

UNIVERSIDAD DE CONCEPCION
ESCUELA DE GRADUADOS



**ESTUDIO DE LA EXPRESION Y FUNCION DE TRANSPORTADORES DE HEXOSAS
Y VITAMINA C EN CELULAS EPENDIMARIAS NORMALES Y TUMORALES.**



**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS AREA BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR**

**TESIS REALIZADA POR: MARIA DE LOS ANGELES GARCIA ROBLES.
DIRIGIDA POR: DR. FRANCISCO NUALART SANTANDER.**

Resumen

Los transportadores de glucosa (GLUTs) cumplen una importante función en la adquisición de glucosa a nivel cerebral. La isoforma GLUT1 está presente en las células endoteliales de la BBB y en la barrera de sangre-LCR presente en los plexos coroideos. En neuronas el principal transportador presente es GLUT3. Existe muy poca información de la expresión de GLUTs en las células endimarias que revisten las paredes ventriculares. Entre las células endimarias especializadas destacan los tanicitos, células que se localizan en los órganos circunventriculares como la eminencia media. Los tanicitos pueden ser clasificados en $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\beta 2$, sólo los tanicitos $\beta 2$ se unen a través de “tight junctions” formando la barrera LCR-eminencia media. Se estudió la expresión y función de GLUTs en tanicitos hipotalámicos de ratón a través de inmunocitoquímica, hibridación *in situ* y la determinación de parámetros cinéticos. Encontramos una elevada expresión de GLUT1 en tanicitos α y $\beta 1$, y en los tanicitos $\beta 2$ una muy baja expresión. Además, detectamos la expresión de conexina 43 y del transportador de lactato MCT1. La expresión de GFAP (marcador de astrocitos) demostró que existe un bajo contenido de astrocitos en las áreas hipotalámicas en que se localizan los tanicitos α y $\beta 1$. Implementamos cultivos primarios de tanicitos aislados desde hipotálamo de ratón y demostramos que sobreexpresan GLUT1, expresan MCT1 y liberan lactato en respuesta a neurotransmisores como norepinefrina y glutamato. Por esta razón especulamos que los tanicitos pueden acoplarse metabólicamente con las neuronas de la región del hipotálamo.

La microscopía confocal nos permitió determinar que los tanicitos β expresan GLUT2, isoforma que además transporta fructosa y que se expresa principalmente en tejidos que participan en el “sensing” de glucosa. A la fecha, la expresión de GLUT2 en el hipotálamo ha sido demostrada solo por hibridación *in situ*, no hay datos funcionales que demuestren que GLUT2 se exprese en neuronas o células gliales (tanicitos). Usamos inmunocitoquímica y análisis cinéticos de captación de hexosas para estudiar la expresión de GLUTs en tanicitos hipotalámicos. La microscopía confocal confirma la reacción positiva en el área proximal y distal de los tanicitos β . Los tanicitos en cultivos presentaron reacción positiva con anti-GLUT1 y 2. Los ensayos de captación de 2-DOG demostraron que expresan dos sistemas transportadores con K_m s de 3 y 40 mM, que corresponden a las descritas para GLUT1 y GLUT2, respectivamente. También logramos establecer que los tanicitos incorporan fructosa, confirmando la presencia de un transportador de fructosa en estas células. Nuestros resultados demuestran que los tanicitos

expresan GLUT2. Debido a que los tanicitos están en contacto directo con neuronas, el LCR y vasos sanguíneos hipotalámicos, hipotetizamos que pueden tener la capacidad de detectar y responder a cambios en la concentración de glucosa extracelular y activar la liberación neuronal de factores específicos al fluido extracelular.

En el sistema nervioso existe una elevada concentración de vitamina C. Análisis cinéticos de la captación de vitamina C han demostrado que células especializadas incorporan la forma reducida de la vitamina C, ácido ascórbico (AA), a través de un co-transportador de AA/Na⁺. Recientemente se han clonado dos isoformas de estos transportadores (SVCT1 y 2), estos transportadores incorporan AA con una alta afinidad, SVCT2 es una proteína que se ha detectado principalmente en ojo y cerebro. Varias de las isoformas de los GLUTs transportan eficientemente ácido deshidroascórbico (DHA), la forma oxidada de la vitamina C. Demostramos que SVCT2 es expresado en tanicitos *in situ* e *in vitro*. La incorporación de la forma reducida de la vitamina C, en tanicitos, es dependiente de sodio y presenta una Km de 20 μM. Los tanicitos también transportan DHA, molécula que es neurotóxica para el sistema nervioso, de tal forma, que los tanicitos pueden realizar una función neuroprotectora reciclando la vitamina C oxidada.

Los plexos coroideos están localizados en la región rostral de los ventrículos cerebrales, donde forman la barrera sangre-LCR. La glucosa es transportada por GLUT1 y la vitamina C por SVCT2. Nosotros analizamos la expresión y función de GLUTs y SVCTs en células de papiloma de plexos coroideos humanos. Los análisis inmunocitoquímicos y de hibridación *in situ* demostraron que estas células mantienen la expresión y la localización basolateral de GLUT1. Por otra parte, las células tumorales no presentaron la capacidad de transportar AA. Sin embargo, las células de los plexos coroideos incorporaron DHA a través de GLUT1. Dado que, en la sangre la vitamina C se encuentra principalmente en la forma reducida, nuestros resultados sugieren que la vitamina C es oxidada extracelularmente, en el tejido circundante por un efecto “bystander”, asociado a la presencia de células estromales y la producción de anión superóxido. Además, las células de los plexos coroideos expresan p47^{PHOX}, una subunidad de la enzima NADPH oxidasa, lo que indica que ellas producen anión superóxido permitiéndoles generar DHA.