

Tlamati Sabiduría



Efecto de la infección por *Yersinia pseudotuberculosis* sobre la morfología, activación de Rac y RhoA de eritrocitos de ratón BALB/c

Jonathan Cisneros-Pano¹
Patricia Talamás-Rohana²
Argelia Poblete-Mayo²
Dulce María Vega-Rodríguez¹
Julia Flores-de la Cruz¹
Donaciano Flores-Robles^{2*}

¹Centro de investigación especializada en microbiología, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Guerrero. Ex Rancho El Shalako, Carretera Nacional Chilpancingo-Petaquillas, Col. Las Colinas, 39115, Petaquillas, Guerrero, México.

²Departamento de Biología celular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional. Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, San Pedro Zacatenco, 07360, Ciudad de México, México.

*Autor de correspondencia

floresrd@hotmail.com

Resumen

Yersinia pseudotuberculosis es una bacteria Gram negativa considerada como un patógeno intracelular facultativo distribuida ampliamente en la naturaleza y responsable de síndromes gastrointestinales en diferentes especies. La bacteria es capaz de atravesar el epitelio gastrointestinal y evadir la respuesta inmune para causar infecciones localizadas. Entre las proteínas involucradas en la internalización de *Y. pseudotuberculosis* se encuentran las GTPasas Rac y RhoA, quienes participan en procesos de estructuración del citoesqueleto. Se ha observado que la bacteria interacciona con eritrocitos murinos causando deformaciones de la membrana, culminando en la lisis de los eritrocitos, pero se desconocen las causas que provocan estos eventos. En eritrocitos de ratones BALB/c infectados por *Y. pseudotuberculosis*, se analizó la morfología empleando microscopía confocal, además se midió la activación Rac y RhoA.

Información del Artículo

Cómo citar el artículo:

Cisneros-Pano, J., Talamás-Rohana, P., Poblete-Mayo, A., Vega-Rodríguez, D.M., Flores-de-la-Cruz, J., Flores-Robles, D. (2023). Efecto de la infección por *Yersinia pseudotuberculosis* sobre la morfología, activación de Rac y RhoA de eritrocitos de ratón BALB/c. *Tlamati Sabiduría*, 15, 82-89.

Editores Invitados: Dr. Carlos Ortuño-Pineda; Dra. Mayrut Osdely Urióstegui-Acosta

Recibido en la versión aceptada por los editores invitados: 19 de marzo 2023; Publicado: 23 de septiembre 2023



Se observaron cambios en la estructuración de actina en el citoesqueleto. Los niveles de activación de las GTPasas Rac y RhoA se encontraron incrementadas, además de observarse cambios en el perfil de proteínas fosforiladas en los eritrocitos de ratones infectados por *Y. pseudotuberculosis*. La interacción de los eritrocitos con *Y. pseudotuberculosis* genera cambio en la estructuración de actina del citoesqueleto del eritrocito, así como un incremento en la activación de Rac y RhoA, además, se incrementa la generación de ROS y se modifica el perfil de fosforilación de proteínas de los eritrocitos.

Palabras clave: Fosforilación, GTPasas, Rac, RhoA, *Yersinia pseudotuberculosis*.

Abstract

Yersinia pseudotuberculosis is a Gram negative bacteria considered a facultative intracellular pathogen, widely distributed in nature and responsible for gastrointestinal syndromes in different species. The bacterium is able to cross the gastrointestinal epithelium and evade the immune response to cause localized infections. Among the proteins involved in the internalization of *Y. pseudotuberculosis* are the Rac and RhoA GTPases, those involved in cytoskeletal structure processes and generate ROS oxidize phosphatases deregulating the basal phosphorylation of the cytoskeleton. It has been observed that bacteria interacts with murine erythrocytes causing deformation of the membrane, culminating in the lysis of erythrocytes, but the causes of these events are known. Erythrocytes of infected BALB / c mice by *Y. pseudotuberculosis*, morphology was analyzed using confocal microscopy further activation of Rac and RhoA was measured, and the production of ROS and changes in the phosphorylation profile. There were changes in the structuring of actin from cytoskeleton. Levels of activation of Rac and RhoA GTPases found increased further to meet changes in the profile of phosphorylated proteins in erythrocytes of infected mice with *Y. pseudotuberculosis*. Erythrocyte interaction with *Y. pseudotuberculosis* generates change in the cytoskeleton actin structuring, increased activation of Rac and RhoA also ROS generation is increased and the phosphorylation profile of erythrocyte proteins is modified

Keywords: Phosphorylation, GTPases, Rac, RhoA, *Yersinia pseudotuberculosis*.

