguez Salazar L. M.<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Ciencias Biológicas, FES-Cuautitlán, UNAM, Estado de México, 54740

<sup>b</sup>Instituto Politécnico Nacional, CIECAS. Ciudad de México, 11360

### ARTICLE INFO

**Received:** August 4, 2017

**Accepted:** September 12, 2017

**Available on-line:** November 2, 2017

**Keywords:** Epistemología de la imaginación, pedestales, Microbiología celular, Inyección, *Escherichia coli*.

#### E-mail addresses:

Oliver González MR.

[oliverglz@yahoo.com.mx](mailto:oliverglz@yahoo.com.mx)

Soto Zárate CI.

[cisz2003@hotmail.com](mailto:cisz2003@hotmail.com)

García Tovar CG.

[cgarciatov@yahoo.com.mx](mailto:cgarciatov@yahoo.com.mx)

Garrido Fariña G.

[isaurogafa@yahoo.com.mx](mailto:isaurogafa@yahoo.com.mx)

Rodríguez Salazar LM.

[luismauriciors@gmail.com](mailto:luismauriciors@gmail.com)

ISSN XXX-XXX

© 2017 Institute of Science Education.

All rights reserved

### ABSTRACT

The understanding of scientific knowledge in cell biology necessarily requires the reflection about the process in which they are constructed and structured. The epistemology of the imagination propose as alternative the constructs of images by means of concepts, making possible the concrete representation of the abstract processes involved in the structuring of the phenomena of cellular biology. To emphasize this, we focus imaginary configuration of mechanisms of enteropathogenic *Escherichia coli*, which generate typical lesions in infected enterocytes. These lesions are elevations of the plasma membrane of infected cells, rich in actin, called pedestal. In the 1980s and 1990s, researchers focused on the structuration of molecular mechanisms of this lesion, so that samples of natural infections observed under the electron microscope showed the pedestals, but the molecular mechanisms involved were not known. For this, *in vivo* and *in vitro* infection models were developed and standardized in animal models and cell cultures on a process that, at the beginning, was implicit the formation of the pedestals themselves. With the help of pedestals, the purpose was to show the role of the protein complex that forms the bacterial secretion system with several Gram negative bacterial to transfer effector proteins from the inside to the host cell cytoplasm to control several cellular systems for their benefit and which proteins participate in the formation of the pedestals. Under this framework, the epistemology of the imagination starts from the fact that the researcher creates imaginary configurations of a reality structured from abstract concepts looking for their concrete representation in reality.

Para la comprensión de los conocimientos generados en biología celular, es necesario reflexionar sobre la manera en que son construidos y estructurados, no en la mera transmisión de los conceptos abstractos que la conforman. La epistemología de la imaginación da una alternativa al proponer la construcción de imágenes a partir de los conceptos, haciendo posible la representación concreta de los procesos abstractos implicados en la estructuración de los fenómenos de la biología celular. Para puntualizar esto, nos centramos en la configuración imaginaria de los mecanismos de patogenicidad de *Escherichia coli* enteropatógena, la cual genera lesiones típicas en enterocitos infectados. Estas lesiones son elevaciones de la membrana plasmática de células infectadas, ricas en actina, a la que le dieron el nombre de pedestales. En los años 80s y 90s, los investigadores se ocuparon en estructurar los mecanismos moleculares de esta lesión, por lo que muestras de infecciones naturales observadas al microscopio electrónico mostraron los pedestales, pero no se sabía sobre los mecanismos moleculares involucrados. Para ello se desarrollaron y se estandarizaron modelos de infección *in vivo* e *in vitro* en modelos animales y cultivos celulares sobre un proceso que, de inicio, estaba implícito la formación misma de los pedestales. Al contar con pedestales, el propósito fue mostrar el papel del complejo proteico que forma el sistema de secreción bacteriana con que cuentan varias bacterias Gram negativas para translocar proteínas efectoras desde su interior al citoplasma de la célula hospedera, para controlar varios sistemas celulares para su beneficio y qué proteínas participan en la formación de los pedestales. Bajo este marco, la epistemología de la imaginación parte de que el investigador crea configuraciones imaginarias de una realidad

---

estructurada a partir de conceptos abstractos buscando su representación concreta en la realidad.

---

## I. INTRODUCCIÓN

El conocimiento científico cada vez va en aumento en las diferentes áreas como en las ciencias naturales, en donde, en las últimas tres décadas se ha obtenido grandes avances en materia de biología celular, biología molecular y microbiología celular. Para ello, enmarcadas en la epistemología de la imaginación, se considera que los investigadores han generado configuraciones de realidades posibles, expresadas en diseños experimentales y desarrollando instrumentos apropiados para llevarlos a cabo, que derivan en el desarrollo de nueva tecnología. Con esto, es posible representar esas realidades posibles, procesando las muestras en su preparación, construyendo conceptos para elaborar los modelos que representan y expliquen el conocimiento adquirido. El proceso de la enseñanza y del aprendizaje en este tipo de conocimiento, se hace complejo, en primer lugar para la comprensión del docente de estos conceptos y modelos, y en segundo lugar, por el procesamiento de esta información para el aprendizaje del estudiante, ya que son procesos que no pueden ser observados a simple vista. En las ciencias biológicas, al estudiar lo visible a simple vista (como los órganos y demás estructuras del organismo de los animales), al pasar al estudio a nivel tisular, para observar al microscopio óptico la estructura de los tejidos que componen a los órganos mediante distintas preparaciones, es importante tener claridad en dicho proceso para su comprensión. Esto conlleva la necesidad de preparar el tejido antes de llevarlo a la observación al microscopio, que desde la propuesta de la epistemología de la imaginación, es necesaria una representación previa, que planteamos como la configuración imaginaria de esa realidad.

