



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias
Escuela de Bioquímica

Profesor patrocinante:
Dr Alejandro M. Reyes
Instituto de Bioquímica
Facultad de Ciencias

Transporte de Nicotinamida en Eritrocitos humanos.

**Nicotinamida no es sustrato del transportador
facilitativo de Hexosas GLUT1**

Tesis de Grado presentada como parte de los requisitos para optar al grado de *Licenciado en Bioquímica* y al Título profesional de *Bioquímico*.

Fernando Patricio Bustamante Vilches

Valdivia Chile 2002

.....Dedico este trabajo de tesis a mis padres, hermanos y muy especialmente a la memoria de mi querida abuelita Emma Rosa Velásquez Castro Q.E.P.D., cuyo amor y enseñanzas han sido la luz que me ha permitido alcanzar cada meta en mi vida.....

Agradecimientos

Quiero agradecer en primer término a mi profesor patrocinante, el Dr. Alejandro M. Reyes P. por haberme acogido en su laboratorio, por todo el tiempo, dedicación y los conocimientos que me ha entregado, por hacerme sentir su apoyo siempre y en cada lugar en donde me he encontrado y muy especialmente por la infinita paciencia que ha tenido conmigo durante todo este largo camino. Gracias por haber contribuido de manera tan significativa en mi desarrollo tanto profesional como humano.

Quiero agradecer también a la Dra. Ilona Concha G. por aceptar ser parte de mi comisión evaluadora, por su trato deferente y su apoyo en cada situación en que requerí de su ayuda.

Así también quiero agradecer al Dr. Alejandro Yáñez C. por aceptar ser miembro de mi comisión evaluadora, por toda la ayuda que me brindó durante el desarrollo de mi tesis, por estar siempre cerca con una palabra de aliento cada vez que lo necesité y especialmente por la amistad que me ha permitido disfrutar a través de los años que hemos compartido.

Me gustaría agradecer también al Dr. Juan Carlos Slebe por todo el apoyo que me brindó, especialmente durante la primera etapa de mi tesis al igual que el Dr. Juan Guillermo Cárcamo por su continuo apoyo y la sincera amistad que me regaló.

A mis amigos, por estar a mi lado en los buenos y malos momentos, a don Mario Fernández y doña Irma Carriel por su incondicional apoyo y por acogerme en su hogar siempre con gran cariño, haciéndome sentir uno más de sus hijos, y a todos aquellos que me han acompañado durante estos años, gracias.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Estructura y Función de Proteínas del Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, y contó con el financiamiento de los proyectos FONDECYT 1981018, DID-UACH S-97-04 Y PEF-02-2001.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. RESUMEN		vii
1.1. ABSTRACT		viii
2. INTRODUCCIÓN		1
3. MATERIALES Y MÉTODOS		11
3.1. Materiales.		11
3.2. Aislamiento de los eritrocitos.		11
3.3. Preparación de membranas de eritrocitos.		12
3.4. Preparación de vesículas de membrana de eritrocitos.		12
3.4.1. Preparación de las vesículas de orientación normal.		13
3.4.2. Preparación de las vesículas de orientación invertida.		13
3.5. Cinéticas de la entrada de 3-O-metil-D-glucosa, 2-desoxi-D-glucosa y nicotinamida en eritrocitos humanos enteros.		14
3.5.1. Cinéticas de los transportes de 3-O-metil-D-glucosa y de 2-desoxi-D-glucosa.		14
3.5.2. Cinética del transporte de nicotinamida.		15
3.6. Cinética de la incorporación de hexosas y nicotinamida en vesículas normales e invertidas.		15
3.6.1. Cinéticas del transporte de 3-O-metil-D-glucosa y de 2-desoxi-D-glucosa.		15
3.6.2. Cinética del transporte de nicotinamida.		16
3.7. Ensayos de transporte en eritrocitos humanos enteros.		17
3.7.1. Transporte de hexosas en eritrocitos en presencia de nicotinamida.		17
3.7.2. Transporte de nicotinamida en presencia de los análogos de glucosa. ..		17

3.7.3. Transporte de nicotinamida en presencia de aminoácidos.	18
3.7.4. Transporte de nicotinamida en presencia de tetraetilamonio.	18
3.8. Ensayos de transporte de hexosas y nicotinamida en vesículas selladas.	18
3.8.1. Transporte de hexosas en presencia de nicotinamida, en vesículas normales e invertidas.	18
3.9. Ensayos de la saturación del transporte de nicotinamida.	19
3.9.1. Curvas de saturación en eritrocitos humanos.	19
3.9.2. Cinéticas de saturación en vesículas normales e invertidas.	19
3.10. Ensayos de desplazamiento de la unión de citocalasina B a membranas de eritrocitos.	20
3.11. Otras determinaciones.	21
 4. RESULTADOS	 22
4.1. Ensayos de transporte en eritrocitos humanos.	22
4.1.1. Incorporación de nicotinamida, 2-desoxi-D-glucosa y 3-O-metil-D-glucosa.	22
4.1.2. Saturación del transporte de nicotinamida.	24
4.1.3. Incorporación de 2-desoxi-D-glucosa y 3-O-metil-D-glucosa en presencia de nicotinamida y de análogos de glucosa.	24
4.1.4. Incorporación de nicotinamida en presencia de azúcares.	26
4.1.5. Efecto de inhibidores de GLUT1 sobre el transporte de nicotinamida. ...	28
4.2. Ensayos de unión de citocalasina B a membranas de eritrocitos humanos.	29
4.2.1. Efecto de nicotinamida sobre la unión de citocalasina B.	29
4.2.2. Tipo de desplazamiento de citocalasina B provocado por nicotinamida.	31
4.3. Ensayos de transporte en vesículas selladas de orientación normal.	33
4.3.1. Cinética de la entrada de nicotinamida, 2-desoxi-D-glucosa y 3-O-metil-D-glucosa.	33
4.3.2. Saturación del transporte de nicotinamida.	35

4.3.3. Incorporación de 2-desoxi-D-glucosa y 3-O-metil-D-glucosa en presencia de nicotinamida y de azúcares.	35
4.4. Ensayos de transporte en vesículas de orientación invertida.	38
4.4.1. Cinética de la entrada de nicotinamida, 3-O-metil-D-glucosa y 2-desoxi-D-glucosa	38
4.4.2. Saturación del transporte de nicotinamida.	40
4.4.3. Incorporación de nicotinamida, 3-O-metil-D-glucosa y 2-desoxi-D-glucosa en presencia de nicotinamida o de azúcares.	40
4.5. Relación del transporte de nicotinamida con la función de otros transportadores facilitativos en el eritrocito humano.	40
4.5.1. Ensayos de transporte de nicotinamida en presencia de aminoácidos.	40
4.5.2. Transporte de nicotinamida en presencia de tetraetilamonio.	43
4.6. Efecto de nicotinamida sobre la acumulación de 2-desoxi-D-glucosa en eritrocitos humanos.	43
5. DISCUSIÓN	47
6. BIBLIOGRAFÍA	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cinéticas de las incorporaciones de nicotinamida, 2-desoxi-D-glucosa y 3-O-metil-D-glucosa en eritrocitos humanos enteros en ensayos de entrada.	23
Figura 2. Curva de saturación de la velocidad de entrada de nicotinamida en eritrocitos humanos enteros.	25
Figura 3. Efecto de hexosas y de nicotinamida sobre transporte de entrada de 2-desoxi-D-glucosa, 3-O-metil-D-glucosa y nicotinamida en eritrocitos humanos enteros.	27
Figura 4. Inhibidores reconocidos de GLUT1 son incapaces de afectar la incorporación de nicotinamida en eritrocitos humanos enteros.	30
Figura 5. Competencia por nicotinamida de la unión desplazable por D-glucosa de citocalasina B a membranas aisladas de eritrocitos humanos.	32
Figura 6. Cinéticas de la incorporación de nicotinamida, 3-O-metil-D-glucosa y 2-desoxi-D-glucosa en vesículas normales.	34
Figura 7. Curva de saturación de la velocidad de entrada de nicotinamida en vesículas selladas de orientación normal.	36
Figura 8. Efecto de hexosas y de nicotinamida sobre la incorporación de sustratos en vesículas de orientación normal.	37
Figura 9. Cinéticas de la incorporación de nicotinamida, 3-O-metil-D-glucosa y 2-desoxi-D-glucosa en vesículas invertidas.	39

Figura 10. Curva de saturación de la velocidad de entrada de nicotinamida en vesículas selladas de orientación invertida.	41
Figura 11. Efecto de hexosas y de nicotinamida sobre la incorporación de sustratos en vesículas de orientación invertida.	42
Figura 12. Ausencia de inhibición del transporte de nicotinamida en eritrocitos humanos enteros por la presencia de ciertos aminoácidos o de tetraetilamonio.	44
Figura 13. Nulo efecto de nicotinamida y de L-glucosa sobre la acumulación de 2-desoxi-D-glucosa en eritrocitos humanos.	46

LISTA DE ABREVIATURAS

DOG	:	2-desoxi-D-glucosa
GLUT	:	Transportador facilitativo de hexosas
NAM	:	Nicotinamida
OMG	:	3-O-metil-D-glucosa
TEA	:	Tetraetilamonio

1. RESUMEN

Se ha propuesto que GLUT1, una proteína de membrana que permite el transporte facilitado de hexosas y de la forma oxidada de la vitamina C, el ácido deshidroascórbico, es también capaz de transportar nicotinamida (Sofue *et al.* Possible multifunction of glucose transporter: Transport of nicotinamide by reconstituted liposomes. *Biochem. J.* 288, 669-674, 1992). Para probar esta proposición, en esta Tesis estudiamos el transporte de 2-desoxi-D-glucosa, 3-O-metil-D-glucosa y de nicotinamida en eritrocitos humanos enteros y en vesículas de membranas de eritrocitos preparadas con una orientación normal (lado citoplasmático hacia adentro) o invertida (lado citoplasmático hacia fuera). En eritrocitos y en vesículas, el transporte de nicotinamida fue saturable con un valor de K_M de 5,5 mM en eritrocitos y de 6,1 mM y 6,0 mM respectivamente, para el influjo y eflujo de sustrato en vesículas. Encontramos que el transporte de hexosas por GLUT1 no fue competido por nicotinamida tanto en eritrocitos enteros como en vesículas normales o invertidas. Asimismo, el transporte de nicotinamida no fue afectado por hexosas o por inhibidores del transporte de glucosa como citocalasina B, floretina, genisteína o miricetina. Por otra parte, nicotinamida es capaz de desplazar la unión específica de citocalasina B a GLUT1 en membranas de eritrocitos, lo que sugiere que la vitamina se une realmente a la proteína GLUT1. Sin embargo, lo hace de una manera no competitiva, lo cual indica que los sitios de unión de nicotinamida y de los sustratos de GLUT1 son diferentes e independientes. Los resultados entonces sugieren que GLUT1 no permite el transporte facilitado de nicotinamida y proponemos en vez la existencia de otros sistemas como responsables de facilitar el transporte de nicotinamida a través de las membranas celulares.

ABSTRACT

It has been proposed that GLUT1, a membrane protein that transports hexoses and the oxidized form of vitamin C, dehydroascorbic acid, is also able to transport nicotinamide (Sofue *et al.* Possible multifunction of glucose transporter: transport of nicotinamide by reconstituted liposomes. *Biochem. J.* 288: 669-674, 1992). To ascertain this, in this Thesis we studied the transport of 2-deoxy-D-glucose, 3-O-methyl-D-glucose and nicotinamide in human erythrocytes and in erythrocyte membrane vesicles prepared in a normal (right-side-out vesicles) or inverted (inside-out vesicles) orientations. In erythrocytes and vesicles the transport of nicotinamide was saturable, with K_M values of 5,5 mM in erythrocytes and of 6.1 and 6.2 mM respectively for influx and efflux in vesicles. We found that the transport of the hexoses was not competed by nicotinamide in both the erythrocytes and the erythrocyte normal or inverted vesicles. Likewise, the transport of nicotinamide was not affected by hexoses or by inhibitors of glucose transport such as cytochalasin B, phloretin, genistein and myricetin. On the other hand, nicotinamide blocked the binding of cytochalasin B to human erythrocyte membranes, suggesting that the vitamin does bind to the GLUT1 protein. However, it did so in a non-competitive manner, which indicates that the nicotinamide and substrates binding sites on GLUT1 are different and independent. Therefore, our results indicates that GLUT1 does not transport nicotinamide, and we propose instead the existence of other systems for the translocation of nicotinamide across cell membranes.

2. INTRODUCCION

El metabolismo celular involucra una serie de reacciones que tienen como objeto la generación de energía. Entre éstas, una de las vías metabólicas de mayor importancia se relaciona con la degradación de la glucosa, molécula cuyo proceso metabólico se ha establecido como la principal fuente de generación de energía, en forma de ATP, en células de mamíferos, tanto en condiciones de aerobiosis como anaerobiosis (Bell *et al.*, 1993).

Si hablamos de metabolismo celular, nos referimos a un proceso que considera una sucesión de reacciones químicas, catalizadas por enzimas, que tienen lugar en el interior de la célula, siendo por tanto un factor preponderante la concurrencia en el citoplasma de todos los sustratos necesarios para dar inicio a este proceso. En términos concretos, esto significa que la molécula de glucosa debe ser transportada desde el medio extracelular hacia el interior de la célula, lo cual implica el paso de la dicha molécula a través de la membrana plasmática, evento que dada su trascendencia no puede estar exento de un eficiente mecanismo de control. Es razonable entonces que la célula debería estar provista de un sistema adecuado de transporte.

Numerosos grupos de trabajo han realizado importantes esfuerzos para caracterizar los mecanismos involucrados en el transporte de glucosa al interior de la célula, consiguiendo así establecer ciertas conclusiones que han sido de mucha utilidad en la dilucidación de este mecanismo. Así por ejemplo, se ha logrado demostrar la existencia de dos familias de transportadores asociados al proceso de incorporación de la glucosa en células de mamíferos. La primera de éstas, es la familia de los transportadores facilitativos de glucosa, también denominados GLUTs, los que transportan hexosas en un proceso independiente de energía celular y a favor de un gradiente de concentración (Carruthers, 1990; Mueckler, 1994). La otra familia corresponde a los transportadores activos de hexosas, dependientes de sodio, los que adquieren vital importancia cuando se trata de transportar la glucosa en contra de un gradiente de concentración. Su función requiere la participación concomitante de una bomba biológica denominada sodio-potasio ATPasa con el objeto de mantener un gradiente de iones adecuado

para las condiciones de transporte del ión sodio (Hediger *et al.*, 1995). Este último tipo de transportador puede observarse en una elevada cantidad al nivel de tejidos como el intestino delgado, donde cumple el objetivo de absorber la glucosa desde el lumen intestinal a las células epiteliales. Es también importante su presencia en el tejido renal, específicamente a nivel de las células del túbulo proximal, donde está asociado a funciones de reabsorción (Wright *et al.*, 1992).

En mamíferos se han logrado identificar doce isoformas de los transportadores facilitativos de glucosa, denominadas GLUT1 a GLUT12 (Joost y Thorens, 2001). Estas proteínas comparten la cualidad de ser expresadas al nivel de la membrana plasmática, aunque difieren respecto de su distribución tisular. Se ha establecido que GLUT1 es la isoforma predominante en el tejido fetal y en las células sanguíneas de adultos, principalmente eritrocitos (Widdas, 1988). Esta proteína fue clonada en 1985 y corresponde a un polipéptido de 492 residuos (Mueckler *et al.*, 1985). Por su parte, GLUT2 es la isoforma predominante en células hepáticas, ubicándose preferentemente a nivel de los vasos sanguíneos, aunque no ha sido demostrada su presencia en la membrana de los canalículos biliares (Fukumoto *et al.*, 1988). GLUT2 tiene además una alta expresión en las células β -pancreáticas, encargadas de la secreción de insulina (Orci *et al.*, 1989) y se encuentra también en elevados niveles de expresión a nivel de la membrana basolateral de las células de la mucosa intestinal, mientras que en el tejido renal se le puede encontrar a nivel de la membrana basolateral de las células epiteliales del túbulo contorneado proximal (Thorens *et al.*, 1990). Con respecto a GLUT3, es la isoforma predominante en las células del parénquima de cerebro adulto (Kayano *et al.*, 1988; Nagamatsu *et al.*, 1992), aunque es posible verificar su presencia en hígado y corazón, pero en niveles mucho menores (Gould y Holman, 1993). La expresión de la isoforma GLUT 4 en la membrana celular se encuentra regulada por la presencia de insulina, y en consecuencia se ubica preferentemente en el ámbito de las células que responden a insulina con un rápido incremento en la entrada de glucosa. Como ejemplos de estos tejidos, tenemos los músculos esquelético y cardíaco (Mueckler, 1994). Esta proteína corresponde a un polipéptido de 509 aminoácidos (Fukumoto *et al.*, 1989). GLUT5 es la isoforma que mayoritariamente se expresa en la membrana apical de las células del intestino delgado, aunque su presencia se ha comprobado también en riñón, cerebro,

músculo esquelético y tejido adiposo (Davidson *et al.*, 1992), además de espermios humanos (Burant *et al.*, 1992).

En el último par de años, se han identificado los otros nuevos 7 miembros de la familia de los GLUTs, mediante rastreos de lo que se ha llamado “marcas distintivas de los transportadores de glucosa” en la base de datos del proyecto del genoma humano (Joost y Thorens, 2001). La mayor parte de estos han sido clonados y se ha comprobado que efectivamente permiten la difusión facilitada de hexosas, pero todavía se carece de análisis funcionales y de expresión detallados. GLUT8 fue clonado en forma independiente por dos grupos (Doege *et al.*, 2000b; Ibberson *et al.*, 2000) y se ha mostrado que codifica para una proteína de 477 residuos de aminoácidos, la cual transporta glucosa y fructosa y se expresa preferentemente en la línea germinal masculina, pero también se detecta en hígado, músculo y neuronas. Esta proteína también se encontraría involucrada en la captación de glucosa, dependiente de insulina, en el blastocisto (Carayannopoulos *et al.*, 2000). GLUT6 (producto del gen *SLC2A6*, descrito originalmente como GLUT9) se expresa predominantemente en cerebro y en leucocitos periféricos (Doege *et al.*, 2000a). Otro transportador (producto de gen *SLC2A9*) fue designado como GLUT9 (Phay *et al.*, 2000). Este transportador se expresa en riñón y en hígado. McVie-Wylie *et al.* (McVie-Wylie *et al.*, 2001) describieron a GLUT10, transportador que se ubica preferentemente al nivel de hígado y de páncreas. Finalmente, Doege *et al.* (Doege *et al.*, 2001) describen la existencia de GLUT11, el cual se lo encuentra exclusivamente en corazón y en músculo esquelético.

