



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“ANÁLISIS DE LA ASOCIACIÓN DE LAS
PROTEÍNAS ESPECTRINA, BANDA 4.1 Y ACTINA EN
ERITROCITOS DE RATÓN BALB/c INFECTADOS
CON *Yersinia pseudotuberculosis*”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

ARIADNA TORRES RAMOS

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Donaciano Flores Robles

CHILPANCINGO, GRO., DICIEMBRE DE 2011.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 19 días del mes de agosto de dos mil once, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Análisis de la asociación de las proteínas Espectrina, Banda 4.1 y Actina en eritrocitos de ratón BALB/c infectados con *Yersinia pseudotuberculosis*", presentada por la alumna Ariadna Torres Ramos, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial

Dr. Donaciano Flores Robles
Dirección de tesis

Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero

Dra. Natividad Castro Alarcón

Dr. Alejandro Millán Vega

Dra. Patricia Talamás Rohana

Vo. Bo



Dra. Isela Parra Rojas
Coordinadora del Posgrado en Ciencias Biomédicas



Vo. Bo

Dra. Berenice Illades Aguiar
Directora de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas

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:

Dr. Alejandro Millán Vega.

Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero.

Dra. Natividad Castro Alarcón.

Durante el periodo en el que cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas, la C. Ariadna Torres Ramos recibió beca del CONACYT 231144.

ABREVIATURAS

CST	Caldo soya tripticasa
EDTA	Ácido etilén-diamino-tetra-acético
ET	Extracto total
FM	Fracción membranal
FS	Fracción soluble
HCl	Ácido clorhídrico
IA	Iodoacetoamida
IPP	Inmunoprecipitación
NaCl	Cloruro de sodio
NEM	n-etil-maleimida
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PM	Peso molecular
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
PSA	Persulfato de amonio
SDS-PAGE	Dodecilsulfato de sodio- Electroforesis en gel de poliacrilamida
TEMED	N, N, N', N'-tetrametildiamina
TLCK	n-Tosil-lisin-clorometilcetona
UFC	Unidades formadoras de colonias
WB	Western blot

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Cambios morfológicos de los eritrocitos durante la infección con <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> .	5
Figura 2	Membrana del eritrocito.	6
Figura 3	Perfil de proteínas en eritrocito sano.	12
Figura 4	Inmunodetección de espectrina, banda 4.1 y actina en eritrocitos sanos.	13
Figura 5	Cambios en la concentración de α -espectrina en la fracción membranal durante el proceso infeccioso provocado por <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> .	14
Figura 6	Cambios en la concentración de β -espectrina en la fracción membranal durante el proceso infeccioso provocado por <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> .	14
Figura 7	Cambios en la concentración de banda 4.1 en la fracción membranal durante el proceso infeccioso provocado por <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> .	15
Figura 8	Cambios en la concentración de actina en la fracción membranal durante el proceso infeccioso provocado por <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> .	16
Figura 9	Asociación de las proteínas espectrina, banda 4.1 y actina en eritrocito de ratón sano e infectado con <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> .	17
Figura 10	Disociación del complejo ternario en los eritrocitos infectados con <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> .	22

AGRADECIMIENTOS

Primeramente quiero agradecer a mi director de tesis el Doctor Donaciano Flores Robles por todo su apoyo, sus enseñanzas y su amistad.

A mi codirectora la Doctora Patricia Talamás Rohana por todo el apoyo brindado para que este trabajo pudiera ser posible y a mis revisores Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero, Dra. Natividad Castro Alarcón y Dr. Alejandro Millán Vega quienes me asesoraron con el fin de que mi trabajo quedara lo mejor posible.

Al Doctor Eduardo Castañeda, Dra. Mónica Espinoza, Dr. Bernabé Carreño y a todo su grupo de trabajo por haberme asesorado y proporcionado el material necesario para la etapa final de mi proyecto.

A mis seres queridos...

**“ANÁLISIS DE LA ASOCIACIÓN DE LAS PROTEÍNAS
ESPECTRINA, BANDA 4.1 Y ACTINA EN ERITROCITOS DE
RATÓN BALB/c INFECTADOS CON *Yersinia
pseudotuberculosis*”**

CONTENIDO

	Página
Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Materiales y métodos	8
Resultados	12
Discusión y conclusiones	18
Referencias	23

RESUMEN

Yersinia pseudotuberculosis es un patógeno que puede infectar diversos tipos celulares como macrófagos, células dendríticas y hepatocitos, pero recientemente se ha demostrado que también puede infectar eritrocitos, motivo por el cual en nuestro grupo de trabajo se abrió una línea de investigación sobre la interacción *Yersinia*-eritrocito. Se ha demostrado que durante esta interacción los eritrocitos sufren cambios morfológicos por lo que en el presente estudio se analizaron tres proteínas del citoesqueleto las cuales conforman el complejo ternario, el cual es el responsable de dar integridad y estabilidad a los eritrocitos. Se realizaron geles de poliacrilamida, técnicas de inmunoprecipitación e inmunodetección con el fin de conocer la asociación de las proteínas espectrina, banda 4.1 y actina en eritrocitos sanos y en eritrocitos infectados *in vivo*. A las 48 h de infección hubo una pérdida total del 68.5% para la α -espectrina, 75.1% para β -espectrina, 76.6% para banda 4.1 y 58.2% para actina. En condiciones basales se observó asociación del complejo ternario, sin embargo, a las 12 h de infección hubo un pérdida del 75% y 80% para la unión banda 4.1-espectrina y banda 4.1-actina respectivamente, mientras que a las 24 h de infección no se detectó asociación. Estos resultados demuestran que aunque se encuentren presentes las proteínas después de 24 horas de infección, no significa que se encuentren unidas formando el complejo ternario, por lo que se propone que dichas proteínas podrían encontrarse en forma despolimerizada o bien, siendo degradadas por proteasas. En conclusión, se demostró por primera vez que las proteínas pertenecientes al complejo ternario disminuyen y se disocian durante el proceso infeccioso, lo cual explica los cambios morfológicos encontrados en los eritrocitos infectados por *Yersinia pseudotuberculosis*

Palabras clave: *Yersinia pseudotuberculosis*, eritrocito, espectrina, banda 4.1 y actina.

ABSTRACT

Yersinia pseudotuberculosis is a bacteria with the ability to infect many cellular types like macrophages, dendritic cells and hepatocytes, but recently has been shown that this bacterium can also infect erythrocytes. These findings change everything because all the knowledge is about the infection in nucleated cells and for this reason we study the *Yersinia*-erythrocyte interaction. It has been shown that in the *Yersinia*-erythrocyte interaction the erythrocytes have morphological changes and for this reason we analyzed three proteins of the cytoskeleton which form the ternary complex, complex that provides the integrity and stability to the red cells. We used SDS-PAGE, immunoprecipitation and immunodetection assays to know the association of the spectrin, band 4.1 and actin in basal and infected erythrocytes *in vivo*. At 48 h of infection there was 68.5% total loss of α -spectrin, 75.1% of β -spectrin, 76.6% of band 4.1 and 58.2% of actin. In basal conditions we observed association of the ternary complex, however, at the 12 h of infection there was a loss of 75% and 80% for the union band 4.1-spectrin and band 4.1-actin respectively, while at 24 h of infection there was no association. These findings show that although the proteins were present after 24 hours of infection, this does not mean that they were associated in the ternary complex and we presume that these proteins probably are depolymerized or degraded by proteases. In conclusion, we demonstrated for the first time that the proteins of cytoskeleton spectrin, band 4.1 and actin decrease and dissociate during the infection process, which explains the morphological changes founded in *Yersinia pseudotuberculosis* infected erythrocytes.

Keywords: *Yersinia pseudotuberculosis*, erythrocyte, spectrin, band 4.1 and actin.