Introducción

El género *Yersinia* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, comprende bacilos Gram negativos no esporulados. De las 17 especies existentes, 3 son patógenas para el ser humano: *Y. pestis* es causante de la fiebre bubónica; *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis* son responsables de síndromes gastrointestinales. La transmisión al hombre se debe a la picadura de pulgas presentes en animales infectados en el caso de *Y. pestis*, mientras que *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis* se transmiten por la ingesta de alimentos y/o bebidas contaminadas con excretas de organismos infectados (El-Maraghi y Mair, 1979; Bergsbaken y Cookson, 2009).

Las GTPasas son proteínas de señalización intracelular, miembros de la familia Rho y de la

superfamilia Ras, las cuales cambian entre su forma inactiva unida a GDP y su forma activa unida a GTP con el fin de regular múltiples vías involucradas en la organización celular actomiosina, la adhesión y la proliferación. Se ha demostrado que estas enzimas desempeñan funciones únicas en las células hematopoyéticas sanguíneas.

Las proteínas Rac, unidas a GDP inactivas, son secuestradas en el citosol por inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina (GDIs) que se unen a la región hidrofóbica C-terminal de Rac, la misma región que es responsable de la unión de Rac a la membrana plasmática. Se ha visto que la deficiencia concomitante de Rac1 y Rac2 causa una profunda perturbación de la actina polimerizada y una deformabilidad anormal del citoesqueleto de los eritrocitos, indicando una

regulación dinámica de la organización del citoesqueleto de los eritrocitos (Pantaleo *et al.*, 2010a).

Y. pseudotuberculosis es una bacteria Gram negativa, considerada como un patógeno intracelular facultativo, distribuido ampliamente en la naturaleza, además, es responsable de síndromes gastrointestinales en diferentes especies. La bacteria es capaz de atravesar el epitelio gastrointestinal y evadir la respuesta inmune para causar infecciones localizadas. Entre las proteínas involucradas en la internalización de *Y. pseudotuberculosis* se encuentran las GTPasas Rac y RhoA, quienes participan en procesos de estructuración del citoesqueleto. Se ha observado que la bacteria interacciona con eritrocitos murinos causando deformaciones de la membrana, culminando en la lisis de los eritrocitos, pero se desconocen las causas que provocan estos eventos. En este trabajo analizamos a nivel morfológico y funcional el efecto de la interacción de *Y. pseudotuberculosis* con eritrocitos de ratón, abordando aspectos tales como (i) la morfología de los eritrocitos empleando microscopia confocal (ii), la actividad de las GTPasas Rac.

Materiales y métodos

Se utilizaron ratones hembras de la cepa BALB/c, de 20-25 g de peso (4-6 semanas de edad). Se utilizó un número total de 20 animales que fueron divididos aleatoriamente en los diferentes grupos (control n=10 e infectado n=10); para cada análisis se usaron grupos independientes. La cepa que se utilizó fue *Y. pseudotuberculosis* NCTC 8315 se cultivó en 10 ml de caldo Luria-Bertoni (LB) a 37 °C por 24 h, posteriormente se tomaron 10 µl del precultivo y se inoculó en 10 ml de LB el cual se incubó por 3 h 15 min a 37 °C. Para valorar la virulencia de la cepa, antes de los experimentos de infección de eritrocitos, 1.5×10^8 UFC se inocularon por vía intraperitoneal en un ratón y después de 24 h éste se sacrificó para aislar la cepa en agar CIN. Se utilizó el modelo de infección *in vivo* utilizado por Garibay-Cerdenares (2008), infectando ratones de la cepa BALB/c con 1.5×10^6 UFC la cepa de *Y. pseudotuberculosis* NCTC 8315 por vía intraperitoneal, se sacrificaron al cabo de 24h post-infección y un modelo de infección *in vitro*

como lo describe Feodorova y Devdariani (2007), con algunas modificaciones, utilizando 6×10^6 eritrocitos de ratón BALB/c en contacto con 60×10^6 UFC de la cepa de *Y. pseudotuberculosis* NCTC 8315. Se extrajeron eritrocitos de ratones (ER) sanos de la cepa BALB/c y se purificaron por el método de Ficoll-Hystopaque. Se evaluó la viabilidad celular por el método de Azul de tripano.

