



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante

Dr. Mónica Salas G.

Instituto de Bioquímica y

Microbiología

Facultad de Ciencias

**EFEECTO DEL ÁCIDO NORDIHIIDROGUAYARÉTICO SOBRE
EL TRANSPORTE DE GLUCOSA EN LÍNEAS DE CÉLULAS
LEUCÉMICAS HUMANAS**

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

DAVID ALEJANDRO LEÓN NAVARRO

VALDIVIA – CHILE

2015

Agradecimientos

Le doy gracias a mi profesora patrocinante, la Dra. Mónica Salas G. por permitirme trabajar en su proyecto, y por su interés y consejos que me ha dado para desarrollar esta tesis de manera ordenada.

A los profesores Dra. Ángara Zambrano A. y Dr. Alejandro Reyes P., por formar parte de mi comisión evaluadora de esta tesis como profesores informantes, y en especial al Dr. Reyes por acogerme en su laboratorio, y apoyar mi participación en congresos durante este periodo.

También agradezco a mis compañeros de laboratorio. A Alexei Cuevas y Lorena Ojeda por mantener las comunicaciones con el Banco de Sangre del Hospital Base de Valdivia, a Matias Toledo por realizar el experimento de desplazamiento de citocalasina B, y en especial a la Dra. Alejandra Pérez por su apoyo, tutelaje y paciencia durante este proceso.

Por último le doy gracias a mis padres, ya que sin ellos no estaría aquí para escribir esta tesis.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Proteínas de Membranas del Instituto de Bioquímica y Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, y contó con el financiamiento de los proyectos FONDECYT 1130386, FONDEF D11I1131 y DID-UACH S-2013-22.

Índice General

1. Resumen	1
1.1 Summary	2
2. Introducción	3
3. Materiales y métodos	
3.1 Materiales	12
3.2 Ensayos de salida de D-glucosa (Ensayos de Sen-Widdas) en eritrocitos	12
3.3 Caracterización de la inhibición en condiciones de salida en eritrocitos	12
3.4 Desplazamiento de Citocalasina B (CCB)	12
3.5 Cultivo celular	12
3.6 Ensayos de inhibición del transporte en condiciones trans-cero de entrada	12
3.7 Caracterización del tipo de inhibición en condiciones trans-cero de entrada	12
3.8 Análisis estadístico	12
4. Resultados	17
4.1 Inhibición del transporte de D-glucosa en eritrocitos humanos en condiciones de salida (Ensayos de Sen-Widdas)	17
4.2 Caracterización de la inhibición del transporte de D-glucosa en eritrocitos humanos en condiciones de salida	17
4.3 Ensayos de desplazamiento de Citocalasina B (CCB)	17
4.4 Ensayos de inhibición en condiciones trans-cero de entrada en líneas celulares U937 y HL-60	17

4.5 Caracterización de la inhibición del transporte de glucosa en condiciones de entrada mediado por NDGA	17
5. Discusión.....	25
6. Bibliografía.....	32

Índice de Figuras

Figura 2.- Desplazamiento de CCB en membranas de eritrocitos humanos por NDGA..	24
Figura 3.- Inhibición del transporte de 2-DOG en condiciones trans-cero de entrada en las líneas celulares U937 y HL-60 por NDGA.....	25
Figura 4.- Caracterización del mecanismo de inhibición de NDGA sobre la captación de 2-DOG en líneas celulares leucémicas humanas.....	26
Figura 5.- Modelo de transportador simple (<i>simple carrier model</i>).	30

Lista de Abreviaturas

2-DOG: 2-desoxiglucosa

3-OMG: 3-O-metilglucosa

CCB: citocalasina B

CCE: citocalasina E

DMSO: dimetil sulfóxido

FBS: fetal bovine serum, suero fetal bovino

NDGA: nordihydroguaietic acid, ácido nordihidroguayerético

PBS: phosphate buffered saline, buffer fosfato salino

SDS: dodecil sulfato sódico

1. Resumen

Debido a la alta dependencia energética de glucosa que presentan las células tumorales, se ha propuesto como estrategia para combatir el crecimiento de células transformadas a un fenotipo maligno, la inhibición farmacológica de la captación de glucosa con el fin de generar un estado de privación de energía. Esta tesis propone estudiar el efecto del ácido nordihidroguayarático (NDGA) sobre el transporte de glucosa en células leucémicas humanas. NDGA es un polifenol extraído del chaparral *L. tridentata* que posee propiedades antioxidantes y anticancerígenas, y presenta una alta similitud estructural con resveratrol; una conocida fitoalexina capaz de inhibir el transporte de glucosa en células humanas. Se evaluó la capacidad inhibitoria de NDGA en condiciones trans-cero de entrada a tiempos cortos, y se encontró que NDGA fue capaz de inhibir el transporte de 2-desoxiglucosa (2-DOG) en las líneas de células leucémicas humanas U-937 y HL-60 con valores de IC_{50} de 53 y 85 μM , respectivamente. Se determinó que el mecanismo de inhibición en la línea celular U-937 en condiciones de entrada es no competitivo. Esto indica que NDGA ejerce su efecto inhibitorio sin desplazar a 2-DOG del sitio de unión al sustrato en el transportador GLUT1. Para caracterizar mejor el efecto de NDGA sobre GLUT1 se hicieron ensayos de Sen-Widdas en eritrocitos humanos. NDGA fue capaz de inhibir el transporte de glucosa en condiciones infinito-cis de salida con un IC_{50} de 26 μM , y de manera competitiva. Además, NDGA fue capaz de desplazar a CCB unida a GLUT1 en membranas de eritrocitos humanos. En conclusión, NDGA es un compuesto capaz de inhibir el transporte de glucosa en eritrocitos y en las líneas celulares HL-60 y U-937 en forma directa, uniéndose por el lado exofacial del, o los transportadores de glucosa.