En cuanto a la caracterización funcional de las distintas isoformas de los transportadores de glucosa, se ha mostrado funcionalmente que GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT4, GLUT6, GLUT8 y GLUT11 serían al menos transportadores de D-glucosa (Mueckler *et al.*, 1985; Fukumoto *et al.*, 1988; Kayano *et al.*, 1988; Birnbaum, 1989; Fukumoto *et al.*, 1989; Doege *et al.*, 2000a; Doege *et al.*, 2000b; Ibberson *et al.*, 2000; Doege *et al.*, 2001), mientras que GLUT5 estaría asociado exclusivamente al transporte de D-fructosa y no facilita la entrada de D-glucosa (Keller *et al.*, 1989; Burant *et al.*, 1992). A la fecha, no existen datos funcionales respecto de GLUT7, GLUT9, GLUT10 y GLUT12. A este respecto, cabe señalar que GLUT1, GLUT3 y

GLUT4 presentan una alta afinidad por glucosa, determinándose para ellos un valor de K_M de 2 a 10 mM, el cual se condice con los valores normales para este metabolito en condiciones fisiológicas (5 mM). GLUT2 por su parte, presenta un valor aproximado para K_M de 15 mM, coherente con su alta capacidad de transporte. A diferencia de las otras isoformas, tanto GLUT2 como GLUT5 presentan la particular característica de ser capaces de transportar D-fructosa, observándose para cada uno valores de K_M del orden de 67 y 6 mM, respectivamente (Bell *et al.*, 1993).

Basándose en el análisis de los perfiles de hidrofobicidad de GLUT1 deducidos a partir de su secuencia, Mueckler *et al* postularon en 1985 un modelo para la orientación de los segmentos transmembrana de GLUT1 en la membrana plasmática. Dicho modelo considera un transportador constituido por 492 aminoácidos agrupados en 12 dominios hidrofóbicos que atraviesan la membrana plasmática, cada uno de los cuales comprendería un número 20 a 25 residuos aminoácidos ordenados de acuerdo a una estructura en α -hélice, los cuales se alternan consecutivamente con una serie de cortos dominios hidrofílicos. Entonces, se propuso que la proteína atravesaría la membrana celular 12 veces y tanto el extremo amino como el carboxilo terminal se encontrarían ubicados hacia el interior de la célula.

Por medio del análisis de la estructura primaria deducida para cada una de las isoformas del transportador de glucosa en humanos, se ha podido establecer un patrón de comparación respecto de la estructura postulada para GLUT1. Es así como GLUT2 presenta un 55% de similitud con GLUT1 en términos de secuencia aminoacídica, existiendo una marcada divergencia principalmente a nivel de un gran segmento endofacial ubicado entre los dominios 6 y 7, así como también es notoria la diferenciación en la región correspondiente al extremo carboxilo terminal del transportador (Thorens *et al.*, 1988). En el caso de GLUT3 se determinó una razón de similitudes de secuencia correspondientes a un 64 y 52 % en relación a GLUT1 y GLUT2 respectivamente, coincidiendo la localización de las regiones de alta divergencia con las citadas para GLUT2 (Kayano *et al.*, 1988). Para GLUT4, nuevamente tenemos un nivel de diferenciación relativamente bajo, por cuanto presenta un 65, 54 y 58% de similitud de secuencia respecto de GLUT1, GLUT2 y GLUT3, respectivamente, encontrándose que la mayor

zona de diferencia corresponde en este caso a la región carboxilo terminal. Además esta última isoforma posee segmentos extracelulares e intracelulares mayores que los de las otras isoformas (Fukumoto *et al.*, 1989). GLUT5 parece ser la más divergente en términos de su similitud de secuencia en la estructura primaria, con respecto a GLUT1, GLUT2, GLUT3 y GLUT4, puesto que exhibe tan solo un 42, 40, 39 y 42% de similitud, respectivamente (Kayano *et al.*, 1990). Actualmente, las 12 isoformas de la familia de los transportadores de glucosa se han catalogado en tres clases, de acuerdo a sus correspondientes similitudes de secuencias (Joost y Thorens, 2001). La primera clase incluye a GLUT1, 2, 3 y 4. La segunda incluye a GLUT5, 7, 9 y 11, mientras una tercera esta conformada por GLUT6, 8 y 12. Se requieren más estudios funcionales de las distintas isoformas para evaluar si esta categorización teórica se refleja efectivamente en propiedades funcionales características de cada clase.

Considerando que el transportador GLUT1 se encuentra presente en forma abundante en la membrana plasmática de eritrocitos, en las que constituye entre un 3 - 5 % del total de proteínas (Gould y Holman, 1993) y atendiendo a la relativa facilidad de acceder a preparaciones del transportador funcional purificado, reconstituido en vesículas lipídicas (Wheeler y Hinkle, 1981), se le ha usado ampliamente para caracterizar el mecanismo de transporte de glucosa asociado al conjunto de transportadores facilitativos de hexosas. Basado en resultados de estudios realizados tanto en eritrocitos enteros como en vesículas selladas, se ha podido establecer que GLUT1 es un transportador altamente estereoespecífico, es decir, sólo permite el paso del isómero D de la glucosa no ocurriendo lo mismo con el isómero L; además el transportador es saturable y presenta un valor aparente aproximado de K_M para D-glucosa de 2 a 10 mM (Carruthers, 1990). Por otro lado, ensayos de competencia realizados con una serie de análogos de glucosa, como 2-desoxi-D-glucosa (desoxiglucosa) y el análogo no metabolizable de glucosa 3-O-metil-D-glucosa (metilglucosa) describen valores de K_i para GLUT1 de 20 a 26 mM en el caso de metilglucosa y de 7 mM para desoxiglucosa (Bell *et al.*, 1993).

Un factor importante a considerar al momento de trabajar con estos análogos surge del hecho que desoxiglucosa es un sustrato altamente específico para los transportadores facilitativos de glucosa, ya que no es sustrato para el cotransportador de sodio y glucosa (Simpson y

Cushman, 1986; Carruthers, 1990); siendo por tanto de mucha utilidad en la apreciación de efectos netos sobre el transportador GLUT1. Metilglucosa por su parte, es de suma importancia en análisis cinéticos y estudios de aceleración en trans, debido a su condición de sustrato no metabolizable.

En lo concerniente a la especificidad del sustrato transportado por los transportadores facilitativos de glucosa, se aceptaba que ellos no sólo transportaban D-glucosa sino que además una serie de análogos relacionados, pero a la luz de ciertos hallazgos se ha convenido en establecer a GLUT1 como un transportador multifuncional, es decir, un transportador capaz de permitir el ingreso de otras moléculas, no necesariamente análogos estructurales de glucosa. Es así, como por ejemplo, el transportador facilitativo de hexosas GLUT1 se ha asociado al transporte de vitamina C, llegando incluso a ser descrito como la principal vía de ingreso de la forma oxidada de esta vitamina (ácido deshidroascórbico) en células animales (Vera *et al.*, 1993; Vera *et al.*, 1994; Vera *et al.*, 1995). Este transporte se ha demostrado tanto en vesículas normales como en vesículas invertidas preparadas a partir de membranas de eritrocitos humanos (Iribarren, 1997). Estos postulados han sido ratificados por ensayos realizados por sobreexpresión de los transportadores GLUT de mamíferos en ovocitos de *Xenopus leuvis*. En los ovocitos inyectados se detectaron dos vías de transporte para ácido deshidroascórbico, una de baja afinidad (3,5 mM) y otra de alta afinidad (60 μ M), ambas inhibidas efectivamente por desoxiglucosa y citocalasina B, pero no por L-glucosa y citocalasina E (Vera *et al.*, 1993).

Otros estudios han permitido caracterizar una variedad de compuestos que, aún siendo en algunos casos estructuralmente muy divergentes, presentan la capacidad de inhibir la actividad funcional del transportador facilitativo de hexosas GLUT1. Entre ellos es posible citar por ejemplo, floretina (LeFevre y Marshall, 1959) y forskolina (Lavis *et al.*, 1987), un diterpeno activador de la adenilato ciclasa que al igual que floretina es capaz de inhibir el transporte de D-glucosa tanto en adipocitos (Kashiwagi *et al.*, 1983; Joost *et al.*, 1986) como en eritrocitos humanos (Sergeant y Kim, 1985). Compuestos del grupo de los flavonoides, como genisteína (4', 5, 7-trihidroxiisoflavona) una isoflavona presente en una gran variedad de vegetales comestibles (principalmente productos derivados de la soya (Barnes, 1995), que además de inhibir las

proteína quinasas (Akiyama *et al.*, 1987), inhibe de manera importante la actividad funcional de los transportadores de glucosa (Vera *et al.*, 1996). Así también, se ha demostrado que otros inhibidores reconocidos de proteínas quinasas, como las flavonas miricetina y quercetina, la isoflavona biochanina A, tirfostinas y lavendustinas, afectan la actividad de los transportadores de glucosa GLUT1, inhibiendo la incorporación de glucosa y sus análogos en eritrocitos humanos intactos (Strobel, 1996; Iribarren, 1997; Vera *et al.*, 2001).

De los inhibidores conocidos para GLUT1, sin duda el más ampliamente utilizado con fines experimentales es citocalasina B. Este alcaloide, producido por algunos hongos, es capaz de inhibir el transporte de glucosa con un K_i aparente cercano a 0,1 μM (Bloch, 1973b). Sin embargo, la utilización de citocalasina B no está exenta de ciertas complicaciones prácticas debido a que se une también a filamentos de actina e induce la desorganización del citoesqueleto, generando así cambios significativos en la fisiología celular. Afortunadamente, se han descubierto, a través de ensayos realizados en eritrocitos humanos, una serie de análogos de citocalasina B, los que si bien también se unen a filamentos de actina, no se ligan al transportador de glucosa. Compuestos como citocalasina E, citocalasina D y deshidrocitocalasina B son ejemplos de estos últimos y por tanto, son de suma utilidad como controles de la unión de citocalasina B a GLUT1 (Jung y Rampal, 1977; Rampal *et al.*, 1980).

En eritrocitos humanos se ha mostrado que citocalasina B disminuye en forma reversible el influjo, a través de la membrana plasmática, de los aminoácidos aromáticos L-triptófano y L-tirosina (Widmer *et al.*), lo cual podría sugerir algún tipo de relación funcional entre el transportador facilitativo de hexosas GLUT1 y el sistema T de transporte de aminoácidos aromáticos descrito en la membrana del eritrocito humano. Es en este mismo contexto que Sofue *et al.* describieron que existía una estrecha relación funcional entre la incorporación de nicotinamida y los transportadores facilitativos de hexosas (Sofue *et al.*, 1991). Los estudios descritos por el grupo de Sofue daban cuenta de una inhibición dosis dependiente de la incorporación de nicotinamida por la presencia del análogo de glucosa 2-desoxi-D-glucosa, utilizando como modelo experimental un cultivo en monocapa de células β -pancreáticas de rata. El ensayo recíproco, es decir la incorporación de 2-desoxi-D-glucosa en presencia de

nicotinamida, mostraba una inhibición similar, llegando inclusive a determinarse que las concentraciones necesarias para conseguir el 50% de inhibición en cada caso eran equivalentes para ambos compuestos (2,5 mM).

Sin embargo, dado que existen numerosas complicaciones que dificultan el análisis de sistemas de transporte en células enteras, Sofue y su grupo decidieron abordar la caracterización del transporte de nicotinamida utilizando para ello un modelo experimental diferente; vesículas lipídicas reconstituidas a partir de membranas de eritrocitos humanos (Sofue *et al.*, 1992). Los análisis cinéticos realizados tanto para las captaciones de D-glucosa y de nicotinamida, mostraron valores similares para K_M y V_{max} de 6,0 mM y 2,8 mmol min⁻¹ mg proteína⁻¹ respectivamente, para D-glucosa y de 7,5 mM y 3,6 mmol min⁻¹ mg proteína⁻¹ respectivamente para nicotinamida. Adicionalmente, se caracterizó una inhibición de tipo competitivo por nicotinamida, de la incorporación de D-glucosa, estimándose un valor aproximado para K_i del orden de 13 mM. Al ensayar el efecto tanto de D-glucosa como de nicotinamida sobre la unión de citocalasina B al transportador de hexosas de eritrocitos humanos, se verificó con ambos una inhibición del tipo dosis dependiente (Sofue *et al.*, 1992). Con esta evidencia, los autores afirmaron que la entrada de nicotinamida hacia el interior del eritrocito humano era facilitada por el transportador facilitativo de hexosas GLUT1 presente en su membrana, sosteniendo por consiguiente que el transportador en cuestión poseía una función alternativa a la de transporte de glucosa.

En términos metabólicos, nicotinamida es incorporada eficientemente en células animales como NAD(P) (Bernofsky, 1980). Aún cuando existen datos que sugieren la existencia de un sistema de transporte específico para esta vitamina al nivel de la membrana plasmática, se desconocen las propiedades de este posible sistema de transporte. Sin embargo, la estructura de nicotinamida es muy diferente de la de los sustratos reconocidos de GLUT1, como azúcares y ácido deshidroascórbico. Por otra parte las concentraciones fisiológicas de nicotinamida son mucho menores que el valor de K_M descrito para el putativo transporte de nicotinamida mediado por GLUT1. Estos antecedentes hacen necesario reevaluar la participación de GLUT1 en el transporte de nicotinamida.

Basados en estas premisas, en esta oportunidad planteamos probar la siguiente hipótesis: Existe en la membrana plasmática de los eritrocitos humanos un sistema de transporte para nicotinamida, el cual es saturable, pero que es independiente del transportador facilitativo de hexosas GLUT1.

Para probar esta hipótesis, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- a) Estudiar las características del transporte de nicotinamida en eritrocitos humanos y vesículas selladas.
- b) Probar el efecto de sustratos de GLUT1 sobre el transporte de nicotinamida, así como el efecto de nicotinamida sobre el transporte de hexosas.
- c) Probar si algunos compuestos que bloquean la actividad funcional de GLUT1, afectan el transporte de nicotinamida en eritrocitos humanos.

En acuerdo a lo anterior, en esta tesis determinaremos algunos parámetros cinéticos que nos permitan caracterizar el transporte de nicotinamida tanto en eritrocitos humanos enteros como en vesículas lipídicas de orientación normal e invertida. Además de esto, nos propusimos desarrollar una serie de estudios con el objeto de verificar la putativa participación del transportador facilitativo de hexosas GLUT1 en el mecanismo de captación de nicotinamida tanto en eritrocitos humanos intactos como en vesículas lipídicas preparadas a partir de membranas aisladas de eritrocitos. Para ello realizaremos ensayos que nos permitan evaluar algún efecto de nicotinamida sobre el transporte de algunos análogos de glucosa, efectivamente transportados vía GLUT1, como son 2-desoxi-D-glucosa y 3-O-metil-D-glucosa. Por otra parte, llevaremos a cabo estudios que evalúen algún posible efecto de los sustratos de GLUT1 sobre el transporte de nicotinamida y adicionalmente analizaremos los efectos de reconocidos compuestos inhibidores funcionales del transportador GLUT1 sobre el proceso de incorporación de nicotinamida.

Complementariamente, estudiaremos el efecto de nicotinamida sobre la unión de citocalasina B a GLUT1, para probar si nicotinamida se une en forma directa al transportador facilitativo de hexosas GLUT1.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Materiales.

Nicotinamida, 2-desoxi-D-glucosa (DOG), 3-O-metil-D-glucosa (OMG), L-glucosa, D-glucosa, L-triptófano, L-leucina, citocalasina B, citocalasina E, ácido etilenglicol-bis-(b-amino-etil-eter)-N-tetracético (EGTA), ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinaetano sulfónico (Hepes), floretina, ditiotreitól, dimetilsulfóxido (DMSO), dextran T-70, 2,5-difenil-oxazol (PPO), tritón X-100 y sodio dodecil sulfato (SDS), fueron obtenidos de Sigma Chemicals Co.

Acido clorhídrico, cloruro de calcio, cloruro de mercurio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio, tolueno, metanol, fosfato ácido de sodio, fosfato diácido de sodio, hidróxido de sodio, sulfato de magnesio, yoduro de potasio y 2,2'-p-fenil-bis(5-fenil-oxazol) (POPOP) fueron adquiridos a Merck Química.

Los isótopos radioactivos 3-O-[metil-³H]D-glucosa (86,7 Ci/mmol), 2-[1,2-³H]desoxi-D-glucosa (26,2 Ci/mmol), y [4-³H]citocalasina B (11,9 Ci/mmol) fueron obtenidos de DuPont NEN, mientras que el isótopo radioactivo [¹⁴C]nicotinamida (45,4 mCi/mmol), se obtuvo en Sigma Radiochemicals.

Todas las soluciones se prepararon con agua desionizada con una conductancia entre 0,2 - 0,3 mS, y posteriormente fueron esterilizadas en autoclave.

3.2. Aislamiento de los eritrocitos.

Las muestras de sangre total contenían dextrosa, adenina y además citrato de sodio como anticoagulante. Fueron donadas por la unidad de Banco de Sangre del Hospital Regional de Valdivia y previo a cada ensayo se procedió al aislamiento de eritrocitos humanos según lo descrito (Fairbanks *et al.*, 1971), a partir de la sangre total.

Se lavó una muestra de sangre total por medio de una batería de tres centrifugaciones sucesivas con solución de lavado (amortiguador fosfato de sodio 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4 a 4°C), utilizando para este propósito una centrífuga Sorvall RC-2B y rotor HB-4, estableciendo cada ciclo de lavado a 5000 rpm, 4°C por 10 min. Los eritrocitos sedimentaron completamente, depositándose sobre ellos una capa blanquecina correspondiente a leucocitos y plaquetas, la cual se extrajo completamente por medio de aspiración suave. Se extrajo además la capa de eritrocitos inmediatamente adyacente, con el fin de asegurar la remoción completa de cualquier tipo celular no eritrocítico. Una vez finalizado el último ciclo de lavado, los eritrocitos se resuspendieron en tampón de lavado y se almacenaron entre 0 y 4°C para su posterior utilización (no más de 2 días).