El experimento se realizó a 37 °C con una atmósfera de 5% de CO₂ y se recuperaron los eritrocitos a 0, 15, 30 min, y 1 h. Como control se utilizaron eritrocitos a los cuales no se les adicionaron bacterias.

Para los experimentos *in vivo*, se utilizaron 10 ratones de la cepa BALB/c a los que se les inocularon 150×10^6 UFC por vía intraperitoneal en 200 µl de solución salina y como control 10 ratones a los que se les suministraron únicamente 200 µl de solución salina vía intraperitoneal. Los eritrocitos infectados y no infectados (2×10^6) se fijaron con *p*-formaldehído al 4% en PBS durante 1h a 37 °C, se lavaron 3 veces con PBS.

Para la medición de los niveles de RhoA, Cdc42 y Rac activas, se llevó a cabo siguiendo lo establecido en el protocolo de purificación de fosfoproteínas según instrucciones del ensayo Phosphoprotein purification kit, de Quiagen, Cat. No. 37101.

Para la detección de anticuerpos se utilizó, Anti-tirosinas fosforiladas (Abcam, Cat. No. ab10321, Clona PY20), Antifosfotirosina acoplado a HRP (Millipore, Cat. No. ab16389), anti-IgG de ratón acoplado HRP (Pierce, Cat. No. 31430).

El nivel de generación de ROS se estimó por el método de Wan *et al.* (1994), modificado por Wilson *et al.* (2002) utilizando el colorante diacetato de 7-diclorofluoresceína (DCFDA). Todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con las reglas de uso y manejo de animales establecido por la Norma Oficial Mexicana para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999) y a los principios éticos para las investigaciones médicas descritos por Helsinki y sus enmiendas (Declaración de Helsinki de la AMM, 2017).

Para sacar las diferencias significativas se analizaron estadísticamente mediante la prueba t de Student ($p < 0.05$). Todos los análisis

estadísticos se realizaron utilizando el software Stata versión 11.0.

Resultados

Se inoculó la cepa de *Y. pseudotuberculosis* por vía intraperitoneal en ratones BALB/c (Fig. 1a), y transcurridas 24 h se valoró el estado de los ratones (Fig. 1b).

Se utilizó el método de Ficoll-Hypaque para la separación de los eritrocitos del resto de las fracciones celulares, sabiendo que las densidades de diferentes células sanguíneas son: neutrófilos 1.082, linfocitos 1.070, monocitos 1.062 y eritrocitos maduros entre 1,090 y 1,100 g/ml. Se emplearon ficolos de densidades 1.119 y 1.077 g/ml (Fig. 2).

Para la interacción *in vivo* se infectaron 10 ratones de la cepa BALB/c con 1×10^7 UFC de *Y. pseudotuberculosis* NCTC 8315. Como control se utilizaron eritrocitos de ratones no infectados. Los resultados obtenidos por microscopía confocal mostraron la presencia de deformaciones en la membrana de los eritrocitos infectados, las cuales se debían a la presencia de acúmulos de actina F, sugiriendo que la bacteria induce cambios en el rearrreglo del citoesqueleto de espectrina/actina cuando interacciona con el mismo, en contraste con lo observado en el modelo *in vitro* donde a pesar de que se observa interacción de la bacteria con los eritrocitos, estos no mostraron deformaciones en su membrana (Fig. 3 y 4).

Se midieron los niveles de Rac, RhoA y Cdc42 activas; para estos ensayos se utilizaron extractos totales de eritrocitos infectados. Se encontró que la proporción de Rac y RhoA activas se encuentra incrementada en las muestras de ratones infectados (Fig. 5A).

Para medir los niveles de ROS en los eritrocitos infectados empleando CDFDA, se observó un incremento del 30% respecto al control en la cantidad de especies reactivas en los eritrocitos infectados (Fig. 6). Se observó también que en las pastillas de los eritrocitos infectados la intensidad del color rojo se veía incrementada en un 5% respecto del control (Fig. 6B) así como deformaciones en la membrana eritrocitaria (Fig. 6C).

