

La hemina induce la autofagia en eritroblastos leucémicos

F. Moor¹, A. N. Vergara¹, B. N. Salassa¹, M. I. Colombo^{1,2} y C. M. Fader^{1,2}

Recursos humanos en formación: F. Moor y B. N. Salassa

¹Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Juan Agustín Maza

²Facultad de Ciencias Médicas, UNCuyo

cfader@fcm.uncu.edu.ar

Introducción

La autofagia es una vía intracelular mediante la cual organelas son secuestradas en vesículas llamadas autofagosomas para su degradación. Este proceso fisiológico ha sido asociada a procesos como el envejecimiento celular y la maduración de algunos tipos celulares, como los eritroblastos, que eliminan algunas de sus organelas por esta vía para dar lugar al glóbulo rojo maduro. Una de las proteínas que es requerida en la autofagia es la citosólica LC3, que es un buen marcador de autofagosomas cuando se asocia a la membrana del mismo.

Objetivo

Determinar el rol de la hemina en la maduración eritropoyética y su relación con la autofagia, dilucidando los componentes moleculares involucrados en esta vía degradativa intracelular.

Metodología de trabajo

Utilizamos células K562 (eritroblastos leucémicos) tratados con 50µm de hemina. Luego cuantificamos la maduración celular (concentración de hemoglobina) por espectrofotometría. Asimismo, observamos la estimulación de la vía autofágica por microscopía confocal y Western blot.

Resultados

Incubamos células K562 frente a distintos inductores de maduración, determinando que la estimulación con hemina produjo una mayor maduración (aumento del porcentaje de hemoglobina). Por Western blot analizamos los niveles de LC3 en un lisado celular, observando un aumento de la expresión de LC3 total, como también un incremento del procesamiento de LC3 I a LC3 II, sugiriendo una estimulación de la vía autofágica. Medimos los niveles de autofagia inducidos por diferentes inductores, analizando por microscopía confocal la colocalización entre dos marcadores de vesículas autofágicas (GFP-LC3, monodansilcadaverina) y lisotracker (marcador lisosomal). Las vesículas que presentaban los tres marcadores fueron cuantificadas, observándose que la hemina estimuló un aumento de la formación de vesículas autofágicas degradativas (autolisosomas). La pérdida de las mitocondrias por despolarización

(pérdida de funcionalidad) es un marcador de maduración eritropoyética. Para determinar el grado de funcionalidad de éstas utilizamos la sonda TMRE, la cual marca fluorescentemente las mitocondrias funcionales polarizadas. Observamos que las células incubadas con hemina presentaban una menor marca de mitocondrias polarizadas, comparadas con el control, sugiriendo esto que la hemina induce la despolarización de mitocondrias, favoreciendo así su degradación. Células K562 que expresaban GFP-Lamp1 (marcador lisosomal) y tratadas con hemina fueron incubadas en presencia de mitotracker (marcador de mitocondrias). Se observó un aumento del número de mitocondrias dentro de estructuras lisosomales, sugiriendo que son degradadas en este tipo de vesículas.

Conclusión

Nuestros resultados sugieren que la estimulación de los mecanismos de maduración con hemina podría inducir una respuesta autofágica en células K562 que llevaría a una maduración más rápida y eficiente.

Publicaciones

II, III y IV Jornadas de Investigación de la Universidad Juan Agustín Maza (2010, 2011 y 2012). I Encuentro de Investigadores de la Red Andina de Universidades o RADU (2011), XLVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular o SAIB (2011), III Foro Provincial de Investigación, y reunión conjunta de las XII Jornadas de Investigación de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNCuyo y las I Jornadas de Investigación del Hospital Universitario (2012), XXIII Jornadas de Investigación y V Jornadas de Posgrado UNCuyo (2013) y La Brújula: Exposición de Ciencia y Tecnología (2013).