



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias
Escuela de Bioquímica

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

INTERACCIÓN DE LAS METILXANTINAS CON EL TRANSPORTADOR 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*.

PAOLA GABRIELA OJEDA OJEDA

VALDIVIA-CHILE

2005

AGRADECIMIENTOS

A mi profesor patrocinante, el Dr. Alejandro Reyes P. por haberme acogido en su laboratorio, por todo el tiempo, dedicación y conocimientos que me brindo durante el desarrollo de esta tesis, además de su estímulo, comprensión y apoyo en esta etapa de mi vida.

Quiero agradecer a la Dra. Iona Concha y al Dr. Juan Guillermo Cárcamo, por acceder a formar parte de mi comisión evaluadora y por el interés manifestado en cada momento durante el transcurso de esta tesis.

Así también quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio, en especial a Ximena Valenzuela, por su paciencia, apoyo y tolerancia.

El presente trabajo se llevó a cabo en El Laboratorio de Proteínas de Membranas del Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, y contó con el financiamiento del proyecto FONDECYT 1020908.

....Dedico esta tesis a mis padres, por el apoyo y cariño que me han entregado a lo largo de mi vida. A mis hermanos por acompañarme siempre. A Claudio por su amor incondicional. Y a mi pequeña Marión por la sonrisa que me regala cada mañana....

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. RESUMEN.....	1
1.1 SUMMARY.....	2
2. INTRODUCCIÓN	3
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
3.1 Materiales	14
3.2 Aislamiento de los eritrocitos	14
3.3 Preparación de membranas de eritrocitos humanos	15
3.4 Procedimiento experimental para ensayos trans-cero de entrada para glucosa.....	16
3.4.1 Cinética de incorporación de glucosa.....	16
3.4.2 Curva de saturación para el transporte de glucosa	17
3.4.3 Inhibición del transporte por metilxantinas.....	17
3.4.4 Determinación de la inhibición en ensayos trans-cero de entrada.....	18
3.5 Procedimiento experimental para ensayos de intercambio en equilibrio.	18
3.6 Procedimiento experimental para ensayos trans-cero de salida para glucosa	19
3.6.1 Cinética de salida de análogos de glucosa.....	20
3.6.2 Curva de saturación.	20
3.6.3 Inhibición del transporte por metilxantinas.....	21
3.6.4 Determinación de la inhibición.....	21
3.7 Ensayos de salida de D-glucosa (Ensayo de Sen y Widdas).....	22
3.7.1 Inhibición de la salida de D-glucosa por metilxantinas.....	22
3.7.2 Caracterización del tipo de inhibición.....	23

3.8 Ensayos de unión desplazable por D- glucosa de citocalasina B en membranas de eritrocitos	23
3.8.1 Efecto de las metilxantinas	23
3.9 Lavado y determinación de la radiactividad.....	24
3.10 Efecto de las metilxantinas sobre GLUT1 expresado en membrana de ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	25
3.10.1 Obtencion de ovocitos de <i>Xenopus</i>	25
3.10.2 Microinyeccion de ovocitos.....	25
3.10.3 Ensayos trans-cero de entrada	25
4. RESULTADOS	27
4.1 Ensayos de transporte en eritrocitos humanos.....	27
4.1.1 Cinéticas de transporte de 3-O-metil-D-glucosa y de 2-desoxi-D-glucosa	27
4.1.2 Saturación del transporte de 3-O-metil-D-glucosa y de 2-desoxi-D-glucosa.....	29
4.1.3 Transporte de análogos de glucosa en presencia de metilxantinas.....	31
4.1.4 Análisis de la inhibición del transporte de hexosas por las metilxantinas.....	34
4.2 Ensayos de salida de D-glucosa (Ensayo de Sen y Widdas).....	40
4.2.1 Inhibición del eflujo de D-glucosa por metilxantinas	40
4.2.1 Ensayos de Sen-Widdas	43
4.2.2 Competencia de los inhibidores por el sitio de unión externo.....	44
4.3 Ensayos de unión de citocalasina B a membranas de eritrocitos humanos.	50
4.3.1 Desplazamiento de la unión de citocalasina B en membranas de eritrocitos por las metilxantinas	50
4.3.2 Efecto de metilxantinas sobre la unión de citocalasina B al transportador GLUT1	52

4.4 Efecto de las metilxantinas sobre GLUT1 expresado en membrana de ovocitos de <i>Xenopus leavis</i>	52
5. DISCUSIÓN.....	54
6. BIBLIOGRAFÍA.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Cinéticas para los sustratos 3-O-metil-D-glucosa y 2-desoxi-D-glucosa en eritrocitos humanos.....	28
Figura 2.- Curvas de saturación de la velocidad del transporte de 2-desoxi-D-glucosa y 3-O-metil-D-glucosa en eritrocitos humanos.....	30
Figura 3.- Efecto de las metilxantinas sobre el transporte de desoxiglucosa en eritrocitos enteros.....	32
Figura 4.- Efecto de metilxantinas sobre el transporte de 3-O-metilglucosa.	33
Figura 5.- Caracterización del patrón de la inhibición de metilxantinas y floretina en condiciones de entrada.....	35
Figura 6.- Caracterización del patrón de la inhibición de metilxantinas en condiciones de entrada.	36
Figura 7.- Caracterización del patrón de la inhibición de metilxantinas en condiciones de intercambio en equilibrio.....	38
Figura 8.- Caracterización del patrón de la inhibición de metilxantinas en condiciones de trans-cero de salida	39
Figura 9.- Inhibición del eflujo de D-glucosa en eritrocitos humanos	42
Figura 10.- Efecto de metilxantinas sobre la afinidad de D-glucosa por el sitio de unión externo	45
Figura 11.- Controles realizados para los ensayos de competencia por el sitio de unión externo para D-glucosa.....	47
Figura 12.- Curvas de unión y desplazamiento con CCB.	51

Figura 13.- Efecto de metilxantinas sobre GLUT1 expresado en ovocitos de *Xenopus laevis*.....53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valor de las razones obtenidas al competir mezclas de inhibidores por el sitio de unión externo del transportador.....49

LISTA DE ABREVIATURAS

DOG : 2-desoxi-D-glucosa

OMG : 3-O-metil-D-glucosa

GLUT: Transportador facilitativo de hexosas

CCB : Citocalasina B

1. RESUMEN

GLUT1 es una proteína integral que facilita el traspaso de hexosas a través de la membrana plasmática de células animales, cuya actividad es inhibida por diversas moléculas estructuralmente no relacionadas con sus sustratos. En esta tesis analizamos en detalle la interacción con GLUT1 de las metilxantinas, una familia de compuestos naturales que se reconocen por bloquear la captación celular de glucosa. Estudiamos el efecto de cafeína, pentoxifilina y teofilina sobre el transporte de hexosas mediado por GLUT1 en eritrocitos humanos, empleando ensayos cinéticos en condiciones de intercambio en equilibrio y trans-cero de entrada y salida. En ensayos de intercambio las metilxantinas exhibieron valores de K_i entre 2-3 mM; en estas condiciones el carácter de la inhibición fue no competitivo. Esta conducta se reprodujo en los ensayos de salida. En condiciones de entrada las metilxantinas fueron menos eficientes (K_i entre 5-12 mM) y el carácter de la inhibición fue incompetitiva. Estos datos evidencian que las metilxantinas no se unen a los sitios interno o externo de unión del sustrato, sino que a través de un sitio diferente accesible por la cara externa del transportador. La unión de las metilxantinas estabilizaría una conformación del transportador que muestra mayor afinidad de unión para los sustratos, pero menor eficiencia en el transporte. Mediante ensayos de salida en condiciones cis-infinito (ensayos de Sen-Widdas), evaluamos el efecto de las metilxantinas sobre la afinidad para D-glucosa en el sitio de unión accesible por la cara externa del transportador. Encontramos que pentoxifilina desplaza a D-glucosa en el sitio exofacial de GLUT1, en claro contraste con cafeína y teofilina que no muestran este efecto. Ensayos de competencia para la inhibición muestran que estas tres metilxantinas se unen a un sitio común. Concluimos que estas metilxantinas se unen a GLUT1 en un sitio accesible por la superficie externa de la proteína, el cual es distinto, pero cercano al sitio de unión externo para D-glucosa.

1.1. SUMMARY

GLUT1 is an integral protein which facilitates the passage of hexoses across animal cell plasma membranes, whose activity is blocked by several molecules not structurally related with its substrates. In this thesis we analyzed in detail the interaction of methylxantines with Glut1, a family of natural compounds recognized as blocker of glucose cellular uptake. We studied the effect of caffeine, pentoxifylline and theofylline on hexose transport mediated by GLUT1 in human erythrocytes, employing kinetic assays under equilibrium exchange and entry and exit zero-trans conditions. In exchange assays the methylxantines exhibited K_I values of 2-3 mM; under these conditions the inhibition was non competitive. This behavior was reproduced in exit assays. Under entry conditions the methylxantines were less efficient (K_I among 5-12 mM) and the character of the inhibition was uncompetitive. These data provides convincing evidence that the methylxantines do not bind to the substrate binding site, but rather to a different site accessible by the external face of the transporter. The binding of the methylxanthines seems to stabilize a protein conformation that shows higher affinity for D-glucose, but less efficiency for the transport. By assays under cis-infinite conditions (Sen-Widdas assays), methylxanthines effect on the affinity of the D-glucose external site was evaluated. We found that pentoxifylline displaces to D-glucose of the exofacial site of GLUT1, in clear contrast with caffeine and theofylline that do not showed this effect. Inhibition competition assays shows that these three methylxantines bind to a common site on the transporter. We concluded that these inhibitors bind to GLUT1 in a site accessible by the external surface of the transporter, which is distinguishable but close to the D-glucose external site.

2. INTRODUCCIÓN

El movimiento de sustratos a través de membranas biológicas se encuentra mediado por una gran variedad de proteínas de membrana que funcionan como transportadores. Estas proteínas se han agrupando en familias para su mejor identificación. Existen dos familias que se encuentran ubícuaamente en todas las clasificaciones de organismos vivientes. La primera denominada como la superfamilia principal de facilitadores (MFS), permiten el transporte a favor de un gradiente de concentración. Es la familia numéricamente más grande dentro de las proteínas transportadoras de membrana y se caracteriza por transportar pequeños solutos en respuesta a un gradiente quimiosmótico (Griffith *et al.*, 1992; Baldwin, 1993; Goswitz y Brooker, 1995). El segundo grupo corresponde a los transportadores ABC (ATP Binding Cassette) los cuales usan la energía liberada en la hidrólisis de ATP para el transporte de solutos (Higgins, 1992; Fath y Kolter, 1993; Dean y Allikmets, 1995). Todas estas familias se caracterizan por poseer una estructura secundaria muy similar.

La MFS se divide a su vez en 18 familias. La más numerosa es la familia numero 1, también llamada familia transportadoras de azúcares o SP (sugar porter) con 133 miembros identificados (Pao *et al.*, 1998). Análisis de secuencias y bioquímicos sugieren que la estructura terciaria es común para todos los miembros de MFS y consta de doce dominios transmembrana en donde el amino y carboxilo terminales se encuentran orientados hacia la cara citoplasmática del transportador. Esta estructura se ha confirmado recientemente por la determinación de la estructura terciaria de tres diferentes miembros de estas proteínas, el transportador de oxalato (Hirai *et al.*, 2002; Hirai *et al.*, 2003), de la lactosa permeasa (Abramson *et al.*, 2003) y el transportador de glicerol-3-fosfato (Huang *et al.*, 2003).

La glucosa, uno de los principales combustibles celulares es transportado por un miembro de la MFS, la familia SP. El mecanismo de transporte de glucosa en la célula es mediado por dos subfamilias de transportadores los cuales serían los directos responsables de este intercambio. La primera corresponde a los transportadores facilitativos de glucosa, también denominados GLUTs, cuyo mecanismo es independiente de energía y a favor del gradiente de concentración (Mueckler, 1994; Joost y Thorens, 2001) y la segunda subfamilia corresponde a los transportadores activos de hexosa, dependientes de sodio, denominados SGLT cuya función es importante en casos del transporte de glucosa en contra del gradiente de concentración (Wright, 2001).

El transporte de glucosa mediado por SGLT utiliza la hidrólisis de ATP en forma indirecta. El sistema de cotransporte sodio-glucosa utiliza el transporte de sodio para transportar glucosa y la energía necesaria la obtiene de un gradiente iónico generado en la células por la bomba sodio-potasio dependiente de ATP. El primero de este tipo de transportadores que fue clonado de intestino de conejo se le llamó SGLT1 (Hediger *et al.*, 1987) y es un transportador de alta afinidad por glucosa. Por homología de secuencia se clonó el equivalente humano (Hediger *et al.*, 1989) con una identidad de secuencia de entre un 57-71 %. Este último transportador se encuentra principalmente en la membrana apical de células del intestino delgado y en túbulos contornados proximales en el riñón. También existe un segundo transportador, SGLT2, de baja afinidad que se encuentra principalmente en la membrana apical del túbulo proximal (Wells *et al.*, 1992; Kanai *et al.*, 1994). Estudios recientes por homología de secuencia en base de datos de genomas completos, sugieren la presencia de al menos 4 miembros más en esta familia en humanos, SGLT4-6, pero falta por completar los estudios estructurales y cinéticos para caracterizarlos.

La segunda familia corresponde a los transportadores facilitativos de hexosas (GLUTs) quienes permiten el transporte facilitado de glucosa y otras hexosas en células de mamíferos (Carruthers, 1990; Bell *et al.*, 1993; Mueckler, 1994; Barrett *et al.*, 1999; Joost y Thorens, 2001). Hasta el momento en humanos se han clonado 14 isoformas del transportador de hexosas (GLUT 1-14), los cuales difieren en su expresión en los diferentes tejidos, en sus propiedades cinéticas y en su especificidad de sustrato, además se ha visto que más de una isoforma es capaz de expresarse en un mismo tejido o tipo celular (Joost y Thorens, 2001; Wu y Freeze, 2002). Estos catorce miembros se clasifican a su vez en tres clases (Uldry y Thorens, 2004). La clase I incluye a GLUT1, 2, 3, y 4 transportadores que han sido bien caracterizados en términos de estructura, función y distribución en los tejidos. GLUT1 se expresa particularmente en cerebro (incluyendo barrera hematoencefalica) (Maher y Simpson, 1994) y eritrocitos (Carruthers, 1990; Gould y Holman, 1993; Hruz y Mueckler, 2001); niveles moderados de expresión se han observado en adipocitos, músculo e hígado. GLUT2 se expresa principalmente en células β -pancreáticas, en hígado, en riñón y en eritrocitos. En las células β , se encuentra formando parte de mecanismo de sensibilidad a glucosa (Orci *et al.*, 1989), mientras que en el hígado se expresa en la membrana sinusoidal de hepatocitos y se encuentra regulado por un control hormonal; también se encuentra en la cara basolateral del túbulo proximal del riñón, donde forma parte de la vía transcelular para el transporte de glucosa y fructosa (Thorens *et al.*, 1990). GLUT3 tiene una alta afinidad por glucosa y se encuentra presente en tejidos que tiene alta demanda de glucosa como combustible, como en el cerebro (Gould y Holman, 1993); también se la encuentra en testículo (Haber *et al.*, 1993). GLUT4, es un transportador de glucosa que responde a insulina y se encuentra en corazón, músculo esquelético y tejido adiposo, donde es responsable de la disminución de los niveles de glucosa elevados en el plasma (Murata *et al.*, 2002); también se lo encuentra en el cerebro (Rayner *et al.*, 1994). La insulina actúa estimulando la translocación de vesículas específicas que

contienen GLUT4 desde el espacio intracelular hacia la membrana plasmática, lo que resulta en un aumento inmediato de entre 10-20 veces en el transporte de glucosa (Shepherd *et al.*, 1992; Shepherd y Kahn, 1999; Bryant *et al.*, 2002).

Los transportadores GLUTs que corresponden a la clase II son GLUT 9, 7, 5 y 11. El miembro mejor caracterizado de esta clase es GLUT5 que transporta fructosa pero no glucosa (Kayano *et al.*, 1990) y se expresa principalmente en intestino delgado, testículo y riñón (Burant y Bell, 1992; Mate *et al.*, 2001). GLUT7 es el miembro menos conocido de esta familia, su gen se identificó por homología con secuencias típicas de transportadores de azúcares en la base de datos del genoma humano; posee gran similaridad a GLUT5, presenta alta afinidad por glucosa y fructosa pero es incapaz de transportar 2-desoxiglucosa y xilosa. Citocalasina B y floretina no fueron capaces de afectar el transporte del sustrato y se expresa en intestino delgado, colon, testículo y próstata. Se postula como un intermediario entre la clase I y la isoforma GLUT2 perteneciente a la clase II (Cheeseman *et al.*, 2004). GLUT9 se expresa en hígado y riñón (Phay *et al.*, 2000). Por otra parte, dos variantes de corte y empalme alrededor del exón 2 se han encontrado para GLUT11, el cual resulta en una forma larga y una forma corta de la proteína, de 503 y 493 residuos de aminoácidos respectivamente (Doege *et al.*, 2001; Sasaki *et al.*, 2001). Las dos variantes se expresan de una manera tejido específica; la forma corta presenta una baja afinidad por glucosa, es competida por fructosa, y se expresa predominantemente en corazón y músculo esquelético (Doege *et al.*, 2001). La forma larga no se expresa ni en músculo ni en corazón pero se encuentra en hígado, pulmón, traquea y cerebro; datos funcionales sugieren que transporta fructosa (Wu *et al.*, 2002).