Discusión

En este trabajo se analizó a nivel morfológico y funcional el efecto de la interacción de *Y. pseudotuberculosis* con eritrocitos de ratón. La fosforilación de proteínas en residuos de serina, treonina y tirosina son importantes en la regulación del citoesqueleto del eritrocito, proveyéndolo de flexibilidad. Algunos patógenos intracelulares como *Plasmodium* spp y *Bartonella*

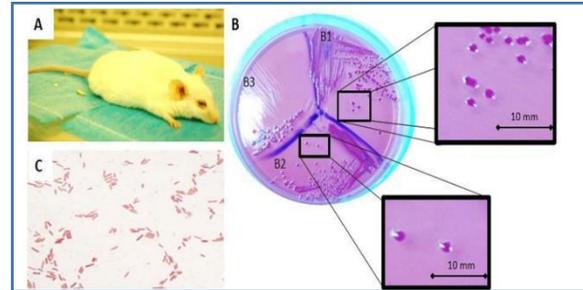


Figura 1. Prueba del fenotipo virulento de la cepa *Y. pseudotuberculosis* NCTC 8315. A) Ratón de la cepa BALB/c inoculado con *Y. pseudotuberculosis*. Al cabo de 24 h de infección se le ve con los parpados y orejas pálidas y movilidad reducida, signo de que la cepa aun es virulenta. B) Cultivo en agar CIN de diferentes regiones anatómicas del ratón después de su sacrificio, B1 proviene del peritoneo, B2 (cola) y B3 (corazón) provienen de una muestra sanguínea. En los tres aislamientos se observan colonias convexas de 1-2 mm, fermentación del manitol positiva con centro rosa y bordes claros en forma de ojo de toro. C) Tinción de Gram de una de las colonias del cultivo B1, se observa la presencia de bacilos Gram negativos.

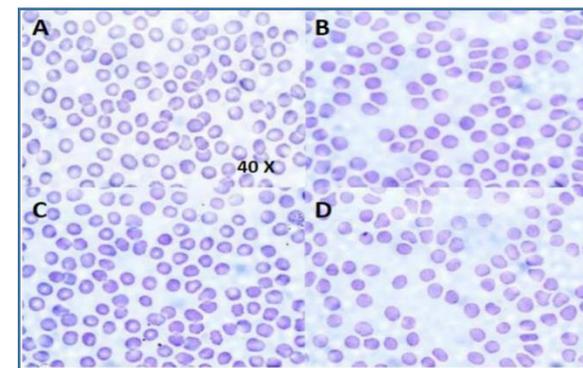


Figura 2. Eritrocitos de ratón purificados por la técnica de Ficoll-Hypaque. A-D imágenes representativas de 4 extendidos teñidos por la técnica de Giemsa observados al microscopio óptico con objetivo 40X.