1.1 Summary

Since neoplastic cells have a high energetic dependence on glucose, a strategy proposed to hamper growth of cancer cells is the pharmacologic inhibition of glucose uptake in order to generate an energy deprived state. The objective of this Thesis is to study the effect of nordihydroguaiaretic acid (NDGA) on glucose transport in leukemic human cell lines. NDGA is a polyphenol extracted from the creosote bush *L. tridentata* that has antioxidant and anticancer properties, which also shows a high structural similitude with resveratrol, a phytoalexin able to block glucose transport in human cells. NDGA's inhibitory properties were assessed in zero-trans entry assays at short times. We found that NDGA was able to block 2-deoxyglucose (2-DOG) transport in human cell lines U-937 and HL-60 in a dose dependant manner, with IC_{50} values of 53 and 85 μM , respectively. We also show that NDGA behaves as a noncompetitive inhibitor in both cell lines, which means that NDGA exerts its effect without displacing 2-DOG from its binding site in GLUT1. In order to further study the effect of NDGA on the GLUT1 transporter we performed infinite-cis Sen-Widdas assays in human erythrocytes. NDGA behaved as a competitive inhibitor of glucose exit in human erythrocytes, with an IC_{50} value of 26 μM . We also demonstrate that NDGA is able to displace CCB bound to GLUT1 in human erythrocyte membranes. In conclusion, NDGA is able to block glucose transport in human erythrocytes and in human leukemic cell lines HL-60 and U-937 directly, binding to the exofacial site of the glucose transporters.

2. Introducción

Una de las principales adaptaciones metabólicas de las células transformadas a un fenotipo maligno es el llamado efecto Warburg, que consiste en un cambio en el mecanismo principal de producción de ATP celular de fosforilación oxidativa a glicólisis, llegando a metabolizar alrededor de diez veces la cantidad de glucosa que consume un tejido normal, incluso en condiciones aeróbicas (Warburg *et al.*, 1924), mientras que en células eucariontes mantenidas condiciones aeróbicas la fermentación de glucosa se ve disminuida, favoreciendo la fosforilación oxidativa (Lehninger *et al.* 2000).

Otto Warburg y colaboradores demostraron mediante experimentos *in vitro* que distintos cortes de tejidos de cáncer producían cantidades similares de energía que células normales, pero que la relación entre la energía obtenida por fermentación a la obtenida por respiración era mayor en células cancerígenas. Un grupo diferente realizó experimentos *in vivo* donde demostraron que la sangre que ha pasado por un tumor contiene menos azúcar y más ácido láctico que la sangre que pasa por un tejido normal (Cori y Cori, 1925), apoyando la hipótesis de Warburg.

Otto Warburg atribuyó este aumento en la fermentación a una destrucción de la capacidad respiratoria, ya que la fermentación tumoral no se ve contrarrestada por un mayor consumo de oxígeno en las células tumorales (Warburg, 1927). En 1956, Warburg propone que una pérdida irreversible de la respiración celular es la explicación al origen del cáncer, y que la adaptación al uso de fermentación como principal medio de obtención de energía causa la transformación de células diferenciadas a células menos diferenciadas y con una alta tasa de proliferación (Warburg, 1956).

Sin embargo, la conclusión de Warburg es errónea, ya que si bien en algunos tipos de cáncer existen mutaciones en genes mitocondriales asociadas con pérdida de la respiración

celular, también hay tipos de cáncer que mantienen una capacidad respiratoria similar a la de tejidos normales, como ha sido demostrado de manera experimental por distintos autores (Weinhouse, 1976; Frezza y Gottlieb, 2009; Moreno-Sanchez *et al.*, 2007). Esto indica que la causa de la formación de cáncer no es el daño en la respiración celular, por lo que ha sido necesario buscar hipótesis alternativas para explicar el origen e importancia del efecto Warburg en el desarrollo del cáncer.

A simple vista, el efecto Warburg no parece ser una ventaja adaptativa, puesto que substituye un proceso catabólico eficiente por uno menos eficiente, ya que la fermentación de una molécula de glucosa a lactato tiene como producto neto 2 moléculas de ATP, mientras que mediante la fosforilación oxidativa se producen 36 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa oxidada a CO₂ (Lehninger *et al.*, 2000). Sin embargo, hay que considerar que Warburg descubrió que las células tumorales metabolizan glucosa diez veces más rápido que las células normales, incluso en condiciones aeróbicas, junto con la fosforilación oxidativa. Por cada 13 moléculas de glucosa captada por la célula tumoral, una es oxidada completamente, produciendo 36 ATP, mientras que las otras 12 sufren glicólisis y fermentación a lactato, produciendo otros 24 ATP, mientras que una célula normal sólo produce 36 ATP mediante la oxidación completa de glucosa (Warburg *et al.*, 1924).