Este planteamiento lo desarrollamos en el trabajo titulado “Epistemología de la imaginación: el pensamiento geométrico en la enseñanza de la anatomía y la histología”, que presentamos en este mismo congreso, en donde planteamos que el paso del nivel de órgano al de tejido requiere una comprensión que es compleja por su grado de abstracción. Pasar del nivel de tejidos a células, requiere una mayor comprensión por su mayor grado de abstracción en la relación de estos niveles estructurales y fisiológicos, como lo planteamos en el trabajo titulado “Trascendencia del desarrollo de prácticas de enseñanza y de los foros virtuales (TIC) sobre el aprendizaje de la Biología Celular” que también fue presentado en este congreso. Este nivel de comprensión del conocimiento se agudiza al pasar del nivel celular al molecular, en donde la ultraestructura y los mecanismos moleculares de los procesos celulares, así como, las reacciones bioquímicas y fisicoquímicas, cuyo nivel de abstracción complica aún más la comprensión de dicho conocimiento (tanto para el docente como para el discente) y por ende dificultar tanto en la enseñanza como en el aprendizaje.

Para abordar este problema, la epistemología de la imaginación da una alternativa al proponer la configuración imaginaria a partir de los conceptos, haciendo posible la representación concreta de los procesos abstractos implicados en la estructuración de los fenómenos de la biología celular. Para ello proponemos que para la comprensión de los conocimientos generados, es necesaria la toma de conciencia de la manera en que son construidos y no en la mera transmisión de los conceptos abstractos que la conforman. De esta manera, la epistemología de la imaginación resalta el papel de las configuraciones imaginarias generadas en el pensamiento de los investigadores (basadas en sus conocimientos previos), para elaborar diseños experimentales y crear los instrumentos adecuados para llevar a cabo la materialización de acciones evocadas en su imaginación, para obtener las representaciones de la estructura, ultraestructura y mecanismos moleculares de la célula, creando así, los modelos para representarlos y permitir la adquisición de dicho conocimiento.

Con el propósito de hacer explícita esta propuesta, tomamos como caso de estudio los mecanismos macromoleculares de evolución de varias bacterias patógenas Gram negativas, como es el sistema de secreción bacteriana tipo 3, (T3SS, por sus siglas en inglés, Type 3 Secretion System) con su estructura principal denominada “complejo aguja o inyectisoma”. Ahí describimos el complejo proceso de ensamblaje de este complejo proteico, lo cual permitió el avance del conocimiento acerca de cómo actúa durante la infección llevada a cabo por *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) en los enterocitos (células epiteliales del intestino), dando como resultado la formación de

pedestales. Después de una descripción general del complejo proceso de ensamblaje del complejo proteico del inyectisoma, presentamos nuestra propuesta acerca de cómo se fue estructurado este tipo de conocimientos, para finalizar con la propuesta de aprendizaje de la microbiología celular, analizado desde los tres conjuntos de acciones cognitivas planteados por la epistemología de la imaginación, como la coordinación entre sí de la experiencia práctica, la experiencia simbólica-imaginativa y experiencia formal (Rodríguez-Salazar, 2015).

