

UNIVERSIDAD DE CONCEPCION



**RESISTENCIA A ESTRES OXIDATIVO
EN CELULAS ENDOTELIALES HUMANAS:
VITAMINA C Y GLUTATION**

Tesis de Magíster presentada a la Escuela de Graduados de la Universidad de Concepción,
como parte de los requisitos para optar al grado de Magíster en Ciencias,
mención Bioquímica

Por

Paula Angélica Marcela Guzmán González

2005

RESUMEN

El endotelio humano representa un órgano que está constantemente expuesto a oxidantes, tanto intracelulares como exógenos, de los que está protegido por la acción concertada de una serie de moléculas antioxidantes, entre las cuales destacan antioxidantes solubles como la vitamina C 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, absorbida a nivel del epitelio intestinal y luego adquirida por todas las células del organismo. Se han descrito dos sistemas de transporte de vitamina C en células de mamíferos: los transportadores facilitativos de hexosas GLUTs transportan la forma oxidada (el ácido deshidroascórbico), y los cotransportadores de sodio-ascorbato SVCTs transportan la forma reducida (el ácido ascórbico). La vitamina C se almacena en el interior de las células solamente como ácido ascórbico, y el glutatión y enzimas con actividad de dehidroascorbato reductasas juegan un importante papel en la acumulación, reciclaje y mantención de niveles constantes de ácido ascórbico intracelular, y estudios *in vivo* indican que existiría una relación funcional entre el par vitamina C-glutatión en la protección contra el estrés oxidativo.

Estudiamos el metabolismo de vitamina C en cultivos primarios de células endoteliales humanas obtenidas de vena umbilical (células HUVEC) y de amígdala humanas (células HUTEK). Metodológicamente, realizamos ensayos de RT-PCR para identificar los transportadores de vitamina C, reductasas de ácido deshidroascórbico y enzimas antioxidantes expresadas por las células endoteliales, experimentos de transporte de ácido ascórbico, ácido deshidroascórbico y hexosas para identificar la forma de la

vitamina C transportada por las células endoteliales, y realizamos ensayos de exposición a peróxido de hidrógeno y células HL-60 neutrofilicas activadas, acoplados a ensayos de viabilidad y determinación cuantitativa de glutatión, para establecer la respuesta de las células endoteliales al estrés oxidativo. Los objetivos desarrollados fueron: i) identificar molecularmente y caracterizar funcionalmente los transportadores de vitamina C reducida y oxidada expresados por las células endoteliales humanas, ii) determinar el papel del glutatión en el transporte y acumulación intracelular de vitamina C, iii) identificar molecularmente las enzimas con actividad de reductasas de ácido deshidroascórbico y enzimas antioxidantes expresadas por las células endoteliales, iv) establecer el papel del par vitamina C-glutatión en la capacidad de las células endoteliales para sobrevivir a estrés oxidativo agudo inducido por tratamiento con peróxido de hidrógeno y por su interacción con células activadas en pleno estallido respiratorio.

Los resultados obtenidos indican que las células endoteliales humanas (HUVEC y HUTEK) expresan un único sistema de transporte de ácido ascórbico, el que corresponde al transportador de sodio-ascorbato de alta afinidad SVCT2. Por otro lado, las células endoteliales expresan al menos 8 isoformas de los transportadores de glucosa, de los cuales hemos identificado tentativamente al menos dos isoformas, GLUT1 y GLUT6, como participantes activos en la adquisición de la vitamina C oxidada. Células carentes de glutatión por tratamiento farmacológico con los compuestos L-butionil (SR) sulfoximina y dietilmaleato mostraron una dependencia diferencial del contenido de glutatión para sobrevivir, proliferar, y acumular vitamina C, revelando la participación de al menos dos sistemas de reductasas de ácido deshidroascórbico en el proceso de acumulación, aunque las células endoteliales expresan al menos 9 enzimas distintas. El

tratamiento agudo de las células endoteliales con peróxido de hidrógeno causó una masiva caída del contenido de glutatión intracelular, seguido por una recuperación parcial, efecto que estuvo relacionado con la sobrevivencia de las células y fue modificado por la presencia de vitamina C, además de cambios selectivos en la expresión de reductasas de ácido deshidroascórbico. La carencia de glutatión intracelular aumentó la sensibilidad de las células endoteliales al peróxido de hidrógeno, efecto que fue revertido en forma dosis-dependiente por un aumento en el contenido intracelular de glutatión o 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 0,1-0,3 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, solamente en la presencia simultánea de vitamina C y de glutatión, las células endoteliales mostraron un nivel máximo de resistencia al estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno o exposición a células HL-60 neutrofilicas activadas.

Concluimos que la vitamina C y el glutatión actúan en forma complementaria en conferir a las células endoteliales su capacidad antioxidante. Nuestros datos también indican que a pesar de encontrarse en elevadas concentraciones en el interior de todas las células, la presencia del glutatión no es suficiente para proveer a las células endoteliales con una adecuada resistencia al estrés oxidativo, siendo la presencia de vitamina C fundamental en este proceso.