



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO**  
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS  
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA

“NIVELES DE FOSFORILACIÓN EN TIROSINA EN  
ERITROCITOS DE RATÓN BALB/c DURANTE UN  
PROCESO INFECCIOSO PROVOCADO POR *Yersinia*  
*pseudotuberculosis*”

# T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

P R E S E N T A:

**OLGA LILIA GARIBAY CERDENARES**

DIRECTOR DE TESIS: Dr. DONACIANO FLORES ROBLES

CHILPANCINGO, GUERRERO, AGOSTO DEL 2008

**Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología celular de la Unidad de Investigación Especializada en Microbiología de la Universidad Autónoma de Guerrero.**

**Bajo la dirección del  
Dr. Donaciano Flores Robles**

**La codirección de la  
Dra. Patricia Talamás Rohana**

**La asesoría de  
Dra. Mónica Espinoza Rojo  
Dra. Natividad Castro Alarcón  
Dr. Alejandro Millán Vega**

**Y la colaboración de la  
Dra. Bibiana Chávez Munguía**

Esta investigación se desarrolló con financiamiento institucional.

Durante el periodo en el que cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas, la C. Olga Lilia Garibay Cerdanars recibió beca del CONACYT 210645

## ABREVIATURAS

<b>AP</b>	Fosfatasa alcalina
<b>CBIP</b>	4-cloro-5-bromoindolilfosfato
<b>EDTA</b>	Ácido etilen-diamino-tetra-acético
<b>ET</b>	Extracto total
<b>FM</b>	Fracción membranal
<b>IA</b>	Iodoacetamida
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub></b>	Ortovanadato de sodio
<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio
<b>NBT</b>	Azul de nitrotetrazolium
<b>NEM</b>	n-etil-maleimida
<b>p125FAK</b>	Cinasa de adhesión focal
<b>p130Cas</b>	Sustrato asociado a Crk
<b>p60Src</b>	Tirosin cinasa no receptora de 60 kDa
<b>PBS</b>	Amortiguador de fosfato salino
<b>PM</b>	Peso molecular
<b>PMSF</b>	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
<b>PSA</b>	Persulfato de amonio
<b>PY</b>	Fosfotirosina
<b>Pyk2</b>	Tirosin cinasa 2 rica en prolina
<b>Rac1</b>	Rho GTPasa de la Superfamilia Ras
<b>SDS</b>	Duodecilsulfato de sodio
<b>SN</b>	Sobrenadante
<b>SSTT</b>	Sistema de secreción tipo III
<b>TBS-T</b>	Amortiguador tris-salino-Tween20
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-tetrametildiamina
<b>TLCK</b>	n-Tosil-lisin-clometilcetona
<b>WB</b>	Western blot
<b>Yop</b>	Proteína externa de <i>Yersinia</i>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b>	Detección de p125FAK en el eritrocito.	14
<b>FIGURA 2</b>	Inmunodetección en fase sólida de fosfoproteínas basales y de la cinasa p125FAK en eritrocitos.	15
<b>FIGURA 3</b>	Inmunodetección en fase sólida de fosfoproteínas en eritrocitos infectados con <i>Y. pseudotuberculosis</i> .	17
<b>FIGURA 4</b>	Fosforilación diferencial de p125FAK durante el proceso infeccioso inducido por <i>Y. pseudotuberculosis</i> .	18
<b>FIGURA 5</b>	Microscopía electrónica de eritrocitos de ratón BALB/c Infectados con <i>Y. pseudotuberculosis</i> .	19
<b>FIGURA 6</b>	Perfil proteico de los cursos temporales de infección en eritrocitos de ratones BALB/c inoculados con <i>Y. pseudotuberculosis</i> .	20
<b>FIGURA 7</b>	Modelo de interacción <i>Y. pseudotuberculosis</i> -eritrocito.	26

## AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Donaciano Flores Robles**, que ha me ha demostrado que la generación de ciencia surge no sólo de grandes y equipados laboratorios. Basta un cerebro con cierta clase de locura que en un principio sueña, después imagina, diseña, crea y así, descubre. Gracias por su confianza y amistad, pero sobre todo por otorgarme el beneficio de la duda. Contará conmigo siempre.

A la **Dra. Patricia Talamás Rohana**, por la oportunidad de conocerla y de recibir valiosos aportes y sugerencias que indudablemente han enriquecido este trabajo.

A mis asesores, **Dr. Alejandro Millán Vega**, **Dra. Natividad Castro Alarcón** y **Dra. Mónica Espinoza Rojo**, por el interés, el tiempo y las valiosas aportaciones a este proyecto.

A la **Dra. Bibiana Chávez Munguía** del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, CINVESTAV-IPN, por la oportunidad de conocerla y su valiosa colaboración en la realización de la Microscopía Electrónica presentada en este trabajo.

Al **Dr. José Carlos Rosales Ortega** del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, por el anticuerpo  $\alpha$ -PY (AFT8) donado para la realización de este trabajo.

Un especial agradecimiento al **Dr. Javier Antúnez Solís** y al **Dr. Alfonso Bernabé Carreño**, por los años de amistad incondicional, por la confianza y la fe que han tenido en mi persona, por los ánimos y por el impulso que jamás han dejado de mostrarme. Porque ustedes son los culpables de esta hermosa locura que hoy es una realidad. Cuentan conmigo incondicionalmente.

A las mujeres investigadoras de esta Facultad, que sin decir nombres saben que las admiro. Por que mis primeros anhelos se vieron reflejados en la realidad que viven y me han demostrado que cuando se tiene un sueño, ser madre o esposa no es una dificultad, es un estímulo. Gracias por su apoyo y ejemplo.

## DEDICATORIAS

A ese Ser Supremo que la ciencia persiste en superar, pero que día a día nos maravilla con la enorme complejidad en la más diminuta forma de vida.

*A Jorge*

Un ser extraordinario que Dios ha puesto en mi camino, con el que he formado una pareja maravillosa basada en el amor, la confianza y el respeto. Te agradezco que siempre me impulsas a seguir mis sueños (aunque debo reconocer que en ocasiones, me has tenido que empujar) y has estado ahí para apoyarme, escucharme y consolarme. Nunca permites que mis pies se despeguen del suelo. Te amo profundamente y te agradezco que me permitas estar a tu lado.

*A Gil y Vale*

A dos niños maravillosos que Dios ha puesto en mi camino, de los que he recibido amor, apoyo, paciencia y que entienden que su mami lucha y se esfuerza por alcanzar sus propios sueños.

*A mis padres*

A los cuales debo casi nada.....la vida misma. De los que he recibido la mejor herencia que un padre es capaz de dar .....el ejemplo.

*A mis hermanos*

Que están ahí siempre que los necesito, a los cuales no hace falta decir que los amo, porque lo saben.

*A San, Estre, y Abi*

Que han llegado para quedarse, a ustedes quiero demostrarles que mis sueños no pueden ser más grandes que los suyos.

*A Juane*

El cual dejó de ser un sobrino más, para convertirse en mi mejor amigo.

A mis compañeros de maestría: Yuli, Dino, Blanquis, Irma, Clau, Anita, Pao, Diana, Pedro, Rubén, Juan Pablo, Toño y Beto, a quienes respeto y admiro por lo que son y por el esfuerzo y empeño que ponen en lo que quieren ser. A todos los quiero mucho y los tengo siempre en mi mente.

“NIVELES DE FOSFORILACIÓN EN TIROSINA EN  
ERITROCITOS DE RATÓN BALB/c DURANTE UN  
PROCESO INFECCIOSO PROVOCADO POR  
*Yersinia pseudotuberculosis*”

# CONTENIDO

	PÁGINA
II. RESUMEN	4
III. ABSTRACT	5
IV. INTRODUCCIÓN	6
V. MATERIAL Y MÉTODOS	9
VI. RESULTADOS	13
VII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	21
VIII. REFERENCIAS	27

## II. RESUMEN

*Yersinia pseudotuberculosis* puede penetrar células del epitelio intestinal e invadir ganglios linfáticos mesentéricos, hígado y bazo a través de la interacción invasina-integrina  $\beta 1$ . En ensayos experimentales *in vitro* en diferentes líneas celulares, se ha demostrado la inducción de eventos de señalización por fosforilación en tirosina, involucrados en el proceso de captación bacteriana. En nuestro grupo de trabajo se demostró la presencia de una proteína integrina  $\beta 1$  en la membrana del eritrocito, que se sugiere participa en la interacción con el patógeno. Sin embargo, no habían sido descritos mecanismos que implicaran la inducción de transducción de señales, que incluyeran un aumento en los niveles de fosforilación en tirosina de la cinasa p125FAK, como resultado de la interacción *Yersinia*-eritrocito. Empleando ensayos de inmunoprecipitación e inmunodetección en fase sólida en eritrocitos sin tratamiento, demostramos por vez primera el patrón de niveles basales de fosforilación en tirosina, encontrando una proteína de aproximadamente 119 kDa inmunológicamente identificada como la cinasa p125FAK, fosforilada en su estado basal. Al realizar cursos temporales de infección *in vivo*, demostramos que las proteínas constitutivas del eritrocito infectado varían en cuanto a su patrón de expresión durante el proceso infeccioso, corroborando los resultados obtenidos por microscopía electrónica en los cuales se muestra una lisis gradual. Finalmente, se detecta un incremento en los niveles de fosforilación en tirosina en eritrocitos infectados, destacando la fosforilación diferencial de p125FAK. En conclusión, demostramos que la interacción *Y. pseudotuberculosis* con el eritrocito, a través del receptor integrina, provoca una señalización que involucra un incremento en los niveles de fosforilación en tirosina de p125FAK, una cinasa determinante en el proceso de captación bacteriana.

Palabras clave: *Yersinia pseudotuberculosis*, fosforilación en tirosina, p125FAK, interacción invasina-integrina  $\beta 1$ .