Otras hipótesis han surgido para intentar explicar el beneficio adaptativo del incremento en la glicólisis en células de cáncer, entre ellas que el cambio a glicólisis anaeróbica es un proceso adaptativo a las condiciones hipóxicas del microambiente tumoral (Gatenby y Gillies, 2004). Investigadores han encontrado que la disponibilidad de oxígeno en tumores es heterogénea en el tiempo y el espacio (Kimura *et al.*, 1996; Hill *et al.*, 1999), y que disminuye rápidamente con la distancia respecto a los vasos sanguíneos (Helmlinger *et al.*, 1997; Secomb *et al.*, 1998), por lo que un aumento en el metabolismo anaeróbico permite a las

células tumorales sobrevivir y proliferar en estas condiciones. Es importante recordar que las células tumorales mantienen una alta tasa de glicólisis incluso en tejidos con suficiente suministro de oxígeno, como los pulmones y el torrente sanguíneo (Nolop *et al*, 1987; Gottschalk *et al*, 2004; Elstrom *et al*, 2004).

Por otro lado, Gatenby y Gawlinsky proponen que el aumento en la glicólisis no es sólo una adaptación a un microambiente anóxico, sino que es necesaria para estimular la capacidad invasiva de las células tumorales, y proponen un modelo de invasión mediada por acidez (Gatenby y Gawlinski, 1996). El incremento en la tasa de fermentación y producción de lactato por las células tumorales acidifica el medio extracelular, llegando a valores de pH de 6,0 (Raghunand *et al.*, 2003). Esta acidificación del medio extracelular puede inducir apoptosis en células normales (Gottlieb *et al.*, 1995). Se sabe que las células neoplásicas mantienen un pH citosólico alto y logran evitar la apoptosis por acidificación gracias a que presentan una actividad elevada de transportadores de H^+ , tales como el cotransportador de Na^+/H^+ NHE1 (McLean *et al.*, 2000) y la bomba vacuolar H^+ -ATPasa (Martinez-Zaguilán *et al.*, 1993). Esto le confiere a las células transformadas una ventaja adaptativa importante respecto a las células normales, por lo que la mantención de un metabolismo glicolítico les permite sustentar un crecimiento e invasión agresivos. La invasión de tejidos es facilitada porque la disminución del pH en el microambiente peritumoral permite la acción de catepsinas extracelulares que degradan las proteínas de la matriz extracelular, permitiendo la invasión de las células cancerígenas a otros tejidos (Montcourrier *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 2010).

Por último, un aumento en la glicólisis permite a las células producir distintos metabolitos intermediarios necesarios para algunas vías biosintéticas, incluyendo ribosas, glicerol, aminoácidos no esenciales, y NADPH a través de la vía de las pentosas fosfato, la que le confiere resistencia al estrés oxidativo. Este aumento en la glicólisis debe ir

acompañado de un aumento en la captación de glucosa, debido a que éste es el paso limitante para la disposición de un nutriente que es metabolizado rápidamente para mantener los requerimientos energéticos de la célula tumoral (Hatanaka, 1974).

El transporte de solutos pequeños, como la glucosa, a través de la membrana plasmática depende de proteínas de membrana que funcionan como transportadores. Estas se han clasificado en familias, según su homología de secuencia, para permitir su identificación. En esta clasificación se encuentra la familia principal de facilitadores MFS, cuyos miembros son proteínas que transportan solutos pequeños a favor de un gradiente quimiosmótico (Griffith *et al.*, 1992; Goswitz y Brooker, 1995) y poseen una estructura terciaria común de doce dominos transmembrana, con los amino y carboxilo terminales orientados hacia la cara citoplasmática de la proteína (Hirai *et al.*, 2003).

A su vez, hay sobre 74 familias de proteínas que forman la MFS, de las cuales la familia 1, o transportadora de azúcares SP (sugar porter), es la más numerosa (Reddy *et al.*, 2012). Dentro de los miembros de la familia SP se encuentran las dos subfamilias de proteínas encargadas del transporte de glucosa. La primera es la subfamilia de transportadores facilitativos GLUT, que transportan hexosas a favor de su gradiente de concentración (Mueckler, 1994; Joost y Thorens, 2001), y la segunda es la subfamilia SGLT, cuyos miembros transportan glucosa en contra de su gradiente de concentración gracias al acoplamiento del transporte a un gradiente de sodio (Wright, 2001).

Los transportadores de la subfamilia SGLT transportan glucosa en contra de su gradiente de concentración gracias al cotransporte de esta hexosa con sodio, que es transportado a favor de un gradiente de concentración generado por la bomba sodio-potasio (sodio-potasio ATPasa) mediante la hidrólisis de ATP. En humanos se han identificado dos miembros de esta subfamilia; SGLT1, un transportador de alta afinidad que se expresa en la

membrana apical de enterocitos y células del túbulo contorneado proximal en riñones (Hediger *et al.*, 1989), y SGLT2, un transportador de baja afinidad que se expresa en células del túbulo contorneado proximal (Kanai *et al.*, 1994).

La subfamilia GLUT corresponde a los transportadores facilitativos de hexosas en células de mamíferos (Carruthers, 1990; Barret *et al.*, 1999; Joost y Thorens, 2001). Hasta ahora se han clonado 14 isoformas del transportador GLUT en humano, que difieren en su estructura primaria, especificidad por el sustrato, cinética y en su expresión en tejidos. Los 14 miembros de esta subfamilia se clasifican en tres clases según su similitud de secuencia (Joost *et al.*, 2002).

