

ARTICULOS ORIGINALES

**INDUCCION DE LA DIFERENCIACION EN CELULAS
ERITROLEUCEMICAS HUMANAS Y MURINAS:
SINTESIS DE ESPECTRINA¹⁾**

RUTH MOSQUERA*, JEAN PAUL VERNOT*, MOISES WASSERMAN**

Se estudió la diferenciación de las células eritroleucémicas humanas (K562) y murinas (Friend) estimuladas con hemina y DMSO respectivamente. Después del segundo día de estimulación, la hemina incrementa la producción de hemoglobina hasta el 18% en las células K562. En las células Friend, el DMSO produce un aumento en la síntesis de hemoglobina solamente después del quinto día de estimulación; cerca del 30% de las células se diferencian en estas condiciones. Ambas líneas celulares mostraron un incremento en las síntesis de una proteína con movilidad electroforética similar a la β -espectrina del eritrocito. El aumento de esta proteína fue de 5 veces en las células murinas y de 2.5 en las células humanas. Las células K562 incrementaron también la síntesis de una proteína con movilidad electroforética semejante a la α -espectrina. Sin embargo, ninguna de estas proteínas reaccionó por inmunotransferencia con un antisuero poliespecífico contra β -espectrina humana producida en conejo.

Palabras clave: eritroleucemia, espectrina, diferenciación celular.

INTRODUCCION

Las células eritroleucémicas representan precursores eritroides cercanos a la CFU-E (Unidad Formadora de Colonias Eritroides) o al estadio de proeritoblasto (1) y exhiben muchas de las características de la eritropoyesis normal (2). La línea celular K562 fue establecida por Lozzio y Lozzio (3), a partir de la efusión pleural de un paciente con Leucemia Mieloide Crónica en crisis blástica terminal. Las células Friend fueron obtenidas por la doctora Charlotte Friend, a partir de

cultivos de fragmentos de bazo de ratones infectados con el complejo viral Friend (4).

Estudios anteriores han demostrado que éstas dos líneas celulares pueden ser inducidas por una gran variedad de agentes químicos que las convierten irreversiblemente en células que expresan muchas características fisiológicas de los eritrocitos normales (5, 6). Durante este proceso de diferenciación, las células estimuladas sintetizan hemoglobina fetal y adulta, el mRNA globínico es detectado en células después de

¹⁾Trabajo presentado como requisito parcial para optar al título de Magister en Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana.

* Investigador Asociado, Grupo de Inmunología, Instituto Nacional de Salud.

**Jefe Grupo de Bioquímica, Instituto Nacional de Salud, Avenida Eldorado carrera 50, Zona 6, Bogotá, D.E., Colombia. Profesor de Bioquímica, Facultad de Ciencias Universidad Nacional de Colombia.

ABREVIATURAS: DMSO, dimetil sulfóxido; SDS, dodecil sulfato de sodio; BA, ácido butírico; HMBA, hexametilén bisacetamida.

24 a 48 horas en presencia del inductor (7). Además, existen muchos rasgos comunes entre estas células y los eritrocitos normales. Algunas de las proteínas del eritrocito normal como la glicoforina A -la principal sialoglicoproteína del eritrocito-, varios antígenos de superficie y algunas proteínas del citoesqueleto se expresan en estas células (8).

En los procesos de invasión del eritrocito humano por *Plasmodium falciparum* se ha visto que algunas proteínas como la glicoforina A y la banda 3 pueden ser receptores del merozoito (9, 10, 11), y que otras como la espectrina y la banda 4,1 se modifican durante la interiorización del parásito (12, 13). También se ha visto que las células Friend estimuladas pueden ser invadidas por *Plasmodium* y que éstas a su vez pueden ocasionar una infección en ratones normales (14).

El objeto del presente trabajo es determinar la síntesis de proteínas presentes en el eritrocito maduro, que se producen durante la inducción de las células eritroleucémicas. La aparición secuencial de algunas de estas proteínas en la membrana de las células estimuladas, ofrece un buen modelo experimental para determinar cuales de éstas pueden ser esenciales para la invasión del parásito.

El conocimiento de los mecanismos moleculares y de los componentes involucrados en el proceso de invasión de *Plasmodium falciparum* a los eritrocitos humanos, es esencial para el desarrollo de estrategias más efectivas que permitan controlar la infección.