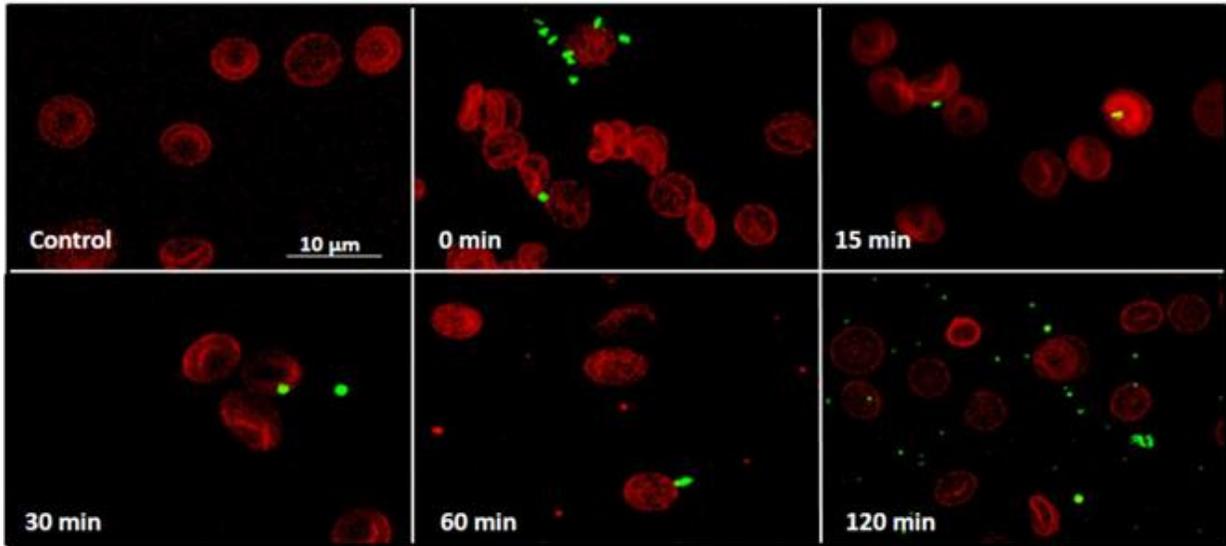


Figura 3. Modelo *in vitro* de infección de eritrocitos de ratón con *Y. pseudotuberculosis*. Se muestran imágenes de microscopía confocal de una cinética de interacción (0-120 min) de eritrocitos de ratón con *Y. pseudotuberculosis*. En rojo se muestra la señal de la Faloidina Rodaminada unida a la actina F y, en verde, la señal del Sytox Green unido al DNA bacteriano.

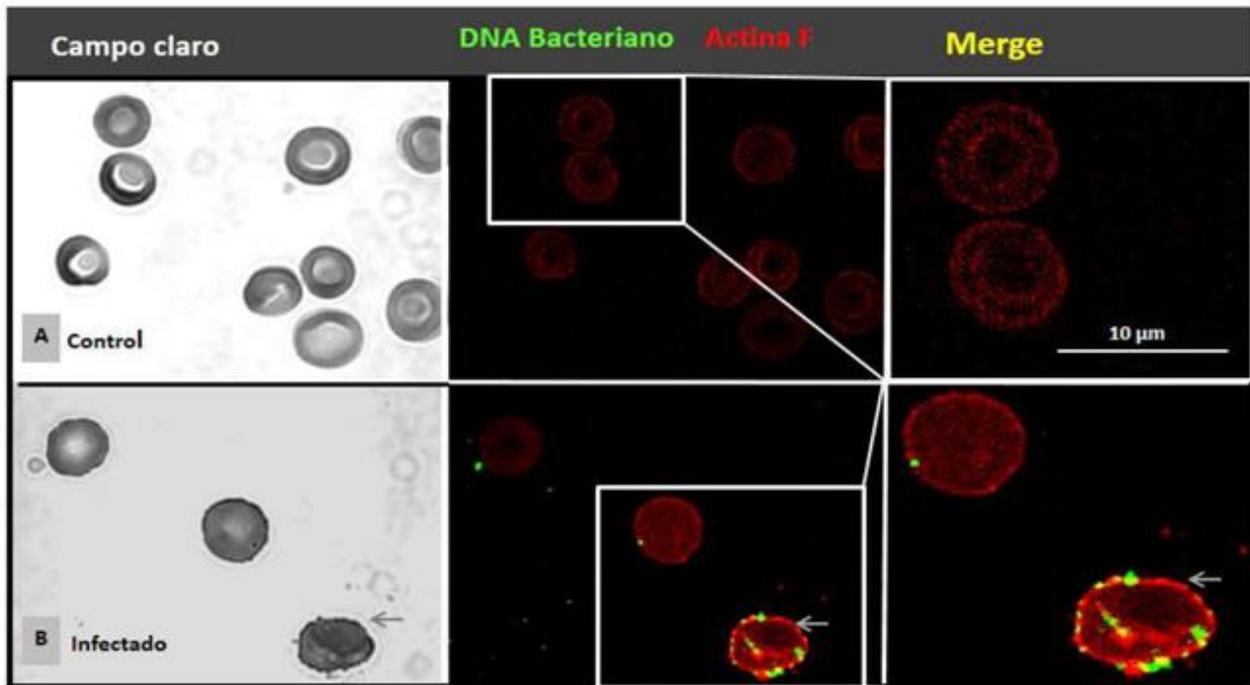


Figura 4. Modelo *in vivo* de infección de eritrocitos con *Y. pseudotuberculosis*. Imágenes de microscopía confocal. A) Eritrocitos de ratones sanos. B) Eritrocitos de ratones después de 24 h de infección. En rojo se muestra la señal de la Faloidina Rodaminada unida a la actina F, en verde, la señal de Sytox Green unido al DNA bacteriano. Las flechas señalan las alteraciones en la membrana de los eritrocitos.