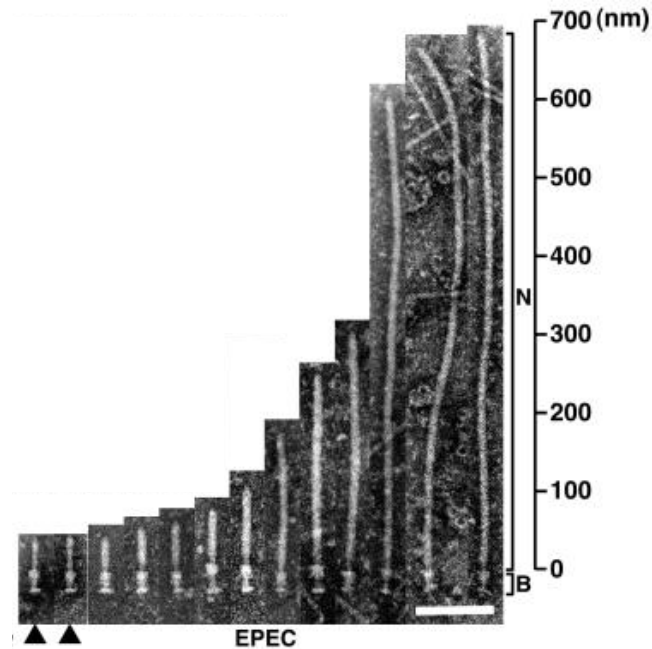
## II. ENSAMBLAJE DEL COMPLEJO PROTEICO DEL INYECTISOMA: UN PROCESO COMPLEJO

El T3SS es un complejo mecanismo multi-proteico y supramolecular que han evolucionado varias bacterias patógenas Gram negativas para infectar células de humanos, animales, insectos y plantas. Con este sistema de secreción las bacterias translocan (transfieren) diversas toxinas, denominadas en su conjunto proteínas efectoras, desde el citoplasma bacteriano hasta el interior de la célula eucariota hospedera. Estas proteínas efectoras alteran varios procesos biológicos de la célula blanco para beneficio del patógeno, como el tráfico de membrana, la selectividad de la membrana celular y la respuesta inmune, así como, procesos celulares internos como el citoesqueleto. La estructura principal del T3SS es un complejo multiproteico denominado “inyectisoma” o “complejo aguja” que se constituye de tres partes principales: un cuerpo basal, una extensión en forma de aguja de jeringa y una prolongación denominado translocón (Fig. 1). Con el fin de hacer explícito el grado de abstracción conceptual, lo cual lo vuelve un proceso complejo, presentaremos la explicación del complejo proteico a partir del cual se forma el inyectisoma, para ilustrar nuestra propuesta del proceso de configuración imaginaria de la realidad a partir de los conceptos, como paso intermedio de lo abstracto a lo concreto con fines educativos.

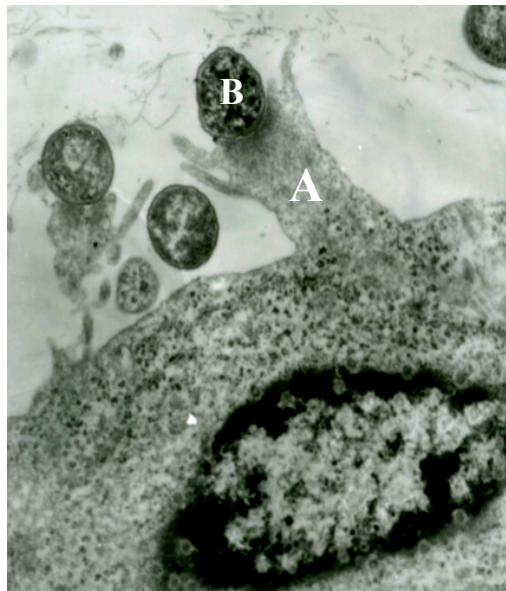
El complejo basal está constituido por proteínas que se disponen en forma de anillos, embebidos en las membranas interna y externa de la bacteria en donde se ancla una barra central formando, entre los anillos, un soporte para la estructura en forma la aguja molecular que sobresale. Esta especie de aguja se protruye del cuerpo basal hacia el espacio extracelular y en la punta de esta, se une un polímero proteico que prolonga al complejo aguja hasta 700 nm (Fig. 1) para alcanzar la célula hospedera e interactuar directamente con la membrana celular. El complejo aguja transloca 2 proteínas para formar un poro en la membrana de la célula hospedera a través del cual, la bacteria vierte sus proteínas efectoras al interior de la célula infectada. En conjunto, estos componentes proteicos forman el aparato de T3SS. La organización y los componentes del T3SS son genéticamente muy conservados en bacterias como *Salmonella*, *Yersinia*, *Shigella* y dos *Escherichia coli*, enteropatógena y enterohemorrágica, entre otras. Además, tiene gran similitud con el flagelo que presentan en mayor número de bacterias. (Daniell *et al.*, 2003; Galán *et al.*, 2014 y Notti and Stebbins, 2016).

Con el T3SS de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), se translocan, como se mencionó arriba, proteínas efectoras desde su interior al citoplasma de la célula hospedera provocando rearrreglos del citoesqueleto. Dentro de las proteínas efectoras que transloca EPEC a la célula hospedera es su propio receptor llamado Tir (del inglés Translocated intimin receptor), que, al ser depositado en el citoplasma de la célula eucariota, se fosforila y se ensambla en la membrana plasmática para actuar como receptor para la proteína de superficie bacteriana intimina. Con la interacción Tir-intimina resulta la formación de las lesiones A/E, característica de la infección intestinal por EPEC. Esta interacción se caracteriza por destrucción de las microvellosidades de los enterocitos infectados al inicio, luego una relación íntima entre las membranas de la bacteria y de la célula hospedera y tercero, la reorganización del citoesqueleto con la formación de los pedestales que van de 5 a 10 nm de extensión (Fig. 2). (Monn *et al.*, 1983; Knutton *et al.*, 1987; Kelly *et al.*, 1997; Celi *et al.*, 2000; Sekiya *et al.*, 2001; Garmendia *et al.*, 2005 y Notti and Stebbins, 2016). La infección gastrointestinal con EPEC representa un gran problema de salud en niños y animales en países en desarrollo (Natato and Kaper, 1998).

La representación concreta de este proceso abstracto de alto nivel de complejidad conceptual se puede apreciar en su representación en las figuras 1 y 2.



**FIGURA 1.** Imagen de varios inyectisomas o complejos aguja, después de llevar a cabo las acciones experimentales derivadas de la configuración imaginaria de estas complejas estructuras macromoleculares para aislarlas y exponerlas al microscopio electrónico de transmisión. Es evidente la forma de una aguja de jeringa de diferentes longitudes. El nivel señalado con B se muestra el cuerpo basal y con N la parte del filamento del complejo aguja que se extienden hasta 700 nm. (Tomado y modificado de Sekiya *et al.*, 2001)



**FIGURA 2.** Representación de un pedestal (P) obtenido mediante una modelo infección experimental, *in vivo*, de la línea celular RK13, células epiteliales de riñón de conejo infectadas con *Escherichia coli* para conejo (REPEC) (B). La muestra fue preparada para ser vista al microscopio electrónico de transmisión (Oliver *et al.*, 2008).