MATERIALES Y METODOS

Cultivo de células

Las líneas celulares humanas y murinas fueron genéticamente donadas por el doctor T. Kamiyama (NIH, Tokyo, Japón). Los cultivos se realizaron en medio RPMI 1640 suplementado con Hepes 9,4 mM, bicarbonato de sodio 0.15%, sulfato de gentamicina 50 µg/ml, glutamina 2 mM y suero fetal bovino al 10% para las células K562 o suero de ternero al 10% para las células Friend. Las células se ampliaron y se mantuvieron en los cultivos entre 0.5 y 5×10^5 células/ml, en ambiente húmedo a 37° 10% de CO₂. Porciones congeladas a -70°C, en una solución de DMSO al 5% en suero fetal bovino, se establecieron en cultivo cada 3 ó 4 meses para reemplazar la cepa usada. Esto con

el fin de garantizar la estabilidad y homogeneidad de la cepa original.

Obtención de sueros

Los anticuerpos contra espectrina y los usados en la preparación del conjugado se obtuvieron en un trabajo previo (15), inoculando a un conejo; 100 µg de espectrina en adyuvante completo de Freund por vía intradérmica y con refuerzo a las tres semanas. Los títulos de los anticuerpos presentes en los sueros se determinaron mediante el método enzimático de ELISA, obteniéndose reacción positiva hasta la dilución 1:10240. La especificidad del anticuerpo se determinó mediante inmunotransferencia.

Inducción de la diferenciación

Cuando las células alcanzaron una viabilidad mayor del 90% se diluyeron hasta una concentración de 1×10^5 células/ml. Las células Friend se estimularon con DMSO al 2% (v/v) (4) y las K562 con hemina 0.1 mM (16) durante seis días, con cambio de medio e inductor al tercer día. Paralelamente se hicieron controles con cultivos que contenían la misma densidad celular inicial pero sin adicionar el inductor químico. Durante la inducción se hicieron recuentos celulares diarios y tinciones con azul de tripano para determinar viabilidad celular y bencidina para detectar la síntesis de hemoglobina (17).

Lisis hipotónica

Las células se lisaron y se lavaron con buffer fosfato de sodio 5 mM, pH 7.5 a 4°C de acuerdo al método de Dodge (18), centrifugando la suspensión tres veces a 16000 xg durante 15 minutos a 4° para remover el contenido citoplásmico. Las proteínas se extrajeron con buffer muestra (Tris-HCl 0.125 M pH 6,8, SDS 4%, β-mercaptoetanol 10%, glicerol 20%) y se analizaron por electroforesis.

Aislamiento de membranas de eritrocitos humanos y de ratón

Las membranas de los eritrocitos se obtuvieron según el método descrito por Froman y colaboradores (19), pasando los eritrocitos lisados a través de una columna de Sepharosa 4B (Pharmacia Fine Chemical, Uppsala, Sweden) previamente equilibrada con la solución de lisis (buffer fosfato de sodio 5 mM, pH 7.5,

4°C). Posteriormente, las fracciones con membranas libres de hemoglobina se disolvieron en buffer muestra, separando previamente una alícuota para la determinación de proteínas totales siguiendo el método de Bradford (20).

Electroforesis y transferencia de proteínas

Las proteínas se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% en presencia de SDS, utilizando el sistema discontinuo de Laemmli (21). Una vez separadas, las proteínas se visualizaron mediante la tinción de los geles con Azul de Coomassie Brillante R-250 (Sigma, Chemical Co, St Louis, USA) al 0.15% en ácido acético al 10% e isopropanol al 10% (22), o se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se detectaron por procedimientos inmunológicos incubando las membranas, primero con el suero antispectrina en dilución 1:2000 y posteriormente con el segundo anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina en dilución 1:800, cuya reacción se visualiza al adicionar el sustrato de alfa naftil fosfato y la sal de diazonio (23).

RESULTADOS

Para este trabajo se ensayaron previamente varios inductores potenciales (BA, HMBA, DMSO y Hemina) con el fin de probar su efecto sobre las células humanas y murinas, pero resultaron ser inefectivos a concentraciones que en estudios anteriores estimularon la producción de hemoglobina. Solamente dos de ellos, el DMSO y la Hemina estimularon la síntesis de hemoglobina en las células Friend y en las células K562 respectivamente.