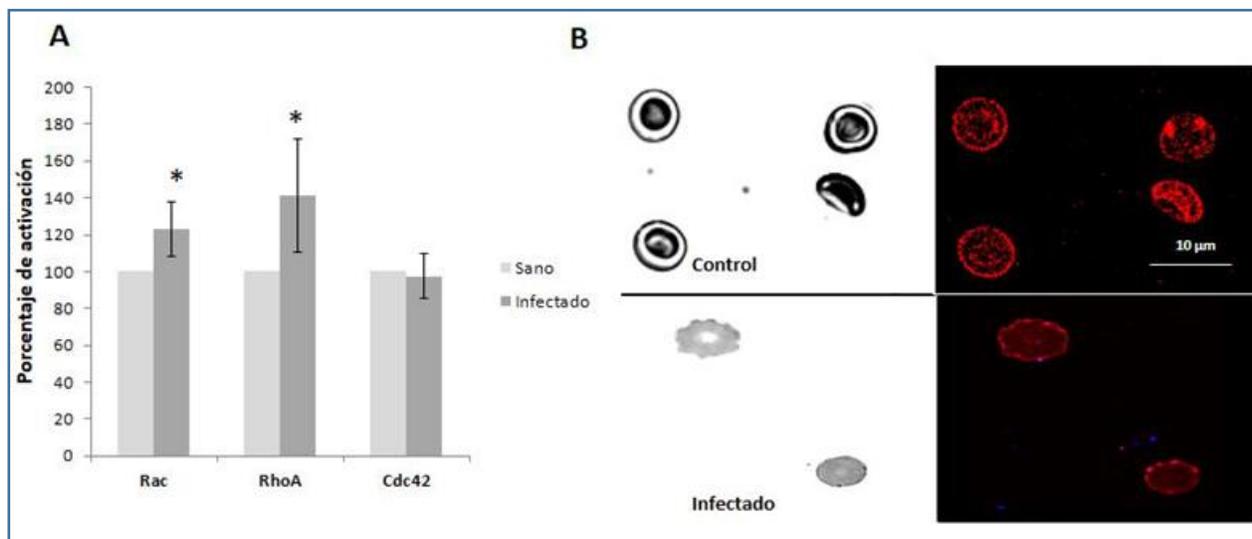


Figura 5. Niveles de activación de GTPasas. A) Se muestra la activación de Rac, Cdc42 y RhoA en eritrocitos de ratones sanos y eritrocitos de ratones infectados con *Y. pseudotuberculosis*. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de *Student* ($* > p = 0.05$). B) Imágenes de microscopía confocal de eritrocitos; en azul se muestra el DNA bacteriano con DAPI, en rojo se muestra a la actina F teñida con Faloidina Rodaminada.

