

Atlas de Histología Vegetal y Animal

TEJIDOS ANIMALES

La célula
AMPLIACIONES II

Manuel Megías, Pilar Molist, Manuel A. Pombal

Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud.

Facultad de Biología. Universidad de Vigo

(Versión: Mayo 2022)

Este documento es una edición en pdf del sitio
<http://mmegias.webs2.uvigo.es/inicio.html>.

Todo el contenido de este documento se distribuye bajo
la licencia Creative Commons del tipo BY-NC-SA
(Esta licencia permite modificar, ampliar, distribuir y usar
sin restricción siempre que no se use para fines comerciales,
que el resultado tenga la misma licencia y que se nombre
a los autores)

La edición de este documento se ha realizado con el software \LaTeX
(<http://www.latex-project.org/>), usando Texstudio
(www.texstudio.org/) como editor.

Contenidos

1	Modelos de membrana	1
2	Uniones en hendidura	8
3	Autofagia	11
4	Vesículas	15
5	Transcitosis	23
6	Vesículas extracelulares	26
7	Apoptosis	30

1 Modelos de membrana

En esta página se explica cómo se ha llegado al modelo químico y físico de membrana celular con el que hoy se trabaja y se explica en los libros de texto. Actualmente la descripción de las células no se entiende sin las membranas. Las membranas no sólo establecen límites de la célula y los compartimentos intracelulares sino que multitud de funciones de las células residen en las membranas. Sin embargo, la formulación de la teoría celular se hizo sin conocimiento de la existencia de las membranas y sólo fue considerada necesaria en el siglo XX. De hecho, el concepto de membrana no fue muy popular hasta principios del siglo XX.

Inicialmente se llamó membrana a las paredes celulares más la porción citoplasmática adherida a ellas, que se observaba con dificultad con los microscopios de los siglos XVII y XVIII. Un paso importante para eliminar esa ambigüedad fue la posibilidad de que las células vegetales podían separarse de su “membrana” o pared celular. Por tanto la célula no dependía de la pared celular. Esto fue un avance importante también para poner en el mismo plano a las células animales y vegetales.

La estructura de la membrana celular, es decir, cómo se organizan las moléculas que la componen, ha ido en paralelo con el descubrimiento de dichas moléculas y sus propiedades, así como con el avance de los aparatos como el microscopio electrónico y de las técnicas experimentales en los laboratorios (Figura 1). Inicialmente se pensaba que las células estaban delimitadas por una capa terminal de características desconocidas, que se describía como un límite del protoplasma.

La primera propuesta sobre la composición de la membrana fue hecha por C.E. Overton en 1895 (Figura 2). Propuso que el trasiego de moléculas entre la célula y su entorno no dependía de la pared celular. Observó que las moléculas de naturaleza lipídica entraban más fácilmente en las células que las hidrofílicas por lo que intuyó que debía existir una barrera o cubierta lipídica delimitando a la célula. Incluso llegó a proponer que estaba compuesta por colesterol y otros lípidos. C.E. Overton no fue el

primero en sugerir que había un límite lipídico en la célula, ya se había mencionado hacia 1880, pero sus trabajos fueron más contundentes.

Más tarde, I. Langmuir descubrió que los lípidos anfipáticos, con una parte hidrófoba y otra hidrofílica, se disponían en las superficies acuosas formando monocapas con las cabezas polares hacia la parte acuosa y la parte hidrófoba fuera del agua. Es decir, formaban una membrana de una capa de lípidos (Figura 2). Esta idea fue importante para interpretaciones posteriores de la membrana celular puesto que la célula poseía estos lípidos anfipáticos en forma de glicerofosfolípidos y esfingolípidos. Otras líneas de investigación como la electrofisiología habían llegado a la conclusión de los axones de las células poseían electrolitos y podían crear gradientes gracias a envueltas semipermeables que podían cruzarse de manera regulada.

En torno a 1925, E. Gorter y F. Grendel, querían saber cuántos lípidos había en los eritrocitos. Se encontró que los lípidos extraídos de la membrana de los glóbulos rojos, los cuales sólo tienen la membrana plasmática, formaban una monocapa en la superficie de soluciones acuosas con un área que era el doble de la superficie estimada de la membrana del propio glóbulo rojo (Figura 2). Parece ser que se cometieron muchos errores cuantitativos en estos experimentos, pero, por suerte, unos compensaron a otros. Ellos encontraron una relación superficie eritrocito: superficie de lípidos extendidos de 1:2. En realidad, estudios más tardíos y precisos dan una relación de 1:1,3. Ese 0,7 que falta es debido a las proteínas, que por aquel entonces no sabía que debían incorporarse en las membranas.

De cualquier manera, el resultado que ellos obtuvieron les llevó a proponer que los glicerofosfolípidos se organizaban formando una bicapa lipídica con las cabezas polares hacia la solución acuosa, intracelular y extracelular, respectivamente, mientras que sus partes hidrófobas quedaban recluidas en su interior, a salvo del ambiente acuoso. Habían propuesto el modelo de bicapa lipídica de la membrana celular que explicaba tanto sus características físicas como químicas, y que además era termodinámicamente favorecida (Figura 2). Esta disposición se ajustaba más

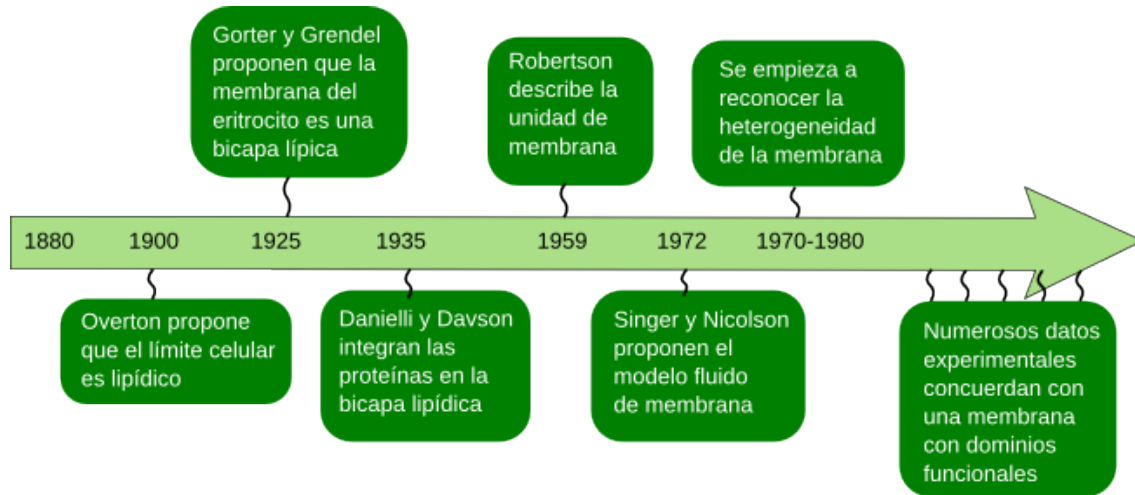


Figura 1: Principales propuestas y años aproximados en los que fueron hechas (modificado de Edidin 2003).

o menos al grosor de la membrana de 4 nm, estimado por H. Fricke en 1920-1930 tras medir la capacitancia de la membrana. Este modelo de bicapa lipídica fue la base para futuros ajustes y reformulaciones de organización de la membrana celular. .

En la década de 1930 nuevos experimentos aportaron datos acerca de las propiedades mecánicas de las membranas, los cuales no podían ser explicados simplemente con la participación de los lípidos. Éstos incluían tensión superficial, permeabilidad de solutos y resistencia eléctrica. Por ejemplo, encontraron que algunas moléculas podían cruzar las membranas más fácilmente de lo esperado por sus características químicas, lo cual implicaba que tenían algún tipo de ayuda. Así que se introdujo a las proteínas como parte de las membranas y como responsables de esos nuevos datos experimentales. H. Davdson y J.F. Danielli propusieron un modelo trilaminar de la membrana incorporando a las proteínas a la bicapa lipídica. Colocaron a las proteínas recubriendo la bicapa lipídica, es decir, tapizando ambas superficies, intentando que cumplieran las leyes termodinámicas (Figura 2).

Hasta que se pudieron observar las primeras muestras biológicas con el microscopio electrónico nadie pudo asegurar como estaba estructurada la membrana celular. Esto ocurrió en los años 1950. El modelo trilaminar de Davdson y Danielli se vio reforzado por las imágenes de microscopía electrónica. Aunque el microscopio electrónico apareció hacia

1930, no fue hasta 1950 que se pudieron observar membranas con nitidez. En los años 50, 60 y 70 del siglo pasado, se consiguieron imágenes de membranas cortadas transversalmente en las cuales aparecían tres líneas: dos líneas oscuras, separadas por una zona clara. Esta imagen se observó en todas las membranas de la célula y en todas las células estudiadas. Por ello, a esta organización oscuro-claro-oscuro se le denominó unidad de membrana, y se consideró universal para cualquier membrana celular. En esta época se midió el espesor de la membrana, 6-8 nm y J.D. Robertson (1960) propuso que la zonas oscuras correspondían a las proteínas y partes hidrofílicas y la zona central clara a las cadenas de lípidos. Cuando se sintetizaron membranas artificiales y se vieron con el microscopio electrónico se comprobó que también poseían la unidad de membrana, incluso sin proteínas. El modelo de Davson y Danielli, que fue popular hasta los años 60 del siglo pasado. coexistió con otros en los que los lípidos y proteínas se colocaban en diferente disposición pero siempre proteínas cubriendo la superficie de la membrana. A pesar de ello no se explicaba muy bien como los iones y otras moléculas cargadas podían cruzar la membrana.

En 1966, Green y Benson, trabajando con liposomas de mitocondrias, descubrieron que se podían extraer trozos, subunidades, de membranas con lípidos y proteínas, luego sugirieron que los lípidos podían ser solventes de proteínas globulares. En esos mismos años también se propuso que algunas proteínas

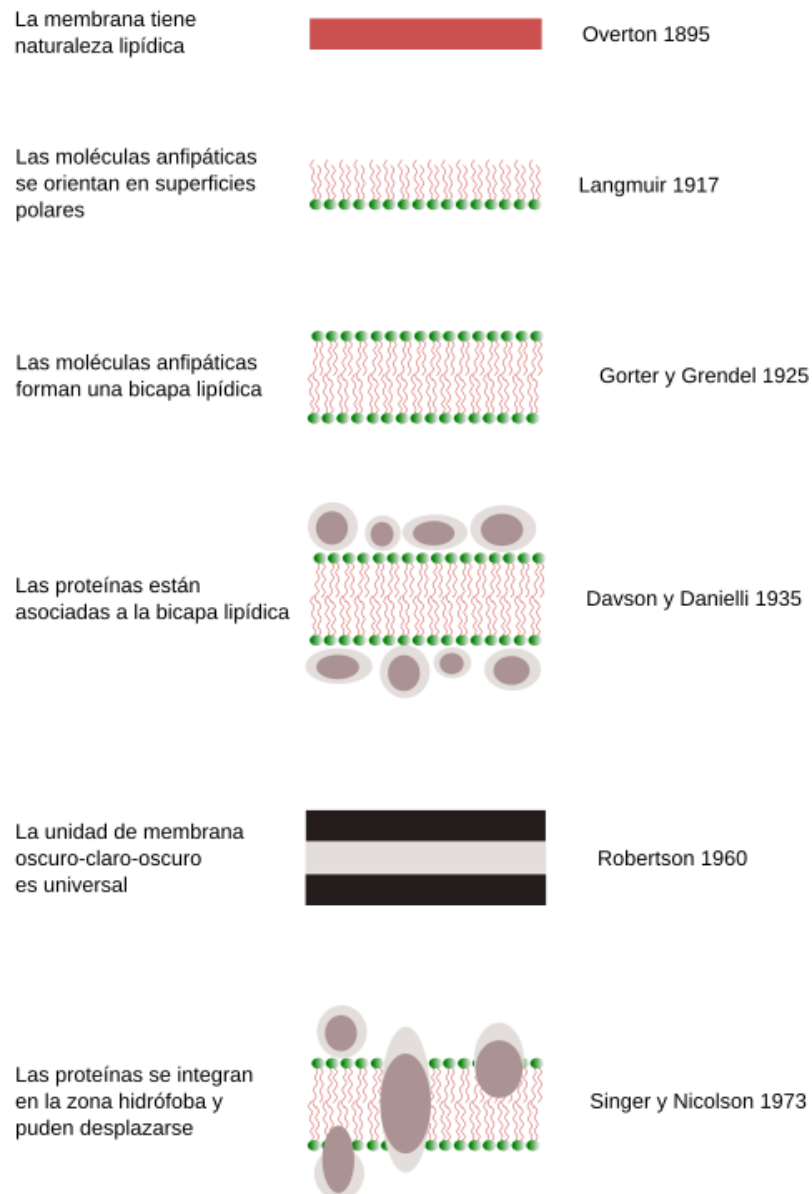


Figura 2: Principales modelos de organización de la membrana celular (modificado de Becker et al., 2003).

podrían incluso cruzar la membrana actuando como poros. Esto fue debido a que a medida que mejoraron las técnicas de separación de tipos de membrana se pudieron estudiar por separado sus composiciones químicas y se comprobó que era muy variable. Por ejemplo, había membranas con una tasa de lípidos respecto a las proteínas que podía variar desde el 50% al 80%. Por otro lado, muchas proteínas de membrana eran muy insolubles por lo que no se explicaba que fueran sólo periféricas en medio acuoso. Es decir,

en las membranas había muchas proteínas y éstas no era probable que fueran sólo periféricas, sino que deberían formar parte de la membrana con las porciones de sus cadenas con aminoácidos localizadas entre las cadenas de ácidos grasos y otras porciones hidrofílicas saliendo por ambos lados de la membrana. Además, desde 1945, la integración de las proteínas en la bicapa lipídica se benefició de los estudios de iones en los que se propuso que el mantenimiento de diferentes concentraciones de éstos a ambos lados de la membrana era

debida a una posible bomba que los propulsaba con consumo de energía. Hacia 1965 se encontró que las ATPasas estaban asociadas a las membranas. Estas proteínas usaban ATP para mover iones, luego debían ser transmembrana. Había otros problemas. ¿por qué unos azúcares se incorporaban a la células mejor que otros? ¿Por qué se saturaba el proceso de incorporación? Una posibilidad era la existencia de proteínas transmembrana.

En la década de los 70 del siglo pasado dos líneas de investigación mostraron evidencias de que había proteínas insertadas en las membranas. Una era el desarrollo de la microscopía electrónica de barrido. En 1963, Moor y Mühlethaller desarrollaron la técnica de criofractura para el microscopio electrónico. Y unos años más tarde se observó en el interior de las membranas unas estructuras globulares que no podían ser más que proteínas. La otra eran los estudios moleculares. En 1966 algunos trabajos indicaron que las proteínas no eran globulares, sino que podrían tener disposiciones más alargadas y que podrían insertarse en las membranas. Se podían distinguir dos dominios de la misma molécula, uno era intracelular y el otro extracelular, lo que sólo podía explicarse si dicha molécula atravesaba completamente la membrana plasmática.

En 1972, S.J. Singer y G. Nicolson (*Science* 175: 720-731), recogieron la información acumulada en la década anterior: movimiento flip-flop limitado de lípidos y nulo para las proteínas, difusión lateral de las moléculas, barrera permeable, proteínas con estructuras en alfa hélice, globulares y transmembrana, transiciones de fase de la membrana, y la necesidad que algunas enzimas tenían de los lípidos para su actividad. Con todo ello propusieron el modelo de mosaico fluido de membrana (Figuras 2 y 3) para incorporar todos estos datos nuevos (ver Figura 1 de Nicolson 2014). Uno de sus grandes ventajas era que recurría a la termodinámica, fuerzas electro-químicas, para explicar la organización de la membrana. Esto suponía que no sólo explicaba sino que predecía las propiedades de la membrana. Propusieron que las membranas están formadas por proteínas embebidas en una bicapa lipídica (de ahí la palabra mosaico). Las proteínas se incorporan a la bicapa y tienen dominios intra y extracelulares. Esto es importante

porque establece una vía de comunicación entre el interior y el exterior celular, bien mediante la creación de canales hidrofílicos, bien como elementos transportadores que permiten salvar la barrera de cadenas de ácidos grasos, o bien como receptores que transmiten la información mediante cambios de conformación de la propia estructura molecular frente a señales. A este modelo se le incorporaron posteriormente las proteínas periféricas, tanto las unidas covalentemente a la membrana como las asociadas mediante enlaces eléctricos. Singer y Nicolson ya sugirieron que la interacción entre lípidos y proteínas debía ser funcionalmente importante para la membrana. El término fluido fue otro gran avance conceptual y se propuso como consecuencia de los datos aportados por trabajos previos. H.M. McConnell y D. Chapman realizaron experimentos de resonancia magnética en los que se mostraba que las moléculas de las membranas, tanto lípidos como proteínas, no estaban estáticas sino podían moverse lateralmente en la bicapa por difusión, con lo cual la membrana se transformó en una estructura dinámica y maleable. Incluso en estos experimentos se sugirió que la membrana es asimétrica, es decir que la monocapa citosólica tenía una composición diferente a la monocapa externa.