Para la formación del inyectisoma de EPEC, primero se ensamblan las proteínas EscR, EscS, EscT, EscU y EscV y se forma el anillo de la membrana interna, de manera simultánea, la proteína EscC forma el anillo de la membrana

externa. Luego, mediante el sistema Sec de secreción bacteriana, se coloca en el espacio periplásmico la proteína EscJ para formar un tubo que conecta el anillo de ambas membranas. La proteína EscN se ubica en la parte citoplasmática del anillo de la membrana externa y tiene actividad ATPasa que proporciona la energía necesaria para la secreción (Garmendia *et al.*, 2005 y Vidal *et al.*, 2007).

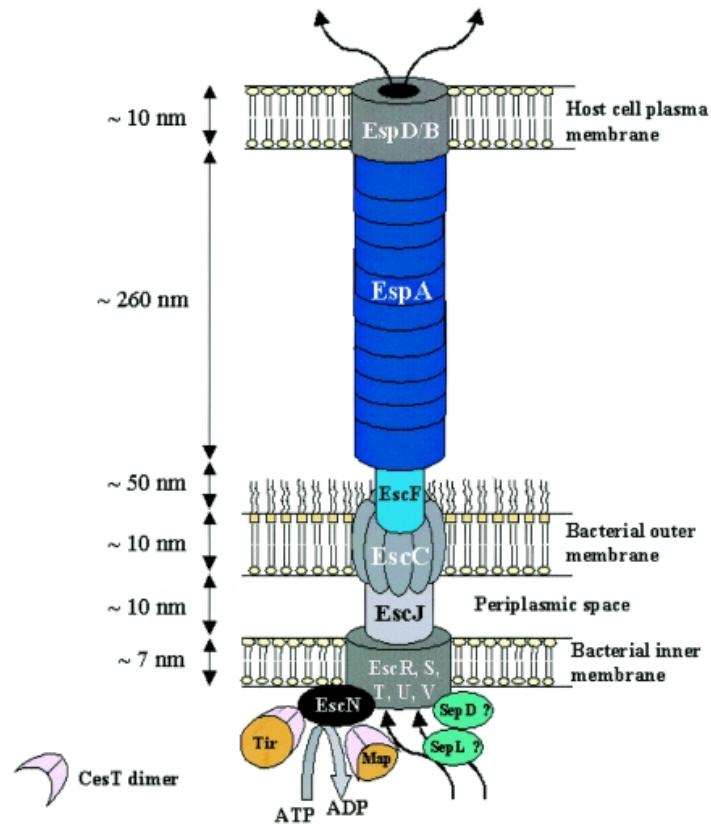
La proteína EscF forma a la proyección hacia el espacio extra celular formando la aguja de unos 25 nm. Ya a través de este conducto (complejo aguja) se transporta la proteína EspA e interactúa con EscF para polimerizarse y extender el conducto para formar el puente entre la bacteria y la célula hospedera. De esta misma manera, se translocan las proteínas EspB y EspD para llevarlas hasta la membrana de la célula hospedera y formar un poro. Con esto se termina de ensamblar todo el inyectisoma y así, tener comunicación con el interior de la célula e inyectar sus proteínas efectoras (Fig. 3). (Garmendia *et al.*, 2005 y Vidal *et al.*, 2007).

### III. CONFIGURACIONES IMAGINARIAS EN LA CARACTERIZACIÓN DEL INYECTISOMA Y LAS LESIONES A/E.

La descripción del complejo aguja o inyectisoma y las lesiones A/E con la formación de los pedestales, ya se tiene con gran claridad por los investigadores en la actualidad, pero como lo hemos señalado, en el proceso enseñanza-aprendizaje, es necesario analizar los procesos de construcción y estructuración del conocimiento y no simplemente el proceso de transmisión de conceptos y representaciones previamente elaborados por el docente. En los años 80s, se empezaron a observar, al microscopio electrónico, las lesiones A/E que caracterizaron la infección de EPEC, representadas por elevaciones de la membrana plasmática de los enterocitos infectados y que se le denominan pedestales para el asentamiento de las bacterias, destruyendo previamente las microvellosidades. Para esclarecer la patogenia de esta infección, se tuvieron que despejar una serie de interrogantes, también llamadas lagunas de conocimiento, que el último autor denomina vacíos epistemológicos. No se tenía claro qué moléculas participaban para llevar a cabo la interacción (adherencia inicial y adherencia estrecha) de la bacteria con los enterocitos. Asimismo, no se sabía qué mecanismo provocan la reacción de la célula hospedera para formar los pedestales, y tampoco se sabía qué moléculas bacterianas (toxinas) eran las responsables de alterar el comportamiento biológico de la célula hospedera.

No se trataba entonces de una simple búsqueda de estos procesos en la célula misma, como muchas veces se cree, cuando se tiene una postura ontológica y filosófica realista, que es la base de la propuesta de descubrimiento de la realidad. Estos procesos funcionales de la estructura anatómica encontrada, son procesos de abstracción teórica, que nosotros planteamos como procesos de configuración imaginaria llevados a cabo en el proceso de investigación, en donde el investigador estructura esa realidad, estructurando sus estructuras de razonamiento, tanto de razonamiento práctico como de pensamiento racional, los cuales son vinculados por medio de lo que la epistemología de la imaginación llama procesos de razonamiento simbólico-imaginativo, por medio del cual se crean las configuraciones imaginarias con los que se plantean alternativas de solución a los vacíos epistemológicos.