Efecto del DMSO sobre las células Friend

a) *Multiplicación celular.* El recuento de células estimuladas mostró un incremento desde 2×10^5 hasta 7×10^5 células/ml en el día tercero, después del cual se mantuvo constante (Figura 1A, trazado con círculos). Por el contrario, el control se incrementa tres veces más hasta el día tercero, disminuye en el día cuarto y aumenta nuevamente a partir del quinto día pero sin llegar a estabilizarse.

b) *Viabilidad.* A medida que la densidad celular aumenta, la viabilidad tiende a disminuir (Figura 1B, trazado con triángulos). Este fenómeno se observa tanto en células del control como en las células trata-

c) *Diferenciación.* La síntesis de hemoglobina se observó con la coloración de bencidina. Durante la estimulación con DMSO, cerca del 5% de las células Friend contenían hemoglobina al tercer día. En los días siguientes al tratamiento, la proporción aumentó gradualmente hasta alcanzar el 48% en el día sexto (Figura 2). Las células sin estimular muestran una diferenciación espontánea menor del 2%.

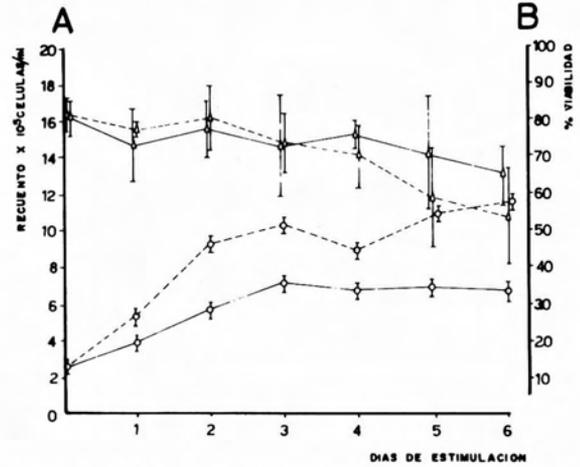


Fig. 1. A. Curva de crecimiento para células Friend estimuladas con DMSO (o—o) y el control (o- - - -o). B. Viabilidad celular durante los ensayos de estimulación: Células estimuladas (Δ—Δ) y el control (Δ- - - -Δ). Cada punto representa el promedio ± DS de experimentos similares repetidos.

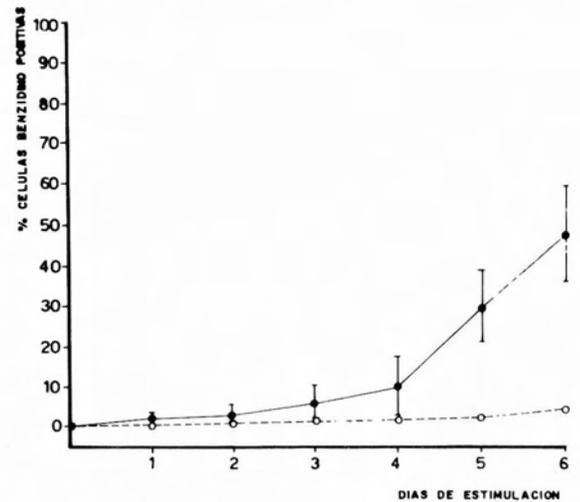


Fig. 2. Efecto del DMSO sobre las síntesis de hemoglobina por las células Friend durante siete días de tratamiento (●—●) y control de células sin estimular (o- - - -o). Cada punto representa el promedio ± DS de experimentos similares repetidos.

Efecto de la hemina sobre las células K562

a) *Multiplicación celular.* En la figura 3A, trazado con círculos, se observa que las células K562 cultivadas en presencia de hemina incrementan su concentración hasta 16×10^5 células/ml en el día sexto de estimulación, en forma similar al control.

b) *Viabilidad.* Tanto el control como las células tratadas con hemina, se mantienen con una viabilidad estable de $90\% \pm 5$ durante todo el ensayo (Figura 3B, trazado con triángulos).

c) *Diferenciación.* El número de células bencidina positivas incrementa hasta un valor cercano al 20% en el segundo día de estimulación (Figura 4), valor que permanece más o menos constante en los días siguientes. Sin embargo, es importante observar que hay un incremento proporcional en el número total de células (Figura 3A).