INTRODUCCIÓN

Yersinia pseudotuberculosis es una bacteria Gram negativa la cual es patógena para el ser humano. Cuando se ingieren alimentos ó bebidas contaminadas por este patógeno puede desarrollarse una enfermedad denominada yersiniosis (Yuan, 2006) la cual al igual que muchas enfermedades gastrointestinales produce síntomas como dolor estomacal, náuseas, vómito, fiebre y diarrea con sangre. Una vez que *Y. pseudotuberculosis* es ingerida pasa del estómago al íleon intestinal, región del tracto digestivo rico en placas de Peyer el cual está cubierto por un epitelio especial de células M, las cuales son las responsables de recolectar antígenos y transportarlos hacia los linfocitos y macrófagos (Olsson 2006). *Y. pseudotuberculosis* puede penetrar las células M por medio de la interacción entre sus adhesinas con los receptores integrina expuestos en la superficie de estas células. Así, esta bacteria toma ventaja sobre la respuesta inmunológica y atraviesa las células M para multiplicarse en las placas de Peyer (Hudson y Bouton, 2006). En algunos casos *Y. pseudotuberculosis* puede ocasionar gastroenteritis, apendicitis y linfadenitis mesentérica (Jani y Chen, 2008) pero cuando el paciente se encuentra inmunosuprimido puede generar infecciones sistémicas en hígado, bazo y pulmón (Hudson y Bouton, 2006) y en casos más graves, complicaciones como el eritema nodoso y artritis reactiva (Jani y Chen, 2008).

Para los microorganismos patógenos intracelulares la adherencia es un mecanismo esencial para que se origine el proceso de invasión, para ello, *Y. pseudotuberculosis* cuenta con 4 adhesinas: invasina, YadA, Ail y antígeno pH6. La invasina es la principal proteína de invasión de *Y. pseudotuberculosis* y *Y. enterocolítica*. Esta proteína tiene gran afinidad por receptores integrina $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha 6\beta 1$ con los cuales se une por medio de 192 aminoácidos de su extremo C-terminal (Yuan, 2006) formando una estructura parecida a zipper y permitiendo así la internalización a la célula hospedera. Es importante señalar que durante el proceso de internalización también están involucrados los filamentos de actina, microtúbulos, proteínas tirosina cinasa como Pyk2 y Src, Rac, el complejo Arp 2/3, FAK, CAS y Crk (Boyle y Finlay, 2003).

La proteína YadA es una adhesina no fimbrial y en *Y. pseudotuberculosis* tiene una secuencia única capaz de interactuar con la integrina $\alpha 5\beta 1$, unión que promueve la adhesión e invasión en cultivos celulares aún en ausencia de invasina (Heise y Dersch, 2005). Por otra parte, Ail es una proteína de membrana externa que confiere resistencia al suero y el antígeno pH6 es una fimbria bacteriana importante para la virulencia de *Y. pestis* y muy probablemente también para *Y. pseudotuberculosis* debido a la gran similitud entre estas dos especies (Olsson, 2006).

Al igual que diversos patógenos *Yersinia pseudotuberculosis* cuenta con un sistema de secreción tipo tres el cual se encuentra codificado en el plásmido de virulencia denominado pVY. Como se sabe, los sistemas de secreción tienen como objetivo principal secretar, translocar y regular diversas proteínas efectoras las cuales en este caso reciben el nombre de Yops. Cada una de las proteínas efectoras (YopE, YopT, YopH, YopJ, YopO y YopM) tienen como blanco diferentes moléculas de la célula hospedero y una vez internalizadas en la célula eucariota tienen como objetivo bloquear la señalización celular para así evadir la fagocitosis y poder proliferar extracelularmente (Carlsson *et al.*, 2007).

Y. pseudotuberculosis puede infectar diversas líneas celulares entre las que destacan macrófagos, células dendríticas y hepatocitos, sin embargo, en el año 2002 se demostró por primera vez que *Y. pestis* era capaz de infectar y lisar eritrocitos (Feodorova, *et al.*, 2002). Este indicio propició el estudio sobre las interacciones *Yersinia*-eritrocito ya que hasta entonces todo lo conocido provenía de estudios realizados en células nucleadas. En el año 2006 en nuestro grupo de trabajo se demostró que los glóbulos rojos expresan sobre su superficie una proteína tipo integrina $\beta 1$ la cual es reconocida por *Yersinia pseudotuberculosis*. Por otra parte, se observó que durante el proceso de infección los eritrocitos sufrían cambios morfológicos desde etapas tempranas de infección, obteniendo como resultado final la lisis de la célula (figura 1, Javier, 2006) al igual que los resultados obtenidos en el año 2002 por Feodorova y colaboradores.

Posterior a esto, en el año 2008 se evaluó la presencia de proteínas fosforiladas durante la interacción *Yersinia pseudotuberculosis*-eritrocito. En este estudio se demostró por primera vez la existencia de proteínas fosforiladas en los eritrocitos en estado basal (p125FAK). Así mismo, se mostró que los niveles de fosforilación

de dicha proteína aumentaban conforme transcurría el tiempo de infección. Complementando los dos estudios, en este último se sugiere un modelo de interacción *Yersinia*-eritrocito, donde la adhesión se lleva principalmente por la unión invasina-integrina $\beta 1$, teniendo como consecuencia un cambio en los niveles de fosforilación de la proteína p125FAK la cual a su vez podría estar involucrada en el proceso de captación bacteriana a través de la modificación del citoesqueleto de actina y la formación de la copa fagocítica que pudiera inducir la internalización de *Yersinia pseudotuberculosis* al eritrocito (Garibay, 2008).

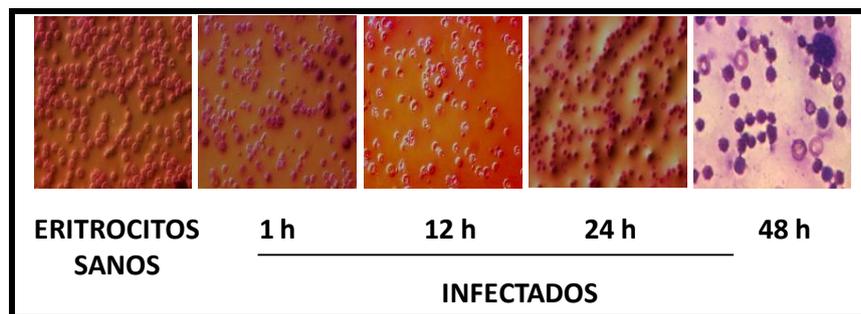


Figura 1. Cambios morfológicos de los eritrocitos durante la infección con *Y. pseudotuberculosis*. Tomado y modificado de Javier, 2006.

Como se sabe los eritrocitos son las células encargadas del transporte de oxígeno hacia todos los tejidos del organismo. Su estructura está determinada por el citoesqueleto el cual está compuesto por la unión de los filamentos de actina a diversas proteínas de la membrana plasmática (Figura 2). En sí, estas uniones son las que permiten la fluidez de los eritrocitos a través de los capilares (flexibilidad) y por otra parte, la fuerza que necesitan para mantener la integridad celular (Lodish *et al.*, 2010). Uno de los complejos estructurales más importantes del eritrocito recibe el nombre de complejo ternario. El complejo ternario está formado por la interacción del extremo N-terminal de la β -espectrina con un polímero de F-actina de 12 a 20 subunidades, donde la proteína banda 4.1 actúa como intermediario entre ambas (Mohandas y Gallagher, 2008). Este complejo se observa al microscopio como una red hexagonal (Cheng-Zhi, 1988) y actúa como un regulador de la estabilidad mecánica de la membrana, además que juega un papel muy importante en la prevención de la deformación del eritrocito bajo condiciones de estrés (Mohandas, *et al*, 2008). Algunos experimentos sugieren que factores como el calcio y el ATP pueden regular bioquímicamente la

estructura del eritrocito, afectando principalmente la unión entre las proteínas espectrina y actina. La constante de asociación entre la unión espectrina-actina es relativamente baja ($K= 5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$) cuando no se encuentra asociada la proteína banda 4.1, sin embargo, cuando se encuentra la unión espectrina-banda 4.1-actina, la constante de asociación es igual a $K= 1 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$, lo que determina la gran importancia de la proteína 4.1 en este complejo (Li *et al.*, 2007).