### III. ABSTRACT

*Yersinia pseudotuberculosis* can penetrate cells in the intestinal epithelium and invades mesenteric lymph nodes, liver and spleen through invasin- $\beta$ 1 integrin interaction. It has been shown *in vitro* experimental assays with different cell lines, that signaling events mediated by tyrosine phosphorylation are involved in the process of bacterial uptake. We have previously shown the presence of a  $\beta$ 1 integrin molecule in the membrane of erythrocytes, which participates in the interaction with the pathogen. However, there was no experimental evidence to support the induction of signal transduction through an increase in levels of tyrosine phosphorylation in p125FAK, as a result of the interaction *Yersinia*-erythrocytes. By immunoprecipitation and immunodetection assays we demonstrated for the first time in non-stimulated erythrocytes, the presence of basal levels of tyrosine phosphorylation of a protein of approximately 119 kDa, immunological identified as p125FAK kinase. In temporary courses of infection *in vivo*, we demonstrated that the protein profile of infected erythrocytes varies during the infectious process, corroborating the results obtained by electron microscopy in which a gradual lysis of red cell was observed. Finally, it was possible to detect an increase in tyrosine phosphorylation levels in infected erythrocyte, within which highlights the differential phosphorylation of p125FAK. In conclusion, we demonstrated that the interaction *Y. pseudotuberculosis*-erythrocytes, through the integrin receptor, is a signal transduction process during which increased levels of tyrosine phosphorylation in p125FAK were detected, a kinase determinant in the process of bacterial uptake.

Keywords: *Yersinia pseudotuberculosis*, tyrosine phosphorylation, p125FAK,  $\beta$ 1 integrin-invasin interactions.

## IV. INTRODUCCIÓN

*Yersinia pseudotuberculosis*, una bacteria Gram negativa considerada como un patógeno intracelular facultativo, está ampliamente distribuida en la naturaleza y es responsable de síndromes gastrointestinales en diversas especies <sup>1</sup>. La infección en humanos se debe comúnmente a la ingestión de alimentos o aguas contaminadas con excretas de organismos infectados <sup>2</sup>. La bacteria es capaz de penetrar el epitelio gastrointestinal, donde se localiza extracelularmente, a través de la unión, invasión y transvasación de células M especializadas <sup>3</sup>. Al penetrar el epitelio gastrointestinal, migra hacia las placas de Peyer, las cuales delimitan a los nódulos linfáticos del intestino, para posteriormente invadir bazo e hígado <sup>4,5</sup>. Este microorganismo se ha asociado con la generación de complicaciones relacionadas con la post-infección produciendo artritis reactiva <sup>6</sup> o eritema nodosum, sugiriendo incluso que es uno de los agentes causales del síndrome de Kawasaki <sup>7</sup>, una vasculitis aguda autolimitante que afecta predominantemente a los niños y adolescentes.

*Y. pseudotuberculosis* posee genes que codifican para factores de virulencia entre los que incluyen factores que promueven la expresión del sistema de secreción de tipo III (TTSS) <sup>8-10</sup>. Bajo ciertas condiciones restrictivas, dirige la síntesis de un complejo de aproximadamente 12 proteínas, de las cuales cinco poseen actividad catalítica, YopH, YopP, YopE, YopO/YpkA, y YopT <sup>9</sup>. Cumplen funciones importantes en la prevención de la fagocitosis de la bacteria por macrófagos, neutrófilos y/o células epiteliales <sup>10-13</sup>. Además, posee ciertas adhesinas como la proteína YadA, Ail, el antígeno pH 6 y finalmente la invasina <sup>14</sup>. YadA forma parte del regulón Yop, es multifuncional y se considera una de las adhesinas más importantes, ya que promueve la unión a las células epiteliales y fagocitos profesionales <sup>15</sup>. YadA interactúa inespecíficamente con integrinas de tipo  $\beta 1$ , estableciendo puentes de interacción con componentes de la matriz extracelular como: laminina, colágena y fibronectina <sup>16</sup>. La invasina, una proteína de membrana externa codificada en el cromosoma bacteriano, es la principal adhesina involucrada en la adhesión e internalización de la bacteria a las células eucarióticas vía interacción específica con la porción  $\beta 1$  de las integrinas <sup>17,18</sup>.

La sobrevivencia de *Y. pseudotuberculosis* depende de la eficiencia de la interacción invasina-integrina  $\beta 1$ , lo cual garantiza el contacto célula-célula, la internalización y la replicación en sus células hospederas <sup>19</sup>. Al unirse a la integrina se promueve la activación de señales citoplasmáticas específicas activando vías de señalización dentro de la célula generando la fosforilación de proteínas específicas y la reorganización del citoesqueleto de actina hasta formar pseudópodos que envuelven a la bacteria para favorecer su internalización <sup>20</sup>. En el modelo de interacción *Y. pseudotuberculosis*-célula hospedera, se han realizado ensayos experimentales infectando diferentes líneas celulares como células HeLa, fibroblastos, macrófagos, neutrófilos e incluso plaquetas, evidenciado *in vitro*, la inducción de eventos de transducción de señales por fosforilación en tirosina, generando una variedad de señales intracelulares, como la activación de tirosina cinasas, la activación de cascadas que involucran a las MAP cinasas y la fosforilación de proteínas asociadas al citoesqueleto como la familia Rho de GTPasas pequeñas<sup>21,22</sup>. Una de las proteínas involucradas en la internalización de *Y. pseudotuberculosis* es Rac1, ya que determina el destino final de la bacteria dirigiendo la formación de los lamelipodios membranales, involucrados en la formación de la copa fagocítica <sup>23</sup>. Existe controversia con respecto al papel de la activación de diversas proteínas que incluyen a p125FAK (cinasa de adhesión focal), p60Src y p130Cas, las cuales están implicadas en la dinámica del citoesqueleto. Sin embargo, no se sabe si estas proteínas dirigen la formación de la copa fagocítica o si modulan la entrada general de la bacteria. En el caso de p125FAK, ésta puede dirigir la unión de proteínas al dominio citoplasmático del receptor integrina, su ausencia conduce a la rigidez del citoesqueleto que puede prevenir el reclutamiento de factores importantes que promueven la internalización<sup>24</sup>. De manera que p125FAK podría ser parte de un complejo multimérico que relacione la activación de Rac1 hacia integrinas después de la interacción con la invasina.

Feodorova y Devdariani <sup>25</sup> demostraron que *Y. pestis* es capaz de invadir eritrocitos para obtener los nutrientes necesarios que le permitan su persistencia y una replicación activa, lo que nos podría sugerir la interacción con receptores específicos con la consiguiente transducción de señales que permita su permanencia en el hospedero. Investigaciones recientes desarrollados en este

grupo de trabajo han demostrado que una de las células que sufre alteraciones durante el desarrollo de la enfermedad provocada por *Yersinia pseudotuberculosis* es el eritrocito, en el cual se evidenció la presencia de un receptor integrina  $\beta 1$  que permite la interacción con dicha bacteria <sup>26</sup>. Durante la interacción *Yersinia*-eritrocito se pueden estar disparando eventos de señalización por fosforilación en tirosina de forma similar a lo que ocurre en otros tipos celulares cuando interaccionan con fibronectina. Sin embargo, no existe evidencia experimental que sustente un aumento en los niveles de fosforilación en tirosina que activen a proteínas como p125FAK. Por lo que el objetivo de este trabajo fue establecer los niveles de fosforilación basal y de p125FAK en el eritrocito, además de evaluar los cambios provocados durante el proceso infeccioso. Al definir si en este tipo celular se desencadena una cascada de señalización por fosforilación en tirosina en la que esté involucrada la proteína p125FAK, podremos establecer los primeros mecanismos moleculares de respuesta que se desencadenan en el citoesqueleto del eritrocito a consecuencia de la interacción con *Y. pseudotuberculosis*.

## V. MATERIAL Y MÉTODOS

### **Anticuerpos**

Los anticuerpos utilizados: anti p125FAK (mAb, 2A7; Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). Anti-PY20 (Zymed laboratories, invitrogen immunodetection, Eccles Avenue, South San Francisco), anti-PY (mAb, AFT8, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México), anti-IgG acoplado a fosfatasa alcalina (Santa Cruz, Biotech.) y anti Integrina- $\beta$ 1 (Santa Cruz, Biotech.).

### **Cepa bacteriana**

Se utilizó la cepa NCTC 8315 de *Yersinia pseudotuberculosis*, cuya virulencia fue obtenida por pases en ratón BALB/c.

### **Cultivo bacteriano**

Para el cultivo de *Yersinia pseudotuberculosis*. Se tomaron 50  $\mu$ l y se inocularon en un matraz con 50 ml de de Caldo soya tripticasa (CST) incubándose por 24 h a 35 °C en agitación constante, hasta alcanzar una densidad óptica de 0.7 a una absorbancia de 600 nm. Esta densidad corresponde a un inóculo de 100,000 UFC/ml. Posteriormente se tomó 1 ml del cultivo y se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min, para obtener el paquete bacteriano.

### **Modelo experimental**

Se emplearon 30 ratones machos de la cepa BALB/c de 20-25 g de peso, clínicamente sanos y fueron manipulados de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana para el manejo de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999)<sup>27</sup>, además de la Norma Oficial Mexicana para la protección ambiental, salud ambiental, residuos peligrosos biológicos-infecciosos (NOM-087-ECOL-SSA1-2002)<sup>28</sup>.

### **Vía de inoculación y sangrado de ratones.**

Los ratones fueron clasificados en tres grupos: Control sano (6), controles de inoculación (12) y problema (12). Para el grupo de ratones problema, se infectaron con *Yersinia pseudotuberculosis* por vía intraperitoneal con 100,000 UFC/ml contenidos en un volumen de 100  $\mu$ l de PBS estéril. Se permitió el desarrollo de la enfermedad durante 48 h en intervalos de una hora, se obtuvo sangre de la cola de los ratones, mediante un corte con una hoja de bisturí estéril, recolectándose

40 µl de sangre manteniéndola en un tubo estéril con 60 µl citrato de sodio al 5 %, como anticoagulante.

