

Estudio celular y molecular de la autofagia durante los procesos de maduración en células eritroleucémicas

Cellular and molecular study of autophagy during the erythroleukemia cell maturation process

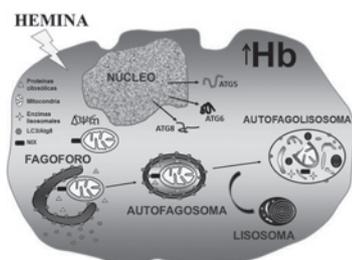
Director: Claudio Fader Kaiser^{1,2}

Integrantes del proyecto: R. Milan¹; J. Martín¹; B.N. Salassa^{1,2}

¹ Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Juan Agustín Maza, Mendoza, Argentina

² IHEM-CONICET. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo

Contacto: cfader@fcm.uncu.edu.ar



La autofagia es un mecanismo de homeostasis celular, en el cual macromoléculas citosólicas e incluso organelas enteras son degradadas en los lisosomas. Durante este proceso varias proteínas ATG (autophagy-related gene) se combinan de forma secuencial, induciendo la prolongación de membranas especializadas del retículo endoplasmático (Fagoforo) que al fusionarse forman el autofagosoma. Esta vacuola comienza a madurar por fusión con vesículas provenientes de la vía endocítica dando origen al anfisoma, el cual finalmente se fusiona con el lisosoma para degradar su contenido (autofagolisosoma). Diariamente se producen en nuestro organismo cantidades extraordinarias de células sanguíneas, tales como los glóbulos rojos o eritrocitos, los cuales se generan a través de un

proceso denominado eritropoyesis. Es importante tener en cuenta que los reticulocitos (precursores inmediatos de los eritrocitos) sufren una extensiva remodelación de sus estructuras internas, lo cual asegura su función celular crítica. Varios trabajos han demostrado la importancia de la autofagia en la maduración de algunos tipos celulares, como los reticulocitos. El estudio en profundidad de los mecanismos moleculares que regulan la autofagia aportará datos importantes para entender con mayor profundidad los mecanismos de diferenciación eritroide, especialmente en las hemopatologías como las leucemias. Nuestro modelo celular son las células K562, las cuales provienen de pacientes con leucemia mieloide crónica, siendo muy utilizadas como modelo de diferenciación eritroide. Resultados previos de nuestro laboratorio, por microscopía de fluorescencia confocal y microscopía electrónica de transmisión, han demostrado que la incubación de las células K562 con hemina (inductor fisiológico de la eritropoyesis) es capaz de inducir la autofagia. Actualmente decidimos estudiar si hemina es capaz de aumentar los niveles de expresión de algunos genes relacionados con la autofagia. Para ello realizamos una RT-PCR en tiempo real de las células K562 incubadas en presencia de hemina. De forma interesante, observamos que hemina incrementó los niveles de los genes autofágicos ATG8, ATG6 y ATG5. Consistente con esta observación, también se observó, por Western Blot, elevados niveles de estas proteínas, sugiriendo que hemina es capaz de estimular la autofagia, induciendo la expresión de los genes autofágicos. Asimismo, nuestro análisis por microscopía de fluorescencia confocal demostró que hemina es capaz de inducir un aumento de la cantidad de mitocondrias dentro de los autofagosomas degradativos. Para corroborar estos datos, decidimos realizar por microscopía confocal, cortes seriados de distintos planos focales de células K562 incubadas en presencia de hemina. Luego, mediante el Software Reconstruct, armamos una reconstrucción en 3 dimensiones de la célula. Claramente se puede observar mitocondrias atrapadas dentro de autofagosomas. Esto nos confirma que hemina induce la degradación de las mitocondrias en este tipo celular. Trabajos recientes han demostrado que la proteína NIX es requerida para dirigir las mitocondrias al interior del autofagosoma para su degradación. De forma interesante, hemos determinado mediante la sobreexpresión de esta proteína, así como el knockdown (depleción) de la misma con RNAs interferentes, que NIX es necesaria para la degradación de las mitocondrias, inducida por hemina. Además, mediante la utilización de sondas fluorescentes mitocondriales, pudimos observar por microscopía de fluorescencia, así como por citometría de flujo, que hemina induce la despolarización de las mitocondrias. En conclusión, nuestros resultados sugieren que la estimulación de los mecanismos de maduración eritroide, por un compuesto natural como es la hemina, es capaz de estimular la síntesis de hemoglobina e inducir una respuesta autofágica en células K562. Esta respuesta genera el secuestro de mitocondrias dentro de los autofagosomas para su degradación, siendo la proteína NIX fundamental para dicho proceso. Nosotros creemos que la inducción de este mecanismo llevaría a una maduración más rápida y eficiente.