Después de obtener la diferenciación eritroide en las dos líneas celulares, se hicieron análisis electroforéticos para determinar la síntesis de las proteínas similares a las encontradas normalmente en el citoesqueleto del eritrocito.

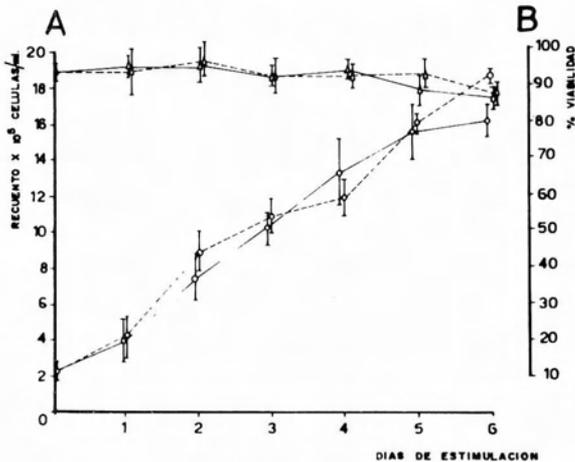


Fig. 3. A. Curva de crecimiento para las células K562 estimuladas con Hemina (o—o) y para las células K562 no estimuladas (o- - - o).

B. Viabilidad celular durante los ensayos de estimulación. Células K562 tratadas con Hemina (Δ — Δ) y de las células no tratadas (Δ - - - Δ). Experimentos repetidos mostraron un patrón similar.

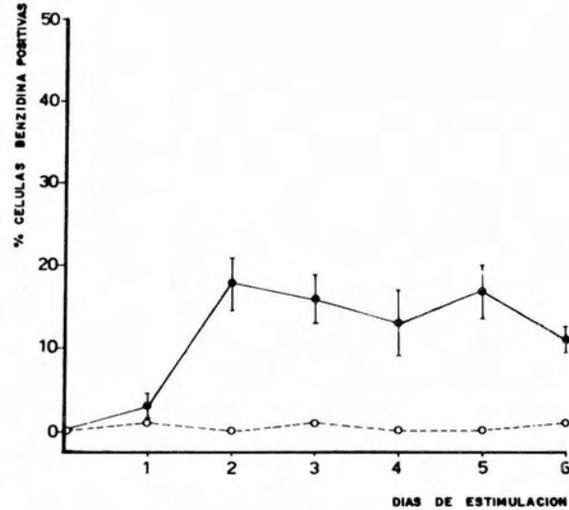


Fig. 4. Diferenciación celular medida usando el método de la coloración con Bencidina para hemoglobina. Células K562 estimuladas con hemina (●—●) y control de células sin estimular (o- - - o).

Experimentos repetidos mostraron un patrón similar.

Síntesis de espectrina

En ausencia del inductor, tanto las células murinas (Figura 5A, carriles b y d) como las células humanas (Figura 5B, carril c) sintetizan pequeñas cantidades de espectrina. Los análisis por densitometría mostraron que las células Friend estimuladas con DMSO incrementan 5 veces las síntesis de una proteína de 210 kDa al tercer día de estimulación (Figura 5A, carril c), valor que permanece más o menos constante hasta el día séptimo del tratamiento (Figura 5A, carril e). Después de estimular las células K562 con hemina, el incremento de dos bandas de peso molecular 220 kDa y 210 kDa fue solamente de 2.5 veces al sexto día con respecto al tercero (Figura 5B, carriles d y e).

Mediante el uso del suero anti-espectrina se trató de probar la identidad de estas bandas. En la figura 6A se observa la transferencia total tanto de las proteínas de los eritrocitos humanos y murinos como de las células eritroleucémicas. en la figura 6B se observa que el antisuero solamente detecta la espectrina y sus fragmentos de degradación proteolítica de las membranas del eritrocito humano (carril f). Este no reacciona ni con la espectrina del eritrocito de ratón (carril a)

ni con las bandas de proteínas con movilidades electroforéticas similares a la espectrina, de los carriles correspondientes a las células humanas (carriles d y e) y a las células murinas (carriles b y c). En el inmunorreveado se observa además una reacción cruzada con una proteína de aproximadamente 36 kDa.