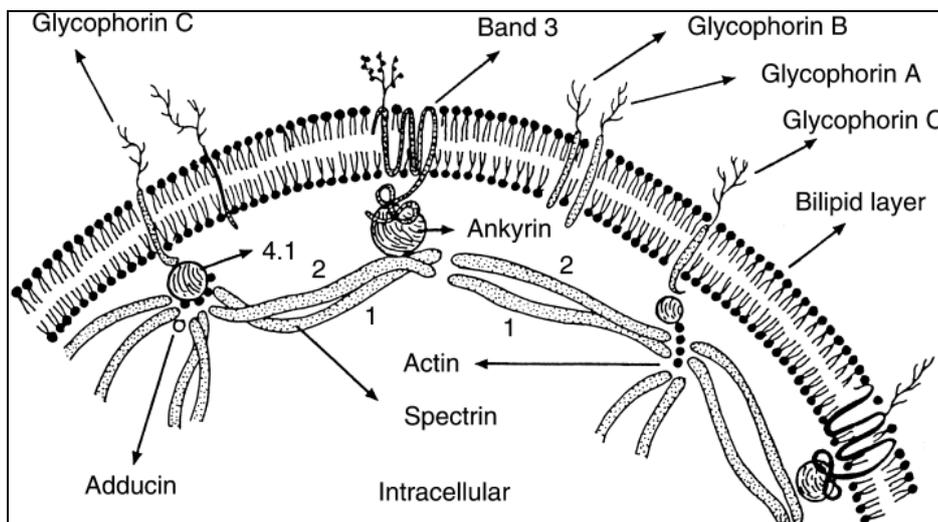


Figura 2. Citoesqueleto del eritrocito. Se observa como los filamentos de actina se encuentran unidos a diferentes proteínas de membrana. Tomado y modificado de Wrong *et al.*, 2002.

La espectrina es una proteína con dos subunidades; α y β . La subunidad α tiene un peso molecular de 250 kDa y la subunidad β de 225 kDa (Marchesi, 1983). Esta proteína es el principal componente del citoesqueleto del eritrocito la cual se extiende hasta la membrana celular manteniendo así la integridad de la célula y permitiendo que el eritrocito adopte diversas formas al atravesar los estrechos conductos capilares (Alberts *et al.*, 2002).

La proteína banda 4.1 tiene diversas isoformas que son tejido-específicas y que resultan del proceso de corte y empalme (splicing). En los eritrocitos la isoforma que se presenta es 4.1R₈₀. Esta proteína tiene como función estabilizar el canal espectrina-actina y unir al citoesqueleto con la bicapa lipídica específicamente con fosfatidilserina y fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (Perez *et al.*, 2006).

Los filamentos de actina son polímeros helicoidales de actina que se encuentran dispersos en el citoplasma pero que son más abundantes en el córtex (por debajo de la membrana plasmática), de ahí radica que una de sus funciones principales sea el transporte de compuestos a través de la superficie celular. Estos filamentos también son llamados microfilamentos ya que su diámetro oscila entre 8 y 9 nm. La actina es un polipéptido polar de 375 aminoácidos de longitud que para su polimerización necesita hidrólisis de ATP y cationes monovalentes y divalentes como K^+ y Mg^{2+} (Alberts *et al.*, 2002). La forma de las células depende más que nada de la organización de los filamentos de actina y de otras proteínas que se encuentran conectadas a la membrana plasmática, quienes reciben el nombre de “proteínas de unión a microfilamentos y membrana” (Lodish *et al.*, 2003).

El eritrocito necesita de diversas proteínas para mantener su estructura y poder entonces realizar su función la cual es única y vital para todos los seres vivos: el transporte de oxígeno. Dado que en investigaciones pasadas se ha observado que su estructura es alterada debido a la infección por *Y. pseudotuberculosis* (Figura 1) se considera necesario realizar un estudio donde se analicen los cambios en la asociación de las proteínas del citoesqueleto espectrina, banda 4.1 y actina, donde se espera observar una disminución de la asociación de dichas proteínas ya que como se menciona anteriormente, el complejo ternario es crucial para la integridad y estabilidad del eritrocito y si sufre cambios morfológicos durante el proceso infeccioso, es muy probable que el complejo ternario se encuentre alterado en este evento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Anticuerpos

Anti-actina, anti- β espectrina, anti-banda 4.1, anti-IgG-HRP (todos de Santa Cruz, Biotech).

Cepa bacteriana

Se utilizó la cepa NCTC 8315 de *Yersinia pseudotuberculosis* cuya virulencia fue corroborada en ratón BALB/c.

Modelo experimental

Se utilizaron ratones machos de la cepa BALB/c, clínicamente sanos y con un peso entre 20 y 25 g. Se manipularon de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana para el manejo de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y con la Norma Oficial Mexicana para la protección ambiental, salud ambiental y residuos peligrosos biológico infecciosos (NOM-087-ECOL-SSA1-2002).

Cada experimento se llevó a cabo por triplicado.

Cultivo bacteriano

Se realizó un pre-cultivo en 10 ml de Caldo Soya Tripticasa (CST) a partir de un cultivo que se encontraba a 4°C. Después de 24 horas de incubación a 37 °C se tomaron 100 μ l del pre-cultivo y se inocularon en 50 ml de CST el cual se incubó durante 3 horas a 37 °C. Se tomó 1 ml del cultivo y se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min para finalmente obtener el paquete bacteriano (100,000 UFC).

Vía de inoculación y sangrado de ratones

Los ratones se clasificaron en 3 grupos: control sano (6), control de inoculación (12) y grupo problema (12). Los ratones del grupo problema se inocularon por vía intraperitoneal con 100,000 UFC de *Yersinia pseudotuberculosis* contenidas en 1 ml de agua inyectable estéril.

La sangre se recolectó de la vena submandibular según la técnica reportada por Golde *et al.*, 2005. Se obtuvieron un total de 48 muestras de sangre (una por cada hora de infección) las cuales se recolectaron en tubos que contenían citrato de sodio al 5 % como anticoagulante.

El control sano no fue inoculado. Al control de inoculación se le inoculó únicamente 1 ml de agua inyectable estéril. El sangrado de estos ratones se llevó a cabo de la manera mencionada anteriormente.

Purificación de eritrocitos

Los eritrocitos se purificaron por el método de Ficoll-Hypaque (English y Andersen, 1974). Una vez obtenida la sangre se realizó una dilución 1:2 con PBS 1 X. Por otra parte, en un tubo nuevo se colocaron 300 µl de Ficoll-Hypaque y posteriormente se agregaron suavemente 300 µl de sangre diluida en PBS. Los tubos se centrifugaron a 4°C durante 15 min a 5,000 rpm. Se desechó el sobrenadante.

Lisis de eritrocitos y obtención del extracto total, fracción soluble y fracción membranal

Obtención de extracto total: Para obtener el extracto total al paquete celular se le agregaron 150 µl de buffer de lisis (Tris-HCl (pH 7.4) 10 mM, NaCl 150 mM, Tritón X-100 al 2 %, NEM 1 mM, TLCK 1 mM, PMSF 1 mM y IA 1 mM). Posteriormente se dio vortex 1 min y después reposo en hielo durante 3 min (5 repeticiones vortex-hielo).

Obtención de fracción soluble y fracción membranal: El homogeneizado se centrifugó a 4°C durante 10 min a 10,000 rpm. El sobrenadante se recolectó en un tubo nuevo (fracción soluble). Al pellet obtenido se le agregaron 150 µl de buffer de lisis y se sometió al proceso vortex-reposo en hielo mencionado anteriormente (fracción membranal).