En la clase III encontramos cinco miembros: GLUT6, GLUT8, GLUT10, GLUT 12 y HMIT (que correspondería a GLUT13). Una característica que posee esta clase es la presencia de un sitio de glicosilación en el lazo 9, que conecta los segmentos transmembrana 9 y 10. Este sitio

de glicosilación, el cual es importante para el funcionamiento de GLUT1 (Asano *et al.*, 1991), se encuentra en el lazo 1 que conecta los segmentos transmembrana 1 y 2 en las otras dos clases. GLUT6 se expresa en bazo, leucocitos, tejido adiposo y cerebro, y se ha demostrado que el transportador reconstituido promueve el transporte de D-glucosa (Doege *et al.*, 2000a; Lisinski *et al.*, 2001). GLUT8 en cambio, transporta glucosa y fructosa y se expresa preferentemente en la línea germinal masculina, pero también se localiza en hígado, músculo, tejido adiposo y neuronas (Doege *et al.*, 2000b; Ibberson *et al.*, 2000). GLUT12 fue identificado a partir de una línea de cáncer mamario y se ha descrito que se expresa normalmente en músculo esquelético, tejido adiposo e intestino delgado (Rogers *et al.*, 2002; Wood *et al.*, 2003); su análisis funcional muestra que transporta D-glucosa de preferencia sobre otras hexosas (Rogers *et al.*, 2003). GLUT13 ha sido encontrado exclusivamente en cerebro (corteza e hipotálamo) y muestra homología con GLUT8. La expresión de la proteína en ovocitos de *Xenopus* demostró que corresponde funcionalmente a un cotransportador de H⁺-mioinositol (Uldry *et al.*, 2001).

Por último la isoforma GLUT14 sería el producto de una duplicación de GLUT3 y se expresa exclusivamente en testículo humano (Wu y Freeze, 2002).

De todos los transportadores facilitativos de hexosas, GLUT1 es el mejor estudiado desde el punto de vista estructural y cinético, debido principalmente a su abundancia en eritrocitos humanos y la facilidad que representa su estudio en dichas células (Hruz y Mueckler, 2001). El transportador de glucosa GLUT1 es una proteína integral de membrana que se expresa ubicuamente en la mayoría de los tejidos siendo la directa responsable del transporte basal de esta hexosa hacia y desde la célula. La proteína fue clonada y secuenciada en el año 1985 a partir de células humanas HepG2 (Mueckler *et al.*, 1985). Desde entonces también se la ha clonado en diversas líneas celulares y se reconoce como un polipéptido que posee 492 residuos de aminoácidos y presenta una masa molecular de 54117 Da. De acuerdo al análisis de predicción de

su estructura secundaria se propuso un modelo conformacional el cual asume 12 segmentos α -hélices transmembrana con características hidrofóbicas lo que le permitiría atravesar la membrana celular, alternados con cortos dominios hidrofílicos. En esta conformación los extremos amino- y carboxilo- terminales y un gran lazo entre los segmentos 6 y 7 se encuentran orientados intracelularmente, mientras que un sitio de *N*-glicosilación ubicado en Asn 45 se encuentra en el primer lazo extracelular entre los segmentos 1 y 2. Diversos abordajes experimentales que incluyen proteólisis controlada, análisis inmunológicos, de marcaje con epítopes de glicosilación y de mapeo de saturación con cisteínas han confirmado que este modelo de 12 α -hélices transmembrana se extiende para todos los miembros de la familia de GLUTs que se encuentran clonados hasta el momento (Cairns *et al.*, 1984; Cairns *et al.*, 1987; Davies *et al.*, 1987; Andersson y Lundahl, 1988; Burdett y Klip, 1988; Gibbs *et al.*, 1988; Davies *et al.*, 1990; Asano *et al.*, 1992; Hresko *et al.*, 1994). GLUT1 a pesar de ser un transportador muy eficiente de azúcares, permite la entrada sólo de D-hexosas y es incapaz de transportar isómeros L como sustratos, pero además permite el transporte facilitado de ácido deshidroascórbico, la forma oxidada de la vitamina C (Vera *et al.*, 1993; Vera *et al.*, 1995).

Sólo se han identificado un número reducido de residuos de aminoácidos importantes para su actividad funcional. El mayor aporte se ha obtenido a través de los resultados de mutagénesis sitio-dirigidas, los que señalan la existencia de dos sitios (dominios), uno en su cara externa o sitio-dominio exofacial y otro en su cara interna o sitio-dominio endofacial en relación con la membrana plasmática los cuales son indispensables para su unión y translocación del sustrato (Carruthers, 1990; Hruz y Mueckler, 2001). Se propone además la existencia de un poro acuoso a través del cual sería transportado el sustrato y que sería accesible desde el medio acuoso externo (Jung *et al.*, 1986; Katagiri *et al.*, 1991). La existencia de estos sitios concuerda con la evidencia funcional que indica que GLUT1 es un transportador bidireccional, de carácter

facilitativo, que transporta el sustrato hacia dentro y fuera de la célula y este flujo se encuentra determinado sólo por la concentración relativa del sustrato a ambos lados de la membrana plasmática. Sin embargo y a pesar de toda la información existente aun no se conoce con exactitud como ocurre el ciclo de transporte, ni cuales residuos de aminoácidos estarían involucrados, ni la regulación del proceso en si mismo.

Es conocido que GLUT1 une moléculas que no tienen relación estructural con su sustrato, compuestos naturales como por ejemplo citocalasina B y floretina entre otros, y sintéticos como las tirfostinas, por lo que algunos de estos compuestos se han usado para tratar de esclarecer la estructura y función del transportador (Carruthers, 1990). Tanto para citocalasina B como floretina está muy bien caracterizado su mecanismo de acción; son capaces de interactuar de manera directa con el transportador GLUT1, además de ser inhibidores de muchos otros procesos celulares. Citocalasina B, alcaloide producido por algunos hongos, es un inhibidor no competitivo con respecto a glucosa en el transportador de hexosas GLUT1 en eritrocitos humanos (Bloch, 1973), presentan una constante de inhibición de alrededor de 0,5 μM y se une de manera competitiva por el sitio endofacial del transportador y de forma no competitiva al sitio de unión exofacial. Por lo tanto los datos sugieren que citocalasina B se une sólo a un sitio accesible por la superficie interna del transportador (Basketter y Widdas, 1978; Deves y Krupka, 1978). Estudios de fotomarcaje y de mutaciones sitio dirigidas indican que citocalasina B posiblemente se uniría al lazo que se encuentra entre los segmentos transmembrana 10 y 11 (Baldwin, 1993). Sin embargo no todas las citocalasinas inhiben el transporte de glucosa, aunque están estructuralmente muy relacionadas, este es el caso de citocalasina E (Rampal *et al.*, 1980). Esta diferencia deja ver que la unión al transportador no depende de la familia a la cual pertenezca el inhibidor sino más bien a sus propiedades estructurales específicas. Por otro lado tenemos a floretina, un inhibidor competitivo con respecto a glucosa en el transportador de hexosas GLUT1

en eritrocitos humanos, este compuesto presenta una K_i de alrededor de $1 \mu\text{M}$, siendo competitivo en ensayos de entrada, ensayo que evalúa el sitio de unión externo de glucosa, y no competitivo en ensayos de salida que en contraparte evalúa el sitio de unión interno de glucosa (LeFevre y Marshall, 1959). Con estos datos se puede sugerir que floretina se une en un sitio accesible por la cara interna del transportador.

Otra característica del transportador es que se le han reconocido sitios con homología a sitios de unión a nucleótidos. Esto se sugirió mediante el análisis de la secuencia primaria del transportador y con la base de datos de secuencias de otras proteínas conocidas por dicha característica, tales como ATPasas y proteínas que dependen de la hidrólisis de ATP para su función, donde es reconocida su habilidad de unir nucleótidos. No obstante, estudios funcionales con GLUT1 purificado y reconstituido en proteoliposomas revelan que el transportador mantiene su actividad en ausencia de ATP, lo que confirma que GLUT1 es un transportador facilitativo, vale decir la translocación del sustrato es independiente de energía (Kasahara y Hinkle, 1977; Baldwin *et al.*, 1981). Sin embargo, estos datos no se relacionan con los datos que sugieren que ATP sería capaz de modular el transporte de glucosa mediado por GLUT1 (Jacquez, 1983; Carruthers, 1986b, 1986a; Hebert y Carruthers, 1986; May, 1988; Carruthers y Helgerson, 1989; Helgerson *et al.*, 1989; Levine *et al.*, 1998), y con estudios de marcaje por afinidad que muestran GLUT1 une ATP (Carruthers, 1986b; Hebert y Carruthers, 1986; Carruthers y Helgerson, 1989; Wheeler, 1989; Levine *et al.*, 1998). Estos sitios de unión a ATP son tres cortas secuencias, (sitio I-II-III), separadas en la estructura primaria. Sin embargo, la actividad de GLUT1 es también modulada por análogos de ATP no hidrolizables, lo que demuestra que el efecto modulador no requiere hidrólisis y sería mediado simplemente por la unión del nucleótido. Esto ha dado lugar a la proposición que GLUT1 posee secuencias putativas de unión de ATP, las que no corresponderían a regiones con actividad enzimática relacionada a la hidrólisis del nucleótido-

trifosfato, pero que jugarían un papel importante en modular las propiedades funcionales de GLUT1. No está claro como ATP puede afectar la actividad de GLUT1 sin la hidrólisis del nucleótido trifosfato. La participación de proteínas extrínsecas se ha descartado. En vez, se postula que ATP puede jugar un papel estructural importante en determinar la conformación de los dominios del transportador que participan en el ciclo de transporte.

Recientemente se ha validado la utilización de inhibidores de tirosina quinasas con especificidad para sitios de unión de ATP como herramientas apropiadas para la detección de sitios con características funcionales de sitios de unión de nucleótidos en GLUT1 (Vera *et al.*, 1996b; Vera *et al.*, 2001). Estos inhibidores corresponden a moléculas pequeñas, tanto de origen natural como sintéticas (flavonas, isoflavonas y tirfostinas), que se caracterizan por ser inhibidores específicos de tirosina quinasas. De estas moléculas, sólo los inhibidores que se ligan a sitios de unión de ATP fueron capaces de inhibir de manera competitiva la actividad de GLUT1. En cambio, los inhibidores con afinidad por sitios de unión de tirosina, no bloquean la actividad de GLUT1 o la inhiben de manera no competitiva (Vera *et al.*, 1996b; Vera *et al.*, 2001).

Otra familia de compuestos que se conocen como inhibidores del transporte de glucosa son las metilxantinas (Challiss *et al.*, 1980; Yasuhara y Levy, 1988). Teofilina, cafeína y teobromina son tres alcaloides relacionados que se encuentran en plantas alrededor de todo el mundo. Además podemos mencionar a pentoxifilina e isobutylmetilxantina, que corresponden a metilxantinas sintéticas. Existen variados productos que contienen elevadas cantidades de estas metilxantinas, como es el caso por ejemplo de las bebidas cola (Daly y Fredholm, 1998).

Químicamente, teofilina, cafeína y teobromina son xantinas metiladas. La xantina en si es una dioxipurina y se encuentra estructuralmente relacionada tanto al ácido úrico como a las purinas. Cafeína es 1,3,7-trimetilxantina; teofilina, 1,3-dimetilxantina; teobromina es, 3,7-

dimetilxantina.; la pentoxifilina es un derivado de las xantinas, 1-(5-oxohexil)-teobromina. Las xantinas producen un espectro de acciones similares, pero difieren en su actividad. La teofilina es muy activa para relajar la fibra muscular lisa, en particular de los bronquios y vasos, estimular la actividad cardiaca, activar el SNC y aumentar la diuresis. La cafeína es la más activa para incrementar la respuesta contráctil del músculo esquelético; la teobromina es la menos activa de las tres. La pentoxifilina aumenta la deformabilidad de eritrocitos dañados, reduce la agregación eritrocitaria y plaquetaria, reduce los niveles de fibrinógeno, reduce la adhesividad de leucocitos al endotelio, reduce la activación de leucocitos y los daños resultantes en el endotelio, y reduce la viscosidad de la sangre. Así pentoxifilina facilita la perfusión microcirculatoria a través de una mejora de la fluidez de la sangre (Sato *et al.*, 1990b, 1990a, 1991).

El mecanismo celular de acción por el que las metilxantinas ejercen sus efectos es todavía impreciso. Las metilxantinas son inhibidores competitivos de fosfodiesterasas, una familia de enzimas que degradan AMPc. Inhibición de estas enzimas llevan al aumento de los niveles celulares de AMPc, pero esto se produce a concentraciones que superan las terapéuticas. La hipótesis de acción actualmente más aceptada se basa en la capacidad de las xantinas para bloquear los receptores adenosinicos, A₁ y A₂, a concentraciones equivalentes a la terapéutica (Biaggioni *et al.*, 1991b; Fredholm, 1995).

Se ha descrito en los últimos años una enfermedad relacionada al transporte de glucosa. La deficiencia del transportador de glucosa, GLUT1DS, o enfermedad De Vivo, (Klepper *et al.*, 1999; Klepper y Voit, 2002; Gordon y Newton, 2003). Estudios en eritrocitos de pacientes con GLUT1DS han revelado que existen ciertas mutaciones capaces de disminuir considerablemente el transporte de glucosa, incluso de ser insuficiente y producir graves trastornos en los individuos afectados. Bajo estas circunstancias la administración de compuestos capaces de afectar el transporte de glucosa puede ser considerada y evaluada, ya que podría disminuir aun más la

captación de glucosa por los tejidos, las metilxantinas, cafeína e isobutilxantina, son capaces de afectar este transporte en pacientes con GLUT1DS (Ho *et al.*, 2001).

Sin embargo, el tipo de inhibición que ejercen estos compuestos sobre el transportador no está clara. Es por esto que nos proponemos probar la siguiente hipótesis: Las metilxantinas afectan el transporte de glucosa en el transportador de hexosas GLUT1 por unión directa a la proteína.

Para probar esta hipótesis, nos planteamos el siguiente objetivo general: Establecer el efecto de las metilxantinas sobre las cinéticas de transporte de hexosas en eritrocitos humanos.

Para ello nos proponemos como objetivos específicos:

- a. Analizar el mecanismo de la inhibición del transportador GLUT1 en eritrocitos humanos en ensayos trans-cero de entrada y salida y en ensayos de intercambio en equilibrio.
- b. Evaluar el efecto de las metilxantinas sobre la afinidad por glucosa por el sitio de unión externo en GLUT1 mediante ensayos infinito-cis.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3-O-metil-glucosa y cloruro de magnesio, cafeína, pentoxifilina, teofilina, teobromina e isobutilmetilxantina, D-glucosa, floretina, yoduro de potasio, D-sorbitol, citocalasina B, citocalasina E, genisteína, 2-desoxi-D-glucosa, Tris, (³H)2-desoxi-D-glucosa fueron adquiridos en Sigma Chemical Co. [³H]3-O-metil-D-glucosa fue adquirido de ARC Radiochemicals, USA. Cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio, fosfato de sodio dibásico, fosfato de potasio monobásico, HEPES, dimetilsulfóxido (DMSO), cloruro de mercurio y metanol fueron adquiridos de J.T.Baker. Las ranas fueron adquiridas en la Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago y se mantuvieron en el laboratorio en vasijas con agua y a temperatura ambiente.

3.2 Aislamiento de los eritrocitos

La sangre fue donada por el servicio de Banco de Sangre del Hospital Regional Valdivia, en bolsas de 450 ml de sangre entera. Cada unidad contenía dextrosa, adenina y como anticoagulante citrato de sodio. El aislamiento de eritrocitos se realizó suspendiendo alrededor de 5 ml de sangre en HEPES salino (150 mM HEPES pH 7,4; 135 mM cloruro de sodio, 50 mM cloruro de potasio, 18 mM cloruro de calcio y cloruro de magnesio 8 mM), luego de hacer tres lavados sucesivos de la sangre por centrifugación en centrífuga clínica, se elimina el sobrenadante hasta que este sea claro y se resuspende el sedimento celular en HEPES salino. Sobre los eritrocitos sedimentados se deposita una capa blanca, que

corresponde a las células de la línea blanca (neutrófilos, macrófagos, linfocitos), la que se extrae fácilmente por aspiración con una pipeta. Después del último lavado los eritrocitos son resuspendidos en el tampón de lavado y almacenados a 4°C.

3.3 Preparación de membranas de eritrocitos humanos

La preparación de membranas se realizó siguiendo una metódica descrita en estudios previos por Carruthers (Carruthers, 1986a). Los eritrocitos se colocaron en tubos plásticos de 250 ml y se lavaron tres veces con una solución de fosfato salino pH 7,4. Para esto la sangre se centrifugó en una centrífuga Sorvall RC-5C a 4.500 rpm en rotor GSA por 10 min cada vez. Sobre los eritrocitos sedimentados se depositó una capa blancuzca, que corresponde a las células de la línea blanca, la que se extrajo fácilmente por aspiración con una pipeta y se resuspendieron las células con un volumen de fosfato salino. Después del último lavado los eritrocitos fueron lisados por estrés hipotónico al agregarles 5 volúmenes de 5 mM fosfato de sodio pH 7,4 por 10 min a 4°C. Las membranas se colectaron por centrifugación en una centrífuga Sorvall RC-5C a 10.00 rpm en rotor GSA por 25 min a 4°C; se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 10 mM fosfato de sodio pH 7,4. El proceso de centrifugación y resuspensión se repitió tres veces, para obtener membranas de eritrocitos totalmente desprovistas de citoplasma. Las membranas se resuspendieron finalmente en 10 mM fosfato de sodio pH 7,4. A estas membranas se les determina la concentración de proteínas.

3.4 Procedimiento experimental para ensayos trans-cero de entrada para glucosa

Estos ensayos consisten en medir transporte de hexosas en condiciones en que el sustrato radiactivo se encuentra en el lado externo, fuera de los eritrocitos y las células no poseen la hexosa en el espacio intracelular. Se mide entonces la cantidad de metilglucosa tritiada que es capaz de ingresar hacia el citoplasma desde el exterior de la célula. Experimentalmente se prepara por una parte una suspensión de células en HEPES salino a una concentración adecuada ($50-60 \times 10^6$ células por ensayo) libres de glucosa y, por otra, una mezcla radiactiva que consiste de HEPES salino que contiene [^3H]metilglucosa (20-35 $\mu\text{Ci/ml}$) o [^3H]desoxiglucosa (20-35 $\mu\text{Ci/ml}$) y una cantidad de metilglucosa o desoxiglucosa fría en una concentración adecuada y suficiente para alcanzar la concentración final que se desea usar en el ensayo de transporte, que puede ser fija o variable dependiendo del ensayo. Todos los ensayos se realizaron a temperatura ambiente y por triplicado.