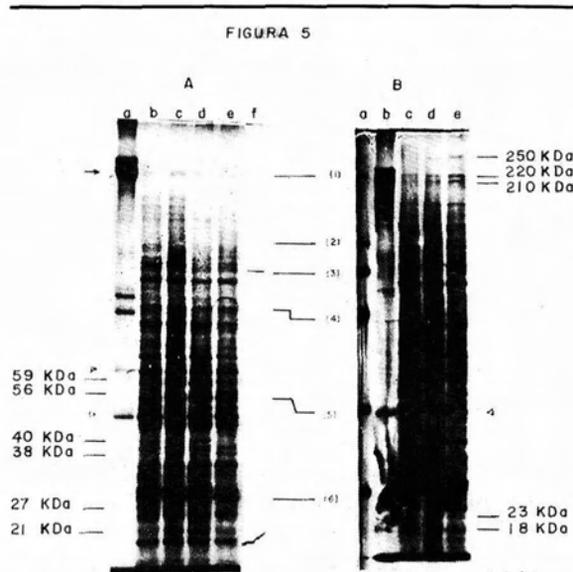


Fig. 5. A. Electroforesis de células Friend tratadas con DMSO 2% y sus respectivos controles.

- a) Proteínas de membrana de eritrocitos de ratón.
- b) Células Friend sin estimular, día tercero.
- c) Células Friend al tercer día de tratamiento con c) DMSO.
- d) Células Friend sin estimular, día séptimo.
- e) Células Friend al séptimo día de tratamiento con DMSO.
- f) Marcadores de peso molecular: (1) Miosina 205 kDa. (2) β -Galactosidasa 116 kDa (3) Fosforilasa β 97.4 kDa (4) Anhidrasa Carbónica 68 kDa (5) Albúmina de Huevo 45 kDa (6) Albúmina Humana 29 kDa.

La flecha indica la posición de la banda de β -espectrina según la nomenclatura de Fairbanks (28) usada para describir las movilidades electroforéticas relativas de las proteínas del eritrocito.

B. Electroforesis de las células eritroleucémicas humanas no estimuladas y estimuladas con Hemina 0.1 mM.

- a) Marcadores de peso molecular.
- b) Proteínas de membrana de los eritrocitos humanos.
- c) Células K562 no estimuladas.
- d) Células K562 al tercer día de tratamiento.
- e) Células K562 al sexto día de tratamiento.

Síntesis de otras proteínas

Las células murinas sintetizan dos proteínas con movilidad electroforética similar a las bandas 4.5 y 5 del eritrocito de ratón, antes y después de al inducción (Figura 5A, flechas); mientras que en las células humanas solamente se observa, durante todo el ensayo, una proteína con movilidad electroforética similar a la banda 5 del eritrocito humano (Figura 5B, flecha). Además, en las células murinas estimuladas, se observa que algunas proteínas disminuyen su concentración (56 kDa y 21 kDa), desaparecen después del tratamiento (40 kDa y 27 kDa) o son sintetizadas de novo (59 kDa y 38 kDa). Las células humanas cultivadas en presencia de hemina, sintetizan proteínas de peso molecular 250 kDa, 23 kDa y 18 kDa.

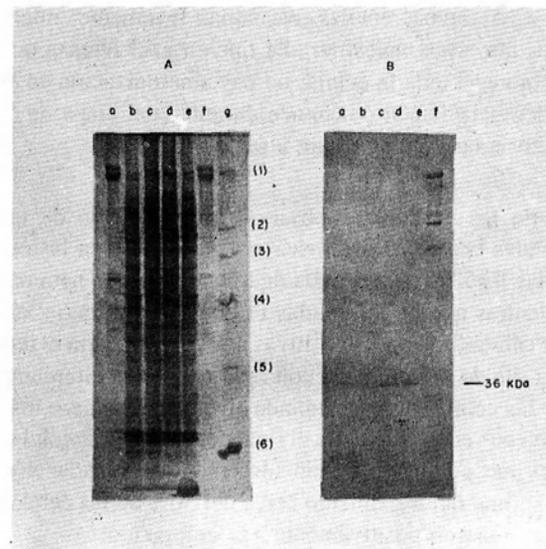


Fig. 6. Transferencia de las proteínas sobre Membranas de Nitrocelulosa.