Toda vez que se trata de una realidad construida a partir de supuestos teórico, el paso previo de la configuración imaginaria de la realidad en su paso de lo abstracto a lo concreto, es la creación de modelos de la realidad, los cuales posteriormente se hace ostensible a través de los procesos experimentales llevados a cabo en el laboratorio. Esta construcción de modelos se puede observar en la figura 3, en la que se muestra el ensamblaje de las 5 proteínas EscR, S, T, U y V que forman el anillo de la membrana interna de EPEC, así como, la proteína EscC que forma el anillo de la membrana externa, la proteína EscJ que conecta a los anillos de ambas membranas atravesando el espacio periplásmico y la EscF que forma la prominencia extracelular del inyectisoma. Además, se esquematiza la polimerización de la proteína EscA que prolonga el inyectisoma para alcanzar la membrana de la célula huésped en donde se ubican las proteínas que forman el poro en la célula blanco, EscD y EscB, quedando completo el modelo, representando la comunicación directa entre el agente patógeno y la célula huésped para poder translocar sus proteínas efectoras.



**FIGURA 3.** Representación esquemática del inyectisoma de EPEC. Se muestra el ensamble de todas las proteínas que constituyen a este complejo proteico y que se mencionaron en el texto (tomado de Garmendia *et al.*, 2005). Al coordinarse la configuración imaginaria de la realidad posible con las acciones de la experiencia práctica, se llega a las acciones de la experiencia formal en la que, en este caso, son representadas por este modelo didáctico del inyectisoma, esto es de acuerdo en lo postulado por Rodríguez-Salazar en la Epistemología de la imaginación, 2015.

Sin ninguna duda, los investigadores deben contar con una serie de conocimientos y conceptos teóricos del tema a investigar, con los que pueden imaginarse varios escenarios como realidades posibles y después llevar a cabo acciones para su representación. Como se puede ver en la literatura, primero crearon modelos experimentales para reproducir las lesiones A/E *in situ*, como lo realizaron Monn *et al.* (1983), infectando a lechones y conejos gnotobióticos obtenidos por cesárea y sin proveerlos de calostro en los primeros días de nacidos. La infección se llevó a cabo con tres cepas patógenas de EPEC de humano y una de conejo, para después tomar muestras de asas intestinales y preparar muestras para microscopio óptico y microscopio electrónico de transmisión, mostrando adherencia bacteriana a los enterocitos, la destrucción de las microvellosidades y formación de las lesiones A/E. Después, Knutton *et al.* (1987) diseñaron el modelo experimental para la reproducción de las lesiones A/E en cultivos de biopsias de células de la mucosa intestinal de personas adultas infectándolas *in vitro*. Mediante preparaciones para su observación en el microscopio electrónico, representaron la adherencia íntima de la bacteria en células de la mucosa intestinal en cultivo, mostrando la destrucción de las microvellosidades y la formación de pedestales. En estos dos trabajos se configuró en el laboratorio la naturaleza de la infección para reproducirla *in vivo* e *in vitro*, mostrando ese proceso en los microscopios óptico y electrónico, mediante la preparación adecuada de las muestras.

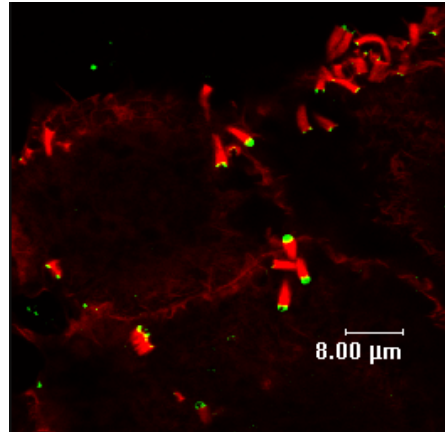
Ya contando con estos modelos experimentales, se pudieron reproducir las lesiones A/E en forma controlada a nivel de laboratorio y diseñar los experimentos apropiados para despejar la pregunta el vacío epistemológico acerca de saber qué moléculas se presentan en el interior del pedestal. En los años 80 ya se tenía claro la presencia del citoesqueleto en células eucariotas y del cual, uno de sus componentes, los filamentos de actina, participaba en la

formación de prolongaciones celulares como lamelipodios y filopodios para los movimientos celulares. La configuración imaginaria basada en los supuestos teóricos de los que partían los investigadores los hacía suponer que era posible que estos pedestales fueran ricos en actina filamentosa (Pollard and Borisy 2003). Por otro lado, la existencia de la droga faloidina que tiene afinidad a la actina filamentosa y a su vez a su conjugación con un fluorocromo como la fluoresceína o rodamina, permitió a Knutton *et al.* (1989) diseñar el experimento de aplicar faloidina fluoresceínada a los pedestales formados por la infección de EPEC en enterocitos que se prepararon para observarlos al microscopio de fluorescencia y mostrar la posible marca de filamentos de actina en los pedestales. Los supuestos teóricos de los que parte el investigador están basados en una robusta preparación en bioquímica, [en biología celular y microscopía](#).

