

## CAPÍTULO 4.

### DEVENIR INTRACELULAR DE SUBSTANCIAS CAPTADAS

En el capítulo 2 se describió la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática y en el capítulo 3 las modalidades y los mecanismos de comunicaciones intercelulares. En este capítulo se analizan los mecanismos por medio de los cuales se interiorizan en la célula las sustancias extracelulares, tales como la endocitosis y la fagocitosis. Las macromoléculas que son transportadas al interior de las células sufren, a menudo, la digestión intracelular por los lisosomas (heterofagia); a veces, van a otro organelo o son arrojadas de nuevo al medio extracelular por un polo diferente de la célula (transcitosis). Por razones de similitud se describe también la autofagia, aunque se trate en este caso de la digestión de los constituyentes propios de la célula y no de sustancias captadas.

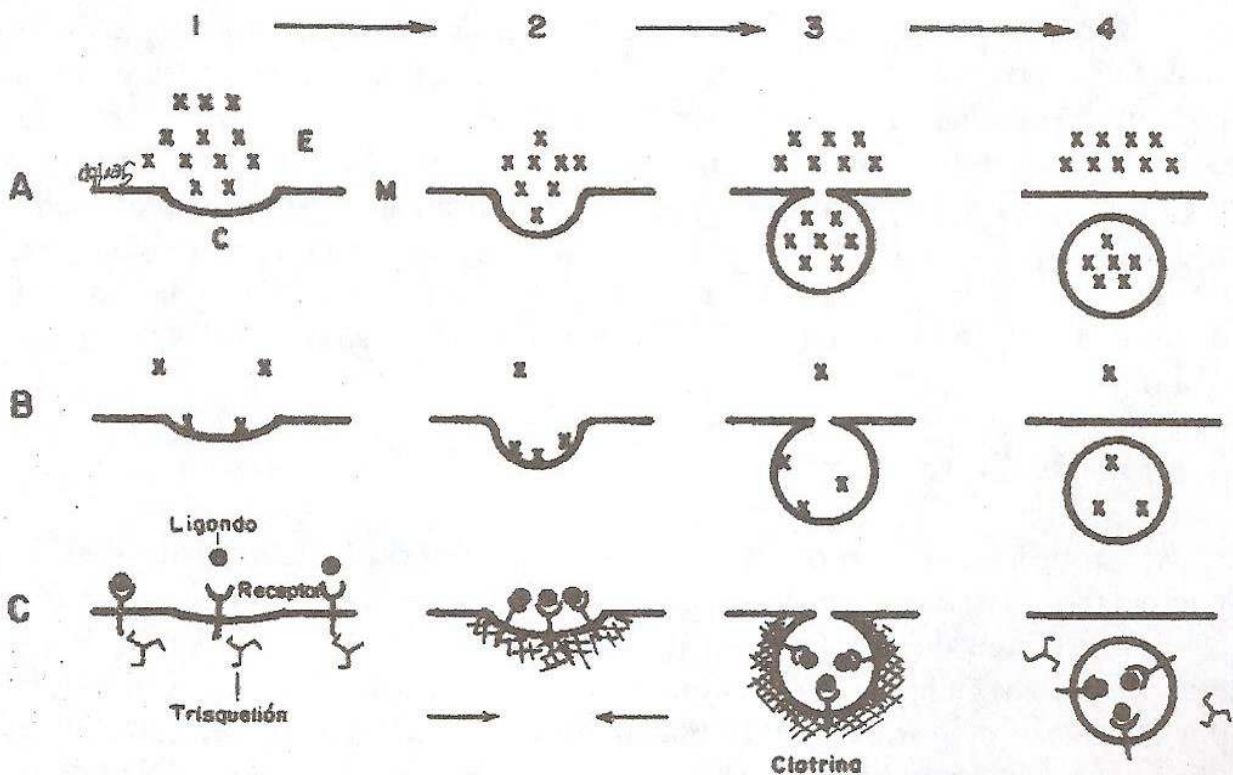
#### 4.1. ENDOCITOSIS.

A parte de los mecanismos de transporte pasivo (simple difusión, canales iónicos) y activo (bombas, transportadores) que se describieron en el segundo capítulo, las células disponen de otro proceso de intercambio de sustancias con el medio extracelular. La célula puede captar masivamente sustancias del medio extracelular por el proceso de **endocitosis**, y liberar sustancias hacia el medio extracelular por **exocitosis**. La endocitosis y la exocitosis se oponen a la permeabilidad selectiva de la membrana donde las moléculas se difunden individualmente a través de ella. En el proceso de endocitosis pueden entrar al mismo tiempo diversas moléculas del medio extracelular. Con este proceso la célula capta macromoléculas, partículas de sustancias y, en algunos casos especializados, puede captar hasta células enteras por el proceso denominado **fagocitosis**. A continuación se considera la endocitosis y la exocitosis en el capítulo 5.

Cuando la célula requiere captar sustancias y macromoléculas que son bastante grandes y no pueden atravesar la membrana plasmática, utiliza el proceso de

endocitosis. Para interiorizar esas sustancias, que pueden estar unidas a la membrana o en solución en el medio extracelular, la membrana plasmática forma una hendidura (Fig. 4.1 1A, 1B y 1C) que se invagina paulatinamente hacia el interior de la célula para formar una fosilla (Fig. 4.1 2A, 2B y 2C). Los bordes de la invaginación se acercan progresivamente (Fig. 4.1 3A, 3B y 3C) y luego se fusionan de tal manera que se aísla completamente el contenido de la invaginación del medio extracelular. Así se forma una **vesícula de endocitosis** (Fig. 4.1 4A, 4B y 4C). Esta vesícula de endocitosis a menudo se fusiona con un lisosoma para la digestión de su contenido, o puede eventualmente dividirse o fusionarse con otras vesículas de endocitosis o con otro organelo celular.

Existen tres modalidades de endocitosis: endocitosis fluida, endocitosis de adsorción y endocitosis específica o mediada por receptores.



**Figura 4.1. Esquema de las tres modalidades de endocitosis.**

A1, A2, A3 y A4: Endocitosis fluida. B1, B2, B3 y B4: Endocitosis de adsorción. C1, C2, C3 y C4: Endocitosis específica.

1A, 1B y 1C: Inicio de la invaginación de la membrana plasmática. 2A, 2B y 2C: Aumento de la invaginación formando una fosilla. 3A, 3B y 3C: Acercamiento de las membranas para fusionarse. 4A, 4B y 4C: Formación de la vesícula de endocitosis. Las flechas en C2 indican la difusión lateral de los complejos ligandos-receptores para agruparse en la región de la fosilla tapizada.

M: membrana plasmática; C: citosol.

### **4.1.1. Endocitosis fluida**

Cuando las moléculas son muy abundantes y están en solución en el medio extracelular, una vesícula de endocitosis interioriza muchas moléculas al mismo tiempo, en forma de una “gotita”, por el proceso denominado endocitosis fluida (Fig. 4.1 A1, A2, A3 y A4). La cantidad de sustancias captadas es proporcional a su concentración en el medio extracelular. Las macromoléculas penetran en la célula exclusivamente en forma soluble, es decir que tendrán la misma concentración dentro de las vesículas que en el medio extracelular. Comparado con las otras modalidades de endocitosis, se trata siempre de un proceso no selectivo, de eficacia limitada, determinada totalmente por la abundancia de las partículas en el medio extracelular.

La membrana de la vesícula de endocitosis que deriva de la membrana plasmática se vuelve después a la periferia de la célula y se reinserta en la membrana plasmática, el proceso se denomina reciclaje de membranas. El reciclaje de las membranas de vesículas de endocitosis se hace por pequeñas vesículas poco definidas.

### **4.1.2. Endocitosis de adsorción**

En este caso se interiorizan sobre todo las moléculas del medio extracelular adsorbidas de manera inespecífica sobre la membrana plasmática, porque se encuentran en muy poca concentración en el líquido extracelular (Fig. 4.1 B1, B2, B3 y B4). La adsorción, que es poco específica de una molécula, pone en juego un gran número de sitios de adsorción de baja afinidad sobre la membrana plasmática para varios tipos diferentes de moléculas. En esta adsorción intervienen la carga eléctrica y/o el carácter hidrofílico de las moléculas. El carácter limitado en número de sitios de adsorción tiene como consecuencia que el proceso de asociación de las moléculas a la membrana presente el fenómeno de saturación. Una vez que todos los sitios están ocupados, el aumento en la concentración de las moléculas en el medio extracelular no tiene efecto sobre la cantidad de moléculas adsorbidas.

La endocitosis fluida y la de adsorción coexisten: la endocitosis de adsorción predomina cuando las moléculas se encuentran en bajas concentraciones, mientras que en altas concentraciones que saturan los sitios de adsorción la endocitosis fluida se vuelve el fenómeno principal. Así, la endocitosis de adsorción permite a la célula captar las moléculas que necesita de una manera más eficaz que la endocitosis fluida.

### **4.1.3. Endocitosis específica o mediada por receptores**

A diferencia de los dos tipos de endocitosis mencionados, que no son muy eficaces en la selectividad de la molécula a interiorizar, existe un tercer tipo denominado endocitosis específica (Fig. 4.1 C1, C2, C3 y C4) que hace intervenir los

receptores de la membrana plasmática. Estos receptores se unen específicamente a un tipo de molécula del medio extracelular (ligando). Los receptores unidos a su ligando se concentran, por difusión lateral, en la fosilla para ser endocitados luego (Fig. 4.1 C2). La unión específica del ligando permite su interiorización aunque se encuentre en concentraciones muy bajas en el medio extracelular, hasta del orden de nanomolar ( $10^{-9}$  M) o menos.

Los ligandos interiorizados de esta manera incluyen varias moléculas de señal extracelular como los factores de crecimiento, los neuropéptidos, los neurotransmisores y las hormonas proteicas, que se unen a los receptores de la membrana plasmática. Pueden ser también sustancias que la célula necesita para su metabolismo como las partículas de LDL (*Low density lipoproteins*).