3.3. Preparación de membranas de eritrocitos.

Para la obtención de membranas de eritrocitos libres de citoplasma, se procedió según lo descrito por Steck y Kant (Steck y Kant, 1974). Una vez separados se llevaron los eritrocitos a tubos de centrífuga de 250 ml, a los cuales se adicionó enérgicamente 20-25 volúmenes de solución de lisis (Hepes 5 mM, pH 7,4 a 4°C), incubando a 4°C por 10 min con agitación esporádica. Los fragmentos de membrana así generados se colectaron por centrifugación en centrífuga Sorvall RC-5C *plus*, a 11.000 rpm en rotor GSA a 4°C por 40 min. Se descartó el sobrenadante y se traspasaron las membranas a un nuevo tubo de 250 ml con el objeto de evitar la presencia de un precipitado compacto de difícil resuspensión. Por último se volvieron a resuspender las membranas en tampón de lisis para iniciar un nuevo ciclo de lavado. Con el objeto de eliminar restos citosólicos se repitió el proceso antes descrito de 8 a 10 veces, de manera tal de obtener un precipitado casi translúcido. Se procedió a resuspender los fragmentos de membrana, en tampón de lisis, para la determinación de proteínas y se almacenaron a -20°C para su posterior utilización.

3.4. Preparación de vesículas de membrana de eritrocitos.

Se prepararon vesículas normales y vesículas invertidas como lo describió Jarvis (Jarvis, 1988), basado en el método de Steck y Kant (Steck y Kant, 1974).

3.4.1. Preparación de las vesículas de orientación normal.

A partir de una suspensión de membranas preparadas como se describió en 3.2.2, con una concentración aproximada de 3 mg de proteína/ml, se tomó una alícuota de 6 a 8 ml, la cual se llevó a un volumen total de 120 ml con medio de vesiculación - normales (Hepes 0,5 mM, pH 8,0 a 4°C). Esta mezcla se incubó en cámara fría (4°C), con agitación suave, por 30 min. Luego, se le adicionó una alícuota de MgSO_4 200 mM para obtener una concentración final de Mg^{2+} 0,1 mM; esta suspensión fue traspasada a un tubo de centrifuga de 250 ml, para colectar las membranas por centrifugación (11.000 rpm, 40 min a 4°C), en centrifuga Sorvall RC-5C *plus* con rotor GSA. Se descartó el sobrenadante y las membranas se resuspendieron en aproximadamente 4 ml de Hepes 0,5 mM, MgSO_4 0,1 mM, pH 8,0. Se homogeneizó el tamaño de las vesículas, al pasar la mezcla a través de una aguja N° 27, procedimiento que se repitió 10 veces en cada oportunidad. Una vez concluido este tratamiento, se agregó una alícuota de 4 ml del amortiguador, de manera de obtener un volumen total de 8 ml. De esta última suspensión se agregaron, sin mezclar, 2 ml sobre un volumen de 3 ml de solución 4,5 % p/v de Dextrano T-70 en tampón Hepes 0,5 mM, MgSO_4 0,1 mM, pH 8,0 contenido en un tubo centrifuga de propileno de 13 ml. Se procedió entonces a la separación de las vesículas selladas del resto de las membranas no vesiculadas y otros contaminantes (hemoglobina remanente, etc.) por medio de una única centrifugación a 24.000 rpm, por 1 hora a 4°C, en ultra centrifuga Sorvall OTD-COMBI con rotor TH-641. Las vesículas selladas se recuperaron de la interfase solución-Dextran por medio de aspiración suave, utilizando para ello una pipeta Pasteur. Luego las vesículas selladas se lavaron dos veces con solución Hepes 0,5 mM, pH 8,0, centrifugándolas a 12.000 rpm y 4°C, por 12 min en cada oportunidad, en centrifuga Sorvall RC-5C *plus* con rotor SS-34. Por último, las vesículas se resuspendieron en 4 ml de solución Hepes 5 mM, pH 7,8, se determinó la concentración de proteínas y finalmente se almacenaron por no más de 4 días entre 0 y 4°C hasta ser utilizadas.

3.4.2. Preparación de las vesículas de orientación invertida.

A partir de una suspensión de membranas preparada según lo descrito en 3.2.2 se tomó una alícuota de 4 a 6 ml (3 mg de proteínas/ml), y se llevó a un volumen final aproximado de 130

ml con medio de vesiculación - invertidas (Hepes 0,5 mM, EGTA 0,5 mM, pH 8,4) precalentado a 35°C. La suspensión así obtenida se incubó por espacio de 15 min a 35°C, período en el cual se procedió al traspaso de la preparación a un tubo de centrifuga de 250 ml con el objeto de sedimentar la totalidad de la muestra por centrifugación a 11.000 rpm, a 4°C por 40 min, en centrifuga Sorvall RC-5C *plus* con rotor GSA. El sedimento obtenido entonces, se resuspendió en 4 ml de medio de vesiculación - invertidas frío, procediendo luego a homogeneizar el tamaño de las vesículas por medio de 10 pasajes sucesivos a través de una aguja N° 27. A continuación, la suspensión de vesículas homogéneas se llevó a 8 ml de volumen total con medio de vesiculación invertidas, tomándose 2 ml de esta última preparación para ser depositados sobre 3 ml de solución 4,5 % p/v de Dextran T-70 en Hepes 0,5 mM, MgSO₄ 0,1 mM, pH 8,0, contenida en un tubo de propileno de 13 ml. Se siguió en adelante el procedimiento descrito para vesículas normales, con el fin separar las vesículas selladas.

3.5. Cinéticas de la entrada de 3-O-metil-D-glucosa, 2-desoxi-D-glucosa y nicotinamida en eritrocitos humanos enteros.

3.5.1. Cinéticas de los transportes de 3-O-metil-D-glucosa y de 2-desoxi-D-glucosa.

Los ensayos de transporte de 3-O-metil-D-glucosa y 2-desoxi-D-glucosa se iniciaron por medio de la adición de un volumen de 180 µl de una suspensión de eritrocitos (aproximadamente 220×10^6 células/ml) sobre 20 µl de una mezcla de hexosa radioactiva (1,2 µCi/ensayo) y fría, a una concentración final de 0,5 mM por ensayo. Después de alcanzado el tiempo de incubación se procedió a la detención del transporte por medio de la dilución de la mezcla con solución de transporte (Hepes 5 mM, NaCl 150 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 2 mM, pH 7,4 a 4°C), seguida de una rápida centrifugación a 10,000 rpm por 10 seg a 4 °C en microcentrífuga Eppendorf. Se removió el sobrenadante por aspiración y se procedió al lavado de los eritrocitos con la misma solución de transporte. Una vez finalizado el tercer lavado se adicionó una alícuota de 200 µl de metanol 100%, con el objeto de lisar los eritrocitos, precipitar proteínas, y de esta forma liberar la radioactividad contenida en ellos. Finalmente, luego de una última centrifugación, esta vez a 10,000 rpm por 5 min. y 4 °C, se tomó una alícuota de 150 µl de sobrenadante vertiéndose dentro

de viales de vidrio en los que se agregó 1,5 ml de mezcla de centelleo soluble para cuantificar la radioactividad presente por medio de un contador de centelleo Packard Tri-Carb 1600 TR.

3.5.2 Cinética del transporte de nicotinamida.

Los ensayos de transporte de nicotinamida comenzaron mediante la adición de una alícuota de 180 μ l de una suspensión de eritrocitos sobre una mezcla de 20 μ l que contiene nicotinamida radioactiva (1 μ Ci/ensayo) y fría, en cantidad suficiente para alcanzar una concentración final en el ensayo de 1 mM. Una vez transcurrido el tiempo establecido en la cinética se procedió a detener la reacción de transporte mediante la adición de una alícuota de 1,2 ml de solución de transporte. Se centrifugó la muestra en una microcentrífuga refrigerada a 10,000 rpm por espacio de 10 seg a 4 °C y se retiró por aspiración el sobrenadante. Se procedió a efectuar una serie de 3 lavados con el mismo tampón de transporte, con el objeto de eliminar la radioactividad presente en el entorno de las células. Por último se agregó una alícuota de 200 μ l de metanol 100% con agitación fuerte y se realizó una última centrifugación a 10,000 rpm por 5 min. a 4 °C. Luego, una alícuota de 150 μ l del sobrenadante se llevó a un vial de vidrio, al cual se agregó 1,5 ml de mezcla de centelleo soluble para determinar radioactividad en contador de centelleo Packard Tri-Carb 1600 TR.

3.6. Cinética de la incorporación de hexosas y nicotinamida en vesículas normales e invertidas.

Los ensayos de transporte de 3-O-metil-D-glucosa y de 2-desoxi-D-glucosa en las vesículas fueron realizados conforme al protocolo descrito por Jarvis (1988), el cuál contempla un método de filtración.

3.6.1. Cinéticas del transporte de 3-O-metil-D-glucosa y de 2-desoxi-D-glucosa.

Se inició el ensayo por la adición de 170 μ l de una suspensión de vesículas (100 μ g de proteínas) a un tubo Eppendorf que contenía 30 μ l de una mezcla de hexosa radioactiva (1,2

$\mu\text{Ci/ensayo}$) y fría, a una concentración final de 0,5 mM. En el tiempo requerido se detiene el transporte por la rápida adición de 1,2 ml de solución de detención (Hepes 5 mM, floretina 100 μM , HgCl_2 2 μM , KI 1,5 mM, citocalasina B 10 μM , pH 8,0), seguida por la filtración inmediata de la mezcla en filtros de fibra de vidrio GF/C-Whatman, montados sobre un sistema de filtración por vacío Cole-Parmer. Posteriormente, se lavaron los filtros tres veces con solución de detención a 4 °C. Una vez lavados, los filtros se secaron a 40°C por 12 h y se llevaron a viales de vidrio, en los que se adicionó 3 ml de mezcla de centelleo precipitable. La radioactividad retenida en los filtros se midió en un contador de centelleo Packard Tri-Carb 1600 TR.

En cada experimento se realizó un ensayo de tiempo 0 seg. Para ello, previo al ensayo se preincubaron las vesículas (170 μl de suspensión) en solución de detención (1,2 ml) por 10 min. Se agregó esta suspensión de vesículas sobre la mezcla radioactiva e inmediatamente se filtró la muestra, prosiguiendo con el resto del procedimiento descrito.

3.6.2. Cinética del transporte de nicotinamida.

Los ensayos cinéticos para nicotinamida se realizaron de acuerdo a lo presentado por Jarvis (Jarvis, 1988), es decir, utilizando un método de filtración. Se comenzó la reacción agregando 170 μl de una suspensión de vesículas (100 μg de proteínas) sobre 30 μl de una mezcla de nicotinamida radioactiva (1 $\mu\text{Ci/ensayo}$) y fría, considerando una concentración final de nicotinamida en el ensayo de 1,0 mM. La detención del transporte se produjo mediante la adición de 1,2 ml de solución de detención, seguida por la filtración inmediata de la mezcla en filtros de fibra de vidrio GF/C-Whatman, montados sobre un sistema de filtración por vacío Cole-Parmer. Los filtros se lavaron tres veces con solución de detención a 4 °C y luego se secaron en estufa Pasteur por espacio de 12 h. Por último se traspasaron los filtros a viales de vidrio donde se les adicionaron 3 ml de mezcla de centelleo precipitable, para y de esta forma determinar la radioactividad retenida en ellos mediante un contador de centelleo Packard Tri-Carb 1600 TR.

3.7. Ensayos de transporte en eritrocitos humanos enteros.

3.7.1. Transporte de hexosas en eritrocitos en presencia de nicotinamida.

Una vez caracterizadas las cinéticas respectivas, se procedió a ensayar el efecto de nicotinamida sobre el transporte de análogos de glucosa, 3-O-metil-D-glucosa y 2-desoxi-D-glucosa. Se ensayó la incorporación a un tiempo fijo de transporte para el análogo de glucosa, enfrentado a un rango de concentraciones crecientes de nicotinamida entre 0- 50 mM.

Este tipo de ensayo comenzó por la adición de 180 μ l de suspensión de eritrocitos (aproximadamente 220×10^6 células/ml) sobre una pre-mezcla que contenía el análogo de glucosa radioactivo (1,2 μ Ci/ensayo) y frío, considerando una concentración final del análogo en el ensayo de 0,5 mM. Además la pre-mezcla contenía alícuotas variables de nicotinamida de manera tal de conseguir concentraciones finales en el ensayo de 0, 10, 20, 30, 40 y 50 mM. Una vez transcurrido el tiempo de incubación correspondiente, se procedió a detener el transporte por medio de la dilución de la mezcla de reacción con 1,2 ml de solución de transporte e inmediatamente se centrifugó la muestra en microcentrífuga Eppendorf a 10,000 rpm por 10 seg a 4 °C. El precipitado resultante se lavó tres veces con la misma solución, procediéndose por último a la adición de metanol 100% sobre el precipitado final. Luego de agitar y centrifugar a 10.000 rpm por 5 min. en microcentrífuga a 4 °C, de manera similar a lo descrito en puntos anteriores, se tomó una alícuota de 150 μ l del sobrenadante final y se llevó a un vial de vidrio, agregando posteriormente 1,5 ml de mezcla de centelleo soluble para la posterior determinación de radioactividad almacenada.

3.7.2. Transporte de nicotinamida en presencia de los análogos de glucosa.

Los ensayos de transporte de nicotinamida en eritrocitos fueron realizados según lo descrito en 3.2.8, considerando esta vez una pre-mezcla con nicotinamida radioactiva (1 μ Ci/ensayo) y fría para alcanzar una concentración por ensayo de 1 mM. El rango utilizado para

los análogos de glucosa fue el mismo empleado para la nicotinamida en los ensayos recíprocos, entre 0 y 50 mM.

3.7.3. Transporte de nicotinamida en presencia de aminoácidos.

Ensayos de transporte de nicotinamida en presencia de hexosas o aminoácidos (L-leucina y L-triptófano) tanto en vesículas normales como invertidas, se realizaron según lo descrito, pero agregando estos compuestos a las pre-mezclas, en cantidades suficientes para alcanzar las concentraciones finales que se muestran en las figuras respectivas.

3.7.4. Transporte de nicotinamida en presencia de tetraetilamonio.

Para probar si la captación de nicotinamida involucra a los transportadores de cationes orgánicos, decidimos ensayar el posible efecto inhibitorio que tetraetilamonio podría ejercer sobre el transporte de nicotinamida en eritrocitos humanos intactos. Este ensayo se realizó en forma análoga a la descrita en 3.2.9 pero esta vez consideró un rango de concentraciones para tetraetilamonio comprendido entre 0 y 20 mM y a 4 °C como temperatura de ensayo.

3.8. Ensayos de transporte de hexosas y nicotinamida en vesículas selladas.

Los ensayos de transporte de análogos de glucosa tanto en vesículas normales como invertidas contemplaron un método de filtración, de acuerdo a lo descrito por Jarvis (Jarvis, 1988). Según el análisis de las cinéticas correspondientes se determinó un período de 5 seg como tiempo para el transporte.

3.8.1. Transporte de hexosas en presencia de nicotinamida, en vesículas normales e invertidas.

El ensayo contempla una pre-mezcla que contiene el análogo de glucosa radioactivo (1,2 μ Ci/ensayo) y frío, estimando una concentración final en el ensayo de 0,5 mM; siendo el

volumen total de pre-mezcla por tubo 30 μ l. Es importante considerar además que el rango de concentraciones finales por ensayo para nicotinamida se ubica entre 0 – 50 mM. Sobre los 30 μ l de pre-mezcla se adicionaron 170 μ l de suspensión de vesículas (100 μ g proteína/ml) permitiéndose el transporte por espacio de 5 seg. Se detuvo la reacción por la adición de 1,2 ml de solución de detención y filtración inmediata de las mezclas en filtros de fibra de vidrio GF/C-Whatman, montados sobre un sistema de filtración por vacío Cole-Parmer. Los filtros se lavaron tres veces con la misma solución y se dejaron secar por 12 h en estufa Pasteur. Posteriormente, los filtros se llevaron a viales de vidrio en los que se agregó 3 ml de mezcla de centelleo precipitable para finalmente, cuantificar la radioactividad retenida en los filtros por medio de un contador de centelleo Packard Tri-Carb 1600 TR.

3.9. Ensayos de la saturación del transporte de nicotinamida.

3.9.1. Curvas de saturación en eritrocitos humanos.

Los ensayos de saturación se realizaron considerando un rango de concentraciones para nicotinamida entre 0 y 50 mM. Para dar inicio al ensayo se agregó un volumen de 180 μ l de suspensión de eritrocitos 245×10^6 células/ml, sobre 20 μ l de una pre-mezcla que contenía 1 μ Ci de [14 C]-nicotinamida, nicotinamida fría, en una proporción adecuada para alcanzar las concentraciones deseadas y 50×10^6 células por ensayo. Se permitió la reacción por espacio de 10 seg y a una temperatura de 4 °C, período en el cabo se procedió a detener la reacción por medio de la adición de 1,2 ml de solución de transporte fría. Posteriormente se procedió a la centrifugación de la muestra, la cual se lavó con el mismo tampón de transporte 3 veces. Finalmente se agregó una alícuota de 200 μ l de metanol 100% y se procesó para determinación de radioactividad incorporada.

3.9.2. Cinéticas de saturación en vesículas normales e invertidas.

Estos ensayos se realizaron considerando un intervalo de concentración de nicotinamida comprendido entre 0 y 50 mM. Se inició la reacción por la adición de 180 μ l de una suspensión

de vesículas (170 µg de proteína) sobre una premezcla que contiene 1 µCi [¹⁴C]-nicotinamida y nicotinamida fría suficiente para alcanzar las concentraciones requeridas en el ensayo. Se dejó transcurrir la reacción por espacio de 5 seg y a una temperatura de 4 °C, finalmente se detuvo la reacción mediante la adición de 1,2 ml de tampón de transporte frío, procediendo inmediatamente a la filtración y lavado de las vesículas para su posterior procesamiento con el fin de determinar la radiactividad asociada a ellas.

3.10. Ensayos de desplazamiento de la unión de citocalasina B a membranas de eritrocitos.

Para determinar la unión de citocalasina B al transportador, se trabajó sobre la base de lo descrito por Gorga y Lienhard (Gorga y Lienhard, 1981), Lavis *et al.* (Lavis *et al.*, 1987) y Vera *et al.* (Vera *et al.*, 1996). La unión específica de citocalasina B a los transportadores de glucosa funcionales fue estimada por la diferencia entre las uniones en presencia de D-sorbitol 500 mM, que corresponde a la unión total, y en presencia de D-glucosa 500 mM, que representa la unión inespecífica de citocalasina B a las membranas aisladas de eritrocitos humanos.

