

Maduración de las células eritropoyéticas y su relación con la vía autofagia.

F. Moor¹, G. Recalde¹, A. Vergara¹, M. I. Colombo^{1,2}, C. M. Fader^{1,2}

1. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Juan Agustín Maza.

2. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Cuyo.

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 (fagoforo) que envuelven parte del citoplasma y organelas, y que al entrar en contacto sus extremos y fusionarse forman una vesícula de doble membrana llamada autofagosoma. El autofagosoma madura por fusión con vesículas provenientes de la vía endocítica (por ejemplo los cuerpos multivesiculares (MVBs)) dando origen al *anfísoma*. El anfísoma termina, posteriormente, 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 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 es necesario 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 medición del carácter reductor de la misma frente a compuestos como la benzidina, dando una reacción colorimétrica. Nuestros resultados muestran que frente a distintos inductores de maduración como lo son la hidroxurea, la hemina, un ester de forbol (PMA) o butirato de sodio, la estimulación de la maduración con hemina fue la más marcada, comparado con el control. Por otro lado determinamos por microscopía confocal la distribución de las proteínas LC3 o Rab11, en células K562 que expresaban GFP-LC3 o co-expresaban 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 tanto RFP-LC3 y GFP-Rab11 se generó un agrandamiento de vesículas en los que coexistían ambos marcadores. Para estudiar los posibles cambios moleculares que puede sufrir la proteína LC3 en presencia de un estímulo de maduración, se realizó una electroforesis de un lisado de células K562 GFP-LC3, incubadas en presencia o ausencia de hemina, luego fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa e incubadas con un anticuerpo anti-GFP. Como resultado, aquellas células que fueron incubadas en presencia de hemina la banda correspondiente a la proteína LC3 presentaba un peso menor (35Kd) a aquellas que no fueron incubadas en presencia de hemina (42Kd). Esto nos sugiere que frente al estímulo de maduración la proteína LC3 podría estar siendo clivada para generar un producto de menor peso molecular. En células K562 que expresaban GFP-Lamp 1 e incubadas con mitotracker y hemina, observamos un aumento del tamaño de las vesículas decoradas con GFP-Lamp 1 y marcadas con mitotracker. En células K562 estables para GFP-LC3 con y sin estimulación con hemina, y con DQ-BSA, se observó que en la estimulación con hemina aumentaba la cantidad de vesículas que contenían DQ-BSA degradada, confirmando que son autofagolisosomas degradativos. Esto nos demuestra que la estimulación con hemina no bloquea la vía degradativa.

Nuestros resultados sugieren que la estimulación de los mecanismos de maduración podría estimular una respuesta autofágica en células K562 y en células obtenidas de médula ósea de ratón, respuesta que llevaría a una maduración más rápida y eficiente.