Cuantificación de proteínas

Se llevó a cabo por el método de Bradford (Bradford, 1976) para conocer la concentración de proteína total presente en extracto total, fracción soluble y fracción membranal.

Inmunoprecipitación

La inmunoprecipitación se llevó a cabo partiendo de 1 mg de proteína total. Durante 2 h se incubó la muestra con proteína-A-agarosa a 4 °C en agitación

constante (pre-aclarado). Después se desecharon las perlas y al sobrenadante se le adicionaron 4 µl del anticuerpo primario anti-banda 4.1. Se incubó durante toda la noche a 4 °C en agitación constante. Una vez transcurrido el tiempo se incubó con la proteína-A-agarosa previamente acoplada a albumina al 2% durante 2 h a 4 °C. Se dejó sedimentar el inmunoprecipitado y se desechó el sobrenadante. El inmunoprecipitado fue lavado 5 veces con el buffer de lavado (Tris-HCl 0.05 mM (pH 7.4), NaCl 150 mM, EDTA 10 mM y Nonidet P-40 al 10 %). Una vez finalizado el lavado, se eliminó todo el residuo del buffer de lavado y se agregaron 20 µl de buffer de muestra 2X (Tris-HCl 100 mM (pH 6.8), Glicerol, β-mercaptoetanol, pironina, azul de bromofenol y SDS). Se hirvió durante 5 min, se dejó reposar 5 min en hielo y posteriormente se centrifugó a 4 °C durante 1 min a 10,000 rpm. El sobrenadante se sometió a SDS-PAGE al 7.5 %.

Electroforesis

Las muestras obtenidas del extracto total, fracción membranal y fracción soluble se sometieron a SDS-PAGE al 10%, mientras que las muestras de los inmunoprecipitados se corrieron en geles SDS-PAGE al 7.5%. La corrida se inició con un voltaje de 80 V y una vez que la muestra se encontraba en el gel separador se aumentó a 120 V. Cada gel se realizó por duplicado. El primero se tiñó con azul de Coomassie y el segundo se transfirió a membrana de nitrocelulosa.

Western blot

Una vez obtenido el gel de poliacrilamida se llevó a cabo la transferencia a una membrana de nitrocelulosa (NTC). Posteriormente se bloqueó la membrana incubándose con PBS leche al 2 % durante 2 h a temperatura ambiente y en agitación constante. Una vez transcurrido el tiempo se dieron 10 lavados con PBS 1 X durante 10 min cada uno.

Se adicionó el anticuerpo primario diluido en PBS (anti-espectrina 1:250, anti-actina 1:500 ó anti-banda 4.1 1:250) y se incubó durante toda la noche a 4 °C en agitación constante. Para eliminar el exceso de anticuerpo se dieron 10 lavados con PBS 1X y posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario durante 1 h a 37°C en agitación constante. Se dieron 10 lavados con PBS 1 X y finalmente se reveló por quimioluminiscencia.

Análisis densitométrico

Las bandas obtenidas se sometieron al software Sigma-plot y posteriormente se graficaron considerando unidades arbitrarias de intensidad neta contra tiempo de infección (h). Los resultados de cada experimento fueron promediados y reportados en porcentaje

RESULTADOS

En la Figura 3 se muestran las tres proteínas de interés para este estudio. La espectrina con sus dos isoformas α y β con un peso de 250 y 225 kDa respectivamente, banda 4.1 con un peso aproximado de 85 kDa y la actina con un peso de 45 kDa. Es importante mencionar que dichas proteínas pueden señalarse con seguridad ya que el perfil de proteínas del eritrocito está ampliamente estudiado y caracterizado (Orlacchio *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2007). En esta figura también se muestran los perfiles de proteínas del extracto total, la fracción soluble y la fracción membranal, destacando que en cada una de ellas se cargó una concentración de 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteína total. Puede observarse que las proteínas se encuentran en mayor concentración en la fracción membranal.

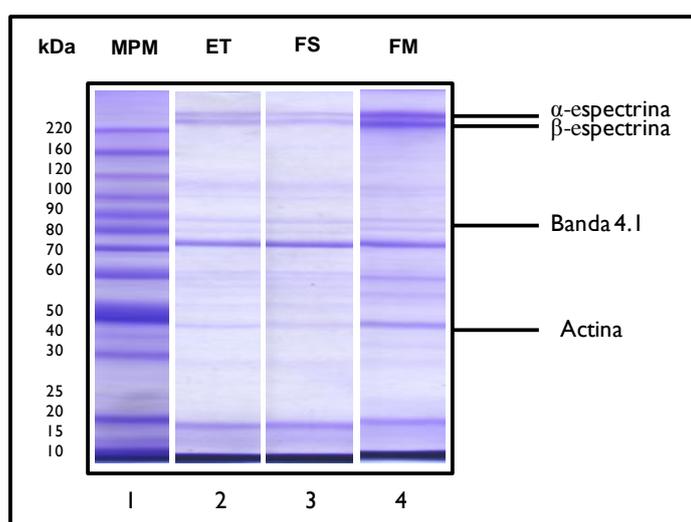


Figura 3. Perfil de proteínas en eritrocito sano. 1) Marcador de peso molecular. 2) Extracto total. 3) Fracción soluble. 4) Fracción membranal. Se lisaron los eritrocitos para obtener las tres fracciones: ET, FS Y FM. Se cargó en cada carril 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteína total en SDS-PAGE al 10 %. Técnica de tinción: azul de Coomassie.

Una vez obtenidos los perfiles de proteínas se realizó inmunodetección en fase sólida para espectrina, banda 4.1 y actina en las tres fracciones del eritrocito sano (Figura 4). Las tres proteínas se encontraron tanto en el extracto total, la fracción soluble y la fracción membranal. Puede observarse que la espectrina y la actina se encontraron en mayor concentración en la fracción membranal, seguidas del extracto total y finalmente la fracción soluble. Por otra parte, la proteína banda 4.1 parece mantenerse constante en las tres fracciones. Estos resultados coinciden con los perfiles de proteínas presentados en la Figura 3.

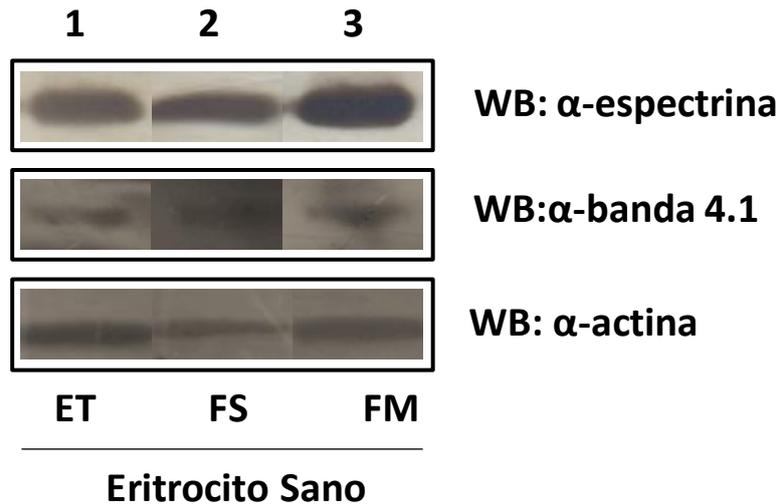


Figura 4. Inmunodetección de espectrina, banda 4.1 y actina en eritrocito sano. 1) Extracto total. 2) Fracción soluble. 3) Fracción membranal. Las diferentes fracciones se sometieron a SDS-PAGE, las proteínas se transfirieron a membrana de nitrocelulosa, se incubaron durante toda la noche con el anticuerpo primario diluido en PBS 1X (anti-espectrina 1:250, anti-banda 4.1 1:250 y anti-actina 1:500). Técnica: quimioluminiscencia.