3.4.1 Cinética de incorporación de glucosa

Los ensayos se realizan en tubos plásticos de 1,5 ml, teniendo un volumen final total de reacción de 200 μl por ensayo con una concentración final de metilglucosa o desoxiglucosa de 0,5 mM. Del volumen total, 20 μl corresponde a los eritrocitos diluidos en HEPES salino pH 7.3 ($50-60 \times 10^6$ células) y 180 μl corresponde al volumen de mezcla radiactiva que contiene 1 μl de metilglucosa o desoxiglucosa 100 mM, 0,8 μl de ^3H -metilglucosa o ^3H -desoxiglucosa con una actividad de 0,8 μCi por ensayo y 178 μl de HEPES salino pH 7,3. Los ensayos se ejecutan en triplicado para lo cual sobre los 20 μl de eritrocitos se adicionan los 180 μl de mezcla. La reacción se detiene a distintos tiempos, los que varían de 0 a 900 seg,

diluyendo la mezcla alrededor de 5 veces con solución de detención fría (amortiguador fosfato salino pH 7,3, cloruro de mercurio 10 μM , floretina 100 μM y yoduro de potasio 1,5 mM). Se realiza además un control basal en el cual se mide la radiación propia del sistema (tiempo 0 seg) el cual se obtiene al adicionar sobre los 20 μl de eritrocitos, en forma simultánea los 180 μl de mezcla y la solución de detención. Seguido se centrifuga a 11000 g por 15 seg, se extrae el sobrenadante y se repite la operación dos veces mas para luego realizar la lectura como se describe en el punto 3.9.

3.4.2 Curva de saturación para el transporte de glucosa

El ensayo se inició al añadir 20 μl de la suspensión de células ($50\text{-}60 \times 10^6$ células) sobre 180 μl de una mezcla radiactiva que contenía [^3H]metilglucosa o [^3H]desoxiglucosa 0,8 μCi y diferentes cantidades de metilglucosa o desoxiglucosa fría en HEPES salino pH 7,3, para obtener concentraciones finales de 2 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM y 50 mM. La reacción se detuvo al cabo de 30 seg diluyendo 5 veces con la solución de detención; se realizó un ensayo de tiempo a 0 seg para cada concentración de sustrato. Luego de detener la reacción, se procedió a realizar el lavado y lisis de las células y posterior lectura de la cantidad de radiactividad presente en las células.

3.4.3 Inhibición del transporte por metilxantinas

Para los ensayos de inhibición fue necesario preparar soluciones concentradas de las metilxantinas, de 150 mM, en HEPES salino pH 7,3. El ensayo se realizó por triplicado con concentraciones de metilxantinas que variaban desde 0 mM hasta 60 mM. Estas alícuotas de

las metilxantinas se incluyeron en la mezcla radiactiva, que contenía glucosa tritiada, glucosa fría, HEPES y distintos volúmenes de las soluciones concentradas de metilxantinas para alcanzar las concentraciones deseadas. Un volumen de 180 μ l de esta mezcla se adicionó a 20 μ l de eritrocitos y luego de haber esperado 30 seg se detuvo la reacción, se lavó tres veces, se lisaron las células con metanol y midió la radiactividad presente en las células.

3.4.4 Determinación de la inhibición del transporte en ensayos trans- cero de entrada

En estos experimentos se midió transporte de diferentes concentraciones de metilglucosa o desoxiglucosa en presencia de concentraciones fijas y variables de metilxantinas (0, 2 y 4 mM para pentoxifilina, 0, 4 y 8 para cafeína y teofilina). A 20 μ l de células (50-60 $\times 10^6$ células) se le adicionaron los 180 μ l de mezcla que contenía distintas concentraciones de OMG o DOG frío (2 - 50 mM), [3 H]OMG o [3 H]DOG 0,8 μ Ci y HEPES salino pH 7,3, además de las alícuotas de inhibidor necesarias para obtener las concentración ya dichas. La reacción se detuvo al cabo de 30 segundos y las células se lavaron y lisaron de la manera descrita en el punto 3.9.

3.5 Procedimiento experimental para ensayos de intercambio en equilibrio.

Este ensayo consiste en mantener a ambos lados de la membrana plasmática la misma concentración de sustrato, mide el transporte de sustrato marcado en condiciones en que el sustrato radiactivo se encuentra en el lado externo, fuera de los eritrocitos, o en que el sustrato radiactivo se encuentra en el espacio intracelular. Se mide entonces la cantidad de metilglucosa tritiada que es capaz de ingresar hacia el citoplasma desde el exterior de la célula

o bien el que sale de ésta. Experimentalmente se realiza el ensayo de intercambio en equilibrio en condiciones de entrada, se preparó por una parte una suspensión de células en HEPES salino a una concentración adecuada ($50-60 \times 10^6$ células por ensayo) las cuales contienen metilglucosa y, por otra, una mezcla radiactiva que consiste de HEPES salino que contiene [^3H]metilglucosa ($20-35 \mu\text{Ci/ml}$) y una cantidad de metilglucosa no marcada suficiente para igualar la concentración que se desea usar en el ensayo de transporte. Para determinar las cinéticas de transporte, las curvas de saturación y la inhibición del intercambio en condiciones de equilibrio se procedió como se describe para los correspondientes ensayos de entrada (sección 3.4), con la precaución que la concentración de metilglucosa fría fuera idéntica a ambos lados de la membrana.

3.6 Procedimiento experimental para ensayos trans-cero de salida para glucosa

Estos ensayos consisten en medir transporte de glucosa en condiciones en que el sustrato radiactivo se encuentra en el lado interno, dentro de los eritrocitos mientras que el espacio extracelular se encuentra libre del sustrato. Se mide entonces la cantidad de metilglucosa tritiada que es capaz de salir hacia el exterior de la célula. Experimentalmente se prepara una suspensión de células en HEPES salino a una concentración adecuada ($60-90 \times 10^6$ células por ensayo) que además contiene [^3H]metilglucosa ($20-35 \mu\text{Ci/ml}$) y una cantidad de metilglucosa fría en una concentración adecuada y, que puede ser fija o variable dependiendo del ensayo. Todos los ensayos descritos a continuación se realizaron a temperatura ambiente y por triplicado.

3.6.1 Cinética de salida de análogos de glucosa.

Los ensayos se realizan, a temperatura ambiente en tubos plásticos de 1,5 ml, teniendo un volumen final total de reacción de 200 μ l por ensayo con una concentración final de metilglucosa de 10 mM. Del volumen total, 8 μ l corresponde al volumen de mezcla radiactiva que contiene 6 μ l de eritrocitos diluidos en HEPES salino pH 7,3 ($60-90 \times 10^6$ células), 0,8 μ l de metilglucosa 100 mM, 0,2 μ l de [3 H]metilglucosa y 1 μ l de HEPES salino pH 7,3. Los ensayos se ejecutan en triplicado para lo cual sobre los 8 μ l de la mezcla de eritrocitos previamente incubados 30 min con metilglucosa a 37°C y luego incubados 10 min más a temperatura ambiente se adicionan los 192 μ l de HEPES. La reacción se detiene a distintos tiempos, los que varían de 0 a 900 seg, diluyendo la mezcla alrededor de 5 veces con solución de detención fría (amortiguador fosfato salino pH 7,3, cloruro de mercurio 10 μ M, floretina 100 μ M y yoduro de potasio 1,5 mM). Se realiza además un control basal en el cual se mide la radiación propia del sistema (tiempo cero) el cual se obtiene al adicionar sobre los 8 μ l de mezcla de eritrocitos, en forma simultánea los 192 μ l de HEPES y la solución de detención. Seguido se centrifuga a 11.000 g por 15 seg se extrae el sobrenadante y se repite la operación dos veces mas para luego realizar la lectura como se describe en el punto 3.9.

3.6.2 Curva de saturación.

El ensayo se inició al añadir 192 μ l de HEPES a 8 μ l de una suspensión de células preincubadas ($60-90 \times 10^6$ células) con una mezcla radiactiva que contenía [3 H]metilglucosa 0,8 μ Ci y diferentes cantidades de metilglucosa fría en HEPES salino pH 7,3, para obtener concentraciones finales de 2 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM y 50 mM. La reacción se

detuvo al cabo de 10 seg diluyendo 5 veces con la solución de detención; se realizó un ensayo de tiempo a 0 seg para cada concentración de sustrato. Luego de detener la reacción, se procedió a realizar el lavado y lisis de las células y posterior lectura de la cantidad de radiactividad presente en las células, del modo descrito en el punto 3.9.

3.6.3 Inhibición del transporte por metilxantinas.

Para la realización de la curva de inhibición fue necesario preparar soluciones concentradas de metilxantinas, los que fueron 150 mM para pentoxifilina; cafeína y teofilina, todas se diluyeron en HEPES salino pH 7,3. El ensayo se realizó por triplicado con un total de 6 puntos cuyas concentraciones de metilxantinas variaban desde 0 mM hasta 30 mM por tubo, estas alícuotas de inhibidor se incluyeron en los 192 μ l de HEPES con los que se inicia la reacción. Un volumen de 192 μ l conteniendo distintos volúmenes de soluciones concentradas de metilxantinas para alcanzar las concentraciones adecuadas mencionadas anteriormente por ensayo se adicionó a 8 μ l los que contenía glucosa tritiada, glucosa fría, HEPES salino y luego de haber esperado 10 seg se detuvo la reacción, se lavó tres veces, se lisaron las células con metanol y se procedió de igual forma que en el punto 3.9

3.6.4 Determinación de la inhibición

En estos experimentos se midió transporte de diferentes concentraciones de metilglucosa en presencia de concentraciones fijas y variables de metilxantinas (0, 2 y 6 mM para pentoxifilina, 0, 4 y 8 para cafeína y teofilina). A 8 μ l de la mezcla de células ($50-60 \times 10^6$ células) preincubadas que contenía distintas concentraciones de metilglucosa fría (2 hasta 50

mM), [^3H]metilglucosa 0,2 μCi y HEPES salino pH 7,3 se le adicionaron los 192 μl de HEPES, que contenían las alícuotas de inhibidor necesarias para obtener las concentraciones deseadas. La reacción se detuvo al cabo de 10 seg y las células se lavaron y lisaron de la manera descrita en el punto 3.9.

3.7 Ensayos de salida de D-glucosa (Ensayo de Sen y Widdas)

Este método se basa en la metódica descrita por Sen y Widdas (Sen y Widdas, 1962). Los eritrocitos previamente lavados se incuban a 30°C por al menos 1 h en 100 mM D-glucosa. La velocidad de salida de D-glucosa se registró usando un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS-50 con temperatura controlada a 30°C y provisto de un agitador magnético. Las longitudes de onda de excitación y de emisión fueron de 650 nm, con ranuras de 5 nm en ambos casos. El ensayo comienza cuando se adiciona directamente sobre 5 μl de células cargadas con D-glucosa, 2,5 ml de HEPES salino pH 7,4, en una cubeta de cuarzo de 3 ml. Las soluciones madres de metilxantinas, se llevaron a las concentraciones deseadas en 6 ml de HEPES salino pH 7,4 en un tubo plástico de 15 ml.

3.7.1 Inhibición de la salida de D-glucosa por metilxantinas

A 5 μl de eritrocitos previamente incubados con D-glucosa se le adiciona 2,5 ml de HEPES salino pH 7,3 que contenían concentraciones crecientes de metilxantinas cuyos valores iban de 0 a 15 mM. Estas soluciones frescas se prepararon en tubos plásticos de 15 ml. El ensayo se realiza en una cubeta de cuarzo y se detiene cuando la dispersión de luz alcanza un valor constante, vale decir cuando los eritrocitos llegan al equilibrio.

3.7.2 Caracterización del tipo de inhibición

Para determinar el tipo de inhibición que ejercían las metilxantinas sobre el sitio de unión externo de D-glucosa en el transportador de hexosa GLUT1, el método se basó en lo descrito por Sen-Widdas (Sen y Widdas, 1962). Se midió transporte, utilizando el mismo procedimiento que en el paso 3.7.1, pero en presencia de diferentes concentraciones de D-glucosa en el lado externo de las células. Estos datos se expresan como tiempo de salida en función de la concentración de glucosa externa (Gráfico de Sen-Widdas). Se puede demostrar que el intercepto en el eje horizontal corresponde a $-K_d$ para el sitio de unión externo para D-glucosa.

3.8 Ensayos de unión desplazable por D- glucosa de citocalasina B en membranas de eritrocitos

Para determinar la unión de citocalasina B al transportador en fantasmas de eritrocitos, el método se basó en lo descrito por Gorga y Lienhard (Gorga y Lienhard, 1981, 1982), Lavis *et al.* (Lavis *et al.*, 1987) y Vera *et al.* (Vera *et al.*, 1996^a).

3.8.1 Efecto de las metilxantinas

La unión de citocalasina B a transportadores de glucosa funcionales fue estimada a partir de la diferencia entre la unión de citocalasina B en presencia de 0,5 M D-sorbitol (unión total) y 0,5 M D-glucosa (unión inespecífica). El ensayo fue iniciado por la adición de 0,1 ml de preparación de membranas (0,38 mg proteína/ml) en fosfato de sodio 10 mM, pH 7,4 sobre 50 μ l de una mezcla de reacción, para tener una composición final de citocalasina B fría 0,1

μM , [^3H]-citocalasina B (11,9 Ci/mmol), citocalasina E 10 μM (exceso para desplazar la unión inespecífica de CCB a membrana, (Mookerjee *et al.*, 1981)), el compuesto inhibidor en un rango de concentraciones de 0-30 mM y 0,5 M D-sorbitol. La mezcla se incubó a temperatura ambiente por 10 min, luego se centrifugó a 16.000 g por 10 min en microcentrífuga Eppendorf. El precipitado se resuspendió en 0,1 ml de Tris-HCl 10 mM, 0,5 % SDS, pH 8,0 y se agregó a un vial de centelleo para conteo de radiactividad.

3.9 Lavado y determinación de la radiactividad.

Luego de detenida la reacción de transporte, se centrifuga inmediatamente a 11.000 g por 15 seg para extraer el sobrenadante (por aspiración con bomba de vacío) y se repite el procedimiento de lavado 2 veces más con la solución de detención con el fin de eliminar la glucosa tritiada unida inespecíficamente al transportador. Posteriormente y después de extraer todo el sobrenadante se adiciona 200 μl de metanol con el fin de lisis de los eritrocitos y liberar la glucosa tritiada. Los tubos plásticos de 1,5 ml se centrifugan a 16.000 g por 5 min. Luego se transfieren los 200 μl del sobrenadante a viales de vidrio para su lectura. Las mediciones de radiactividad se efectuaron en un contador de centelleo líquido Packard, modelo 1600 TR. Para determinar la radiactividad en solución, se tomaron 200 μl de la solución y se coloca en un vial de vidrio de 7 ml de capacidad, agregándole 2 ml de mezcla de centelleo comercial.

3.10 Efecto de las metilxantinas sobre GLUT 1 expresado en membrana de ovocitos de *Xenopus laevis*.

3.10.1 Obtención de ovocitos de *Xenopus*

Los ovocitos fueron extraídos de *Xenopus laevis* según protocolo de Mueckler (1990), con algunas modificaciones. En breve, las ranas fueron anestesiadas en hielo luego de lo cual, por una incisión en el abdomen, se les extrajo los lóbulos de ovocitos. Los lóbulos fueron tratados con colagenasa [1,3mg/ml] para disgregar los ovocitos. Los ovocitos seleccionados fueron separados. Estos se mantuvieron en medio MR (NaCl 1 M, KCl 18 mM, MgCl₂ 10 mM, CaCl 20 mM, HEPES 50 mM, pH 7.8) hasta su posterior microinyección con mRNA de GLUT1.

3.10.2 Microinyección de ovocitos

En el laboratorio se generó el mRNA de GLUT1 por transcripción *in vitro* utilizando el kit mMessage mMachinette (Ambion) a partir del vector pGEM3 en el que se encuentra clonado el cDNA de la proteína. Los ovocitos fueron inyectados con 50 ng de mRNA de GLUT1 a una concentración de 1mg/ml o con 50 nl de agua como control. Los ovocitos microinyectados se mantuvieron 72 horas en medio MR momento en el cual fueron utilizados en los ensayos trans-cero de entrada.

3.10.3 Ensayos cero-trans de entrada

Se realizaron tres tipos de ensayos (cinéticos, de saturación y de inhibición). Para todos ellos el protocolo consistió en colocar grupos de 3 ovocitos en tubos plásticos de 2 ml con 200

μl de medio MR. La reacción se inicia al agregar 100 μl de mezcla radiactiva la cual contiene 1 $\mu\text{C}/\text{ml}$ de [^3H]- desoxiglucosa y la cantidad de desoxiglucosa fría (DOG) correspondiente para obtener una mezcla de transporte de concentración 10 mM de DOG para los ensayos cinéticos y de inhibición, para los ensayos de saturación se usaron concentraciones que van de 0 a 50 mM de DOG. Todos los ensayos se realizaron a temperatura ambiente y por 3 minutos, excepto los ensayos cinéticos los que se realizaron a diferentes intervalos de tiempo, al final del cual se detuvo la reacción con medio de detención el que esta compuesto de MR a 4°C que contenía HgCl_2 10 μM . Se lavaron 3 veces con el mismo medio y finalmente se traspasaron los ovocitos a viales donde se les agregó 150 μl de SDS al 5% para romperlos y 2 ml de líquido de centelleo para determinar la lectura de la radiactividad en un contador de centelleo.

