

Estudio de la maquinaria molecular que regula la vía autofágica y su relación con la eritropoyesis

Betiana Nebaí Salassa¹; Federico Moor¹; Bioq. Agustín Nicolás Vergara¹; Dra. María Isabel Colombo²; Dr. Claudio Fader Kaiser²

¹Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Juan Agustín Maza

²Instituto de Histología y Embriología (IHEM), Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo-CONICET, Mendoza, Argentina

cfader@fcm.uncu.edu.ar

Resumen

La autofagia es un proceso de autodegradación que implica degradación y reciclaje de organelas, proteínas de vida media larga y otras moléculas citoplasmáticas en el tejido sano y dañado, a través de una vía lisosomal. (Knecht E et al. 2009). Durante este proceso varias proteínas ATG (autophagy-related gene) se combinan de forma secuencial y terminan por generar vesículas de doble membrana conocidos como autofagosomas. Estas estructuras se forman por el alargamiento y la fusión de un saco de membrana plana, llamado fagoforo, que envuelve los componentes citoplasmáticos. Se cree que diferentes compartimentos contribuyen con proteínas y lípidos para generar el autofagosoma, tales como el retículo endoplásmico, aparato de Golgi, mitocondrias y membrana plasmática (Militello 2011).

Aunque el mecanismo molecular de la autofagia no ha sido totalmente descrito, muchos de los genes implicados en todas las formas de este proceso se han caracterizado tanto en levaduras y células de mamíferos. Para muchos de los genes ATG de levaduras los ortólogos correspondientes se han identificado en los eucariotas superiores, incluyendo mamíferos y el hombre. Uno de ellos es la proteína LC3 (homólogo en mamífero de la proteína de levadura Atg8), la cual se asocia con el fagoforo y las membranas de vacuolas autofágicas, siendo un marcador de autofagosomas.

La diferenciación eritroide implica la progresión a través de varios cambios bioquímicos y morfológicos desde los precursores nucleados al eritrocito maduro. Una de estas modificaciones intracelulares es el aumento en la producción de hemoglobina. Publicaciones anteriores han demostrado que los diferentes estimuladores fisiológicos y farmacológicos de maduración eritroide son capaces de inducir la síntesis de la hemoglobina en los diferentes tipos de células hematopoyéticas humanas como las células K562 (Bianchi 2012).

De acuerdo con estas observaciones, nuestros resultados sobre la medición de hemoglobina por espectrofotometría y por la observación de células coloreadas por la reacción de bencidina, indican que dihidroxiurea,

hemina y ácido butírico producen un aumento en los niveles de hemoglobina, siendo hemina el que induce el mayor incremento.

Algunos informes han propuesto que la autofagia tiene un papel importante en la maduración eritroide (Fader 2005), por lo que decidimos estudiar esta vía intracelular durante el proceso de eritropoyesis. Conforme a los datos obtenidos del análisis de imágenes, nuestros resultados muestran que las células K562 tratadas con hemina y teñidas con May-Grunwald Giemsa revelaron la presencia de numerosas vacuolas, así como un aumento del tamaño de las mismas comparadas con células control. Esto nos llevó a determinar si hemina estaba induciendo autofagia en las células K562. // De forma interesante, observamos por microscopía confocal que hemina induce la autofagia, generando un aumento en el tamaño de las vesículas autofágicas con una disminución concomitante en el número de vesículas. Esto sugiere que podrían generarse eventos de fusión homotípicos y heterotípicos entre vesículas autofágicas y vesículas de la vía endocítica (lisosomas). Asimismo, observamos por microscopía electrónica de transmisión (TEM) el agrandamiento de autofagosomas con material degradado en su interior (Figura 1). Además, la inducción de la autofagia por hemina fue confirmada por Western blot, observándose un flujo autofágico normal (Figura 2).