La clase I agrupa a los transportadores de glucosa clásicos GLUT1, 2, 3 y 4, los que han sido ampliamente estudiados en cuanto a estructura, propiedades cinéticas y especificidad de sustrato. GLUT1 es el transportador de glucosa más estudiado y se expresa mayoritariamente en cerebro y eritrocitos (Maher y Simpson, 1994; Hruz y Mueckler, 2001), permitiendo la captación basal de glucosa requerida para mantener la actividad celular. GLUT2 se expresa en células β -pancreáticas, riñón, intestino e hígado, y está involucrado en la secreción de insulina en el páncreas y en la inducción de genes glicolíticos en el hígado (Thorens y Mueckler, 2010). GLUT3 es un transportador de alta afinidad por glucosa que se expresa en neuronas, astrocitos, y en espermatozoides de ratón (Simpson *et al.*, 2008). GLUT4 se expresa en adipocitos y músculo estriado, y es traslocada desde compartimentos intracelulares a la membrana plasmática cuando las células son expuestas a insulina (Suzuki y Kono, 1980; Larance *et al.*, 2008).

En la clase II se encuentran los transportadores GLUT 5, 7, 9 y 11, de entre los cuales GLUT 5 es el mejor caracterizado. GLUT 5 es capaz de transportar fructosa, pero no glucosa (Kayano *et al.*, 1990), y se expresa principalmente en riñón, intestino delgado e hígado (Mate

et al., 2001). GLUT 11 presenta dos variantes de corte y empalme; una larga y una corta de 503 y 493 residuos, respectivamente (Sasaki *et al.*, 2001). Ambas variantes se expresan de manera tejida específica y poseen distinta afinidad de sustrato; la forma corta se expresa en corazón y músculo esquelético y posee baja afinidad por glucosa (Doege *et al.*, 2001), mientras que la variante larga transporta fructosa y se expresa en tráquea, hígado, pulmón y cerebro (Wu *et al.*, 2001).

Por último, la clase III agrupa a GLUT 6, 8, 10, 12 y HMIT (GLUT 13). Esta clase presenta la peculiaridad de que todos sus miembros poseen un sitio de glicosilación en el lazo 9, que conecta los segmentos transmembrana 9 y 10, mientras que en las otras dos clases este sitio se encuentra en el lazo 1 (Asano *et al.*, 1991).

GLUT1 fue clonado y secuenciado por primera vez en 1985 (Mueckler *et al.*, 1985), y es el transportador facilitativo de hexosas mejor estudiado gracias a que se expresa de manera abundante en eritrocitos humanos, células que facilitan el estudio de las propiedades estructurales y cinéticas del transportador (Hruz y Mueckler, 2001). GLUT1 es una proteína integral de membrana que se expresa de manera ubicua en los tejidos de mamíferos, y que permite el transporte basal de D-glucosa desde y hacia la célula, según su gradiente de concentración. Mediante análisis de predicción de estructura secundaria se ha generado un modelo conformacional de 12 segmentos α -hélice transmembrana alternados por cortos lazos hidrofílicos y con los extremos amino y carboxilo terminales orientados hacia la cara citoplasmática del transportador. Distintos experimentos han confirmado que esta estructura de 12 α -hélices transmembrana es común para todos los miembros de la familia GLUT que se han clonado hasta la fecha (Cairns *et al.*, 1987; Andersson y Lundahl, 1988; Zuniga *et al.*, 2001), y un grupo de investigadores confirmó el modelo predicho al determinar la estructura cristalográfica de GLUT1 (Dong *et al.*, 2014).

GLUT1 es capaz de reconocer y transportar dehidroascorbato (Bianchi y Rose, 1986), α - y β -D-glucosa (Leitch y Carruthers, 2009), y los análogos 2-DOG y 3-OMG. Estos últimos permiten estudiar el transporte de glucosa en eritrocitos u otros tipos celulares gracias a que su metabolismo es limitado luego de su incorporación a la célula. 2-DOG es transportado por GLUT1 y fosforilado por hexoquinasa a 2-desoxi-D-glucosa-6-fosfato, producto que no puede ser utilizado por la enzima glucosa-6-fosfato isomerasa (Bachelard, 1972), y termina atrapado dentro de la célula. 3-OMG es transportado por GLUT1 pero no puede ser fosforilado por hexoquinasa (Jay *et al.*, 1990), por lo que se puede estudiar su captación y acumulación sin temor a observar variaciones causadas por el metabolismo celular.

Hay suficiente evidencia que demuestra que en distintos tipos de tumores se observa una sobreexpresión de las proteínas transportadoras de glucosa GLUT (Macheda *et al.*, 2005), y en especial de GLUT1 (Younes *et al.*, 1997; Basturk *et al.*, 2011), y que su nivel de expresión está asociado a una mayor capacidad invasiva (Ito *et al.*, 2002) y mal pronóstico en estados avanzados de la enfermedad (Younes *et al.*, 1997; Kunkel *et al.*, 2003). Esto indica que el aumento en la captación y metabolismo de glucosa por las células tumorales no es un evento trivial en el desarrollo y tratamiento de esta enfermedad. Estos antecedentes sugieren que inhibir el transporte de glucosa mediado por la familia GLUT es una estrategia terapéutica que puede ser explotada para el tratamiento de algunos tipos de cáncer.

Los polifenoles son compuestos producidos por organismos vegetales, e incluyen sustancias como las fitoalexinas e isoflavonas. También denominados antioxidantes, estas sustancias cumplen diversos roles en la fisiología vegetal, incluyendo protección contra los rayos UV, protección contra el estrés oxidativo y acción antimicrobiana.

Resveratrol (RSV) es una fitoalexina producida en respuesta a infección fúngica en organismos vegetales como *Vitis vinifera* (vid), donde se ha observado que resveratrol es

capaz de inhibir la proliferación del hongo patógeno *Botritis cinerea* (Langcake, 1979). Este compuesto se encuentra de manera abundante en sus frutos y productos derivados, así como en otros alimentos como el maní.