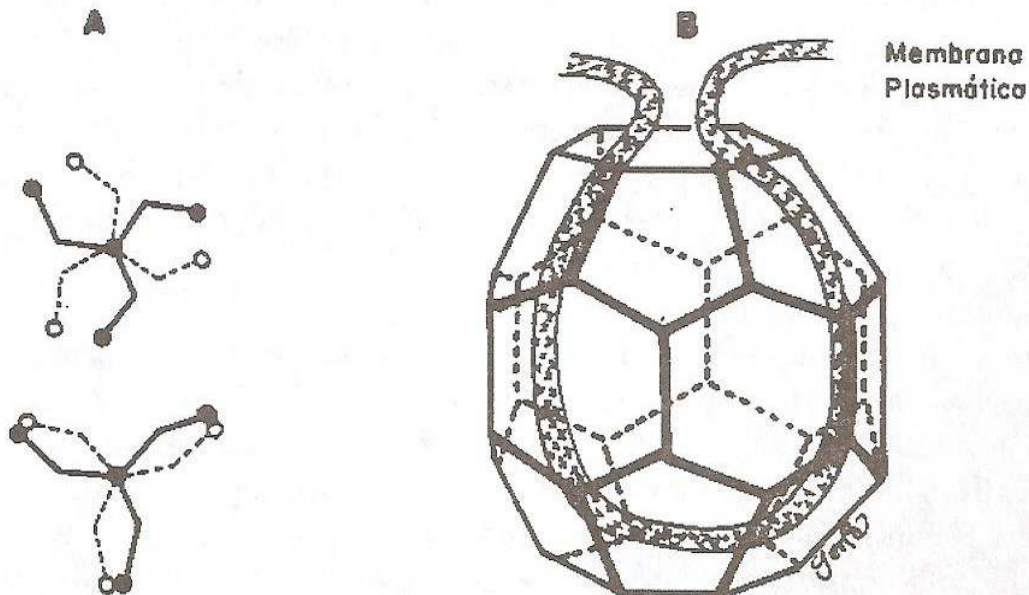
En numerosos casos los complejos ligando-receptor que se forman sobre la membrana plasmática son interiorizados por endocitosis específica. El devenir intracelular de estos complejos difiere según el mediador, pero muchos mediadores polipeptídicos culminan en los lisosomas donde son destruidos. La interiorización de los complejos ligando-receptor tiene una etapa inicial caracterizada por la acumulación de receptores en zonas limitadas de la membrana plasmática, las fosillas tapizadas (*coated pits*), que típicamente ocupan alrededor del 2% del área total de la superficie celular (Fig. 4.1 C2). Se trata de zonas que se presentan en el ME como depresiones de la membrana plasmática, con un depósito, en el lado citosólico, de un material denso a los electrones. Esta zona densa se debe a la concentración de unas proteínas que intervienen dinámicamente en el proceso de invaginación. La proteína mejor conocida de las fosillas tapizadas de la membrana plasmática es la *clatrina* (*clathrin*). La vida media de la malla de clatrina es corta, se forma en pocos minutos, y acompaña a la invaginación dentro de la célula hasta que se forma la vesícula; entonces, la clatrina se disocia en proteínas separadas denominadas los trisqueliones. La formación de la fosilla tapizada puede ocurrir antes de la fijación de los ligandos al receptor o en respuesta a esta unión. Generalmente, la vesícula en formación es enriquecida selectivamente con receptores y sus ligandos. Aparentemente la formación del complejo ligando-receptor no es indispensable para la interiorización del receptor. No se entiende, en este caso, la función de una interiorización continua del receptor sin unirse a su ligando.

A medida que la fosilla se va interiorizando sigue acompañada por la clatrina (Fig. 4.1 C3). Una vez fusionadas las membranas y formada la vesícula tapizada de endocitosis, el material denso desaparece rápidamente (Fig. 4.1 C4). Se ha estimado que alrededor de 2.500 vesículas tapizadas se forman cada minuto en un fibroblasto en cultivo. Estas vesículas tapizadas son aun más transitorias que las fosillas tapizadas: segundos después que se han formado, pierden su cubierta de clatrina y son capaces de fusionarse con otras vesículas denominadas endosomas.

En la endocitosis específica entran también otras moléculas, como en la endocitosis fluida, por el hecho de que cierta cantidad del líquido extracelular queda atrapado dentro de la invaginación y las vesículas tapizadas.

La endocitosis específica interviene como uno de los mecanismos de inhibición del estímulo iniciado por la unión de un mediador a su receptor interrumpiendo la transducción de la señal al interior de la célula (Ver 3.4.2).

El sombreado o tapizado de las fosillas y de vesículas recién formadas está constituido por un material fibrilar que forma una red de pentágonos y hexágonos cuya unidad básica está formada por tres moléculas flexibles unidas por el mismo extremo, denominadas trisqueliones (Fig. 4.2 A). El ensamblaje de los trisqueliones forma la red de revestimiento que se denomina clatrina. A medida que se va invaginando la fosilla y en el momento de la fusión de membranas para formar la vesícula, el aspecto de la clatrina visto desde el interior de la célula es de un balón de *football* (Fig. 4.2 B). Una vez formada e interiorizada, la vesícula tapizada pierde rápidamente su revestimiento de clatrina por la disociación de los trisqueliones que se quedan cerca de la membrana (Fig. 4.1 C4). Todo indica que la clatrina interviene de manera activa en la invaginación y la formación de la vesícula de endocitosis. Una proteína, llamada adaptina, forma un “puente” entre el receptor y la malla de trisqueliones o clatrina (Fig. 5.14).



**Figura 4.2. Estructura del trisquelión y de la clatrina.**

A. El trisquelión está formado por tres proteínas que se unen en sus extremidades globulares. Cada proteína tiene en su centro una “articulación” que le permite los movimientos para adaptarse a los cambios de la membrana plasmática durante el proceso de endocitosis. Las líneas discontinuas muestran la forma alternativa de la organización (Näthke y col., 1992).

B. Organización de los trisqueliones que forman la red de clatrina durante la formación de la vesícula de endocitosis.

Aunque la unión del ligando a su receptor se puede realizar a 4°C, la formación de las vesículas de endocitosis fluida y específica se bloquean a esta temperatura, al igual que en la ausencia de ATP, mientras que la endocitosis de adsorción no requiere gasto de energía y tiene lugar incluso a temperaturas de apenas 4°C. Por esto, algunos autores denominan las endocitosis fluida y específica como verdaderas endocitosis.

La endocitosis específica provee un mecanismo de concentración selectivo que aumenta la eficiencia de la interiorización de un ligando particular más de 1.000 veces. De esta manera un componente que se encuentre aun en concentraciones de nM en el líquido extracelular puede ser endocitado en grandes cantidades sin interiorizar un gran volumen de líquido extracelular. Un ejemplo particularmente bien comprendido de endocitosis mediada por receptores, y fisiológicamente importante, es el proceso de interiorización del colesterol por las células de los mamíferos, ejemplo que se describe a continuación.

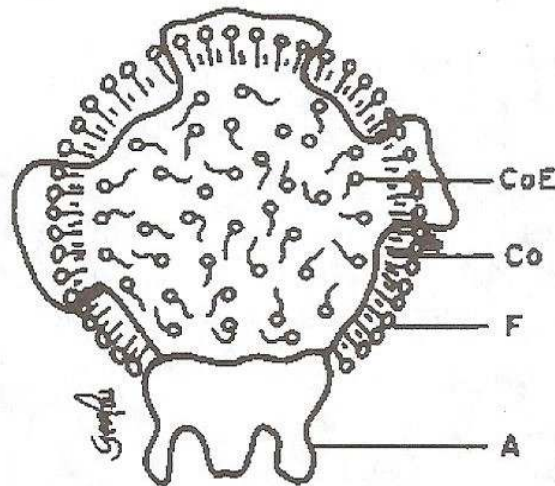
#### 4.1.4. Interiorización del colesterol por endocitosis específica

Muchas células animales interiorizan el colesterol del plasma sanguíneo para utilizarlo en su metabolismo. Si esta interiorización es bloqueada, el colesterol se acumula en la sangre y contribuye a la formación de placas de arteriosclerosis que provocan la hipertensión, derrame cerebral o el infarto del corazón. Efectivamente, a través del estudio de una predisposición genética para la arteriosclerosis en el hombre, se reveló por primera vez el mecanismo de endocitosis mediada por receptores (Ver 4.6.4).

La mayoría del colesterol es transportado en la sangre bajo la forma de una partícula conocida como lipoproteínas de baja densidad, las LDL (*Low density lipoproteins*). Cada partícula de LDL es un complejo molecular de una masa de 3 millones de daltons y de un diámetro de 22 nm, constituido por un núcleo formado de  $\pm 1.500$  moléculas de colesterol esterificado con ácidos grasos (Fig. 4.3). El núcleo hidrofóbico de la partícula está rodeado por una monocapa lipídica constituida por  $\pm 800$  moléculas de fosfolípidos y unas 500 moléculas de colesterol no esterificado. Una sola proteína de 500.000 daltons, denominada apoproteína-B100, organiza la partícula de LDL y actúa como ligando en la unión específica a los receptores de LDL de la membrana celular.

Cuando una célula necesita colesterol, sintetiza los receptores de LDL y los transporta a la membrana plasmática. Las partículas de LDL se unen a sus receptores y son concentradas en las fosillas tapizadas de clatrina; rápidamente se forma la vesícula de endocitosis y finalmente las partículas de LDL se encuentran dentro de lisosomas. En los lisosomas se hidroliza el colesterol esterificado y todo el

colesterol libre se vuelve disponible para la célula. La síntesis de receptores de las LDL se para cuando hay demasiado colesterol en la célula (regulación río abajo de los receptores).



**Figura 4.3. Modelo de la estructura de una partícula de LDL.**

A: apoproteína-B100; CoE: colesterol esterificado; Co: colesterol; F: fosfolípidos.

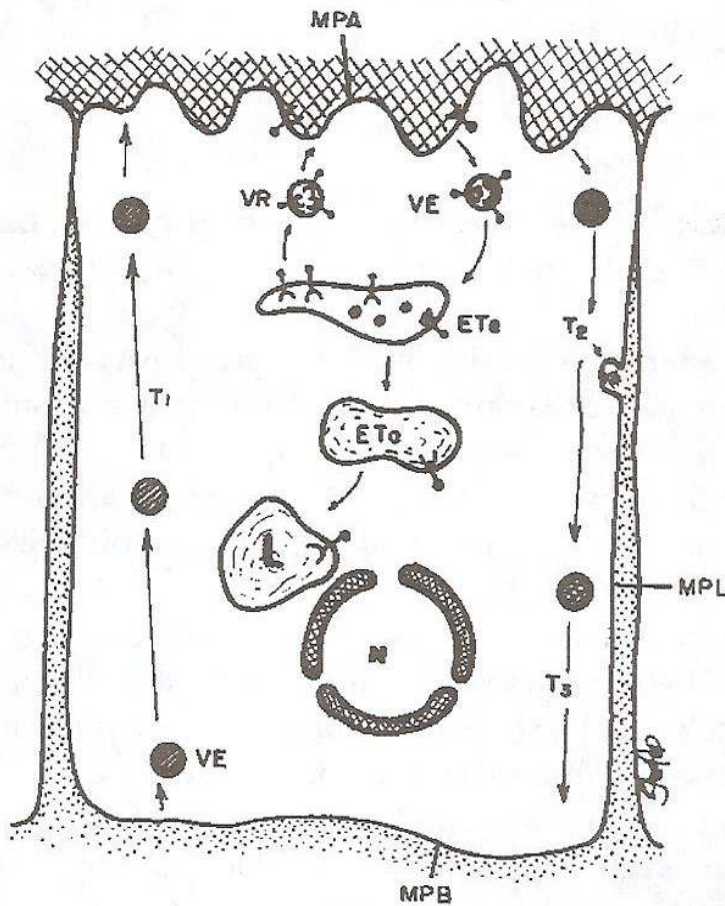
Las grandes características del sistema de receptores para las partículas de LDL parecen encontrarse para otras proteínas de transporte tales como la transferrina (transporte de hierro) cuyos receptores fueron detectados en los eritroblastos y los reticulocitos, y la transcobalamina II (transporte de la vitamina B12) cuyos receptores se han encontrado en los hepatocitos y en los fibroblastos.