Este modelo surge a raíz de que en las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de las lesiones A/E se notaron muchas fibras electro-densas en la parte más alta del pedestal. Con la marca fluorescente de actina se muestra que esas fibras electro-densas corresponden a filamentos de actina, que es con lo que damos soporte a la propuesta del paso de lo abstracto de los complejos procesos bioquímicos, a su observación concreta en el microscopio. No nos referimos a una realidad concreta desde el punto de vista ontológico, sino la concreción de los procesos abstractos mostrados mediante sus representaciones desarrolladas en el laboratorio. Su concreción se hace patente en que este procedimiento se utilizó como prueba diagnóstica de la infección de EPEC en humanos, evitando así la prueba de microscopía electrónica que tiene costos más altos. En un trabajo al respecto, el primer autor de este trabajo (Oliver *et al.*, 2008), al hacer estudios de la dinámica del citoesqueleto en los pedestales, marcó filamentos de actina con faloidina rodaminada e intimina con anticuerpos monoclonales unida a fluoresceína en un modelo de infección de células epiteliales de riñón de conejo infectadas con *Escherichia coli* y al preparar las muestras para observarlas al microscopio confocal se mostró claramente que los pedestales son ricos en actina y que la bacteria interactúa en la parte alta de los pedestales, como se muestra en la figura 4.

Otro vacío epistemológico, como se mencionó anteriormente, era determinar qué moléculas participaban para llevar a cabo la interacción entre EPEC y la célula infectada. En 1997 el grupo de trabajo de Knutton, con la técnica de inmuno-oro marcaron la proteína de superficie bacteriana, intimina, partiendo del supuesto de que, como proteína de superficie bacteriana, podría ser que influyera en la formación de los pedestales. Esto se fue dando con trabajos previos en donde usando el transposon, *TnphoA* mutante, Jerse *et al.* (1990) y Donnenberg *et al.* (1990), demostraron que el factor de adherencia de EPEC para producir las lesiones A/E no tenía efecto con el gen *eae* mutado. Demostraron también que la secuencia que el gen *eae* codifica a intimina era cromosómico y no plasmídico. Con los avances de biología molecular, se pueden realizar construcciones y mutaciones genéticas puntuales y demostrar lo que sucede durante el desarrollo del proceso biológico, en este caso la formación de las lesiones A/E en células infectadas por EPEC normal y EPEC mutante en el gen *eae* que codifica a intimina, una proteína de superficie bacteriana que tiene gran homología con el gen de proteína invasina de *Yersinia pseudotuberculosis* que ya se conocía.

Hasta aquí ya se había mostrado que intimina era la proteína que determinaba la relación de EPEC con la célula hospedera, que en la elevación llamada pedestal era rica en filamentos de actina y que el gen que codifica a intimina, *eae*, era cromosómico y no plasmídico, o sea, ya se tenía ubicado en el genoma bacteriano y además se habían estandarizado sistemas de infección *in vivo* e *in vitro* en células de mucosa intestinal y en líneas celulares de la infección con EPEC para el estudio de la patogenia de las lesiones A/E. Como se puede ver, se manifiestan configuraciones imaginarias de cierta realidad posible, que determinaron los diseños experimentales y los instrumentos para la representación de los fenómenos naturales.

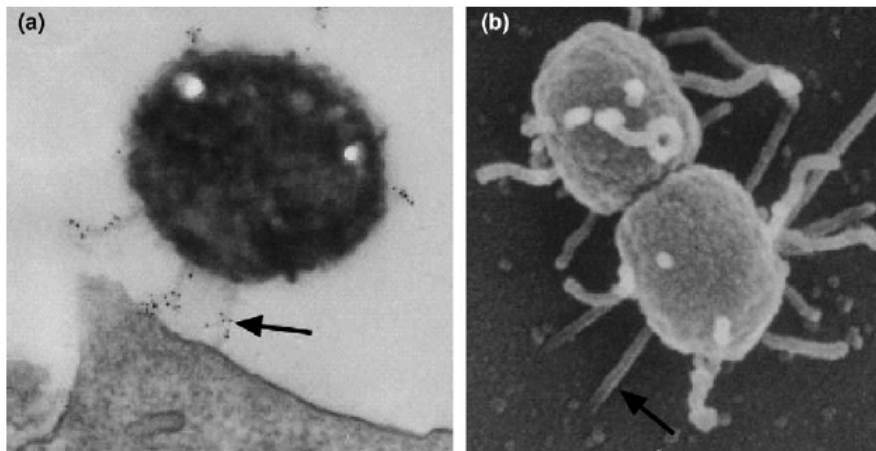


**FIGURA 4.** Representación de la relación entre la bacteria REPEC (verde) con los pedestales ricos en actina (rojo). Las muestras se procesaron para ser observadas al microscopio confocal (Oliver *et al.*, 2008). La configuración imaginaria de esta realidad posible se basó en que, con la plasticidad del citoesqueleto de actina se forman lamelipodios en células eucariotas para su movimiento, por lo que era muy probable que los pedestales fueran ricos en actina, como lo mostraron Knutton *et al.* (1989) y que después se sigue haciendo esta marca en los diferentes modelos experimentales.