4. RESULTADOS

4.1 Ensayos de transporte en eritrocitos humanos.

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

Para poder realizar un estudio cinético detallado del efecto de las metilxantinas sobre la actividad funcional de GLUT1 en eritrocitos humanos, se debe primero determinar el periodo en el cual el transporte es una función lineal del tiempo; es decir, se requiere establecer las condiciones de velocidad inicial. Estas condiciones experimentales nos permiten establecer claramente la diferencia entre el proceso de transporte en si mismo y la posible acumulación celular del sustrato. Por esto se comenzó el estudio analizando las características cinéticas asociadas al transporte de los sustratos 3-O-metil-D-glucosa (metilglucosa) y de 2-desoxi-D-glucosa (desoxiglucosa).

La figura 1 muestra la captación en eritrocitos humanos de los sustratos en función del tiempo en distintos tipos de ensayo. En el panel A tenemos la cinética de incorporación en condiciones de entrada utilizando 2-desoxi-D-glucosa. Se puede apreciar un transporte lineal hasta aproximadamente los 30 seg. Por esto se decidió realizar los ensayos de transporte durante este periodo de tiempo. Algo similar se aprecia en el panel B usando metilglucosa en ensayos de transporte de entrada en condiciones trans-cero. El transporte fue lineal cerca de los 60 seg. Por comodidad adoptamos realizar los ensayos durante 30 seg. En el panel C se muestra la cinética en condiciones de equilibrio realizada a 4° C. En estas condiciones el transporte se mantuvo lineal hasta aproximadamente los 500 seg. La cinética de incorporación en condiciones de equilibrio a temperatura ambiente, fue lineal sólo hasta los 5 seg

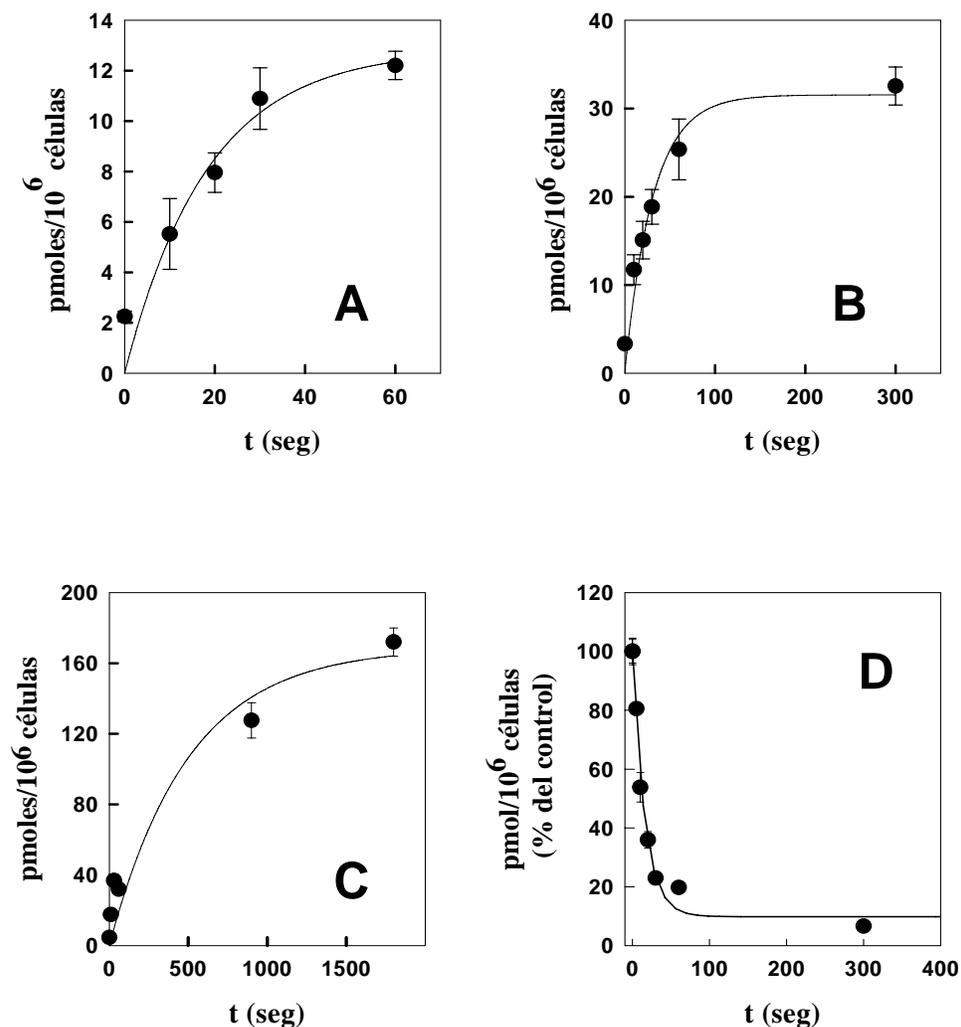


Figura 1.- Cinéticas para los sustratos 3-O-metil-D-glucosa y 2-desoxi-D-glucosa en eritrocitos humanos. **Panel A y B.** Incorporación de 0,5 mM de 2-desoxi-D-glucosa y de 3-O-metil-D-glucosa, respectivamente. **Panel C.** Incorporación de 0,5 mM de 3-O-metil-D-glucosa en condiciones de intercambio en equilibrio. **Panel D.** Salida de 10 mM de 3-O-metil-D-glucosa. Cada determinación se realizó en triplicado, a temperatura ambiente, excepto panel C (4°C), y se representa el valor del promedio \pm una desviación estándar.

aproximadamente, lo que nos forzó a realizar los ensayos durante a lo mas 3 seg (dato no mostrado). Por esta razón técnica, el transporte en ensayos de equilibrio se midió también a 30 seg pero a 4°C. En el panel D vemos la cinética de salida de glucosa a temperatura ambiente, en donde el transporte es lineal aproximadamente hasta los 40 seg. Este ensayo también se realizó a 4°C, pero a esta temperatura el transporte resultó ser muy lento. Por ello todos los ensayos en condiciones de salida se realizaron a temperatura ambiente y por 10 seg.

4.1.2 Saturación del transporte de 3-O-metil-D-glucosa y de 2-desoxi-D-glucosa

Existen bastantes notas en la literatura acerca de las características cinéticas del transporte de glucosa y análogos en eritrocitos bajo diferentes condiciones experimentales. Fue necesario, sin embargo, caracterizar nuestro sistema experimental, como una base para los análisis de la inhibición del transportador GLUT1. En las diferentes condiciones experimentales se midió transporte en función de las concentraciones de sustrato, para obtener el valor de K_M y V_{max} para los distintos tipos de ensayos. Para ello se midió la incorporación de los distintos sustratos en un intervalo de 0 a 50 mM. El resultado de estos ensayos se presenta en la figura 2. Se puede apreciar que en todos los ensayos se verificó un transporte saturable. En condiciones de entrada para 2-desoxi-D-glucosa un valor de K_M de 8 mM y una velocidad máxima de $1400 \text{ pmoles} \times 10^6 \text{ cels}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ (Figura 2A). En idénticas condiciones pero usando el sustrato no metabolizable 3-O-metil-D-glucosa, la constante de semisaturación fue de 10 mM, con una velocidad máxima de $2000 \text{ pmoles} \times 10^6 \text{ cels}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ (Figura 2B). En condiciones de intercambio en equilibrio la afinidad de GLUT1 por la metilglucosa disminuyó ligeramente a un valor de K_M de 25 mM, y una V_{max} de $780 \text{ pmoles} \times 10^6 \text{ cels}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ (Figura

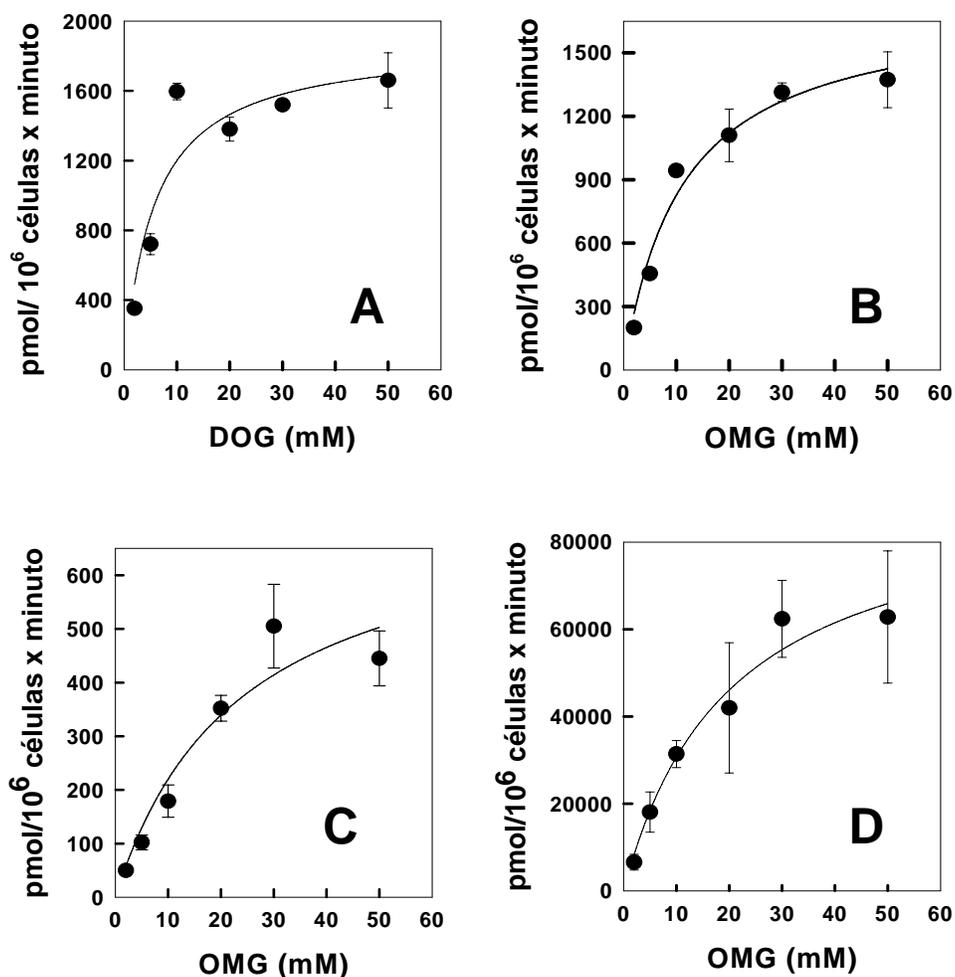


Figura 2.- Curvas de saturación de la velocidad del transporte de DOG y OMG en eritrocitos humanos. Cada ensayo se realizó como se describe en materiales y métodos. **Panel A y B.** Curva de saturación para DOG y OMG en ensayos trans-cero de entrada. **Panel C.** Curva de saturación para OMG en condiciones de equilibrio. **Panel D.** Curva de saturación para 3-O-metil-D-glucosa en condiciones de salida. Cada ensayo se realiza en triplicado y se representa \pm una desviación estándar.

2C). Por último en condiciones de salida se determino un K_M de 20 mM y una V_{max} de 90000 pmoles $\times 10^6$ cels $^{-1}\times$ min $^{-1}$ aproximadamente (Figura 2D). Nuestros resultados confirman que GLUT1 es más afín por desoxiglucosa que por metilglucosa y que existen diferencias en los parámetros cinéticos que se determinan en diferentes condiciones experimentales, pero son en general similares a los descritos por otros autores.

4.1.3 Transporte de análogos de glucosa en presencia de metilxantinas.

Las metilxantinas fueron capaces de bloquear el transporte de sustratos a través de GLUT1 en eritrocitos humanos. En condiciones de entrada al medir el transporte a un nivel fijo de desoxiglucosa en presencia de concentraciones crecientes de metilxantinas, pentoxifilina, cafeína y teofilina lograron inhibir el transporte hasta un 60-80%. Pentoxifilina mostró un valor de K_i de 10 mM, mientras que para cafeína y teofilina los valores de K_i fueron de 20 y 18 mM (Figura 3A) respectivamente. Como control positivo usamos floretina, compuesto que es un conocido inhibidor de GLUT1. Floretina bloqueó el transporte de desoxiglucosa en nuestro sistema con un valor de K_i igual a 10 μ M, lo cual concuerda con lo descrito por otros autores (Figura 3B).

En condiciones de entrada pero al utilizar metilglucosa los valores de constantes de inhibición (K_i) fueron para pentoxifilina de 5 mM y para cafeína y teofilina de 10 mM (Figura 4A). En este caso mostraron ser mejores inhibidores afectando el transporte hasta en un 100%. En los ensayos de intercambio de equilibrio estas tres metilxantinas revelaron valores de constante de inhibición de alrededor de 2 mM (Figuras 4B). En condiciones de salida encontramos resultados muy similares a los obtenidos en condiciones de equilibrio, arrojando

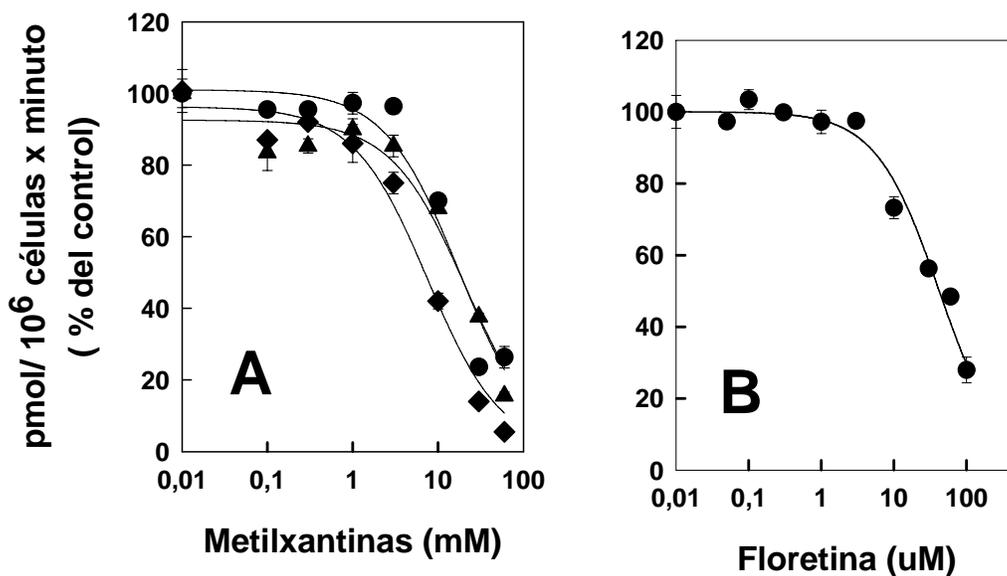


Figura 3.- Efecto de las metilxantinas sobre el transporte de desoxiglucosa en eritrocitos enteros. Panel A. Inhibición de la entrada de DOG por metilxantinas (●) pentoxifilina, (▲) cafeína y (■) teofilina. **Panel B.** Inhibición del transporte de DOG por (●) floretina. Los datos son presentados como porcentaje del control (sin inhibidor). Los ensayos se realizaron por triplicado en un tiempo de 30 segundos usado una concentración de DOG fría igual a 0,5 mM y caliente de 0,8 μ Ci, usando 50-60 millones de células y a t° ambiente. Cada ensayo se realiza en triplicado y se representa \pm una desviación estándar.

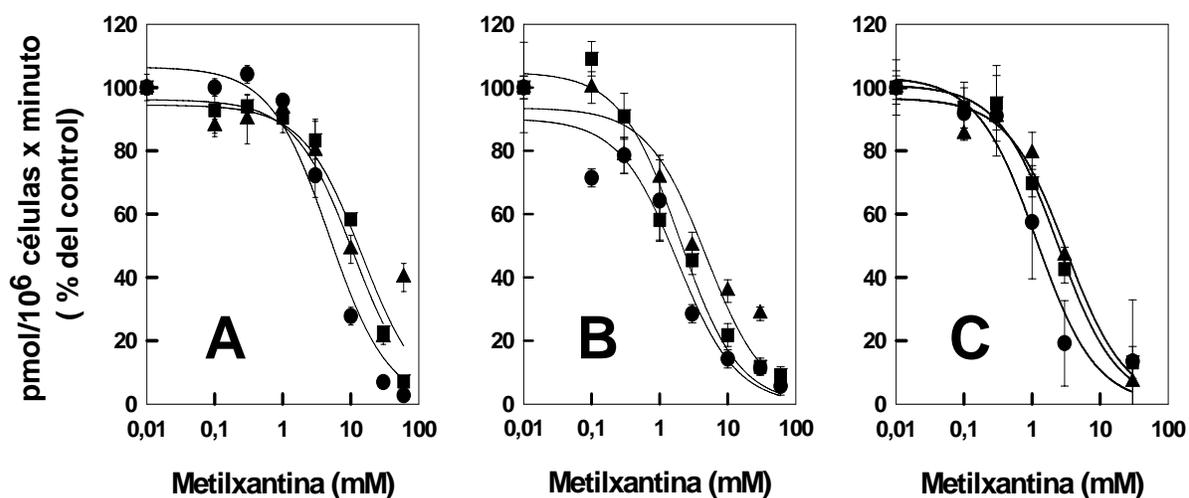


Figura 4.- Efecto de metilxantinas sobre el transporte de 3-O-metilglucosa.

Panel A. Trans-cero de entrada, realizado a 30 segundos, a temperatura ambiente. **Panel B.** Intercambio en equilibrio, realizado a 4°C en un periodo de 30 segundos. **Panel C.** Trans-cero de salida, realizado en 10 segundos a t° ambiente. En todos los gráficos el símbolo (●) representa a pentoxifilina (▲) a teofilina y (■) a cafeína. Los datos son presentados como porcentaje del control (sin inhibidor). Cada determinación se realizó por triplicado y se representa el valor del promedio \pm una desviación estándar. La cantidad de células empleadas en cada ensayo fluctuó entre 50-60 millones.

valores de 1 mM para pentoxifilina y de alrededor de 3 mM para cafeína y teofilina (Figura 4C). Es claro entonces que pentoxifilina es un inhibidor ligeramente más eficiente que cafeína y teofilina. Asimismo, la capacidad de las metilxantinas de bloquear al transportador es dependiente del tipo de ensayo de transporte empleado.