Una vez obtenido el perfil de proteínas en el eritrocito sano se prosiguió con la evaluación de los cambios en la concentración de las tres proteínas de interés conforme transcurría el proceso infeccioso. Para ello se elaboraron y tiñeron 48 geles correspondientes a las 48 h de infección, cada uno con las tres fracciones. Una vez que se obtuvo el perfil de proteínas de las 48 h de infección se seleccionaron cuidadosamente las bandas correspondientes a cada proteína y se sometieron a un análisis densitométrico. Los resultados indicaron alteraciones de las tres proteínas en cada una de las fracciones (ET, FS Y FM), sin embargo, dado que en los eritrocitos el citoesqueleto está compuesto por las proteínas de membrana, se decidió enfocar los siguientes resultados únicamente hacia la fracción membranal, tomando como base que la concentración obtenida de cada una de las proteínas del eritrocito sano representaba el 100%.

En la Figura 5 se muestran los cambios que sufrió la α -espectrina. Puede observarse que durante las primeras horas de infección se incrementó la concentración hasta en un 40.5% (12 h), sin embargo, a la hora 13 ésta disminuyó un 73.2% y aunque en las siguientes horas hubo ligeros aumentos, a la hora 48 hubo una pérdida total del 68.5% en comparación con el control sano.

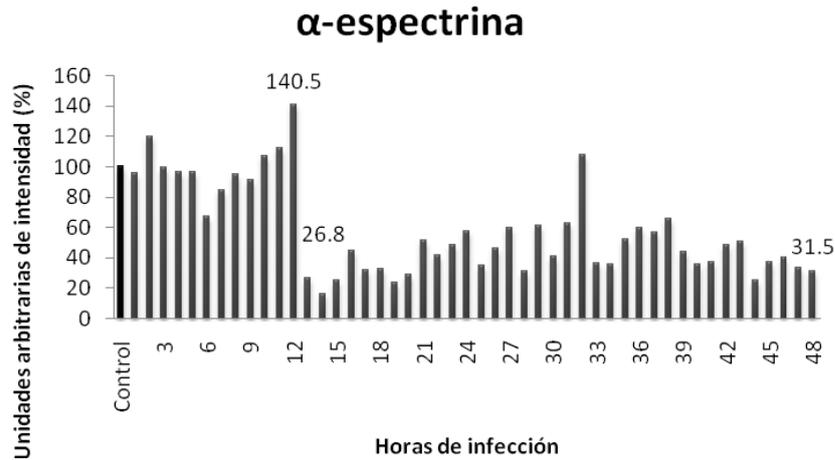


Figura 5. Cambios en la concentración de alfa-espectrina en la fracción membranal durante el proceso infeccioso provocado por *Yersinia pseudotuberculosis*.

Un comportamiento similar se observó con la β-espectrina. Como se muestra en la Figura 6 a las primeras horas de infección también se observó un aumento de la β-espectrina, donde para la cuarta hora de infección se observó casi el doble de la concentración que en el control negativo. Sin embargo, de nueva cuenta el proceso infeccioso provocó que a la hora 13 la concentración disminuyera en un 91.3% respecto al eritrocito sano. A partir de la hora 16 se observó un ligero aumento de la β-espectrina, sin embargo, para la hora 48 la pérdida total fue de 75.1% en comparación con el eritrocito sano.



Figura 6. Cambios en la concentración de beta-espectrina en la fracción membranal durante el proceso infeccioso provocado por *Yersinia pseudotuberculosis*.

En la figura 7 podemos observar como la proteína banda 4.1 a la segunda hora de infección disminuyó más del 50 % en comparación con el control. A la hora 13 se observó una pérdida del 68.1% sin embargo, para la hora 28 hubo un incremento casi del 100%. A pesar de esto, a la última hora de infección la proteína banda 4.1 tuvo una pérdida total del 76.6% en comparación con el control negativo.

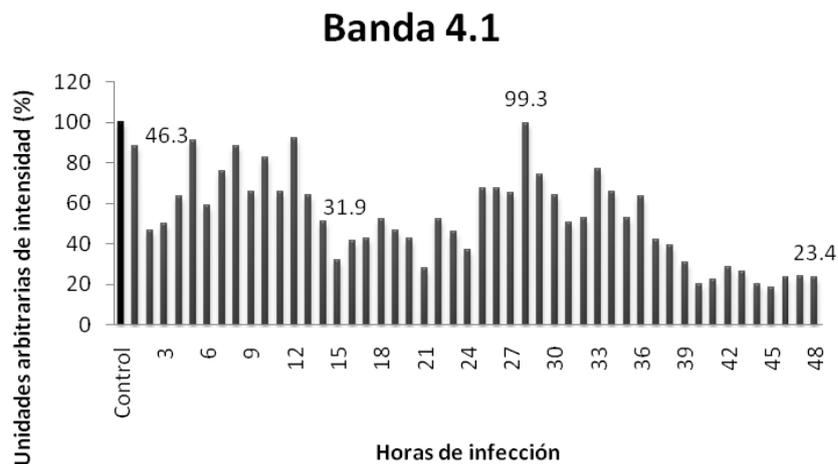


Figura 7. Cambios en la concentración de banda 4.1 en la fracción membranal durante el proceso infeccioso provocado por *Yersinia pseudotuberculosis*.

En la figura 8 se muestran los resultados referentes a la actina. Puede observarse que esta proteína también sufrió numerosas alteraciones ya que a la tercer hora de infección disminuyó un 66.7%, mientras que a la hora 7 tuvo un incremento mayor a la del control sano. A partir de este punto la actina mostró fluctuaciones pero a partir de la hora 40 se observó una concentración aparentemente constante hasta llegar a la última hora de infección con una pérdida total del 58.2% en comparación con el control sano.

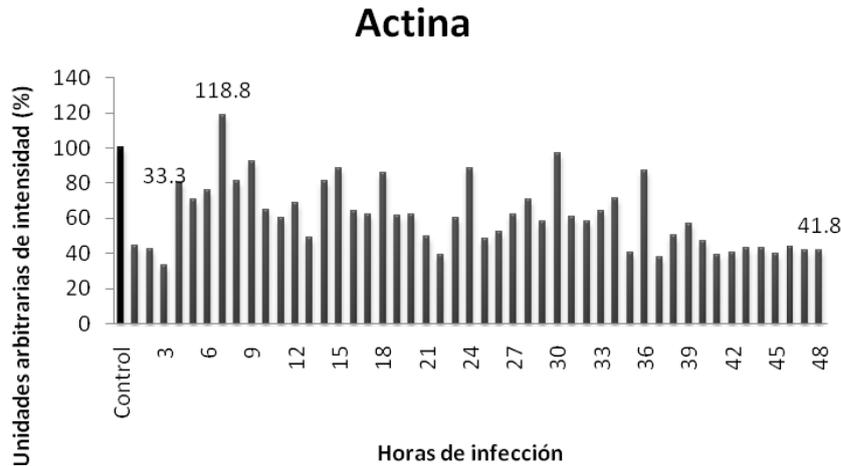


Figura 8. Cambios en la concentración de actina en la fracción membranal durante el proceso infeccioso provocado por *Yersinia pseudotuberculosis*.

Con los resultados obtenidos en las figuras 5, 6 7 y 8 es evidente que las tres proteínas de interés presentaron diversas variaciones en su concentración durante todo el proceso infeccioso donde al final de la infección, las tres proteínas disminuyeron notablemente su concentración en comparación con la encontrada en los eritrocitos sanos.

En los ensayos de inmunoprecipitación (Figura 9) tanto la espectrina como la actina fueron detectadas en los eritrocitos sanos (carril 1), sin embargo, en los eritrocitos infectados se observaron variaciones (carriles 2 y 3). Puede observarse que a las 12 horas de infección la intensidad y el grosor del bandeo tanto para la espectrina como para la actina, disminuyó notablemente en comparación con los controles (75 y 80% respectivamente) mientras que a las 24 horas de infección ninguna de las dos proteínas pudo ser detectada.