Actualmente se conocen muchos receptores de diferentes tipos de moléculas que son interiorizados por endocitosis específica, y todos ellos utilizan la misma vía de las fosillas cubiertas por clatrina. La mayoría de estos receptores, como los receptores de LDL, se interiorizan continuamente, estén o no unidos a sus ligandos específicos, pero otros son interiorizados únicamente cuando están unidos a su ligando. Estos últimos casos sugieren que el cambio conformacional de los receptores inducido por el ligando u otro mecanismo es necesario para que se unan a los trisqueliones de la clatrina.

Las fosillas tapizadas deben funcionar como un filtro molecular coleccionando los receptores de la membrana y excluyendo a las otras proteínas de la membrana plasmática. Se ha demostrado que muchos tipos de receptores se acumulan en la misma fosilla tapizada. Una fosilla tapizada podría acomodar contener de 1.000 receptores mezclados. Aunque todos los complejos receptores-ligandos que utilizan la vía de endocitosis específica entren en el mismo compartimento endocitario, sus destinos posteriores varían.

#### 4.1.5. Compartimento endocitario

El compartimento endocitario incluye todas las estructuras que nacen del proceso de endocitosis. La distribución de moléculas marcadas después de su endocitosis revela un compartimento endocitario constituido por un conjunto complejo de vesículas y tubos heterogéneos que se extienden desde la periferia de la célula hasta la región perinuclear. Dos compartimentos pueden distinguirse en estos experimentos: las vesículas muy cercanas a la membrana plasmática donde aparecen las moléculas marcadas en más o menos un minuto se denominan **endosomas tempranos** o endosomas (Fig. 4.4 ETe); y las vesículas cerca del complejo de Golgi y del núcleo donde aparecen las moléculas marcadas después de 5 a 15 minutos se llaman **endosomas tardíos** o prelisosomas (Fig. 4.4 ETa).



**Figura 4.4. Los destinos de las vesículas de endocitosis en una célula epitelial polarizada.**

Las vesículas de endocitosis (VE) pueden retornar por vesículas de reciclaje (VR) al mismo dominio de la membrana plasmática; o pueden fusionarse con endosomas (ETa) y con lisosomas (L). Algunas vesículas de endocitosis realizan la transcitosis (T1, T2 y T3).

MPA: membrana plasmática apical; MPL: membrana plasmática lateral; MPB: membrana plasmática basal; ETe: endosoma temprano; T<sub>1</sub>: transcitosis de la membrana basal a la apical; T<sub>2</sub>: transcitosis de la membrana apical a la lateral; T<sub>3</sub>: transcitosis de la membrana apical a la basal; N: núcleo.



Los compartimentos endocitarios que intervienen después de la endocitosis específica han sido designadas con términos diferentes como compartimento intermedio, compartimento de decoplaje, receptosomas o endosomas. Aunque el último término tenga un sentido bastante general, su utilización tiende a ser reservada para los organelos que tienen un contenido ácido. Efectivamente, una bomba de protones acidifica las vesículas de endocitosis y de exocitosis, los endosomas, fagosomas, lisosomas, compartimentos seleccionados del complejo de Golgi, vesículas de secreción, de transcitosis y de transporte entre los organelos.

En la endocitosis específica, el destino de un receptor varía según su tipo: primero, la mayoría retorna al mismo dominio de la membrana plasmática (reciclaje) (Fig. 4.4 VR); segundo, algunos receptores progresan hacia los lisosomas donde son degradados (Fig. 4.4 L); y tercero, otros receptores van a un dominio diferente de la membrana plasmática mediando el proceso de transcitosis (Fig. 4.4 T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> y T<sub>3</sub>). Los receptores de LDL se reciclan sin fusionarse con los lisosomas y los de EGF sí se fusionan con lisosomas. Pero a diferencia de los receptores de LDL, los receptores del EGF se concentran en las fosillas tapizadas únicamente después de su unión al EGF. Otra diferencia es que la mayoría de los receptores EGF no son reciclados, sino acaban en los lisosomas donde son degradados junto con el EGF interiorizado. La unión del mediador lleva así a una disminución de la concentración de receptores de EGF sobre la membrana celular (regulación río abajo de los receptores).

La relación entre endosomas tempranos y tardíos es incierta. Todavía no es claro cómo las moléculas endocitadas se mueven de un compartimento endosomal al otro y eventualmente culminan en los lisosomas.

Una hipótesis indica que los endosomas tempranos formados por unión de varias vesículas de endocitosis se mueven lentamente hacia el interior de la célula para transformarse en endosomas tardíos como resultado de tres procesos: primero, sería la fusión con vesículas que vienen del complejo de Golgi con las hidrolasas lisosomiales; segundo, reciclaje continuo de su membrana por otras vesículas; y tercero, la acidificación de su contenido por las bombas a protones. Esta hipótesis se basa en la presencia de la actividad de enzimas lisosomiales en muchos endosomas tardíos. Por el mismo hecho los endosomas tardíos son llamados también prelisosomas.

Otra hipótesis propone que los endosomas tempranos y tardíos son dos compartimentos estacionarios y el transporte entre ellos ocurre por un compartimento intermedio, ya sea por la dinámica de una red de tubos o ya sea por vesículas específicas de transporte. Efectivamente, los endosomas tempranos y tardíos difieren en su composición, entre otros tienen proteínas *rab* diferentes (Ver 5.4.2.3).

Algunas vesículas de endocitosis se acidifican rápidamente después de su formación debido a la acción de una bomba a protones en su membrana. La acidificación provoca una reducción importante de la afinidad de muchos receptores a sus ligandos, quedando libres en la solución del contenido de la vesícula. Los receptores así disociados de sus ligandos vuelven a la periferia celular anclados en la membrana de la vesícula de reciclaje (Fig. 4.4 VR), mientras que los ligandos son transferidos en gran parte a los lisosomas.

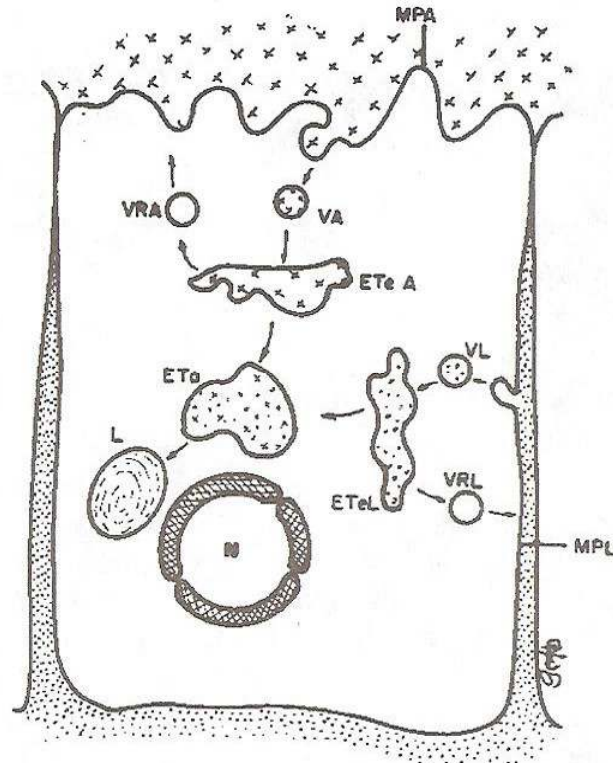
No todo el contenido de los endosomas son degradados por los lisosomas, muchas moléculas son recicladas retornando de los endosomas a la membrana plasmática por las vesículas de transporte. Existen dos posibilidades para los receptores interiorizados: pueden ser degradados en los lisosomas y reemplazados por la síntesis de nuevos receptores; la otra posibilidad es el reciclaje de los receptores ya explicado (Fig. 4.4 VR). El reciclaje de los receptores es más frecuente que su degradación en los lisosomas.

En las células epiteliales polarizadas (Fig. 4.5), la endocitosis ocurre en los dos dominios de la membrana plasmática, la apical y la basolateral. Substancias endocitadas en los dos dominios entran primero en un endosoma temprano que es específico de cada dominio. Esta especificidad permite a los receptores ser reciclados únicamente hacia su dominio específico, al menos que tengan una señal que les indica la transcitosis hacia otro dominio de la membrana plasmática. Las moléculas endocitadas de ambos dominios que no son recicladas a partir de los endosomas tempranos son transportadas a los endosomas tardíos comunes cerca del centro de la célula y eventualmente degradados en los lisosomas.

#### **4.1.6. Transporte vesicular**

El transporte intracelular por vesículas es un modo de transporte en masa que interviene no solamente en el proceso de endocitosis, del transporte entre los endosomas tempranos y tardíos, sino también en los procesos de exocitosis, de transcitosis, de transporte de membranas, de distribución intracelular de proteínas sintetizadas.

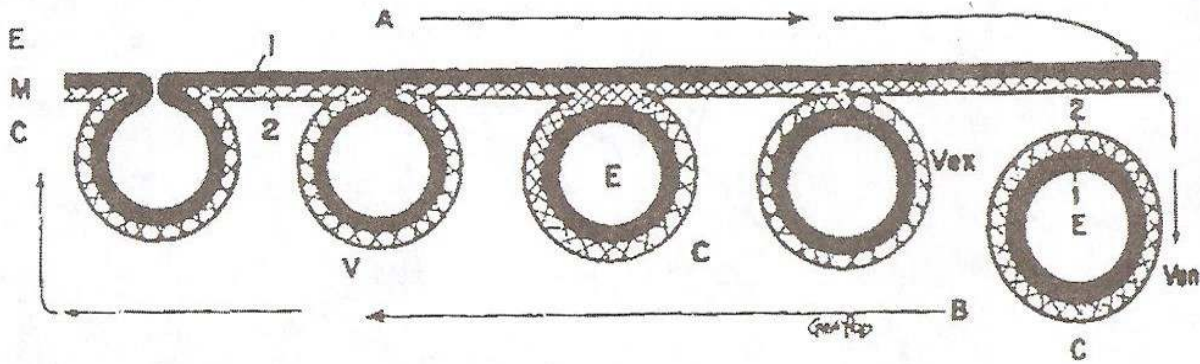
En los hepatocitos las vesículas de endocitosis específicas pueden ir a organelos como el complejo de Golgi. Cuando se interiorizan en la misma vesícula de endocitosis diferentes ligandos-receptores, rápidamente la vesícula se divide en dos más pequeñas, donde cada una lleva un solo tipo de receptor-ligando, y cada una toma un destino diferente, por ejemplo una va al complejo de Golgi y la otra al lisosoma. Esto demuestra la complejidad y también la precisión del transporte intracelular por vesículas (Ver 4.6.2. y 5.4.2).