Además de su efecto antibiótico, RSV es un polifenol valioso para la salud humana gracias a sus propiedades antioxidantes y emergentes capacidades anticancerígenas. Distintos grupos de investigación han demostrado que RSV inhibe la proliferación de las líneas celulares de leucemia aguda promielocítica y monocítica humanas HL-60 y U-937, respectivamente (Gautam *et al.*, 2000; Park, 2001), además de inducir la muerte celular programada en ambos modelos celulares (Komina y Weiserska-Gadek, 2008; Guha *et al.*, 2011). Otro efecto fisiológico relevante es que RSV es capaz de inhibir el transporte de glucosa en líneas celulares leucémicas humanas (Park, 2001; Salas *et al.*, 2013), añadiendo este polifenol a la lista de candidatos de fármacos antitumorales.

Otro polifenol con propiedades antineoplásicas y antiinflamatorias es el ácido nordihidroguayarático (NDGA). NDGA es extraído del chaparral *Larrea tridentata*, el cual crece en desiertos del sudoeste de Estados Unidos y del norte de México (Coole, 2004). Esta planta ha sido usada en medicina tradicional de las culturas que cohabitan con ella para tratar distintas enfermedades, entre ellas infertilidad, enfermedades de transmisión sexual, cálculos renales y biliares, inflamación, artritis y reumatismo (Arteaga *et al.*, 2005). La actividad terapéutica de NDGA se puede atribuir a su acción antioxidante y a su capacidad de afectar procesos celulares mediante la inhibición de la acción de factores de crecimiento (Lee *et al.*, 2003; Domin *et al.*, 1994), inducción de la expresión de óxido nítrico sintasa (Ramasamy *et al.*, 1999) e inhibición de la proliferación e inducción de apoptosis en células neoplásicas (McDonald *et al.*, 2001; Seufferlein *et al.*, 2002; Youngren *et al.*, 2005). Debido a la similitud estructural entre RSV y NDGA, y dado que no existen antecedentes en la literatura sobre el

efecto de NDGA sobre el transporte de glucosa en células neoplásicas, nos proponemos a comprobar la siguiente hipótesis: NDGA inhibe la captación de glucosa en las líneas celulares leucémicas humanas HL-60 y U-937.

Para probar esta hipótesis nos proponemos como objetivo general: demostrar y caracterizar el mecanismo de inhibición de NDGA sobre la captación de glucosa en las líneas celulares leucémicas humanas HL-60 y U-937.

Para ello nos proponemos los siguientes objetivos específicos:

- a. Determinar el efecto de NDGA sobre el transporte de 2-desoxiglucosa (2-DOG) en células leucémicas humanas: HL-60 y U-937.
- b. Caracterizar el mecanismo de inhibición de NDGA en HL-60 y U-937 mediante ensayos trans-cero de entrada de 2-DOG.
- c. Evaluar el efecto de NDGA sobre la afinidad por glucosa del sitio de unión externo en eritrocitos humanos mediante ensayos infinito-cis (Ensayos de Sen Widdas).
- d. Comprobar si NDGA es capaz de interactuar directamente con el transportador GLUT1 en eritrocitos humanos.

3. Materiales y métodos

3.1 Materiales

Cloruro sódico, cloruro potásico, fosfato ácido disódico, fosfato monopotásico, cloruro mercúrico, DMSO, Tris, D-sorbitol y D-glucosa fueron adquiridos en Merck. NDGA, [^3H]-2-DOG, [^3H]-CCB, floretina, citocalasina B, citocalasina E y 2-DOG fueron adquiridos en Sigma Chemical Co. Azul de tripán y RPMI-1640 fueron adquiridos de HyClone. SDS fue comprado a Calbiochem. El cocktail de centelleo líquido Ecoscint fue adquirido de Fermelo Biotec. Los eritrocitos se obtuvieron de unidades de sangre donadas por el Banco de Sangre del Hospital Base de Valdivia. Las líneas celulares U937 y HL-60 fueron compradas a ATCC.

3.2 Ensayos de salida de D-glucosa (Ensayos de Sen-Widdas) en eritrocitos

El método se basa en el descrito por Sen y Widdas (Sen y Widdas, 1962). 500 μl de eritrocitos humanos lavados fueron incubados a 30°C durante 1 hora con 100 μl de 1M D-glucosa (concentración final 100 mM) y 400 μl de PBS pH 7,4. La velocidad de salida de D-glucosa se registró usando un espectrofluorímetro PerkinElmer LS 55 con temperatura regulada a 30°C y agitador magnético. La longitud de onda de excitación y emisión usada fue 650 nm, con ranuras de 5 nm. La medición se inició inmediatamente después de añadir sobre 3 μl de eritrocitos cargados con D-glucosa, 2,5 ml de PBS pH 7,4 que contiene concentraciones crecientes de NDGA (0 a 100 μM), en una cubeta de cuarzo de 3 ml. La medición se detuvo cuando la dispersión de luz alcanzó un valor constante, es decir, cuando el balance de concentración de glucosa en el medio y el interior de los eritrocitos llegue al equilibrio. Las disoluciones de NDGA se prepararon en tubos de 15 ml a partir de un stock de NDGA 300 μM que fue diluido con PBS pH 7,4 hasta completar 8 ml.