4.1.4 Análisis de la inhibición del transporte de hexosas por las metilxantinas.

Se llevó a cabo un análisis detallado de cómo afectan las metilxantinas al transporte de hexosas en eritrocitos. Para ello se determinó el transporte de diferentes niveles de metilglucosa en condiciones trans-cero de entrada y salida y en ensayos de intercambio en equilibrio, en presencia de distintas concentraciones fijas y variables de las metilxantinas. El propósito de estos ensayos es obtener pruebas acerca de la manera en la cual las metilxantinas afectan el transporte, es decir si lo hacen modulando o no la unión del sustrato a la proteína. Este concepto se ve directamente reflejado al analizar los valores de K_M y V_{max} en presencia o ausencia de una concentración de metilxantina igual o superior al valor de su K_i .

En ensayos de entrada realizados con desoxiglucosa (Figura 5) o metilglucosa (Figura 6) las tres metilxantinas presentaron una inhibición del tipo incompetitiva. Esto quiere decir que en estas condiciones tanto pentoxifilina, cafeína y teofilina fueron capaces de afectar los valores tanto de K_M como de V_{max} para el transporte del azúcar. En la figura 5 podemos ver los resultados para la caracterización de los compuestos analizando el transporte con desoxiglucosa en donde los valores de K_M bajaron de 8 mM a un valor promedio de 4 mM en presencia de pentoxifilina, cafeína y teofilina; mientras que los valores de V_{max} disminuyeron de 1400 a alrededor de 600 $\text{pmoles} \times 10^6 \text{ cels}^{-1} \times \text{min}^{-1}$. En la figura 6 se aprecian los datos

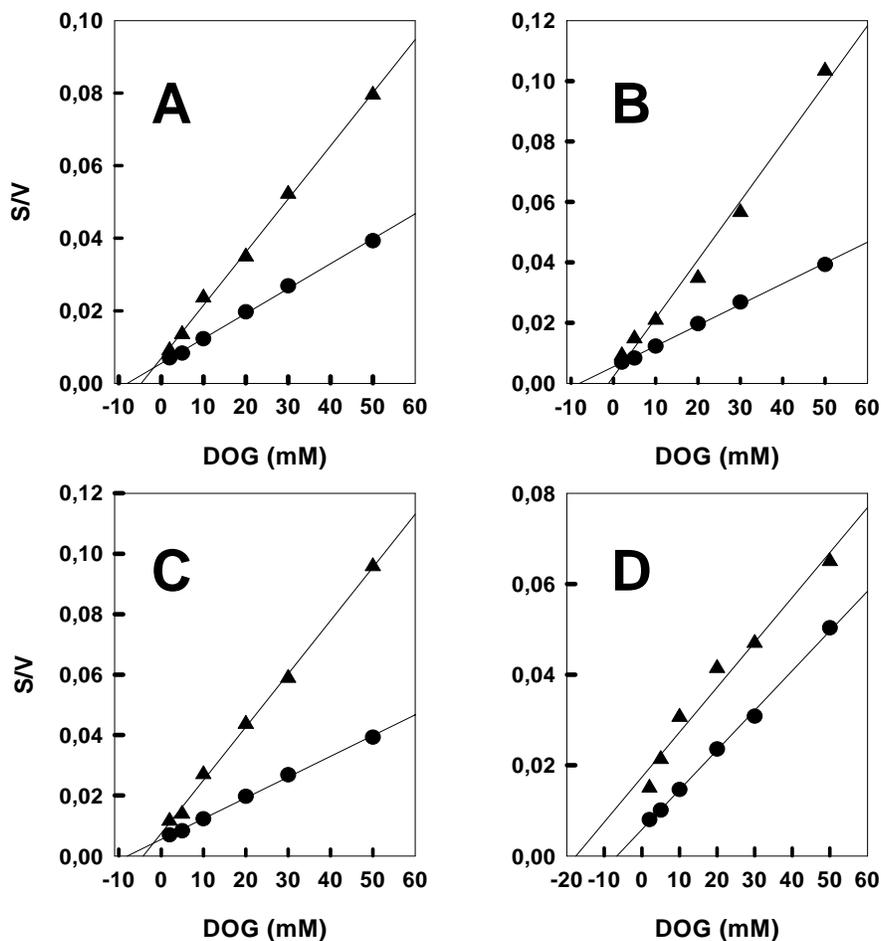


Figura 5.- Caracterización del patrón de la inhibición de metilxantinas y floretina en condiciones de entrada. Se evaluó la incorporación de distintas concentraciones de DOG tanto en ausencia (●) como en presencia (▲) de una concentración fija de los distintos inhibidores en cada curva. **Panel A.** Efecto de pentoxifilina en una concentración de 0 y 1 mM. **Panel B.** Efecto de cafeína en una concentración de 0 y 4 mM. **Panel C** Efecto de teofilina en una concentración de 0 y 4 mM. **Panel D.** Efecto de floretina en una concentración de 0 y 10 mM. Los datos se representan como un gráfico de Hanes- Woolf.

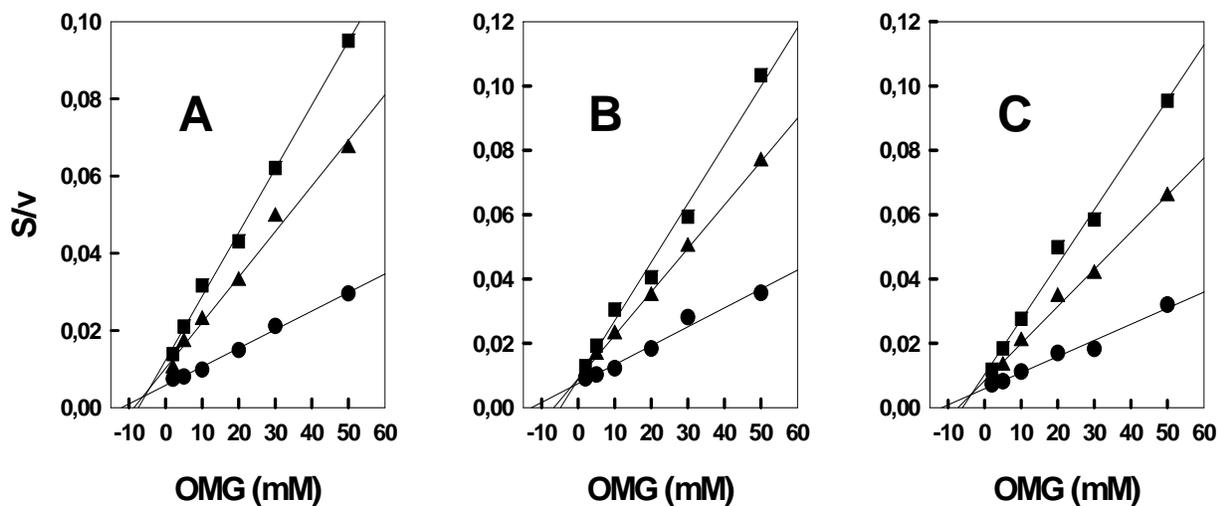


Figura 6.- Caracterización del patrón de la inhibición de metilxantinas en condiciones de entrada. Se evaluó la incorporación de distintas concentraciones (2-50 mM) de 3-O-metilglucosa tanto en ausencia (●) como en presencia (▲) y (■) de dos concentraciones fijas de los inhibidores en cada curva. Los ensayos se realizaron en un periodo de 30 segundos, con una cantidad de 50-60 millones de células y a t° ambiente. **Panel A.** Efecto de pentoxifilina en una concentración de 0, 2 y 4 mM. **Panel B.** Efecto de cafeína en una concentración de 0, 4 y 8 mM. **Panel C.** Efecto de teofilina en una concentración de 0, 4 y 8 mM. Los datos se representan en gráficos de Hanes-Woolf.

usando metilglucosa y dos concentración distintas para cada compuesto; aquí el valor de K_M descendió de un valor de 11 mM para la curva control (sin inhibidor) a aproximadamente 7 mM en presencia de metilxantinas; mientras que el valor de V_{max} fue de 2000 $\text{pmoles} \times 10^6 \text{ cels}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ en ausencia y de aproximadamente 700 $\text{pmoles} \times 10^6 \text{ cels}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ en presencia de las metilxantinas. Este tipo de inhibición refleja la capacidad del inhibidor de unirse reversiblemente al complejo proteína-sustrato formando con esto un complejo proteína-sustrato-inhibidor inactivo, sin capacidad de traslocar el sustrato a través de la membrana. En la figura 5D se puede apreciar el control realizado por floretina usando desoxiglucosa como sustrato. Se reconoce que la inhibición por este compuesto sobre el transporte es de carácter competitivo, pues su sitio de unión a GLUT1 se encuentra por la cara exofacial del transportador y donde afecta directamente la unión del sustrato a la proteína.

En condiciones de intercambio en equilibrio y trans-cero de salida el tipo de inhibición fue del tipo no competitiva (Figura 7-8). En estos casos el inhibidor aparentemente no afecta la unión del sustrato a la proteína. El sustrato y el inhibidor se unen reversiblemente y de forma independiente a sitios distintos sin embargo el complejo proteína-sustrato-inhibidor es catalíticamente inactivo para permitir el transporte. Esto en la práctica se traduce en que el valor de K_M para el azúcar no se ve afectado por la presencia de metilxantinas pero si afecta el valor de V_{max} para su transporte. Es decir, la afinidad del transportador por el análogo de glucosa se mantiene pero la velocidad en que es transportada cambia. Se realizaron para cada ensayo dos concentraciones de inhibidor. Para ambos ensayos el valor de K_M se mantuvo inalterado tanto en presencia como en ausencia de metilxantinas; a partir del valor del intercepto en el eje X se deriva un K_M de aproximadamente 20 mM. Por otro lado, el valor

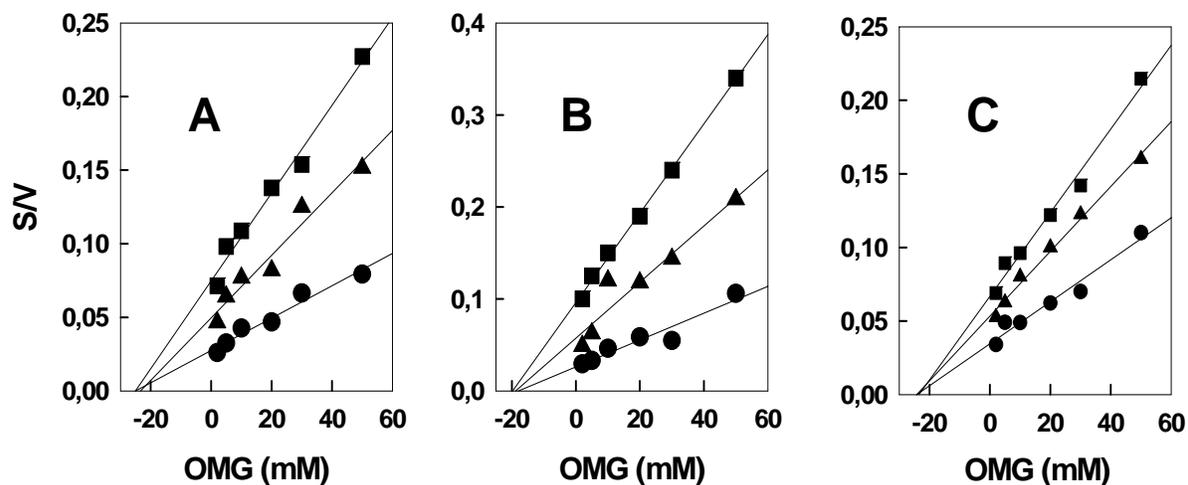


Figura 7.- Caracterización del patrón de la inhibición de metilxantinas en condiciones de intercambio en equilibrio. Se evaluó la incorporación de distintas concentraciones (2-50 mM) de 3-O-metil-D-glucosa tanto en ausencia (●) como en presencia de dos (▲) y (■) concentraciones fijas de los inhibidores en cada curva. **Panel A.** Efecto de pentoxifilina en una concentración de 0, 2 y 6 mM **Panel B.** Efecto de cafeína en una concentración de 0, 4 y 8 mM. **Panel C.** Efecto de teofilina en una concentración de 0, 4 y 8 mM. Todas las curvas se graficaron como concentración de sustrato/ velocidad de incorporación versus concentración de sustrato (gráfico de Hanes-Woolf).

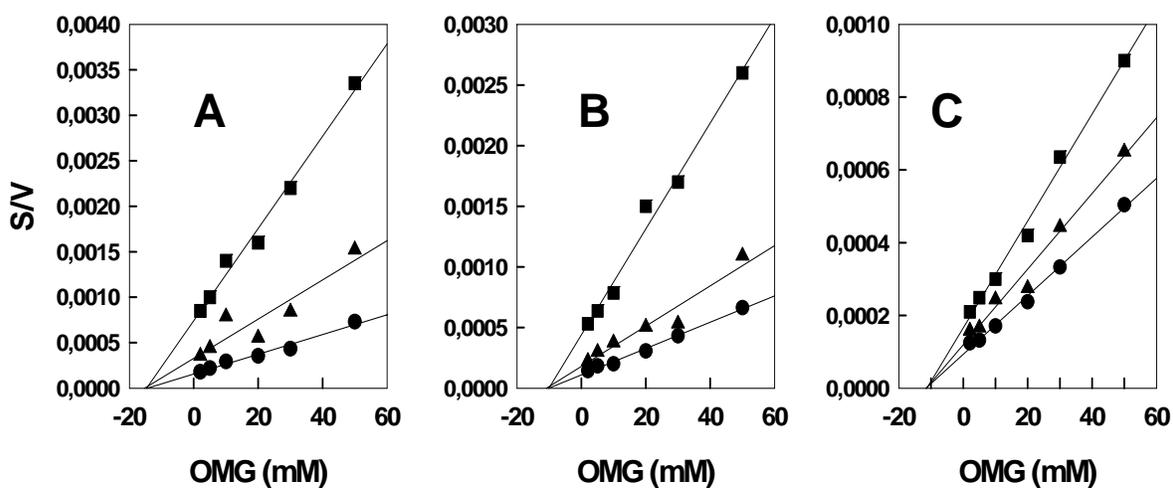


Figura 8.- Caracterización del patrón de la inhibición de metilxantinas en condiciones de trans-cero de salida. Se evaluó la incorporación de distintas concentraciones (2-50 mM) de 3-O-metil-D-glucosa tanto en ausencia (●) como en presencia de dos (▲) y (■) concentraciones fijas de los inhibidores en cada curva. Los ensayos se realizaron en un periodo de 10 segundos, con una cantidad de 50-60 millones de células y a t° ambiente. **Panel A.** Efecto de pentoxifilina en una concentración de 0, 2 y 6 mM. **Panel B.** Efecto de cafeína en una concentración de 0, 4 y 8 mM. **Panel C** Efecto de teofilina en una concentración de 0, 4 y 8 mM. Todos las curvas se graficaron como concentración de sustrato/ velocidad de incorporación versus concentración de sustrato (gráfico de Hanes-Woolf).

de V_{\max} descendió de 740 y 95400 $\text{pmoles} \times 10^6 \text{ cels}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ a aproximadamente 400 y 50000 $\text{pmoles} \times 10^6 \text{ cels}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ en condiciones de intercambio en equilibrio y salida, respectivamente.

Al graficar las pendientes de las rectas (dato no mostrado) obtenidas en la determinación de la inhibición en función de las concentraciones de las metilxantinas, se obtuvo por extrapolación al eje X que valor de K_i para el inhibidor. Este valor debería ser semejante al obtenido en las curvas de inhibición simples, y concuerda en los ensayos de equilibrio y salida en donde los valores fluctuaron entre 2-5 mM. No obstante, son marcadamente distintos en condiciones de entrada, por ejemplo decae de 20 a 2 mM para pentoxifilina. Esta diferencia puede deberse al ensayo en sí mismo y a la afinidad que presenta el transportador en esta conformación por el sustrato.

4.2 Ensayos de salida de D-glucosa (Ensayo de Sen y Widdas)

4.2.1 Inhibición del eflujo de D-glucosa por metilxantinas

Con el fin de evaluar la unión de las metilxantinas al sitio externo del transportador, decidimos probar el transporte mediante ensayos de eflujo (salida) de D-glucosa, en condiciones cis-infinito, usando la técnica descrita por Sen y Widdas (Sen y Widdas, 1962). Este procedimiento se basa en el cambio de volumen que experimentan eritrocitos que contienen una alta concentración de glucosa (100 mM), al ser sometidos a un rápido cambio de osmolaridad del medio. Luego de una rápida disminución inicial en la luz dispersada, la salida de D-glucosa conlleva eventualmente a un aumento en la luz dispersada. Este aumento de la dispersión de luz es función de la velocidad de transporte de D-glucosa desde el interior

de las células, hasta alcanzar el equilibrio quimioosmótico. La velocidad de salida de D-glucosa se registró fotométricamente a una temperatura controlada de 30°C, usando un espectrofotómetro Perkin-Elmer LS-50, en agitación constante. En ausencia de un gradiente de glucosa en las células no se observa un cambio de la luz dispersada.

Para evaluar el transporte se determinaron los valores de las constantes de velocidad de primer orden (k) en ausencia y en presencia de los inhibidores. En nuestras manos el valor de k en condiciones controles, en ausencia de inhibidores, fue de 0,07-0,08 seg^{-1} . El transporte de salida de glucosa mediado por GLUT1 se vio inhibido por concentraciones milimolares de los inhibidores. Estos datos de transporte de salida (k) en función de la concentración de los inhibidores se ajustaron a una ecuación de inhibición hiperbólica. Las constantes de inhibición fluctuaron entre 1 y 5 mM (Figura 9A). Los valores de K_i mostraron un excelente acuerdo con los valores obtenidos en condiciones trans-cero de salida usando metilglucosa como sustrato de transporte en eritrocitos. Controles en donde se evaluó la capacidad de floretina, citocalasina B y citocalasina E de afectar el transporte de D-glucosa; muestran que las constantes de inhibición obtenidas fueron de 0,5 μM para CCB y de 1 μM para floretina, mientras citocalasina E fue incapaz de afectar el transporte. Estos resultados están en perfecto acuerdo con los datos de la literatura. Esto indica que el ensayo es apropiado para evaluar la sensibilidad del transportador GLUT1 frente a los inhibidores (Figura 9B).