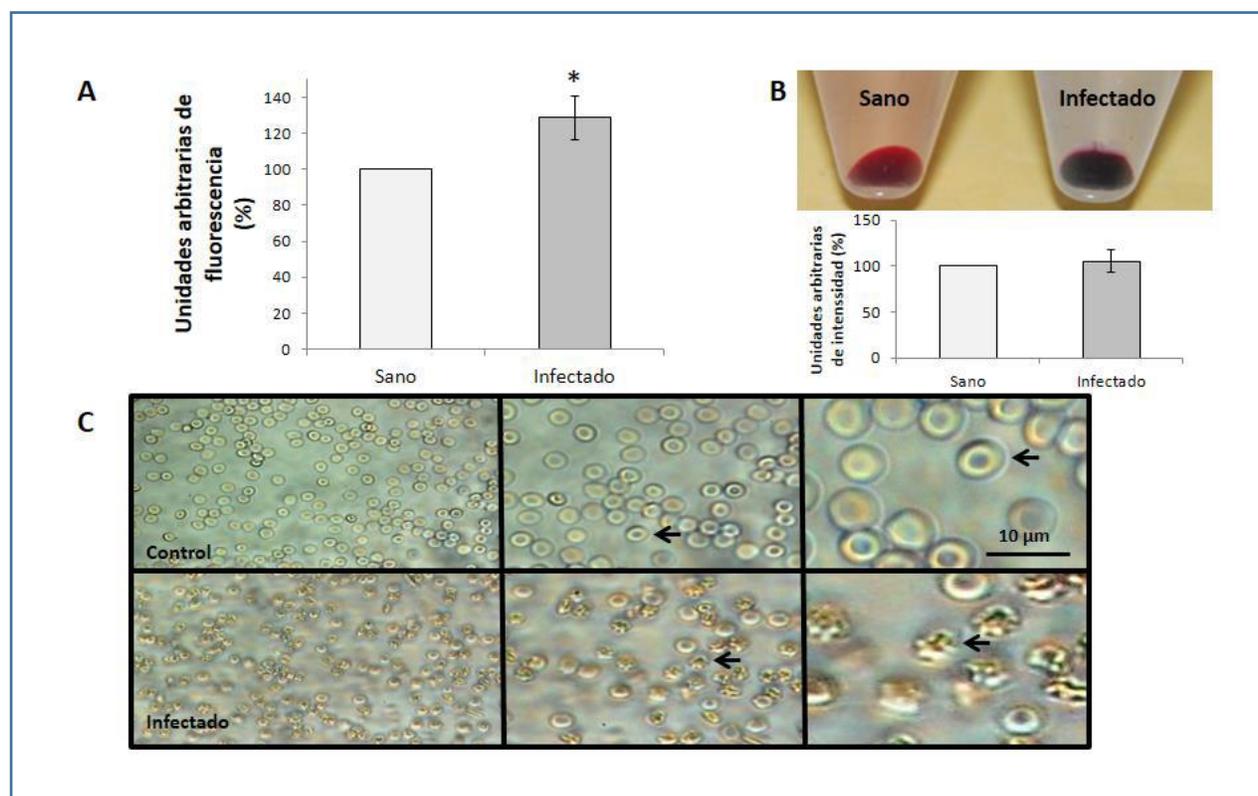


Figura 6. Niveles de ROS en eritrocitos de ratones infectados. A) Representación gráfica de los niveles de las ROS en eritrocitos sanos e infectados; las unidades arbitrarias de fluorescencia se muestran expresadas en porcentaje, tomando como 100% el control sano. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de *Student* ($* > p = 0.05$). B) Muestras de eritrocitos después de ser empastillados para su procesamiento. Bajo la imagen se muestra la intensidad del color rojo. C) Microscopía de luz-campo claro de muestras de eritrocitos de ratones infectados; con flechas se marcan los cambios en la membrana de los eritrocitos respecto al control.

spp interactan con proteínas de la membrana del eritrocito, las cuales sirven de anclaje y por medio de ellas desencadenan cascadas de señalización que tienen como objetivo favorecer su internalización para obtener nutrientes y continuar con su ciclo replicativo dentro de los eritrocitos (Vojtová *et al.*, 2006; Pitassi *et al.*, 2007).

Por otra parte, en nuestro grupo de trabajo Javier-Reyna (2006) demostró la presencia de integrinas $\alpha 5\beta 1$ en la membrana de eritrocitos murinos, así como cambios morfológicos en las membranas de los eritrocitos de ratones infectados con *Y. pseudotuberculosis*, como resultado de la interacción. En este estudio se infectaron ratones con *Y. pseudotuberculosis* y el efecto de la infección sobre los eritrocitos se analizó por microscopía confocal. Así, fue posible demostrar, en forma cualitativa, que las bacterias son capaces de unirse y penetrar a los eritrocitos, fenómeno que hasta la fecha sólo se había observado por microscopía de luz - campo claro, mediante tinciones de Giemsa (Feodorova y Devdariyani, 2007; Javier-Reyna, 2006).

En el modelo *in vivo* se logró observar un mayor número de bacterias adheridas a los eritrocitos en comparación a lo observado en el modelo *in vitro*, así como deformaciones en la membrana, con acúmulos de actina F en la periferia de la membrana eritrocitaria. Estos resultados indican que la infección por *Y. pseudotuberculosis*, induce una reestructuración del citoesqueleto de actina. Se sabe que la interacción entre la proteína invasiva de la membrana externa de *Y. pseudotuberculosis* y la integrina $\beta 1$ tiene como efecto una mayor invasión de enterocitos, inducción de la fagocitosis en macrófagos, liberación de NET (por sus siglas en inglés, trampas extracelulares de neutrófilos) en neutrófilos, y en estos procesos se requiere la activación de Rac1 (Gillenius y Urban, 2015). Al medir los niveles de activación de las GTPasas, encontramos que Rac y RhoA se encontraban más activas en los eritrocitos infectados respecto de los controles.

Los resultados de los niveles de Rac activa correlacionan con lo reportado en otras estirpes celulares donde se ha visto que la interacción con la invasina bacteriana y las integrinas median cascadas de señalización donde participa Rac1 la

cual media la internalización de *Y. pseudotuberculosis*.