Para continuar dando fundamento nuestra argumentación de la manera en que la configuración imaginaria de realidades posibles puede ayudar a llenar el vacío epistemológico, hacemos referencias a otro de los puntos señalados anteriormente acerca de que faltaba saber cómo se transferían proteínas efectoras de EPEC al interior de la célula infectada para provocar reorganización del citoesqueleto. En esos años, en otras bacterias, como *Salmonella Typhimurium* ya se había caracterizado un mecanismo multiproteico con el que transloca proteínas efectoras a la célula hospedera para su internalización, era el T3SS (Kubori *et al.*, 1998). Haciendo análisis de secuenciación de DNA de *Salmonella* y de *Escherichia coli*, se mostró que los 20 genes que codifican a las proteínas del inyectisoma eran muy conservados, por lo que diseñaron experimentos para identificar la proteína que posiblemente constituyen al inyectisoma de EPEC. Uno de estos trabajos fue el de Knutton, *et al.* (1998), quienes prepararon muestras de células infectadas con EPEC para microscopía electrónica en infecciones tempranas y avanzadas, para identificar la proteína EspA con la técnica de inmuno-oro. EspA es la proteína que inicialmente se secreta por el inyectisoma, se une en la punta de este y polimeriza para extender el complejo aguja varios nanómetros más para alcanzar la célula hospedera y formar, físicamente, un puente entre la bacteria y el enterocito y generar la lesión A/E (Knutton *et al.*, 1998; Garmendia *et al.*, 2005 y Vidal *et al.*, 2007), como se muestra en la figura 5.

Ahora haremos referencia al último vacío epistemológico que señalamos, acerca de qué receptor participaba por parte de la célula eucariota. Rosenshine *et al.* (1992), usando inhibidores de kinasas de tirosina demostró que después de la unión de EPEC con el enterocito se desencadena la fosforilación de tres proteínas de la célula hospedera y la principal proteína fosforilada era una proteína, que en esos años se creía que era de la membrana de células eucariotas, identificada como Hp90 por su peso de 90 kDa. Al evitar la fosforilación de esta proteína con inhibidores de las kinasas, no se genera la lesión A/E. Así, la configuración de este experimento se demuestra que al fosforilar Hp90 se desencadena la polimerización de actina y que sirve como receptor de intimina.

Con procesos de fraccionamiento celular y utilizando células infectadas con EPEC, se identifica que la proteína Hp90 no era una proteína de la célula eucariota. En 1997, Kenny *et al.*, con pruebas de inmunoblot para analizar las proteínas obtenidas de los fraccionamientos celulares demuestra que Hp90 es sintetizada por EPEC y la transloca al citoplasma del enterocito mediante el inyectisoma. Ya en la célula hospedera, se fosforila y se ancla a la membrana para actuar como receptor de intimina, da ahí su nombre de Tir (receptor de intimina translocado), además, al fosforilarse interactúa con proteínas promotoras de polimerización de actina provocando rearrreglos del citoesqueleto y la formación de los pedestales.



**FIGURA 5.** Con la técnica de inmuno-oro se usaron anticuerpos anti-EspA para demostrar la secreción a través del T3SS, polimerizarse a extender el inyectisoma para alcanzar la célula hospedera. El panel (a) representa una infección temprana en donde ya se aprecia el inicio de la polimerización de EspA (flecha) y en el panel (b) ya se muestra por completo el puente entre la bacteria y la célula hospedera (flecha) Tomado de Knutton *et al.*, 1998.

Esta demostración cambió por completo la caracterización de la patogenia de EPEC al generar las características lesiones A/E, ya que una proteína sintetizada por una célula procariota es ensamblada en la célula eucariota para ser su propio receptor. Actualmente se está reproduciendo artificialmente el inyectisoma como recurso para translocar moléculas al interior de células eucariotas con fines terapéuticos nanomoleculares (Ruano-Gallego *et al.*, 2015).

#### IV. REFLEXIONES EPISTEMOLÓGICAS FINALES

En la epistemología de la imaginación de Rodríguez-Salazar (2015), propuesto para el caso del origen del concepto de electromagnetismo, se hace referencia a tres conjuntos de acciones que se coordinan entre sí para la configuración imaginaria de realidades posibles. La propuesta de estos tres conjuntos de estructuras es traída al caso de la biología celular descrito anteriormente, los cuales sirven de fundamento de la propuesta de la configuración imaginaria de realidades posibles. El primero son las acciones simbólico-imaginativas que se generan en el pensamiento del investigador con base en los conocimientos del citoesqueleto y en especial el citoesqueleto de actina, así como los fundamentos de la inmunofluorescencia que permite dar color a las proteínas de interés en la célula con el uso de anticuerpos conjugados con fluorocromos, así como la creación y uso del microscopía de fluorescencia, con el que se exponen las muestras preparadas a rayos ultravioleta que al excitar a los fluorocromos emiten una luz intensa.

Para esto, se debe tener claridad en los mecanismos moleculares de actina, la naturaleza y función de los anticuerpos, la posibilidad de conjugación con fluorocromos y el funcionamiento del microscopio de fluorescencia o en su caso el microscopio confocal. Estas acciones simbólico-imaginarias se coordinan con las acciones materiales representadas por la experiencia práctica desarrollada en el laboratorio. La inmunofluorescencia se da al preparar las células para aplicar los anticuerpos fluoresceinados, o como se hizo en el trabajo referido anteriormente (Oliver *et al.*, 2008), se usó la droga faloidina conjugada con fluorocromos como la rodamina. Finalmente, con las operaciones mentales identificadas como experiencia formal, con los resultados obtenidos mostrados en las imágenes, se construyen los conceptos y se elaboran los reportes para validarlos ante la comunidad científica. Es entonces cuando la experiencia formal, reflejada en el conocimiento reportado, es aceptada socialmente, iniciando con la comunidad científica y

después por el resto de la comunidad académica, con lo que se logra el paso de los resultados de investigación, aplicados a la docencia.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con apoyo de los siguientes proyectos de investigación: SIP 20170385 (IPN), DGAPA-PAPIIT IN402515 (UNAM), DGAPA-PAPIME PE205717 (UNAM) y PIAPI 1602 (FESC-UNAM). Adicionalmente los autores desean agradecer a las siguientes personas; MVZ Ma. Reyes Pichardo Molinero, M. en C. Francisco Rodolfo González Díaz y MVZ José Luis Nieto Bordes por su apoyo en la implementación de las prácticas de laboratorio que son la base de este trabajo.