**Figura 4.5. Compartimento endocitario en una célula epitelial polarizada.**  
 MPA: membrana plasmática apical; MPL: membrana plasmática basolateral; VA: vesícula de endocitosis apical; VRA: vesícula de reciclaje apical; ETeA: endosoma temprano apical; ETo: endosoma tardío; L: lisosoma; N: núcleo; VL: vesícula de endocitosis basolateral; VRL: vesícula de reciclaje basolateral; ETeL: endosoma temprano basolateral.

Con algunas pocas excepciones, el traspaso individual de una gran macromolécula a través de la membrana no es posible. El transporte por vesículas permite interiorizar macromoléculas dentro de membranas cerradas, separando citosol y medio extracelular; parece además el único medio que tienen las células para transportar membranas.

Otro aspecto importante del transporte vesicular es que permite mantener la especificidad de las dos hemicapas de las membranas que limitan la célula, los organelos y las vesículas. Cuando se describió la membrana plasmática en el segundo capítulo, se definió la hemicapa citoplásmica la que siempre está en contacto con el citosol; y la hemicapa exoplásmica la que está en contacto con el medio extracelular o con el contenido de un organelo intracelular. Estas hemicapas se unen siempre entre ellas cuando se forma o se fusiona una vesícula, es decir que siempre hay una coalescencia de la hemicapa citoplásmica de una vesícula con la misma hemicapa de la membrana de donde se formó o a donde llega para fusionarse (Fig. 4.6). Por ejemplo, durante la formación de la vesícula de endocitosis la hemicapa exoplásmica inicia la coalescencia (Fig. 4.6 A flecha), mientras que en la exocitosis son las hemicapas citoplásmicas que inician el proceso (Fig. 4.6 B flecha).

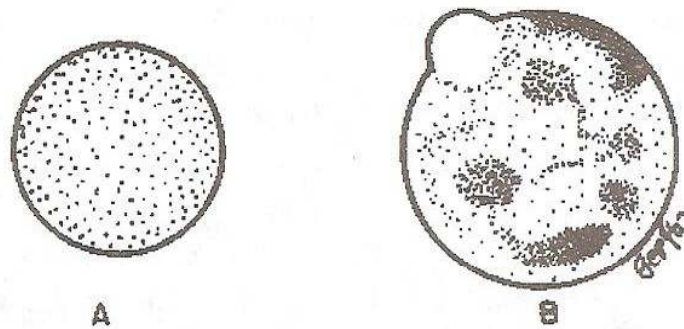


**Figura 4.6. Coalescencia de las hemicapas de una membrana con las de la membrana de una vesícula.**

A. La coalescencia de las hemicapas exoplásmicas de la membrana plasmática inicia la formación de una vesícula de endocitosis (VEn). Las flechas indican la dirección de los procesos de endocitosis. B. La coalescencia de las hemicapas citoplásmicas inicia la fusión de una vesícula de exocitosis (VEx) con la membrana plasmática. Las flechas indican la dirección de los procesos de exocitosis. E: medio exterior o exoplásmico; M: membrana; C: citosol; 1: hemicapa exoplásmica; 2: hemicapa citoplásmica.

## 4.2. LISOSOMAS, HETEROFAGIA Y AUTOFAGIA

Los lisosomas son los organelos principales de la digestión intracelular y existen prácticamente en todas las células animales, excepto en algunas altamente especializadas, como los glóbulos rojos. Las características morfológicas de un organelo digestivo son evidentemente muy variables, pues, ellas dependen esencialmente de la naturaleza de las sustancias ingeridas. Es por ésto que los lisosomas son a menudo caracterizados por un contenido heterogéneo y polimorfo. Las dimensiones de los lisosomas no son tampoco un elemento muy característico: ellas dependen de la cantidad de sustancias ingeridas y del tiempo necesario para su digestión. Los lisosomas pueden entonces variar ampliamente en función del tipo celular, o en la misma célula según las circunstancias fisiológicas. Esta variabilidad en las características morfológicas explican la diversidad de nombres utilizados en el pasado (más de 50) para designar a los lisosomas: corpúsculos densos, corpúsculos mielínicos o cuerpos pseudomiélnicos, corpúsculos residuales, citosomas, etc. Actualmente se denominan lisosomas **primarios** a los que tienen un contenido homogéneo claro y a veces con un halo claro entre su membrana y su contenido en las observaciones al ME (Fig. 4. A); y **secundarios** a los que presentan un contenido muy heterogéneo y polimorfo (Fig. 4.7 B). Se considera, fisiológicamente, que los lisosomas primarios no han participado todavía en un proceso de digestión. La proporción de los lisosomas primarios en una célula es, en general, muy baja, lo que dificulta su observación en un corte corriente al ME. Por ejemplo, en el hígado, los lisosomas primarios representan un 3% del total de los lisosomas en un hepatocito.



**Figura 4.7. Aspectos de lisosomas observados en el ME.**

A. Lisosoma primario. B. Lisosoma secundario.

Los lisosomas mejor conocidos son los del hígado. En cada hepatocito se encuentran cientos de lisosomas representando menos del uno por ciento del volumen celular. Los lisosomas hepáticos tienen un diámetro de  $0,5 \mu\text{m}$  en promedio, y contienen a menudo numerosos gránulos muy pequeños de  $10 \text{ nm}$  de diámetro que corresponden a las moléculas de ferritina. La presencia de la ferritina en los lisosomas secundarios se detecta fácilmente en ME sin ninguna coloración específica, debido a su alto contenido en hierro que son densos a los electrones. Es por esta razón que la ferritina se emplea como molécula marcadora para el análisis citológico de estructuras y moléculas celulares en el ME.

Los lisosomas secundarios de las células en cultivo, al contrario de los de las células de *in vivo*, tienen un contenido muy homogéneo. Porque estas células están expuestas a un medio artificial con un contenido en macromoléculas de suero que son digeridos rápida y completamente por los lisosomas. Los lisosomas primarios de los polimorfonucleares neutrófilos son una excepción del aspecto de estos lisosomas porque tienen un contenido muy denso a los electrones debido a su alto contenido en enzimas.

La definición de los lisosomas es esencialmente funcional, porque la identificación de estos organelos se basa en la presencia de enzimas hidrolíticas que intervienen en la digestión celular.

La identificación de los lisosomas puede realizarse por métodos bio-químicos detectando las hidrolasas ácidas en lisosomas aislados, o por aplicación de métodos citoquímicos en los cortes histológicos preparados para su análisis en el microscopio óptico o electrónico.

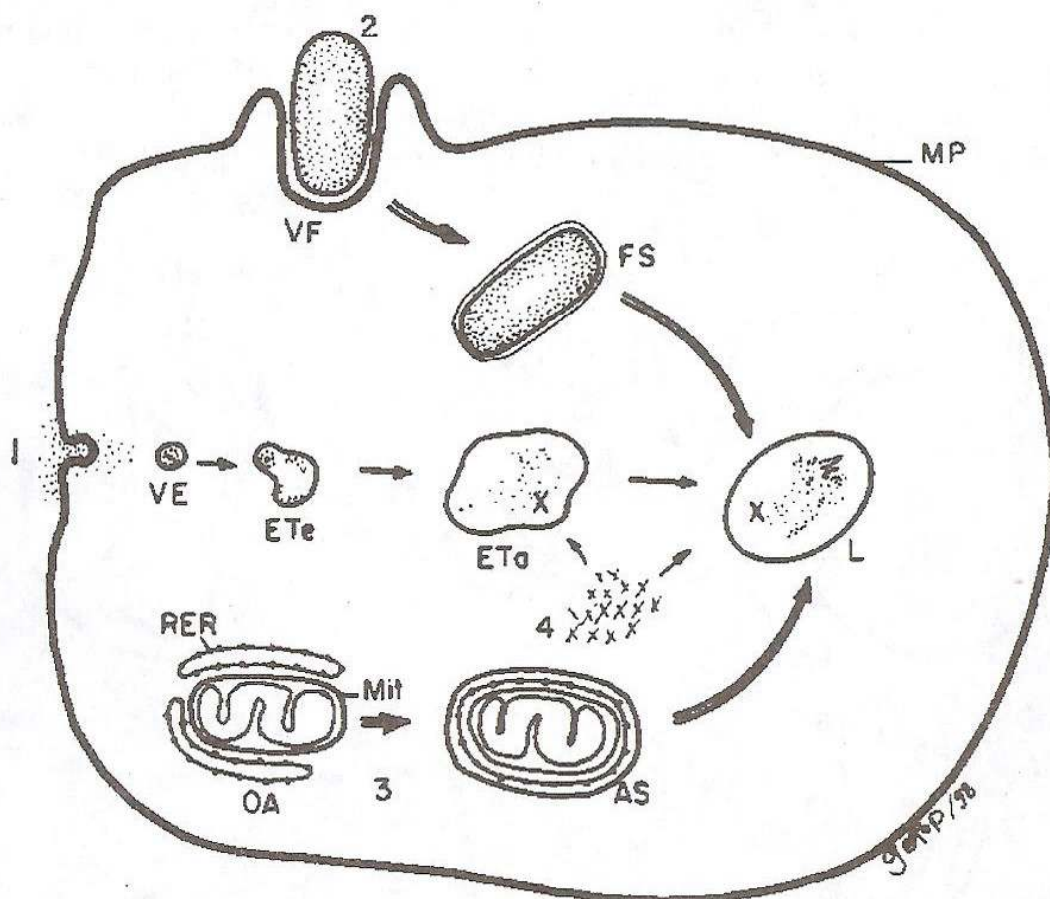
Actualmente se han identificado unas cincuenta **hidrolasas ácidas** diferentes en los lisosomas, que incluyen proteasas, nucleasas, glicosidasas, lipasas, fosfolipasas,

fosfatasas, y sulfatasas. Estas enzimas hidrolíticas pueden digerir prácticamente a todas las moléculas de origen biológico: proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos o lípidos. Todas son hidrolasas ácidas porque necesitan para su acción un pH ácido de  $\pm 5$  que se forma dentro de los lisosomas. La membrana de los lisosomas contiene, entre otros, una bomba a protones mantiene ácido el medio intralisosomial por transferencia de protones del citosol, mientras que el pH del citosol es de  $\pm 7,2$ .

La acción de las hidrolasas ácidas está limitada normalmente al interior de los lisosomas. El citosol es protegido de la acción enzimática lisosomal por la membrana del lisosoma. El mecanismo por el cual se protegen de la acción de las hidrolasas ácidas los constituyentes de los lisosomas, su membrana y sus enzimas, constituye un enigma aún no resuelto. El alto grado de glicosilación de las proteínas de la membrana lisosomal sería uno de los factores de protección contra las proteasas intralisosomiales.