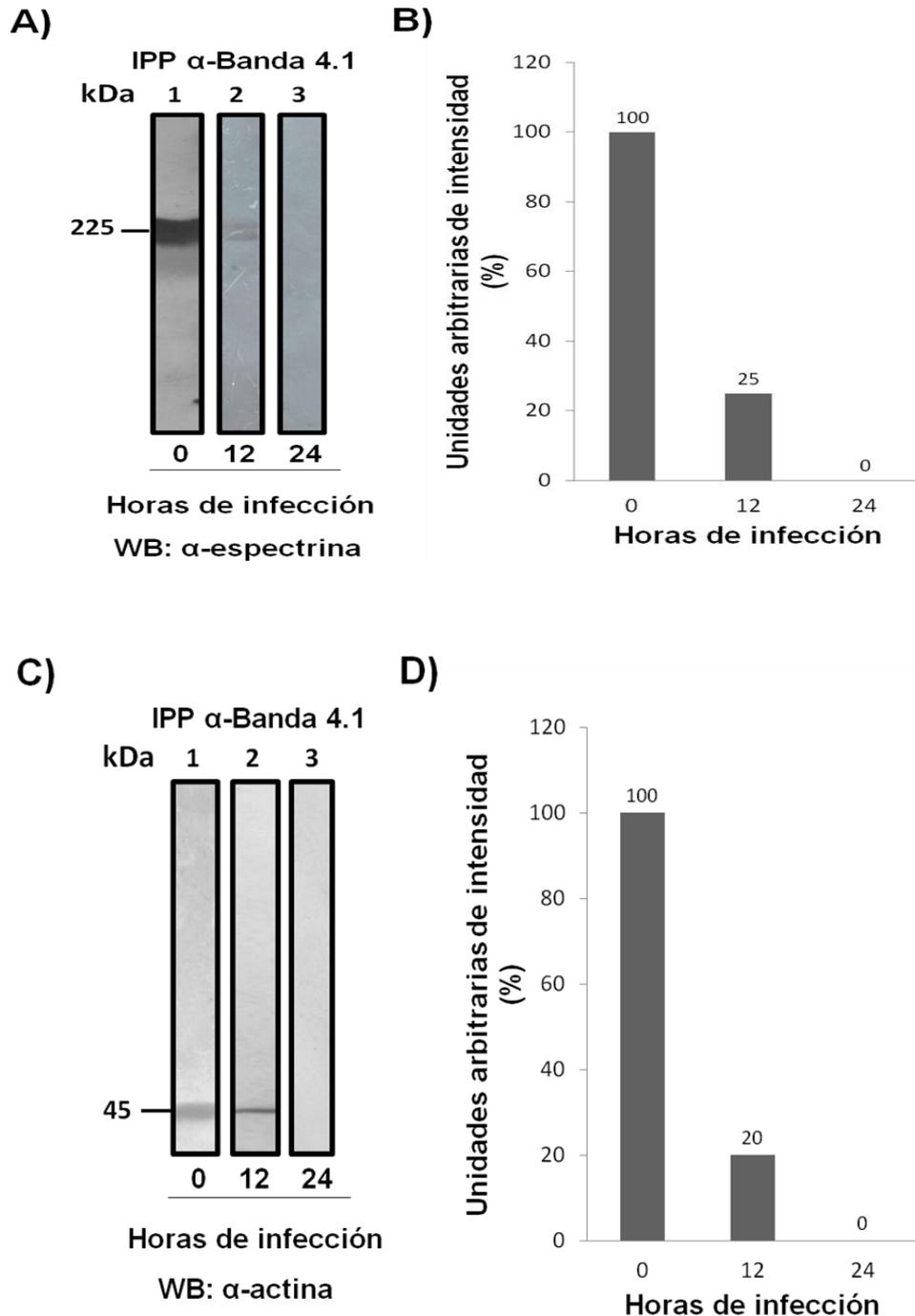


Figura 9. Asociación de las proteínas espectrina, banda 4.1 y actina en eritrocito de ratón sano e infectado con *Yersinia pseudotuberculosis*. Extracto total inmunoprecipitado con anti-banda 4.1. Posteriormente se realizó un SDS-PAGE al 7.5% y se llevó a cabo una transferencia a membrana de nitrocelulosa. Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo anti-espectrina dilución 1:250 (A) y anti-actina dilución 1:500 (C). Revelado por quimioluminiscencia. B) Análisis densitométrico del panel A. D) Análisis densitométrico del panel C.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los eritrocitos son células sanguíneas cuya función es el transporte de oxígeno hacia todos los tejidos del organismo. En los humanos tienen una vida media de 120 días y miden aproximadamente 7.5 μm de diámetro, mientras que los conductos capilares miden aproximadamente de 2 a 3 μm (Benz, 2010). Estas diferencias de tamaño exigen una estructura celular lo más perfecta posible, aquella que le otorgue estabilidad al eritrocito pero también rigidez y flexibilidad al mismo tiempo, lo cual es posible gracias a las proteínas que conforman el citoesqueleto del eritrocito. El citoesqueleto es el responsable de las diferentes formas que adopta la célula y está compuesto por filamentos de actina unidos fuertemente a diversas proteínas de la membrana plasmática como espectrina, banda 4.1, actina, banda 3, ankirina, tropomodulina, tropomiosina, dematina, aducina, entre otras (Mohandas y Gallagher, 2008). A simple vista el eritrocito pareciera una célula simple y sencilla, sin embargo, existen numerosos estudios físicos (Borghini y Wyart, 2007) y matemáticos (Park *et al.*, 2010) donde se evalúan y proponen modelos para poder comprender cómo una célula puede ejercer una función tan vital bajo las condiciones de tensión que experimenta.

En este estudio se analizó la concentración y la asociación de tres proteínas del citoesqueleto las cuales conforman el complejo ternario, espectrina, banda 4.1 y actina. La espectrina forma filamentos los cuales proveen estabilidad y soporte mecánico a la membrana celular. Estos filamentos interactúan directamente con los filamentos de actina y otras proteínas como banda 4.1, aducina y ankirina, unión que permite conectar el canal espectrina-actina con la membrana plasmática (Bennett y Baines, 2001). La proteína banda 4.1 es esencial para mantener la forma del eritrocito y las propiedades mecánicas de la membrana. Su función principal es estabilizar el canal espectrina-actina y mediar la unión con los fosfolípidos de la membrana plasmática (Orlacchio *et al.*, 2007).

En primera instancia se analizó la concentración de las proteínas espectrina, banda 4.1 y actina en los eritrocitos sanos para posteriormente compararlas con la concentración de dichas proteínas en los eritrocitos infectados. En la Figura 3 puede observarse que las tres proteínas se encuentran en mayor concentración en la fracción membranal lo cual era de esperarse debido a que la mayoría de las

proteínas presentes en el eritrocito son proteínas de membrana. En la figura 5 y en la Figura 6 se puede apreciar como la concentración de la α y la β -espectrina incrementó a las 12 horas de infección un 40.5% y 85.5% respectivamente, para posteriormente disminuir a las 13 horas de infección hasta un 73.2 y 91.3% respectivamente. A partir de este punto la espectrina presentó fluctuaciones sin embargo puede observarse con claridad que a las 48 horas de infección hubo una pérdida total del 68.5% y 75.1% para la α y la β -espectrina respectivamente. Por otra parte, en la figura 7 y en la figura 8 podemos observar el comportamiento de la proteína banda 4.1 y la actina respectivamente. A diferencia de la espectrina donde en las primeras horas de infección se muestra un incremento de la concentración y posteriormente una disminución, para el caso de las proteínas banda 4.1 y la actina se muestran gran cantidad de fluctuaciones donde aumentan y disminuyen continuamente, sin embargo, al final del proceso infeccioso (48 horas de infección) estas proteínas disminuyeron notablemente su concentración en comparación con los controles 76.6% y 58.2% respectivamente. Con estos resultados se confirma que durante el proceso infeccioso provocado por *Y. pseudotuberculosis* las proteínas espectrina, banda 4.1 y actina disminuyeron notablemente su concentración en comparación con la encontrada en los eritrocitos sanos.