## REFERENCIAS

- Celli, J., Wanyin Deng, W. and B. Finlay, B. (2000). Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) attachment to epithelial cells: exploiting the host cell cytoskeleton from the outside. *Cell. Microbiol. Microreview.* 2(1): 1-9.
- Chen, H.E. and Frankel, G. (2005). Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiology Reviews* 29: 83–98.
- Daniell, S. J., Kocsis, E., Morris, E., Knutton, S., Booy, F. P., and Frankel, G. (2003) 3D structure of EspA filaments from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 49: 301–308.
- Donnenberg, M. S., S. B. Calderwood, A. Donohue-Rolfe, G. T. Keusch, and J. B. Kaper. (1990). Construction and analysis of TnphoA mutants of enteropathogenic *Escherichia coli* unable to invade HEp-2 cells. *Infect. Immun.* 58:1565–1571.
- Galán, J. E., Lara-Tejero, M., Marlovits, T. C., and Wagner, S. (2014) Bacterial type III secretion systems: specialized nanomachines for protein delivery into target cells. *Annu. Rev. Microbiol.* 68: 415–438.
- Garmendia, J., Frankel, G. and Crepin, V. F. (2005). Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections: Translocation, Translocation, Translocation. *Infect. Immun.* 2573–2585.
- Jerse, A. E., Yu, J., Tall, B. D. and Kaper, J. B. (1990). A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 7839–7843.
- Kenny, B., DeVinney, R., Stein, M., Reinscheid, D.J., Frey, E.A., and Finlay, B.B. (1997). Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* 91: 511–520.
- Kubori T, et al. (1998) Supramolecular structure of the *Salmonella* Typhimurium type III protein secretion system. *Science* 280: 602–665.
- Knutton, S., Baldwin, T., Williams, P.H., and McNeish, A.S. (1989). Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 57: 1290–1298.
- Knutton, S., I. Rosenshine, M. J. Pallen, I. Nisan, B. C. Neves, C. Bain, C. Wolff, G. Dougan, and G. Frankel. (1998). A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. *EMBO J.* 17: 2166–2176.
- Knutton, S., Adu-Bobie, J., Bain, C., Phillips, A. D., Dougan, G. and Frankel, G. (1997). Down regulation of intimin expression during attaching and effacing enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion. *Infect. Immun.* 65: 1644–1652.

- Knutton, S., D. R. Lloyd, and A. S. McNeish. (1987). Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. *Infect. Immun.* 55: 69-77.
- Moon, H. W., Whipp, S.C., Argenzio, R. A., Levine, M. M. and Giannella, R. A. (1983). Attaching and Effacing Activities of Rabbit and Human Enteropathogenic *Escherichia coli* in Pig and Rabbit Intestines. *Infect. Immun.* 41: 1340-1351.
- Nataro, J.P., and Kaper, J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol Rev* 11: 142–201.
- Notti, R.Q. and Stebbins C.E. (2016). The Structure and function of type III secretion systems. *Microbiol Spectr*; 4(1): . doi:10.1128/microbiolspec.VMBF-0004-2015.
- Oliver, G.M.R., García T.C.G., Juárez M.L, and Navarro, G.F. (2008). Infection of rabbit kidney cells (RK13) by enteropathogenic *Escherichia coli* as a model to study the dynamics of actin cytoskeleton. *Can. J. Microbiol.* 54: 748-757.
- Pollard, T. and G. Borisy. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell.* 112: 453–465.
- Rodríguez-Salazar, L.M. (2015) Epistemología de la Imaginación: el trabajo experimental de Ørsted. Ed. Corinter. México. Capítulos 2 y 3.
- Rodríguez-Salazar, L.M. (2015). Epistemología de la Imaginación: el trabajo experimental de Ørsted. Ed. Corinter. México. Capítulo 5.
- Rosenshine, I., Michael S. Donnenberg, M.S., Kaper, J.B. and Finlay, B.B. (1992). Signal transduction between enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and epithelial cells: EPEC induces tyrosine phosphorylation of host cell proteins to initiate cytoskeletal rearrangement and bacterial uptake. *The EMBO J.* 11(10): 3551 -3560.
- Ruano-Gallego, D., Álvarez, B., and Fernández, L. Á. (2015). Engineering the controlled assembly of filamentous injectisomes in *E. coli* K-12 for protein translocation into mammalian cells. *ACS Synth. Biol.* 4: 1030–1041.
- Sekiya, K., Ohishi, M., Ogino, T., Tamano, K., Sasakawa, C., and Abe, A. (2001). Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 11638–11643.
- Vidal, J. E., Canizález-Román, A., Gutiérrez-Jiménez, J. y Navarro-García, F. (2007). Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *Salud Pública de México.* 49(5): 376-386