3.3 Caracterización de la inhibición en condiciones de salida en eritrocitos

Para caracterizar el tipo de inhibición que ejerce NDGA sobre la salida de D-glucosa en eritrocitos humanos se procedió de manera similar al experimento anterior, excepto que se realizaron tres curvas de concentraciones crecientes de D-glucosa que fueron de 1 mM a 9 mM. Cada una de las curvas poseía una concentración determinada de NDGA en cada uno de sus puntos (0, 7.5 y 15 μ M), además de un control con 0,5 μ M citocalasina B (CCB). Se midió la velocidad de salida de D-glucosa en función de la dispersión de luz y los resultados se graficaron en un diagrama de Sen-Widdas.

Las disoluciones de D-glucosa se prepararon diluyendo una disolución stock de 1 M D-glucosa en PBS, usando matraces aforados de 25 ml y 50 ml. Las concentraciones de NDGA se obtuvieron añadiendo distintos volúmenes de una solución stock de 50 mM NDGA preparado en DMSO.

3.4 Desplazamiento de Citocalasina B (CCB)

Estos ensayos permiten determinar si concentraciones crecientes de NDGA son capaces de desplazar a CCB unida al transportador GLUT1 de membranas de eritrocitos humanos.

Se preparó una mezcla de reacción con 45 μ l de 2M D-sorbitol (unión total) o 2M D-glucosa (unión inespecífica), 50 μ l de 0,3-0,5 mg/ml de membranas de eritrocitos humanos resuspendidas en 10 mM Na_2HPO_4 pH 7,4; 53,5 μ l de mezcla radiactiva. La mezcla radiactiva se preparó con 0,03 μ l de [^3H]-CCB, 0,3 μ l de CCB fría 50 μ M en DMSO; 0,15 μ l de CCE 10 mM, y 53,02 μ l de Na_2HPO_4 pH 7,4.

Cada reacción se inició al añadir 1,5 µl de una solución de NDGA en DMSO a un tubo con 148,5 µl de mezcla de reacción, logrando concentraciones finales de NDGA entre 0 y 30 µM. Los tubos se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente, y luego se centrifugaron para remover la mezcla de reacción mediante aspiración, preservando el precipitado de membranas. A continuación, los precipitados se lisaron con 200 µl de buffer de lisis (10 mM Tris-HCl, 2% SDS pH 8,0) durante una hora, y finalmente se contó la cantidad de tritio en los lisados mediante centelleo líquido en un contador PerkinElmer Tri-Carb 2910 TR. Cada reacción se realizó en triplicado, además de un control de unión inespecífica con D-glucosa.

El desplazamiento de [³H]-CCB se calculó como la diferencia entre la cantidad de [³H]-CCB en el lisado en presencia de 500 mM D-sorbitol y la cantidad de [³H]-CCB en el lisado en presencia de 500 mM D-glucosa. Los pmoles de [³H]-CCB unidos se graficaron en función de la concentración de NDGA correspondiente, y los datos se ajustaron a una curva hiperbólica.

3.5 Cultivo celular

Las líneas celulares U-937 y HL-60 fueron cultivadas en medio RPMI-1640 suplementado con FBS diluido al 10% en volumen final, 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml sulfato de estreptomicina, a 37°C con 5% CO₂ ambiental, en botellas T-75. La densidad de las células se mantuvo entre 1x10⁵ y 2x10⁶ células/ml. Cada 1 o 3 días se contaron las células en una cámara de Neubauer, en microscopio de luz invertido, tomando 10 µl del cultivo y mezclándolos con 10 µl de azul de tripán para distinguir las células vivas de las muertas.

3.6 Ensayos de inhibición del transporte en condiciones trans-cero de entrada

Para medir el efecto inhibitorio de NDGA sobre la captación de glucosa en las líneas celulares HL-60 y U-937 se realizaron ensayos a un volumen de 200 μ l donde 30 μ l corresponden a una suspensión de células (aproximadamente 2 millones de células) en PBS pH 7,4, y 170 μ l corresponden a una mezcla radiactiva que contiene 0,5 μ Ci de 2-DOG-[3 H], 0,25 mM 2-DOG frío y concentraciones crecientes de NDGA entre 0 y 100 μ M.

La reacción comienza cuando a 30 μ l de células se añadieron 170 μ l de mezcla radiactiva, y luego de 40 segundos se detuvo añadiendo 1 ml de solución de detención fría (PBS pH 7,4, HgCl 10 μ M). Se realizó un control de la radiación basal (tiempo cero) añadiendo simultáneamente 170 μ l de mezcla radiactiva con NDGA 100 μ M y 1 ml de solución de detención a un tubo con 30 μ l de células a temperatura de hielo. Luego, los tubos se centrifugaron a 13,4 rpm durante 15 segundos en una centrífuga, se extrajo el sobrenadante y se lavó el pellet de células con 1 ml de solución de detención fría y se centrifugó y extrajo el sobrenadante una vez más. Los pellets resultantes se trataron con 200 μ l de tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM, SDS 2% pH 8.0) durante al menos una hora. Finalmente se midió la actividad radiactiva en los lisados mediante centelleo líquido en un contador PerkinElmer Tri-Carb 2910 TR. Los ensayos fueron realizados a temperatura ambiente y en triplicado.

3.7 Caracterización del tipo de inhibición en condiciones trans-cero de entrada

Para determinar el tipo de inhibición que NDGA ejerce sobre la captación de glucosa en las líneas celulares leucémicas humanas U-937 y HL-60 se usó el método descrito por Sen y Widdas (Sen y Widdas, 1962). Se midió el transporte de 2-DOG de la misma manera que en el procedimiento anterior, pero en presencia de concentraciones crecientes de 2-DOG y una concentración constante de NDGA en la mezcla radiactiva. Se realizaron tres experimentos

independientes, cada uno por triplicado, y con concentraciones determinadas de NDGA (0, 40 y 80 μM). La curva de saturación resultante de cada experimento se expresó en un diagrama de Hanes-Woolf.