Este modelo de mosaico fluido ha explicado los datos experimentales conseguidos con otras técnicas actuales. Así, con la llegada de los marcajes selectivos de moléculas y su observación en tiempo real con microscopía de fluorescencia se pueden observar moléculas individuales en membranas íntegras y en condiciones más o menos fisiológicas. Se puede comprobar que las moléculas no están fijas en una posición sino que pueden moverse por la bicapa lipídica. Mediante espectroscopía cuantitativa se ha observado que los movimientos son sobre todo laterales, es decir, desplazamientos como si la molécula estuviera flotando en la bicapa lipídica, pero las inversiones o cambios de una monocapa a la otra de la membrana son muy infrecuentes.

Actualmente, el modelo se ha ido modificando y ajustando a los nuevos datos experimentales, que indican que la característica preponderante de la membrana es heterogeneidad, más que fluidez (Figura 3). Por ejemplo, mediante el seguimiento del movimiento de moléculas en células in vivo, y posteriormente in

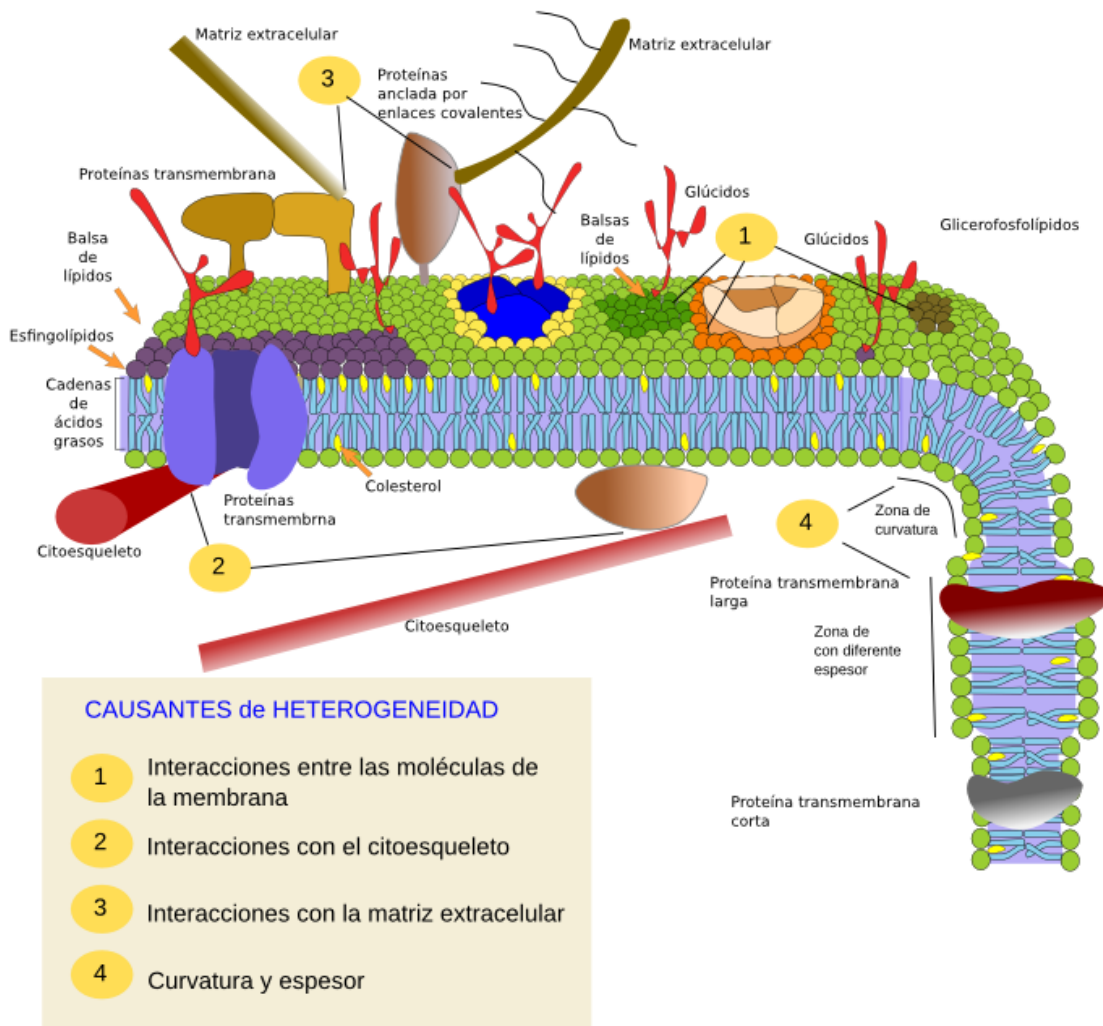


Figura 3: Modelo de membrana heterogénea, indicando las principales causas de esa heterogeneidad.

vitro, se ha encontrado que los movimientos de las moléculas no son completamente al azar, es decir, hay restricciones al movimiento. Estas restricciones son evidentes para las proteínas, pero más recientemente también se han encontrado restricciones a los lípidos, afectando principalmente a los esfingolípidos y al colesterol. Así, la membrana se ajusta al modelo de mosaico fluido en que las moléculas tienden a difundir lateralmente de forma libre, pero ese movimiento puede estar sometido a restricciones. Las restricciones a la movilidad de las moléculas de la membrana se agrupan en tres categorías: dependientes de las interacciones físico-químicas entre las propias moléculas, de las interacciones con el citoesqueleto

o con la matriz extracelular y dependientes de las propiedades físicas de la propia membrana, fundamentalmente grosor y curvatura. Estas restricciones hacen que la membrana no sea homogénea sino que las moléculas se distribuyan y agrupen en áreas de la superficie celular para formar los llamados dominios de membrana. Estos dominios tendrían una composición molecular característica que le permitirían llevar a cabo diferentes funciones. Por tanto el modelo de membrana actual está basado en el modelo de mosaico fluido, pero curiosamente, la posibilidad de difusión de las moléculas no produce una homogeneidad química de la membrana sino todo lo contrario, una heterogeneidad de dominios distribuidos

por toda la extensión de la membrana. Cada uno de estos dominios, del orden de nanómetros, puede variar su posición, su número, su tamaño (pocas decenas de nanómetros de extensión), aparecer y desaparecer en intervalos de tiempo cortos, y todo ello según las necesidades funcionales de la célula. La fluidez, paradójicamente, favorece la formación y la dinámica de estos dominios.

Hay numerosos datos con técnicas recientes que probablemente nos harán dibujar a las membranas de manera diferente a como aparecen actualmente en la mayoría de los libros de texto.

Más proteínas. Por ejemplo, en las representaciones de la membrana las proteínas están a baja concentración, dispersas y aisladas entre los lípidos. Pero las membranas están llenas de proteínas, que interactúan entre sí, y además varían considerablemente en grosor. Hay que tener en cuenta que una membrana plasmática tipo tiene hasta un 50 % del peso de proteínas. Se estima que hay una proteína por cada 40 lípidos. Debido al pequeño tamaño de los lípidos se calcula que hay sólo de uno a dos nanómetros de distancia entre las proteínas. En realidad es muy probable que las proteínas formen grandes complejos macromoleculares, y que, mediante sus anclajes a citoesqueleto y matriz, y las interacciones entre ellas, puedan actuar como un esqueleto para las propias membranas.

Espesor irregular. En cuanto al espesor de la membrana, se podría pensar que la evolución ha llegado a producir proteínas transmembrana cuyo segmento hidrófobo se ajuste al espesor de la zona de ácidos grasos de la membrana, pero esto no es así. Hay proteínas con zonas hidrófobas más largas que otras y, por tanto, para quedar protegidas dentro de la membrana los lípidos deben ajustarse para cubrirlas, lo que hará membranas más gruesas según la zona (Figura 4).

Superficies asimétricas. Mediante el uso de microscopios de fuerza atómica se pueden estudiar las superficies de membranas del orden de nanómetros, todo ello con libre movimiento de las moléculas. El estudio de la membrana de los eritrocitos ha arrojado datos curiosos. Por ejemplo, la superficie externa es muy lisa, lo que indica que ni el glicocáliz ni el dominio extracelular de las proteínas sobresalen

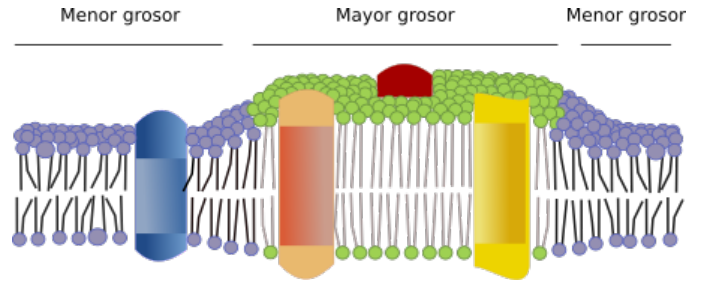


Figura 4: Dominio de membrana creado por diferencias de espesor.

mucho más allá de la capa de cabezas hidrofílicas de los lípidos de membrana. La barrera externa sería una capa hidrofílica compuesta por las cabezas de los fosfolípidos, dominios proteicos extracelulares y los azúcares que se situarían entre ellas. Sin embargo, la parte interna es tiene muchos altibajos, que se achacan a los dominios intracelulares de las proteínas (Figura 5).

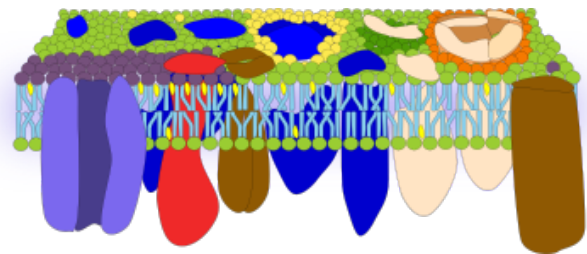


Figura 5: Modelo de membrana de eritrocito. Modificado de Wang et al., 2010.

Una aproximación similar en membranas celulares de células eucariotas ha revelado que las proteínas son muy abundantes y ocupan la mayor parte de la superficie de la membrana. El dominio proteico extracelular es de unos 4 nm, por encima de la cabeza de los lípidos. Hay tantas proteínas y tan empaquetadas que se forma una superficie muy homogénea. Se pueden detectar zonas ricas en colesterol y los azúcares parecen concentrarse en microdominios en el lado extracelular. Las proteínas transmembrana se colocan asimétricamente en la membrana, con una parte mucho mayor en el dominio citosólico. De hecho, el lado citosólico de las proteínas se extiende unos 10 a 12 nm desde las cabezas de los lípidos. Las proteínas del lado citosólico se agregan en microdominios ricos en colesterol. Estos dominios están separados unos 13 a 105 nm, y miden unos 53 nm. Hay que tener en cuenta

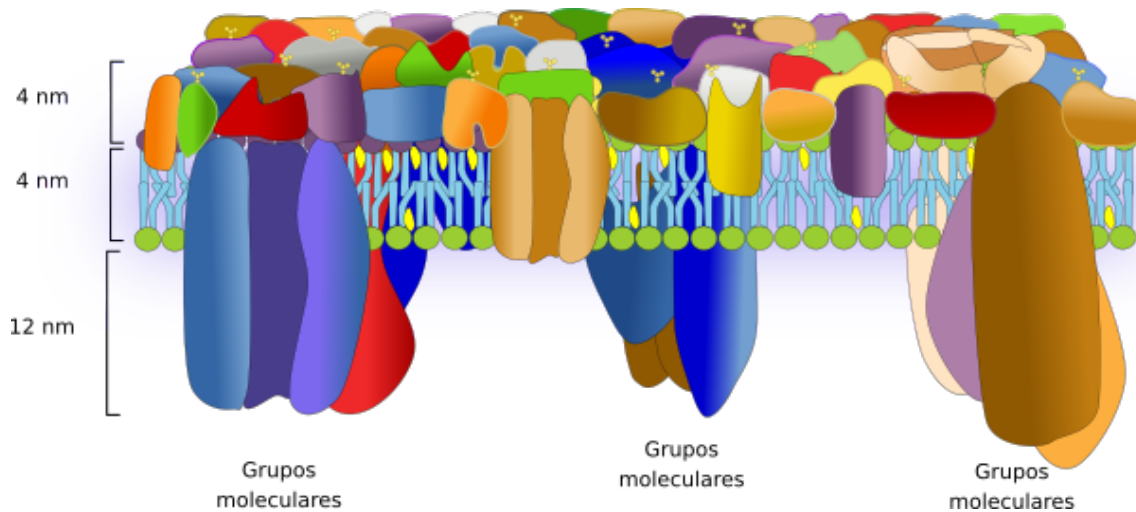


Figura 6: Modelo de membrana de una célula eucariota. Modificado de Zhao et al., 2014.

que la capa de lípidos mide unos 4 nm de espesor, por lo que todo esto resulta en un grosor de membrana de unos 20 nm (Figura 6). Este modelo supone que existe un barrera protectora externa básicamente formada por proteínas. Los microdominios de las proteínas transmembrana indican que las proteínas trabajan en grupos a modo de plataformas que aumentan la probabilidad de interacción entre proteínas y por tanto la eficiencia.

Bibliografía

Alberts A, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2007. *Molecular Biology of the Cell*. 5th edición. Garland Science. ISBN: 9780815341055.

Bagatolli LA, Ipsen JH, Simonsen AC, Mouritsen OG 2010. An outlook on organization of lipids in membranes: Searching for a realistic connection with the organization of biological membranes. *Progress in lipid research*. 49: 378–389.

Becker WM, Kleinsmith LJ, Hardin J, Raasch J. 2003. *The world of the cell*. 6th. San Francisco: Benjamin Cummings. ISBN-10: 0321716027 ISBN-13: 9780321716026.

Eddin M. 2014. Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. *Nature reviews molecular cell biology*. 9:32.

Engelman DM. 2005. Membranes are more mosaic than fluid. *Nature*. 438:578-80.

Lombard J. 2003. Once upon a time the cell membranes: 175 years of cell boundary research. *Biology direct*. 4(5), 414-418. Leer el artículo

Nicolson GL. 2014. The Fluid—Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40years. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 1838(6), 1451-1466.

Pollard TD, Earnshaw WC, Lippincott-Schwartz J. 2007. *Cell biology*. 2th edición. Saunders Elsevier Inc. ISBN: 978-1-4160-2255-8.

Wang H, Hao X, Shan Y, Jiang J, Cai M, Shang X 2010. Preparation of cell membranes for high resolution imaging by AFM. *Microscopy*. 110: 305-312.

Zhao W, Tian Y, Cai M, Wang F, Wu J, Gao J, Liu S, Jiang J, Jiang S, Wang H. 2014. Studying the nucleated mammalian cell membrane by single molecule approaches. *PLoSone*. 9 (5):e91595.

2 Uniones en hendidura

Las uniones en hendidura, o mejor denominadas como uniones intercelulares, son complejos moleculares a modo canales que se disponen en las membranas plasmáticas de células contiguas y que permiten la comunicación directa entre los citoplasmas de dichas células. Virtualmente todas las células de tejidos sólidos animales, aparte de por otros mecanismos, se pueden comunicar con sus vecinas mediante uniones en hendidura. Aunque estas uniones se explican tradicionalmente en el apartado de los complejos de unión, los cuales tienen una misión de adhesión, debería estudiarse junto con los mecanismos de comunicación celular, pues ésta es su principal misión. Fueron descubiertas en la década de los 60 del siglo XX con inyecciones de colorantes, los cuales se inyectaban en el interior de una célula y más tarde se podían observar en el interior de otras células contiguas. Cosa que sólo podría explicarse por una comunicación directa entre sus citoplasmas.

Morfología y estructura

En las imágenes de microscopía electrónica de transmisión las uniones en hendidura aparecen como segmentos rectos formados por dos membranas plasmáticas de células contiguas, donde el espacio intercelular está tan obliterado que no se puede observar a no ser a grandes aumentos. Este espacio intercelular varía entre 2 y 4 nm. Sin embargo, tridimensionalmente son como manchas o placas un tanto irregulares localizadas en la membrana plasmática, cuyo tamaño y forma dependen del tipo celular y del estado fisiológico en que se encuentre. Por ejemplo, en las células hepáticas pueden medir 0.3 μ m de diámetro.