### **Purificación de eritrocitos**

Los eritrocitos se purificaron mediante el método de Ficoll-Histopaque<sup>29</sup>. El procedimiento se realizó de la siguiente forma: De la sangre obtenida se realizó una dilución 1:2 con PBS 1X. En el fondo de un tubo se depositaron 200 µl de Ficoll-Histopaque 1077, posteriormente 200 µl de sangre diluida en PBS. La muestra se centrifugó a 2600 rpm durante 10 min a temperatura ambiente (TA), al término de la centrifugación, el sobrenadante se decantó y el paquete celular se lavó 2 veces con PBS 1X a 1400 rpm durante 10 min, se eliminó el sobrenadante (SN).

### **Lisis de eritrocitos y obtención del extracto celular total y fracción membranal**

Obtención del extracto total: los eritrocitos previamente purificados se lisaron por 20 min en amortiguador de lisis (Tritón x-100 al 2%, Tris-HCl (pH 7.4) 100 mM, NaCl 150 mM, PMSF 1 mM, NaVO<sub>3</sub> 10 mM y TLCK 1 mM, NEM 1 mM e IA 1 mM). Posteriormente se sometió a agitación 5 veces durante 1 min con reposo de 3 min en hielo<sup>30</sup>.

Obtención de la fracción membranal (fantasmas de eritrocitos): a los eritrocitos purificados se les colocó una solución hemolizante (PBS 5 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM y PMSF 0.1 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 0.1 mM), centrifugándose por 1 min a 3000 rpm, se retiró el SN y se colocó una solución de lavado (NaCl 10 mM y PMSF 0.1 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 0.1 mM), para centrifugarse por 1 min a 3000 rpm, finalmente se desecha el SN<sup>31</sup>.

Al final del proceso, se cuantificó la concentración de la proteína total de cada una de las fracciones por el método de Bradford<sup>32</sup>.

### **Microscopía electrónica**

A partir de 80 µl de sangre contenida en 120 µl de citrato de sodio al 5% (anticoagulante) de ratones inoculados a diferentes horas con *Y. pseudotuberculosis*, se purificaron los eritrocitos por el método de Ficoll-histopaque 1077, posteriormente se les añadió un amortiguador de cacodilato al 0.1 M en paraformaldehído al 2% + glutaraldehído al 2.5%. Se fijó la muestra por 1-2 h a TA. Se lavaron tres veces con la solución de cacodilato por 5 minutos. La

post-fijación de la muestra se realizó por 1 h en Tetraóxido de osmio al 1% conteniendo cacodilato 0.1 M. Posteriormente, se lavó con cacodilato 0.1 M por 5 min. Posteriormente se sometieron a diferentes concentraciones de alcohol (etanol al 50% por 10 min, etanol al 70% por 10 min, etanol al 80% por 10 min, etanol al 95% con dos cambios por 10 min y etanol al 100% por 10 min). Enseguida, la muestra se coloca en óxido de propileno/resina (1:1), mínimo por 1 h, óxido de propileno/resina (1:2) por 1 h o durante toda la noche. Finalmente en resina al 100% con 2 cambios de 2-6 h, para su posterior procesamiento por microscopía electrónica.

### **Inmunoprecipitación**

La inmunoprecipitación se llevó a cabo empleando 1 mg de proteína total, la muestra fue agitada en vórtex 6 veces durante 1 min, manteniendo la muestra en hielo. El lisado se preacloró usando 30  $\mu$ l de proteína-G-agarosa, y se incubó a 4  $^{\circ}$ C durante 2 h en agitación, de manera simultánea se procesa proteína-G-agarosa mezclada con 50  $\mu$ l de albúmina al 2%. Posteriormente se dejó precipitar la proteína-G-agarosa y el sobrenadante fue colocado en otro tubo Eppendorf. Al lisado se le agregó el anticuerpo: anti-FAK (2  $\mu$ g/ml), anti-PTY (2  $\mu$ g/ml), se incubó toda la noche a 4  $^{\circ}$ C en agitación leve en el vórtex. Posteriormente, se agregaron 100  $\mu$ l de proteína-G-agarosa previamente bloqueada con albúmina al 2% y se incubó durante 2 h a 4  $^{\circ}$ C. Al finalizar se dejó precipitar la proteína G agarosa durante 15 min en hielo. El sobrenadante se desechó y la proteína G agarosa se procedió a lavar agregando al precipitado 1 ml de amortiguador de lavado (Tris 10 mM, pH 7.4, NaCl 10 mM, EDTA 10 mM y Nonidet P-40 al 1%), previamente enfriado, agitando durante 1 min, dejando precipitar las perlas de proteína G agarosa por 30 min manteniendo el tubo en hielo para retirar cuidadosamente el sobrenadante, teniendo precaución de no absorber las perlas de proteína-G-agarosa. Este procedimiento se repitió 5 veces. En el último lavado se eliminó el amortiguador de lavado. Al inmunoprecipitado se le adicionaron 20  $\mu$ l de amortiguador de muestra 2x, se hirvió durante 5 min y al finalizar se centrifugó 2 min a 12, 000 rpm. Finalmente, los 20  $\mu$ l del sobrenadante se pudieron someter a SDS-PAGE <sup>30</sup>.

### **Corrimiento electroforético**

Las muestras obtenidas tanto del extracto total, la fracción membranal, así como de la inmunoprecipitación, se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE), cargando 30 µg de proteína. El corrimiento inició aplicando 80 V durante 20 min aumentando posteriormente a 180 V durante 40 min aproximadamente. El corrimiento electroforético se realizó por duplicado y uno de los geles se transfirió a membranas de nitrocelulosa para la posterior Inmunodetección en fase sólida, mientras que el otro fue teñido con azul de Coomassie<sup>33,34</sup>.

### **Inmunodetección en fase sólida**

Las proteínas del extracto total, fracción membranal o del inmunoprecipitado se transfirieron a papel de nitrocelulosa (NTC), el cual se bloqueó con PBS-leche al 5% 1 h a TA y se lavaron 5 veces con PBS 1x durante 10 min por lavado. Posteriormente, el papel de nitrocelulosa se incubó toda la noche a 4<sup>0</sup>C con los anticuerpos primarios: α-FAK (2A7) (5 µg/ml), α-PY (PY20), (1 µg/ml) y α-integrina β<sub>1</sub> (1 µg/ml); diluidos en PBS-leche al 2%; posteriormente se lavó el papel de nitrocelulosa 6 veces con PBS 10 min por lavado. Enseguida, se incubó el papel de nitrocelulosa con un anticuerpo secundario acoplado a fosfatasa alcalina en PBS-leche al 2% durante 2 h a TA. Finalmente, el papel de nitrocelulosa se lavó exhaustivamente con PBS 1X durante 10 min por lavado, el papel de nitrocelulosa se reveló con 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato a una concentración de 50 mg/ml en dimetilformamida y azul de nitrotetrazolium a una concentración de 50 mg/ml en 70% de dimetilformamida para fosfatasa alcalina.<sup>33,34</sup>

### **Análisis densitométrico**

Las bandas reveladas por Inmunodetección en fase sólida se sometieron a un análisis densitométrico utilizando el software Sigma-plot. Para ello se realizó el análisis de cada una de las bandas presentes en los diferentes tiempos de infección, comparándose con respecto al control<sup>35</sup>.

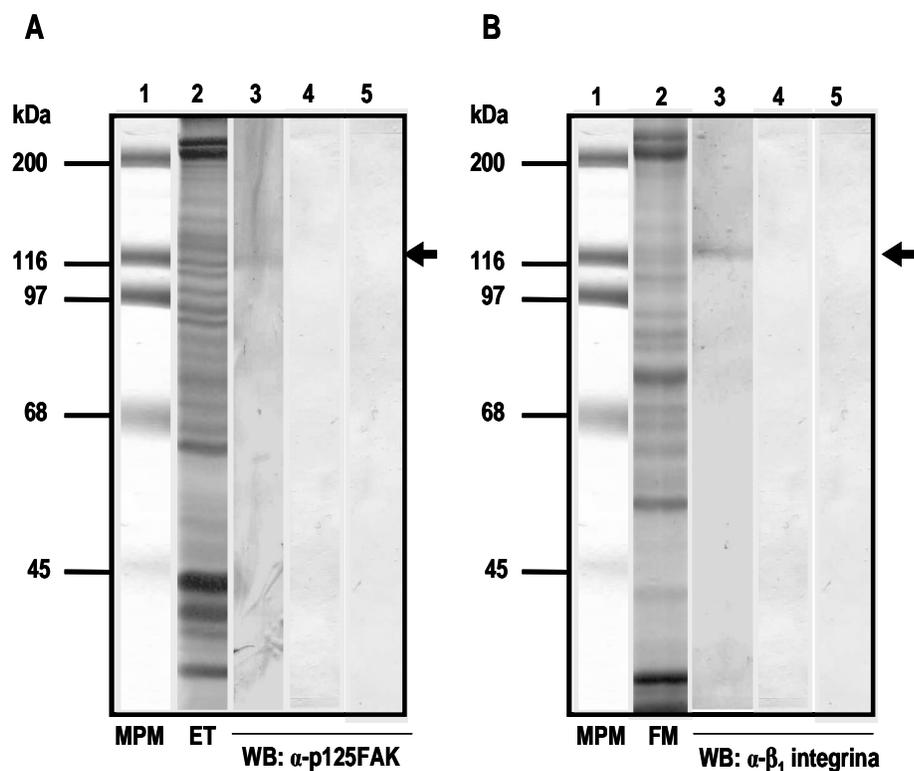
Los resultados se graficaron considerando unidades arbitrarias de intensidad neta contra tiempo de infección (h) y todo fue reportado en porcentajes (%).