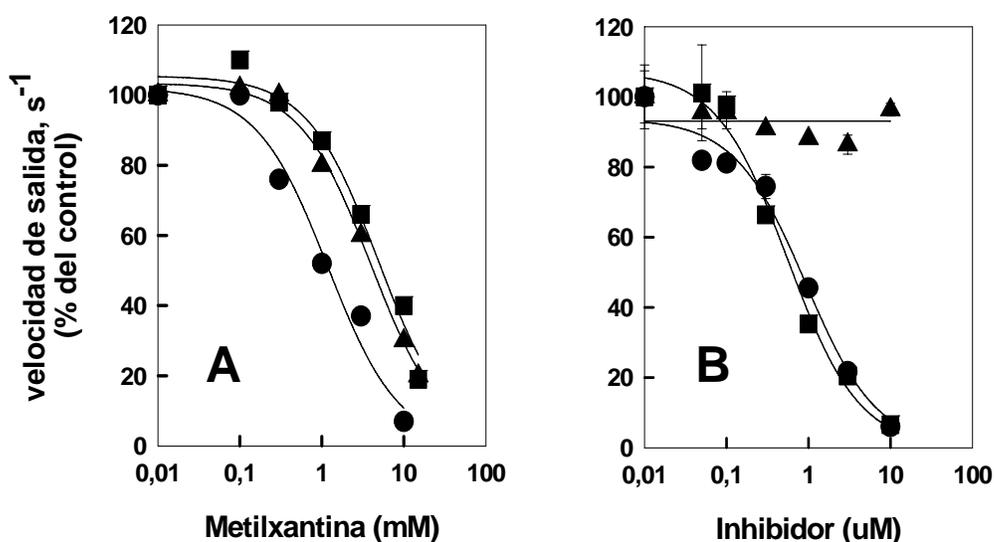


Figura 9.- Inhibición del eflujo de D-glucosa en eritrocitos humanos. Los ensayos se realizaron midiendo dispersión de luz, como se describe en materiales y métodos. **Panel A.** Efecto de (●) pentoxifilina, (▲) cafeína y (■) teofilina; en donde el valor de K_i aparente calculado fue de 1 mM, 3 mM y 3 mM respectivamente para cada compuesto. **Panel B.** Curvas controles realizadas con CCB (■) con un K_i de 0,5 uM, floretina (●) con un valor de K_i aproximado de 1 μ M y CCE (▲) que no fue capaz de afectar el transporte. Los datos se presentan como porcentaje del control (sin inhibidor) Cada determinación se realizó por duplicado y se representa el valor del promedio \pm una desviación estándar.

4.2.1 Ensayos de Sen-Widdas

Sen y Widdas demostraron que si los datos de transporte obtenidos en presencia de diferentes concentraciones de D-glucosa en el lado externo de las células se expresan como tiempo de salida en función de la concentración de glucosa externa (Gráfico de Sen-Widdas), el intercepto en el eje horizontal corresponde al valor negativo de la constante de semisaturación para el sitio de glucosa externo (Sen y Widdas, 1962). La figura 10 muestra gráficos de Sen-Widdas para la salida de D-glucosa en condiciones cis-infinito. El valor de K_d para el sitio externo de glucosa corresponde a 4 mM, en acuerdo a lo descrito por otros autores (Figuras A, B y C, recta representada con el símbolo ●).

Los efectos cinéticos de la presencia de citocalasina B y de floretina sobre el transporte de hexosas facilitado por GLUT1 son bien conocidos. Se ha descrito que citocalasina B es un inhibidor competitivo de la salida de glucosa desde las células, mientras que resulta ser nocompetitivo en relación a la incorporación del azúcar hacia la célula (Basketter y Widdas, 1978; Deves y Krupka, 1978). Estos datos se explican pues citocalasina B se une a un sitio accesible por la cara endofacial del transportador, mientras que floretina se une competitivamente al sitio externo de unión a glucosa del transportador y no se une a la superficie endofacial (Krupka, 1985). En acuerdo con estos antecedentes, citocalasina B inhibió la salida de D-glucosa ($K_i = 0,5 \mu\text{M}$), pero no afectó la afinidad de D-glucosa por su sitio de unión externo. Asimismo, floretina también bloqueó la salida del azúcar ($K_i = 1 \mu\text{M}$), pero fue capaz de alterar notablemente la afinidad de D-glucosa por su sitio de unión externo. El valor de K_d para el sitio de D-glucosa accesible por la cara externa aumentó de 4 mM a 15 mM (dato no mostrado). Estos resultados están de acuerdo con la noción que el sitio de unión

de citocalasina B se encuentra por dentro y el de floretina por fuera del transportador. Entonces con estos resultados se valida el uso de esta tecnología para probar el efecto de otros compuestos sobre la integridad del sitio externo de unión de D-glucosa.

Al realizar este tipo de ensayo en presencia de concentraciones fijas de las metilxantinas se pudo apreciar que la presencia de la metilxantina pentoxifilina alteró la afinidad de D-glucosa por el sitio externo (Figura 10A), en forma similar a lo observado con floretina. Los valores de K_d variaron de 3,5 mM en ausencia de pentoxifilina a 5mM y 8 mM en presencia de 3 mM y 6 mM de pentoxifilina, respectivamente. En claro contraste, el sitio de D-glucosa externo no fue afectado por la presencia de las metilxantinas cafeína y teofilina (Figura 10B y 10C), vale decir el intercepto en el eje horizontal se mantuvo inalterado en un valor de K_d de 4 mM aproximadamente, en presencia de 4 mM y 8 mM de los compuestos. Los resultados sugieren que cafeína y teofilina se unen al transportador en un sitio diferente al sitio de unión externo de D-glucosa; mientras que pentoxifilina comparte algunos determinantes de unión con D-glucosa.

4.2.2 Competencia de los inhibidores por el sitio de unión externo

Nuestros resultados apuntan a que las metilxantinas afectan la actividad del transportador GLUT1 por unión a un sitio accesible por la superficie externa del transportador. Surge la pregunta entonces si todas ellas se unen a un mismo sitio. Para obtener una prueba de esta posibilidad diseñamos un ensayo de competencia con parejas de inhibidores. Se midió el transporte de D-glucosa en presencia de concentraciones variables de un inhibidor (I_1), en presencia de una concentración fija del otro inhibidor (I_2). En este caso comparamos el valor

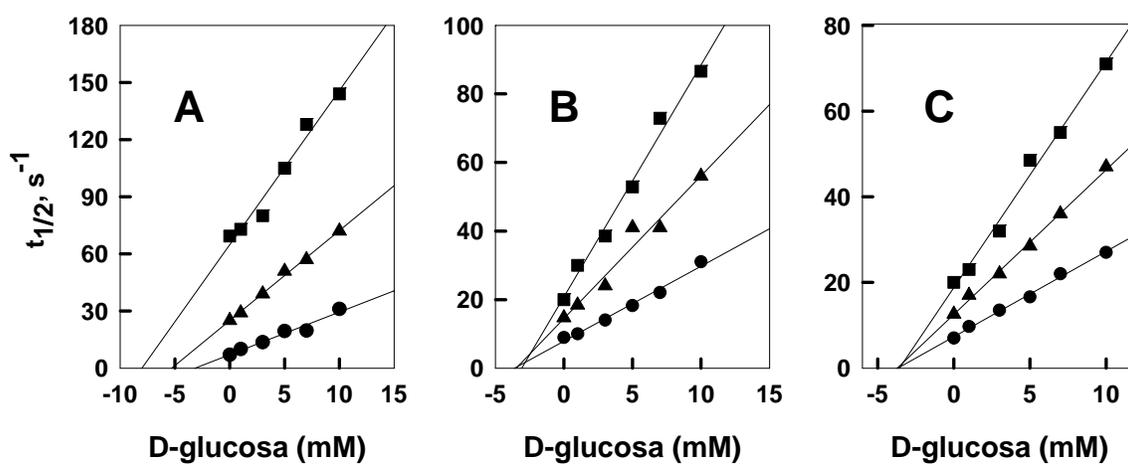


Figura 10.- Efecto de metilxantinas sobre la afinidad de D-glucosa por el sitio de unión externo. Los ensayos se realizaron por dispersión de luz como se describe en materiales y métodos **Panel A.** Efecto de pentoxifilina. Los símbolos corresponden a los experimentos realizados en presencia de (●) 0 mM, (▲) 3 mM y (■) 6 mM del compuesto. **Panel B.** Efecto de cafeína. Los símbolos corresponden a los experimentos realizados en presencia de (●) 0, (▲) 4 y (■) 8 mM del inhibidor. **Panel C.** Efecto de teofilina. Los símbolos corresponden a los experimentos realizados en presencia de (●) 0 mM, (▲) 4 mM y (■) 8 mM del inhibidor.

de K_i aparente que obtuvimos con un inhibidor (K_{I1}), con el valor de K_i que se obtenía en el ensayo en presencia de una concentración fija del otro inhibidor (K_{I1}^{I2}). La concentración del segundo inhibidor fue igual al valor aparente de K_i para este inhibidor (K_{I2}). Razonamos que si I_2 es capaz de unirse al mismo sitio que I_1 , el valor de K_{I1}^{I2} calculado debe ser mayor que el determinado en ausencia de I_2 . Entonces, la razón K_{I1}^{I2}/K_{I1} debe ser igual o mayor a 2. En cambio, si I_2 inhibe el transporte por unión a un sitio independiente al de I_1 , entonces K_{I1}^{I2} debe ser similar a K_{I1} y el valor de razón K_{I1}^{I2}/K_{I1} debería ser cercano a 1.

Para probar este abordaje, se realizaron dos controles, uno usando citocalasina B y D-glucosa y otro usando floretina y D-glucosa, respectivamente. Como sabemos citocalasina B y floretina son dos compuestos que afectan el transporte de glucosa uniéndose en distinta forma al transportador GLUT1, CCB se une a la cara endofacial donde compite por la unión de D-glucosa al sitio accesible internamente, mientras que floretina lo hace a su cara exofacial, donde compite con D-glucosa por la unión al sitio accesible externamente. Al determinar una curva de inhibición por CCB se obtuvo un valor de K_i de 0,5 μM . Por lo tanto al agregar una concentración de azúcar suficiente, este valor no debería cambiar pues estamos evaluando el sitio externo de unión de glucosa y CCB se une internamente. Con floretina obtuvimos que el valor de K_i es de 1 μM ; al agregar D-glucosa por el lado externo este valor debería aumentar por lo menos al doble. Obtuvimos que el valor de K_i para citocalasina B en presencia de 5 mM de D-glucosa se mantuvo inalterado, y al expresarla como razón del K_i de D-glucosa/citocalasina B el valor fue de 1. En cambio el valor de K_i para floretina aumentó de 1 μM a 2 μM , cuando D-glucosa se encontraba presente en el lado externo, por lo que la razón de los K_i D-glucosa/floretina arrojó un valor de 2 (Figura 11, paneles A y B). Estos resultados

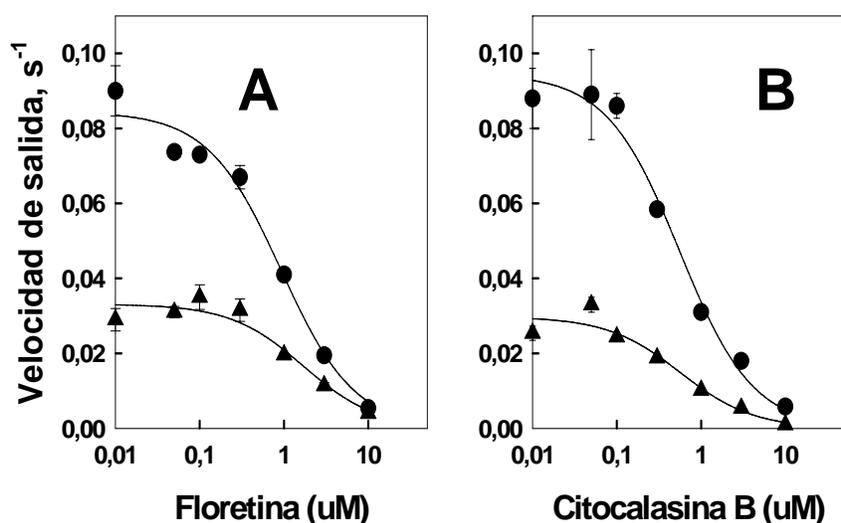


Figura 11.- Controles realizados para los ensayos de competencia por el sitio de unión externo para D-glucosa. Se midió el efecto sobre la velocidad de salida de D-glucosa en presencia de concentraciones crecientes de un compuesto y luego se realizó esta misma curva en presencia de otro compuesto en una concentración fija. **Panel A.** Inhibición por floretina de la salida de glucosa. En ausencia de 5 mM de glucosa (●), más una concentración fija en 5 mM de D-glucosa (▲). **Panel B.** Inhibición por CCB de la salida de glucosa. En ausencia de glucosa (●). Más una concentración fija en 5 mM de D-glucosa (▲). Cada determinación se realizó por duplicado y se representa el valor del promedio \pm una desviación estándar

demuestran la utilidad de estos ensayos de competencia, pues ellos podrían dar indicios de cómo se estarían uniendo algunos compuestos a la cara extracelular del transportador. En la tabla 1 se resumen los resultados obtenidos con las tres metilxantinas. Podemos ver que al hacer competir la metilxantina pentoxifilina contra cafeína y teofilina el valor de la razón aumentó en ambos casos a 2, lo que nos diría que estos tres compuestos se estarían uniendo al mismo sitio en la cara externa del transportador (tabla 1, columna 1). Para confirmar este resultado, se invirtieron los compuestos y se hizo competir cafeína contra pentoxifilina y teofilina. En la segunda columna, podemos ver que la razón también aumentó al doble, por lo que se confirma que ellas afectan el mismo sitio en la cara extracelular de GLUT1. Sin embargo al hacer competir estas tres metilxantinas contra el sustrato del transportador, D-glucosa obtuvimos, que sólo pentoxifilina fue capaz de afectar directamente la unión de D-glucosa a la cara exofacial del transportador, mientras que cafeína y teofilina mantienen la razón en un valor de 1. Es decir la presencia de D-glucosa en el ensayo no afectó el sitio de unión al transportador para cafeína y teofilina.

Probamos además si genisteína, otro inhibidor de GLUT1 no relacionado estructuralmente a las metilxantinas, afectaba la unión de tanto las metilxantinas como de D-glucosa a la cara exofacial del transportador. Esta isoflavona se hizo competir con 5 mM de D-glucosa y con 5 mM de cafeína. Los resultados muestran que el valor de K_i para genisteína se ve afectado por la presencia de cafeína y de D-glucosa. Genisteína es un inhibidor que compite por la unión del sustrato por la cara externa del transportador, por lo que el resultado está en completo acuerdo con los antecedentes bibliográficos (Vera et al, 1996). Como este mismo abordaje aplicado a las metilxantinas arrojó que todas ellas se unían a un mismo sitio, el

Tabla 1.-Valores de las razones obtenidas al hacer competir parejas de inhibidores por el sitio de unión externo del transportador

	$\frac{K_i \text{ compuesto}}{K_i \text{ pentoxifilina}}$	$\frac{K_i \text{ compuesto}}{K_i \text{ cafeína}}$	$\frac{K_i \text{ D-glucosa}}{K_i \text{ metilxantina}}$
5 mM cafeína	2,0		1,1
5 mM teofilina	2,0	2,5	1,1
1 mM pentoxifilina		2,9	2,0

resultado obtenido para cafeína se puede comprender como el resultado esperado para las metilxantinas pentoxifilina y teofilina. Entonces además de afectar directamente la unión de D-glucosa al transportador, interfiere con la unión de cafeína a GLUT1. Este resultado puede ser consecuencia de la estructura de genisteína la que sería capaz de impedir el libre acceso de las metilxantinas al transportador. Otra hipótesis no descartable es que el sitio de unión de genisteína podría estar entre el sitio de unión para cafeína y D-glucosa.

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

4.3.1 Desplazamiento de la unión de citocalasina B en membranas de eritrocitos por las metilxantinas

Es conocido que citocalasina B se une al transportador de hexosas GLUT1 de forma directa, por lo que el hecho de desplazar la unión de citocalasina B a GLUT1 se usa como prueba para indicar si otros compuestos se unen al transportador. Para aplicar este criterio con las metilxantinas, en primer lugar verificaremos la afinidad con la que se liga citocalasina B a nuestras preparaciones de membranas de eritrocitos. Para ello se obtuvo una curva de unión de citocalasina B (Figura 12. Panel A). En la literatura este valor se ubica alrededor de 0,3 -0,8 μM . En la Figura 12A podemos apreciar que obtuvimos un valor de 0,5 μM , que concuerda con los datos de la bibliografía. Al analizar los datos de la curva de unión y expresarlos como unión (desplazamiento/concentración de sustrato) en función de la concentración de citocalasina B libre (gráfico de Eadie-Scatchard) podemos ver que la pendiente es de un valor de 0,6 μM (dato no mostrado). Además se puede apreciar que la unión de citocalasina B al transportador GLUT1 es saturable.