Las pequeñas moléculas producidas por la digestión lisosomal como los aa, azúcares y nucleótidos pueden pasar al citosol gracias a la permeabilidad de la membrana del organelo.

Las enzimas digestivas de los lisosomas son transportadas por vesículas desde el complejo de Golgi hasta los lisosomas (Ver 5.7.1). Las sustancias que serán digeridas por los lisosomas llegan al menos por cuatro fuentes diferentes. **La primera** y más estudiada fuente de sustancias de degradación es la **endocitosis**. Las moléculas endocitadas son inicialmente llevadas dentro de las vesículas pequeñas que se forman en la membrana plasmática (Fig. 4.8 1). Luego adquieren una forma irregular, llamadas endosomas tempranos, antes se denominaban simplemente endosomas (Fig. 4.8 ETe). Algunas moléculas ingeridas son selectivamente recogidas y recicladas en vesículas a la membrana plasmática, mientras que otras pasan a los endosomas tardíos o prelisosomas (Fig. 4.8 ETa). El material del endosoma tardío entra en contacto con las hidrolasas lisosomiales que vienen del complejo de Golgi o de lisosomas secundarios por la fusión de sus membranas. El interior de los endosomas tardíos es moderadamente ácido ( $\text{pH} \pm 6$ ), y es el lugar de iniciación de la digestión hidrolítica de las moléculas endocitadas. Efectivamente, se demostró en las tiroides que la hidrólisis de la molécula de tiroglobulina necesaria para la formación de las hormonas tiroides se realiza en los endosomas tardíos o prelisosomas antes de fusionarse con los lisosomas. Los lisosomas secundarios se forman a partir de los endosomas tardíos, pero no se conoce con precisión su mecanismo. Durante el proceso de conversión del endosoma tardío en lisosoma algunas proteínas específicas de la membrana del endosoma se pierden y se acidifica más su contenido.



**Figura 4.8. Cuatro fuentes de sustancias destinadas a la digestión lisosomal.**

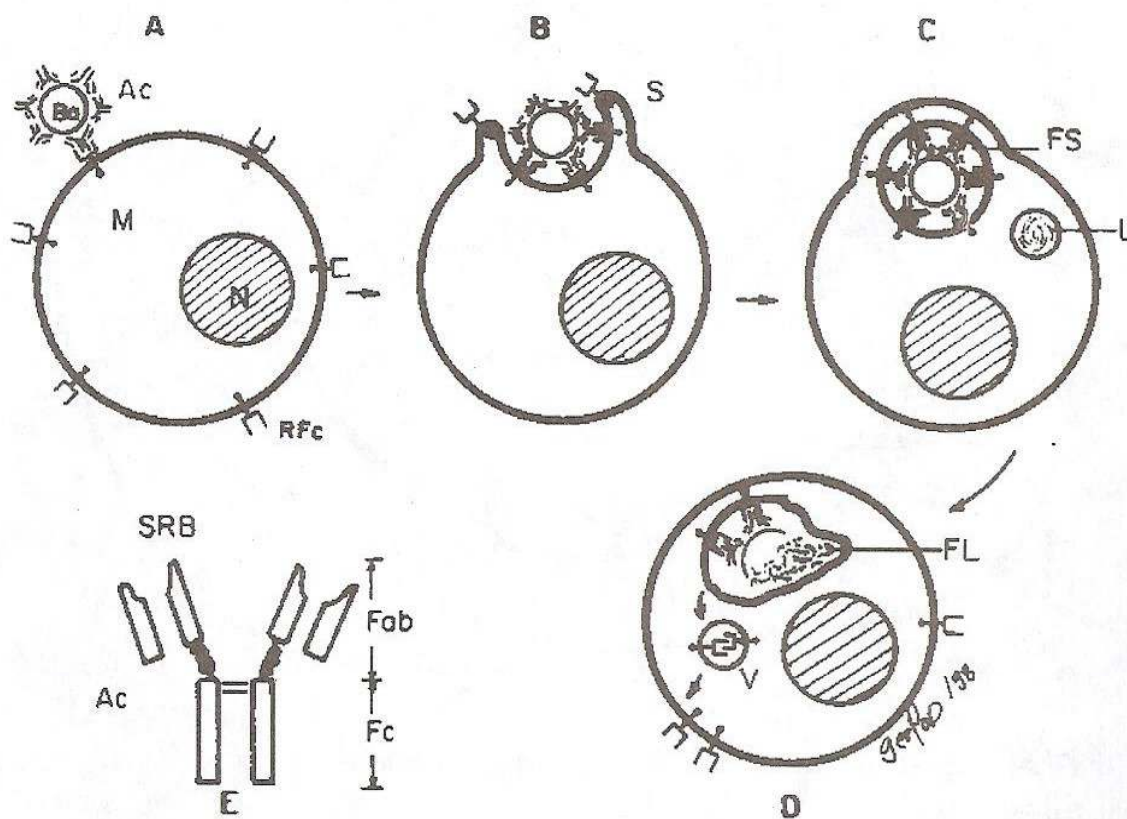
1. Endocitosis. 2. Fagocitosis. 3. Autofagia. 4. Proteínas citosólicas.

MP: membrana plasmática; VE: vesícula de endocitosis; ETe: endosoma temprano; ETa: endosoma tardío; L: lisosoma; VF: vesícula de fagocitosis en formación; FS: fagosoma; OA: organelo para la autofagia; RER: retículo endoplásmico rugoso; Mit: mitocondria; AF: autofagosoma.

La **segunda** fuente que provee sustancias a los lisosomas para la degradación es la de **fagocitosis** (Fig. 4.8 2). La fagocitosis es un proceso de endocitosis de partículas grandes o de microorganismos que ocurre principalmente en las células especializadas como los macrófagos y polimorfonucleares neutrófilos en vertebrados. Estas células especializadas cubren con pseudópodos los partículas grandes o microorganismos y forman un fagosoma (Fig. 4.8 FS) o macrovesícula de endocitosis que se fusiona con un lisosoma para formar un fagolisosoma donde se realiza la digestión.

Antes de utilizar el nombre genérico de endocitosis para la interiorización de material extracelular, se conocía el nombre fagocitosis. La fagocitosis significa que la célula come. La función principal de la fagocitosis es la defensa de nuestro cuer-

po contra los microorganismos (Fig. 4.9). El proceso de fagocitosis sirve también de alimento en los protozoarios. Los macrófagos juegan también un papel importante en la homeostasis de los tejidos, ellos destruyen las células senescentes, dañadas o restos de células del propio organismo. Los macrófagos fagocitan más de  $10^{11}$  glóbulos rojos senescentes por día en cada uno de nosotros.



**Figura 4.9. Fagocitosis de una bacteria cubierta por anticuerpos por un macrófago.**

- A. Reconocimiento de la bacteria por el receptor Fc del macrófago.
- B. Formación del pseudópodo del macrófago que recubre la bacteria.
- C. Formación del fagosoma.
- D. Fusión del fagosoma con un lisosoma formando el fagolisosoma.
- E. Estructura de un anticuerpo.

Ba: bacteria; Ac: anticuerpo; M: Macrófago; N: núcleo; RfC: receptor del macrófago para la región Fc de un anticuerpo; S: pseudópodo; FS fagosoma; L: lisosoma; FL: fagolisosoma; V: vesícula que recicla los receptores Fc; Fc y Fab: las dos regiones de un anticuerpo; SRB: sitio de reconocimiento de la bacteria por el anticuerpo.

Los macrófagos son capaces de formar vesículas de fagocitosis mucho más grandes (250 nm de diámetro o más) que las de endocitosis. Este proceso no es una simple invaginación, sino que la célula forma evaginaciones denominadas pseudópodos (Fig. 4.9 B S). La evaginación de la membrana plasmática entre los pseudópodos termina cubriendo toda la célula que se interioriza formando final-



mente una vesícula de endocitosis denominada **fagosoma** (Fig. 4.9 C FS). Cuando el fagosoma se fusiona con un lisosoma se llama **fagolisosoma** (Fig. 4.9 D FL). El material ingerido se degrada, pero las sustancias que no se digieren se quedan en el lisosoma formando los cuerpos residuales. Algunos componentes de la membrana plasmática del fagosoma, como los receptores o anticuerpos, son reciclados, es decir que son transportados de nuevo a la membrana plasmática por las vesículas de transporte (Fig. 4.9 D V). En la mayoría de las células (macrófagos, polimorfonucleares neutrófilos, protozoarios) que realizan fagocitosis existe una selectividad como en la endocitosis específica: la célula reconoce gracias a sus receptores específicos, por ejemplo a una bacteria antes de interiorizarla. La fagocitosis es un proceso activado por receptores específicos que transmiten señales dentro de la célula fagocitaría. Cuando un microorganismo (Fig. 4.9 A Ba) está cubierto por anticuerpos (Fig. 4.9 A Ac), proceso denominado opsonización, la región Fc de estos anticuerpos es reconocida por los receptores Fc de los macrófagos (Fig. 4.9 A RFc) o de los neutrófilos. Este reconocimiento inicia el proceso de fagocitosis.

Otro término utilizado para los procesos de endocitosis es la **pinocitosis** que significa la célula bebe. La pinocitosis implica la formación de vesículas pequeñas (150 nm o menos) que contienen únicamente líquido, lo que equivaldría a una endocitosis fluida. Este proceso se describió inicialmente en las células endoteliales de los capilares, pero se encontró posteriormente en todas las células. Algunos autores siguen utilizando como sinónimos pinocitosis y endocitosis. Se denomina también **macroendocitosis** a la fagocitosis por formar grandes vesículas, y **microendocitosis** a la endocitosis por formar pequeñas vesículas.

La **tercera** fuente que provee materiales a los lisosomas para la degradación es la utilizada por todas las células para eliminar partes obsoletas de ella, un proceso llamado **autofagia** (Fig. 4.8 3), mientras que la digestión de sustancias que entran por endocitosis y fagocitosis se denomina **heterofagia**.

La imagen de un hepatocito normal al ME muestra lisosomas conteniendo mitocondrias y otros organelos. El proceso parece empezar con el aislamiento de un organelo por membranas derivadas de RE creando un autofagosoma o “vacuola de autofagia” (Fig. 4.8 AF), que se fusiona enseguida con un endosoma tardío o con un lisosoma. El proceso es altamente regulado, y los componentes celulares seleccionados deben ser marcados de alguna manera para ser destruidos durante la renovación de los componentes celulares. Por ejemplo, la vida media de una mitocondria en los hepatocitos es del orden de 10 días.