Una cantidad de membranas aisladas, equivalentes a 38 µg de proteínas se incubó en un medio cuya composición final correspondía a fosfato de sodio 10 mM, pH 7,4, CCB 0,1 mM, 0,05 µCi [4-³H]-citocalasina B, citocalasina E 10 µM (utilizada en alta concentración con el objeto de evitar la unión inespecífica de citocalasina B a filamentos de actina (Jung y Rampal, 1977), 500 mM D-sorbitol (unión total) o D-glucosa (unión inespecífica) y un intervalo de concentraciones de nicotinamida entre 0 y 5 mM. Esta mezcla se incubó por 20 min a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 20.000 rpm a 4°C por 15 min, en microcentrífuga Eppendorf refrigerada. Finalmente, se descartó el sobrenadante, y el sedimento fue resuspendido en 200 µl de Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, SDS 0.2 %, siendo transferido por completo a un vial de vidrio al que se agregó 2 ml de mezcla de centelleo soluble y de esta forma determinar la radioactividad asociada a las membranas. La unión inespecífica de citocalasina B a GLUT1 corresponde a la diferencia entre la unión total (en presencia de D-sorbitol 0,5 M) y unión inespecífica (en presencia de D-glucosa 0,5 M).

3.11. Otras determinaciones.

Las cantidad de proteínas se determinó por el procedimiento de Bradford (Bradford, 1976), usando albúmina sérica de bovina como estándar.

4. RESULTADOS

4.1. Ensayos de transporte en eritrocitos humanos.

4.1.1. Incorporación de nicotinamida, 2-desoxi-D-glucosa y 3-O-metil-D-glucosa.

Para realizar un análisis cinético detallado se debe caracterizar el comportamiento cinético del transporte de nicotinamida en eritrocitos humanos, para determinar el periodo en el cual el transporte sea función lineal del tiempo, es decir, se requiere normar las condiciones de velocidad inicial. En otras palabras, es necesario determinar condiciones experimentales que nos permitan establecer claramente la diferencia entre el proceso de transporte en sí mismo y la putativa acumulación celular del sustrato. Por esto, comenzamos nuestro estudio analizando en detalle las características cinéticas asociadas al transporte tanto de nicotinamida, como de los sustratos de GLUT1 3-O-metil-D-glucosa y 2-desoxi-D-glucosa, en eritrocitos humanos intactos.

La figura 1 muestra la captación en eritrocitos de los tres sustratos en función del tiempo. El panel A corresponde a la captación de nicotinamida. Se pudo verificar que la incorporación de nicotinamida en eritrocitos intactos es un proceso más bien rápido, en el que la fase lineal de captación del sustrato no supera los 10 seg y cuya etapa de equilibrio se establece luego de transcurridos 60 seg de iniciada la reacción.

El panel B nos muestra la entrada de 2-desoxi-D-glucosa (DOG) a eritrocitos humanos en función del tiempo. En este caso la incorporación también es relativamente rápida por cuanto tan sólo son necesarios 20 seg para alcanzar el valor medio de la concentración de desoxi-glucosa en equilibrio. Adicionalmente visualizamos que la velocidad de transporte exhibe un incremento lineal durante los primeros 15 seg del ensayo, período al cabo del cual se observa la aparición de un segundo componente cinético. Este segundo componente lo atribuimos a la acumulación intracelular de 2-deoxi-D-glucosa en forma de 2-desoxi-D-glucosa-6-fostato.

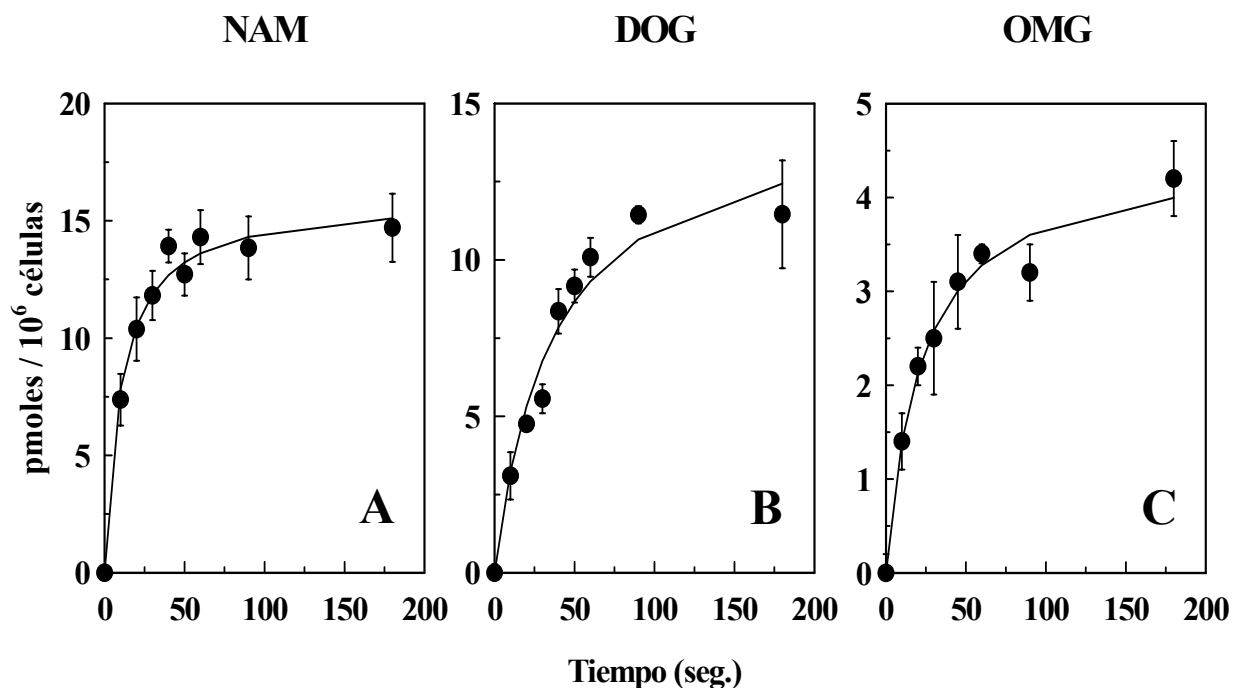


Figura 1. Cinéticas de las incorporaciones de nicotinamida, 2-desoxi-D-glucosa y 3-O-metil-D-glucosa en eritrocitos humanos enteros en ensayos de entrada. Los ensayos se realizaron en condiciones cero-trans, a 4°C, empleando una cantidad de células cercana a $42,5 \times 10^6$ células por ensayo y 0,8-1,2 μCi por ensayo de los respectivos sustratos radiactivos. **(A)** Incorporación de 1 mM nicotinamida (NAM). **(B)** Incorporación de 0,5 mM 2-desoxi-D-glucosa (DOG). **(C)** Incorporación de 0,5 mM 3-O-metil-D-glucosa (OMG). Cada determinación se realizó en cuadruplicado y se representa el valor del promedio \pm una desviación estándar.

El panel C exhibe la cinética de entrada de 3-O-metil-D-glucosa (OMG) en eritrocitos humanos. En este caso el transporte muestra un único componente cinético, el cual muestra una fase de incremento lineal durante los primeros 15 seg de reacción. El equilibrio se alcanza aproximadamente a los 180 seg.

Como resultado de estos ensayos cinéticos preliminares podemos concluir que los tiempos adecuados para realizar nuestros ensayos en eritrocitos humanos se encuentran entre 5 y 10 seg, tanto para nicotinamida como para los análogos de glucosa.

4.1.2. Saturación del transporte de nicotinamida.

Para determinar los parámetros cinéticos asociados al transporte de nicotinamida en eritrocitos humanos intactos, medimos la incorporación de nicotinamida en un intervalo de concentraciones entre 0 y 50 mM, en un tiempo de reacción de 10 seg. El resultado de estos ensayos se presenta en la figura 2. En el panel A podemos apreciar que la captación de nicotinamida por la célula roja humana es un proceso saturable, por lo que la captación no es un fenómeno de simple difusión, sino que involucra necesariamente la participación directa de un transportador. En otras palabras, nicotinamida es incorporado al eritrocito humano por un sistema de transporte particular presente en sus membranas.

El panel B nos presenta el análisis de v en función de v/S (gráfico de Hanes-Wolff) para los datos mostrados en el panel A. Nicotinamida es incorporada a la célula roja con una $V_{max} = 52$ pmoles/(10^6 células \times min) y, con un valor aparente para K_M de 5,5 mM.

4.1.3. Incorporación de 2-desoxi-D-glucosa y 3-O-metil-D-glucosa en presencia de nicotinamida y de análogos de glucosa.

En estos ensayos se midió a 4°C la incorporación de 2-desoxi-D-glucosa y de 3-O-metil-D-glucosa 0,5 mM en eritrocitos humanos intactos, en presencia de diferentes concentraciones de nicotinamida en un rango de 0 a 50 mM. Como control se probó la competencia por hexosas

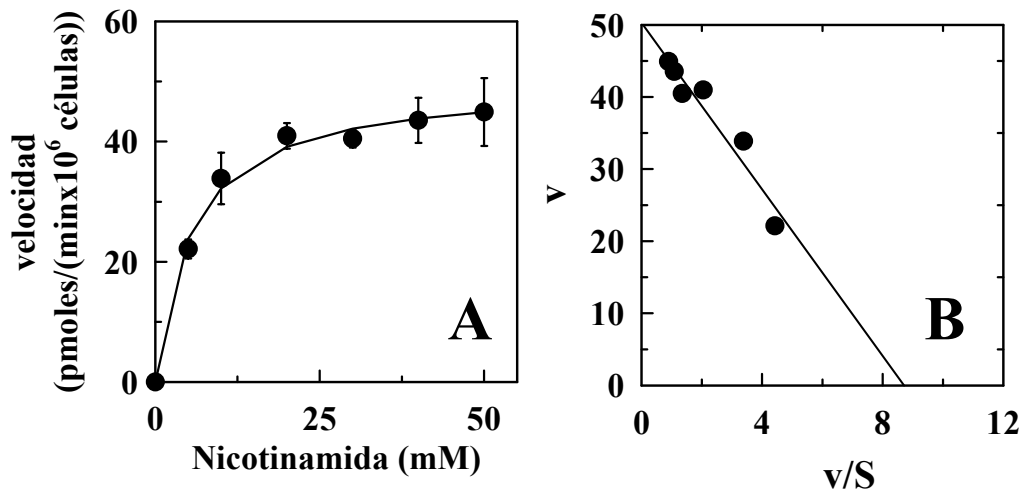


Figura 2. Curva de saturación de la velocidad de entrada de nicotinamida en eritrocitos humanos enteros. Se midió la velocidad de entrada de nicotinamida durante 10 seg y a una temperatura de 4 °C en eritrocitos humanos, en presencia de distintas concentraciones de sustrato frío y de 1 μ Ci de [¹⁴C]nicotinamida. **(A).** Curva de saturación. **(B)** Gráfico de v en función de v/S (gráfico de Hanes-Wolff) para los datos del panel A. Se pudo calcular un valor de K_M aparente de 5,5 mM y un valor de V_{max} cercano a 52 pmoles/(min × 10⁶ células).

reconocidas como sustratos del transportador GLUT1. Para ello se usaron concentraciones entre 0 y 50 mM, tanto de D-glucosa, el cual corresponde al sustrato natural del transportador, como de 3-O-metil-D-glucosa, el cual se reconoce como otro sustrato de GLUT1 (Bell *et al.*, 1993). Se ensayó además L-glucosa, metabolito incapaz de ser transportado por medio de GLUT1, a manera de control del efecto nulo sobre el transporte mediado por este transportador.

Los resultados se resumen en la figura 3. El panel A muestra el efecto de nicotinamida y de los azúcares sobre el transporte de 2-desoxi-D-glucosa en eritrocitos humanos, mientras el panel B exhibe los resultados usando 3-O-metil-D-glucosa como sustrato. Nicotinamida y L-glucosa no ejercieron efecto alguno sobre el transporte de 2-desoxi-D-glucosa o de 3-O-metil-D-glucosa en estas células. En contraste, D-glucosa produce una marcada disminución en la incorporación tanto de 3-O-metil-glucosa como 2-desoxi-D-glucosa, con niveles de inhibición máxima del orden del 90% cuando la concentración de D-glucosa alcanzó a 50 mM. Esta competencia se puede apreciar también para los análogos 3-O-metil-D-glucosa y 2-desoxi-D-glucosa, alcanzándose en ambos casos una inhibición cercana al 80% cuando la concentración del azúcar fue de 50 mM.

Estos datos sugieren convincentemente que el transporte de nicotinamida en eritrocitos humanos intactos no se encontraría ligado a la participación del transportador facilitativo de hexosas GLUT1, responsable de la entrada de las hexosas. Como esta conclusión se contrapone a lo descrito por Sofue *et al.* (Sofue *et al.*, 1992), surge la necesidad de evaluar en detalle el transporte de nicotinamida en este sistema.

4.1.4. Incorporación de nicotinamida en presencia de azúcares.

Si nicotinamida utiliza como vía de ingreso a la célula roja un mecanismo que involucra la participación del transportador de glucosa GLUT1, entonces es de esperar que exista competencia entre la nicotinamida y los análogos de glucosa.

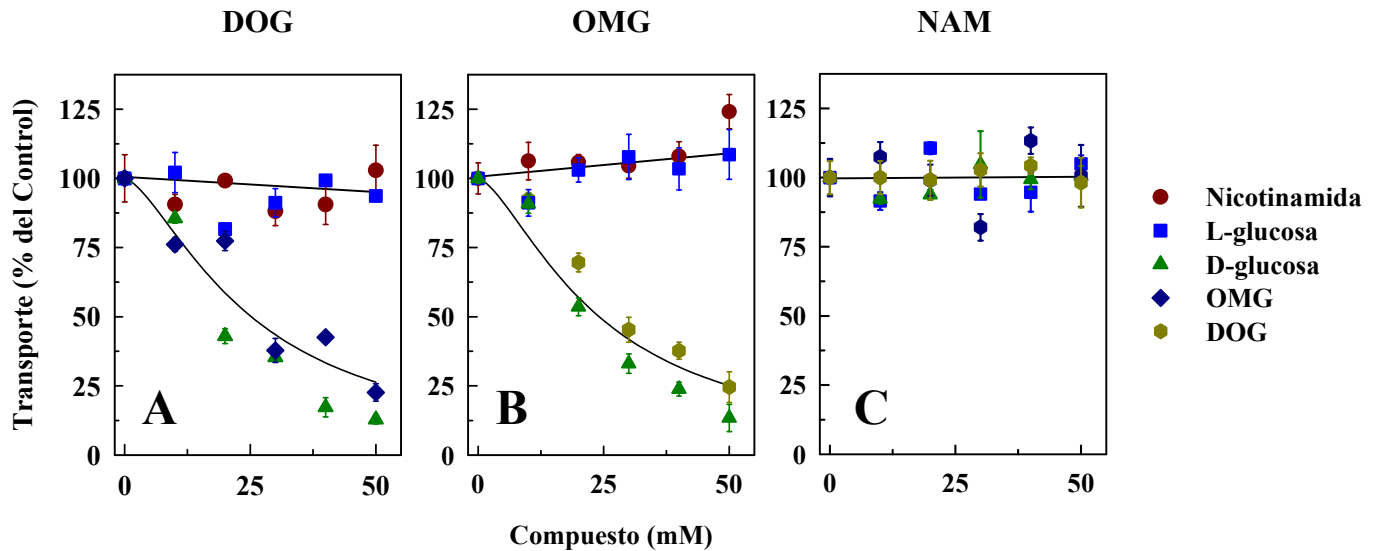


Figura 3. Efecto de hexosas y de nicotinamida sobre transporte de entrada de 2-desoxi-D-glucosa, 3-O-metil-D-glucosa y nicotinamida en eritrocitos humanos enteros. Se midió el transporte de entrada de 2-desoxi-D-glucosa, 3-O-metil-D-glucosa y de nicotinamida en ausencia (controles, 100% de transporte) o en presencia de las concentraciones de compuestos que se indican. La temperatura de los ensayos fue de 4°C y la cantidad de células empleada en cada ensayo fue de $47,2 \times 10^6$ células. Cada determinación se realizó en cuadruplicado y se representa el valor del promedio \pm una desviación estándar. **(A)** Efecto de nicotinamida, L-glucosa, D-glucosa y 3-O-metil-D-glucosa sobre la entrada de 0,5 mM 2-desoxi-D-glucosa (DOG). **(B)** Efecto de nicotinamida, L-glucosa, D-glucosa y 2-desoxi-D-glucosa sobre la entrada de 0,5 mM 3-O-metil-D-glucosa (OMG). **(C).** Efecto de L-glucosa, D-glucosa, 2-desoxi-D-glucosa y 3-O-metil-D-glucosa sobre el transporte de 1 mM nicotinamida (NAM)..

Para evaluar esta posibilidad, se ensayó la incorporación de nicotinamida 1 mM en una preparación de eritrocitos humanos enteros en la presencia de concentraciones crecientes de análogos de glucosa en un intervalo de 0 a 50 mM. En la figura 3C se puede apreciar que la incorporación de nicotinamida a eritrocitos humanos no se ve afectada por la presencia de ninguno de los análogos de glucosa que son sustratos reconocidos del transportador facilitativo de hexosas GLUT1. Por tanto, estos resultados muestran que nicotinamida no es capaz de bloquear la entrada de hexosas, mediada por GLUT1 y, a la vez, los azúcares son refractarios a inhibir la entrada de nicotinamida a las células. Entonces estos datos confirman la noción que el transporte facilitado de nicotinamida hacia el interior de la célula roja humana no necesariamente involucra la participación del transportador facilitativo de hexosas GLUT1. Al menos, no se utilizaría el mismo canal de translocación que permite el traspaso de la membrana por las hexosas.

4.1.5. Efecto de inhibidores de GLUT1 sobre el transporte de nicotinamida.

Nuestros resultados nos permiten establecer que si bien nicotinamida es incorporada a la célula roja por medio de un mecanismo que involucra la participación de un transportador específico presente en la membrana del eritrocito, este transportador no se relacionaría funcionalmente con el transportador facilitativo de hexosas GLUT1. Sin embargo, con el objeto de complementar la caracterización del transporte de nicotinamida, nos propusimos verificar el efecto de distintos inhibidores reconocidos del transportador GLUT1 sobre la captación de nicotinamida por eritrocitos humanos intactos.

