

UNIVERSIDAD DE CONCEPCION



**METABOLISMO DE VITAMINA C EN CELULAS ENDOTELIALES
HUMANAS EN CULTIVO: MECANISMOS DE ADQUISICION,
RELACION CON EL GLUTATION CELULAR Y PAPEL
PROTECTOR FRENTE A ESTRES OXIDATIVO AGUDO**

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

Por

Viviana Paz Montecinos Acuña

2004

RESUMEN

El endotelio humano representa un órgano que está constantemente expuesto a oxidantes, tanto intracelulares como exógenos, y bajo condiciones normales está protegido por la acción concertada de una serie de moléculas antioxidantes, entre las cuales destacan antioxidantes solubles como el ácido ascórbico y el glutatión. Todas las células humanas tienen la capacidad de sintetizar el glutatión, pero no la vitamina C, la que debe ser adquirida desde la dieta y absorbida a nivel del epitelio intestinal. Hasta el momento se han descrito dos sistemas que median el transporte de vitamina C en células de mamíferos. La forma oxidada de esta vitamina (ácido deshidroascórbico) ingresa a la célula por los transportadores facilitativos de hexosas (GLUTs), a favor del gradiente de sustrato, en tanto que la forma reducida (ácido ascórbico), es transportado por co-transportadores de sodio-ascorbato (SVCTs), a favor del gradiente electroquímico del sodio. La vitamina C se encuentra en el interior de las células solamente como ácido ascórbico, y el glutatión juega un importante papel tanto en la acumulación como en el reciclaje y la mantención de niveles constantes de vitamina C reducida intracelular. Estudios *in vivo* indican que existiría una relación funcional entre estas dos moléculas antioxidantes en la protección contra el estrés oxidativo, ya que el daño oxidativo producido por una deficiencia de glutatión es prevenido por la administración de vitamina C, mientras que los efectos deletéreos de la deficiencia de vitamina C son retardados por la administración de ésteres de glutatión.

Utilizando como modelo de estudio cultivos primarios de células endoteliales humanas obtenidas de vena umbilical (HUVEC) y de amígdalas humanas (HTEC), y la

línea celular endotelial inmortalizada ECV-304, identificamos y caracterizamos funcionalmente los transportadores de vitamina C reducida y oxidada expresados en estas células. Determinamos además la participación del glutatión en el transporte y acumulación de la vitamina C y el papel de ambos antioxidantes en la capacidad de las células endoteliales para sobrevivir a estrés oxidativo agudo inducido por tratamiento con peróxido de hidrógeno.

Nuestros resultados, de experimentos de PCR, inmunolocalización y transporte, muestran que las células endoteliales presentan un único sistema de transporte para el ácido ascórbico, con las propiedades esperadas para la isoforma SVCT2. En forma similar el transporte de ácido deshidroascórbico en la línea celular ECV-304 es mediado por un único sistema de transporte, que corresponde al transportador de glucosa GLUT1. Por otro lado, las células HTEC y HUVEC transportan el ácido deshidroascórbico por medio de dos transportadores expresados simultáneamente en cada célula, los que transportan el sustrato con diferentes afinidades. El componente de mayor afinidad correspondería a GLUT1, mientras que las propiedades del componente de menor afinidad permiten identificarlo tentativamente como GLUT6.

Aunque los tres tipos celulares estudiados mostraron un contenido de glutatión similar (2 a 4 mM), células carentes de glutatión por de tratamiento con L-butionil (SR) sulfoximina y dietilmaleato mostraron una dependencia diferencial del contenido de glutatión para sobrevivir y proliferar. Del mismo modo, la ausencia de glutatión intracelular afectó la acumulación de vitamina C en las células ECV-304 y en las HUVEC pero no en las células HTEC. El tratamiento agudo de las células endoteliales con peróxido de hidrógeno causó una masiva caída del contenido de glutatión intracelular

que estuvo relacionada con la sobrevivencia de las células. La carencia de glutatión intracelular aumentó la sensibilidad de las células endoteliales al peróxido de hidrógeno, efecto que fue revertido en forma dosis dependiente del contenido intracelular de glutatión. Del mismo modo, la suplementación con vitamina C intracelular aumentó la resistencia de las células endoteliales en una forma en forma dosis dependiente del contenido de vitamina C. Estos experimentos también mostraron que la vitamina C y el glutatión son claramente diferenciables respecto de su capacidad para proteger a las células del estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno. Así, bajas concentraciones de vitamina C, en el rango de 0,2-0,3 mM, protegieron eficientemente las células endoteliales del estrés oxidativo, mientras que se necesitaron concentraciones de glutatión cercanas a 2 mM para observar un efecto protector semejante. Además de lo anterior, la presencia simultánea de vitamina C y glutatión torna a las células muy resistentes al estrés oxidativo producido por exposición directa a peróxido de hidrógeno y a oxidantes generados por células neutrofilicas activadas. Concluimos que la vitamina C y el glutatión actúan en forma complementaria en la defensa celular contra el estrés oxidativo.