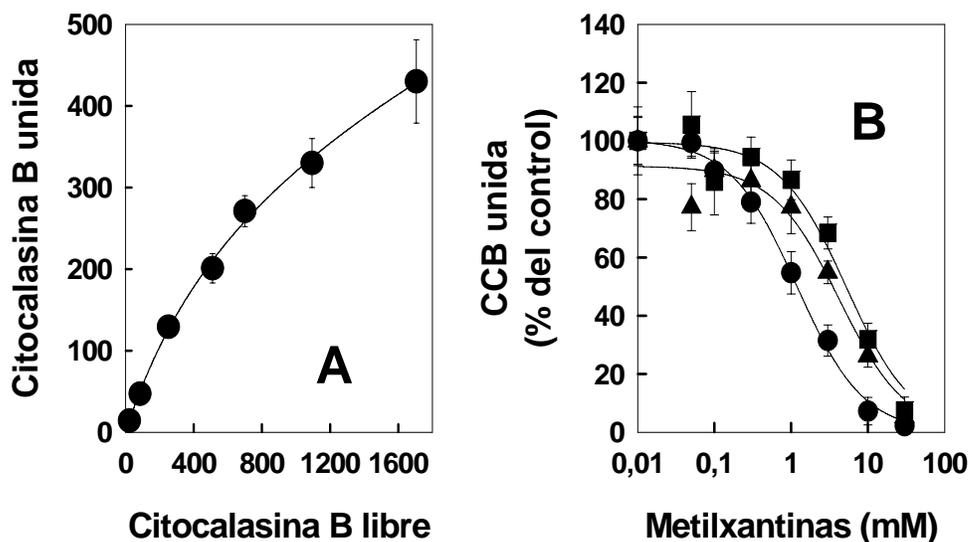


Figura 12.- Curvas de unión y desplazamiento con CCB. Panel A. Se midió la unión de citocalasina B al transportador GLUT1. **Panel B.** Se determinó la capacidad de pentoxifilina (●), cafeína (▲) y teofilina (■) de desplazar a CCB unida al transportador. Estos ensayos se realizaron con membranas de eritrocitos como se describe en materiales y métodos. Cada determinación se hizo por triplicado y se representa como el promedio \pm DS. El valor de las constantes de desplazamiento se describen en resultados.

4.3.2 Efecto de metilxantinas sobre la unión de citocalasina B al transportador GLUT1

Para determinar que tan eficientes son las metilxantinas para desplazar a citocalasina B de su sitio de unión a GLUT1, se midió la cantidad de CCB (0,1 μ M) que permanece unida a las membranas de eritrocitos en función de una concentración creciente de metilxantina. En la Figura 12, panel B podemos apreciar que la unión de CCB a membranas de eritrocitos se ve notablemente afectada por la presencia de metilxantinas. Para pentoxifilina se pudo determinar un valor de K_d de 1mM y con cafeína y teofilina un K_d de 5 mM.

4.4 Efecto de las metilxantinas sobre GLUT1 expresado en membrana de ovocitos de *Xenopus laevis*.

Una vez expresada la proteína en la membrana del ovocito lo primero a determinar es el periodo en el cual el ensayo es función lineal del tiempo de transporte para así no realizar los ensayos en un periodo de posible acumulación del sustrato. Este tiempo en este sistema fue de alrededor de los 15 min (Figura 13, panel A). Todos los ensayos se realizaron a 3 min. La curva de saturación para el sustrato DOG nos mostró un valor de K_M de 6 mM (Figura 13B), valor que concuerda con datos de bibliografía (Carruthers, 1990). Al evaluar el efecto de las metilxantinas sobre el transporte de DOG, observamos una inhibición de un 100 % para pentoxifilina y cafeína. Los valores de K_i estimados fueron de 1 mM para pentoxifilina y de 3 mM para cafeína (Figura 13, paneles A y B). Estos datos confirman nuestros resultados obtenidos en eritrocitos humanos y demuestran que el efecto inhibitorio de las metilxantinas sobre el transporte de hexosas facilitado por GLUT1 no es dependiente del contexto celular en el cual se expresa la proteína.

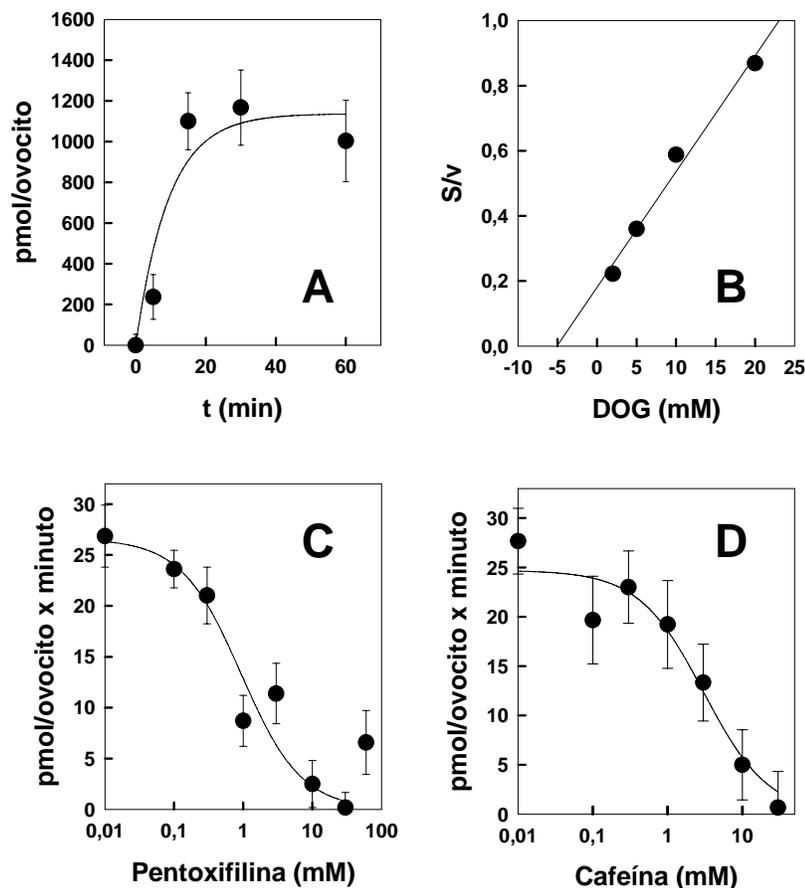


Figura 13.- Efecto de metilxantinas sobre GLUT1 expresado en ovocitos de *Xenopus laevis*. Los ensayos se realizaron como se describe en materiales y métodos. **Panel A.** Cinética de incorporación de DOG. Se midió la incorporación del sustrato a distintos tiempos. **Panel B.** Curva de saturación de la velocidad del transporte de DOG. Los datos se presentan en un gráfico de Hanes-Woolf. **Panel C y D.** Efecto de pentoxifilina y cafeína, respectivamente, sobre la incorporación de DOG por GLUT1. Todos los ensayos se realizaron a temperatura ambiente y se expresan como el promedio \pm DS.

5. DISCUSIÓN

En esta tesis mostramos que una familia de compuestos naturales, las metilxantinas, son capaces de inhibir de forma reversible y muy eficiente el transporte de metilglucosa, desoxiglucosa y D-glucosa, todos ellos sustratos que ingresan a la células a través del transportador de hexosas de tipo facilitativo, GLUT1. Usamos como modelo experimental eritrocitos humanos, células que expresan el transportador de hexosas GLUT1. Adicionalmente usamos membranas de eritrocitos, y la expresión del transportador en ovocitos de *Xenopus laevis*. Nuestros datos indican que el efecto en el transporte se debe a una interacción directa de los inhibidores, pentoxifilina, cafeína y teofilina con el transportador GLUT1 y no se encuentra relacionada con la alteración de otras propiedades.

Se reconoce que pentoxifilina tiene la propiedad de afectar la fluidez de la membrana de los eritrocitos (Sato *et al.*, 1991). Es posible pensar entonces que la inhibición del transporte de glucosa obedezca a un fenómeno inespecífico producto de la alteración de las propiedades de la membrana. Para probar esta posibilidad efectuamos ensayos de desplazamiento de citocalasina B desde GLUT1 por las metilxantinas. Se reconoce que este alcaloide compite directamente al transportador por la unión del sustrato en su cara endofacial, por esto se usa como prueba directa para evaluar si otros compuestos interaccionan con el transportador (Bloch, 1973). Las tres metilxantinas fueron capaces de afectar la afinidad de citocalasina B al transportador GLUT1, dato que confirmaría que la interacción de las metilxantinas es directa con el transportador y no es consecuencia de un efecto inespecífico. Este resultado es respaldado por los datos obtenidos al expresar la proteína en un sistema

heterólogo, en ovocitos de *Xenopus laevis*. Las propiedades de la membrana de ovocitos de anfibios son diferentes que las del eritrocito humano. No obstante, las metilxantinas bloquearon la actividad de GLUT1 en este sistema tal como lo caracterizamos en la célula roja. En efecto las constantes de inhibición resultaron en un valor similar a las obtenidas para los ensayos efectuados en eritrocitos humanos.

Por otra parte, la inhibición del transporte de azúcares por estos compuestos ha sido atribuido a cambios en los niveles intracelulares de cAMP en sistemas donde las adenilciclasas y fofodiesterasas se encuentran activas (Biaggioni *et al.*, 1991a). Este potencial factor de confusión se encuentra minimizado en eritrocitos debido a la ausencia o bajos niveles de actividad tanto de adenilciclasas como de fosfodisterasas que presentan estas células. Es por esto que los eritrocitos proveen un sistema simple para el estudio del efecto directo de las metilxantinas sobre el transportador de glucosa GLUT1 sin la posible interferencia de otros mecanismos reguladores.

El efecto directo de las metilxantinas sobre GLUT1 se apoya también en el hecho que las células no requirieron de un periodo de preincubación para que se pueda observar la inhibición sobre el transporte tanto de metilglucosa, desoxiglucosa y D-glucosa. La inhibición se observó inmediatamente después de agregar las metilxantinas y de una manera dosis dependiente. Esto quiere decir que a mayor concentración de metilxantina mayor inhibición. Asimismo, los resultados no son afectados por un periodo de preincubación de las células con las metilxantinas.

GLUT1 es un transportador de hexosas del tipo facilitativo, que permite el transporte de sustratos a través de la membrana plasmática a favor de un gradiente de concentración, sin

gasto de energía (Carruthers, 1990; Gould y Holman, 1993). Los mecanismos moleculares por los que GLUT1 realiza el transporte aun no están claros. Para comprender la relación entre la estructura del transportador y su función, se ha obtenido diversa información bioquímica y biofísica de esta proteína. Por ejemplo, mediante propuestas como mutaciones sitio dirigidas, mapeo por saturación de cisteínas, se ha tratado de dilucidar los residuos de aminoácidos que estarían directamente involucrados en el transporte. Se sabe que el transporte es bidireccional encontrándose en la proteína dos sitios de unión para el sustrato, uno por la cara interna y el otro por la cara externa del transportador (Carruthers, 1990). Asimismo, se ha encontrado que a parte de sus sustratos GLUT1 une un número de moléculas que no tienen una relación estructural con los sustratos y bloquean el ingreso de estos a la célula. Compuestos como citocalasina B, floretina, forscolina y recientemente flavonas y tirfostinas se han usado para identificar posibles regiones de la proteína involucrada tanto en la unión del sustrato como en el ciclo de transporte (Vera *et al.*, 2001).

Se le reconocen a GLUT1 tres secuencias, ubicadas dos en la cara extracelular y una en la cara citoplasmática, que serían putativos sitios de unión a nucleótidos y que estarían involucrados en la regulación del proceso de transporte (Carruthers *et al.*, 1998, Carruthers *et al.*, 2000, Carruthers *et al.*, 2001). Es por esto que es de interés reconocer que las xantinas metiladas están estructuralmente relacionadas a las purinas, pues son precursores de los nucleótidos e investigar su relación con el transportador de glucosa GLUT1.

Nuestros estudios cinéticos revelaron que las tres metilxantinas, pentoxifilina, cafeína y teofilina, son eficientes inhibidores del transporte a concentraciones milimolares, afectando el transporte del sustrato en los ensayos trans-cero de entrada y salida y en condiciones de

equilibrio. Pentoxifilina se manifestó como un inhibidor más eficiente en comparación con cafeína y teofilina, mientras que estas dos últimas mostraron patrones semejantes. La afinidad de las metilxantinas por GLUT1 es mayor cuando el transportador se encuentra mirando endofacialmente, como se mostró en los ensayos de salida ($K_i \sim 1-3$ mM). Para los ensayos de entrada, en que el transportador se encuentra preferentemente con su conformación exofacial, las tres metilxantinas presentaron menor afinidad para unirse al transportador ($K_i \sim 10-20$ mM). Empero, al extrapolar el valor de K_i a partir de las pendientes de las rectas obtenidas al determinar el tipo de inhibición que ejercían estos compuestos (gráfico de Hanes-Woolf) y graficarlas en función de la concentración de inhibidor utilizado, sus valores de K_i fueron similares a aquellos obtenidos para los ensayos trans-cero de salida e intercambio en equilibrio. En ensayos cis-infinito el transporte de D-glucosa se vio igualmente afectado a concentraciones milimolares dejando ver a pentoxifilina como mejor inhibidor del transporte que cafeína y teofilina, manteniendo esta tendencia en todos los ensayos realizados. Los valores de K_I fluctuaron en un rango de 1-5 mM para los tres compuestos, valores muy parecidos a los obtenidos para los ensayos trans-cero de salida utilizando isótopo radiactivo, ambos ensayos evalúan la conformación orientada endofacialmente en el transportador.

Al determinar el tipo de inhibición, en condiciones trans-cero de entrada las metilxantinas se comportaron como un inhibidor del tipo incompetitivo, tanto para el sustrato metilglucosa como para desoxiglucosa. Esto sugiere que fueron capaces de alterar los valores de K_m y V_{max} para el transporte del sustrato, siempre y cuando el complejo proteína-sustrato se encuentre previamente formado. Sin embargo, las metilxantinas mostraron un carácter no competitivo para los ensayos de equilibrio y trans-cero de salida. Esto apunta a que en estas

condiciones se estarían uniendo a sitios independientes del sustrato, lo que se traduce en que se ve afectado sólo el valor de V_{max} , pues la afinidad del sustrato por el transportador no se ve alterada. Nuestros datos nos muestran entonces que la afinidad del sustrato por la proteína sólo se ve afectada cuando se estudia la conformación que se encuentra orientada hacia la cara extracelular del transportador. Es sensato postular entonces que existe un sitio de unión de las metilxantinas en el transportador GLUT1 en la cara extracelular de la proteína.

Los ensayos de Sen-Widdas, evalúan la afinidad de D-glucosa por la cara externa del transportador. Los resultados reflejaron que cafeína y teofilina no afectaron la afinidad de la proteína por D-glucosa. En cambio, pentoxifilina fue capaz de afectar la afinidad de D-glucosa por el sitio de unión externo de una manera competitiva. De estos resultados podríamos deducir que pentoxifilina se está uniendo de una manera funcionalmente distinguible en la cara exofacial del transportador de hexosas GLUT1, al compararla con cafeína y teofilina. Para lo que podríamos señalar dos hipótesis:

1. Existe un sitio de unión en común para las tres metilxantinas al transportador y es la estructura particular de pentoxifilina la que potencia este comportamiento diferencial con cafeína y teofilina, o
2. Existe más de un determinante de unión para pentoxifilina que se encuentra ausente en las dos restantes metilxantinas.

Los experimentos de competencia usando mezclas de metilxantinas nos permiten dirimir entre estas opciones. Al hacer competir estos inhibidores por un posible sitio de unión nuestros resultados son concordantes con la presencia de un sitio común para las metilxantinas, pero distinto al sitio de unión para D-glucosa. Proponemos entonces la

existencia de varios sitios de unión accesibles por la cara exofacial del transportador. La competencia observada para pentoxifilina se podría explicar por la presencia en la estructura de esta metilxantina una cadena lateral de seis carbonos [1-(5-oxohexil)-] que no existe en cafeína y teofilina. Este sitio debe encontrarse próximo al sitio de unión para D-glucosa.

Al realizar este mismo abordaje con la isoflavona genisteína, un reconocido inhibidor competitivo del sitio de unión extracelular para D-glucosa en el transportador GLUT1, compuesto que no presenta propiedades estructurales en común tanto a la familia de las metilxantinas como al sustrato D-glucosa, parece afectar competitivamente tanto al sitio de unión para D-glucosa como al de las metilxantinas. Este antecedente nuevo permite sugerir que existen a lo menos dos diferentes sitios de unión accesibles extracelularmente en el transportador. Este es un dato interesante pues genisteína se reconoce como inhibidor de proteínas tirosina quinasas, donde interactúa con los sitios de unión a nucleótidos en estas proteínas. Estas consideraciones demuestran que se requerirán mayores estudios para comprender el mecanismo de acción de estas metilxantinas sobre los transportadores de glucosa.

En los últimos dos años se han resuelto por cristalografía de rayos X las estructuras de 3 miembros de la superfamilia MFS, el transportador de oxalato, el transportador de glicerol-3-fosfato y la lactosa permeasa (Hirai *et al.*, 2002; Abramson *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2003). Las estructuras secundarias y los empaquetamientos de las hélices fueron homólogos, lo que indica que parece existir un empaquetamiento universal para la familia de transportadores MFS (Hirai *et al.*, 2003). Sobre la base de estas estructuras cristalográficas y empleando una nueva estrategia de modelamiento por homología, se generó un modelo teórico

para la estructura tridimensional del transportador GLUT1 humano (PDB No 1SKU) (Salas-Burgos *et al.*, 2004). La estructura exhibe un pasadizo acuoso en la proteína que constituía el canal de translocación de sustratos, delineado por residuos que se conoce que son cruciales para el transporte, mientras que putativos dominios de reconocimiento de azúcares delimitan ambos extremos del canal. Estudios de acoplamiento molecular con el modelo identifican putativos sitios para el sustrato glucosa y para reconocidos inhibidores de GLUT1: floretina, citocalasina B. Entonces, este modelo teórico da cuenta de la mayor parte de la información bioquímica y de mutagénesis disponible. La disponibilidad de esta estructura, aunque teórica, nos permite comenzar a probar la relación entre estructura y función de los transportadores de glucosa.