Por su naturaleza los eritrocitos son las células que se encuentran mayormente expuestas al estrés oxidativo y dado que no cuentan con un sistema de reparación eficiente necesitan ser removidos frecuentemente del torrente sanguíneo lo cual se logra gracias a la fagocitosis mediada por los macrófagos. En los humanos aproximadamente el 1% de los eritrocitos totales es removido cada día, en los roedores se presume podría ser del 2% (Saxena y Khandelwal, 2009), pero específicamente se sabe que en los ratones BALB/c la vida media de los eritrocitos es tan solo de 39.3 días y que aproximadamente el 46.2% de los eritrocitos son considerados potenciales peligrosos (Horký *et al.*, 1978). Resulta sorprendente que a pesar de la alta tasa de rotación que presentan los eritrocitos, la infección haya dominado sobre este fenómeno lo cual provocó la disminución en la concentración de las tres proteínas de interés: espectrina, banda 4.1 y actina. Estos resultados podrían estar relacionados con la gran capacidad que tiene *Yersinia pseudotuberculosis* para evadir la respuesta inmunológica ya que como se mencionó anteriormente, los macrófagos son los responsables de

fagocitar a los eritrocitos dañados y si por algo se caracteriza *Yersinia* es por su habilidad para evadir la fagocitosis y debilitar a los macrófagos mediante las proteínas efectoras Yops (Bi *et al.*, 2008)

Estos resultados nos llevan a suponer que las alteraciones morfológicas encontradas por Javier en el año 2006 se deben muy probablemente a la disminución que sufren las proteínas del complejo ternario el cual como ya se mencionó anteriormente es el responsable de dar integridad y estabilidad al eritrocito, por lo tanto, si dichas proteínas se encuentran en menor proporción a la presente en los eritrocitos sanos, es de suponer que la membrana del eritrocito sufrió entonces cambios morfológicos, aunque si bien es cierto, no podríamos establecer que este sea el único factor. Para confirmar los resultados anteriores se procedió a evaluar la asociación de las mismas proteínas mediante la técnica de inmunoprecipitación. En primera instancia se evaluó la asociación de la proteína banda 4.1 con la espectrina y posteriormente de la proteína banda 4.1 con la actina en el extracto total de los eritrocitos sanos e infectados a las 0, 12 y 24 h de infección. En la Figura 9 podemos observar que tanto la espectrina como la actina fueron detectadas en los eritrocitos sanos (carril 1), sin embargo, en los eritrocitos infectados se observaron variaciones (carriles 2 y 3). Puede observarse que a las 12 horas de infección la intensidad y el grosor del bandeo tanto para la espectrina como para la actina, disminuyó notablemente en comparación con los controles (75% y 80% respectivamente) mientras que a las 24 horas de infección ninguna de las dos proteínas pudo ser detectada.

En las figuras 5 y 6, a las 12 horas de infección hubo un incremento significativo de la espectrina en comparación con los controles, motivo por el cual se decidió analizar esta hora de infección para conocer si este incremento estaba involucrado con la asociación del complejo ternario, sin embargo, los resultados obtenidos mostraron que aunque a las 12 horas de infección hubiera mayor concentración de espectrina, esto no significaba que hubiera una mayor asociación ya que como se muestra en la Figura 9, la asociación de la banda 4.1 con la espectrina disminuyó un 75 % (A y B), mientras que la asociación de banda 4.1 con la actina disminuyó 80% (C y D) en comparación con los controles. También se realizaron ensayos de Ipp con los extractos totales a las 24 horas de infección, sin embargo, en este caso la asociación no pudo ser detectada, por lo que podemos concluir que la asociación del complejo ternario se ve afectada

radicalmente con el proceso infeccioso y con ello podemos darle una explicación molecular a los cambios morfológicos encontrados en los eritrocitos por Javier Reyna en el año 2006, que como puede observarse en la figura 1, son cambios morfológicos muy severos, los cuales incrementan conforme transcurre el tiempo de infección. Dado que el ATP y el Ca^{2+} son factores que regulan la asociación de banda 4.1 con las proteínas espectrina y actina (Li *et al.*, 2007), es muy probable que durante el proceso infeccioso se hayan alterado los niveles de estos dos factores y esto haya contribuido directamente en la disociación del complejo ternario.

Gracias a los antecedentes reportados por Tarone en el año 1979 y Marchesi en el año 1983 respecto a la presencia de proteasas en los eritrocitos, ya se cuenta con resultados preliminares en nuestro grupo de trabajo los cuales señalan la presencia de proteasas en los eritrocitos. Por otra parte, en un estudio realizado por Dominguez en el año 2009 se demostró que *Yersinia pseudotuberculosis* cuenta con diversas proteínas con actividad proteolítica las cuales puede secretar durante el proceso infeccioso, motivo que nos permite proponer el siguiente modelo (Figura 10). Durante la infección con *Yersinia pseudotuberculosis* se ha demostrado que los eritrocitos sufren cambios morfológicos (Javier, 2006) los cuales se deben principalmente a la disminución y disociación de las proteínas que conforman el complejo ternario. En estado basal el eritrocito se encuentra íntegro y estable (Figura 10a) sin embargo, en etapas tempranas de infección *Yersinia pseudotuberculosis* provoca alteraciones en la membrana celular debido a la disminución en la concentración y en la asociación de las proteínas del complejo ternario (Figura 10b), fenómeno que se ve agravado conforme transcurre el tiempo de infección y que resulta en la lisis total del eritrocito. En esta última etapa las proteínas del complejo ternario que ya no se encuentran asociadas o polimerizadas son degradadas por las proteasas que se presume se encuentran presentes en los eritrocitos ó bien, por las proteasas secretadas por *Yersinia pseudotuberculosis* durante el proceso infeccioso (Figura 10c).

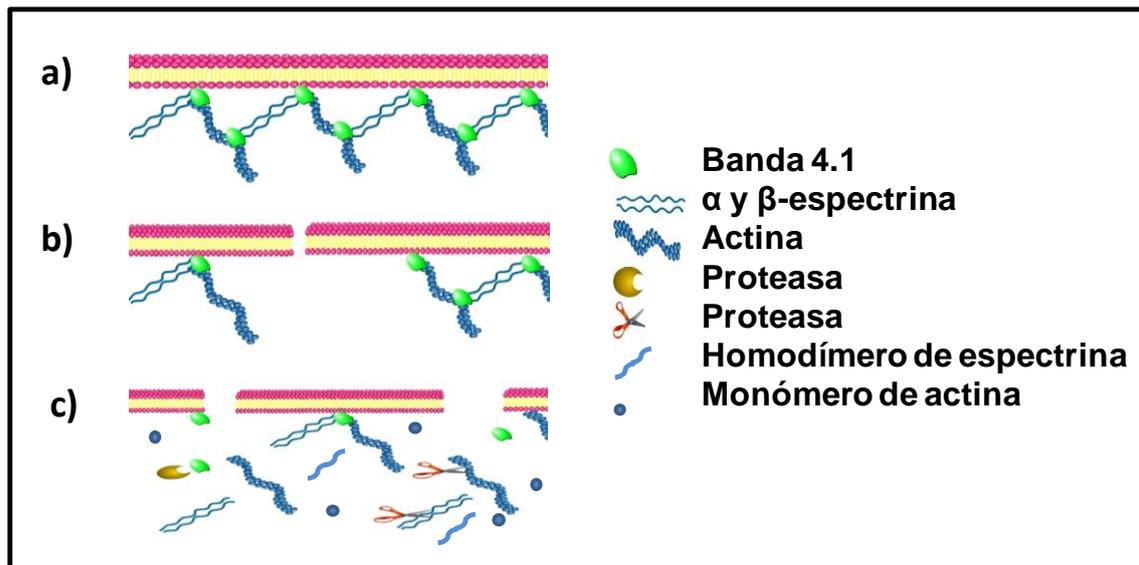


Figura 10. Disociación del complejo ternario en los eritrocitos infectados con *Yersinia pseudotuberculosis*. **a)** En el eritrocito sano se encuentran asociadas las proteínas espectrina, banda 4.1 y actina formando el complejo ternario el cual le da integridad y soporte a la membrana celular. **b)** A las primeras horas de infección comienzan a disociarse las proteínas del complejo ternario lo cual ocasiona rompimiento de la membrana y por lo tanto cambios morfológicos en el eritrocito. **c)** En las etapas tardías de la infección el eritrocito sufre cambios morfológicos severos debido a la disociación completa del complejo ternario. Los polímeros de actina se disocian así como los heterodímeros formados por la α y β -espectrina. Las proteínas del complejo ternario muy probablemente son degradadas por las proteasas que se presume se encuentran presentes en los eritrocitos ó por las proteasas segregadas por *Yersinia pseudotuberculosis*.