A. Tinción con Amido Black.

- a) Proteínas de membrana de los eritrocitos de ratón.
- b) Células Friend sin estimular.
- c) Células Friend al tercer día de tratamiento con DMSO.
- d) Células K562 al tercer día de tratamiento con Hemina.
- e) Células K562 sin estimular.
- f) Proteínas de membrana de los eritrocitos humanos.
- g) Marcadores de peso molecular.

B. Inmunorreveado con el suero anti-espectrina y con el conjugado con fosfatasa alcalina de una Membrana de Nitrocelulosa con proteínas transferidas a partir de un gel en las mismas condiciones que en A.

DISCUSION

En estudios anteriores se ha observado que al cuarto día de estimulación con DMSO, el 60% de las células Friend son bencidina positivas y al sexto día alcanzan valores hasta del 85% (24). Con las células K562 también se ha demostrado más del 50% de reacción positiva a la coloración con bencidina de las células, a partir del tercer día de estimulación con hemina (25).

El procedimiento de coloración basado en bencidina ácida se usó como una medida relativa de diferenciación. Las células productoras de hemoglobina reaccionaron positivamente con esta tinción observándose una coloración azul. A diferencia del control, las células estimuladas sintetizan hemoglobina, pero no es evidente un patrón uniforme de coloración. Al final del ensayo algunas células reaccionan levemente, mientras que otras muestran una tinción azul intensa que cubre casi toda la célula; no hay sincronización en la diferenciación ni se conoce durante cual etapa de la mitosis las células llegan a ser estimuladas.

En los ensayos se observó un incremento de las células bencidina positivas cercano al 20% en las células K562 al segundo día de tratamiento con hemina, mientras que en las células Friend se observaron 5% de células bencidina positivas únicamente hasta el tercer día de estimulación con DMSO. Pero a diferencia de las células humanas donde el valor permanece más o menos constante hasta el final del ensayo, las células murinas continúan siendo susceptibles a la inducción y al final del tratamiento cerca del 50% de las células reaccionaron positivamente a la coloración.

Durante los experimentos se hicieron recuentos celulares para observar si se inhibía la división celular estimulando la diferenciación. De acuerdo a los resultados podemos afirmar que los inductores utilizados en este trabajo afectan de manera diferente las células sobre las cuales ejercen su acción. La hemina no causa un efecto sobre el crecimiento de las células humanas, pues en su presencia éste es igual al observado en el control. En cambio el DMSO afecta el crecimiento de las células murinas a partir del tercer día de estimulación. El crecimiento de las células Friend estimuladas con DMSO se estabiliza a partir del tercer día de tratamiento, hecho que concuerda con trabajos anteriores (27).

La tinción con azul de tripano se realizó con el fin de medir la viabilidad celular durante la incubación de las células con el inductor y descartar una posible toxicidad causada por el mismo. Como se pudo observar, en presencia de hemina las células K562 son viables hasta el final del tratamiento en forma similar al control (Figura 3B). Para las células Friend, parece ser el medio de cultivo el que, en un momento dado, resulta insuficiente para la población celular alcanzada, ya que al final del experimento, la viabilidad celular de las células cultivadas con DMSO disminuye hasta el 65% mientras que en el control solamente el 54% de las células son viables (Figura 1B).

Durante la diferenciación, además de la hemoglobina, las células eritroleucémicas también sintetizan otras proteínas. El estudio se centró principalmente en la proteína espectrina, uno de los principales componentes del citoesqueleto del eritrocito cuyo contenido en el mismo es de aproximadamente el 75% (26). En experimentos preliminares se procesó para cada carril el mismo valor de cultivo diario del experimento pero esto no produjo la misma cantidad de proteína ya que el inductor detiene la división celular al tercer día de tratamiento en las células murinas, y en las células humanas esto no ocurre. Finalmente se procesaron y sirvieron 2×10^5 células por carril pero hubo necesidad de hacer densitografías debido a la diferencia de proteínas encontradas entre ellos.