No se conoce con precisión el mecanismo de la formación del autofagosoma. Dos hipótesis existen: la primera es que la membrana de la vacuola de autofagia es aportada por un lisosoma, que se deformaría para rodear la zona destinada a ser

degrada. La coalescencia de las hemicapas citoplásmicas aislaría el contenido del citosol en esta zona por una membrana. La segunda hipótesis dice que la envoltura se forma a partir de elementos del retículo endoplásmico. En los dos casos, el autofagosoma tiene inicialmente una doble membrana y la interna es eliminada rápidamente. Una vez aislado el contenido autofágico del citosol es degradado por las enzimas lisosomiales.

La autofagia ha sido observada en muchos tipos celulares y en condiciones muy diversas: en las células en vía de diferenciación, en las células de órganos en vía de atrofia, en el tejido adiposo durante la exposición al frío y durante una dieta hipocalórica, etc. La autofagia y la heterofagia no son procesos separados, se puede observar a veces lisosomas que contienen al mismo tiempo elementos de origen heterofágico y constituyentes autofágicos en vía de digestión.

**La cuarta** fuente por la cual llega material a los lisosomas, es el caso de algunas proteínas citosólicas que son transportadas directamente a los lisosomas para su degradación. Las proteínas citosólicas destinadas a la digestión lisosomal que no son transportadas por vesículas son una excepción a la entrada de moléculas en los lisosomas. Algunas proteínas citosólicas contienen una señal en su superficie, llamada secuencias KFERQ, denominada así por su secuencia de aminoácidos (K: lisina, F: fenilalanina, E: glutamato, R: arginina y Q: glutamina), que son digeridas por lisosomas. Esta secuencia sería la señal de «direccionamiento» (*sorting*) de proteínas citosólicas para ser degradadas en los lisosomas. No se conoce aun el mecanismo de entrada en los lisosomas.

Existen mecanismos no convencionales utilizados por algunas proteínas para atravesar las membranas. Por ejemplo, el FGF básico y la interleuquina-1 son secretadas por las células sin utilizar las vesículas de exocitosis. En las levaduras, una ferhormona, el factor-a, es transportado directamente a través de su membrana por una bomba ATPásica conductora de péptidos. Es posible que bombas similares provean sistemas “privados” de transporte, cada cual se especializaría para transferir una pequeña gama de proteínas específicas a través de una membrana particular. Las proteínas citosólicas con la señal KFERQ podrían atravesar la membrana lisosomal utilizando también un mecanismo no convencional de transporte.

Hay que mencionar que se ha encontrado una degradación de proteínas también a nivel del citosol. El mecanismo molecular no se conoce con exactitud, pero se ha descrito que la proteína que va a ser degradada en el citosol tiene una señal amino terminal para un conjunto de proteínas denominado complejo de ubiquitinas. La unión de la señal de una proteína con el complejo de ubiquitinas desencadena su degradación en el citosol. Pero, no se conoce los mecanismos de decisión del momento de degradación de las proteínas citosólicas.

### 4.3. PASAJE TRANSCELULAR

Algunas vesículas de endocitos no terminan fusionándose con un organelo con membrana. En las células epiteliales, fibroblastos y otras células se ha observado el paso de las vesículas de endocitosis a través de la célula de un lado a otro. Este paso directo, observado primero en las células tiroides, se denominó transcitosis. La transcitosis puede ser de dos tipos: inespecífica y específica.

#### 4.3.1. Transcitosis inespecífica

El resultado de la transcitosis inespecífica es la transferencia en masa de sustancias del medio extracelular de un lado al otro de la célula. Su mejor ejemplo se encuentra en las células endoteliales de los capilares donde se denominó diacitosis o pinocitosis. El proceso de transcitosis es un acoplamiento directo entre el proceso de endocitosis y el proceso inverso, la exocitosis. Las células endoteliales tienen un pequeño espesor ( $< 1 \mu\text{m}$ ), salvo en la región nuclear, donde el núcleo y los organelos agrupados hacen una protrusión a la luz del capilar. En la región más delgada se observan muchas vesículas esféricas de un diámetro de 0,05 a 0,1  $\mu\text{m}$ . Sobre todo a nivel de la microcirculación (arteriolas, capilares y vénulas), estas vesículas son responsables de la mayoría de los intercambios entre el plasma y el líquido intersticial de los tejidos. Las vesículas se forman a nivel en un lado del endotelio por endocitosis, atraviesan la célula endotelial y rápidamente sufren el fenómeno de exocitosis en el otro lado de la célula. La transferencia de proteínas de un lado del endotelio al otro toma entre medio y algunos minutos. La transferencia se hace en las dos direcciones: de la luz de capilar al espacio pericapilar y viceversa.

Los lisosomas de las células endoteliales son poco numerosos y están agrupados en la región perinuclear. Comparado a la intensidad del fenómeno de transcitosis, la fusión de vesículas de endocitosis con los lisosomas es un fenómeno totalmente menor en las células endoteliales.

Con menos frecuencia, las vesículas pueden ser el origen de “canales” transitorios que atraviesan la célula endotelial y resulta de la coalescencia de una cadena de vesículas que fusionan sus membranas, esto se presenta rara vez y fue el origen de un concepto errado que consideró que existían canales permanentes a través de estas células.

La transcitosis inespecífica se presenta también en las células cúbicas como las tiroides y en las cilíndricas como las del intestino.

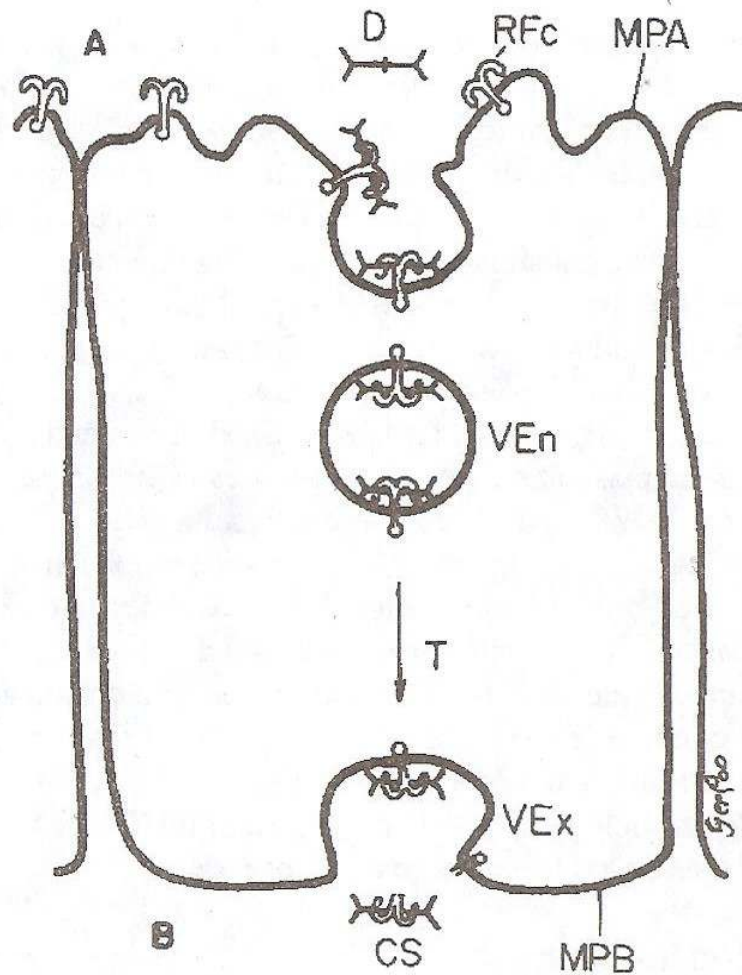
### 4.3.2. Transcitosis específica

En la transcitosis específica, las moléculas extracelulares a transitar son reconocidas por receptores específicos antes de su endocitosis. Las inmunoglobulinas A (IgA) secretadas por los plasmocitos en el medio intersticial atraviesan los epitelios de revestimiento de los bronquios, del intestino, y de los hepatocitos por transcitosis de manera específica. Hay que recordar que las IgA constituyen una de las defensas inmunológicas de las superficies mucosas del organismo y se encuentran dentro del *mucus* que los recubre.

Las células epiteliales captan las moléculas de IgA secretadas en el tejido subyacente por la endocitosis específica. La vesícula de endocitosis atraviesa rápidamente la célula epitelial y su contenido es expulsado por exocitosis en el lado de la luz del epitelio. Los receptores Fc de transferencia reconocen los dímeros de IgA antes de la endocitosis por la célula epitelial (Fig. 4.10). El complejo receptor Fc-IgA es endocitado específicamente de un lado de la célula, la atraviesa dentro de la vesícula y es exocitado por el otro lado de la célula. Una parte del receptor se secreta también unida al dímero IgA en una forma de complejo (Fig. 4.10 CS). Un mecanismo similar ha sido descrito para la transferencia de las IgG maternas a través de la placenta hacia el feto.

De otra parte, un recién nacido obtiene también anticuerpos en la leche materna por su transporte a través del epitelio de su intestino. Los anticuerpos de la leche materna son endocitados mediada por receptores en la superficie apical de las células del epitelio de revestimiento del intestino del bebé, y exocitados en el dominio basolateral de la misma célula, o sea en el espacio intersticial. El anticuerpo se disocia de su receptor en este medio por diferencia de pH comparado con la luz del intestino, y eventualmente entra en la circulación sanguínea del recién nacido. La secreción de esos anticuerpos dentro de la leche materna ocurre también por transcitosis, pero en la dirección opuesta, de la circulación sanguínea a la leche en la glándula mamaria.

La variedad de vías que los diferentes receptores siguen a partir de endosomas implica que, adicionalmente a su sitio de unión para sus ligandos y sitios de unión en las fosillas tapizadas, la mayoría de los receptores poseen también otras señales de "direccionamiento" que guían los receptores hacia vesículas de transportes apropiadas y hacia un dominio determinado de la membrana celular (Ver 4.4.2).



**Figura 4.10. Transcitosis específica de las IgA a través de una célula epitelial.**

A: medio extracelular del polo A de la célula; B: medio extracelular del polo B de la célula; D: dímero de IgA; RFc: receptor de membrana plasmática de los dominios Fc del dímero IgA; MPA: membrana plasmática del polo A; VEn: vesícula de endocitosis; T: transcitosis específica; VEx: vesícula de exocitosis; CS: complejo IgA secretado; MPB: membrana plasmática del polo B.

#### 4.4. FISIOLÓGÍA DE LA ENDOCITOSIS

##### 4.4.1. Equilibrio de volúmenes y de membranas

Todas las células eucarióticas interiorizan continuamente una parte de su membrana plasmática en forma de vesículas de endocitosis que más tarde vuelven a la superficie celular. El volumen del líquido y la cantidad de membrana plasmática interiorizada durante la endocitosis son importantes en la escala celular. La tasa de interiorización de la membrana plasmática en este proceso de endocitosis varía de un tipo de célula a otro, pero es generalmente muy alta. Por ejemplo, un macrófago ingiere 25% de su volumen líquido cada hora. Esto significa que él debe interiorizar

3% de su membrana cada minuto, o sea 100% en media hora. Las células no especializadas en la fagocitosis, como los fibroblastos, interiorizan 3% de su volumen por hora y el equivalente de la mitad de su membrana plasmática.