3.8 Análisis estadístico

Los gráficos y ajustes de los datos a curvas se hicieron con el software SigmaPlot para Windows, versión 11,0 (Systat Software, Inc. 2008). Los análisis mediante el uso del criterio de información de Akaike se hicieron con el software Prism 5 para Windows (GraphPad Software, Inc. 2007).

4. Resultados

4.1 Inhibición del transporte de D-glucosa en eritrocitos humanos en condiciones de salida (Ensayos de Sen-Widdas)

Para determinar si NDGA era capaz de unirse al sitio externo para D-glucosa del transportador GLUT1 se realizaron ensayos de salida de D-glucosa en eritrocitos humanos, células que expresan mayoritariamente GLUT1 en sus membranas. La salida de D-glucosa se midió indirectamente al detectar los cambios en el tamaño y morfología de eritrocitos cargados con 100 mM D-glucosa al ser sometidos a una rápida disminución en la osmolaridad del medio, midiendo el aumento en el tiempo de la dispersión de luz en un espectrofluorímetro. El aumento en la dispersión de luz asociado al cambio de volumen eritrocitario es función de la velocidad de salida de D-glucosa, hasta que se alcanza el equilibrio quimiosmótico entre el medio intracelular y el medio extracelular.

Se determinó el efecto de concentraciones crecientes de NDGA (entre 0 y 100 μM) sobre la constante de velocidad de primer orden (k) de la salida de D-glucosa en eritrocitos humanos en cuatro experimentos independientes. Los datos de velocidad de salida en función de la concentración de NDGA se graficaron y ajustaron a una curva hiperbólica, la cual se presenta en la Figura 1A. Concentraciones micromolares de NDGA fueron capaces de inhibir la salida de D-glucosa, con un valor de IC_{50} promedio de $26,4 \pm 12,46 \mu\text{M}$. Este valor se utilizó como referencia para establecer las concentraciones de NDGA usadas en la caracterización del mecanismo de inhibición sobre la salida de D-glucosa en eritrocitos.

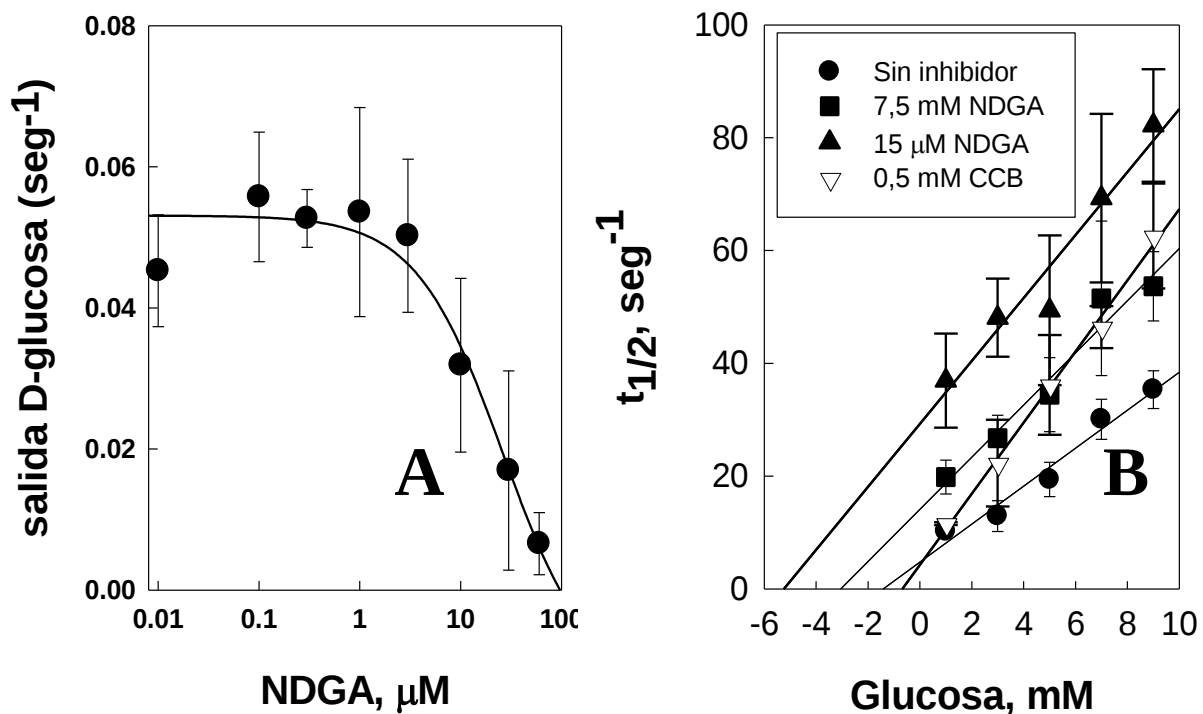


Figura 1.- Inhibición del transporte de D-glucosa en eritrocitos humanos por NDGA en condiciones de salida (Ensayos de Sen-Widdas). Panel A. Velocidad de salida de 0,1 M D-glucosa a distintas concentraciones de NDGA. El gráfico fue obtenido a partir de cuatro experimentos independientes y se representa el promedio $\pm$ desviación estándar. **Panel B.** Caracterización del patrón de inhibición de la salida de 0,1 M D-glucosa mediada por 0; 7,5 y 15 μM NDGA, y una curva de inhibición por 0,5 μM CCB. Los datos se representan en un gráfico de Hanes-Woolf y son representativos de cinco experimentos independientes.