Al realizar los ensayos de inmunodetección en fase sólida utilizando un anticuerpo contra proteínas fosforiladas en residuos de tirosina, observamos que en una banda de 57KDa se observa una mayor fosforilación, en la muestra de eritrocitos infectados en comparación con control. Se ha reportado que *Plasmodium falciparum* modifica la fosforilación de proteínas en residuos de serina y tirosina durante su desarrollo a la fase de trofozoito (Wu *et al.*, 2009; Pantaleo *et al.*, 2010a). Sin embargo, en el rango de los 57 kDa se encuentran una gran cantidad de proteínas lo que dificulta inferir de qué proteína se pudiera tratar. Será necesario complementar el presente trabajo con la identificación de proteínas por espectrometría de masas, para saber qué proteínas están siendo afectadas por la infección de eritrocitos por *Y. pseudotuberculosis*.

Al medir los niveles de ROS de los eritrocitos, se encontró que los eritrocitos infectados presentaban un incremento en los niveles de ROS respecto al control.

Conclusiones

Como resultado de la infección de eritrocitos por *Y. pseudotuberculosis*, en el modelo de ratón. Se observan cambios en la morfología y reestructuración de actina en la membrana. Se observaron cambios en el fosfoproteoma de eritrocitos infectados, con incremento de fosforilación en residuos de tirosina.

Referencias

- Bergsbaken, T., Cookson, B.T. (2009). Innate immune response during *Yersinia* infection: critical modulation of cell death mechanisms through phagocyte activation. *Journal of Leukocyte Biology*, 86, 1153-1158.
- Declaración de Helsinki de la ANN (2017). Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. www.wma.net/es/polices-post/declaracion-de-helsinki-de-la-amm-principios-eticos-para-las-investigaciones-medicas-en-seres-humanos/
- El-Maraghi, N., Mair N. (1979). The histopathology of enteric infection with *Yersinia pseudotuberculosis*. *American Journal of Clinical Pathology*, 71, 631-639.

- Feodorova, V.A., Devdariani, Z.L. (2007). The mechanism of interaction between *Yersinia pestis* and erythrocytes, and its importance for the pathogenesis of plague. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk*, 1, 13-21.
- Garibay-Cerdenares, O.L. (2008). Niveles de fosforilación en tirosina en eritrocitos de ratón BALB/c durante un proceso infeccioso provocado por *Yersinia pseudotuberculosis*. Tesis de Maestría en Ciencias Biomédicas, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, 34p.
[OK06400387_TM2006_1.pdf](#)
- Gillenius, E., Urban F.C. (2015). The adhesive protein invasín of *Yersinia pseudotuberculosis* induces neutrophil extracellular traps via $\beta 1$ integrins. *Microbes and Infection*, 17, 327- 336.
- Javier-Reyna, R. (2006). Identificación del receptor integrina- $\beta 1$ en la interacción *Yersinia pseudotuberculosis*-eritrocito como modelo de infección sistémica. Tesis de Maestría en Ciencias Biomédicas, Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, 33p.
[UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO \(uagro.mx\)](#)
- NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
[www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf](#)
- Pantaleo, A., Ferru, E., Carta, F., Mannu, F., Giribaldi, G., Vono, R., Lepedda, A.J., Pippia, P., Turrini, F. (2010a). Analysis of changes in tyrosine and serine phosphorylation of red cell membrane proteins induced by *P. falciparum* growth. *Proteomics*, 10, 3469-3479.
- Pitassi, L.H., Magalhaes, R.F., Barjas-Castro, M.L., de Paula, E.V., Ferreira, M.R., Velho, P.E. (2007) *Bartonella henselae* infects human erythrocytes. *Ultrastructural Pathology*, 31,369-72.
- Vojtová, J., Kofronová, O., Sebo, P., Benada, O. (2006). Bordetella adenylate cyclase toxin induces a cascade of morphological changes of sheep erythrocytes and localizes into clusters in erythrocyte membranes. *Microscopy Research and Technique*, 69,119-129.
- Wan, C.P., Sigh, V., Lau, B.H.S. (1994). A simple fluorometric assay for the determination of cell number. *Journal of Immunological Methods*, 173, 265-272.
- Wilson, R.S., Mendes De Leon, C.F., Barnes, L.L., Schneider, J.A., Bienias, J.L., Evans, D.A., Bennett, D.A. (2002) Participation in cognitively stimulating activities and risk of incident Alzheimer disease. *JAMA*, 287, 742-748.
- Wu, Y., Nelson, M.M., Quail, A., Xia, D., Wastling, J.M., Craig, A. (2009). Identification of phosphorylated proteins in erythrocytes infected by the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Malaria Journal*, 18, 105.