Las células son capaces de mantener una actividad endocitaria importante durante largos tiempos (varias horas). Existen mecanismos de compensación de su "pérdida" de membrana plasmática: ante todo, hay una reducción rápida e importante del volumen interiorizado que se realiza por una concentración del contenido de las vesículas de endocitosis, aparentemente por una expulsión de agua por las vesículas. Esta disminución de volumen de las vesículas facilita el reciclaje de sus membranas hacia la membrana plasmática. Existe también la posibilidad de la síntesis de membrana plasmática, pero es un proceso demasiado lento para compensar la reducción de la superficie celular que resulta de la endocitosis. Hay que resaltar que la recuperación de membranas interviene probablemente en todos los niveles de estructuras endocitarias. Como el área de superficie celular y el volumen celular se mantiene en un equilibrio constante durante este proceso, es claro que, al mismo tiempo la membrana y su volumen endocitado son adicionados por las vesículas de exocitosis para mantener este equilibrio. En este sentido, la endocitosis y la exocitosis son procesos ligados que se pueden considerar como constituyentes de un ciclo endocitosis-exocitosis, efectivamente si se inhibe la endocitosis también se para la exocitosis y viceversa.

#### **4.4.2. Selección intracelular**

Una parte al menos de los constituyentes asociados a la membrana de las vesículas de endocitosis son reciclados hacia la periferia celular, entonces una selección debe intervenir para separar los elementos de la membrana que son recuperados de los que no lo son. Para este primer tipo de selección, inherente al camino intracelular de las estructuras endocitarias, el ejemplo más ilustrativo es aquel de los complejos receptor-ligando, donde la separación entre el receptor, que es reutilizado, y el ligando, que es digerido, resulta de la acidificación de la estructura endocitaria. Entre otros, todas las macromoléculas que son captadas por endocitosis no tienen el mismo destino al interior de la célula; eso implica la existencia de una selección de ligandos interiorizados con sus receptores.

La selección de los ligandos ha sido estudiada, en los roedores siguiendo el devenir de las IgA y de las proteínas que exponen un radical galactosil, endocitadas simultáneamente por los hepatocitos. Estas células poseen receptores distintos para esos dos tipos de ligandos. La selección de los ligandos se realiza en este caso por la unión covalente que establece la IgA y su receptor, mientras que la unión de las proteínas con un radical galactosil a sus receptores no es covalente. En efecto, los dos tipos de ligandos penetran juntos en el seno de la misma vesícula y es dentro de una estructura de compartimento endocitario que la acidificación provoca la separación de las proteínas con un radical galactosil, mientras que es sin

efecto sobre la unión de la IgA a su receptor. Gracias a este mecanismo diferencial de separación las IgA y las proteínas con un radical galactosil se ubican en vesículas diferentes y se dirigen a destinos diferentes. Las vesículas que contienen únicamente las IgA se transportan hacia los canalículos biliares donde son exocitados (transcitosis específica), mientras que las vesículas con las proteínas que contienen un radical galactosil se orientan hacia los lisosomas o el complejo de Golgi.

#### **4.4.3. Funciones de la endocitosis y de la autofagia**

El significado inicial del proceso heterofágico, tal como se encuentra en los organismos unicelulares, es un mecanismo de nutrición de la célula con macromoléculas del medio exterior. En los organismos multicelulares, un aparato digestivo especializado provee a las células los compuestos nutritivos bajo la forma de sustancias de bajo peso molecular de fácil difusión. En organismos multicelulares aparecen otras funciones, una de las más importantes es la defensa contra las infecciones por el proceso de fagocitosis efectuado por las células especializadas. Otra función se encuentra unida a las propiedades de la superficie de la célula y a la captura de moléculas de señal; ella lleva a la interiorización del complejo mediador-receptor. En principio, la interiorización del complejo mediador-receptor puede tener tres funciones. Ante todo, puede ser un mecanismo necesario a la expresión completa de los efectos biológicos del mediador o a su supresión. Puede acompañarse eventualmente de la modificación de los mediadores peptídicos, permitiendo su degradación en los lisosomas. Finalmente, puede modular el número de receptores en la superficie de la célula (regulación río abajo de los receptores).

El significado original de la autofagia es probablemente igual al mecanismo de supervivencia para la célula: privado de alimentos, ésta se alimenta de una parte de su propia sustancia. Esta función persiste todavía en los unicelulares. En los organismos superiores, las grandes variedades de tratamientos que inducen la estimulación de la autofagia sugiere que ella representa para la célula una defensa de carácter bastante general, contra variadas agresiones metabólicas. Efectivamente, la autofagia elimina macromoléculas citoplásmicas u organelos obsoletos o dañados, y permite indirectamente su reemplazo por estructuras recientemente sintetizadas. La autofagia interviene igualmente en los procesos de modelaje que acompaña la diferenciación celular en el adulto o durante el desarrollo embrionario.

En los organismos unicelulares, las vesículas de endocitosis se fusionan con lisosomas y la degradación de su contenido permite su alimentación. Mientras que en organismos multicelulares el proceso de endocitosis interviene en varias funciones celulares:

1. Captación de moléculas particulares demasiado voluminosas para atravesar la membrana plasmática.
2. Destrucción de organismos extraños, restos tisulares y células muertas.
3. Eliminación de macromoléculas de los espacios extracelulares, como parte de los procesos que controlan la composición del medio extracelular.
4. Controla la composición de la membrana plasmática por supresión selectiva de moléculas específicas, como receptores.
5. Supresión de ligandos a nivel de la superficie celular participando en la adaptación de la célula diana a los mediadores químicos.
6. Transcitosis que permite a moléculas específicas atravesar las células enteras.
7. La endocitosis y la exocitosis intervienen en la restauración de la superficie de la membrana plasmática, reciclaje de membranas y mantenimiento del volumen constante de membranas. La endocitosis hace interiorizar una parte de la membrana plasmática y la exocitosis reintegra membrana por medio de la membrana de las vesículas que vienen de los organelos celulares.

## **4.5. LISOSOMOTROPISMO**

### **4.5.1. Substancias difundibles**

Las moléculas que difunden por las membranas biológicas y con la característica química de ser bases débiles pueden acumularse dentro de los lisosomas, debido a su medio ácido (pH 4 a 5) que los ioniza y ya no pueden difundir en sentido contrario. La concentración intralisosomial de estas substancias, como la cloroquina antimalárica puede ser 1.000 a 10.000 veces más que la del medio extracelular. Por estas concentraciones tan altas, el tamaño de los lisosomas aumenta por el fenómeno de ósmosis, y lo que se observa a veces en MO como una vacuolización de las células. La energía necesaria para la concentración de la substancia es generada por la hidrólisis del ATP a nivel de la bomba de protones de la membrana lisosomal, responsable también de su acidificación. Como la acidificación es la base de la acumulación, lo mismo puede producirse dentro de estructuras cuyo contenido se acidifica.

### **4.5.2. Vectores macromoleculares**

Se puede aprovechar el proceso de endocitosis y el sistema lisosomal para fines terapéuticos, utilizando substancias farmacológicas acopladas de manera covalente o no, a las macromoléculas o partículas, que juegan el papel de vectores. Se formarían complejos dirigidos hacia los lisosomas o complejos lisosomotropos. Substancias con principio activo que entran a la célula por difusión a través de la membrana plasmática lo pueden hacer por endocitosis cuando son puestas bajo la



forma de complejos lisosomotropos. Si el vector y el tipo de unión entre el vector y la sustancia activa son escogidos correctamente, las hidrolasas lisosomiales van a digerir el vector y liberar la sustancia activa. Esta última podría entonces difundir a través de la membrana de lisosomas y ejercer su acción.

El acoplamiento de una sustancia farmacológica a una macromolécula como vector tiene como objetivo disminuir la toxicidad para el organismo, porque la sustancia no se encontraría bajo su forma libre en cantidad importante en todas las células, sino solamente dentro de las células que la endociten. Además, la sustancia tendría una acción prolongada debido a su eliminación más lenta por el organismo. La utilización de macromoléculas como vectores es una rica promesa, sobre todo, por la posibilidad que ofrece para obtener una selectividad para ciertas células. Si, por ejemplo, una célula diana (célula tumoral, parásito patógeno) que posea receptores más abundantes que las células que deben ser protegidas, se puede acoplar un vector a una sustancia farmacológica que será reconocida por estos receptores para influir selectivamente las células diana.

La utilización de anticuerpos monoclonales como vector macromolecular dirigido contra un tipo celular constituye otra posibilidad de encontrar la selectividad.

## **4.6. PATOLOGÍA**

### **4.6.1. Células y agentes infecciosos**

Una de las funciones más importantes de la endocitosis en los organismos multicelulares es la defensa contra las infecciones. Como ya se mencionó, esta función es principalmente asumida por dos tipos de células especializadas: los polimorfonucleares neutrófilos y los macrófagos. Las granulaciones de los polimorfonucleares neutrófilos son lisosomas que, entre otras, contienen hidrolasas ácidas, colagenasa, sustancias bactericidas y lisosima, enzima capaz de degradar la pared bacteriana. Estos lisosomas tienen la característica de ser lisosomas primarios porque la célula no participa sino una sola vez en el curso de su existencia en el proceso de fagocitosis. La observación en cultivo muestra que estas células presentan el fenómeno de quimio-tactismo hacia las bacterias. Durante la fagocitosis la bacteria se encuentra en una vesícula de endocitosis (fagosoma) en 1 o 2 minutos. Aun antes que la vesícula de fagocitosis sea cerrada completamente, el citoplasma del polimorfonuclear neutrófilo comienza a perder sus granulaciones. Las granulaciones se adhieren a la vesícula en formación y desaparecen bruscamente. Al ME se observa que la desaparición de los gránulos resulta de la fusión de sus membranas con la vesícula de fagocitosis; el contenido de los gránulos se mezclan así con el de la vesícula y comienza la digestión de la bacteria. El citoplasma de los polimorfonucleares neutrófilos sufre una degranulación completa y la célula no

es capaz de elaborar nuevos gránulos. La muerte celular ocurre poco tiempo después de la desgranulación y el polimorfonuclear neutrófilo se volverá, él mismo, blanco de un macrófago o hará parte del pus en el lugar de la inflamación.

Muchas bacterias patógenas están rodeadas de una estructura como una caparazón que inhibe su digestión, mientras que cepas del mismo tipo de bacterias que no tienen esta estructura no son patógenas, porque son fácilmente digeridas por los macrófagos o los polimorfonucleares neutrófilos. Este caparazón es una pared celular compuesta por glicoproteínas, proteoglicanos y glicosaminoglicanos muy complejos y muy ricos en azúcares.