Existe una amplia variedad de compuestos que, aún siendo en algunos casos estructuralmente muy divergentes, presentan la capacidad de inhibir la actividad funcional del transportador facilitativo de hexosas GLUT1. Entre estos es posible citar por ejemplo, la chalcona floretina la cual es capaz de inhibir el transporte de D-glucosa tanto en adipocitos (Kashiwagi *et al.*, 1983) como en eritrocitos humanos (LeFevre y Marshall, 1959). Otro ejemplo es genisteína (4',5,7-trihidroxiisoflavona) una isoflavona que además de inhibir proteínas quinasas (Akiyama *et al.*, 1987), inhibe de manera importante la actividad funcional de los

transportadores de glucosa (Vera *et al.*, 1996). Asimismo, la flavona miricetina afecta la actividad de los transportadores de glucosa GLUT1 inhibiendo la incorporación de glucosa en eritrocitos humanos intactos (Strobel, 1996; Vera *et al.*, 2001). Finalmente, hemos mencionado a citocalasina B, la cual es capaz de inhibir el transporte de glucosa mediado por GLUT1 con una K_i de 0,1 μ M, (Bloch, 1973a).

Realizamos entonces una serie de experimentos en los cuales medimos el efecto de la presencia de estos inhibidores sobre la captación de nicotinamida 1 mM en eritrocitos humanos intactos, cuyos resultados se presentan en la figura 4. Podemos apreciar que la presencia de fletina o de las citocalasina B o E no afectó mayormente la magnitud de la entrada de nicotinamida en la célula roja intacta (Figura 4A). Por otro lado, tanto miricetina como genisteína tampoco fueron capaces de producir alguna inhibición notable del transporte de nicotinamida en los eritrocitos intactos (Figura 4B). De acuerdo a lo conocido, genisteína y miricetina fueron capaces de inhibir el transporte de 2-desoxi-D-glucosa en el mismo tipo celular (Figura 4C). Es claro entonces que podemos distinguir farmacológicamente la entrada de nicotinamida de la presencia de GLUT1 en el eritrocito humano.

4.2. Ensayos de unión de citocalasina B a membranas de eritrocitos humanos.

4.2.1. Efecto de nicotinamida sobre la unión de citocalasina B.

Nuestros resultados no favorecen la posibilidad que GLUT1 participe en facilitar la entrada a la célula roja de la nicotinamida, no obstante persiste la posibilidad que esta vitamina se una realmente al transportador, sin afectar su capacidad de facilitar la entrada de hexosas. Citocalasina B presenta una alta afinidad por GLUT1. La presencia de citocalasina B inhibe la actividad funcional del transportador con un valor de K_i de alrededor de 0,1 μ M (Bloch, 1973a; Gorga y Lienhard, 1981). Por esta razón el desplazamiento de la unión de citocalasina B al transportador de glucosa es un parámetro que se emplea comúnmente utilizado como una prueba convincente de la interacción de una molécula determinada con este transportador. Decidimos entonces probar una posible unión de nicotinamida al transportador de glucosa GLUT1 a través

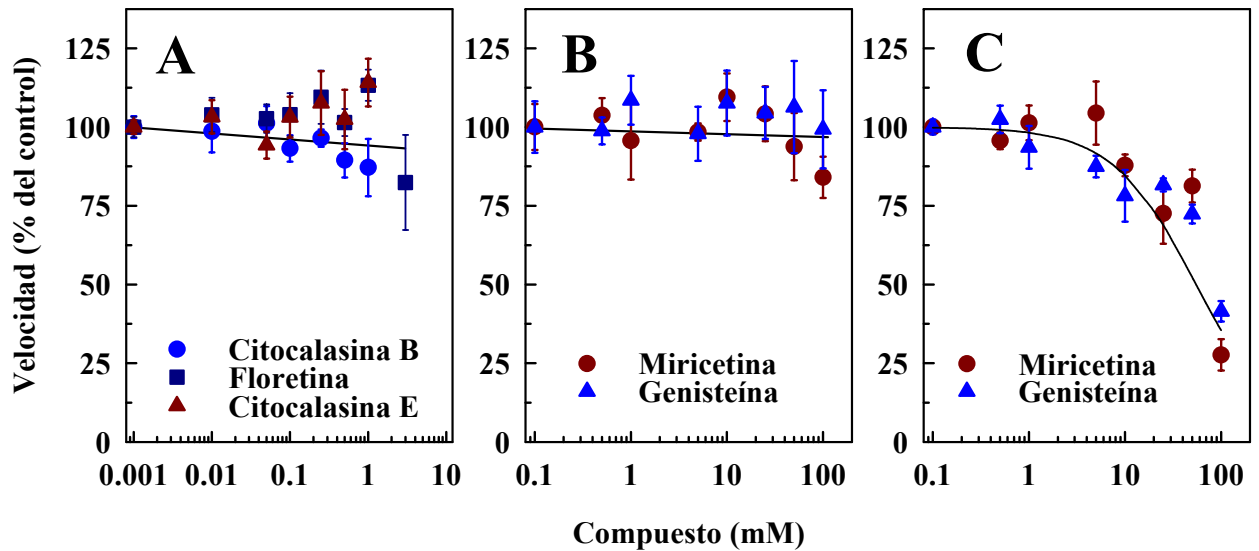


Figura 4. Inhibidores reconocidos de GLUT1 son incapaces de afectar la incorporación de nicotinamida en eritrocitos humanos enteros. Usando eritrocitos enteros se midió transporte de nicotinamida o 2-desoxi-D-glucosa durante 5 seg, a 4°C en ausencia (controles, 100% de transporte) o en presencia de las concentraciones de los compuestos que se indican. **(A).** Incorporación de 1 mM nicotinamida presencia de citocalasinas B y E y de floretina. **(B)** Captación de 1 mM nicotinamida en presencia de miricetina y de genisteína. **(C).** Inhibición del transporte de 0,5 mM 2-desoxi-D-glucosa facilitado por GLUT1 por miricetina y genisteína.

de evaluar el efecto de su presencia sobre la unión de citocalasina B a membranas de eritrocitos humanos. Para ello realizamos un ensayo en el cual se midió la asociación de citocalasina B 0,1 μM a membranas aisladas de eritrocitos humanos en presencia de concentraciones crecientes de nicotinamida, en un intervalo de 0 – 100 mM. Como control negativo empleamos L-glucosa, azúcar que como hemos comentado no se une al transportador, mientras que como control positivo usamos D-glucosa, el sustrato clásico de esta familia de transportadores.

La figura 5 resume los resultados de estos ensayos. En el panel A se puede apreciar que la unión de citocalasina B a membranas de eritrocitos se ve notablemente afectada por la presencia de nicotinamida a concentraciones superiores a 10 mM, llegando a verificarse un desplazamiento de esta unión superior al 90% cuando la concentración de nicotinamida utilizada en la reacción alcanzó a 100 mM. De acuerdo a lo esperado, D-glucosa desplaza en forma eficiente a la citocalasina B unida, aunque a mayores concentraciones que nicotinamida, mientras que la presencia de L-glucosa fue incapaz de afectar en forma alguna la unión de citocalasina B a GLUT1. Estos resultados evidencian que en realidad existe una interacción directa de la molécula de nicotinamida y el transportador facilitativo de hexosas GLUT1, lo cual concuerda con lo descrito por Sofue et al. (Sofue *et al.*, 1992). Sin embargo, y de acuerdo a los resultados anteriormente expuestos, esto no necesariamente significa que nicotinamida utilice al transportador GLUT1 como la vía para ser transportada en este tipo celular.

4.2.2. Tipo de desplazamiento de citocalasina B provocado por nicotinamida.

La mayoría de los compuestos que pueden desplazar citocalasina B desde su sitio de unión en el transportador de glucosa son capaces también de inhibir el transporte de D-glucosa mediado por GLUT1, lo cual en el caso de nicotinamida hemos comprobado no ocurre. Por esta razón, para comprender en forma más acabada el mecanismo involucrado en el desplazamiento de la unión de citocalasina B a membranas de eritrocitos producido por la presencia de nicotinamida, realizamos una serie de ensayos en los que se midió la unión de citocalasina B a membranas en presencia de diferentes concentraciones de nicotinamida, en un intervalo de 0 a 10 mM. Los resultados obtenidos para estos ensayos se presentan mediante una gráfica de Scatchard

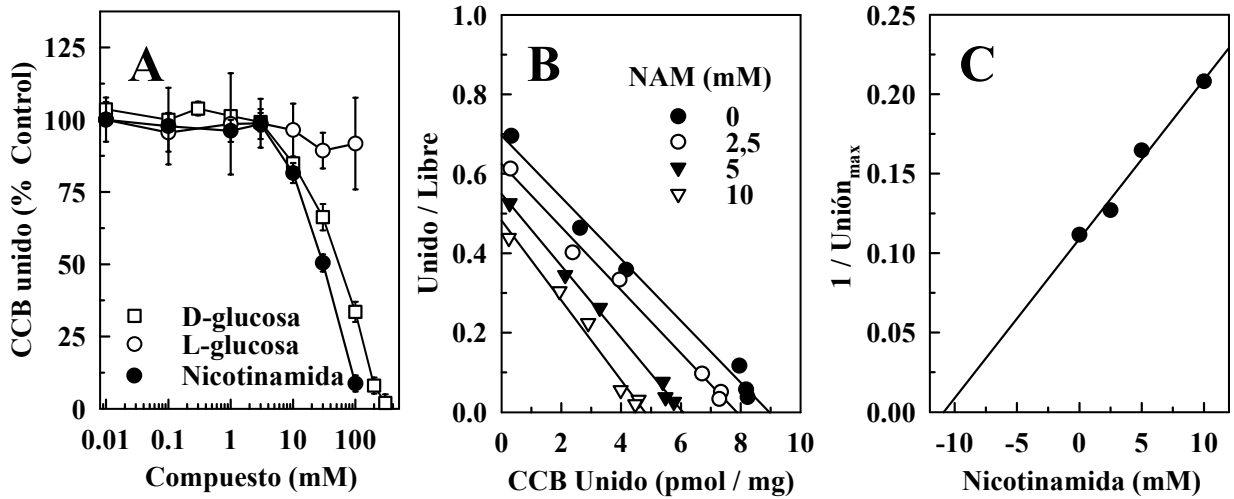


Figura 5. Competencia por nicotinamida de la unión desplazable por D-glucosa de citocalasina B a membranas aisladas de eritrocitos humanos. (A). Se determinó la unión de 0,1 μ M citocalasina B a membranas de eritrocitos humanos en ausencia (control, 100% de unión) o en presencia de distintas concentraciones de L-glucosa, D-glucosa o nicotinamida. Cada ensayo se llevó a cabo en triplicado y se representa el promedio \pm una desviación estándar. (B) Gráfica de scatchard para el análisis de la unión de diferentes concentraciones de citocalasina B, entre 0,05 y 5 μ M, en presencia de concentraciones fijas variables de nicotinamida. Se representa el promedio de ensayos llevados a cabo en triplicado. (C). Gráfico secundario del valor inverso del intercepto vertical de las rectas del panel B, en función de la concentración de nicotinamida. Por extrapolación se puede estimar un valor de K_d para nicotinamida de 12 mM.

(Figura 5B). Este análisis nos permite apreciar que el desplazamiento por nicotinamida de la unión de citocalasina B obedece a un mecanismo de tipo no competitivo, es decir, los sitios de unión para nicotinamida y citocalasina B en el transportador de hexosas GLUT1 son distintos. Un gráfico secundario de los datos del panel B, nos permitió calcular una constante de inhibición para la nicotinamida de 11 mM (Figura 5C).

4.3. Ensayos de transporte en vesículas selladas de orientación normal.

4.3.1. Cinética de la entrada de nicotinamida, 2-desoxi-D-glucosa y 3-O-metil-D-glucosa.

Sofue et al. (1992) describieron la posible relación entre GLUT1 y el transporte facilitado de nicotinamida realizando ensayos en vesículas selladas de membranas de eritrocitos humanos. Con el objeto de estudiar más en detalle el transporte de nicotinamida sin el inconveniente asociado al trabajo con células completas, nos propusimos montar una serie de ensayos que nos permitieran medir la captación de nicotinamida en vesículas lipídicas selladas reconstituidas a partir de membranas de eritrocitos humanos.

En primer término caracterizamos en detalle el comportamiento cinético de los sustratos en este nuevo modelo de estudio. Para ello realizamos ensayos cinéticos para nicotinamida, 3-O-metil-D-glucosa y 2-desoxi-D-glucosa, estableciendo así tiempos de reacción adecuados para asegurar condiciones de velocidad inicial en cada situación.

En la figura 6 podemos apreciar que los procesos de transporte en este sistema de vesículas son bastante rápidos, correspondiendo la fase lineal del transporte en cada uno de estos casos a un intervalo de tiempo que no supera los 10 seg luego de iniciada la reacción. Podemos apreciar además que en tiempos largos se puede verificar el equilibrio cinético del proceso, es decir, donde las velocidades de entrada y salida del sustrato se hacen equivalentes. Este equilibrio se alcanzaría aproximadamente a los 60 seg cuando el sustrato transportado correspondió a nicotinamida y a 2-desoxi-D-glucosa, y a alrededor de 40 seg para la captación de 3-O-metil-D-glucosa.

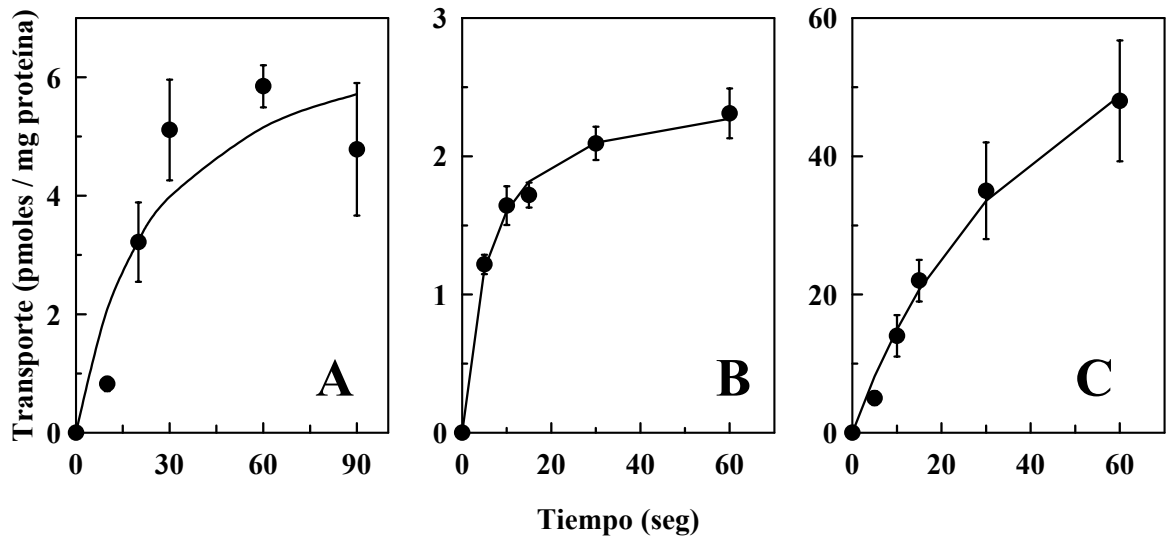


Figura 6. Cinéticas de la incorporación de nicotinamida, 3-O-metil-D-glucosa y 2-desoxi-D-glucosa en vesículas normales. Se midió la entrada de los sustratos en vesículas selladas de orientación normal, preparadas a partir de membranas de eritrocitos humanos. Los ensayos se llevaron a cabo a 4°C, usando una cantidad de proteínas de x mg y 1 μ Ci de sustrato radiactivo por ensayo. **(A)** Incorporación de 1 mM nicotinamida. **(B)** Incorporación de 0,5 mM 3-O-metil-D-glucosa. **(C)** Incorporación de 0,5 mM 2-desoxi-D-glucosa. Cada determinación se realizó en triplicado y se representa el valor del promedio \pm una desviación estándar.

Sobre la base de los resultados obtenidos en las cinéticas, establecimos un periodo de 5seg como un tiempo de reacción adecuado para realizar ensayos de competencia en vesículas lipídicas de orientación normal.

4.3.2. Saturación del transporte de nicotinamida.

Una vez determinadas las condiciones apropiadas para medir transporte en este sistema de vesículas, caracterizamos el transporte de nicotinamida. Para ello, se midió la captación de nicotinamida en función de su concentración (Figura 7). Este transporte se realiza a través de un proceso de tipo saturable, ratificando así que en la membrana del eritrocito humano existe al menos un sistema que es capaz de permitir el traspaso facilitado de nicotinamida. Esta conclusión es congruente con lo descrito por Sofue et al. (Sofue *et al.*, 1992). Pudimos establecer además que para la captación de nicotinamida en las vesículas de orientación normal los valores para V_{Max} y K_M corresponden a 36 pmoles/(mg proteína×min) y 6,3 mM, respectivamente.