La diferenciación terminal de reticulocitos a eritrocitos implica la eliminación coordinada de organelas (Holm: 2002). Varios informes han demostrado que la mitofagia, un proceso de autofagia específica, está implicada en el aclaramiento mitocondrial programado, jugando un papel importante en la diferenciación de los reticulocitos y linfocitos T (Zhang, 2009). // Nuestros resultados muestran que las mitocondrias son secuestradas en las estructuras autofágicas degradativas, en células K562 incubadas con hemina, siendo la proteína NIX (un miembro de la familia Bcl-2) necesaria para la incorporación de estas organelas dentro del autofagosoma. Y también son concordantes con trabajos que demuestran que los glóbulos rojos obtenidos en ratones Nix-/- acumulan mitocondrias, evitando su de-

gradación (Novak, 2010). // Asimismo, se ha observado que el aclaramiento de mitocondrias se encuentra alterado en ratones Nix-/-, los cuales tienden a desarrollar anemia, reticulocitosis e hiperplasia mieloide eritroide (Sandoval, 2008; Schweers, 2007). En conjunto, estos resultados sugieren que NIX juega un papel crítico en la maduración eritroide.

La despolarización de la mitocondria es una importante señal para la eliminación de esta organela. Para determinar si hemina producía despolarización utilizamos la sonda TMRE, que marca las mitocondrias polarizadas. Con esto demostramos que el tratamiento con hemina de las células K562 produce una reducción del 50% en el potencial de membrana mitocondrial. Sin embargo, la viabilidad de las mitocondrias aisladas no se vio afectada cuando estos orgánulos se incubaron en presencia de hemina, lo cual indica que el efecto de hemina sobre la organela no es directo.

Por otro lado, también pudimos determinar que hemina induce el secuestro de mitocondrias por la vía autofágica, y las dirige hacia la degradación lisosomal. Esto se logró visualizar por microscopía confocal, al observar que las mitocondrias marcadas con mitotraker, colocalizaban con vesículas autofágicas marcadas con GFP-LC3 (Figura 3), y que estas estructuras eran degradativas, ya que también colocalizaban con vesículas marcadas con la proteína lisosomal GFP-LAMP1.

Los datos obtenidos en nuestro trabajo sugieren que hemina es capaz de producir despolarización de la membrana mitocondrial e inducir mitofagia en células K562, siendo la proteína NIX necesaria para la progresión de la degradación de esta organela. Este proceso inducido por hemina nos permite dilucidar un mecanismo molecular que permitiría una maduración eritroide más rápida y eficiente, el que podría ser tenido en cuenta como una alternativa terapéutica que ayude en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica (LMC).

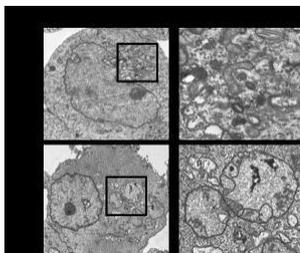


Figura 1. Microfotografía electrónica de células K562 tratadas con hemina, donde se observan vesículas degradativas (autofagolisomas).

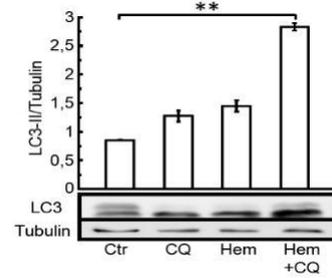


Figura 2. Detección de la proteína LC3 por Western blot en lisado de células K562, incubadas en medio completo en ausencia (Ctr)

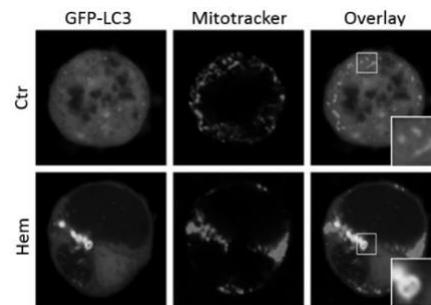


Figura 3. Microscopía confocal donde se observa que las células K562 tratadas con hemina muestran un mayor número de mitocondrias (rojas) secuestradas en vesículas autofágicas (verdes), en comparación con las células control.