Las uniones en hendidura están formadas por proteínas transmembrana que se asocian para formar canales. Estas proteínas se denominan conexinas (Figura 7). Se han encontrado 21 genes que codifican para conexinas diferentes en cordados. En humanos hay 21 genes para conexinas. 6 conexinas juntas forman un conexón o hemicanal, el cual se sitúa en la membrana plasmática de una célula alineado con otro hemicanal en la célula contigua, y juntos forman un canal, de unos 1,5 nm de diámetro, completo y continuo. El canal permite el paso de sustancias de bajo

peso molecular, menos de 1000 a 1200 daltons, entre ambos citoplasmas, aunque en insectos pueden ser mayores. Una zona de unión en hendidura está formada por un número variable de canales, pero se han encontrado hasta 10000 canales que implican a unas 120000 conexinas.

Función

El poro del canal permite el paso de sustancias como iones, azúcares sencillos, segundos mensajeros como el AMPc o calcio, aminoácidos, o pequeños ARNs, pero no proteínas, lípidos o moléculas largas de ARN.

Las uniones en hendidura, al permitir la libre difusión entre células vecinas, hacen posible un acoplamiento eléctrico y metabólico entre células vecinas. Por ejemplo, hay acoplamiento entre neuronas que permite sincronizar sus cambios en el potencial de membrana, además de acelerar la transmisión nerviosa, puesto que evita el proceso de liberación y transducción de neurotransmisores. Las uniones en hendidura entre neuronas forman las denominadas sinapsis eléctricas. Asimismo, las células gliales del sistema nervioso forman una red de células conectadas por uniones en hendidura. Las contracciones rítmicas del músculo cardíaco, las del útero durante el parto, del músculo liso del digestivo durante las contracciones peristálticas, o las de los músculos del iris del ojo para acomodarse a diferentes intensidades de luz, son una consecuencia del acoplamiento celular por uniones en hendidura. Otras células no excitables, como los hepatocitos o las células somáticas de los folículos ováricos están sincronizadas metabólicamente por las uniones en hendidura. La agregación plaquetaria que ocurre en las paredes de las arterias es importante para sellar los vasos sanguíneos. Las uniones en hendidura se forman entre las plaquetas adheridas a la pared arterial comunicando el interior de las plaquetas y favoreciendo una mayor adhesión entre ellas.

La permeabilidad de las uniones en hendidura puede ser modulada por la célula, mediante la expresión de diferentes tipos de conexinas. Esto depende del tipo celular y del estado de diferenciación de la célula. Las propiedades del hemicanal depende de las conexinas que lo formen, pueden ser homoméricos

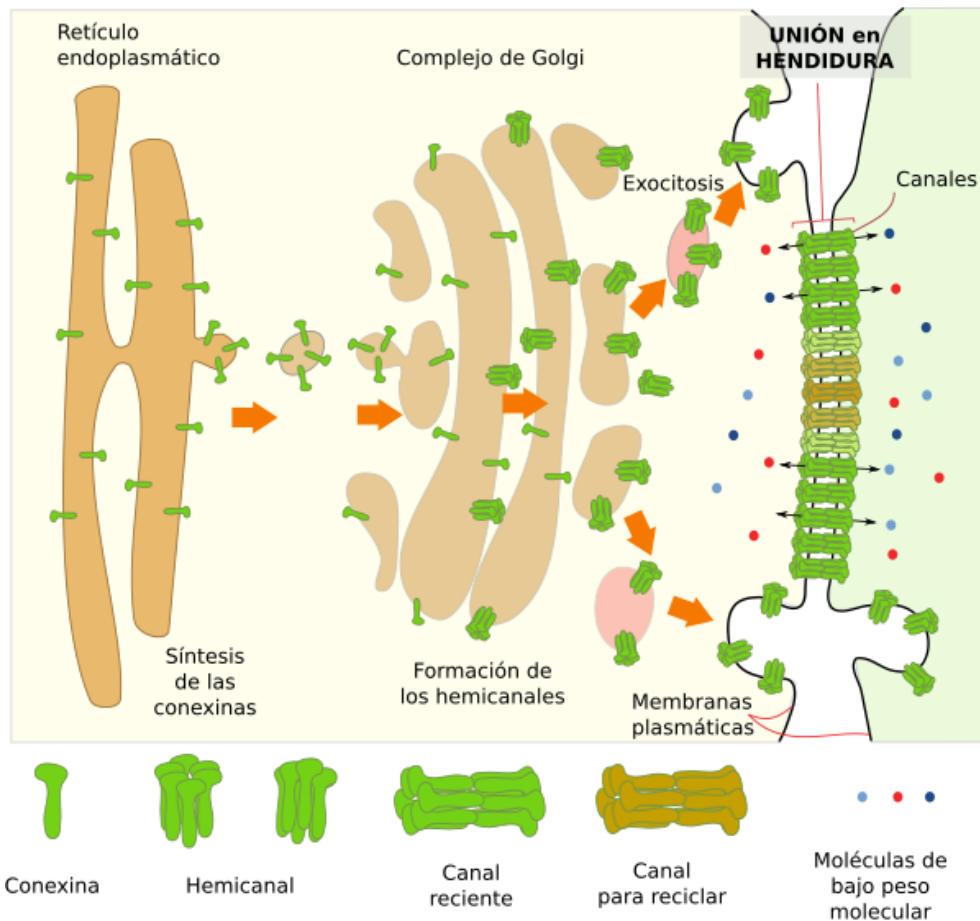


Figura 7: Síntesis, ensamblaje y formación de las uniones en hendidura. Los citoplasmas amarillento y verdoso pertenecen a células contiguas (modificado de Laird et al., 2015).

(la misma conexina) o heteroméricos (distintas conexinas forman en mismo hemicanal), pero no todas las combinaciones están permitidas. La mayoría de las células expresan al menos dos tipos de conexinas. Además, los canales pueden ser homotípicos, cuando los dos hemicanales que forman un canal son iguales, heterotípicos, cuando son diferentes.

Los hemicanales no están permanentemente abiertos sino que más o menos aleatoriamente cambian entre abiertos y cerrados. El porcentaje de tiempo que permanecen abiertos depende de diversos factores como el pH interno, la concentración de ciertos iones, por ejemplo una alta concentración de calcio citosólica, o por señales externas como la dopamina en algunas células de la retina. Prácticamente todos los hemicanales son sensibles al voltaje la membrana. Estos tipos de regulación serían a corto plazo

o rápida. La comunicación por uniones en hendidura también se puede regular a largo plazo. Las placas de hemicanales que forman las uniones en hendidura son muy plásticas: se forman de nuevo, crecen, se dividen, se fusionan, decrecen y desaparecen. La célula puede regular el número de hemicanales en la membrana por procesos de endocitosis, retirándolos de la membrana, o exocitosis, aportándolos a la membrana. Pero también se puede controlar el ensamblado de los conexones o modificaciones post-trasduccionales como la fosforilación de las conexinas. Se ha comprobado que los nuevos hemicanales se añaden al borde de la placa de la unión en hendidura y que los del centro son retirados. Hay un reciclado continuo que lleva a una renovación completa de los conexones de una placa en cuestión de horas.

Mutaciones en los genes de las conexinas provocan

hasta 14 enfermedades conocidas tales como la sordera, dermatopías, cataratas, cardiomiopatías, y varios tipos de cáncer. Estudiando casos patológicos se ha encontrado que algunas células podrían usar los hemicanales para otra actividad diferente a la de comunicación intercelular. Así, se ha propuesto que los hemicanales podrían servir bajo ciertas circunstancias para establecer una comunicación directa entre el citosol y el medio extracelular.

Las panexinas son unas proteínas transmembrana que se descubrieron en el año 2000. Se han encontrado sólo tres panexinas: 1, 2 y 3. Aunque no muestran una secuencia de aminoácidos homóloga a las conexinas, su estructura tridimensional en la membrana es similar y también forman hemicanales hexaméricos. La panexina 1 se expresa en todos los tejidos, mientras que la panexina 2 parece restringirse al sistema nervioso central, y la 3 al hueso, cartílago y piel. Estos hemicanales no sirven para comunicar con otras células citoplasma-citoplasma, puesto que no se alinean con otros hemicanales de panexinas de células vecinas para formar canales, sino que forman hemicanales aislados en las membranas que comunican el citoplasma con el espacio exterior. De esta manera la célula puede liberar moléculas de bajo peso molecular como las purinas y que actuarían de forma paracrina.

Bibliografía

Goodenough DA, Paul DL. 2009. GAP junctions. Cold spring harbour perspective in biology. 1:a002576.

Laird, DW, Lampe PD, Johnson RG. 2015. Dinámica y función de las uniones intercelulares. Investigación y ciencia. 466:66-73.

Sáez JC, Berthoud VM, Brañes MC, Martínez AD, Beyer EC. . 2003. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. 83: 1359 –1400.

3 Autofagia

La autofagia es un proceso, presente en todas las células eucariotas, por el cual se digieren moléculas y orgánulos intracelulares en los lisosomas. La palabra autofagia fue acuñada por C. de Duve en 1963 y significa comida (fagia) propia (auto). El papel de la autofagia es múltiple. Existe un nivel basal de autofagia que actúa como mecanismo de control de calidad en la célula eliminando aquello que resulte defectuoso; es un mecanismo de ajuste del metabolismo celular al estatus nutricional de la célula. Así, participa en procesos naturales como en el metabolismo energético, reciclado de orgánulos, regulación del crecimiento, inicio del desarrollo embrionario, envejecimiento, etcétera. Pero además, la autofagia se activa también cuando hay algún tipo de estrés celular, infección por patógenos o malformaciones celulares internas. Todas estas vías convergen en una maquinaria molecular llamada genéricamente como genes relacionados con la autofagia. Más de 30 genes se han identificado en levaduras que están implicados en la autofagia, entre los que destacan los genes Atg.

Tipos

Aunque el término autofagia se utiliza normalmente para hablar de macroautofagia, hay que tener en cuenta que existen otros tipos de autofagia en las células (Figuras 8 y 9):

Macroautofagia. Proceso mediante el cual se engloban elementos citoplasmáticos en un compartimento delimitado por una doble membrana. Este compartimento resultante se denomina autofagosoma y se fusionará con un lisosoma donde se degrada su contenido, además de la membrana interna del autofagosoma.

Microautofagia. En este caso la membrana del lisosoma forma pequeñas invaginaciones que se desprenden de la membrana y quedan en el interior del lisosoma, donde son degradadas. En estas invaginaciones se incorpora material citosólico. La invaginación en los cuerpos multivesiculares se podría considerar como microautofagia.

Autofagia mediada por chaperonas. Mediante este proceso se incorporan proteínas citosólicas al lisosoma

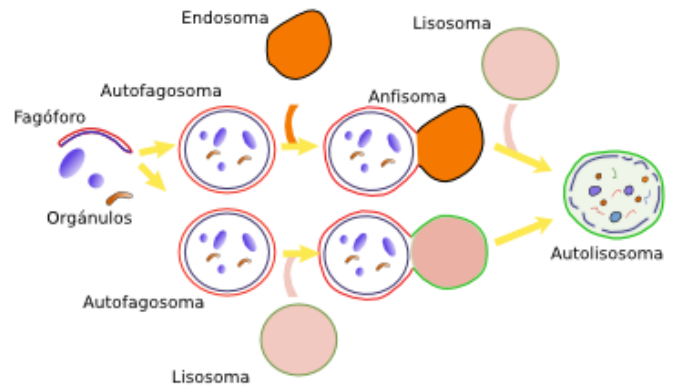


Figura 8: Macroautofagia. Tras la aparición del fagóforo se produce el cierre de sus membranas y se forma el autofagosoma, que está rodeado por una doble membrana. Tras esto, puede fusionarse con un endosoma formándose un anfisoma. En cualquier caso el paso final es fusionarse con un lisosoma para formar el autofagolisosoma, donde se degrada su contenido y la membrana interna. (Modificado de Klionsky 2007).

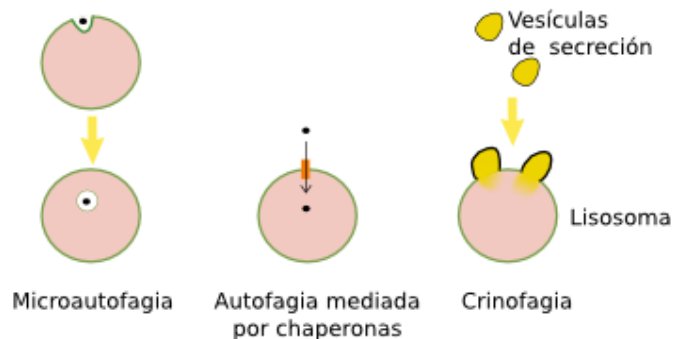


Figura 9: Distintos tipos de autofagia. (Modificado de Eskelinen 2008).

gracias a un transportador localizado en la membrana del lisosoma.

Crinofagia. Este proceso supone la fusión de vesículas destinadas a la exocitosis con el lisosoma.

Inducción

La autofagia se induce en una variedad de situaciones de estrés como la falta de alimento, la falta de factores de crecimiento, infecciones, estrés oxidativo o hipoxia. La autofagia se puede inducir experimentalmente, por ejemplo mediante la eliminación de aminoácidos de la dieta de la célula. También existe

una autofagia basal y permanente en todas las células. Por tanto, la autofagia es necesaria para las células animales bajo cualquier circunstancia. Sin embargo, las plantas podrían vivir sin autofagia cuando están en condiciones favorables, y sólo se activaría en condiciones de estrés. En las plantas se activa bajo escasez de alimentos, calor o salinidad, pero también para otras funciones normales como envejecimiento de las hojas, movilizar las reservas de almidón, germinación del polen, etc.

Proceso

El mecanismo mejor conocido es el de la macroautofagia. La macroautofagia puede ser selectiva o no selectiva. En la selectiva el material que se va englobar se marca primero y es reconocido por receptores de autofagia, incluyendo normalmente agregados de proteínas u orgánulos dañados o innecesarios (mitocondrias, retículo endoplasmático, cloroplastos, o incluso el núcleo bajo ciertas circunstancias). En la no selectiva se engloba una parte del citoplasma de manera inespecífica, como por ejemplo durante periodos de privación de alimento.

La macroautofagia selectiva es un proceso molecular similar para la mayoría de las estructuras que se van seleccionar y a degradar (Figura 10). En las células animales el marcaje de la estructura es normalmente mediante ubiquitinación, es decir, la adición de la proteína ubiquitina como una especie de etiqueta. Posteriormente hay receptores que reconocen ese marcaje, los cuales interaccionan con proteínas ancladas a las membranas del fagóforo. En el caso de los orgánulos se ubiquitinan los dominios citosólicos de las proteínas ancladas a sus membranas, como es el caso de las peroxinas de los peroxisomas, o proteínas de la membrana externa de las mitocondrias. Sin embargo, el retículo no se selecciona por ubiquitinación sino por proteínas específicas que se expresarán en sus membranas. En levaduras tampoco la eliminación de orgánulos se debe a ubiquitinación sino a la expresión de determinadas moléculas en sus superficies que son reconocidos por la maquinaria autofágica. Hay una autofagia selectiva que elimina patógenos intracelulares mediada también por ubiquitinación de alguna de sus proteínas.

La macroautofagia no selectiva, pero probable-

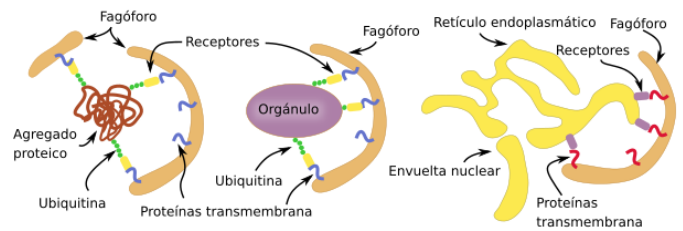


Figura 10: Esquema que muestra los principales tipos de proteínas implicados en la macroautofagia selectiva en células animales. (Modificado de Gatica et al., 2018).

mente también la selectiva, comienza con la activación de membranas celulares, las cuales pueden provenir del retículo endoplasmático, de zonas de contacto entre retículo y mitocondrias, del aparato de Golgi, y de la membrana plasmática. La activación se consigue con la síntesis de PIP3 de ciertas áreas de distintas membranas de la célula. Esta riqueza de PIP3 atraerá a diversas proteínas que provocaran la evaginación y desprendimientos de esas porciones de la membrana. Estas porciones formarán estructuras denominadas fagóforos o membranas de aislamiento. Las membranas del fagóforo engloban a las moléculas u orgánulos que van a ser degradados. Las membranas del fagóforo crecerá en extensión y terminará por unir sus extremos para formar un compartimento cerrado denominado autofagosoma, que posee doble membrana. El crecimiento tanto del fagóforo como del autofagosoma se produce por incorporación de nuevas porciones de membrana desde la membrana plasmática, desde el compartimento ERGIC, desde el aparato de Golgi (hay glúcidos con enlaces tipo O) y desde algunas vesículas. El autofagosoma se puede fusionar directamente con un lisosoma para formar el autofagolisosoma, donde se producirá la degradación de su contenido. El autofagosoma puede también recibir vesículas desde los endosomas o puede llegar a fusionarse directamente con ellos, tanto tempranos como tardíos. Los endosomas aportan proteínas lisosomales y bombas de protones, lo que va provocando la acidificación del fagosoma. Al compartimento resultante se le denomina anfisoma. Como último paso, el anfisoma se fusiona con los lisosomas permitiendo la degradación del contenido interno del autofagosoma junto con su membrana interna. Al compartimento que se crea tras la fusión también se le denomina aut-

ofagolisosoma. Cualquiera que sea el camino, la fusión del autofagosoma o anfisoma con los lisosomas se produce después de que a las membranas del autofagosoma o anfisoma lleguen proteínas del tipo SNARE y rab que posibilitan el reconocimiento del lisosomas y fusión con él. En las plantas el autofagosoma se tiene que fusionar con la vacuola para degradar su contenido.