De otra parte, el organismo responde a una infección por bacterias patógenas, entre otras, produciendo anticuerpos. Los anticuerpos pertenecientes a las IgG (Fig. 4.9 E) estimulan directamente la fagocitosis de bacterias por estas células especializadas, porque las IgG rodean la bacteria, fenómeno denominado opsonización de bacterias (Fig. 4.9 A), y facilitan la interacción con los receptores de los macrófagos.

En la mayoría de las infecciones bacterianas, las bacterias proliferan en el medio extracelular, mientras que la multiplicación de los virus exige la penetración intracelular. Algunos virus se unen a proteínas específicas de la membrana que les sirve como receptores. La adsorción es inicialmente reversible y puede hacerse a temperaturas bajas; después de un cierto tiempo se vuelve irreversible. Existen otros modos de penetración de virus en las células. El mejor conocido es el del virus con envoltura fosfolipídica que se fusiona con la membrana plasmática. Esta fusión traduce la familiaridad de dos tipos de membranas, pues la envoltura de un virus se deriva de la membrana plasmática de la célula infectada (Fig. 5.20). Después de la fusión, el material genético viral se transfiere al citosol, donde puede penetrar al núcleo por uno de los complejos de poro nuclear de la envoltura nuclear.

Una segunda modalidad de penetración de virus con envoltura implica su captura por endocitosis, a veces llamado viropexia. Dentro del compartimento endocitario, la acidificación facilita la coalescencia de capas exoplásmicas de membranas y la fusión de la envoltura viral con la de la estructura endocitaria o de los lisosomas. No se conoce el mecanismo del transporte al núcleo del ácido nucleico viral en esta modalidad de penetración del virus. Es posible que la digestión de ciertos componentes virales por los lisosomas sea necesaria y que la acidificación sea igualmente un elemento que favorezca su traspaso de la membrana lisosomal.

En los casos de virus sin envoltura, el modo de penetración del virus implica el traspaso del genoma viral a través de la membrana. El mecanismo de su traspaso es desconocido.

#### 4.6.2. Mecanismos de evasión de la defensa endocitaria

Como ya se mencionó, en la mayoría de las infecciones bacterianas de nuestro organismo, la multiplicación de bacterias ocurre en el exterior de las células y la fagocitosis elimina la bacteria. Existen sin embargo excepciones como algunas bacterias, ciertos protozoarios, y los virus, se multiplican al interior de las células. Todos estos agentes evitan la defensa endocitaria de diversas maneras:

1. En un primer caso, la adsorción de la partícula infecciosa sobre la membrana plasmática del polimorfonuclear neutrófilo o del macrófago no se hace. Los neumococos constituyen un ejemplo de agentes infecciosos no adsorbidos, gracias a la pared que los rodea.
2. Se conocen casos donde la adsorción del microorganismo se realiza, pero la formación de la vesícula de endocitosis es inhibida. Ciertos micoplasmas (*Mycoplasma pneumoniae*) escapan a la endocitosis de esta manera.
3. La fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática es otra forma de penetración intracelular que evita la vía heterofágica.
4. En ciertos casos, el agente infeccioso evita las hidrolasas lisosomiales inhibiendo la fusión del fagosoma que lo contiene con el lisosoma; él se multiplica entonces en el seno de los fagosomas. Es el caso del bacilo de la tuberculosis, de algunas rickettsias y de ciertos toxoplasmas (*Toxoplasma gondii*).
5. Finalmente ciertas bacterias (bacilo de la lepra) y ciertos protozoarios patógenos (leishmania) resisten a las hidrolasas lisosomiales. De otra parte, los virus del grupo reovirus deben aparentemente sufrir una digestión inicial de sus proteínas para que el ácido nucleico se vuelva infectante y pueda pasar al citosol.

#### 4.6.3. Sobrecargas lisosomiales

Si se inyecta a un animal una macromolécula que puede ser degradada por las hidrolasas lisosomiales, por ejemplo, un polímero sintético como el Tritón WR-1339, provoca una sobrecarga en los lisosomas de las células en los órganos que tienen una actividad endocitaria importante como el hígado y los riñones. En estos casos, los lisosomas aumentan de volumen y se transforman en grandes vesículas.

Existen enfermedades lisosomiales congénitas, aunque sean poco frecuentes. En estos casos hay una pérdida de la actividad de una de las enzimas lisosomiales que induce la acumulación intralisosomial del sustrato de esta enzima. El volumen total ocupado por los lisosomas en una célula puede pasar del 1% a más del 20%, lo que puede impedir a las estructuras celulares cumplir sus funciones normalmente.

La autofagia y/o la heterofagia pueden ser la base de la acumulación que se observa en las enfermedades lisosomiales. En el caso de la glicogenosis tipo II, el

glicógeno no puede ser degradado por las enzimas lisosomiales debido a la ausencia de una  $\alpha$ -glucosidasa ácida. Como el glicógeno no existe en el medio extracelular, es la autofagia que es responsable de su acumulación. Mientras que en los casos de mucopolisacaridosis, los glicosaminoglicanos que se acumulan dentro de los lisosomas vienen del medio extracelular por heterofagia.

Además de las enfermedades hereditarias lisosomiales, existen sobrecargas inducidas. Éstas pueden resultar de la acumulación de sustancias indigestas, como por ejemplo, la polivinilpirrolidona utilizada como agente que retarda la difusión de sustancias farmacológicas inyectadas. Hay sobrecargas que son secundarias a la concentración en los lisosomas de sustancias que inhiben la acción de las hidrolasas lisosomiales, como los antibióticos del grupo de los aminoglicosidos.

#### **4.6.4. Receptores de las partículas LDL**

El receptor de las partículas LDL es una glicoproteína de 160.000 daltons, contiene 839 aminoácidos (Ver 4.1.4). La importancia de los receptores de las partículas LDL en el humano se revela por la patología provocada por ellos. Se trata de diversas formas de hipercolesterolemia familiar, enfermedad genética que afecta alrededor de un individuo sobre 500 y es caracterizada por niveles de colesterol plasmático demasiado altos. En los heterocigotos, las células producen la mitad de los receptores de LDL bajo una forma funcional. Los niveles de LDL en el plasma es 2 a 3 veces más alto que en los individuos normales. La existencia de niveles altos de colesterol en el plasma de estos individuos desde el nacimiento induce una sintomatología ligada a la arteriosclerosis a partir de los 40 o 50 años. En los homocigotos, que son portadores de una mutación del gen de los receptores de LDL sobre los dos cromosomas, presentan pocos receptores funcionales o ninguno. Los niveles de LDL plasmático son 6 a 8 veces más altos que lo normal. La arteriosclerosis de las arterias coronarias provoca infarto del miocardio hacia los 20 años en estos pacientes.

Se identificaron 3 mutaciones del gen de los receptores de las partículas LDL. La más frecuente, sintetiza un receptor no funcional, es decir que él no puede fijar la partícula de LDL. El segundo tipo de mutación genera un receptor cuya afinidad por las partículas de LDL es 10 a 100 veces menor que su forma normal. El tercer tipo de mutación genera receptores con afinidad normal, pero no se reúnen en las fosillas tapizadas para su endocitosis. En este último caso, la mutación tiene como efecto eliminar la secuencia transmembranosa y el dominio carboxi terminal citosólico del receptor. Ese receptor acortado es secretado y se encuentra en el medio extracelular, pero una pequeña fracción se adsorbe en la superficie celular y puede asociarse con las partículas LDL, sin poder concentrarse de todos modos a nivel de las fosillas tapizadas, por lo tanto no son endocitados normalmente.

#### 4.6.5. Liberación de hidrolasas lisosomiales

Como se verá en el siguiente capítulo, las enzimas de los lisosomas son a veces secretadas en el medio extracelular de manera controlada en circunstancias fisiológicas. Pero existen patologías como la gota, la silicosis o el asbestosis, donde la membrana de los lisosomas se alteran por estos cristales indigestibles y sus enzimas salen y digieren los componentes celulares y matan a las células, provocando así inflamaciones crónicas.

Las enzimas de los lisosomas pueden también ser liberadas en el medio extracelular y atacar a los elementos de la matriz extracelular. Eso puede ocurrir cuando la célula tiende a ingerir partículas demasiado voluminosas, tales como los agregados de complejos antígeno-anticuerpo o una estructura plana tal como la matriz del tejido óseo normal o la membrana basal opsonizada accidentalmente por autoanticuerpos en casos de enfermedades autoinmunes. En estos casos, las invaginaciones que resultan de la endocitosis reciben el aporte de hidrolasas ácidas de los lisosomas, mientras que ellas son todavía totalmente abiertas hacia el medio extracelular. Las hidrolasas lisosomiales pueden así salir al exterior de la célula. Lesiones de la matriz extracelular resultantes de tal mecanismo se observan en la artritis reumatisal y en varias otras enfermedades autoinmunitarias. Este mismo mecanismo ocurre dentro de la acción fisiológica de las osteoclastos (los macrófagos especiales del tejido óseo) para disolver los cristales de hidroxia-patita y digerir la matriz del hueso para su remodelaje continuo.

#### 4.7. BIBLIOGRAFÍA

- Brown, M. & J. Goldstein. *Les récepteurs des LDL, le cholestérol et l'athérosclérose*. Pour la Science, (1): 62 - 71, 1985.
- Courtoy, P.J. *Receptor-mediated endocytosis in rat hepatocytes with special reference to the pathways of polymeric IgA and galactose-exposing proteins*. Thèse du grade d'Agrégé de l'Enseignement Supérieur. Université Catholique de Luovain, Faculté de Médecine, Laboratoire de Chimie Physiologique and International Institute of Cellular and Molecular Pathology, 1984.
- Dubois, B., M. Couvreur, M-F. van den Hove, C. Spinel & J-F. Deneff. *Thyroglobulin (Tg) hydrolysis start in prelisosomes*. En: Progress in Thyroids Research. Ed. Gordon A., J. Gross & G. Hennemann, Rotterdam, 1991.
- Herzog, V. *Transcytosis in thyroid follicle cells*. J. Cell Biol., 97: 607 - 617, 1983.
- Näthke, I., J. Heuser, A. Lupas, J. Stock, Ch. Turck & F.M. Brodsky. *Folding and trimerization of clathrin subunits at the triskelion hub*. Cell, 68: 899 - 910, 1992.
- Pastan, I. & M.C. Willingham. *Endocytosis*. Plenum Press, New York, 1985.
- Rothman, J.E. & L. Orci. *Budding vesicles in living cells*. Sci. Ame., Marzo, 50 - 55, 1996.

Sztul, E., A. Kaplin, L. Saucan & G. Palade. *Protein traffic between distinct plasma membrane domains: isolation and characterization of vesicular carriers involved in transcytosis*. Cell, 64: 81 - 89, 1991.

Theriot, J.A. *The cell biology of infection by intracellular bacterial pathogens*. Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 11: 213 - 239, 1995.

Trowbridge, I.S., J.F. Collawn & C.R. Hopkins. *Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway*. Annu. Rev. Cell Biol., 9: 129 - 161, 1993.