En este estudio la presencia de una proteína con peso molecular similar a espectrina se detectó en las líneas celulares sin estimular. Después de la estimulación se observó un incremento máximo de 5 veces para las células Friend y de 2.5 veces para las células K562. De esta manera, esta proteína representa menos de 0.2% de la proteína total de las células.

Hay una diferencia notable en la síntesis de espectrina entre las dos líneas celulares. Las células Friend incrementan su síntesis hasta el tercer día de estimulación, después del cual se mantiene relativamente constante (Figura 5A, carriles b-e). Esto concuerda con otros estudios donde se ha observado que la síntesis es máxima al tercer día de estimulación, después del cual se estabiliza o inclusive llega a disminuir (27). Por otra parte, las células K562 incrementan la síntesis de espectrina en forma progresiva hasta el día sexto, es probable que el aumento continúe hasta los estadios terminales de diferenciación.

Se ha establecido que en células eritroleucémicas estimuladas se sintetizan cantidades desiguales de las dos cadenas α y β -espectrina con un 15% a 30% más de la subunidad β (27). Sin embargo, en las células Friend sólo se observa la síntesis de β -espectrina (Figura 5A) mientras que en las células K562 se observan dos bandas posiblemente pertenecientes a la $\alpha\beta$ -espectrina (Figura 5B).

El suero antiespectrina utilizado no reaccionó con la espectrina de las células eritroleucémicas. El nivel de detección mínimo del suero fue de 5.0 μ g de espectrina como se determinó mediante diluciones de un preparado de espectrina humana pura. Por lo tanto, la cantidad de proteína sintetizada por las células está por debajo del nivel de detección. Es posible que la espectrina de las células eritroleucémicas sea antigénicamente diferente y que la alta especificidad del anticuerpo obtenido no permita su detección. Asimismo, el anticuerpo no reconoce la espectrina del eritrocito de ratón a pesar de encontrarse en mayor cantidad que la del eritrocito humano.

Hubo una reacción cruzada del suero antiespectrina con una proteína de aproximadamente 36 kDa. Esta proteína no es muy notoria en la tinción de la membrana de nitrocelulosa con Amido Black, lo que indica que está en bajas concentraciones; sin embargo, utilizando el suero antiespectrina reaccionó aún con la dilución 1:4500. Posiblemente ésta comparte epítopes semejantes a la espectrina.

En el sistema descrito, el incremento de espectrina fue muy poco; por lo tanto, las células K562 estimuladas tienen poco parecido con el eritrocito humano en lo que a citoesqueleto se refiere. Los análisis de proteínas diferentes a espectrina, muestran que algunas pueden desaparecer durante la diferenciación, mientras que otras pueden ser sintetizadas solamente después de la estimulación. La presencia de proteínas con movilidades electroforéticas similares a las bandas 4.5 y 5 del eritrocito se observaron durante todo el ensayo tanto en las células murinas como en las células humanas. Sin embargo, es difícil asegurar que corresponden exactamente a las proteínas del eritrocito únicamente con base en su peso molecular.

SUMMARY

The differentiation of human (K562) and murine (Friend) erythroleukemic cells was studied by stimulation with hemin and DMSO respectively. After the second day of stimulation, hemin induces the production of hemoglobin up to 18% in K562 cells. In Friend cells, DMSO produces a clear increase in hemoglobin synthesis after the fifth day of stimulation when about 30% of the cells differentiate. Both cellular lines showed an increase in the synthesis of a protein with an electrophoretic mobility similar to the erythrocytic β -spectrin. The amount of this protein increased 5 times in the murine cells and 2.5 times in the human cells during induction. The synthesis of a protein with electrophoretic mobility similar to that of α -spectrin was increased in induced K562 cells. Nevertheless, none of these proteins reacted with a polyspecific rabbit antiserum against human β -spectrin.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por JICA (Japan International Cooperation Agency) y por el Fondo Nacional de Investigaciones Científicas "Francisco José de Caldas" COLCIENCIAS.

BIBLIOGRAFIA

1. Mayeux P, Billat C, Jacquot R. Murine erythroleukaemia cells (Friend cells) possess high-affinity binding sites for erythropoietin. *FEBS Lett* 1987; 211: 229.
2. Harrison PR. New human myeloid leukaemia cell line undergoes red shift. *Nature* 1979; 281: 632.
3. Lozzio CB, Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 1975; 45: 321.
4. Friend C, Scher W, Holland JC, Sato T. Hemoglobin synthesis in murine virus-induced leukemic cells in vitro: stimulation of erythroid differentiation by dimethyl sulfoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68: 378.
5. Andersson LC, Jokinen M, Gahmberg CG. Induction of erythroid differentiation in the human leukaemia cell line K 562. *Nature* 1979; 278:364.

