

UNIVERSIDAD DE CONCEPCION



**TRANSPORTADORES DE VITAMINA C EN HEPATOCITOS Y
CÉLULAS DE HEPATOMA: IDENTIFICACIÓN MOLECULAR,
CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL Y REGULACIÓN BAJO
CONDICIONES DE ESTRÉS OXIDATIVO**

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

Lorena Gisela Mardones Leiva

2005

5. RESUMEN

La vitamina C como un antioxidante muy importante a nivel hepático, sin embargo, existe poca información respecto de la identidad y propiedades funcionales de los sistemas de transporte de vitamina C expresados en los hepatocitos. Existen dos familias de transportadores de vitamina C; los transportadores SVCT, que transportan la vitamina C reducida (ácido ascórbico), y los transportadores GLUTs, de los cuales algunas isoformas transportan la vitamina C oxidada (ácido deshidroascórbico), además de transportar hexosas. Aunque no hay duda de que los hepatocitos expresan GLUT2, no existe información directa indicando si esta isoforma de los GLUT media el transporte de la vitamina C oxidada. Por otro lado, tampoco existen estudios detallados sobre la expresión y función de los transportadores SVCT en los hepatocitos, ni menos aún se conoce la posible regulación de su expresión bajo condiciones de estrés oxidativo.

El objetivo de esta Tesis fue dilucidar los mecanismos por los cuales hepatocitos de rata recién aislados y células de hepatoma de rata obtienen vitamina C. Para ello, identificamos molecularmente y caracterizamos funcionalmente los transportadores de vitamina C expresados en estas células y analizamos su regulación en células de hepatoma sometidas a estrés oxidativo por ausencia de glutatión intracelular. Como modelo de estudio utilizamos hepatocitos de rata recién aislados, células de hepatoma de rata H4IIE y ovocitos de *Xenopus laevis* sobreexpresando GLUT2. Para identificar los transportadores expresados utilizamos ensayos de PCR convencional y cuantitativo e inmunolocalización y para los estudios funcionales utilizamos los sustratos radioactivos ^3H -desoxiglucosa, ^{14}C -ácido ascórbico y ^{14}C -ácido deshidroascórbico, cationes mono y

bivalentes, inhibidores y competidores. Por último, para estudiar la regulación del transporte de vitamina C bajo estrés oxidativo, se realizaron estudios de transporte de vitamina C y de expresión de los ARNm de SVCT1 y SVCT2 por PCR cuantitativo en tiempo real en células H4IIE tratadas con butionina sulfoximina y dietilmaleato.

Nuestros resultados revelaron que los hepatocitos de rata transportan el ácido ascórbico por medio de SVCT1 y el ácido deshidroascórbico por medio de GLUT2. Para el caso del ácido ascórbico, los experimentos de transporte revelaron que el transportador expresado por los hepatocitos de rata presenta las propiedades cinéticas que se correlacionan con las que presenta SVCT1, experimentos que fueron confirmados por RT-PCR. Encontramos que este transportador presenta las propiedades esperadas para los transportadores SVCT, respecto a su activación por sodio y no por otros cationes monovalentes, como Li^+ , Cs^+ y colina⁺. También encontramos que el transporte se ve disminuido por la ausencia de los cationes bivalentes Ca^{2+} y Mg^{2+} , y que la ausencia de ambos cationes produce la pérdida de la cooperatividad para sodio. Para el caso del transporte de ácido deshidroascórbico y 2-desoxiglucosa, los estudios de transporte, inhibición e inmunohistoquímica revelaron que los hepatocitos de rata recién aislados expresan sólo una isoforma de los transportadores facilitativos de hexosas, correspondiente a GLUT2, el cual media el transporte de ácido deshidroascórbico en estas células. Los experimentos realizados en ovocitos de *X. laevis* sobreexpresando GLUT2 confirmaron la capacidad de GLUT2 de transportar el ácido deshidroascórbico, donde los experimentos funcionales incluyeron experimentos de competencia con fructosa. Por otro lado, encontramos que las células H4IIE transportan ambas formas de la vitamina C y expresan los transportadores SVCT1, SVCT2, GLUT1 y GLUT2. Los

estudios de transporte de ácido ascórbico, ácido deshidroascórbico y 2-desoxiglucosa, junto con los estudios de PCR para SVCT revelaron que en estas células el nivel de expresión de los transportadores de vitamina C es mucho menor en comparación con los hepatocitos de rata. En segundo lugar, encontramos que en las células H4IIE el estrés oxidativo inducido por disminución del glutatión celular luego del tratamiento con butionina sulfoximina y dietilmaleato provoca una marcada disminución en el transporte de ácido ascórbico, la que es precedida por una disminución en los niveles de expresión de los ARNm de SVCT1 y SVCT2, sin afectar mayormente el transporte de 2-desoxiglucosa ni la acumulación de vitamina C en este tipo celular.

Estos resultados nos llevan a concluir que los hepatocitos de rata transportan ambas formas de la vitamina C, por medio de SVCT1 y GLUT2, mientras que las células de hepatoma H4IIE lo hacen por SVCT1, SVCT2, GLUT1 y GLUT2 y que existe una relación compleja entre el estrés oxidativo y los transportadores de vitamina C reducida en las células de hepatoma de rata H4IIE.