## VI. RESULTADOS

### Detección de p125FAK en eritrocitos de ratón BALB/c.

El eritrocito es considerado una célula que sólo realiza el transporte de oxígeno, sin embargo, existen evidencias que demuestran que aún carente de organelos, responde a las modificaciones del ambiente que lo rodea, activando cascadas de señalización que pueden generar un efecto sobre su integridad morfológica, mecánica y su plasticidad celular. El análisis del estado basal al interior del eritrocito, cuando éste no es estimulado, se realizó obteniendo perfiles proteicos del extracto total (ET, figura 1A, carril 2) y de la fracción membranal (FM, figura 1B, carril 2) de eritrocitos, con el fin de determinar la integridad de las diferentes proteínas, para su posterior uso en los ensayos de inmunodetección en fase sólida, para el control negativo fueron empleados extractos totales de *Yersinia pseudotuberculosis* (Figuras 1A y 1B, carriles 5).

En diversas líneas celulares se ha demostrado que la estimulación de los receptores integrina induce el reclutamiento de múltiples proteínas asociadas al citoesqueleto, como p125FAK, dando lugar a la organización del citoesqueleto de actina. En el eritrocito se ha demostrado la presencia de una molécula con similitud antigénica al receptor integrina  $\beta 1$ , la cual interactúa con *Y. pseudotuberculosis*, por lo que analizamos si en este tipo celular existía una proteína similar a p125FAK; para ello se realizaron ensayos de inmunodetección en fase sólida a partir de ET y de la FM, usando el anticuerpo monoclonal anti-p125FAK (2A7). En el eritrocito se aprecia la presencia de una proteína con un peso molecular de aproximadamente 119 kDa (figura 1A, carril 3), existen reportes por inmunodetección en fase sólida en los que se ha reportado esta molécula con el mismo peso molecular. Previamente Javier RR <sup>26</sup> demostró la presencia del receptor integrina  $\beta 1$  en estas células (figura 1B, carril 3).



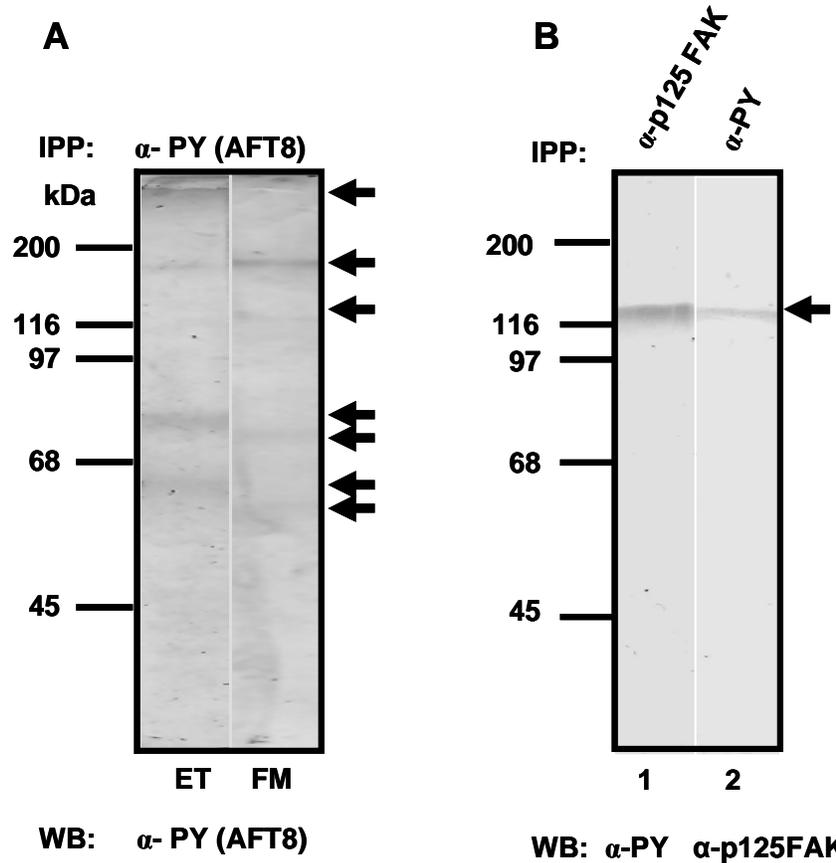
**Figura 1. A. Detección de la cinasa p125FAK en el eritrocito.** Carril 1 MPM. Carril 2, perfil proteico de extracto total obtenido mediante SDS-PAGE al 10%. Carril 3, inmunodetección en fase sólida de p125FAK. Carril 4, control negativo, PNC incubado con el anticuerpo secundario (anti-IgG acoplado a fosfatasa alcalina), Carril 5, extracto total de *Yersinia pseudotuberculosis*, incubado con el anticuerpo anti-p125FAK y revelado con fosfatasa alcalina. **B. Detección de integrina  $\beta$ 1 en el eritrocito.** Carril 1, MPM. Carril 2, perfil proteico de fracción membranal obtenido mediante SDS-PAGE al 10%. Carril 3, inmunodetección en fase sólida del receptor integrina- $\beta$ 1. Carril 4, control negativo, PNC incubado con el anticuerpo secundario (anti-IgG acoplado a fosfatasa alcalina). Carril 5, extracto total de *Yersinia pseudotuberculosis*, incubado con el anticuerpo anti- $\beta$ 1 integrina y revelado con fosfatasa alcalina. En el lado izquierdo se muestran los marcadores de peso molecular.

### Fosforilación de proteínas en el eritrocito

La fosforilación y desfosforilación de los residuos en tirosina han sido implicados en la regulación de varias funciones del eritrocito, incluyendo metabolismo, transporte membranal, volumen y forma celular, sin embargo, no se ha analizado el patrón basal de expresión de fosfoproteínas, por lo que se analizó los perfiles de proteínas fosforiladas en tirosina en el eritrocito. Se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de proteínas del ET y de FM y la presencia de las proteínas fosforiladas se determinó usando el mismo anticuerpo  $\alpha$ -PY (AFT8). Los resultados mostraron la presencia de fosfoproteínas de 230, 175, 79 y 59 kDa en el ET (figura 2A, carril 1), mientras que en la FM fosfoproteínas de 175, 119, 75 y 56 kDa (figura 2A, carril 2). Como se observó en el eritrocito, existen proteínas que

se fosforilan sin que exista un estímulo o tratamiento, además se comprobó la existencia de fosforilación diferencial dependiente de la fracción celular.

Con el fin de corroborar en el eritrocito la existencia de p125FAK y además establecer si pudiera encontrarse fosforilada, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación utilizando el anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -p125FAK (2A7) y un monoclonal  $\alpha$ -PY (AFT8). Los resultados muestran el reconocimiento de una sola molécula que además se encuentra fosforilada a nivel basal (figura 2B, carriles 1 y 2). Que sugiere corresponde a la cinasa de adhesión focal. (figura 2B)

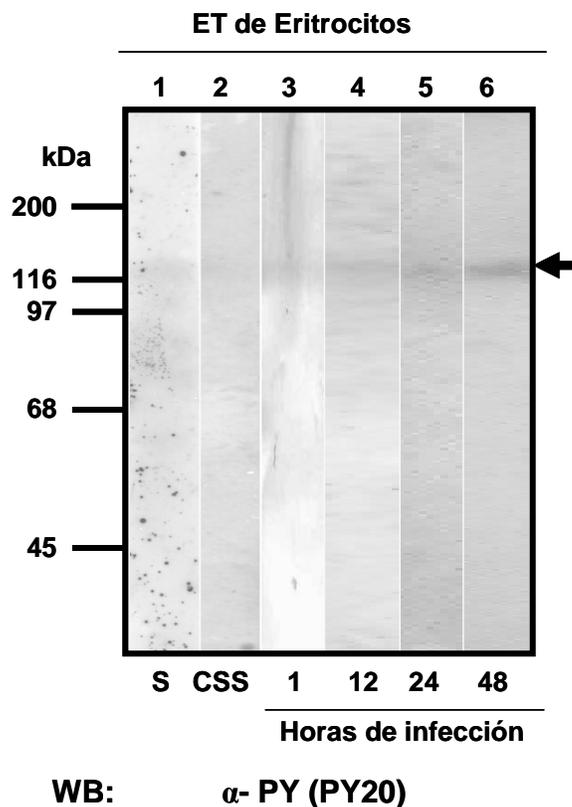


**Figura 2. Inmunodetección en fase sólida de fosfoproteínas basales y de la cinasa p125FAK en eritrocitos.** Los eritrocitos se lisaron, y los diferentes solubilizados obtenidos se sometieron a ensayos de inmunoprecipitación, para posteriormente someterlos a electroforesis en SDS-PAGE al 10%, las proteínas se transfirieron a PNC, se incubó con un anticuerpo anti-fosfotirosina (AFT8) a una dilución 1:1000 y se reveló con un anticuerpo secundario anti-IgG acoplado a FA a una dilución 1:5000. **A)** Fosforilación basal de proteínas del eritrocito a partir de extracto total (carril 1) y fracción membranal (carril 2). **B)** Ensayos de inmunoprecipitación a partir de 1 mg de proteína proveniente de extracto total, las cuales fueron incubadas con los anticuerpos monoclonales  $\alpha$ -p125FAK(2A7) y  $\alpha$ -PY(AFT8), los inmunoprecipitados fueron sometidos a SDS-PAGE, electrotransferidos y revelados con  $\alpha$ -PY(carril 1) y  $\alpha$ -p125FAK(carril 2). En el lado izquierdo se muestran los marcadores de peso molecular.