Cuando se produce una intensa autofagia tras un estrés celular el número de lisosomas disminuye enormemente. Durante la autofagia los lisosomas disminuyen en número tras 4 horas de privación de alimentos, pero crecen de nuevo a las 11 h. La población de lisosomas tiene que regenerarse de nuevo para que la célula vuelva a ser funcional. Se ha comprobado que se generan nuevos lisosomas por tubulación de las membranas de los autofagolisosomas. En la formación de estos túbulos participa el citoesqueleto y en sus extremos se generan vesículas mediadas por clatrina, que una vez liberadas se irán acidificando hasta convertirse en lisosomas maduros. Estas vesículas se llaman protolisosomas, porque madurarán a lisosomas funcionales. A este proceso se le llama regeneración de lisosomas (en inglés ALR: *auphagic lysosome reformation*).

Funciones

La autofagia en condiciones normales favorece el mantenimiento u homeostasis celular. El papel de la autofagia durante el estrés es favorecer la supervivencia de la célula, al menos a corto plazo. Lo que hace es degradar contenido intracelular de forma masiva con dos propósitos: disminuir el número de elementos que consumen energía y producir aminoácidos y otras moléculas para su uso en procesos esenciales. Sin embargo, la autofagia no es un proceso beneficioso a largo plazo, ya que si la situación de estrés se prolonga en el tiempo el proceso degradativo termina por deteriorar a la célula de manera irreversible. En realidad, lo que consigue es ganar tiempo durante una situación de estrés para que la célula o el organismo pueda contrarrestar dicho estrés.

Papel en homeostasis

Se sabe que en ausencia de cualquier tipo de estrés celular existe un proceso basal de autofagia.

Es, junto con los proteosomas, el principal mecanismo de degradar contenido celular. Mientras que la ruta ubiquitina-proteosma se especializa en degradar moléculas jóvenes, la autofagia se ha especializado en degradar moléculas que tienen una vida larga. Pero además es la única vía que degrada orgánulos completos tales como mitocondrias, peroxisomas o retículo endoplasmático. Existe un mecanismo no selectivo, que es basal y permanente, y otro selectivo que elimina estructuras dañadas. Este mecanismo selectivo actúa como control de calidad, asegurando a la célula un sistema de orgánulos en buen funcionamiento.

Algunas células a las cuales se les inhibe la autofagia se atrofian y mueren. En las plantas se ha demostrado también un nivel basal de autofagia, que cuando se inhibe provoca procesos de envejecimiento o senescencia acelerados, independientemente de las cantidades de nutrientes que añadamos. Es especialmente interesante destacar que la autofagia está alterada en enfermedades neurodegenerativas. Determinadas funciones tisulares, como la producción de surfactantes en pneumocitos II, neuromelanina en células dopaminérgicas, o la maduración de los eritrocitos dependen de la actividad autofágica. En las células musculares la autofagia tiene la misión de eliminar las mitocondrias defectuosas. La autofagia a veces lleva a la muerte celular como ocurre con las células mamarias, tras la lactancia.

Deprivación de alimentos

La falta de alimentos provoca en los ratones de experimentación que todos los tejidos experimenten un aumento de la autofagia, excepto el tejido nervioso. Los ratones que no tienen los genes para llevar a cabo la autofagia mueren tras el nacimiento, probablemente por el periodo sin alimento que tienen que soportar en ese momento, y por no poder realizar autofagia basal. La autofagia desencadenada por hambre es no selectiva en cuanto a la material que se va a degradar. Hay un mecanismo molecular que parece ser responsable de esta respuesta celular. mTORC1 (target of rapamycin 1) es una quinasa de serina/treonina que responde a niveles energéticos y de nutrientes de la célula y regula el crecimiento y la división celulares. mTORC1 favorece el catabolismo (degradación) o anabolismo (síntesis) en función de

las condiciones en las que se encuentre la célula. Si la cantidad de aminoácidos es grande, lo que indica abundancia de nutrientes, mTORC1 se activa e inhibe los factores de transcripción que provocan la expresión de los genes que inician la autofagia. Si la cantidad de aminoácidos es baja, mTORC1 se inhibe y los factores de transcripción entran en el núcleo, y activan la expresión de los genes que inician la autofagia. Cuando la cantidad de nutrientes es alta mTORC1 se localiza en las membranas de los lisosomas donde es capaz de sentir los niveles de aminoácidos internos del lisosoma. Si esta concentración es vuelve baja, mTORC1 se despega de los lisosomas y se inactiva. La inactivación de mTORC1, además de activar la expresión de los genes de la autofagia, provoca el desplazamiento de los lisosomas hacia la zona interna de la célula donde se fusionan con los autofagosomas. Curiosamente, tras unas horas de autofagia, y restablecidos los niveles intracelulares de aminoácidos, mTORC1 se vuelve a activar y favorece la regeneración de los lisosomas a partir de los autofagolisomas mediante tubulación de éstos y emisión de vesículas que serán inicialmente prolisosomas que madurarán posteriormente a lisosomas.

Hipoxia

Durante una hipoxia cardiaca hay primero un corte en la circulación que conlleva un periodo de falta de suministro de oxígeno y nutrientes, seguido por un proceso de recirculación donde la sangre vuelve a fluir. Durante la isquemia o hipoxia, se dispara la macroautofagia debido a la falta de alimento y de oxígeno, lo cual tiene un carácter protector frente a la muerte celular.

Defensa frente a patógenos

La macroautofagia es uno de los sistemas de defensa celular más antiguos y es la primera línea de defensa frente a infecciones por protozoos, bacterias y virus. A la degradación de células extrañas por autofagia se le denomina xenofagia. En las respuestas contra patógenos la macroautofagia actúa a diferentes niveles: eliminando los patógenos que han entrado en la célula, activando la información a las células del sistema inmune que facilitan la degradación de los patógenos detectados, y el procesamiento y exposición de antígenos en superficie. Las células

tienen unas proteínas denominadas TLRs (Toll-like receptors) localizados en las membranas de los endosomas que son capaces de reconocer ácidos nucleicos de los patógenos que han entrado en la célula. Este reconocimiento disocia el complejo formado por las proteínas BCL2/Beclin1, lo cual provoca el inicio de la autofagia. Entonces se marcan los patógenos con ubiquitina para su eliminación. Curiosamente algunos virus han desarrollado mecanismos para proliferar en los autofagosomas y aprovechar la producción de energía que se consigue en ellos.

Bibliografía

Choi Y, Bowman JW, Jung JU. 2018. Autophagy during viral infection — a double-edged sword. *Nature reviews in microbiology*. doi: 10.1038/s41579-018-0003-6.

Eskelinen G-L. 2008. New insights into the mechanisms of macroautophagy in mammalian cells. *International review of cell and molecular biology*. 266:207-247.

Gatica D, Lahiri V, Klionsky DJ. 2018. Cargo recognition and degradation by selective autophagy. *Nature cell biology* 20:233-242.

Klionsky DJ. 2007. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nature reviews in molecular and cell biology*. doi:10.1038/nrm2245.

Liu Y, Bassham DC. 2012. Autophagy: pathways for self-eating in plant cells. *Annual review of plant biology*. 63:215-237

Murrow L, Debnath J. 2013. Autophagy as a stress-response and quality-control mechanism: implications for cell injury and human disease. *Annual review of pathology*. 8:105-137

4 Vesículas

Las células eucariotas se caracterizan por el reparto ordenado y dirigido de moléculas entre sus diferentes compartimentos. En muchos casos este reparto está mediado por vesículas. Las vesículas son pequeños compartimentos delimitados por una membrana que viajan entre algunos orgánulos y entre algunos orgánulos y la membrana plasmática. Sirven para transportar moléculas solubles y moléculas de membrana, que viajan en su interior o formando parte de la propia membrana de la vesícula, respectivamente.

El transporte vesicular supone una gran ventaja puesto que se pueden seleccionar de manera específica qué moléculas deben transportarse y a qué compartimento diana deben dirigirse. Por ejemplo, las moléculas de fibronectina deben ir a la matrix extracelular, no a los lisosomas. Pero además, las moléculas que llegan en las vesículas son necesarias para establecer identidad del propio compartimento y por tanto para determinar las funciones que éste puede llevar a cabo. Por ejemplo, las enzimas hidrolíticas ácidas deben ir a los lisosomas, pero no a los endosomas tempranos, y las integrinas han de ir a la membrana plasmática pero no cualquier otra membrana interna. Si no existiera especificidad en el reparto no habría compartimentos diferentes.

Las vesículas se forman en el compartimento fuente y se cargan con aquellas moléculas que deben ser transportadas. Una vez liberadas en el citosol, las vesículas son dirigidas hacia el orgánulo o compartimento diana, al cual reconocen, y con el que finalmente se fusionan. Entonces, las moléculas transportadas formarán parte del orgánulo diana y serán las responsables de su función. Sin embargo, otras moléculas sólo estarán de paso en ese compartimento y serán empaquetadas de nuevo en otras vesículas para dirigirse a otro compartimento celular. Es lo que ocurre con algunas proteínas que viajan en vesículas desde el retículo endoplasmático, pasan por el aparato de Golgi, donde son empaquetadas en nuevas vesículas hacia otros compartimentos como la membrana plasmática o los endosomas. Algunas moléculas volverán desde el compartimento diana al

compartimento fuente del que partieron en un transporte de reciclado. Hay que tener en cuenta que la mayoría de los compartimentos, orgánulos y membrana plasmática, funcionan tanto como compartimento fuente como compartimento diana al mismo tiempo. Es frecuente que cuando un compartimento envía vesículas a otro, suele recibirlas también de este último. Así, la mayoría del tráfico vesicular entre dos compartimentos es bidireccional.

Para formar una vesícula funcional se necesitan multitud de herramientas moleculares (Figura 11):

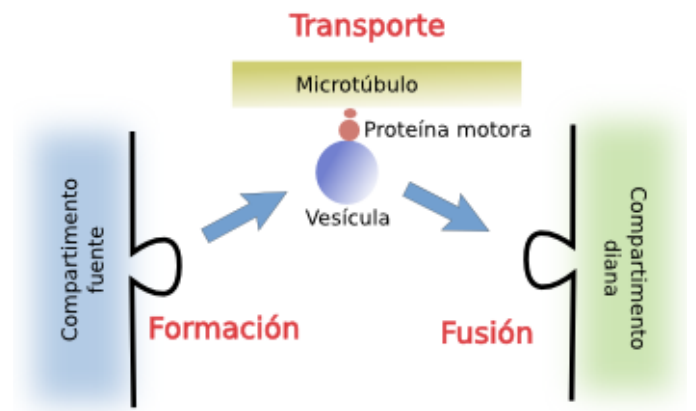


Figura 11: Pasos que se siguen en el transporte de moléculas mediado por vesículas.

a) Moléculas para reconocer y atrapar a las moléculas que se han de transportar. Otras moléculas adicionales tienen como misión formar la vesícula a partir de las membranas del orgánulo fuente. Hay que tener en cuenta que el proceso de formación de una vesícula es tremendamente complejo puesto que su membrana tiene que formar un pliegue y separarse de la membrana del orgánulo fuente.

b) La vesícula debe conseguir proteínas para interactuar con elementos del citoesqueleto para transportar a las vesículas desde el orgánulo fuente hasta el diana.

c) Por último deben incorporar moléculas para permitir a la vesícula reconocer y fusionarse con el orgánulo diana apropiado.

1. Formación de vesículas

La formación de una vesícula es un proceso ordenado de reclutamiento de moléculas. Este proceso

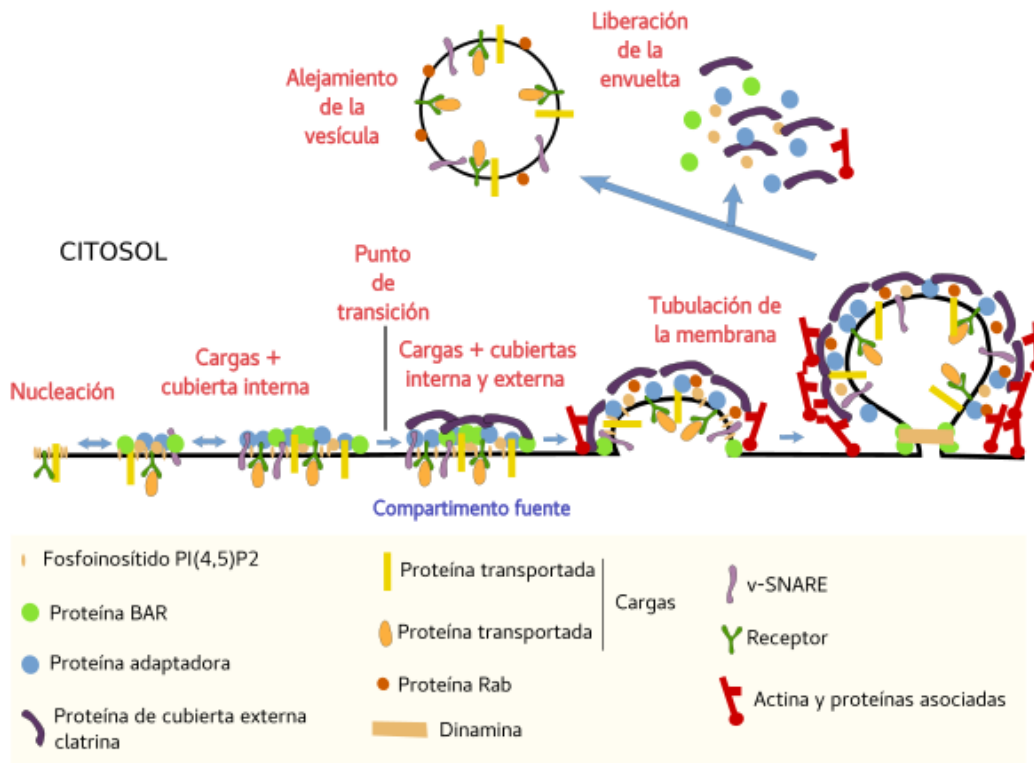


Figura 12: El proceso de formación de una vesícula recubierta por clatrina supone una serie de pasos antes de que sus moléculas formen parte de la vesícula (modificado de Weinberg y Drubin 2012)

depende del tipo de vesícula. Los mecanismos mejor conocidos son los de las denominadas vesículas recubiertas por clatrina, COPI y COPII (Figuras 2 y 3). En el caso de las vesículas recubiertas por clatrina, en levaduras se estima que más de 65 proteínas diferentes intervienen en el proceso formación, y en las células de mamíferos unas 50, todas ellas provenientes del citosol.

Nucleación

En las vesículas recubiertas se ha propuesto que la nucleación se puede iniciar de diferentes maneras. a) En las vesículas recubiertas por clatrina la nucleación se inicia mediante una concentración alta y localizada del fosfoinosítido PI(4,5)P2 en la membrana, el cual capta a las moléculas adaptadoras, que a su vez captará a las cargas y favorecerá la captura de la cubierta de clatrina. Se ha sugerido que también se pueden dar concentraciones de cargas en lugares concretos de la membrana que ayudarían a captar a las proteínas

adaptadoras. b) En las vesículas COPII la nucleación se produce mediante el reclutamiento de proteínas GTPasas Sar a la membrana del orgánulo fuente. Aunque esto ocurre en lugares concretos de la membrana, no se sabe cómo se inicia el proceso, ni cómo se selecciona el lugar de la membrana donde tendrá lugar la adhesión de estas moléculas. Las proteínas Sar son pequeñas moléculas que se activan e inactivan mediante la hidrólisis del GTP. Cuando las moléculas Sar son activadas en la membrana del orgánulo fuente se encargan de reclutar a otras proteínas (denominadas genéricamente como sec), las cuales son las encargadas de seleccionar de manera específica a las proteínas que deberán incorporarse en la vesícula para ser transportadas, y a las que formarán la cubierta (Figuras 12 y 13). En cualquier caso, podría parecer que el sitio de nucleación de una vesícula es aleatorio, pero hay muchos ejemplos en los que no es así. Hay regiones que favorecen esta nucleación, como las zonas de transición del retículo endoplasmático.