4.3.3. Incorporación de 2-desoxi-D-glucosa y 3-O-metil-D-glucosa en presencia de nicotinamida y de azúcares.

Para intentar reproducir los resultados descritos por Sofue et al. (1992), ensayamos el transporte de nicotinamida, 3-O-metil-D-glucosa y 2-desoxi-D-glucosa en la presencia de hexosas y la vitamina, con el propósito de probar alguna relación funcional entre el transporte de nicotinamida y GLUT1. En primer lugar probamos el transporte de nicotinamida en presencia de D-glucosa, 3-O-metil-D-glucosa y 2-desoxi-D-glucosa como inhibidores de GLUT1. Como control negativo empleamos L-glucosa. En la figura 8 se muestra que ninguna de estas hexosas afectó la entrada facilitada de nicotinamida a las vesículas (Panel A). Luego medimos la incorporación de 3-O-metil-D-glucosa 0,5 mM a 4°C y en presencia de un intervalo de concentraciones de nicotinamida (0 a 50 mM) (Panel B). Como controles positivos para bloquear GLUT1 usamos 2-desoxi-D-glucosa y D-glucosa, mientras que L-glucosa se empleó como control negativo. Finalmente, ensayamos la entrada de 2-desoxi-D-glucosa en presencia de distintas concentraciones de nicotinamida y de hexosas (Panel C). Es claro que la presencia tanto

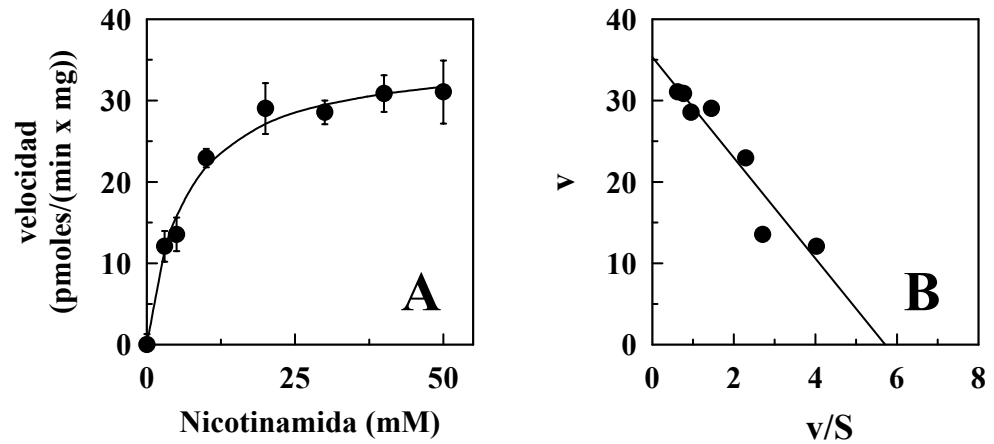


Figura 7. Curva de saturación de la velocidad de entrada de nicotinamida en vesículas selladas de orientación normal. Se midió la velocidad de entrada de nicotinamida durante 10 seg y a una temperatura de 4 °C en vesículas selladas de orientación normal, preparadas a partir de membranas aisladas de eritrocitos humanos, en presencia de distintas concentraciones de sustrato frío y de 0,8 μ Ci de [14 C]nicotinamida. **(A).** Curva de saturación. **(B)** Gráfico de v en función de v/S (gráfico de Hanes-Wolff) para los datos del panel A. Se pudo calcular un valor de K_M aparente de 6,0 mM.

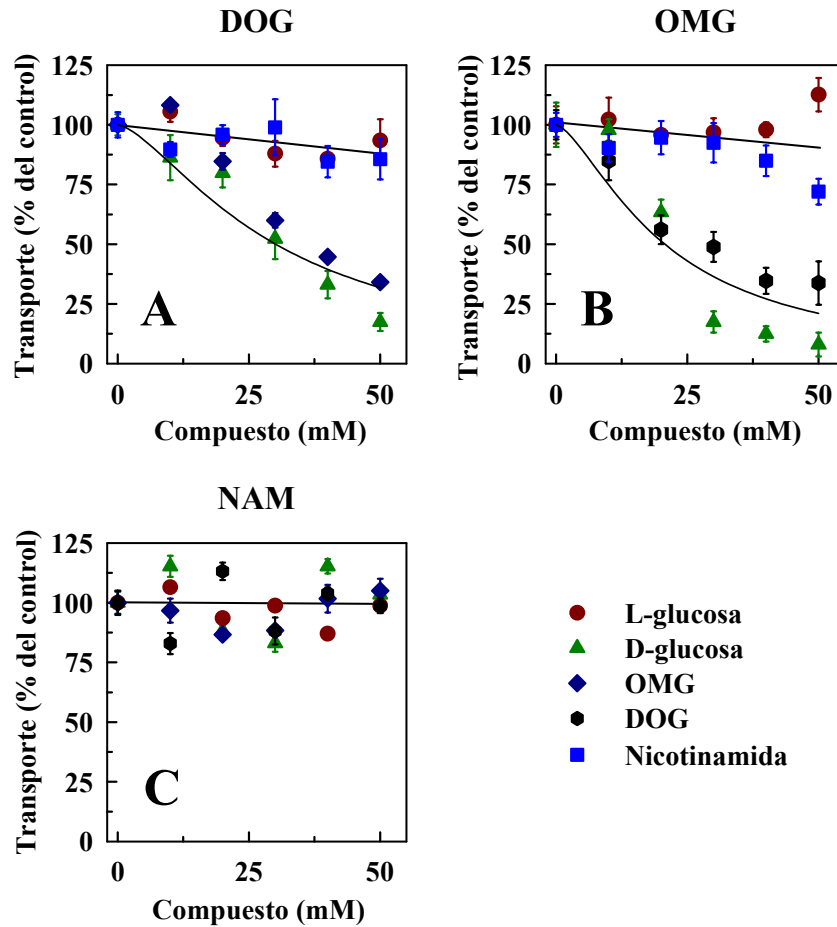


Figura 8. Efecto de hexosas y de nicotinamida sobre la incorporación de sustratos en vesículas de orientación normal. Se midió la entrada de los sustratos en vesículas selladas de orientación normal, preparadas a partir de membranas de eritrocitos humanos. Los ensayos se llevaron a cabo a 4°C, durante 5 seg, usando por ensayo una cantidad de proteínas de x mg y 1 µCi de sustrato radiactivo y en ausencia (controles, 100% transporte) o en presencia de los compuestos a las concentraciones que se indican. (A). Entrada de 0,5 mM 2-desoxi-D-glucosa (DOG). (B). Incorporación de 0,5 mM 3-O-metil-D-glucosa (OMG). (C). Transporte de 1 mM Nicotinamida. Cada determinación se realizó en triplicado y se representa el valor del promedio ± una desviación estándar.

de D-glucosa como la de 3-O-metil-D-glucosa ejercen un notable efecto inhibitorio sobre el transporte de 2-desoxi-D-glucosa mediado por GLUT1 en las vesículas normales, con inhibiciones de alrededor de un 95 y 65%, respectivamente a 50 mM de los azúcares. Asimismo, la presencia tanto de nicotinamida como la de L-glucosa en el medio de reacción no se tradujo en baja significativa alguna de la incorporación de 2-desoxi-D-glucosa en los ensayos respectivos.

4.4. Ensayos de transporte en vesículas de orientación invertida.

4.4.1. Cinética de la entrada de nicotinamida, 3-O-metil-D-glucosa y 2-desoxi-D-glucosa .

Nuestros resultados previos con células enteras y con vesículas selladas de orientación normal no apoyan la existencia de una relación funcional entre el transporte de nicotinamida y GLUT1. Vale decir, GLUT1 no permite el traspaso de nicotinamida desde el lado externo hacia el lado interno de la membrana plasmática. Aún cabe sin embargo la posibilidad que GLUT1 permita la salida de nicotinamida, es decir el traspaso desde la cara interna al lado externo de la membrana plasmática. Para evaluar esta posibilidad, decidimos ensayar el transporte de nicotinamida y de hexosas en vesículas selladas de orientación invertida, preparadas a partir de membranas de eritrocitos humanos normales.

La figura 9 resume los resultados de las cinéticas de transporte para estos ensayos. El panel A muestra que la fase lineal para el transporte de nicotinamida no supera los 10 seg, mientras la fase de equilibrio para dicho transporte se alcanza más allá de los 60 seg. En los paneles B y C se muestra que con 3-O-metil-D-glucosa y 2-desoxi-D-glucosa los resultados son similares a los descritos en A. Con ambos podemos observar una fase lineal para el proceso de transporte que no supera los 10 seg a partir de iniciada la reacción, alcanzándose el equilibrio una vez transcurridos al menos 60 seg. De acuerdo a estos datos, para mantener condiciones de velocidad inicial establecimos un intervalo de tiempo igual a 5 seg como el período de reacción adecuado para realizar los futuros experimentos, que involucrarán la incorporación y competencia de nicotinamida y los análogos de glucosa 3-O-metil-D-glucosa y 2-desoxi-D-glucosa utilizando vesículas lipídicas de orientación invertida como modelo de trabajo.

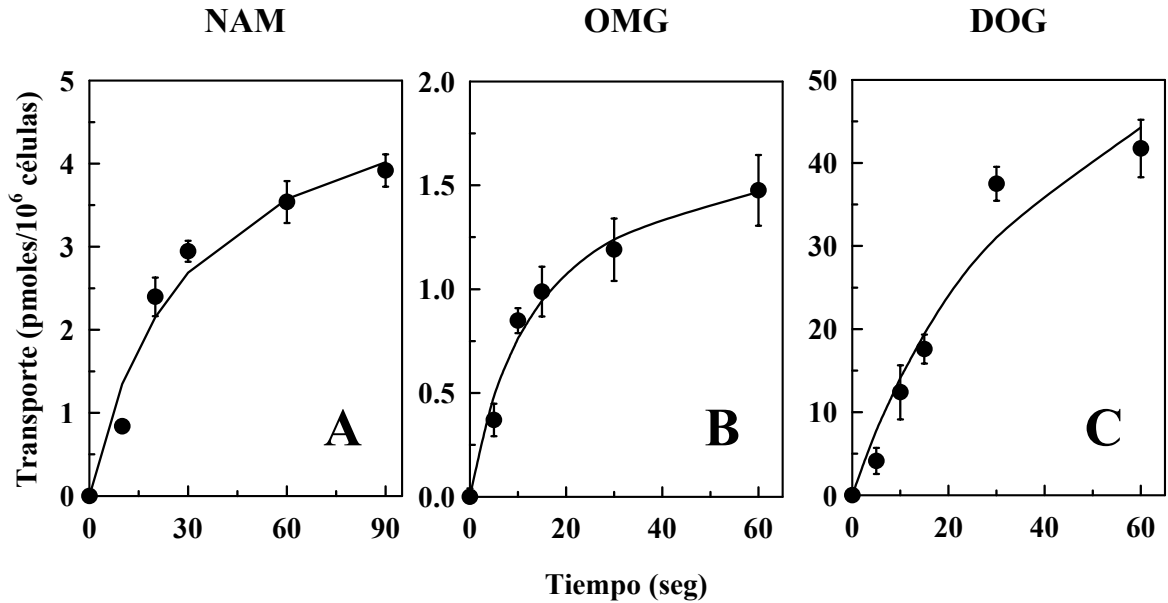


Figura 9. Cinéticas de la incorporación de nicotinamida, 3-O-metil-D-glucosa y 2-desoxi-D-glucosa en vesículas invertidas. Se midió la entrada de los sustratos en vesículas selladas de orientación invertida (“inside-out vesicles”), preparadas a partir de membranas de eritrocitos humanos. Los ensayos se llevaron a cabo a 4°C, usando una cantidad de proteínas de x mg y 0.8-1 μ Ci de sustrato radiactivo por ensayo. **(A)** Incorporación de 1 mM nicotinamida. **(B)** Incorporación de 0,5 mM 3-O-metil-D-glucosa. **(C)** Incorporación de 0,5 mM 2-desoxi-D-glucosa. Cada determinación se realizó en triplicado y se representa el valor del promedio \pm una desviación estándar.

4.4.2. Saturación del transporte de nicotinamida.

El transporte de nicotinamida en estas vesículas invertidas fue un proceso de tipo saturable, que por tanto hace evidente nuevamente la presencia de un sistema de transporte facilitado para nicotinamida en eritrocitos humanos (Figura 10). Este sistema exhibe valores para V_{Max} y K_M de 7,3 pmoles/(mg proteína×min) y 5,8 mM, respectivamente.

4.4.3. Incorporación de nicotinamida, 3-O-metil-D-glucosa y 2-desoxi-D-glucosa en presencia de nicotinamida o de azúcares.

Al igual que con vesículas de orientación normal, en estas vesículas invertidas probamos el transporte de nicotinamida y de sustratos de GLUT1 en ausencia y presencia de distintas concentraciones, entre 0 y 50 mM, de hexosas y nicotinamida, respectivamente. El transporte de nicotinamida 1 mM fue refractario a la presencia tanto de D-glucosa como de L-glucosa así como también lo fue ante la presencia de 3-O-metil-D-glucosa o de 2-desoxi-D-glucosa (Figura 11). Por otro lado, al medir la incorporación de 3-O-metil-D-glucosa y 2-desoxi-D-glucosa, nicotinamida no afectó el transporte de las hexosas, comportamiento similar al observado con L-glucosa. Además, las hexosas fueron excelentes inhibidores del transporte mediado por GLUT1. Por ejemplo, D-glucosa 50 mM bloqueó notablemente el transporte de 3-O-metil-D-glucosa y 2-desoxi-D-glucosa alcanzando esta inhibición a ser del orden de un 90 - 95%, respectivamente.

4.5. Relación del transporte de nicotinamida con la función de otros transportadores facilitativos en el eritrocito humano.

4.5.1. Ensayos de transporte de nicotinamida en presencia de aminoácidos.

Dado que es claro que GLUT1 no colabora en la entrada de nicotinamida a las células, intentamos aproximarnos a verificar una vía alternativa de ingreso para nicotinamida a la célula roja humana por medio de otros transportadores conocidos en esta célula. Por ello decidimos

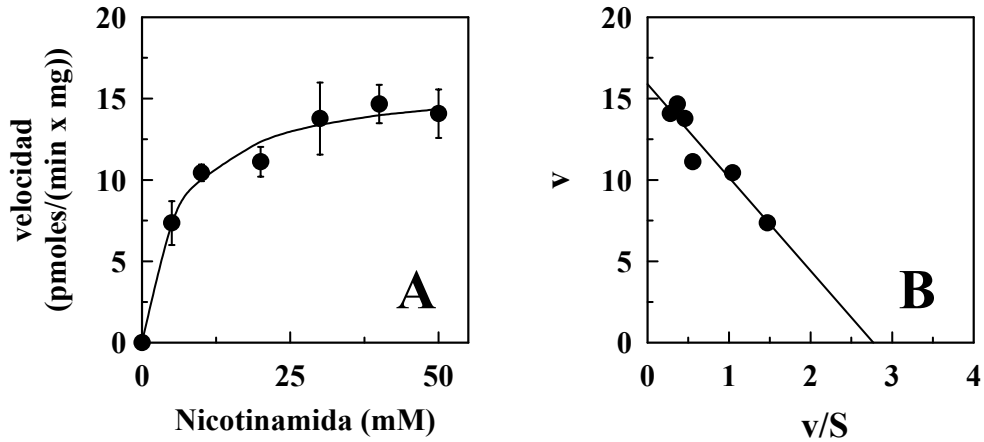


Figura 10. Curva de saturación de la velocidad de entrada de nicotinamida en vesículas selladas de orientación invertida. Se midió la velocidad de entrada de nicotinamida durante 10 seg y a una temperatura de 4 °C en vesículas selladas de orientación invertida (“inside-out vesicles”), preparadas a partir de membranas aisladas de eritrocitos humanos, en presencia de distintas concentraciones de sustrato frío y de 0,8 μCi de $[^{14}\text{C}]$ nicotinamida. **(A)**. Curva de saturación. **(B)** Gráfico de v en función de v/S (gráfico de Hanes-Wolff) para los datos del panel A. Se pudo calcular un valor de K_M aparente de 6,1 mM.

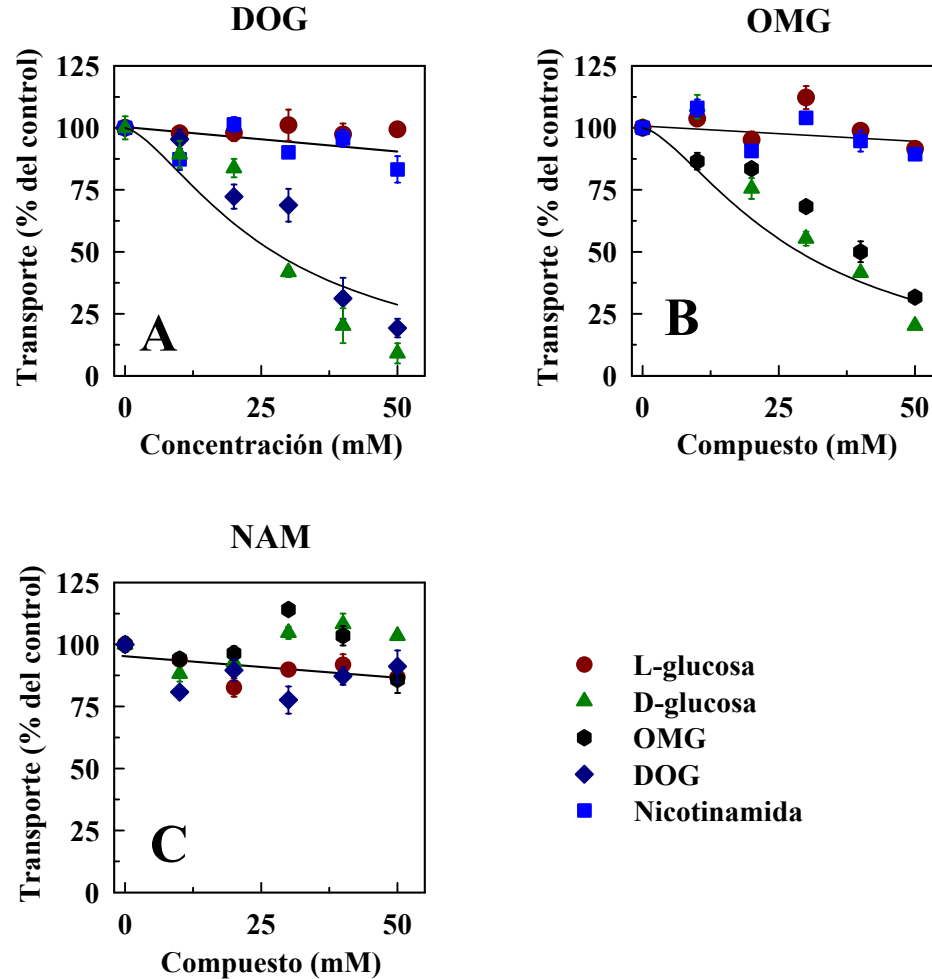


Figura 11. Efecto de hexosas y de nicotinamida sobre la incorporación de sustratos en vesículas de orientación invertida. La entrada de los sustratos en vesículas selladas de orientación invertida, preparadas a partir de membranas de eritrocitos humanos, se midió a 4°C, durante 5 seg, usando por ensayo una cantidad de proteínas de x mg y 1 μ Ci de sustrato radiactivo y en ausencia (controles, 100% transporte) o en presencia de los compuestos a las concentraciones que se indican.. **(A).** Entrada de 0,5 mM 2-desoxi-D-glucosa (DOG). **(B).** Incorporación de 0,5 mM 3-O-metil-D-glucosa (OMG). **(C).** Transporte de 1 mM nicotinamida. Cada determinación se realizó en triplicado y se representa el valor del promedio \pm una desviación estándar.

probar la incorporación de nicotinamida en presencia de aminoácidos representativos de los sistemas T y L de transporte de aminoácidos en eritrocitos. Para el primer caso se ha establecido a L-triptófano como el más claro representante de este sistema de transporte (Rosenberg *et al.*, 1980), mientras que para el caso del sistema L se ha convenido en la utilización de L-leucina (Prasad *et al.*, 1999).