## **Análisis de la fosforilación en tirosina de proteínas del eritrocito infectado con *Y. pseudotuberculosis***

Cuando los receptores integrina son estimulados, a través de la unión a sus ligandos, forman agregados proteicos conocidos como adhesiones focales, los cuales favorecen la interacción de la bacteria con la célula huésped. Durante este evento es probable que se activen procesos de señalización a través de la membrana que involucren la fosforilación en tirosina de proteínas. Para evaluar el efecto de la inducción de fosforilación de proteínas en una yersiniosis experimental se llevó a cabo un curso temporal de infección con *Yersinia pseudotuberculosis* en ratones BALB/c, monitoreándolos a diferentes horas (1, 12, 24 y 48) y posteriormente fueron analizados con el anticuerpo  $\alpha$ -PY (PY20). Detectándose una proteína de aproximadamente 119 kDa, con un aumento en la fosforilación de la misma con respecto al tiempo de infección (figura 3, carriles 3-6).

Para confirmar que las variaciones en los perfiles proteicos se deben al proceso infeccioso, se desarrolló el experimento alterno con un grupo de ratones sanos además de un grupo control estricto, constituido por ratones inoculados con PBS estéril, sangrados a los mismos intervalos, en los cuales no se presentan variaciones en el nivel de fosforilación de la proteína (figura 3, carriles 1 y 2).

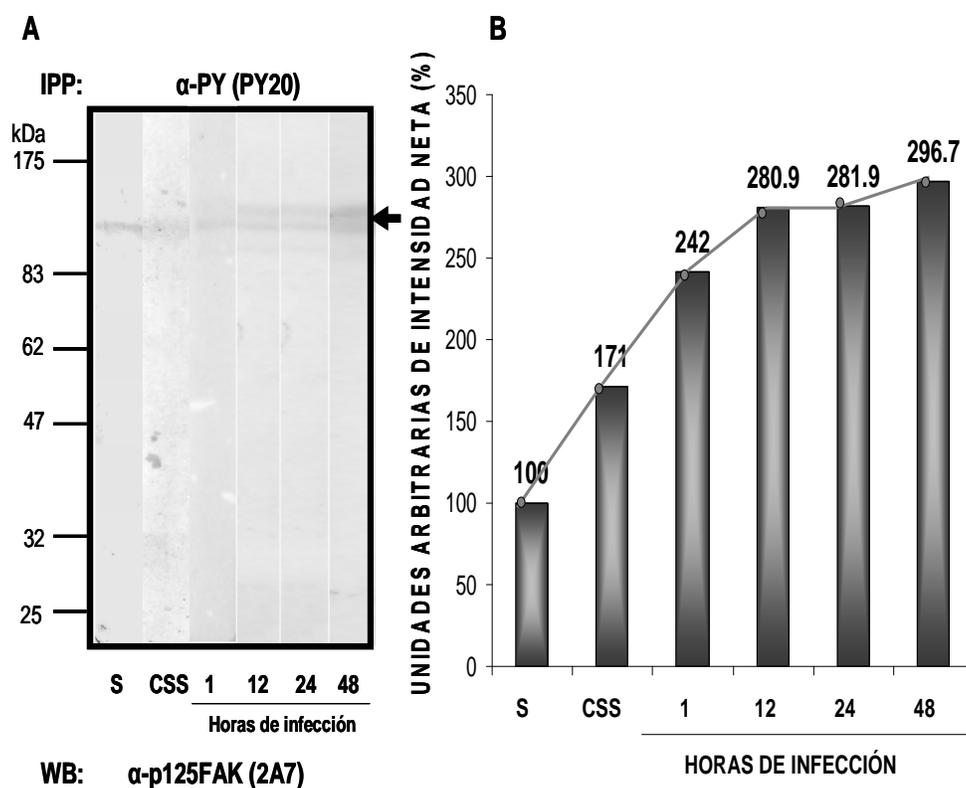


**Figura 3. Inmunodetección en fase sólida de fosfoproteínas en eritrocitos infectados con *Y. pseudotuberculosis*.** Los eritrocitos infectados se lisaron, y los diferentes solubilizados obtenidos a las diferentes horas de infección se sometieron a electroforesis en SDS-PAGE al 10%, las proteínas se transfirieron a PNC, se incubó con un anticuerpo anti-fosfotirosina ( $\alpha$ -PY20) a una dilución 1:500 acoplado a fosfatasa alcalina. Carril 1, eritrocitos de ratón sano, carril 2, eritrocitos de ratón control inoculado con solución salina, carril 3-6 eritrocitos de ratones infectados a diferentes tiempos. En el lado izquierdo se muestran los marcadores de peso molecular.

### **Fosforilación de p125FAK durante el proceso infeccioso provocado por *Y. pseudotuberculosis*.**

Se ha demostrado *in vitro*, que la interacción fibronectina/integrina induce la fosforilación en tirosina de proteínas, entre las cuales se encuentran p125FAK, paxilina, Src, entre otras. En modelos *in vitro* e *in vivo*, los eritrocitos son invadidos por *Y. pseudotuberculosis*, y el receptor integrina  $\beta$ 1 está involucrado en la entrada, supervivencia y proliferación de la bacteria. Por otro lado, se ha demostrado en diferentes líneas celulares que p125FAK está involucrada en la internalización bacteriana, y experimenta fosforilación en tirosina, desencadenando eventos de transducción de señales. Con el fin de establecer si la proteína fosforilada es p125FAK, procedimos a realizar ensayos de inmunoprecipitación de extractos de eritrocitos obtenidos a diferentes tiempos de

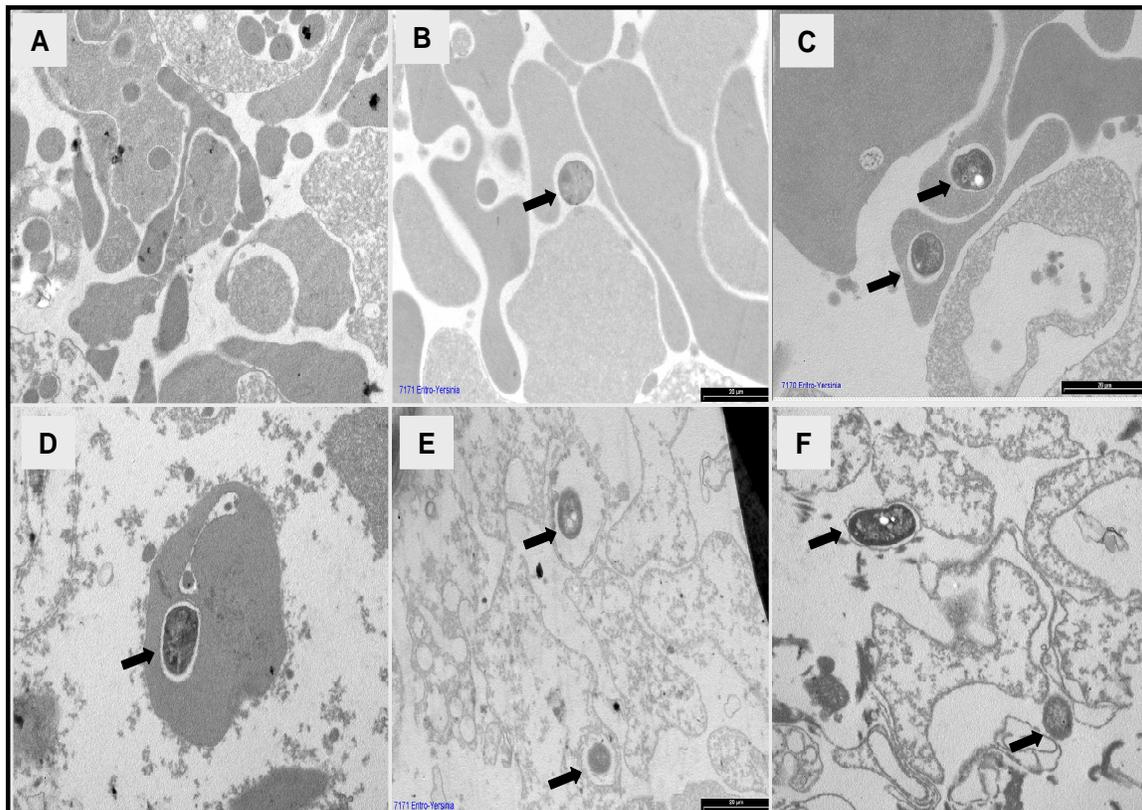
la yersiniosis experimental con el anticuerpo  $\alpha$ -PY20 y posteriormente detectando con el anticuerpo  $\alpha$ -p125FAK. Desde la primera hora de infección se detecta un incremento en la fosforilación de p125FAK, mostrando su nivel mayor a las 48 h, de manera constante y tiempo dependiente, a medida que evoluciona la enfermedad, probablemente a consecuencia de la interacción de la bacteria con el eritrocito (ver figura 4A, carriles 3-6). Para confirmar que las variaciones en los niveles de fosforilación en tirosina de p125FAK se deben al proceso infeccioso, se desarrolló el experimento alterno con un grupo de ratones sanos además de un grupo control estricto, constituido por ratones inoculados con PBS estéril, sangrados a los mismos intervalos, en los cuales no se aprecian variaciones en los niveles de fosforilación de p125FAK (figura 4A, carriles 1 y 2). El análisis densitométrico muestra un drástico incremento de mas de un 140% en la fosforilación de los eritrocitos infectados comparados con los controles (figura 4B).



**Figura 4. Fosforilación diferencial de la cinasa p125FAK durante el proceso infeccioso inducido por *Y. pseudotuberculosis*.** A. Inmunodetección en fase sólida de extractos totales sometidos a inmunoprecipitación, incubados con  $\alpha$ -PY20 y revelados con  $\alpha$ -p125FAK (2A7). (s) sano, (css) control inoculado con solución salina, (1, 12, 24 y 48) horas de infección. B. Análisis densitométrico de la figura A, representando las unidades de intensidad neta en términos de porcentaje, considerando como 100%, el resultado obtenido del ratón sano. En el lado izquierdo de la figura A se muestran los marcadores de peso molecular.