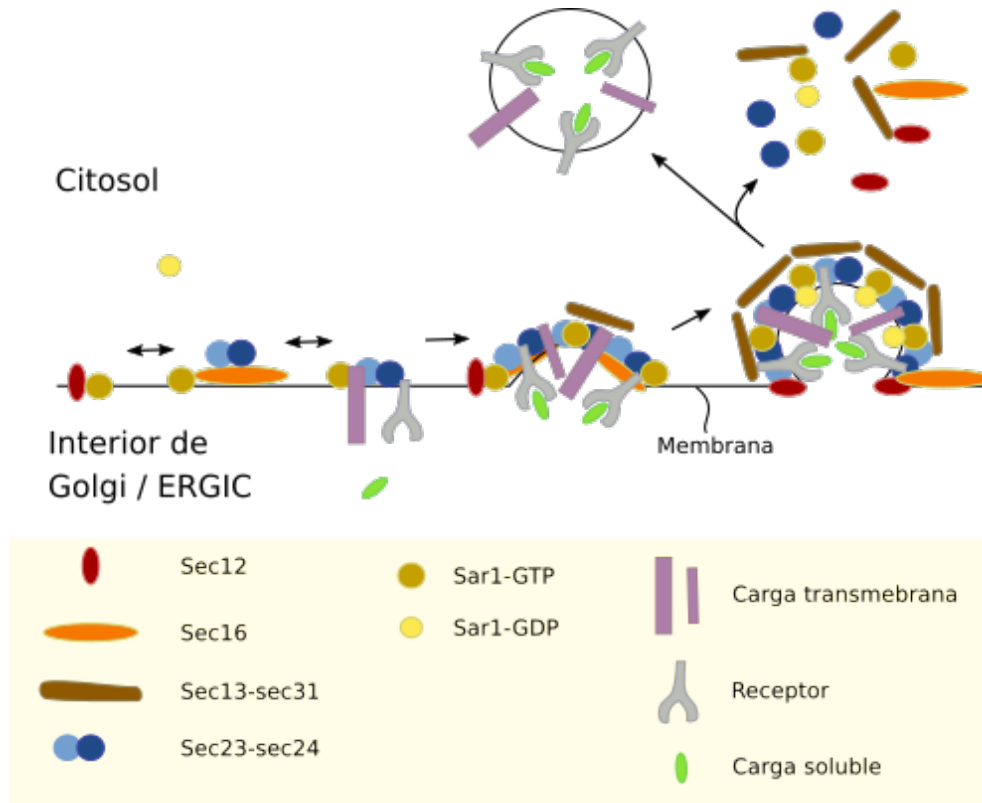


Figura 13: Formación de vesículas COPII en el retículo endoplasmático (modificado de Budnik y Stephens, 2009). Los componentes básicos de la cubierta COPII son Sar1, Sec12, Sec23/24, Sec13/31, que se han conservado evolutivamente desde levaduras hasta mamíferos. El primer paso para la formación de una COPII es la activación de las proteínas GTPasas Sar1 por Sec12. Esto lleva a que Sar1 pueda insertarse en la membrana del retículo. Esta inserción recluta Sec16, Sec23 y Sec24 y produce deformación de la membrana. Sec23 modula la actividad de Sar1. Las cargas a transportar por estas vesículas son capturadas por Sec24, que reconoce distintos dominios citosólicos de dichas moléculas. Las moléculas a transportar pueden ser integrales de membrana o solubles. En este último caso necesitan de receptores transmembrana para ser captadas. La agregación de estas proteínas más las cargas genera un complejo molecular estable que recluta proteínas de la cubierta externa, que son las proteínas Sec13 y Sec31. Éstas se ensamblan formando una estructura geométrica pero con cierta flexibilidad, comparada con las cubiertas de clatrina, que permite acomodar cargas de diferentes tamaños. Tras la escisión, la cubierta externa se libera debido a la hidrólisis del GTP de la Sar1.

Cargas

En una vesícula se puede viajar de tres maneras: como proteína transmembrana, como ligando unido a un receptor y como molécula disuelta en el contenido de la vesícula. La importancia, tanto cualitativa como cuantitativa, de cada uno de ellos no está todavía clara. Las proteínas adaptadoras son capaces de reconocer secuencias señal en los dominios citosólicos de las proteínas transmembrana que a su vez reconocerán a las proteínas del interior del orgánulo fuente que deben ser transportadas. Por ejemplo, en las vesículas de exocitosis constitutiva

deben viajar proteínas hacia la matriz extracelular, así como receptores transmembrana que deben quedar en la membrana plasmática. Las vesículas de clatrina transportan muy diversas cargas desde la membrana plasmática. Existen muchas proteínas en la cubierta de las vesículas que reconocen a las cargas.

Hay otras maneras de seleccionar moléculas para incorporarlas en una vesícula. Una es por la longitud de los dominios transmembrana de la proteína, es decir, la longitud de las cadenas de ácidos grasos de los lípidos que forman la membrana de la vesícula seleccionarán a proteínas que tengan dominios transmem-

brana, Secuencias de aminoácidos hidrófobos, de similar longitud. Proteínas con dominios transmembrana más cortos serán excluidas. Esto se ha demostrado en la formación de las vesículas recubiertas COPI en el retículo. Otro mecanismo de selección que también tiene en cuenta la longitud de los dominios transmembrana de las proteínas ocurre en las vesículas recubiertas con COPI, donde existen receptores como el Erv14 que son capaces de reconocer longitud de dominios transmembrana de proteínas que serán incorporadas a la vesícula. En este caso los receptores Erv14 son reconocidos por las proteínas adaptadoras Sec24. En levaduras los receptores Erv14 parecen captar hasta 1/3 de las proteínas totales de la vesícula. Las proteínas transmembrana que se encuentran en retículo y dominio cis del aparato de Golgi son más cortas que las que del dominio trans-Golgi/membrana plasmática/endosomas. Es decir, que las proteínas se sintetizan sabiendo a dónde deben ir.

Plegamiento

El conjunto inicial de proteínas (GTPasas, adaptoras, cargas, etcétera) se asocian formando agregados en la membrana. Cuando se alcanza una concentración crítica se dispara el reclutamiento de otras proteínas que terminarán de formar la cubierta de la vesícula. A este momento se le llama punto de transición, y una vez alcanzado la vesícula se formará. Si no se pasa el punto de transición las moléculas que forman los agregados iniciales pueden volver a segregarse en la membrana. Aparentemente, el número de cargas que ha conseguido reunir la vesícula es importante para que termine de formarse la vesícula. Si no es suficiente la vesícula no se formará. Entre las proteínas de la cubierta externa están aquellas que permiten entrelazar todo el entramado proteico existente, curvar la membrana y dar volumen a la vesícula incipiente, servir de centros de nucleación de actina o permitir desnudar a la vesícula de estas cubiertas tras la escisión. Cuando las proteínas de la cubierta externa superan una cantidad (para la clatrina podría ser superior al 60 % del total que formará la vesícula) es cuando la curvatura de la membrana empieza a ser visible.

Escisión

La escisión es la separación de la vesícula de la

membrana madre. Curvar la membrana de una vesícula y escindir la del compartimento fuente es un proceso coordinado que requiere energía y la participación de varias proteínas. Por ejemplo, hay proteínas que ayudan a las proteínas de la cubierta externa y que se insertan en una monocapa de la membrana gracias a unas secuencias de aminoácidos denominadas BAR que son capaces de generar curvatura en diferentes momentos de la formación de la vesícula. Por ejemplo, la proteína GTPasa Sar1 participa en la fase inicial de la curvatura. La polimerización de filamentos de actina y la acción de la miosina son también necesarios para generar fuerzas motoras que ayudan en la protusión y posteriormente en la escisión de las vesículas recubiertas por clatrina. La escisión o la independencia física de la vesícula respecto al compartimento fuente requiere de curvatura, fuerza motora, pero también de otras proteínas, denominadas dinaminas, que estrangulan la comunicación membranosa entre el compartimento fuente y la vesícula. Aquí, sin embargo, hay diferencias entre las vesículas recubiertas por clatrina y las recubiertas por COPII. Las vesículas recubiertas por COPII no precisan ni de dinamina ni de filamentos de actina para su formación. Tras la escisión muchas de las proteínas que envuelven a la vesícula son liberadas y devueltas al citosol para realizar un nuevo ciclo con la formación de una nueva vesícula, de manera que tenemos una vesícula casi desnuda.

Cargas especiales

Hay algunas cargas, como las moléculas de colágeno o los quilomicrones, que tienen que transportarse en vesículas muy grandes desde el retículo endoplasmático al aparato de Golgi. El tamaño molecular de estas moléculas excede a las pequeñas vesículas que se pueden formar con las cubiertas COPII (60-90 nm de diámetro). Y sin embargo, su transporte está mediado por COPII. Parece que la regulación de las moléculas GTPasas Sar1 es necesaria para la formación de estas vesículas. Por ejemplo, la mutación de Sar1B (uno de los genes para Sar) provoca la retención en el retículo de quilomicrones en el intestino e hígado. Otras moléculas también son necesarias para la formación de estas grandes vesículas. Una de ellas es TANGO1 ("transport and Golgi Organization), necesaria para el transporte de

colágeno. TANGO tiene dos isoformas: TANGO1S y TANGO1L. TANGO1S interacciona con Sar1 y TANGO1L con la molécula de colágeno y con Sec23. El efecto neto de las dos isoformas es regular la actividad de Sar1 y enlentecer el reclutamiento de las proteínas de cubierta Sec13 y Sec31, por lo que a la vesícula le da tiempo a crecer antes de que se cierre la cubierta.

2. Viaje

Tras la separación del compartimento fuente se produce la eliminación de la cubierta. Hay dos mecanismos que favorecen la eliminación de las proteínas de la cubierta de la clatrina. Una la acción de chaperonas, como la HSC70, la otra es la defosforilación de PI(4,5)P2. La HSC70 se incorpora en la fase de escisión de la vesícula y tras sustituir ADP por ATP provoca más tarde la desorganización y liberación de la cubierta. PI(4,5)P2 se convierte en PI4P, lo cual facilita la liberación de la cubierta. Como se puede ver PI(4,5)P2 es importante tanto en el proceso de ensamblaje como en el desensamblaje de la cubierta. La liberación de la cubierta de las vesículas permite que éstas puedan interactuar con el citoesqueleto y el compartimento diana.

Tras la separación del compartimento fuente, y la liberación de la cubierta, la vesícula es dirigida hacia el compartimento diana. Este viaje está mediado por proteínas motoras y elementos del citoesqueleto, tanto filamentos de actina como microtúbulos. En las células animales los microtúbulos juegan un papel importante en el tráfico de las vesículas, aunque también participan los filamentos de actina. Por ejemplo, se han descubierto que los filamentos de actina forman haces, denominados cables de actina, que tienen uno de sus extremos en las proximidades de los lugares de endocitosis y el otro orientado hacia el interior de la célula, y que parecen ser importantes para el trasiego de vesículas de endocitosis. Sin embargo, en las plantas el tráfico vesicular está fundamentalmente mediado por los filamentos de actina.

3. Fusión de vesículas

El mecanismo de fusión de una vesícula con su compartimento diana es complejo (Figura 14). Ha de ser selectivo puesto que la célula ha de asegurarse de que

una vesícula sólo se fusiona con aquel compartimento para el que las moléculas que transporta han sido destinadas. Pero además, abrir y fusionar membranas supone saltar una barrera termodinámica importante. Esto se hace en pasos sucesivos.

Anclaje

El primer paso es un reconocimiento inicial o anclaje (en inglés: "tethering"). Esto requiere que haya una especie de etiqueta a modo de código postal en la vesícula que sea reconocida por el compartimento con el que se ha de fusionar. Este reconocimiento inicial es similar al de una caña de pescar anclada en el compartimento diana que reconoce y ancla ("pesca") una vesícula que tiene unas determinadas moléculas. Las "cañas" de pescar son unos complejos proteicos asociados a las membranas del compartimento diana. Hay distintos tipos complejos: Golginas, CORVET, Dsl1, exocysto, GARP/VFT, HOPS/Class C VPS, TRAPPI y TRAPP II, que se distribuyen de forma selectiva en distintos compartimentos (Figura 5). Estos complejos pueden cambiar entre estado estirado y contraído, pudiendo en algunos casos medir más de 200 nm de longitud, lo que indica que es una caña molecular bastante larga. Por ejemplo, las proteínas de las membranas del Golgi que capturan vesículas se denominan golginas. Estas proteínas se extiende unos 100 a 600 nm desde las membranas de las cisternas Golgi. Hay 11 golginas. La presencia de estas moléculas es suficiente para capturar vesículas ("tethering") y su localización diferencial en los diferentes compartimentos del Golgi (cis, medio y trans) permite seleccionar qué vesículas se capturan en cada dominio. Por ejemplo, las que hay en el cis capturan vesículas que se han formado en el retículo endoplasmático y las que hay en el lado trans vesículas que vienen desde los endosomas. Aquellas golginas que están en los bordes de las cisternas intermedias capturan vesículas que se ha formado en el propio Golgi.

Las moléculas reconocidas por estas proteínas largas en la vesícula es muy variable. Puede ser desde moléculas concretas, lípidos o proteínas, hasta la organización molecular. Por ejemplo, la golgina GMAP-210 tiene un extremo distal que es capaz de reconocer vesículas por el tamaño, composición lipídica de la membrana y por el grado de empaquetamiento

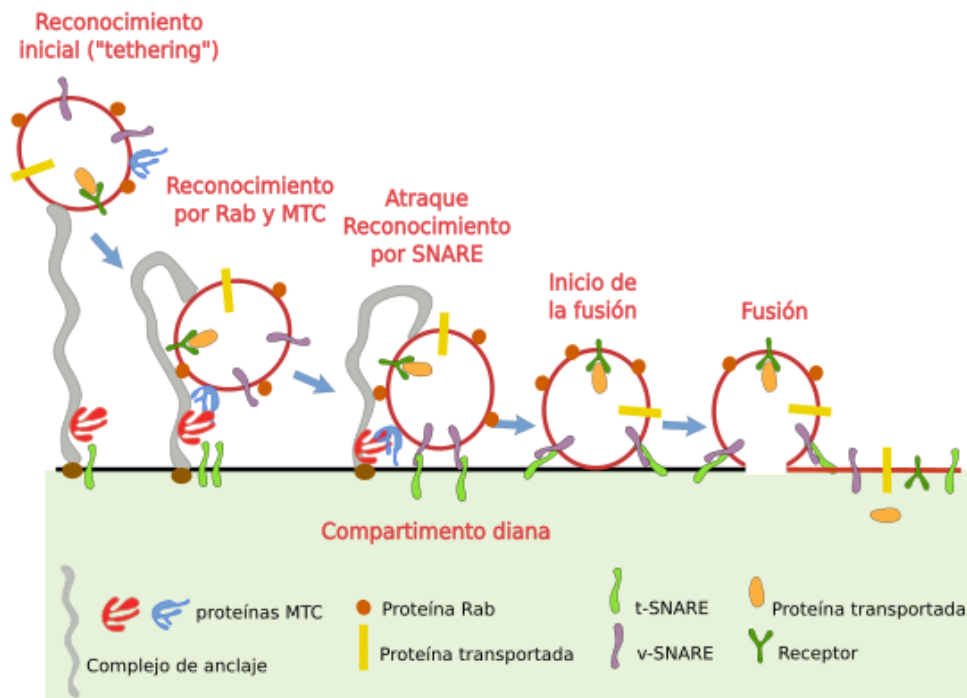


Figura 14: El proceso de fusión vesicular supone una serie de pasos antes de que sus moléculas formen parte del compartimento diana. (Modificado de Weinberg y Drubin 2012; Mitokos y Lowe, 2017).

lipídico. Esto parece suficiente para reconocer a las vesículas que vienen del retículo. Otras golginas son capaces de reconocer proteínas presentes en las membranas de las propias vesículas.

