

Hemina induce la formación de autofagosomas, favoreciendo la maduración eritroide

A. Vergara¹, F. Moor¹, G. Recalde^{1,2}, M. I. Colombo^{1,2} y C. M. Fader^{1,2}

Recursos humanos en formación: A. Vergara, F. Moor y G. Recalde

¹Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Juan Agustín Maza

²Facultad de Ciencias Médicas. UNCuyo. Mendoza

cfader31@gmail.com

Resumen

La autofagia es un mecanismo por el cual macromoléculas citosólicas e incluso organelas enteras son secuestradas en estructuras membranosas para su degradación. Este proceso comienza con la prolongación de membranas especializadas del retículo endoplasmático (fagóforo), las que envuelven parte del citoplasma y las organelas, y forman una vesícula de doble membrana –llamada autofagosoma– cuando sus extremos entran en contacto y se fusionan.

El autofagosoma madura por fusión con vesículas provenientes de la vía endocítica (por ejemplo, los cuerpos multivesiculares o MVB), dando origen al anfisoma. Éste termina fusionándose con el lisosoma, para degradar su contenido. Diferentes señales extracelulares pueden inducir la activación de la vía autofágica, tales como el ayuno (privación de suero y aminoácidos). Una de las proteínas que es requerida en la autofagia es la proteína citosólica LC3/Atg8, la cual es un buen marcador de autofagosomas.

La autofagia ha sido asociada a procesos tan importantes como la diferenciación de algunos tipos celulares, como los reticulocitos, ya que son necesarios el remodelamiento y la eliminación de ciertas estructuras internas. En nuestro laboratorio evaluamos el grado de maduración de las células K562 mediante la medición de los niveles de hemoglobina. Esto se realizó mediante la medición de la autofluorescencia de la hemoglobina o por la medición del carácter reductor de ésta frente a compuestos como la bencidina, lo que dio una reacción colorimétrica.

Nuestros resultados muestran que, frente a distintos inductores de maduración, como la hidroxurea, la

hemina, un éster de forbol (PMA) o butirato de sodio, la estimulación de la maduración con hemina fue la

más marcada, comparada con el control. Además se midieron los niveles de autofagia inducidos por los compuestos anteriormente mencionados, analizando por microscopia de epifluorescencia el grado de colocalización entre GFP-LC3, monodansilcadaverina (MDC) y lisotracker (marcador lisosomal).

Las vesículas que presentaban los tres marcadores fueron cuantificadas, lo que permitió observar que la hemina indujo la autofagia en mayor grado que los demás inductores. También determinamos, por microscopía confocal, la distribución de las proteínas LC3 o Rab11 en células K562 que expresaban GFP-LC3 o coexpresaban RFP-LC3 y GFP-Rab11 al ser incubadas en presencia de hemina. Observamos que el tratamiento con hemina generó un agrandamiento de vesículas decoradas con GFP-LC3.

Del mismo modo, en aquellas células que sobreexpresan RFP-LC3 y GFP-Rab11 se generó un agrandamiento de vesículas en los que coexistían ambos marcadores. En células K562 que expresaban GFP-Lamp1 e incubadas con hemina se marcaron las mitocondrias con mitotracker, lo que evidenció un aumento del tamaño de las vesículas con ambos marcadores.

Del mismo modo, células K562 sobreexpresando GFP-LC3 fueron incubadas en presencia o ausencia de hemina. Luego se marcaron los lisosomas con DQ-BSA y se observó que la estimulación con hemina aumentaba la cantidad de vesículas que contenían DQ-BSA. Esto confirmó que son autofagolisosomas degradativos.

Nuestros resultados sugirieron 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.