Un análisis de cavidades del modelo muestra que existen dos cavidades adyacentes en la superficie exofacial del transportador. Una de ellas debería comprender al sitio externo para la unión de D-glucosa, mientras la restante podría participar en la unión de las metilxantinas. Ciertamente, se requieren más resultados bioquímicos y biofísicos para comprender el detalle de la interacción de las metilxantinas con el transportador.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abramson, J., Smirnova, I., Kasho, V., Verner, G., Kaback, H.R. y Iwata, S. (2003). Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science* **301**, 610-615.
- Andersson, L. y Lundahl, P. (1988). C-terminal-specific monoclonal antibodies against the human red cell glucose transporter. Epitope localization with synthetic peptides. *J Biol Chem* **263**, 11414-11420.
- Asano, T., Katagiri, H., Takata, K., Lin, J.L., Ishihara, H., Inukai, K., Tsukuda, K., Kikuchi, M., Hirano, H. y Yazaki, Y. (1991). The role of N-glycosylation of GLUT1 for glucose transport activity. *J Biol Chem* **266**, 24632-24636.
- Asano, T., Katagiri, H., Tsukuda, K., Lin, J.L., Ishihara, H., Inukai, K., Yazaki, Y. y Oka, Y. (1992). Glucose binding enhances the papain susceptibility of the intracellular loop of the GLUT1 glucose transporter. *FEBS Lett* **298**, 129-132.
- Baldwin, J.M., Gorga, J.C. y Lienhard, G.E. (1981). The monosaccharide transporter of the human erythrocyte. Transport activity upon reconstitution. *J Biol Chem* **256**, 3685-3689.
- Baldwin, S.A. (1993). Mammalian passive glucose transporters: members of an ubiquitous family of active and passive transport proteins. *Biochim Biophys Acta* **1154**, 17-49.
- Barrett, M.P., Walmsley, A.R. y Gould, G.W. (1999). Structure and function of facilitative sugar transporters. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 496-502.
- 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* **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.
- Biaggioni, I., Paul, S., Puckett, A. y Arzubiaga, C. (1991a). Caffeine and theophylline as adenosine receptor antagonists in humans *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **258**, 588-593.
- Biaggioni, I., Paul, S., Puckett, A. y Arzubiaga, C. (1991b). Caffeine and theophylline as adenosine receptor antagonists in humans. *J Pharmacol Exp Ther* **258**, 588-593.
- Bloch, R. (1973). Inhibition of glucose transport in the human erythrocyte by cytochalasin B. *Biochemistry* **12**, 4799-4801.
- Bryant, N.J., Govers, R. y James, D.E. (2002). Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 267-277.
- Burant, C.F. y Bell, G.I. (1992). Mammalian facilitative glucose transporters: evidence for similar substrate recognition sites in functionally monomeric proteins. *Biochemistry* **31**, 10414-10420.
- Burdett, E. y Klip, A. (1988). Exofacial regions of the glucose transporter of human erythrocytes: detection with polyclonal antibodies. *Biochem Cell Biol* **66**, 1126-1133.
- Cairns, M.T., Alvarez, J., Panico, M., Gibbs, A.F., Morris, H.R., Chapman, D. y Baldwin, S.A. (1987). Investigation of the structure and function of the human erythrocyte glucose transporter by proteolytic dissection. *Biochim Biophys Acta* **905**, 295-310.
- Cairns, M.T., Elliot, D.A., Scudder, P.R. y Baldwin, S.A. (1984). Proteolytic and chemical dissection of the human erythrocyte glucose transporter. *Biochem J* **221**, 179-188.
- Carruthers, A. (1986a). Anomalous asymmetric kinetics of human red cell hexose transfer: role of cytosolic adenosine 5'-triphosphate. *Biochemistry* **25**, 3592-3602.

- Carruthers, A. (1986b). ATP regulation of the human red cell sugar transporter. *J Biol Chem* **261**, 11028-11037.
- Carruthers, A. (1990). Facilitated diffusion of glucose. *Physiol Rev* **70**, 1135-1176.
- Carruthers, A. y Helgerson, A.L. (1989). The human erythrocyte sugar transporter is also a nucleotide binding protein. *Biochemistry* **28**, 8337-8346.
- Challiss, J.R., Taylor, L.P. y Holman, G.D. (1980). Sugar transport asymmetry in human erythrocytes--the effect of bulk haemoglobin removal and the addition of methylxanthines. *Biochim Biophys Acta* **602**, 155-166.
- Daly, J. y Fredholm, B. (1998). Caffeine--an atypical drug of dependence. *Drug Alcohol Depend* **51**, 199-206.
- Davies, A., Ciardelli, T.L., Lienhard, G.E., Boyle, J.M., Whetton, A.D. y Baldwin, S.A. (1990). Site-specific antibodies as probes of the topology and function of the human erythrocyte glucose transporter. *Biochem J* **266**, 799-808.
- Davies, A., Meeran, K., Cairns, M.T. y Baldwin, S.A. (1987). Peptide-specific antibodies as probes of the orientation of the glucose transporter in the human erythrocyte membrane. *J Biol Chem* **262**, 9347-9352.
- Dean, M. y Allikmets, R. (1995). Evolution of ATP-binding cassette transporter genes. *Curr Opin Genet Dev* **5**, 779-785.
- Deves, R. y Krupka, R.M. (1978). Cytochalasin B and the kinetics of inhibition of biological transport: a case of asymmetric binding to the glucose carrier. *Biochim Biophys Acta* **510**, 339-348.

- 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., 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.
- 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. *J Biol Chem* **275**, 16275-16280.
- Fath, M. y Kolter, R. (1993). ABC transporters: bacterial exporters *Microbiol. Rev.* **57**, 995-1017.
- Fredholm, B. (1995). Astra Award Lecture. Adenosine, adenosine receptors and the actions of caffeine. *Pharmacol Toxicol* **76**, 93-101.
- Gibbs, A.F., Chapman, D. y Baldwin, S.A. (1988). Proteolytic dissection as a probe of conformational changes in the human erythrocyte glucose transport protein. *Biochem J* **256**, 421-427.
- Gordon, N. y Newton, R.W. (2003). Glucose transporter type1 (GLUT-1) deficiency. *Brain Dev* **25**, 477-480.

- 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.
- Gorga, F.R. y Lienhard, G.E. (1982). Changes in the intrinsic fluorescence of the human erythrocyte monosaccharide transporter upon ligand binding. *Biochemistry* **21**, 1905-1908.
- Goswitz, V.C. y Brooker, R.J. (1995). Structural features of the uniporter/symporter/antiporter superfamily *Protein Sci.* **4**, 534-537.
- 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.
- Griffith, J., Baker, M., Rouch, D., Page, M., Skurray, R., Paulsen, I., Chater, K., Baldwin, S. y Henderson, P. (1992). Membrane transport proteins: implications of sequence comparisons. *Curr Opin Cell Biol* **4**, 684-695.
- Haber, R.S., Weinstein, S.P., O_Boyle, E. y Morgello, S. (1993). Tissue distribution of the human GLUT3 glucose transporter. *Endocrinology* **132**, 2538-2543.
- Hebert, D.N. y Carruthers, A. (1986). Direct evidence for ATP modulation of sugar transport in human erythrocyte ghosts. *J Biol Chem* **261**, 10093-10099.
- Hediger, M.A., Budarf, M.L., Emanuel, B.S., Mohandas, T.K. y Wright, E.M. (1989). Assignment of the human intestinal Na⁺/glucose cotransporter gene (SGLT1) to the q11.2---qter region of chromosome 22. *Genomics* **4**, 297-300.
- Hediger, M.A., Coady, M.J., Ikeda, T.S. y Wright, E.M. (1987). Expression cloning and cDNA sequencing of the Na⁺/glucose co-transporter. *Nature* **330**, 379-381.

- Helgerson, A.L., Hebert, D.N., Naderi, S. y Carruthers, A. (1989). Characterization of two independent modes of action of ATP on human erythrocyte sugar transport. *Biochemistry* **28**, 6410-6417.
- Higgins, C. (1992). ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* **8**, 67-113.
- Hirai, T., Heymann, J.A., Maloney, P.C. y Subramaniam, S. (2003). Structural model for 12-helix transporters belonging to the major facilitator superfamily. *J Bacteriol* **185**, 1712-1718.
- Hirai, T., Heymann, J.A., Shi, D., Sarker, R., Maloney, P.C. y Subramaniam, S. (2002). Three-dimensional structure of a bacterial oxalate transporter. *Nat Struct Biol* **9**, 597-600.
- Ho, Y.-Y., Yang, H., Klepper, J., Fischbarg, J., Wang, D. y De vivo, D. (2001). Glucose Transporter Type 1 Deficiency Syndrome (Glut1DS): Methylxanthines Potentiate GLUT1 Haploinsufficiency In Vitro *Pediatr. Res.* **50**, 254-260.
- Hresko, R.C., Kruse, M., Strube, M. y Mueckler, M. (1994). Topology of the Glut 1 glucose transporter deduced from glycosylation scanning mutagenesis. *J Biol Chem* **269**, 20482-20488.
- Hruz, P.W. y Mueckler, M.M. (2001). Structural analysis of the GLUT1 facilitative glucose transporter (review). *Mol Membr Biol* **18**, 183-193.
- Huang, Y., Lemieux, M.J., Song, J., Auer, M. y Wang, D.N. (2003). Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from Escherichia coli. *Science* **301**, 616-620.

- 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.
- Jacquez, J.A. (1983). Modulation of glucose transport in human red blood cells by ATP. *Biochim Biophys Acta* **727**, 367-378.
- 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 members. *Mol Membr Biol* **18**, 247-256.
- Jung, E.K., Chin, J.J. y Jung, C.Y. (1986). Structural basis of human erythrocyte glucose transporter function in reconstituted system. Hydrogen exchange. *J Biol Chem* **261**, 9155-9160.
- Kanai, Y., Lee, W., You, G., D., B. y Hediger, M.A. (1994). The human kidney low affinity Na⁺/glucose cotransporter SGLT2. Delineation of the major renal reabsorptive mechanism for D-glucose. *J Clin Invest* **93**, 397-404.
- Kasahara, M. y Hinkle, P.C. (1977). Reconstitution and purification of the D-glucose transporter from human erythrocytes. *J Biol Chem* **252**, 7384-7390.
- Katagiri, H., Asano, T., Shibasaki, Y., Lin, J.L., Tsukuda, K., Ishihara, H., Akanuma, Y., Takaku, F. y Oka, Y. (1991). Substitution of leucine for tryptophan 412 does not abolish cytochalasin B labeling but markedly decreases the intrinsic activity of GLUT1 glucose transporter. *J Biol Chem* **266**, 7769-7773.
- 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.
- Klepper, J. y Voit, T. (2002). Facilitated glucose transporter protein type 1 (GLUT1) deficiency syndrome: impaired glucose transport into brain - a review. *Eur J Pediatr* **161**, 295-304.
- Klepper, J., Wang, D., Fischbarg, J., Vera, J.C., Jarjour, I.T., O_Driscoll, K.R. y De_Vivo, D.C. (1999). Defective glucose transport across brain tissue barriers: a newly recognized neurological syndrome. *Neurochem Res* **24**, 587-594.
- Krupka, R.M. (1985). Asymmetrical binding of phloretin to the glucose transport system of human erythrocytes. *J Membr Biol* **83**, 71-80.
- 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**, 3022-3026.
- Levine, K.B., Cloherty, E.K., Fidyk, N.J. y Carruthers, A. (1998). Structural and physiologic determinants of human erythrocyte sugar transport regulation by adenosine triphosphate. *Biochemistry* **37**, 12221-12232.
- Lisinski, I., Schurmann, A., Joost, H.G., Cushman, S.W. y Al_Hasani, H. (2001). Targeting of GLUT6 (formerly GLUT9) and GLUT8 in rat adipose cells. *Biochem J* **358**, 517-522.

- Maher, F. y Simpson, I.A. (1994). Modulation of expression of glucose transporters GLUT3 and GLUT1 by potassium and N-methyl-D-aspartate in cultured cerebellar granule neurons. *Mol Cell Neurosci* **5**, 369-375.
- Mate, A., de_la_Hermosa, M.A., Barfull, A., Planas, J.M. y Vazquez, C.M. (2001). Characterization of D-fructose transport by rat kidney brush-border membrane vesicles: changes in hypertensive rats. *Cell Mol Life Sci* **58**, 1961-1967.
- May, J.M. (1988). Reaction of an exofacial sulfhydryl group on the erythrocyte hexose carrier with an impermeant maleimide. Relevance to the mechanism of hexose transport. *J Biol Chem* **263**, 13635-13640.
- Mookerjee, B.K., Cuppoletti, J., Rampal, A.L. y Jung, C.Y. (1981). The effects of cytochalasins on lymphocytes. Identification of distinct cytochalasin-binding sites in relation to mitogenic response and hexose transport. *J Biol Chem* **256**, 1290-1300.
- Mueckler, M. (1994). Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem* **219**, 713-725.
- 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.
- Murata, H., Hruz, P.W. y Mueckler, M. (2002). Indinavir inhibits the glucose transporter isoform Glut4 at physiologic concentrations. *AIDS* **16**, 859-863.
- 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.
- 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.
- Rayner, D.V., Thomas, M.E. y Trayhurn, P. (1994). Glucose transporters (GLUTs 1-4) and their mRNAs in regions of the rat brain: insulin-sensitive transporter expression in the cerebellum. *Can J Physiol Pharmacol* **72**, 476-479.
- Rogers, S., Chandler, J.D., Clarke, A.L., Petrou, S. y Best, J.D. (2003). Glucose transporter GLUT12-functional characterization in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **308**, 422-426.
- Rogers, S., Macheda, M.L., Docherty, S.E., Carty, M.D., Henderson, M.A., Soeller, W.C., Gibbs, E.M., James, D.E. y Best, J.D. (2002). Identification of a novel glucose transporter-like protein-GLUT-12. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**, E733-738.
- Salas-Burgos, A., Iserovich, P., Zuniga, F., Vera, J.C. y Fischbarg, J. (2004). Predicting the Three-Dimensional Structure of the Human Facilitative Glucose Transporter Glut1 by a Novel Evolutionary Homology Strategy: Insights on the Molecular Mechanism of Substrate Migration, and Binding Sites for Glucose and Inhibitory Molecules *Biophys. J.* **87**, 2990-2999.
- Sasaki, T., Minoshima, S., Shiohama, A., Shintani, A., Shimizu, A., Asakawa, S., Kawasaki, K. y Shimizu, N. (2001). Molecular cloning of a member of the facilitative glucose

- transporter gene family GLUT11 (SLC2A11) and identification of transcription variants. *Biochem Biophys Res Commun* **289**, 1218-1224.
- Sato, Y., Miura, T. y Suzuki, Y. (1990a). Interaction of pentoxifylline with human erythrocytes. I. Interaction of xanthine derivatives with human erythrocyte ghosts. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **38**, 552-554.
- Sato, Y., Miura, T. y Suzuki, Y. (1990b). Interaction of pentoxifylline with human erythrocytes. II. Effects of pentoxifylline on the erythrocyte membrane. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **38**, 555-558.
- Sato, Y., Miura, T. y Suzuki, Y. (1991). Interaction of pentoxifylline with human erythrocytes. III. Comparison of fluidity change of erythrocyte membrane caused by S-adenosyl-L-methionine with that by pentoxifylline. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **39**, 468-473.
- Sen, A.K. y Widdas, W.F. (1962). Determination of the temperature and pH dependence of glucose transfer across the human erythrocyte membrane measured by glucose exit *J. Physiol.* **160**, 392-403.
- Shepherd, P.R., Gibbs, E.M., Wesslau, C., Gould, G.W. y Kahn, B.B. (1992). Human small intestine facilitative fructose/glucose transporter (GLUT5) is also present in insulin-responsive tissues and brain. Investigation of biochemical characteristics and translocation. *Diabetes* **41**, 1360-1365.
- Shepherd, P.R. y Kahn, B.B. (1999). Glucose Transporters and Insulin Action -- Implications for Insulin Resistance and Diabetes Mellitus *N. Engl. J. Med.* **341**, 248-257.

- 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. *Am J Physiol* **259**, C279-285.
- Uldry, M., Ibberson, M., Horisberger, J.D., Chatton, J.Y., Riederer, B.M. y Thorens, B. (2001). Identification of a mammalian H(+)-myo-inositol symporter expressed predominantly in the brain. *EMBO J* **20**, 4467-4477.
- Uldry, M. y Thorens, B. (2004). The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Pflugers Arch* **447**, 480-489.
- Vera, J.C., Reyes, A.M., Carcamo, J.G., Velasquez, F.V., Rivas, C.I., Zhang, R.H., Strobel, P., Iribarren, R., Scher, H.I. y Slebe, J.C. (1996a). 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., Cárcamo, J.G., Velásquez, F.V., Rivas, C.I., Zhang, R.H., Strobel, P., Iribarren, R., Scher, H.I., Slebe, J.C. y Golde, D.W. (1996b). 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., Nunez_Alarcon, J. y Golde, D.W. (2001). Direct inhibition of the hexose transporter GLUT1 by tyrosine kinase inhibitors. *Biochemistry* **40**, 777-790.
- 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., 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.
- Wells, R.G., Pajor, A.M., Kanai, Y., Turk, E., Wright, E.M. y Hediger, M.A. (1992). Cloning of a human kidney cDNA with similarity to the sodium-glucose cotransporter *Am J Physiol Renal Physiol* **263**, F459-465.
- Wheeler, T.J. (1989). ATP does not regulate the reconstituted glucose transporter. *Biochemistry* **28**, 3413-3420.
- Wood, I.S., Hunter, L. y Trayhurn, P. (2003). Expression of Class III facilitative glucose transporter genes (GLUT-10 and GLUT-12) in mouse and human adipose tissues. *Biochem Biophys Res Commun* **308**, 43-49.
- Wright, E.M. (2001). Renal Na(+)-glucose cotransporters. *Am J Physiol Renal Physiol* **280**, F10-18.
- Wu, X. y Freeze, H.H. (2002). GLUT14, a duplicon of GLUT3, is specifically expressed in testis as alternative splice forms. *Genomics* **80**, 553-557.
- Wu, X., Li, W., Sharma, V., Godzik, A. y Freeze, H. (2002). Cloning and characterization of glucose transporter 11, a novel sugar transporter that is alternatively spliced in various tissues. *Mol Genet Metab* **76**, 37-45.
- Yasuhara, M. y Levy, G. (1988). Caffeine as a potential risk factor for theophylline neurotoxicity. *J Pharm Sci* **77**, 745-747.