

Hemina estimula la maduración eritroide, induciendo la vía autofágica

Federico Moor¹; Agustín N. Vergara¹; B. Nebaí Salassa¹; María I. Colombo^{1, 2}; Claudio M. Fader^{1,2}

¹Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Juan Agustín Maza

²Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Cuyo
cfader@fcm.uncu.edu.ar

La autofagia es una vía intracelular mediante la cual algunas organelas (ej. mitocondrias) son secuestradas para su degradación. El material que será degradado es secuestrado mediante la prolongación de membranas especializadas del retículo endoplasmático (fagóforo), la cual fusiona sus extremos para dar lugar al autofagosoma, una estructura de doble membrana. El autofagosoma finalmente puede fusionarse con el lisosoma para degradar su contenido en un autolisosoma. La vía autofágica ha sido asociada a la diferenciación de algunos tipos celulares, como los eritroblastos, ya que es necesario el remodelamiento y la eliminación de ciertas estructuras internas. Una de las proteínas que es requerida en la autofagia, es la proteína citosólica LC3, la cual es un buen marcador de autofagosomas. En nuestro laboratorio evaluamos el grado de maduración de las células K562 (eritroblastos leucémicos), midiendo los niveles de hemoglobina mediante una reacción colorimétrica. Nuestros resultados muestran que frente a distintos inductores de maduración, la estimulación de la maduración con hemina fue la más marcada. Así mismo, analizamos por Western blot los niveles de LC3 en un lisado celular, observando un aumento de la expresión de LC3 total, así como también un incremento del procesamiento de LC3 I a LC3 II, sugiriendo una estimulación de la vía autofágica. Además, se midieron los niveles de autofagia inducidos por los diferentes inductores, analizando por microscopia de epifluorescencia el grado de colocalización

entre dos marcadores de vesículas autofágicas (GFPLC3, monodansilcadaverina) y lisotracker (marcador lisosomal). Las vesículas que presentaban los tres marcadores fueron cuantificadas, observándose que hemina estimuló un aumento de la formación de vesículas autofágicas degradativas (autolisosomas). La pérdida de las mitocondrias es un marcador de maduración de células eritropoyéticas. Así mismo, la despolarización (pérdida de funcionalidad) de las mitocondrias es una señal para que estas organelas sean degradadas, evitando que se induzca la apoptosis. Para determinar el grado de funcionalidad de las mitocondrias, utilizamos la sonda TMRE, la cual marca fluorescentemente las mitocondrias polarizadas. Como resultado, observamos que las células incubadas con hemina presentaban una menor marca de mitocondrias polarizadas comparadas con el control, lo que nos sugiere que hemina induce la despolarización de las mitocondrias, favoreciendo su degradación. Por otro lado, células K562 que expresaban GFP-Lamp1 (un marcador lisosomal) y tratadas con hemina, fueron incubadas en presencia de mitotracker (un marcador de mitocondrias). De forma interesante, se observó un aumento del número de mitocondrias dentro de estructuras lisosomales, sugiriendo que son degradadas en este tipo de vesículas. En general, nuestros resultados sugieren que la estimulación de los mecanismos de maduración podría inducir una respuesta autofágica en células K562 que llevaría a una maduración más rápida y eficiente.