6. Nudel U, Salmon JE, Tereda M, Marks P, Riofkind D. Differential effect of chemical inducers on expression of globin genes in murine erythroleukemia cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 1100.
7. Zucker RM, Umlas ME, Decal DL, Whittington K. Differential hemoglobin synthesis in murine erythroleukemic cells: Hemin effects. *Cell Biochem Func* 1987; 5: 27.
8. Jokinen M, Gahmberg CG, Andersson LC. Biosynthesis of the major human red cell sialoglycoprotein, Glycophorin A, in a continuous cell line. *Nature* 1979; 279: 604.
9. Ravetch JV, Kochan J, Perkins M. Isolation of the gene for a glycophorin-binding protein implicated in erythrocyte invasion by malaria parasite. *Science* 1985; 227: 1593.
10. Friedman MJ, Fukuda M, Laine RA. Evidence for a malarial parasite interaction site on the major transmembrane protein of the human erythrocyte. *Science* 1985; 228: 75.
11. Dkoye VCN, Bennett V. *Plasmodium falciparum* Malaria; Band 3 as possible receptor during invasion human erythrocytes. *Science* 1985; 227: 169.
12. Dluzewski AR, Rangachari K, Gratzler WB, Wilson RJM. Inhibition of malarial invasion of red cells by chemical and immunochemical linking of spectrin molecules. *British J Haematol* 1983; 55: 629.
13. Wasserman M, Vernot JP, Mendoza PM. Role of Ca^{2+} and erythrocyte cytoskeleton phosphorylation in the invasion of *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Res*, 1990; in press.
14. Eisen H, Furusawa M, Tanaba K, Takada S, Ostertag W. Interactions of rodent malarial parasites with Friend erythroleukemia cells in vitro. *Bull WHO* 1977; 55: 367.
15. Barreto NL, Aguilera CD. Purificación de espectrina y actina de eritrocito humano: Efecto del *Plasmodium falciparum* sobre la fosforilación in vitro de estas proteínas. Tesis de Grado, Universidad Nacional, Facultad de Ciencias, Departamento de Química, 1987.
16. Rutherford TR, Clegg JB, Weatherall DJ. K562 human leukaemic cells synthesise embryonic haemoglobin in response to haemin. *Nature* 1979; 280: 164.
17. Perterson JL, McConkey EH. Proteins of Friend leukemia cells. *J Biol Chem* 1976; 251: 555.
18. Dodge et al. The preparation and chemical characterization of haemoglobin-free ghost of human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* 1963; 100: 119.
19. Froman G, Acevedo F, Hjerten S. A molecular sieving method for preparing erythrocyte membranes. *Prep Biochem* 1970; 10: 59.
20. 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.
21. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1971; 227: 680.
22. Andrews AT. Electrophoresis. Theory, techniques, biochemical and clinical applications. II Edition Clarendon Press, Oxford, 1979.
23. Blake MS, Johnston KH, Russell-Jones GJ, Gotchlich EC. A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated antibody on Western Blots. *Anal Biochem* 1984; 136: 175.
24. Orkin SH, Harosi FI, Leder P. Differentiation in erythroleukemic cells and their somatic hybrids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72: 98.
25. Hoffman R, Murnane MJ, Benz EJ, Prohaska R, Floyds V, Dainiak N, Forget BG, Furthmayr H. Induction of erythropoietic colonies in a human chronic myelogenous leukemia cell line. *Blood* 1979; 54: 1182.
26. Cohen CM. The molecular organization of the red cell membrane skeleton. *Sem Hematol* 1980; 20: 141.
27. Pfeffer SR, Huima T, Redman CM. Biosynthesis of spectrin and its assembly into the cytoskeletal system of Friend erythroleukemia cells. *J Cell Biol* 1986; 103: 103.
28. Fairbanks G, Steck TL, Wallach DF. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochem* 1971; 10: 2606.