En estos ensayos se probó entonces el efecto de la presencia de diferentes concentraciones (0 a 30 mM) de los aminoácidos sobre la incorporación de nicotinamida 1 mM en eritrocitos humanos (Figura 12A). Es evidente que no se observa ningún efecto de competencia entre alguno de los aminoácidos ensayados y la incorporación de nicotinamida. Podemos descartar al menos la participación de alguno de estos sistemas de transporte en la entrada de nicotinamida hacia el interior del eritrocito humano.

4.5.2. Transporte de nicotinamida en presencia de tetraetilamonio.

En otro intento por dilucidar la identidad del transportador responsable de la captación de nicotinamida en eritrocitos humanos, decidimos probar si la captación de nicotinamida tiene relación funcional con la familia de los transportadores de cationes orgánicos. Para ello usamos tetraetilamonio (TEA), sustrato de este tipo de transportadores (Green *et al.*, 1999), para probar su efecto sobre el transporte de nicotinamida en eritrocitos humanos intactos. El resultado de este ensayo se observa en la figura 12B. En ella podemos claramente apreciar que la presencia de tetraetilamonio en la mezcla de reacción no alteró de manera alguna la incorporación de nicotinamida, lo cual indicaría que este tipo de transportadores tampoco es el responsable de la captación de nicotinamida por el eritrocito humano.

4.6. Efecto de nicotinamida sobre la acumulación de 2-desoxi-D-glucosa en eritrocitos humanos.

El análogo de glucosa, 2-desoxi-D-glucosa (DOG) se acumula intracelularmente en forma de 2-desoxi-D-glucosa-6-fosfato (Simpson y Cushman, 1986). Quisimos verificar si la presencia

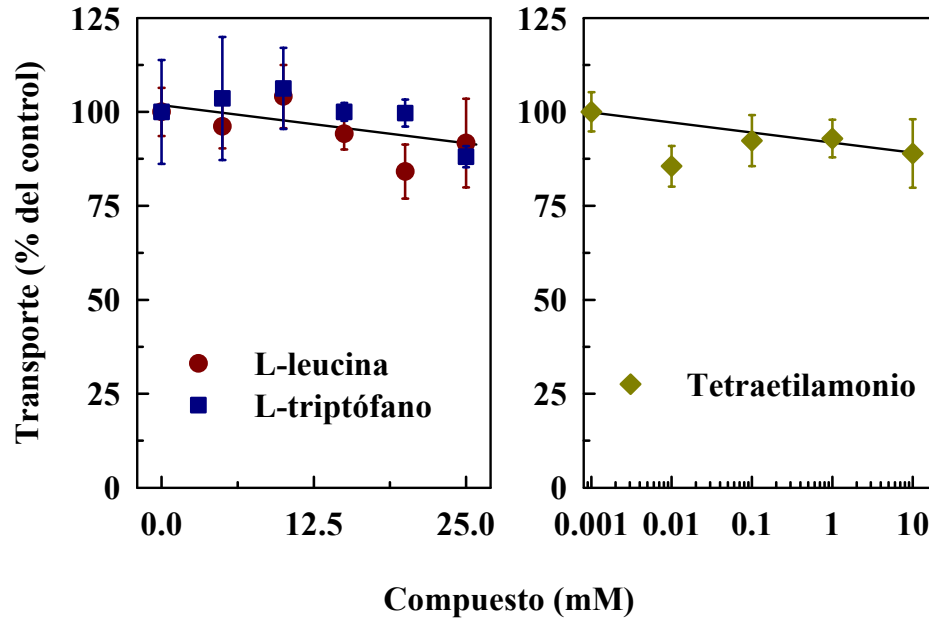


Figura 12. Ausencia de inhibición del transporte de nicotinamida en eritrocitos humanos enteros por la presencia de ciertos aminoácidos o de tetraetilamonio. Se realizaron ensayos de velocidad de transporte de entrada de 1 mM nicotinamida a 4°C, empleando una cantidad de eritrocitos de $42,7 \times 10^6$ células por ensayo y alrededor de 1 μ Ci de nicotinamida radiactiva por ensayo, en ausencia (controles 100% transporte) o en presencia de los compuestos a las concentraciones que se indican. Cada determinación se realizó en cuadruplicado y se representa el valor del promedio \pm una desviación estándar. **(A)** Ensayos en presencia de los aminoácidos L-leucina y L-triptófano. **(B)**. Ensayos en presencia de diferentes concentraciones de tetraetilamonio.

de nicotinamida era capaz de afectar esta acumulación. Con este objetivo diseñamos un ensayo en el que se midió la incorporación de 2-desoxi-D-glucosa a tiempos largos de reacción, separando de esta manera en nuestro análisis el proceso de acumulación intracelular de sustrato del proceso de transporte de sustrato. Sin embargo, la acumulación de 2-desoxi-D-glucosa se mantuvo inalterable tanto para el ensayo realizado en presencia de nicotinamida como en el caso en que se utilizó L-glucosa (Figura 13). Este resultado lo interpretamos como que la presencia de nicotinamida en el intervalo de concentraciones empleado en este ensayo no es capaz de interferir con el proceso de acumulación intracelular de 2-desoxi-D-glucosa en eritrocitos humanos.

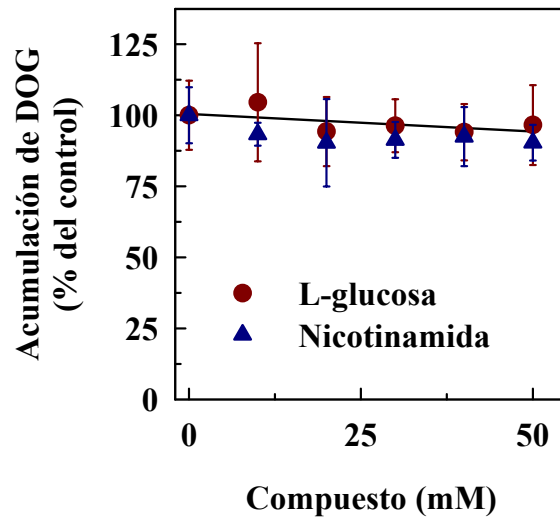


Figura 13. Nulo efecto de nicotinamida y de L-glucosa sobre la acumulación de 2-desoxi-D-glucosa en eritrocitos humanos. Se midió la cantidad de 2-desoxi-D-glucosa acumulada en eritrocitos humanos al cabo de incubarlos durante 5 min con 0,5 mM del azúcar, a una temperatura de 4 °C. La concentración promedio de células para los ensayos fue de $46,3 \times 10^6$ células.

5. DISCUSION

En los últimos años el estudio de los transportadores facilitativos de hexosas (GLUTs) se ha extendido de manera notable, primordialmente dada la importancia metabólica de la glucosa, como la principal fuente para la generación de energía en forma de ATP en mamíferos, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. De los transportadores de glucosa descritos, GLUT1 es el que se conoce con más detalle debido principalmente a que se encuentra en altas cantidades en la membrana plasmática de eritrocitos, constituyendo un 3–5% del total de sus proteínas y atendiendo además a la consideración que la preparación de vesículas selladas derivadas de los eritrocitos es un proceso bien establecido.

Si bien en principio este transportador fue descrito como muy específico para ciertas hexosas, puesto que transporta sólo D-glucosa y no su estereoisómero L-glucosa (Carruthers, 1990), con el tiempo se ha postulado que su especificidad no es tan estricta, pues en células humanas se ha descrito a GLUT1 como la principal vía de ingreso de ácido deshidroascórbico, la forma oxidada de la vitamina C (Vera *et al.*, 1993; Vera *et al.*, 1994; Vera *et al.*, 1995). Además, los transportadores de glucosa son permeables a agua (Fischbarg *et al.*, 1990) y GLUT1 interactúa con compuestos que no tienen una semejanza estructural obvia con hexosas o con el ácido deshidroascórbico. Estos compuestos incluyen al alcaloide citocalasina B (Bloch, 1973a), la chalcona floretina (LeFevre y Marshall, 1959), esteroides (Lacko *et al.*, 1975), derivados del ácido benzoico (Lacko *et al.*, 1981) y barbituratos (Honkanen *et al.*, 1995). Incluso, nosotros describimos en forma reciente que un conjunto de inhibidores de proteína tirosina quinasas que incluyen compuestos naturales de la familia de las flavonas e isoflavonas, y sintéticos como las tirfostinas, inhiben la actividad funcional de GLUT1 por medio de su unión directa al transportador (Strobel, 1996; Vera *et al.*, 1996; Iribarren, 1997; Vera *et al.*, 2001).

El informe que GLUT1 en un sistema reconstituido transporta nicotinamida, a pesar de la diferencia de su estructura química respecto de D-glucosa, implica que quizás la selectividad de GLUT1 por hexosas es menos estricta aún que lo que se aceptaba comúnmente. Esta Tesis evalúa la participación propuesta del transportador facilitativo de hexosas GLUT1 en el proceso de

incorporación de nicotinamida en eritrocitos humanos. Con este propósito realizamos un conjunto de ensayos en los que se midió el efecto ejercido sobre dicho transporte por la presencia de sustratos como 2-desoxi D-glucosa, 3-O-metil-D-glucosa y D-glucosa los cuales han sido reconocidos como sustratos que ingresan a la célula roja a través del transportador de glucosa GLUT1. Asimismo, se caracteriza cinéticamente el transporte de nicotinamida tanto en eritrocitos humanos intactos como en vesículas lipídicas, de orientación normal e invertida, así como el efecto de la presencia de nicotinamida sobre la acumulación intracelular de desoxiglucosa. Finalmente, analizamos el desplazamiento por nicotinamida de la citocalasina B unida al transportador GLUT1 en membranas de eritrocitos humanos.

Las principales conclusiones del presente trabajo son:

- 1) Existe un sistema de transporte que facilita la entrada de nicotinamida en los eritrocitos humanos.
- 2) No hay relación funcional entre el transporte facilitado de nicotinamida y el transportador de hexosas GLUT1.
- 3) Nicotinamida se une aparentemente a GLUT1, pero esta unión no afecta la actividad del transportador.

En eritrocitos humanos el transporte de nicotinamida fue saturable, lo que sugiere que no corresponde sólo a un fenómeno de simple difusión del sustrato a través de la membrana plasmática, sino que más bien obedece a un proceso controlado y en el cual necesariamente debe existir la participación de un transportador capaz de regular en forma eficiente el influjo de nicotinamida en la célula roja. Los valores de K_M y V_{max} para la captación de nicotinamida en eritrocitos humanos corresponden a 6,3 mM y 52 pmoles/(10^6 células×min), respectivamente. Estos valores son semejantes a los descritos por Sofue *et al.* (Sofue *et al.*, 1992). El carácter facilitado del transporte queda de manifiesto por nuestra capacidad de medir transporte de nicotinamida en vesículas selladas de orientación normal e invertida. Los parámetros cinéticos en estos sistemas fueron de $K_M = 6,3$ mM y $V_{max} = 36$ pmoles/(μ g proteína×min) en vesículas

selladas de orientación normal, mientras que con vesículas invertidas estos valores fueron de $K_M = 5,7 \text{ mM}$ y $V_{\max} = 7,9 \text{ pmoles}/(\mu\text{g proteína}\times\text{min})$.

Es claro entonces que el eritrocito humano existe un sistema de transporte que facilita el intercambio de nicotinamida a través de la membrana plasmática. No es claro sin embargo la relevancia fisiológica de este transporte, pues su afinidad se encuentra muy por sobre el intervalo de concentración fisiológicas de nicotinamida. Se puede especular que tal vez este transporte de nicotinamida suceda por la intermediación de una actividad accesoria, de baja afinidad, de otro sistema de transporte, el cual aún no se ha identificado.

Una posible relación funcional entre GLUT1 y el transporte de nicotinamida fue propuesta por Sofue et al. (Sofue *et al.*, 1992), sobre la base de estudios de transporte en eritrocitos enteros, en preparaciones del transportador purificado y reconstituido en vesículas lipídicas y por ensayos de desplazamiento de citocalasina B unida a GLUT1. Ellos describieron que los parámetros cinéticos de transporte para nicotinamida y desoxiglucosa en eritrocitos eran semejantes. Más aún, el transporte de nicotinamida fue sensible a la presencia de D-glucosa, con valores de K_i del orden de la K_M para la entrada de D-glucosa a la célula. Por otro lado, el transporte de D-glucosa fue bloqueado eficientemente por nicotinamida, con un valor de K_i semejante al valor de la K_M para el influjo de Nicotinamida en el mismo sistema. El mecanismo de la inhibición causada por nicotinamida fue de carácter competitivo, lo cual sugirió fuertemente que ambos compuestos compartían el mismo sistema de transporte. En acuerdo con esta interpretación, esta vitamina desplazó a citocalasina B unida a GLUT1, indicando que nicotinamida se une en forma directa al transportador (Sofue *et al.*, 1992).

Nuestros resultados con eritrocitos humanos enteros y empleando vesículas selladas de orientación normal e invertida no favorecen la existencia de una relación funcional entre GLUT1 y el transporte de nicotinamida. Al contrario, en esta Tesis describimos que:

- i) No pudimos observar efecto alguno de la presencia de nicotinamida sobre los transportes de metilglucosa y desoxiglucosa en eritrocitos humanos. Ambos análogos son sustratos que se emplean clásicamente para evaluar el transporte de hexosas facilitado por GLUTs.

- ii) Al medir la incorporación de nicotinamida en los eritrocitos en presencia de metilglucosa o de desoxiglucosa, tampoco apreciamos efecto alguno.
- iii) En ensayos de competencia usando vesículas selladas de orientación normal e invertidas pudimos verificar en forma clara que no existen evidencias de ningún tipo de inhibición por nicotinamida sobre el transporte de metilglucosa y desoxiglucosa mediado por GLUT1.
- iv) La captación de nicotinamida en vesículas tampoco se vio afectada en medida alguna por la presencia de sustratos del transportador facilitativo de hexosas, así como por L-glucosa, isómero incapaz de ser transportado por GLUT1.
- v) Diversos compuestos capaces de inhibir el transporte de hexosas mediado por GLUT1 fueron incapaces de afectar la entrada de nicotinamida a los eritrocitos.

Todas estas pruebas sugieren de manera convincente que es posible discriminar el transporte de nicotinamida de la actividad del transportador de hexosas GLUT1, desde un punto de vista funcional y farmacológico. Nuestros resultados discrepan entonces de los descritos por Sofue et al. No es claro a nuestro entender el origen de esta discrepancia, pues los sistemas experimentales son muy semejantes. Una diferencia pudiera ser que parte de los datos descritos por estos autores se obtuvieron con el transportador GLUT1 purificado y reconstituido en vesículas lipídicas. Se pudiera especular que la especificidad del transportador una vez aislado y reconstituido es diferente a la del transportador natural. Por ejemplo, si la purificación libera algún factor responsable de impedir el transporte de nicotinamida mediado por GLUT1. También se puede sugerir que la estructura del transportador reconstituido difiere en alguna medida de la estructura de la proteína natural, de manera que se comprometa la especificidad del ciclo de transporte y permita el traspaso de nicotinamida.

Ambas alternativas llevan implícita la noción que la reconstitución del transportador cambia sus propiedades fisiológicas, de manera que el putativo transporte de nicotinamida refleja una actividad aberrante del transportador. Nuestro abordaje fue probar la actividad de transporte de nicotinamida en un sistema de vesícula sellada de membranas de eritrocitos. Como en este caso no se requiere reconstituir al transportador, representa un modelo más fisiológico para

analizar en detalle las propiedades de este transporte. Asimismo, tiene la enorme ventaja que es posible controlar la orientación de las membranas, lo cual permite medir transporte en ambos sentidos (Steck y Kant, 1974). Nuestros resultados en estas vesículas selladas son congruentes con la existencia de un sistema de transporte de nicotinamida independiente de la presencia de GLUT1. Una conclusión idéntica se deriva de nuestros resultados de transporte en eritrocitos enteros.

De todos los inhibidores conocidos para GLUT1 sin lugar a dudas el más ampliamente usado con fines experimentales es citocalasina B. Este alcaloide presenta una alta afinidad por el transportador GLUT1 y su unión bloquea la unión del sustrato al transportador (Basketter y Widdas, 1978; Carruthers y Helgerson, 1991; Hamill *et al.*, 1999). El desplazamiento de la unión de citocalasina B a GLUT1 en membranas de eritrocitos es considerado entonces como una prueba de la interacción física directa de un compuesto determinado con el transportador facilitativo de hexosas GLUT1. Asimismo, existen pruebas que su sitio de unión a GLUT1 se encontraría ubicado en un segmento de la región citoplasmática del transportador. Sofue *et al.* señalan que la unión de citocalasina B a liposomas reconstituidos que contienen GLUT1 purificado es inhibida de manera dosis-dependiente por la presencia tanto de D-glucosa como de nicotinamida, informándose lo mismo cuando se midió la unión de citocalasina B a eritrocitos intactos (Sofue *et al.*, 1992). Nuestros resultados para los ensayos de unión de citocalasina B a membranas de eritrocitos humanos muestran claramente que nicotinamida es capaz de desplazar a citocalasina B desde el transportador de hexosas, lo cual indudablemente se traduce en el reconocimiento de al menos una interacción directa entre la molécula de nicotinamida y el transportador de glucosa. Empero, este hallazgo no necesariamente significa que sea este mismo transportador el responsable del proceso de captación de nicotinamida en eritrocitos humanos.

Sofue *et al.*, no analizaron en detalle la naturaleza de la interacción de nicotinamida con el transportador, pero nosotros logramos establecer que ésta corresponde más bien a un desplazamiento de carácter no competitivo. Esta conducta sugiere que el putativo sitio de unión de nicotinamida sería diferente que el sitio de unión de citocalasina B en el transportador. Este

hecho es fácil de conciliar con el resultado que nicotinamida si bien se une al transportador, es incapaz de afectar su capacidad de facilitar el transporte de hexosas.