Todas las vesículas transportan proteínas Rab-GTPasas (en humanos 60 tipos), que son de distinto tipo dependiendo del compartimento fuente, o parte del compartimento fuente, donde se haya formado la vesícula. Se pensaba que estas proteínas eran la principal etiqueta de la vesícula a la hora de ser reconocida por el compartimento diana. Sin embargo, parece que participan en una fase posterior. Por ejemplo, todas las golginas unen Rab-GTPasas en un lugar distinto al de anclaje. Esta diferencia de lugar hace pensar que las RabGTPasas no participan en el reconocimiento inicial sino en pasos posteriores, cuando la vesícula se tiene que acercar a la membrana del compartimento diana. Las proteínas RabGTPasas podrían forzar el plegamiento de las golginas y así acercar la vesícula a la membrana.

Atraje y fusión

El reconocimiento inicial descrito anteriormente es esencial para los pasos posteriores. Tras el anclaje y acción de las proteínas Rab-GTPasas, hay otras proteínas que favorecen el atraque de la vesícula a la membrana del compartimento diana. Se llaman proteínas MTC ("multi-subunit tethering complex"). Son una familia de proteínas con una distribución diferencial. Su misión es acercar aún más la membrana vesicular a la membrana del compartimento diana para que se pueda dar otro reconocimiento adicional entre otras proteínas denominadas SNARE. Son proteínas transmembrana (en humanos hay 37 diferentes) de las cuales hay dos tipos: v-SNARE y t-SNARE. Las v-SNARE se incorporan en la vesícula durante su formación en el compartimento fuente y las t-SNARE se encuentran en las membranas del compartimento diana. La interacción entre v-SNARE y t-SNARE provoca un acercamiento mucho mayor de las membranas de la vesícula y del compartimento diana, liberando además la energía necesaria para la fusión de ambas membranas. Sin embargo, para la fusión de la membrana vesicular y del compartimento fuente, otras proteínas parecen coop-

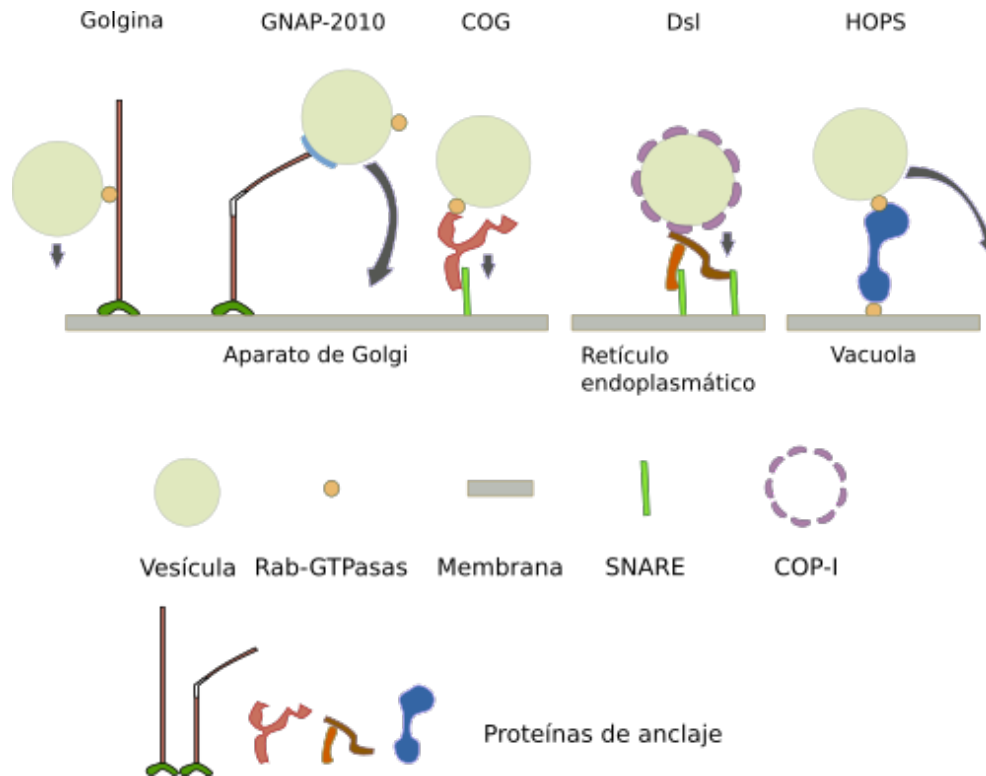


Figura 15: Diversos complejos proteicos relacionadas con el anclaje de las vesículas a diferentes compartimentos diana. (Modificado de Kuhlee et al., 2015).

erar con las proteínas SNARE. La fusión de membranas es un proceso termodinámicamente desfavorecido. Las SNARE son otra capa de especificidad en el reconocimiento del compartimento diana por una vesícula determinada. Por ejemplo, las parejas v-SNARE y t-SNARE de la comunicación entre retículo-golgi, Golgi-Golgi, endosomas-Golgi, son diferentes.

Los filamentos de actina parecen tener un papel relevante en la fusión de las vesículas, al menos durante la secreción regulada (Figura 16). En el caso de las neuronas, en el terminal sináptico, hay un recubrimiento de filamentos de actina bajo la membrana que impide que las vesículas entren en contacto con la membrana plasmática. Los filamentos de actina podrían funcionar como una barrera física para evitar la fusión prematura de las vesículas. Pero a la vez este entramado de actina, y su proteína motora miosina, parece también importante para la expulsión rápida del contenido vesicular una vez que se ha producido la fusión de membranas. La actina también

parece implicada en la conducción de las vesículas hacia su lugar de liberación en algunas células. El proceso sería el siguiente: la actina cubre normalmente la superficie interna de la membrana plasmática, tras la llegada de la señal de exocitosis el entramado de actina disminuye en densidad y permite el contacto entre las membranas de la vesícula y la membrana plasmática, una vez producida la fusión se recluta de nuevo la actina que polimeriza alrededor de la vesícula cubriéndola por completo y comprimiría la vesícula para acelerar la liberación del contenido vesicular. Lo que parece atraer y favorecer la polimerización de la actina sobre la vesícula es la composición lipídica, sobre todo la presencia de el fosfoinosítido PIP2. PIP2 no está presente en la membrana de las vesículas pero sí tras el inicio de la fusión, donde llega por difusión lateral desde la membrana plasmática. Es en esta posición nueva podría favorecer el reclutamiento de proteínas que favorecen la polimerización de filamentos de actina.

Hay que tener en cuenta que la fusión entre mem-

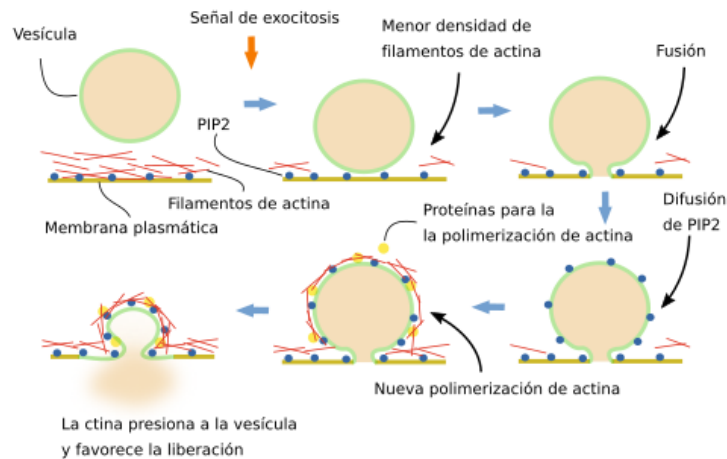


Figura 16: Participación propuesta por la actina en la liberación del contenido vesicular durante la exocitosis regulada (modificado de Tran y Ten Hagen 2017).

branas celulares no siempre involucra a una vesícula y a un compartimento diana. Se producen fusiones entre compartimentos semejantes como ocurre con los endosomas, las mitocondrias o incluso entre vesículas. Se cree que todos estos casos se siguen mecanismos parecidos con implicación de moléculas similares.

Bibliografía

Borgese N. Getting membrane proteins on and off the shuttle bus between the endoplasmic reticulum and the Golgi complex. *Journal of cell sciences*. 2016. 129: 1537-1545.

Budnik A, Stephens EJ. ER exit sites – Localization and control of COPII vesicle formation. *FEBS letters*. 2009. 583: 3796–3803.

Cai H, Reinisch K, Ferro-Novick S. Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Developmental cell*. 2007. 12:671-682.

Kaksonen M, Roux A. Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nature reviews in molecular cell biology*. 2018. doi:10.1038/nrm.2017.132.

Kuhlee A, Raunser S, Ungermann C. Functional homologies in vesicle tethering. *FEBS letters*. 2015. 589:2487-2497.

Maldonado-Baez L, Wendland B. Endocytic adaptors: recruiters, coordinators and regulators. *Trends in cell biology*. 2006. 16:505-513.

Martens S, McMahon H T. Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles. *Nature reviews in molecular cell biology*. 2008. 8:543-556.

Tran DT, Ten Hagen KG. Real-time insights into regulated exocytosis. *Journal of cell science*. 2017. 130:1355-1363.

McNiven MA, Thompson HM. Vesicle formation at the plasma membrane and trans-Golgi network: the same but different. *Science*. 2006. 313:1591-1594.

Weinberg J, Drubin DG. Clathrin-mediated endocytosis in budding yeast. *Trends in cell biology*. 2012. 22:1-13.

Witkos TM, Lowe M. Recognition and tethering of transport vesicles at the Golgi apparatus. *Current opinion in cell biology*. 2017. 47:16–23.

5 Transcitosis

La transcitosis es el transporte de cargas (macromoléculas, inmunoglobulinas, vitaminas, iones, etcétera) incorporadas en vesículas entre dos zonas de la membrana plasmática situadas en distintos lados de la célula. Este mecanismo se propuso primero por Palade (1950) para el transporte de moléculas a través de las células endoteliales donde se forman vesículas en la zona de la membrana plasmática en contacto con la sangre, cruzan el estrecho citoplasma, y se fusionan con la membrana plasmática en contacto con la lámina basal. Los epitelios son capas de células que suelen separar dos medios muy diferentes, como en los pulmones, en el tubo digestivo, o en el endotelio. Estas células tienen dos dominios de membrana diferentes para comunicarse con cada uno de estos medios: apical y basolateral. Se dice por ello que son células polarizadas. Las células tienen que arreglárselas para mantener y comunicar ambos dominios de la célula. Parte de esta comunicación se hace mediante la transcitosis. Aunque la transcitosis es un mecanismo típico de las células epiteliales, está presente en otras células tales como las neuronas o los osteoclastos. Esta ruta de transporte vesicular evita el paso por los lisosomas, y por tanto la degradación de las moléculas que transporta. Tipos diferentes de moléculas se transportan por transcitosis: inmunoglobulinas, insulina, receptores de quimiocinas, lipoproteínas, fragmentos de DNA, enzimas, algunos virus, algunas toxinas, etc.

Las células endoteliales mueven una cantidad ingente de moléculas desde la sangre hasta los tejidos de manera rápida y no totalmente específica (unos 30 segundos desde un lado al otro) mediante transcitosis. Normalmente se transportan moléculas que están en disolución en el plasma sanguíneo y que no necesitan receptores para su inclusión en vesículas por parte de las células endoteliales. La misma vesícula hace todo el trayecto desde una parte de la célula a la otra, es decir, no hay fusión con los endosomas. Sin embargo, las moléculas que se transportan no son totalmente aleatorias sino que hay una selección basada en su carga neta negativa, que poseen la mayor parte de las moléculas del plasma sanguíneo. Se transportan inmunoglobulinas, lipoproteínas de baja densidad, hi-

erro, y otras moléculas. Sin embargo, también hay vesículas de transcitosis en las células endoteliales que incorporarán moléculas, tales como la albúmina o la proteína orosomucoide, captadas de manera mucho más específica mediante receptores. Algunos micronutrientes, una vez internados desde el intestino cruzan los endotelios por transcitosis. El hierro incorporado en la dieta se acopla a un receptor y ambos cruzan el endotelio por transcitosis. Igual ocurre con la vitamina B12.

Los enterocitos, que forman el epitelio intestinal, son células columnares en las cuales también se produce transcitosis. A diferencia de las células endoteliales, donde las membranas basal y apical están muy cerca, la ruta de transcitosis en los enterocitos es más larga y necesita al citoesqueleto y a los endosomas como orgánulos intermedios. Suele iniciarse por vesículas recubiertas por clatrina, donde hay una captación de cargas mediada por receptor (Figura 17). Las vesículas se fusionan con los endosomas tempranos. Hay dos poblaciones de endosomas tempranos, los basolaterales y los apicales, cada uno recibe vesículas de su dominio próximo de membrana plasmática. Desde estos endosomas tempranos se envían las cargas a otro tipo de endosomas localizado en la parte apical de la región perinuclear de la célula. Estos se denominan endosomas comunes. Los endosomas comunes reciben cargas de los dos dominios y son los realmente encargados de repartir englobadas en vesículas a un dominio u otro según les corresponda.

Se han descrito dos tipos de transcitosis en los enterocitos que llevan moléculas desde la membrana basolateral a la apical y desde la membrana apical a la membrana basolateral. Las inmunoglobulinas tipo A (IgA) son anticuerpos liberados por las células plasmáticas, pero su función contra los patógenos se lleva a cabo en las superficies corporales, luego deben ser transportadas por los epitelios desde las membranas basolaterales hasta las apicales. Así, en la mucosa intestinal hay numerosas células plasmáticas que liberan IgA para que ejerzan su acción en el interior del tubo digestivo. Las células epiteliales intestinales sintetizan un receptor de membrana en el retículo endoplasmático, que pasa por el aparato de Golgi, y desde ahí mediante vesículas se traslada a las

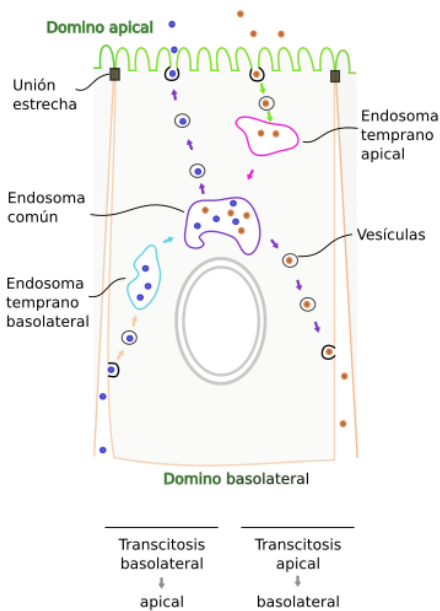


Figura 17: Transporte de cargas entre el dominio basolateral y el apical y entre el apical y el basolateral en un enterocito.

membranas basolaterales. Es el receptor polimérico para IgA. Este receptor, cuando une la IgA que se encuentra en el espacio intercelular, oligomeriza, y en esta forma, receptores-inmunoglobulinas son endocitados. Las vesículas formadas se fusionan con los endosomas tempranos basolaterales, las cargas pasan a los endosomas comunes, y desde aquí salen vesículas con el complejo receptores-inmunoglobulinas hacia la membrana apical (libre) donde se fusionan y liberan a las IgAs. La liberación de las IgAs es por hidrólisis enzimática, de modo que una parte del receptor se libera con la inmunoglobulina. El receptor polimérico para IgA posee un dominio citosólico de unos 100 aminoácidos que es la etiqueta que dirige al complejo receptor-inmunoglobulina por el interior de la célula a través de los diferentes compartimentos. Este mecanismo no sólo se da en el epitelio intestinal sino también en los epitelios del riñón, tráquea, hígado y glándulas mamarias. Del mismo modo, los epitelios respiratorios translocan inmunoglobulinas tipo A hacia la superficie de las vías respiratorias por transcitosis, también gracias a un receptor que reconoce IgA. En este caso el receptor no forma un enlace covalente con su ligando, sino que se libera de él por cambios

en el pH.

Curiosamente, la transcitosis para las inmunoglobulinas puede darse también en sentido contrario, desde el dominio apical al basolateral. Por ejemplo en el trasiego de las inmunoglobulinas maternas tipo IgG desde la placenta al feto o desde leche materna a los vasos sanguíneos del tubo digestivo. En este caso las inmunoglobulinas tienen que cruzar el epitelio desde la parte apical hasta la basolateral. En estos casos la incorporación de las inmunoglobulinas se hace mediada por vesículas recubiertas por clatrina, y son captadas por un receptor que reconoce a la fracción cristalizable de la IgG (la no variable), las vesículas son dirigidas hasta los endosomas tempranos apicales, y desde ahí a los endosomas comunes, los cuales liberan vesículas, con IgG-receptor empaquetados, que se fusionan con las membranas basolaterales donde liberan a las inmunoglobulinas maternas.