### Microscopía electrónica de eritrocitos infectados con *Y. pseudotuberculosis*.

Se ha reportado lisis gradual de los eritrocitos durante la yersiniosis, por lo que realizamos la observación de los cambios morfológicos en los eritrocitos por microscopía electrónica. Como se observa (figura 5, A-D), desde la primera hora la bacteria entra en contacto con los eritrocitos y se internaliza, provocando la lisis gradual de los eritrocitos (figura 5, E y D).

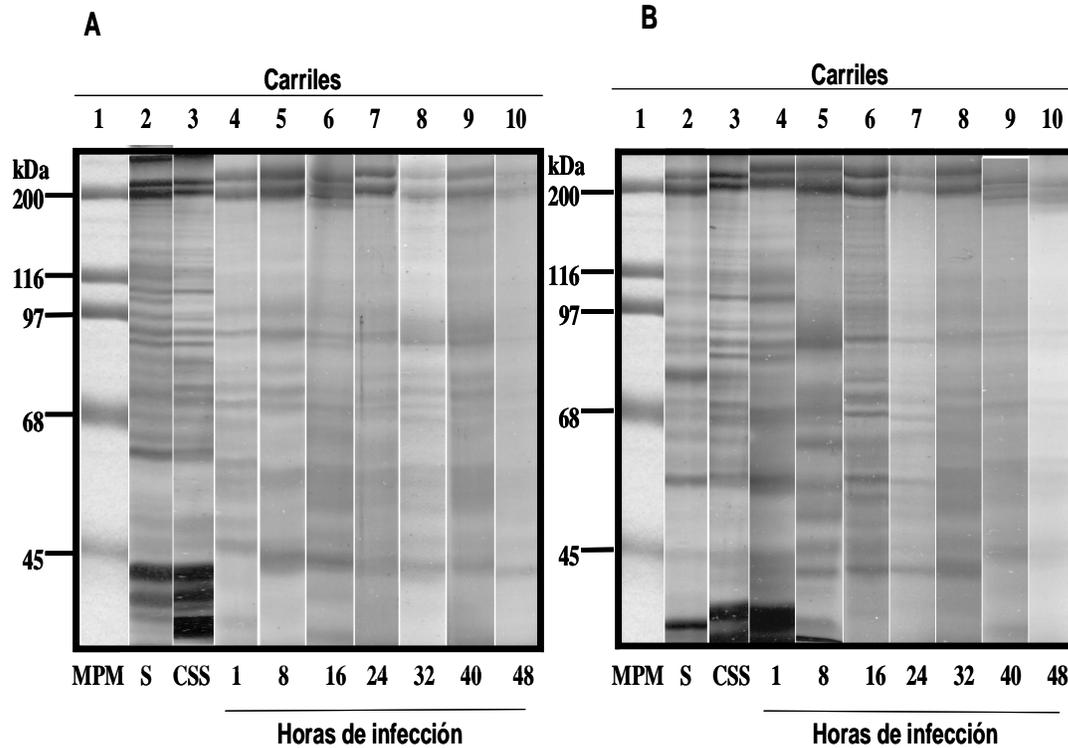


**Figura 5. Microscopía electrónica de eritrocitos de ratón BALB/c infectados con *Y. pseudotuberculosis*.** A, eritrocitos de ratón sin estímulo, B-F, eritrocitos de ratón infectados durante 1(B), 12(C), 24(D), 36(E) y 48(F) horas. Las flechas señalan la forma cocobacilar de *Y. pseudotuberculosis* en el interior del eritrocito.

### Perfiles proteicos de eritrocitos infectados con *Y. pseudotuberculosis*.

Se ha demostrado que cuando *Yersinia* entra en contacto con la célula hospedera, activa su sistema de secreción tipo III, secretando una amplia gama de proteínas, algunas de las cuales poseen actividad de proteasa, por lo que procedimos a evaluar el efecto del proceso infeccioso sobre el perfil proteico y si ocurre degradación de las proteínas del eritrocito. Podemos apreciar un patrón de variación de las proteínas del ET y la FM como consecuencia del proceso infeccioso. Para confirmar que las variaciones en los perfiles proteicos se deben al

proceso infeccioso, se desarrolló el experimento alterno con un grupo de ratones sanos además de un grupo control, constituido por ratones inoculados con PBS estéril, sangrados a los mismos intervalos, en los cuales no se apreciaron variaciones ni degradación en sus perfiles proteicos (figuras 6A y 6B, carril 3).



**Figura 6 Perfil proteico de los cursos temporales de infección en eritrocitos de ratones BALB/c inoculados con *Y. pseudotuberculosis*.** A) extracto total y B) fracción membranal. S) ratón sin estimular, CSS, ratón inoculado con solución salina fisiológica estéril, carriles 4-12 perfiles proteicos de eritrocitos infectados con *Y. pseudotuberculosis* a diferentes tiempos. En el lado izquierdo se muestran los marcadores de peso molecular. Los resultados muestran un experimento representativo.

## VII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Existe controversia acerca del reconocimiento de eritrocito maduro como una célula que participa activamente en diversos procesos celulares, ya que carece de organelos para la síntesis de proteínas. Sin embargo, se ha demostrado que en pacientes con anemia hemolítica, la epinefrina induce en el eritrocito cascadas de señalización mediadas por la activación de proteínas G y proteínas tirosina cinasas, provocando la adhesión de éstos al endotelio vascular, activando un mecanismo de vasooclusión, que provoca en los pacientes muerte por embolia o infarto al miocardio <sup>36</sup>.

La mayoría de los componentes del citoesqueleto, excepto la actina, son fosfoproteínas, algunas reguladas por factores como el calcio y el ATP, de manera que la fosforilación puede modificar las interacciones entre estas moléculas, ejerciendo un efecto sobre la integridad de la membrana y por lo tanto en su función <sup>37,38</sup>. En este sentido, en el presente trabajo mostramos por primera vez en los extractos celulares (ET y FM) del eritrocito sin estimular, un grupo heterogéneo de 8 proteínas que se encuentran fosforiladas en su estado basal y que podrían tener un papel relevante en la función celular (Figura 2). En estudios previos, se ha analizado el papel de las proteínas del citoesqueleto (espectrina, banda 4.1, aducina, demantina, banda 3, entre otras), con respecto a los cambios en los niveles de fosforilación inducidos por la presencia de hormonas, iones y metales, evaluando el efecto de estos cambios sobre la integridad morfológica, mecánica y funcional del eritrocito <sup>39,40</sup>. Sin embargo, no ha sido reportado el perfil de proteínas que se encuentran fosforiladas en el eritrocito de manera basal.

No obstante, en el eritrocito maduro se ha caracterizado la presencia de Rho GTPasas, como Rac1 y Rac2 involucradas en la plasticidad celular, demostrándose que una deficiencia en su expresión produce una alteración en el ensamble de actina y por lo tanto una deformación de su citoesqueleto, ocasionando alteraciones en la función del eritrocito <sup>41</sup>. La formación y remodelación del citoesqueleto de actina es un proceso dinámico regulado entre Rho GTPasas y proteínas tirosina cinasas, como por ejemplo, p125FAK, una cinasa considerada como el enlace entre la regulación de los componentes de la

matriz extracelular y el citoesqueleto de actina<sup>42,43</sup>. En el eritrocito sin estimular demostramos la presencia de una proteína de 119 kDa (Figura 1), inmunológicamente identificada como la cinasa p125FAK, en una fosforilación basal, probablemente involucrada en la señalización mediada por integrinas, donde pudiera actuar como regulador, interruptor y amplificador de múltiples eventos de señalización. En otros estudios se ha reportado esta proteína con un peso molecular similar al encontrado en este trabajo, sin embargo, no existen reportes que hayan identificado a p125FAK en el eritrocito maduro. La caracterización de p125FAK en el eritrocito es indudablemente un hallazgo importante, ya que resulta ser una cinasa clave reclutada como consecuencia de la estimulación del receptor integrina, además de una molécula reguladora del citoesqueleto, indispensable para la supervivencia de la bacteria<sup>44</sup>.

El proceso de internalización bacteriana en las células de mamíferos, requiere del contacto y adhesión de la bacteria a la célula huésped, aunque esta etapa resulta ser un fenómeno relativamente simple de interacción entre el receptor de la célula huésped y el ligando bacteriano, la formación de la copa fagocítica, la reorganización del citoesqueleto de actina y la internalización, se requiere de la generación de eventos de señalización en el huésped mucho más complicados. El eritrocito llega a ser un blanco de agentes infecciosos por la abundancia de nutrientes, indispensables para el crecimiento y proliferación de los microorganismos, como el hierro y la glucosa, además de garantizar la propagación hacia otros tejidos y la evasión de la respuesta inmune en el bazo. En ciertos modelos de infección *in vivo* e *in vitro*, la invasión de eritrocitos por *Plasmodia* es responsable de todos los síntomas y patologías asociadas a la malaria, de manera que el proceso de internalización es clave para el establecimiento de la etapa infecciosa, la entrada del merozoito involucra a proteínas del parásito presentes en su superficie que tienen la capacidad de adherirse<sup>45</sup>. Se ha demostrado que bacterias del género *Yersinia* entran en contacto con los eritrocitos *in vivo* e *in vitro*<sup>25,26</sup>, sin embargo se requería evidencia contundente que demostrara la vía de interacción entre estas células. En este grupo de trabajo, se demostró por microscopía electrónica que al generar una infección sistémica *in vivo* empleando ratones BALB/c con *Yersinia pseudotuberculosis*, la bacteria entra en contacto con el eritrocito y lo invade,

alterando drásticamente su morfología y función, provocando la muerte del ratón por hipoxia tisular, al observar amplias zonas de cianosis por la falta de oxígeno en sus células. Los cambios visibles en el eritrocito sugerían la activación de señales demostradas en otras líneas celulares, en las cuales la interacción invasina-integrina  $\beta_1$ , activó procesos de señalización que involucraban la fosforilación diferencial de cinasas como p125FAK y p130Cas, favoreciendo el proceso de internalización bacteriana <sup>25</sup>.