Queda pendiente entonces la interrogante de cuál sería la identidad del sistema que facilita la entrada de nicotinamida a las células. En forma preliminar, evaluamos algunas opciones. Considerando que nicotinamida tiene una estructura semejante a la de la cadena lateral de los aminoácidos tirosina y fenilalanina, probamos si el sistema T, responsable de la mayor parte del transporte facilitado de estos aminoácidos aromáticos en eritrocitos (Rosenberg *et al.*, 1980), participa en la entrada de nicotinamida. Asimismo, probamos la opción que alguno de los transportadores de cationes orgánicos fuera responsable del influjo de nicotinamida. El transporte de nicotinamida en eritrocitos humanos intactos no fue alterado de manera significativa por L-triptófano, por L-leucina, ni por tetrametilamonio. Estos compuestos son sustratos predilectos de los transportadores de aminoácidos sistema T y sistema L y de los transportadores de cationes orgánicos, respectivamente. Estos resultados indican que los sistemas T y L de transporte de aminoácidos o algún transportador de cationes orgánicos no participan en la entrada de nicotinamida. Esto es perfectamente consistente con resultados de ensayos realizados también en eritrocitos humanos, los cuales muestran que el transporte de L-triptófano tampoco es afectado por la presencia de nicotinamida.

La incorporación en función del tiempo de aquellos compuestos que son metabolizados por las células exhibe normalmente dos componentes. Un componente corresponde al transporte del compuesto a través de la membrana plasmática, mientras un segundo componente funcional da cuenta del atrapamiento o acumulación del metabolito en la célula. La tasa neta de este segundo componente se encuentra limitada entonces por la eficiencia de la célula para metabolizar al sustrato transportado. Es claro que nicotinamida no afecta la fase de transporte de hexosas en los eritrocitos, pero cabe la posibilidad que nicotinamida tenga algún efecto en la fase de acumulación de los sustratos. Probamos entonces en los eritrocitos humanos si esta segunda fase era sensible a la presencia de nicotinamida, midiendo acumulación de desoxiglucosa, así pudimos además establecer que la presencia de nicotinamida fue incapaz de ejercer efecto alguno sobre el proceso de acumulación de desoxiglucosa en eritrocitos humanos.

Los efectos que hemos observado no se encuentran limitados a los eritrocitos humanos y sus membranas, sino que a la vez los hemos observado en células CHO que sobreexpresan GLUT1. Nicotinamida fue incapaz de afectar la incorporación de hexosas en estas células. Como era esperable, la sobreexpresión de GLUT1 fue acompañada de un importante aumento en la capacidad de las células transfectadas para captar desoxiglucosa. En claro contraste, este aumento en la capacidad de transportar hexosas no se acompañó de incremento alguno del transporte de nicotinamida (Vera, J.C. & Reyes, A.M, datos no publicados) confirmándose así la nula relación entre el nivel de expresión de GLUT1 y el transporte de nicotinamida.

En general, estas observaciones reafirman la noción que el transportador facilitativo de hexosas GLUT1 interactúa con sus sustratos de manera altamente específica, lo cual considera el reconocimiento en el sustrato de un anillo de tipo piranosa o furanosa con la quiralidad apropiada. A partir de nuestros resultados, podría establecerse que la presencia de anillo aromático de tipo piridina, o bien la del grupo carboxiamida de la cadena lateral en posición meta de la nicotinamida, previenen su interacción con los sitios de reconocimiento de sustrato del transportador GLUT1.

A pesar de nuestra información e interpretaciones, aún se puede argumentar que es concebible la participación del GLUT1 en el transporte de nicotinamida. Sin embargo, para que ello sucediera en las condiciones de los experimentos que hemos descrito en el presente trabajo, sería necesario que nicotinamida se uniera en el transportador a un sitio diferente del sitio de unión de los azúcares, y tendría que transitar por una vía completamente distinta de aquella empleada por los azúcares. De acuerdo a esto, parece mucho más fácil concluir, como lo hacemos nosotros, que nicotinamida atraviesa la membrana de la célula a través de un transportador completamente diferente del transportador facilitativo de hexosas GLUT1.

6. BIBLIOGRAFIA

Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M. y Fukami, Y. (1987). Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem* **262**, 5592-5595

Barnes, S. (1995). Effect of genistein on in vitro and in vivo models of cancer. *J Nutr* **125**, 777S-783S

Basketter, D. A. y Widdas, W. F. (1978). Asymmetry of the hexose transfer system in human erythrocytes. Comparison of the effects of cytochalasin B, phloretin and maltose as competitive inhibitors. *J Physiol (Lond)* **278**, 389-401

Bell, G. I., Burant, C. F., Takeda, J. y Gould, G. W. (1993). Structure and function of mammalian facilitative sugar transporters. *J Biol Chem* **268**, 19161-19164

Bernofsky, C. (1980). Physiology aspects of pyridine nucleotide regulation in mammals. *Mol Cell Biochem* **33**, 135-143

Birnbaum, M. J. (1989). Identification of a novel gene encoding an insulin-responsive glucose transporter protein. *Cell* **57**, 305-315

Bloch, R. (1973a). Inhibition of glucose transport in the human erythrocyte by cytochalasin B. *Biochemistry* **12**, 4799-4801

Bloch, R. (1973b). Inhibition of glucose transport in the human erythrocyte by cytochalasin B. *Biochemistry* **12**, 4799-4801

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254

Burant, C. F., Takeda, J., Brot-Laroche, E., Bell, G. I. y Davidson, N. O. (1992). Fructose transporter in human spermatozoa and small intestine is GLUT5. *J Biol Chem* **267**, 14523-14526

Carayannopoulos, M. O., Chi, M. M., Cui, Y., Pingsterhaus, J. M., McKnight, R. A., Mueckler, M., Devaskar, S. U. y Moley, K. H. (2000). GLUT8 is a glucose transporter responsible for insulin-stimulated glucose uptake in the blastocyst. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7313-7318

Carruthers, A. (1990). Facilitated diffusion of glucose. *Physiol Rev* **70**, 1135-1176

Carruthers, A. y Helgerson, A. L. (1991). Inhibitions of sugar transport produced by ligands binding at opposite sides of the membrane. Evidence for simultaneous occupation of the carrier by maltose and cytochalasin B. *Biochemistry* **30**, 3907-3915

Davidson, N. O., Hausman, A. M., Ifkovits, C. A., Buse, J. B., Gould, G. W., Burant, C. F. y Bell, G. I. (1992). Human intestinal glucose transporter expression and localization of GLUT5. *Am J Physiol* **262**, C795-800

Doege, H., Bocianski, A., Joost, H. G. y Schurmann, A. (2000a). Activity and genomic organization of human glucose transporter 9 (GLUT9), a novel member of the family of sugar-transport facilitators predominantly expressed in brain and leucocytes. *Biochem J* **350 Pt 3**, 771-776

Doege, H., Schurmann, A., Bahrenberg, G., Brauers, A. y Joost, H. G. (2000b). GLUT8, a novel member of the sugar transport facilitator family with glucose transport activity. **275**, 16275-16280

Doege, H., Bocianski, A., Scheepers, A., Axer, H., Eckel, J., Joost, H. G. y Schurmann, A. (2001). Characterization of human glucose transporter (GLUT) 11 (encoded by SLC2A11), a novel sugar-transport facilitator specifically expressed in heart and skeletal muscle. *Biochem J* **359**, 443-449

Fairbanks, G., Steck, T. L. y Wallach, D. F. (1971). Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* **10**, 2606-2617

Fischbarg, J., Kuang, K. Y., Vera, J. C., Arant, S., Silverstein, S. C., Loike, J. y Rosen, O. M. (1990). Glucose transporters serve as water channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 3244-3247

Fukumoto, H., Seino, S., Imura, H., Seino, Y. y Bell, G. I. (1988). Characterization and expression of human HepG2/erythrocyte glucose-transporter gene. *Diabetes* **37**, 657-661

Fukumoto, H., Kayano, T., Buse, J. B., Edwards, Y., Pilch, P. F., Bell, G. I. y Seino, S. (1989). Cloning and characterization of the major insulin-responsive glucose transporter expressed in human skeletal muscle and other insulin-responsive tissues. *J Biol Chem* **264**, 7776-7779

Gorga, F. R. y Lienhard, G. E. (1981). Equilibria and kinetics of ligand binding to the human erythrocyte glucose transporter. Evidence for an alternating conformation model for transport. *Biochemistry* **20**, 5108-5113

Gould, G. W. y Holman, G. D. (1993). The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. *Biochem J* **295 (Pt 2)**, 329-341

Green, R. M., Lo, K., Sterritt, C. y Beier, D. R. (1999). Cloning and functional expression of a mouse liver organic cation transporter. *Hepatology* **29**, 1556-1562

Hamill, S., Cloherty, E. K. y Carruthers, A. (1999). The human erythrocyte sugar transporter presents two sugar import sites. *Biochemistry* **38**, 16974-16983

Hediger, M. A., Kanai, Y., You, G. y Nussberger, S. (1995). Mammalian ion-coupled solute transporters. *J Physiol (Lond)* **482**, 7S-17S

Honkanen, R. A., McBath, H., Kushmerick, C., Callender, G. E., Scarlata, S. F., Fenstermacher, J. D. y Haspel, H. C. (1995). Barbiturates inhibit hexose transport in cultured mammalian cells and human erythrocytes and interact directly with purified GLUT-1. *Biochemistry* **34**, 535-544

Ibberson, M., Uldry, M. y Thorens, B. (2000). GLUTX1, a novel mammalian glucose transporter expressed in the central nervous system and insulin-sensitive tissues. *J Biol Chem* **275**, 4607-4612

Iribarren, R. (1997). Transporte de vitamina C en vesículas de membranas de eritrocitos humanos. Tesis de Bioquímico, Escuela de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.78.

Jarvis, S. M. (1988). Inhibition by nucleosides of glucose-transport activity in human erythrocytes. *Biochem J* **249**, 383-389

Joost, H. G., Weber, T. M., Cushman, S. W. y Simpson, I. A. (1986). Insulin-stimulated glucose transport in rat adipose cells. Modulation of transporter intrinsic activity by isoproterenol and adenosine. *J Biol Chem* **261**, 10033-10036

Joost, H. G. y Thorens, B. (2001). The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel member. *Molec Memb Biol* **18**, 247-256

Jung, C. Y. y Rampal, A. L. (1977). Cytochalasin B binding sites and glucose transport carrier in human erythrocyte ghosts. *J Biol Chem* **252**, 5456-5463

Kashiwagi, A., Huecksteadt, T. P. y Foley, J. E. (1983). The regulation of glucose transport by cAMP stimulators via three different mechanisms in rat and human adipocytes. *J Biol Chem* **258**, 13685-13692

Kayano, T., Fukumoto, H., Eddy, R. L., Fan, Y. S., Byers, M. G., Shows, T. B. y Bell, G. I. (1988). Evidence for a family of human glucose transporter-like proteins. Sequence and gene localization of a protein expressed in fetal skeletal muscle and other tissues. *J Biol Chem* **263**, 15245-15248

Kayano, T., Burant, C. F., Fukumoto, H., Gould, G. W., Fan, Y. S., Eddy, R. L., Byers, M. G., Shows, T. B., Seino, S. y Bell, G. I. (1990). Human facilitative glucose transporters. Isolation, functional characterization, and gene localization of cDNAs encoding an isoform (GLUT5) expressed in small intestine, kidney, muscle, and adipose tissue and an unusual glucose transporter pseudogene-like sequence (GLUT6). *J Biol Chem* **265**, 13276-13282

Keller, K., Strube, M. y Mueckler, M. (1989). Functional expression of the human HepG2 and rat adipocyte glucose transporters in *Xenopus* oocytes. Comparison of kinetic parameters. *J Biol Chem* **264**, 18884-18889

Lacko, L., Wittke, B. y Geck, P. (1975). Interaction of steroids with the transport system of glucose in human erythrocytes. *J Cell Physiol* **86 Suppl 2**, 673-680

Lacko, L., Wittke, B. y Zimmer, G. (1981). Interaction of benzoic acid derivatives with the transport system of glucose in human erythrocytes. *Biochem Pharmacol* **30**, 1425-1431

Lavis, V. R., Lee, D. P. y Shenolikar, S. (1987). Evidence that forskolin binds to the glucose transporter of human erythrocytes. *J Biol Chem* **262**, 14571-14575

LeFevre, P. G. y Marshall, J. K. (1959). The attachment of phloretin and analogues to human erythrocytes in connection with inhibition of sugar transport. *J. Biol. Chem.* **234**, 3022-3027

McVie-Wylie, A. J., Lamson, D. R. y Chen, Y. T. (2001). Molecular cloning of a novel member of the GLUT family of transporters, SLC2A10 (GLUT10), localized on chromosome 20q13.1: A candidate gene for NIDDM susceptibility. *Genomics* **72**, 113-117

Mueckler, M., Caruso, C., Baldwin, S. A., Panico, M., Blench, I., Morris, H. R., Allard, W. J., Lienhard, G. E. y Lodish, H. F. (1985). Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* **229**, 941-945

Mueckler, M. (1994). Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem* **219**, 713-725

Nagamatsu, S., Kornhauser, J. M., Burant, C. F., Seino, S., Mayo, K. E. y Bell, G. I. (1992). Glucose transporter expression in brain. cDNA sequence of mouse GLUT3, the brain facilitative glucose transporter isoform, and identification of sites of expression by in situ hybridization. *J Biol Chem* **267**, 467-472

Orci, L., Thorens, B., Ravazzola, M. y Lodish, H. F. (1989). Localization of the pancreatic beta cell glucose transporter to specific plasma membrane domains. *Science* **245**, 295-297

Phay, J. E., Hussain, H. B. y Moley, J. F. (2000). Cloning and expression analysis of a novel member of the facilitative glucose transporter family, SLC2A9 (GLUT9). *Genomics* **66**, 217-220

Prasad, P. D., Wang, H., Huang, W., Kekuda, R., Rajan, D. P., Leibach, F. H. y Ganapathy, V. (1999). Human LAT1, a subunit of system L amino acid transporter: molecular cloning and transport function. *Biochem Biophys Res Commun* **255**, 283-288

Rampal, A. L., Pinkofsky, H. B. y Jung, C. Y. (1980). Structure of cytochalasins and cytochalasin B binding sites in human erythrocyte membranes. *Biochemistry* **19**, 679-683

Rosenberg, R., Young, J. D. y Ellory, J. C. (1980). L-Tryptophan transport in human red blood cells. *Biochim Biophys Acta* **598**, 375-384

Sergeant, S. y Kim, H. D. (1985). Inhibition of 3-O-methylglucose transport in human erythrocytes by forskolin. *J Biol Chem* **260**, 14677-14682

Simpson, I. A. y Cushman, S. W. (1986). Hormonal regulation of mammalian glucose transport. *Annu Rev Biochem* **55**, 1059-1089

Sofue, M., Yoshimura, Y., Nishida, M. y Kawada, J. (1991). Uptake of nicotinamide by rat pancreatic beta cells with regard to streptozotocin action. *J Endocrinol* **131**, 135-138

Sofue, M., Yoshimura, Y., Nishida, M. y Kawada, J. (1992). Possible multifunction of glucose transporter. Transport of nicotinamide by reconstituted liposomes. *Biochem J* **288 (Pt 2)**, 669-674

Steck, T. L. y Kant, J. A. (1974). Preparation of impermeable ghosts and inside-out vesicles from human erythrocyte membranes. *Methods Enzymol* **31**, 172-180

Strobel, P. A. (1996). Efecto de algunas flavonas e isoflavonas sobre la actividad funcional del transportador de hexosas GLUT1. Tesis de Bioquímico, Escuela de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile68.

Thorens, B., Sarkar, H. K., Kaback, H. R. y Lodish, H. F. (1988). Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and beta-pancreatic islet cells. *Cell* **55**, 281-290

Thorens, B., Cheng, Z. Q., Brown, D. y Lodish, H. F. (1990). Liver glucose transporter: a basolateral protein in hepatocytes and intestine and kidney cells [corrected and republished with original paging, article originally printed in *J Am Physiol* 1990 Aug;259(2 Pt 1):C279-85]. *Am J Physiol* **259**, C279-285

Vera, J. C., Rivas, C. I., Fischbarg, J. y Golde, D. W. (1993). Mammalian facilitative hexose transporters mediate the transport of dehydroascorbic acid. *Nature* **364**, 79-82

Vera, J. C., Rivas, C. I., Zhang, R. H., Farber, C. M. y Golde, D. W. (1994). Human HL-60 myeloid leukemia cells transport dehydroascorbic acid via the glucose transporters and accumulate reduced ascorbic acid. *Blood* **84**, 1628-1634

Vera, J. C., Rivas, C. I., Velasquez, F. V., Zhang, R. H., Concha, I. I. y Golde, D. W. (1995). Resolution of the facilitated transport of dehydroascorbic acid from its intracellular accumulation as ascorbic acid. *J Biol Chem* **270**, 23706-23712

Vera, J. C., Reyes, A. M., Cárcamo, J. G., Velasquez, F. V., Rivas, C. I., Zhang, R. H., Strobel, P., Iribarren, R., Scher, H. I., Slebe, J. C. y Golde, D. W. (1996). Genistein is a natural inhibitor of hexose and dehydroascorbic acid transport through the glucose transporter, GLUT1. *J Biol Chem* **271**, 8719-8724

Vera, J. C., Reyes, A. M., Velasquez, F. V., Rivas, C. I., Zhang, R. H., Strobel, P., Slebe, J. C., Nuñez-Alarcón, J. y Golde, D. W. (2001). Direct inhibition of the hexose transporter GLUT1 by tyrosine kinase inhibitors. *Biochemistry* **40**, 777-790

Wheeler, T. J. y Hinkle, P. C. (1981). Kinetic properties of the reconstituted glucose transporter from human erythrocytes. *J Biol Chem* **256**, 8907-8914

Widdas, W. F. (1988). Old and new concepts of the membrane transport for glucose in cells. *Biochim Biophys Acta* **947**, 385-404

Widmer, J., Raffin, Y., Gaillard, J. M., Bovier, P. y Tissot, R. (1990-1991). Reversible in vitro decrease of L-tyrosine and L-tryptophan influx across the human erythrocyte membrane induced by cytochalasin B, the specific inhibitor of D-glucose transport. *Neuropsychobiology* **24**, 67-73

Wright, E.M., Hager, K. M. y Turk, E. (1992). Sodium cotransport proteins. *Curr Opin Cell Biol* **4**, 696-702