En conclusión, en este estudio se demuestra por primera vez que las proteínas pertenecientes al complejo ternario disminuyen y se disocian durante el proceso infeccioso provocado por *Yersinia pseudotuberculosis*, lo cual explica los cambios morfológicos de los eritrocitos reportados por nuestro grupo de trabajo (Javier en el año 2006) y todo lo cual contribuye al conocimiento de la interacción *Yersinia*-eritrocito.

Se considera importante estudiar la participación de las proteasas en los cambios morfológicos del eritrocito durante el proceso infeccioso así como la participación de proteínas tirosina fosfatasa, ya que en otros tipos celulares se ha demostrado que estas moléculas alteran la morfología celular.

REFERENCIAS

- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Watson J.D. 2002. *Biología Molecular de la Célula*. Tercera edición. Barcelona. Omega. 855-924.
- Bennett V. and Baines AJ. 2001. Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiol Rev.* 81(3). 1353-92.
- Bi Y., Du Z., Han Y., Guo Z., Tan Y., Zhu Z. y Yang R. 2008. *Yersinia pestis* and host macrophages: immunodeficiency of mouse macrophages induced by YcW. *Immun.* 128. 406-417.
- Boyle E.C. & Finlay B.B. 2003. Bacterial pathogenesis: exploiting cellular adherence. *Curr Opin Cell Biol.* 15, 633–639.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem.* 72. 248-254.
- Benz E.J. 2010. Learning about genomics and disease from the anucleate human red blood cell. *J Clin Inves.* 120 (12). 4204-4206.
- Borghini N. & Brochard-Wyart F. 2007. Tether extrusion from Red Blood Cells: Integral Proteins Unbinding from Cytoskeleton. *Biophys J.* 93(4). 1369-1379.
- Carlsson K.E., Liu J., Edqvist P.J. & Francis M.S. 2007. Influence of the Cpx extracytoplasmic-stress-responsive pathway on *Yersinia* sp. eukaryotic cell contact. *Inf Immun.* 75 (9). 4386-4399.
- Chen H., Khan A., Liu F., Gilligan D., Peters L., Messick J., Hascheck-Hoch W., Li X., Ostafin A. and Chishti A. 2007. *J Biol Chem.* 282 (6). 4124-4135.
- Cheng-Zhi J. 1988. Dynamics of membrane skeleton in fused red cell membranes. *Medical Research Council Cell Biophysics Unit, King's College.* 93-97.
- Dominguez T., Talamás P. Y Flores D. 2009. *Yersinia pseudotuberculosis*: Secreción de proteasas. VI encuentro Participación de la mujer en la ciencia.
- English D. and Andersen BR. 1974. Single-step separation of red blood cells, granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque. *J Immunol.* 5 (3). 249-252.
- Feodorova V.A. and Devdariani L. 2002. The interaction of *Yersinia pestis* with erythrocytes. *J Med Microbiol.* 51. 150-8.
- Garibay O.L. 2008. Niveles de fosforilación en tirosina en eritrocitos de ratón BALB/c durante un proceso infeccioso provocado por *Yersinia pseudotuberculosis*. [tesis maestría]. Chilpancingo, Guerrero. Universidad Autónoma de Guerrero.
- Golde W.T., Gollubin P. and Rodriguez L.L. 2005. A rapid, simple, and humane method for submandibular bleedinf of mice using a lancet. *Lab Anim.* 34 (9). 3
- Heise T. & Dersch P. 2005. Identification of a domain in *Yersinia* virulence factor YadA that is crucial for extracellular matrix-specific cell adhesion and uptake. *PNAS.* 103 (9). 3375-3380.
- Horký J., Vácha J. & Znojil V. 1978. Comparison of life span of erythrocytes in some inbred strain of mice using ¹⁴C-labelled glycine. *Physiol Bohemoslov.* 27(3). 209-217.

- Hudson K.J. & Bouton A.H. 2006. *Yersinia pseudotuberculosis* adhesins regulate tissue-specific colonization and immune cell localization in a mouse model of systemic infection. *Inf Immun.* 74 (11). 6487–6490.
- Jani A.A. & Chen P. 2008. *Pseudotuberculosis (Yersinia)*. Consultado el 13 Noviembre del 2009, de: <http://emedicine.medscape.com/article/226871-overview>
- Javier R. 2006. Identificación del receptor integrina $\beta 1$ en la interacción *Yersinia pseudotuberculosis*-eritrocito como modelo de infección sistémica. [tesis maestría]. Chilpancingo, Guerrero. Universidad Autónoma de Guerrero.
- Li J., Lykotrafitis G., Dao M. & Suresh S. 2007. Cytoskeletal dynamics of human erythrocyte. *PNAS.* 104 (12). 4937–4942.
- Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C.A., Krieger M., Scott M.P., Zipursky L. & Darnell J. *Molecular Cell Biology*. 5ta. Edición. W.H. Freeman Company. New York. 2010.
- Marchesi V.T. 1983. The red cell membrane skeleton: recent progress. *Blood*, 61. 1-11.
- Mohandas N. & Gallagher P.G. 2008. Red cell membrane: past, present, and future. *Blood*, 112. 3939-3948.
- Olsson J. 2006. Delivery of Type III Secreted toxins by *Yersinia pseudotuberculosis*- the role of LcrV, YopD, and free lipids in the translocation process [tesis doctoral]. Umeå Sweden. Universidad de Umeå.
- Orlacchio A., Calabresi P., Rum A., Tarzia A., Salvati A., Kawarai T., Stefani A., Pisani A., Bernardi G., Cianciulli P. and Caprari P. 2007. Neuroacanthocytosis associated with a defect of the 4.1R membrane protein. *Neurol.* 7 (4). 1-8.
- Park Y., Best C., Badizadegan K., Dasari R., Feld M., Kuriabova T., Henle M., Levine A. & Popescy G. 2010. Measurement of red blood cell mechanics during morphological changes. *PNAS.* 107(15). 6731-6736.
- Perez C.M., Lospitao E. & Correias I. 2006. Protein 4.1R self-association: identification of the binding domain. *Biochem J.* 400. 457-465.
- Saxena R.K. & Khandelwal . 2009. Aging and destruction of blood erythrocytes in mice. *Curr Sci.* 97 (4). 500-507.
- Tarone G, Hamasaki N, Fukuda M, Marchesi VT. 1979. Proteolytic degradation of human erythrocyte band 3 by membrane-associated protease activity. *J Memb Biol.* 29;48(1):1-12.
- Wrong O., Bruce L., Unwin R., Toye A. and Tanner M. 2002. Band 3 mutations, distal renal tubular acidosis, and Southeast Asian ovalocytosis. *Kidney Int.* 2002 (62). 10–19
- Yuan M. 2006. Antiphagocytosis by *Yersinia pseudotuberculosis* –role of the YopH target proteins [tesis doctoral]. Umeå Sweden. Universidad de Umeå.