Cuando se llevó a cabo la infección sistémica en ratones BALB/c, a través de la inoculación intraperitoneal de *Yersinia pseudotuberculosis*, se observaron cambios en la fosforilación basal y un aumento en los niveles de fosforilación de una proteína en particular de aproximadamente 119 kDa que resultó ser dependiente de la evolución del proceso infeccioso (Figura 3), logrando demostrar mediante ensayos de inmunoprecipitación e inmunodetección en fase sólida que se trataba de la cinasa p125FAK (Figura 4). Estos resultados coinciden con estudios previos realizados en células HeLa, en las cuales se estableció que la eficiente internalización de *Y. pseudotuberculosis* a la célula huésped a través de la interacción invasina-integrina  $\beta_1$ , induce en el citoesqueleto un incremento en los niveles de fosforilación de proteínas de la célula huésped en respuesta a la adhesión, como la activación de p125FAK <sup>46</sup>. Estos resultados coinciden con los observados en fibroblastos de embriones de pollo (CEFs), donde p125FAK potencia la actividad fagocítica de la célula, un mecanismo alterno en el que al reclutarse en el sitio de activación del receptor integrina, genera cascadas de señalización en el sitio de la copa fagocítica, induciendo la internalización de *Yersinia* <sup>47</sup>. Además se demuestra que las células que sobreexpresan a p125FAK aumentan su disposición a la internalización bacteriana, probablemente estimulando la fosforilación de proteínas clave o aumentando la disponibilidad del receptor integrina en la membrana <sup>48,49</sup>.

Sin embargo, nuestros resultados muestran un incremento en la fosforilación a medida que evoluciona el proceso infeccioso. Sin embargo, aún cuando se observa un aumento en la fosforilación de p125FAK en respuesta a la unión de la bacteria, no se logra demostrar que el resultado directo de esta señal conduce a la internalización de la bacteria, aunque se ha demostrado que en células HeLa y fibroblastos de embriones de ratón (MEFs) deficientes en p125FAK, la bacteria es

incapaz de internalizarse, sin afectar su capacidad de adhesión <sup>46</sup>. En otros modelos de infección *in vivo* e *in vitro*, como por ejemplo *Plasmodium falciparum*, el cual expresa en su membrana glucosilfosfoinosítidos (GPIs), los cuales inducen señales cuando se unen a proteínas de la célula huésped que están físicamente asociadas a proteínas tirosina cinasas como Fyn, Lck, Lyn y hck, induciendo la fosforilación en tirosina de proteínas y por lo tanto, la activación de señales involucradas en la internalización del merozoito al eritrocito <sup>50</sup>.

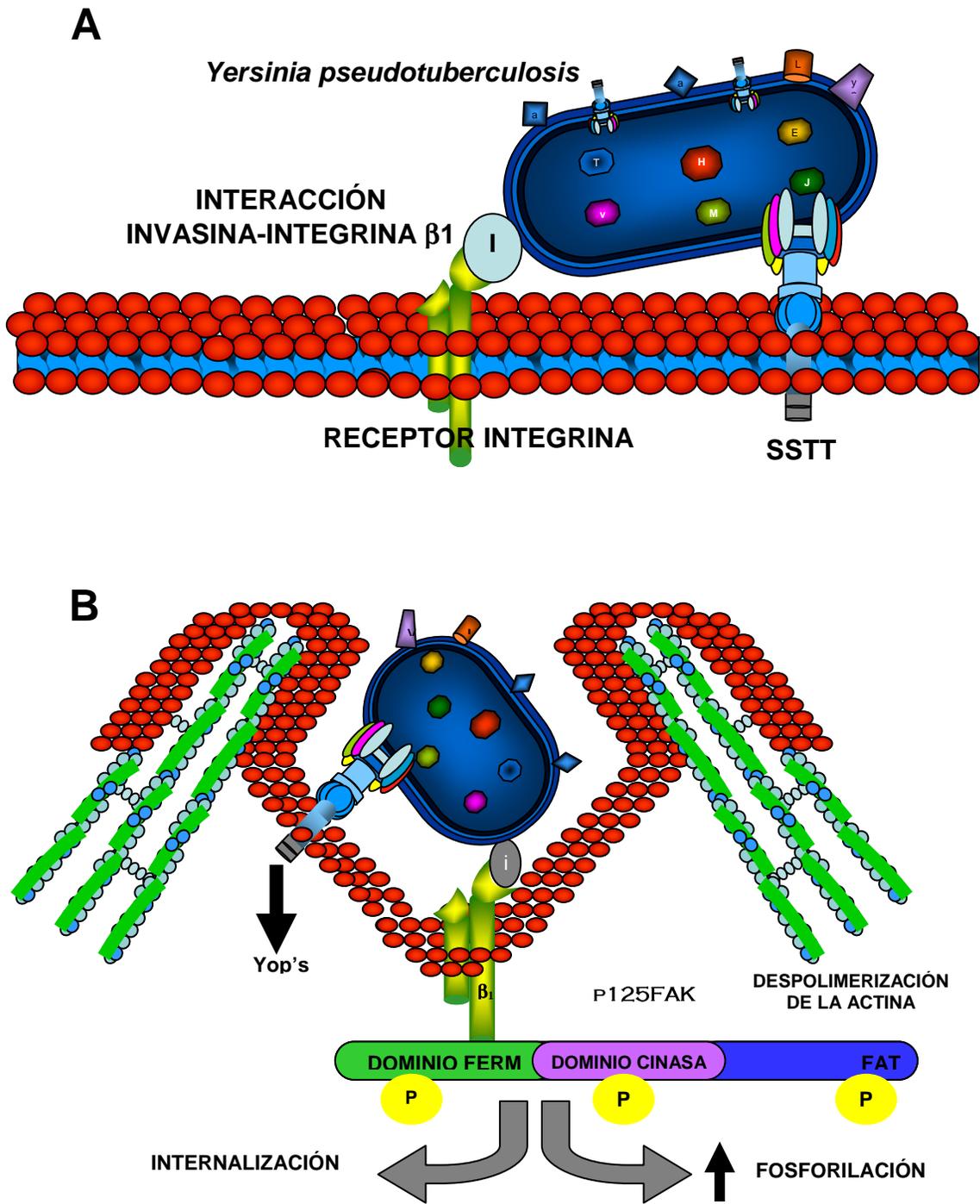
Por otro lado, teníamos evidencia experimental de los cambios morfológicos en el eritrocito durante el proceso infeccioso, sin embargo, resultaba importante establecer si estos cambios se correlacionaban con variaciones en sus proteínas. Por lo que a través del análisis de los perfiles proteicos, demostramos una variación de las proteínas constitutivas del eritrocito, afectándose de manera drástica los componentes de la fracción membranal (Figura 6), un proceso que concuerda con las observaciones previas, en las cuales la evolución del proceso infeccioso depende de la interacción *Yersinia*-eritrocito. De igual forma, se demuestra por microscopía electrónica que *Y. pseudotuberculosis* entra en contacto con el eritrocito a través de la interacción invasina-integrina y es capaz de internalizarse (Figura 6), aunque sería interesante establecer el papel de p125FAK en el proceso de internalización en el eritrocito.

Esta degradación gradual es debida probablemente a la acción de las proteasas secretadas por el SSTT presente en la bacteria. En diferentes líneas celulares, se ha demostrado que la participación de proteínas efectoras de *Yersinia* como Yop O, E o T, tienen efectos directos sobre el citoesqueleto de actina sin afectar el proceso de adhesión de la bacteria a la célula huésped <sup>12,13</sup>.

De acuerdo a nuestros hallazgos, proponemos un modelo, en el cual sugerimos que durante la yersiniosis experimental, la bacteria entra en contacto con el eritrocito, a través de la interacción invasina-integrina  $\beta 1$  (figura 7A), como consecuencia se activan cascadas de señalización, lo que se ve reflejado en un aumento en los niveles de fosforilación en tirosina de moléculas como la cinasa p125FAK. Esta a su vez induce el reclutamiento de moléculas que están involucradas en la modificación del citoesqueleto de actina, para generar la formación de la copa fagocítica y la posterior internalización bacteriana, activando la expresión del SSTT, el cual libera proteínas con actividad proteasa, las cuales

actúan sobre las proteínas del citoesqueleto del eritrocito hasta ocasionar su lisis (figura 7B).

En resumen, se demuestra por vez primera que el eritrocito posee proteínas fosforiladas en su estado basal, entre las cuales se encuentra la cinasa de adhesión focal, p125FAK. Al interactuar *Y. pseudotuberculosis* con el eritrocito *in vivo*, se internaliza. Durante el proceso infeccioso se observa un aumento en los niveles de fosforilación de p125FAK dependientes del tiempo de infección, lo cual resultó ser mediado por el receptor integrina  $\beta 1$ .



**Figura 7.** Modelo propuesto para la interacción *Yersinia pseudotuberculosis*-eritrocito. *Y. pseudotuberculosis* entra en contacto con el eritrocito vía interacción invasina-integrina  $\beta 1$  (A). A consecuencia de esta interacción se elevan los niveles de fosforilación de la cinasa p125FAK, la cual pudiera estar directamente involucrada en el proceso de captación bacteriana, a través de la generación de modificaciones en el citoesqueleto de actina y la posterior formación de la copa fagocítica que pudiera inducir la internalización de la bacteria (B).

