

UNIVERSIDAD DE CONCEPCION



**EXPRESION POLARIZADA DE TRANSPORTADORES DE
GLUCOSA Y VITAMINA C EN CELULAS INMORTALIZADAS DE
MICROVASCULATURA CEREBRAL HUMANA.**

Tesis doctoral presentada a la Escuela de Graduados de la Universidad de Concepción
como parte de los requisitos para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, área

Biología Celular y Molecular

Catherine Goretti Guzmán Sepúlveda

2004

RESUMEN

Hemos utilizado cultivos *in vitro* de células endoteliales inmortalizadas de cerebro humano (HBMEC y HCEC) y astrocitos humanos inmortalizados (FHAS) para obtener información acerca del mecanismo involucrado en el transporte de glucosa y vitamina C a través de la barrera hematoencefálica. Encontramos que las células endoteliales, HBMEC y HCEC, creciendo en monocapas simples, expresan al menos tres componentes funcionales distintos involucrados en el transporte de hexosas: dos componentes de alta afinidad para el transporte de 2-desoxi-D-glucosa con K_m aparentes entre 1-4 mM y un transportador de baja afinidad con una K_m aparente > 15 mM. Junto con estos resultados, el análisis de la cinética de inhibición del transporte de 2-desoxi-D-glucosa por genisteína mostró la presencia de dos componentes cinéticos con diferentes sensibilidades por el inhibidor. De la misma forma, el análisis del transporte de 3-O-metil-D-glucosa, α -metil-D-glucósido y el efecto de los inhibidores florizina, floretina y citocalasina B indicaron que los transportadores expresados por las líneas celulares de endotelio cerebral son de tipo facilitativo (GLUTs) y se descartaron la presencia de cotransportadores sodio-glucosa SGLT. A la vez, los datos del análisis por RT-PCR revelaron la expresión de ARN mensajeros para GLUT1, GLUT4, GLUT6, GLUT8, GLUT10, GLUT11 y GLUT12, mientras que los análisis inmunocitoquímicos mostraron solo la expresión de GLUT1, GLUT8 y muy bajos niveles de expresión de GLUT12. En estudios adicionales se obtuvo, desde las líneas de células endoteliales en cultivo, un clon de la secuencia codificante completa de GLUT6, que al ser expresado en ovocitos de *Xenopus laevis* presentó una K_m

para el transporte de desoxiglucosa de baja afinidad. En resumen, nuestros resultados indican que los transportadores de mayor afinidad corresponden a GLUT1 y GLUT8, y nos permiten identificar a GLUT6 como el transportador de baja afinidad expresado en células endoteliales cerebrales.

Los experimentos de transporte de vitamina C revelaron que las líneas celulares de endotelio adquieren vitamina C por el transporte de ambas formas químicas de la vitamina, el ácido deshidroascórbico y el ácido ascórbico. Los resultados de los experimentos de transporte fueron compatibles con la presencia de al menos dos componentes funcionales involucrados en el transporte de ácido deshidroascórbico. El componente de mayor afinidad presentó una K_m aparente < 1 mM que concuerda con las propiedades funcionales esperadas para GLUT1, mientras que el componente de menor afinidad presentó una K_m aparente de 4-5 mM que fue similar a la K_m de GLUT6 para el transporte de ácido deshidroascórbico obtenida por sobreexpresión en ovocitos de *Xenopus laevis*. Las líneas celulares de endotelio cerebral mostraron también dos componente cinéticos con diferentes afinidades responsables del transporte de ácido ascórbico, con valores de K_m aparentes de 18 – 25 y 75 – 100 μ M, respectivamente. Los resultados de las cinéticas de transporte y la dependencia de sodio para la captación de ácido ascórbico, junto con los datos de experimentos de RT-PCR indicando la expresión de cotransportadores sodio-ascorbato, nos permiten identificar al transportador de mayor afinidad como SVCT2 y al transportador de menor afinidad como SVCT1. Estudios similares en la línea celular inmortalizada de astrocitos revelaron que ellos transportan ácido ascórbico, 2-desoxi-D-glucosa y ácido deshidroascórbico mediante la expresión del transportador de hexosas GLUT1 y el cotransportador sodio-ascorbato SVCT2.

Cultivos postconfluentes de células endoteliales cerebrales humanas en sistemas de cultivo bicamerales retienen la expresión funcional de los transportadores facilitativos de glucosa (GLUTs) y de los cotransportadores sodio-ascorbato (SVCTs) y evidencian una distribución asimétrica de ambos tipos de transportadores. Encontramos que GLUT1 y GLUT8, identificados como transportadores de mayor afinidad, se encuentran presentes en los compartimientos apical y basolateral, mientras que GLUT1 fue distribuido preferencialmente en la membrana apical. Encontramos también que el transportador de menor afinidad, correspondiente a GLUT6, estuvo ausente en la membrana apical pero fue el principal componente funcional presente en la membrana basolateral. Más aún, las células HBMEC y HCEC postconfluentes mostraron una distribución selectiva de SVCT2 y SVCT1 a los compartimientos membranosos apical y basolateral, respectivamente. Además de la distribución asimétrica de ambas familias de transportadores, la capacidad de transporte de 2-desoxi-D-glucosa y ácido ascórbico fue mayor en el compartimiento apical respecto del compartimiento basolateral.

A pesar que nuestros datos fueron obtenidos utilizando cultivos *in vitro* de células endoteliales inmortalizadas de la microvasculatura cerebral humana, proponemos que la distribución polarizada encontrada tanto para los transportadores de glucosa y vitamina C en las membranas apical y basolateral de células postconfluentes, puede ser parte del mecanismo que determina el transporte vectorial de glucosa y vitamina C a través de la barrera hematoencefálica.