No siempre la transcitosis es para transportar moléculas exógenas de un lado a otro de la célula, sino que a veces es para mover moléculas de la propia membrana plasmática de un lado a otro. Por ejemplo, en los enterocitos y en los hepatocitos se sintetizan moléculas de membrana que inicialmente se insertan en las membranas laterales y que después se transportan a la apical mediante transcitosis. Algunos esfingolípidos pueden viajar en sentido contrario, apical a basolateral, por transcitosis evitando su paso por los lisosomas. Esto lo aprovecha por ejemplo la toxina colérica para atravesar los epitelios puesto que se une específicamente a estos lípidos de membrana. Cómo son seleccionados estos lípidos durante la endocitosis parece depender de la formación de balsas de lípidos, y del grado de saturación y de la longitud de su cadena.

Bibliografía

Fung K, Fairn GD, Lee WL. 2018. Transcellular vesicular transport in epithelial and endothelial cells: Challenges and opportunities. *Traffic*. 19: 5-18.

García-Castillo MD, Chinnapen DJ-F, Lencer WI. 2017. Membrane transport across polarized epithelia. *Cold Spring Harbour perspectives in biology*. 9:a027912.

Tuma PL, Hubbard AL. 2003. Transcytosis: cross-

ing cellular barriers. *Physiological reviews.* 83: 871-932.s

6 Vesículas extracelulares

La comunicación entre células es típicamente a distancia mediada por moléculas secretadas al medio extracelular, o por contactos directos mediante moléculas colocadas y expuestas en la superficie celular. Las vesículas como sistema de comunicación y transporte funcionan en el interior celular formando parte del tráfico vesicular. Sin embargo, desde finales de los años 60 del siglo XX se han descrito vesículas en los espacios extracelulares de tejidos sólidos y en fluidos corporales. Antes se pensaba que estas vesículas extracelulares eran consecuencia de roturas de las células o artefactos producidos tras la manipulación experimental. Sin embargo, la emisión de vesículas por parte de las células parece ser un mecanismo conservado evolutivamente, incluso parece estar presente en las células procariotas. Aparentemente la mayoría de las células son capaces de liberar vesículas extracelulares. En los animales se han aislado vesículas extracelulares en la sangre, saliva, leche, fluido amniótico, etcétera. Es difícil averiguar si la población de vesículas extracelulares que parten de una misma célula es heterogénea o no en cuanto a su composición.

Las vesículas extracelulares son heterogéneas y su contenido es muy variado, desde ARN, hasta lípidos, glúcidos y proteínas diversos, incluso ADN, tanto nuclear como mitocondrial. En general estas vesículas contienen una gran surtido de proteínas, tales como enzimas, elementos del citoesqueleto, factores de transcripción, proteínas asociadas integrales de membrana, complejos de histocompatibilidad, etcétera. Se han encontrado en ellas tipos de proteínas sin péptido señal que no provienen del retículo endoplasmático. Contienen también distintos tipos de ARN, tales como mensajeros, ARN de interferencia y pequeños ARN no codificantes están presentes, incluso se ha demostrado que algunos de estos ARNm se pueden traducir a proteínas en las células diana. Los lípidos forman parte de sus membranas, que pueden contener fosfatidil serina, lisofosfatidilcolina, esfingomielina y acilcarnitinas. Estas vesículas están enriquecidas en colesterol y esfingolípidos, dos componentes de las balsas de lípidos. Curiosamente el contenido en ARN no es una representación del ARN que aparece en el

citosol sino que hay concentración de ciertos tipos particulares de ARN en estas vesículas. También contienen proteínas sin péptido señal, las que lo tienen se encuentran en las vesículas que forman parte del tráfico vesicular. También poseen un juego de lípidos diferente, por lo que algunos autores consideran a estas vesículas como un compartimento más de la célula con sus características específicas.

¿De dónde salen entonces estas vesículas extracelulares? Se proponen dos posibles fuentes: exosomas y vesículas emitidas. La mayoría de las células probablemente puedan liberar ambos tipos de vesículas. La liberación de estas vesículas puede ser espontánea o inducida.

1. Exosomas

Se denomina exosomas a las pequeñas vesículas, de unos 30 nm a 150 nm de diámetro, que se liberan al espacio extracelular tras la fusión de los cuerpos multivesiculares con la membrana plasmática (Figura 18). Son por tanto de origen endosoma. Este mecanismo fue descrito, y el término exosoma acuñado, en los años 80 del siglo XX. Se descubrió en el proceso de maduración de los reticulocitos a eritrocitos. Durante esta maduración los reticulocitos se deshacen del receptor de la transferrina localizado en la membrana plasmática mediante su incorporación en vesículas que se fusionan con los endosomas tempranos. Cuando estos maduran se producen invaginaciones de sus propias membranas y los receptores quedan en las pequeñas vesículas internas de los cuerpos multivesiculares. Posteriormente estos cuerpos multivesiculares se fusionan con la membrana plasmática y liberan su contenido, que incluye a las vesículas con el receptor de la transferrina, al exterior celular.

En una misma célula pueden coexistir dos tipos de cuerpos multivesiculares, aquellos que se fusionarán con los lisosomas para la degradación de su contenido y aquellos que se fusionarán con la membrana plasmática para liberar a su contenido al exterior. La diferencia entre estas dos poblaciones parece ser el contenido en proteínas de superficie, por ejemplo proteínas rab, así como el contenido de colesterol de sus membranas. Incluso en algunas células se han podido distinguir morfológicamente estas dos pobla-

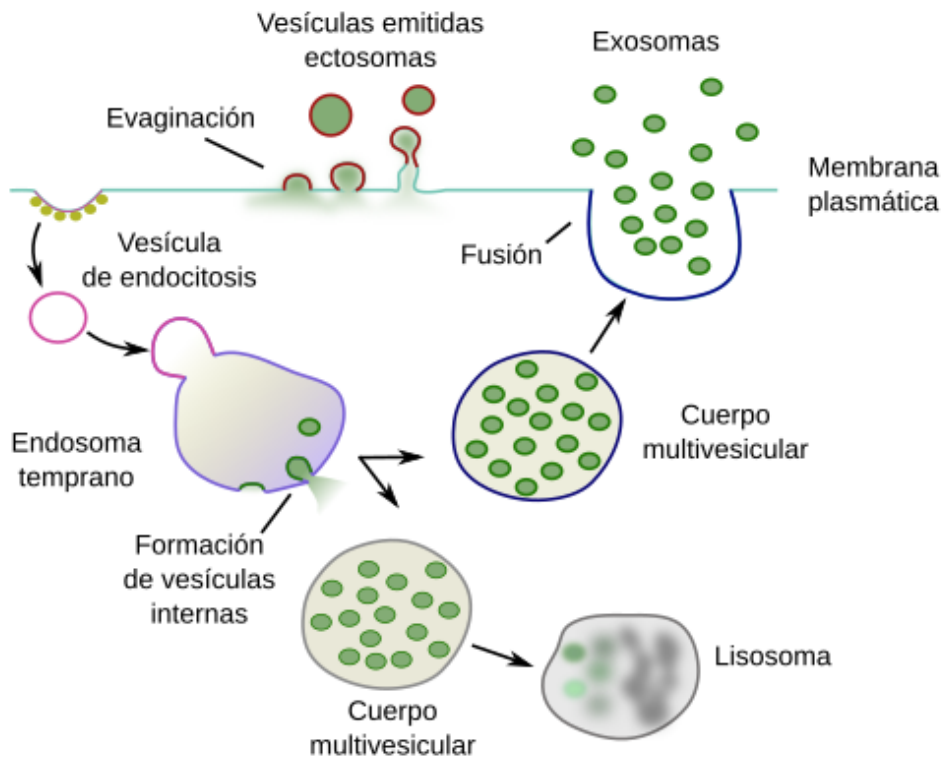


Figura 18: Esquema de la formación de exosomas y vesículas emitidas (modificado de Théry, 2011).

ciones de cuerpos multivesiculares. Los exosomas son liberados como tales por una gran variedad de células: epiteliales, células del sistema inmunitario, neuronas, glía y células tumorales, entre otras. Inicialmente se pensó que era un mecanismo que tenía la célula para deshacerse de material desechable, y por ello no se le prestó mucha atención. Pero unas décadas más tarde se sugirió un papel en la comunicación célula-célula, en la presentación de antígenos, en patologías víricas, incluidas el VIH, en los procesos de metástasis. La liberación regulada o constitutiva de los exosomas depende del tipo celular.

Vesículas emitidas o ectosomas

En la membrana plasmática se pueden formar pequeñas evaginaciones que se desprenderán y convertirán en vesículas que quedan libres en el medio extracelular. A éstas vesículas se les denomina vesículas emitidas (shedding vesicles). La mayoría de estas microvesículas se rompen a los pocos minutos de ser liberadas, pero otras pueden llegar a largas distancias y ser encontradas, por ejemplo, en el líquido ce-

falorraquídeo, la sangre o la orina. El tamaño de las vesículas emitidas puede variar desde mayores de 150 nm a 1 μm .

El proceso de formación de las vesículas emitidas es por evaginación de zonas ricas en fosfatidilserina en la monocapa externa de la membrana. El mecanismo que permite la formación de estas vesículas, en sentido contrario a como es habitual en la membrana plasmática (por endocitosis o invaginación), no se conoce en detalle y parece depender de numerosas moléculas, incluso de la desorganización del citoesqueleto y de la pérdida de asimetría de la membrana plasmática. La concentración de calcio y la hipoxia aumenta la cantidad de vesículas liberadas, pero otros mensajeros también afectan a su tasa de liberación. En cualquier caso la membrana plasmática que forma parte de estas vesículas tiene que reponerse y en realidad se ha visto que la producción de vesículas emitidas sigue a una exocitosis regulada previa de vesículas no secretoras. Estas porciones de membrana que llegan a la membrana plasmática parecen ser las

preferidas para formar nuevas vesículas emitidas.

Durante la apoptosis la célula colapsa y el citoplasma se divide en porciones más o menos grandes rodeadas de membrana que se liberan al tejido. Hay autores que consideran que estos trozos de citoplasma que se liberan durante la apoptosis contienen ADN y por tanto podrían considerarse como vesículas con significado fisiológico.

Funciones

Una vez liberados, tanto los exosomas como las vesículas emitidas, tienen que difundir y reconocer a sus células diana. El reconocimiento parece estar mediado por moléculas de superficie. La célula diana puede iniciar la respuesta, a veces por el simple contacto con moléculas de la superficie de la vesícula, pero en otras el contenido de la vesícula ha de entrar en el interior de la célula por lo que tiene que haber fusión vesícula-membrana plasmática de la célula diana o ser captada por endocitosis (la vesícula se fusionaría con la membrana del endosoma quedando el contenido de la vesícula en el citosol de la célula diana) (Figura 19). La fosfatidilserina en las membranas de las vesículas favorece la incorporación de estas vesículas por las células. Sin embargo, en otras ocasiones las vesículas se romperán y liberarán su contenido en la matriz extracelular.

La función que se les atribuye a las vesículas extracelulares es principalmente la comunicación celular. Aunque también intervienen en el avance de procesos patológicos y en la eliminación de residuos celulares. La información que llevan es muy variada y depende del tipo celular que las libera. En el sistema inmune las células dendríticas liberan vesículas que portan antígenos y complejos mayores de histocompatibilidad e inducen respuestas inmunes. También los macrófagos son capaces de liberar vesículas que promueven respuestas inmunes. Algunos tipos celulares, secretan inmunosupresores incluidos en vesículas. Las vesículas liberadas por las células mesenquimales ayudan a reparar lesiones, las procedentes del epitelio pulmonar favorecen la proliferación celular, las liberadas por las neuronas influyen en la comunicación nerviosa. Un caso bien conocido es la liberación de melanina en exosomas, denominados melanosomas, por parte de los melanocitos. Estos melanosomas son incor-

porados por los queratinocitos de las capas basales y acumulados en torno al núcleo. Un descubrimiento más reciente aporta evidencias de que también los queratinocitos liberan exosomas que afectan a la producción y liberación de melanina por parte de los melanocitos. Los prostasomas de la próstata son como las vesículas liberadas de los MVBs.

Las vesículas extracelulares liberadas por las células tumorales han atraído la atención por su posible papel en la expansión del propio tumor. Las células tumorales liberan vesículas, llamados oncosomas, de 1 a 10 micras, que contienen una gran diversidad de moléculas, incluidas el ADN. Algunas pueden tener un gen completo en su interior. Pueden contener metaloproteasas en algunos tejidos tumorales, que son enzimas que degradan la matriz extracelular y facilitan la colonización por células metastásicas. Se ha demostrado que en los melanomas se liberan vesículas con moléculas tóxicas que afectan al sistema inmune, por lo que favorecen la progresión del tumor. Además, pueden ser una de las causas de la resistencia a fármacos anticancerígenos puesto que las vesículas extracelulares serían un mecanismo para sacar dichos fármacos de las propias células y evitar su toxicidad.

Bibliografía

Abels ER, Breakefield XO. 2006 . Introduction to extracellular vesicles: biogenesis, RNA cargo selection, content, release, and uptake. *Cellular and molecular neurobiology*. DOI 10.1007/s10571-016-0366-z.

Colombo M, Raposo G, Théry C. 2014. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annual review in cell and developmental biology*. 20: 255-289. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326.

Sedgwick AE, D'Souza-Schorey C. 2018. The biology of extracellular microvesicles. *Traffic*. doi: 10.1111/tra.12558

Théry C. 2011. Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. *F100 Biology reports*. 3:15. doi:10.3410/B3-15

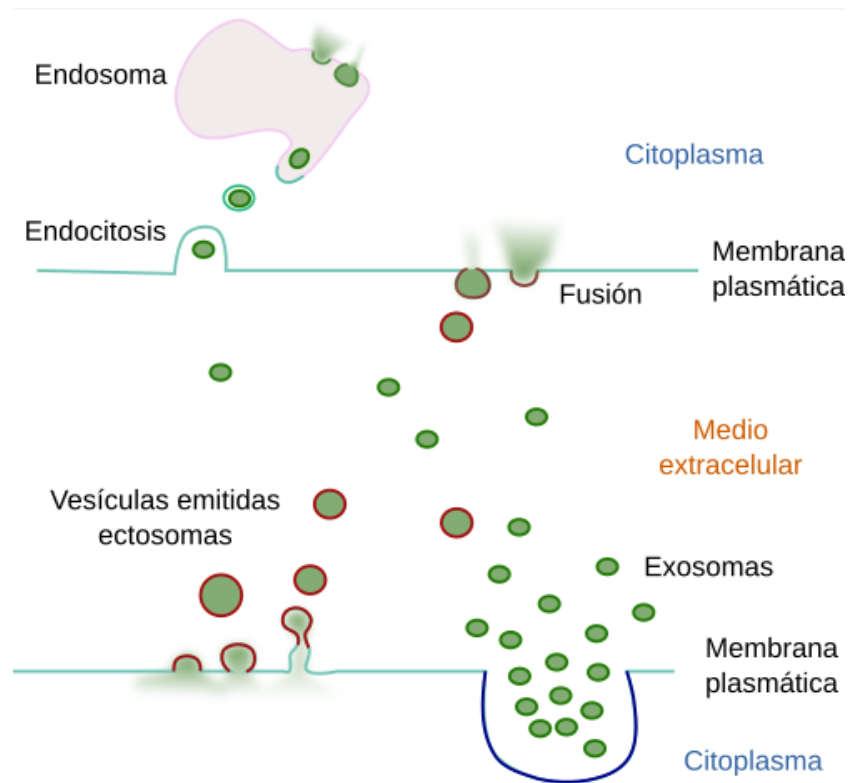


Figura 19: Esquema de la incorporación del contenido de las vesículas extracelulares en las células receptoras.

7 Apoptosis

La apoptosis es un mecanismo molecular que se produce en el interior de las células eucariotas y cuya finalidad es la muerte de la propia célula. Es un suicidio celular en el que se pone en marcha un programa molecular de autodestrucción desencadenado por señales externas o internas. La apoptosis también se llama muerte celular programada porque los pasos para la degeneración celular están establecidos, pero eso no quiere decir que la célula esté predeterminada a morir, es decir no habrá apoptosis si no hay señal que la inicie.

El papel de la apoptosis es importante en muchos procesos fisiológicos, y también patológicos, de los organismos pluricelulares. Por ejemplo, para la morfogénesis de órganos y tejidos durante desarrollo embrionario, en el mantenimiento y regeneración de los tejidos en el animal adulto, en la respuesta a patógenos o a estrés celular y en patologías como el cáncer. La cantidad de células que mueren por apoptosis es enorme, tanto durante el desarrollo embrionario como en animales adultos durante la renovación celular que ocurre en tejidos como la sangre o el epitelio del digestivo de organismos adultos.