## VIII. REFERENCIAS

- [1] Cornelis GR, Boland A, Boyd AP, Geuijen C, Iriarte M, Neyt C, Sory MP and Stainier I. The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Mol Microbiol.* 1998;62(4):1315-52.
- [2] Pujol C and Bliska JB. The ability to replicate in macrophages is conserved between *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect Immun.* 2003;71(10):5892-9.
- [3] Grabestein JP, Marceau M, Pujol C, Simonet M and Bliska JB. The response regulator PhoP of *Yersinia pseudotuberculosis* is important for replication in macrophages and for virulence. *Infect Immun.* 2004;72(9):4973-84.
- [4] Marra A and Isberg R. Invasin-dependent and invasin-independent pathways for translocation of *Yersinia pseudotuberculosis* across the Peyer's Patch intestinal epithelium. *Infect Immun.* 1997;65(8):3412-21.
- [5] Carnoy C, Mullet C, Muller-Alouf H, Leteurtre E and Simonet M. Superantigen YPMa exacerbates the virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* in mice. *Infect Immun.* 2000;68(5):2553-9.
- [6] Hannu T, Mattila L, Nourti JP, Ruutu P, Mikkola J, Siitonen A and Leirisalo-Repo M. Reactive arthritis after an outbreak of *Yersinia pseudotuberculosis* serotype O:3 infection. *Ann Rheum Dis.* 2003;62(9): 866–9.
- [7] Pascal V, Salao E, Skurnik M, Fukushima H and Simonet M. Similarities of Kawasaki disease and *Yersinia pseudotuberculosis* infection epidemiology. *Pediatr Infect Dis J.* 2007;26: 629–31.
- [8] Fällman M, Persson C and Wartz HW. *Yersinia* proteins that target host cell signaling pathways. *J Clin Invest.* 1997;99(6):1153-57.
- [9] Viboud GI and Bliska JB. A bacterial type III secretion system inhibits actin polymerization to prevent pore formation in host cell membranes. *The EMBO J.* 2001;20(19):5373-82.
- [10] Galán JE and Collmer A. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science.* 1999;284(5418):1322-8.
- [11] Troski JE, Liverman ABD and Orth K. *Yersinia* outer proteins:Yops. *Cell Microbiol.* 2008; 10(3):557-65.
- [12] Shao F, Vacratsis PO, Bao Z, Bowers KE, Fierke CA and Dixon JE. Biochemical characterization of the *Yersinia yopT* protease: Cleavage site and recognition elements in Rho GTPases. *Proc Natl Acad Sci.* 2002;100(3):904-9.
- [13] Logsdon LK and Mecsas J. Requirement of the *Yersinia pseudotuberculosis* effectors yopH and yopE in colonization and persistence and lymph tissues. *Infect Immun.* 2003;71(8):4595-607.
- [14] Hudson KJ and Bouton AH. *Yersinia pseudotuberculosis* adhesins regulate tissue-specific colonization and immune cell localization in a mouse model of systemic infection. *Infect Immun.* 2006;74(11):6487-90.
- [15] Eitel J and Dersch P. The YadA protein of *Yersinia pseudotuberculosis* mediates high-efficiency uptake into human cells under environmental conditions in which invasin is repressed. *Infect Immun.* 2002;70(9):4880-91.

- [16] Heise T and Dersch P. Identification of a domain in *Yersinia* virulence factor YadA that is crucial for matrix-specific cell adhesion and uptake. *Proc Natl Acad Sci.* 2006;103(9):3375-80.
- [17] Koga H, Izakawa I, Araki N, Saya H and Mimori T. Observation of the intracellular behavior of recombinant *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein. *Microbiol Immunol.* 2005;49(4):297-302.
- [18] Saltman LH, Lu Y, Zaharias EM and Isberg RR. A region of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein that contributes to high affinity binding to integrin receptor. *J Biol Chem.* 1996;271(28):23438-44.
- [19] Gustavsson A, Armulik A, Brakebusch C, Fässler R and Johansson S. Role of the  $\beta 1$  integrin cytoplasmic tail in mediating invasin-promoted internalization of *Yersinia*. *J Cell Sci.* 2002;115:2669-78.
- [20] Miranti CK and Brugge JS. Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nature.* 2002;4:83-90.
- [21] Isberg RR, Hamburger Z and Dersch P. Signaling and invasin-promoted uptake via integrin receptors. *Microbes Infect.* 2000;2(7):793-801.
- [22] Isberg RR and Barnes P. Subversion of integrins by enteropathogenic *Yersinia*. *J Cell Sci.* 2003;114(1):21-8.
- [23] Wong KW and Isberg RR. Emerging views on integrin signaling via Rac1 during invasin-promoted bacterial uptake. *Curr Opin Microbiol.* 2005;8(1):4-9.
- [24] Parsons T. Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci.* 2003;116:1409-16.
- [25] Feodorova VA and Devdariani L. The interaction of *Yersinia pestis* with erythrocytes. *J Med Microbiol.* 2002;51:150-8.
- [26] Javier RR. Identificación del receptor integrina- $\beta 1$  en la interacción *Yersinia pseudotuberculosis*-eritrocito como modelo de infección sistémica [tesis de maestría]. Chilpancingo, Gro. Maestría en Ciencias Biomédicas. Universidad Autónoma de Guerrero. 2006.
- [27] Aluja A. Animales de laboratorio y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). *Diario Oficial.* 2002.
- [28] Fernández CL. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002 para la protección ambiental, salud ambiental, residuos peligrosos biológicos-infecciosos y la clasificación y especificaciones de manejo. *Diario Oficial.* 2003.
- [29] English D and Andersen BR. Single-step separation of red blood cells, granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque. *J Immunol.* 1974;5(3):249-52.
- [30] Flores RD, Rosales C, Rosales EJM and Talamás RP. *Entamoeba histolytica*: a  $\beta 1$  integrin-like fibronectin receptor assembles a signaling complex similar to those of mammalian cells. *Exp Parasitol.* 2003;103(1-2):8-15.
- [31] Zipser Y, Piade A, Barbul A, Korenstein R and Kosower NS.  $Ca^{2+}$  promotes erythrocyte band 3 tyrosine phosphorylation via dissociation of phosphotyrosine phosphatase from band 3. *J Biol Chem.* 2002;368: 137-44.
- [32] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-54
- [33] Towbin H, Staehelin T and Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci.* 1979;76(9):4350-54.

- [34] Varas CY. Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y DNA. Instituto Nacional de Salud 2003.
- [35] Bio-Rad. Quantity One. User guide for version 4.4 Windows and Macintosh. 2004;117-42.
- [36] Brittain JE, Mlinar KJ, Anderson CS, Orringer EP and Parise LV. Activation of sickle red blood cell adhesion via integrin-associated protein/CDC47-induced signal transduction. *J Clin Invest.* 2001;107:1555-62.
- [37] Gratzer WB. The red cell membrane and its cytoskeleton. *J Biochem.* 1981;198:1-8.
- [38] Kalfa TA, Pushkaran S, Mohandas N, Hartwig JH, Fowler VM, Johnson JF, Joiner CH, Williams DA and Zheng Y. Rac GTPases regulate the morphology and deformability of the erythrocyte cytoskeleton. *Blood J.* 2006;108(12):3637-45.
- [39] Manno S., Takakuwa Y., Nagao K. and Mohandas N. Modulation of erythrocyte membrane mechanical function by  $\beta$ -spectrin phosphorylation and dephosphorylation. *J Biol Chem.* 1995;279(10):5659-65.
- [40] Manno S, Takakuwa Y and Mohandas N. Modulation of erythrocyte membrane mechanical function by protein 4.1 phosphorylation. *J Biol Chem.* 2005;280:7581-7.
- [41] Boquet P and Lemichez E. Bacterial virulence factors targeting Rho GTPases: parasitism or symbiosis? *Trends Cell Biol.* 2003;13(5):238-46.
- [42] Wong KW and Isberg RR. Emerging views on integrin signaling via Rac1 during invasin-promoted bacterial uptake. *Curr Opin Microbiol.* 2005;8:4-9.
- [43] Wong KW and Isberg RR. Arf6 and phosphoinositol-4-phosphate-5-kinase activities permit bypass of the Rac1 requirement for beta 1 integrin-mediated bacterial uptake. *J Exp Med.* 2003;198(4):603-14.
- [44] Parsons T. Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci.* 2003;116:1409-16.
- [45] Gazarini ML, Thomas AP, Pozzan T and Garcia CRS. Calcium signaling in a low calcium environment: how the intracellular malaria parasite solves the problem. *J Cell Biol.* 2003;161(1):103-10.
- [46] Bruce-Staskal PJ, Weidow ChL, Gibson JJ and Bouton AH. Cas, FAK and Pyk2 function in diverse signaling cascades to promote *Yersinia* uptake. *J Cell Sci.* 2002;115(13):2689-700.
- [47] Alrutz MA and Isberg RR. Involvement of focal adhesion kinase in invasin-mediated uptake. *Proc Natl Acad Sci.* 1998;95:13658-63.
- [48] Weidow ChL, Black DS, Bliska J and Bouton AH. CAS/Crk signalling mediates uptake of *Yersinia* into human epithelial cells. *Cell Microbiol.* 2000;2(6):549-60.
- [49] Juris S, Rudolph AE, Huddler D, Orth K and Dixon JE. A distinctive role for the *Yersinia* protein kinase: Actin binding, kinase activation, and cytoskeleton disruption. *Proc Natl Acad Sci.* 2000;97(17):9431-6.
- [50] Souvenir DT, Gerold P, Schwartz R, Novakovic S, McConville M and Schofield L. Signal transduction in macrophages by glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium*, *Trypanosoma*, and *Leishmania*: Activation of protein tyrosine kinases and protein kinase C by inositolglycan and diacylglycerol moieties. *Proc Natl Acad Sci.* 1997;94:4022-27.