1. Mecanismos moleculares

El proceso molecular de la apoptosis se ha conservado evolutivamente en las diferentes especies. Es un mecanismo ordenado y dependiente de energía que necesita ser iniciado. Se conocen varias causas que disparan la apoptosis: señales externas mediadas por receptores de muerte, señales internas donde las mitocondrias juegan un papel importante y hay una tercera vía que involucra a las proteínas perforina y granzima. Estas tres vías convergen en un proceso molecular mediado por las enzimas caspasas (Figura 20).

Caspasas

Las caspasas son enzimas proteolíticas que se sintetizan y se liberan en el citosol en forma de procaspasas, las cuales son las formas inactivas. Ellas son las principales encargadas de degradar el interior celular que lleva a la muerte celular. Hay varios tipos de caspasas, cada uno de ellos especializado en actuar so-

bre diferentes tipos de proteínas. Todas las caspasas rompen cadenas de aminoácidos en lugares donde se encuentra el aminoácido aspartato, pero distintas caspasas actúan sobre diferentes proteínas dependiendo de los aminoácidos que haya próximos a dicho aspartato. Las caspasas que se activan inicialmente son la caspasa-2, 8, 9 y 10, mientras que las efectoras o ejecutoras son las caspasas-3, 6 y 7. Hay otras caspasas que realizan papeles más específicos y otras como la caspasa 14 que sólo se expresa durante el desarrollo embrionario. Dentro de las caspasas ejecutoras, la caspasa-3 es considerada muy importante puesto que activa a la endonucleasa CAD, la cual degrada la cromatina. También afecta a la reorganización del citoesqueleto y como consecuencia provoca la rotura de la célula en fragmentos celulares independientes.

Una vez que se produce la activación de las primeras caspasas, el proceso de muerte celular parece irreversible, aunque no siempre es así (ver más abajo). Es un mecanismo en cascada en el cual las primeras caspasas activas pueden a su vez activar a otras caspasas, dándose una reacción en cadena y exponencial. Finalmente las caspasas ejecutoras degradarán la célula. Curiosamente las caspasas también actúan en procesos no apoptóticos como la separación de las espermátidas, la diferenciación de los macrófagos, la cornificación del epitelio, eritropoyesis o la diferenciación de las células de las lentes del ojo.

Receptores. Señales externas.

La vía de iniciación extrínseca de la apoptosis comienza con la activación de receptores localizados en la membrana plasmática. A estos receptores se les denomina receptores de muerte y son miembros de la familia de receptores conocidos como TNF (tumor necrosis factors). Cada receptor se activa con una señal característica. Por ejemplo, si emparejamos ligando/receptor tenemos a FasL/FasR, TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4, o Apo2L/DR5. La llegada del ligando o señal provoca la asociación de receptores activados en la superficie de la membrana y esto dispara un reclutamiento de proteínas adaptadoras en el interior celular. Estas proteínas adaptadoras se asocian entonces con procaspasas-8 creando un ambiente molecular que lleva al cambio conformacional en las procas-

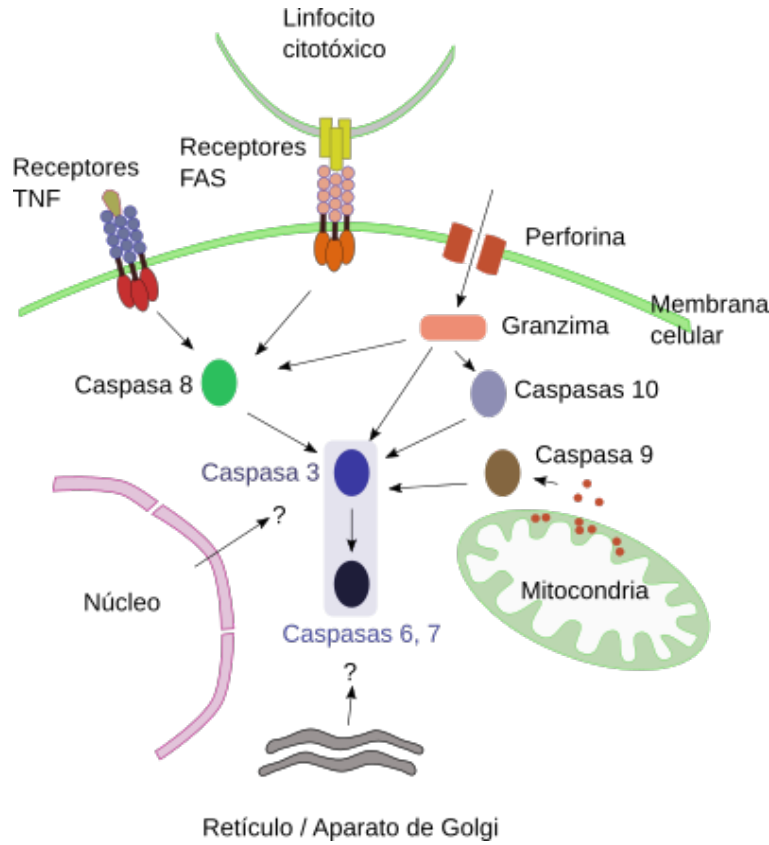


Figura 20: Principales vías de iniciación de la apoptosis. Los signos de interrogación indican vías que podrían también ser activas.

pasas, desencadenando la autoproteólisis de éstas y la conversión de procaspasas en caspasas. Cuando se produce esta activación el proceso molecular degradativo está activado.

Estrés. Señales internas

Esta vía conlleva la aparición de una serie de estímulos para la apoptosis que no están mediados directamente por receptores. Estos estímulos pueden ser por desaparición o por aumento. Por ejemplo, la desaparición de los factores de supervivencia disparan la apoptosis, pero también lo hace un aumento sobre la células de la radiación, temperatura, sustancias tóxicas, etcétera. Todos estos cambios terminan por alterar la membrana interna mitocondrial que provoca la apertura de poros en su membrana, alterándose el potencial eléctrico y se produciéndose la liberación de diversas moléculas proapoptóticas. Entre éstas está el citocromo C, el cual se unirá a las moléculas apaf-1 y a la procaspasa-9, formando lo que se denomina

un apoptosoma. Este complejo provoca la activación de la procaspasa-9 y el inicio del proceso degradativo. Desde la mitocondria se liberan también enzimas en etapas más tardías del proceso apoptótico que se dirigen al núcleo y provocan una primera digestión del ADN. En la membrana de las mitocondrias hay una familia de proteínas denominadas bcl que pueden modular, disparar o inhibir, este mecanismo de inicio de la apoptosis y son potenciales diana para eliminar selectivamente células tumorales.

Patógenos

Los linfocitos T citotóxicos son capaces de matar a células que contienen patógenos mediante la activación de los receptores de muerte y disparar el proceso apoptótico. Sin embargo, existe otra vía mediante la cual crean inicialmente un poro en la membrana e introducen una molécula que activarán la vía apoptótica en el propio citosol. Los linfocitos T citotóxicos poseen unos gránulos que contienen dos

tipos de proteínas: las perforinas y las granzimas. El contenido de estos gránulos es exocitado cuando el linfocito detecta la presencia de una célula infectada o cuando la reconoce como tumoral. La perforina se insertará en la membrana de la célula diana y creará un poro por el cual entrarán en el citoplasma las granzimas. La granzima (hay dos tipos, A y B) activará a las caspasas-10 y 3 y también estimulará a la mitocondria para que se inicie el proceso apoptótico como si de una señal interna se tratara.

2. Efectos celulares

Los cambios celulares que se producen durante la apoptosis son diversos: una retracción o encogimiento de la célula, el citoplasma se vuelve más denso y los orgánulos más empaquetados, se observa condensación de la cromatina, lo cual es un indicio visible en preparaciones histológicas convencionales. Posteriormente hay protusiones y plegamientos de la membrana de modo que la célula se divide en porciones independientes denominados cuerpos apoptóticos, pero siempre rodeadas por membrana plasmática. Estas porciones celulares son posteriormente fagocitadas por macrófagos. Puesto que no hay liberación de sustancias intracelulares al medio extracelular por roturas de la membrana no se dan procesos inflamatorios. Además, los macrófagos que eliminan a los cuerpos apoptóticos no liberan citoquinas al medio. La apoptosis es un proceso de muerte celular sin molestar a las células vecinas. Si embargo, se sabe que en algunos casos son capaces de liberar moléculas que favorecen la proliferación celular, la reorganización de la matriz extracelular o del citoesqueleto en células vecinas.

La carencia de efecto inflamatorio de los cuerpos apoptóticos es debida a que son rápidamente eliminados por los macrófagos. Si la actividad macrofágica es inhibida los cuerpos apoptóticos terminan por romperse y desencadenan respuestas inflamatorias. El reconocimiento de las porciones de citoplasmas apoptóticos por parte de los macrófagos se debe a que durante la apoptosis la célula expresa en su superficie marcadores que serán reconocidos específicamente. Esto se consigue, entre otras cosas, por el movimiento de la fosfatidilserina, que normalmente se encuentra en la monocapa interna de la membrana, hacia la

monocapa externa. Este lípido es una señal para los macrófagos. También cooperan en el reconocimiento de la incorporación a la membrana de la anexina I y de la calreticulina.

Se ha considerado que la apoptosis es un proceso irreversible una vez que se han activado las primeras caspasas. Sin embargo, se ha encontrado que al inactivar los macrófagos algunas células destinadas a morir por apoptosis pueden recuperarse. De manera que la acción de los macrófagos es asegurarse de que una vez que se inicia la apoptosis la célula va realmente a morir.

Por otra parte, la necrosis es una muerte celular debida normalmente a daños celulares producidos por agentes externos tales como temperatura, presión, tóxicos, etcétera. La diferencia con la apoptosis es que la necrosis es un proceso descontrolado y pasivo que conlleva la rotura de la membrana plasmática y liberación del contenido celular desencadenando procesos inflamatorios. Todavía existe un tercer tipo diferente de muerte celular que está mediada por procesos de autofagia. La muerte por autofagia también se considera que es un mecanismo controlado por la célula.

3. Desarrollo

Durante el desarrollo de *C. elegans* se generan 1090 células somáticas, de las cuales morirán 131 en lugares y en momentos concretos. Este patrón de producción de un exceso de células que luego serán eliminadas se observa en todas las especies. Aparentemente es un derroche de energía, pero las apariencias engañan.

Morfogénesis

Quizá el ejemplo clásico de la participación de la apoptosis en la morfogénesis de un órgano durante el desarrollo embrionario es la eliminación de las membranas interdigitales. Los dedos de las extremidades están inicialmente conectados por masas celulares que luego serán eliminadas, resultando en la forma final de los dedos. Sin embargo, los patos y otras aves acuáticas poseen membranas entre sus dedos que les permiten impulsarse en el agua. En estas especies la apoptosis es muy escasa entre los dedos. La muerte celular en las especies con dedos separados tiene un efecto como esculpir una estructura para darle una

forma final. Otro ejemplo claro ocurre durante la metamorfosis de muchas especies, particularmente en anfibios, en los cuales la apoptosis participa en la reorganización del cerebro y del digestivo, así como en la eliminación de la cola.

A veces la muerte celular de ciertas poblaciones celulares durante el desarrollo favorece la liberación de tensiones mecánicas que permiten el plegamiento o cambio de forma de estructuras embrionarias. Parece ser que esto ocurre durante el cierre del tubo neuronal de mamíferos donde gracias a la apoptosis se acelera su cierre. La formación de la cavidad proamniótica en los embriones de mamíferos es resultado de procesos apoptóticos en el centro de la masa de células internas tras el implante del embrión. A este proceso se le denomina cavitación.

El tamaño de los órganos es un balance entre proliferación y muerte celular producida durante el desarrollo o en estado adulto. Existen genes relacionados con la proliferación, particularmente los de la vía Hippo que inhiben los procesos apoptóticos. Normalmente estos genes están implicados en cascadas de señalización que cuando no se activan se favorecen los procesos apoptóticos y por lo tanto la eliminación de células del órgano.

Ajuste fino de la función

Está demostrado matemáticamente que es menos costoso en términos de información sobreproducir inicialmente elementos de una estructura tosca y luego eliminar los excesos para obtener una forma final funcionalmente más precisa. Esto es claro en el sistema nervioso donde establecer las conexiones iniciales de forma precisa requeriría una cantidad de información impresionante, pero mucho menos si primero se establecen las conexiones entre neuronas de una manera poco fina y luego se eliminan las células que establecieron conexiones incorrectas. Mueren aquellas neuronas que no hayan sido capaces de establecer conexiones funcionales. De la misma forma, hacer reordenaciones aleatorias para producir muchos linfocitos y luego eliminar a aquellos que produzcan reacciones autoinmunes es más barato, unos 60 genes, que los 100000 genes que serían necesarios para producir cada uno de las líneas de linfocitos. Este proceso de economía se puede aplicar también a procesos de mor-

fogénesis y regionalización.

4. Homeostasis

La apoptosis en animales adultos sirve para contrarrestar la proliferación por mitosis que ocurre en muchos tejidos. Es un proceso continuo de muerte celular y reemplazo por células nuevas. La eliminación de las células apoptóticas la hacen los macrófagos. En la mayoría de los tejidos hay aproximadamente un 15 % de las células que son macrófagos. Este equilibrio entre proliferación y eliminación celular evidente en los epitelios, donde hay una renovación constante de las células y un balance entre nacimiento y muerte celular. Por ejemplo, la queratinización de la epidermis es un proceso apoptótico especializado. También el ciclo de vida de los enterocitos del intestino comienza con la proliferación en las criptas de la mucosa intestinal, el desplazamiento de los enterocitos hacia las zonas más superficiales y su muerte por apoptosis en las vellosidades intestinales. Esto ocurre también los epitelios de las vías respiratorias. Esto es interesante en células que están expuestas a agentes potencialmente patógenos o tóxicos y es más rentable su renovación que favorecer su resistencia y reparación a tales agentes. El balance entre proliferación celular y apoptosis es importante también en la sangre. Esta regulación empieza al nivel de las células madre hematopoyéticas, donde su población es regulada por apoptosis, y por tanto se controla la cantidad de células sanguíneas producidas. Incluso las plaquetas pueden ser reguladas por apoptosis. Las plaquetas son un ejemplo de apoptosis en estructuras no nucleadas.

La apoptosis es un proceso normal durante la respuesta inmune. Los linfocitos T citolíticos emplean perforina y granzima B para eliminar a las células infectadas. La granzima B activa directamente las caspasas, pero también en otras vías como la activación de una molécula denominada Bid que actúa sobre la mitocondria favoreciendo la salida de citocromo C y activando la vía interna de la apoptosis. Pero además, la apoptosis juega un papel importante mediante la eliminación de los linfocitos B y T una vez que la respuesta inmune ha terminado. Esta acción está mediada por Bcl-2 y por la actividad antigénica. Se ha

propuesto que las células altamente estimuladas por los antígenos, es decir que han desarrollado anticuerpos contra ellos, disminuyen la influencia de Bcl-2 y aumentan la de los receptores de muerte de manera que son células más sensibles a sufrir apoptosis.

Hay numerosas causas que hacen estresarse a una célula, lo que puede provocar un descontrol y mal funcionamiento de esta. Entre estas causas están daños en el ADN, fallos en la división celular, producción y acumulación de proteínas aberrantes, aumento de especies moleculares reactivas o infección por patógenos. Todas ellas, si alcanzan una determinada intensidad, disparan los procesos apoptóticos.

El cáncer es un claro ejemplo donde la apoptosis juega un papel importante. Más concretamente, la inhibición de ésta favorece la proliferación y progresión del cáncer. La resistencia de las células tumorales a la apoptosis se da por mutaciones que afectan a genes proapoptóticos. Por ejemplo, alteraciones en los receptores FAS, disminución de su producción o síntesis de receptores defectuosos, de manera que no pueden ser reconocidos por los linfocitos citotóxicos, o disminución de la expresión de los genes bcl-2 proapoptóticos,

Durante el envejecimiento hay una alteración de la apoptosis en diferentes tejidos. Mientras en unos hay un aumento en otros hay una disminución. Por ejemplo, hay un aumento de la apoptosis en el sistema inmune, en el músculo esquelético, en el músculo cardíaco y en enfermedades neurodegenerativas, mientras que por otra parte las células cancerosas y las senescentes son resistentes a morir por apoptosis, favoreciendo su aumento durante el envejecimiento.

Bibliografía

Elmore S. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicology and pathology*. 35:495-516.

Henson PM, Hume DA. 2006. Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis. *Trends in immunology*. 27:444-250.

Suzane M, Steller H. 2013. Shaping organisms with apoptosis. *Cell death and differentiation*. 20:669-675.