4.2 Caracterización de la inhibición del transporte de D-glucosa en eritrocitos humanos en condiciones de salida

Sen y Widdas demostraron que al graficar los datos de velocidad de salida en función de la concentración externa de D-glucosa (Diagrama de Sen-Widdas) se obtiene una recta cuyo intercepto en el eje de las abscisas corresponde al valor negativo de la constante de semisaturación (K_d) para el sitio externo para glucosa de GLUT1, cuyo valor descrito en la literatura corresponde a 4 mM a 37°C (Sen y Widdas, 1962).

Para determinar el mecanismo de inhibición de NDGA sobre el transporte de D-glucosa facilitado por GLUT1 en condiciones infinito-cis de salida se graficaron los datos de velocidad de salida en función de la concentración de D-glucosa en presencia de dos concentraciones de inhibidor.

NDGA fue capaz de alterar la afinidad de D-glucosa por el sitio externo de GLUT1 (Figura 1B). El valor de K_d varió de 1,2 mM, en ausencia del inhibidor, a 3,9 mM y 5,5 mM en presencia de 7,5 y 15 μ M NDGA, respectivamente. Estos resultados sugieren que NDGA es un inhibidor competitivo de la salida de D-glucosa mediada por GLUT1, ya que es capaz de disminuir la afinidad de D-glucosa por el sitio externo del transportador.

4.3 Ensayos de desplazamiento de Citocalasina B (CCB)

Para verificar que NDGA se une directamente a GLUT1 y su efecto competitivo no se debe a una interacción inespecífica, se evaluó la capacidad de NDGA de desplazar una concentración fija de CCB; un conocido inhibidor competitivo del transporte de glucosa de origen fúngico que se une al sitio endofacial de GLUT1 (Bloch, 1973), y que permite probar si otros compuestos son capaces de interactuar directamente con el transportador si

concentraciones crecientes de estos compuestos son capaces de competir y desplazar a CCB de su sitio de unión al transportador.

En la Figura 2 se presentan los resultados de dichos experimentos, donde se observa que concentraciones crecientes de NDGA fueron capaces de desplazar a CCB unida a GLUT1 de una manera dosis dependiente, con un IC_{50} calculado de 0,45 μ M. Esto indica que NDGA interactúa directamente con el transportador de hexosas GLUT1.

4.4 Ensayos de inhibición en condiciones trans-cero de entrada en líneas celulares U-937 y HL-60

Para determinar si NDGA es capaz de inhibir la captación de glucosa en las líneas celulares U-937 y HL-60 fue necesario asegurar que los experimentos fueran realizados en condiciones de velocidad inicial (transporte lineal en el tiempo) y usando un sustrato que no se metabolice. Experimentos realizados en el laboratorio han demostrado que un tiempo de transporte de 40 segundos está dentro de las condiciones de velocidad inicial para el transporte mediado por GLUT1 (Ojeda, 2005, Salas *et al.*, 2013). Para los ensayos de inhibición se usó como sustrato 2-DOG debido a que es reconocido por los transportadores de glucosa GLUT, pero que no es metabolizado mediante la glicólisis más allá de su fosforilación por hexokinasa (Wick *et al.*, 1957).

En los paneles A y B de la Figura 3 se observa el efecto inhibitorio de concentraciones crecientes de NDGA sobre la captación de 0,25 mM 2-DOG en las líneas celulares leucémicas U-937 y HL-60, respectivamente. Se obtuvo la concentración inhibitoria (IC_{50}) promedio de cuatro experimentos independientes, y se obtuvo un valor de 85 μ M para HL-60, y 53 μ M para U-937. Estos resultados demuestran que NDGA en

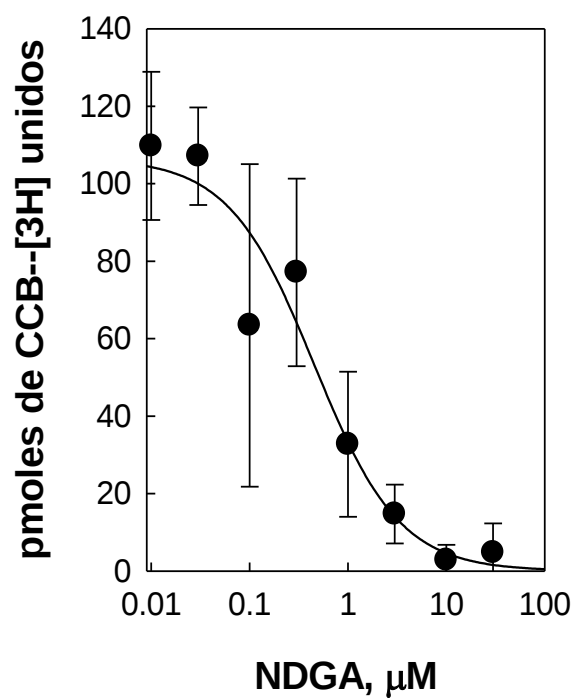


Figura 2.- Desplazamiento de CCB en membranas de eritrocitos humanos por NDGA. Desplazamiento de 0,1 μM de CCB a concentraciones crecientes de NDGA, expresando en pmoles de CCB unidos a membranas de eritrocitos humanos. El experimento se realizó en triplicado, y los datos se muestran como el promedio $\pm$ desviación estándar. La línea continua corresponde a la regresión no lineal de los datos a una curva hiperbólica.

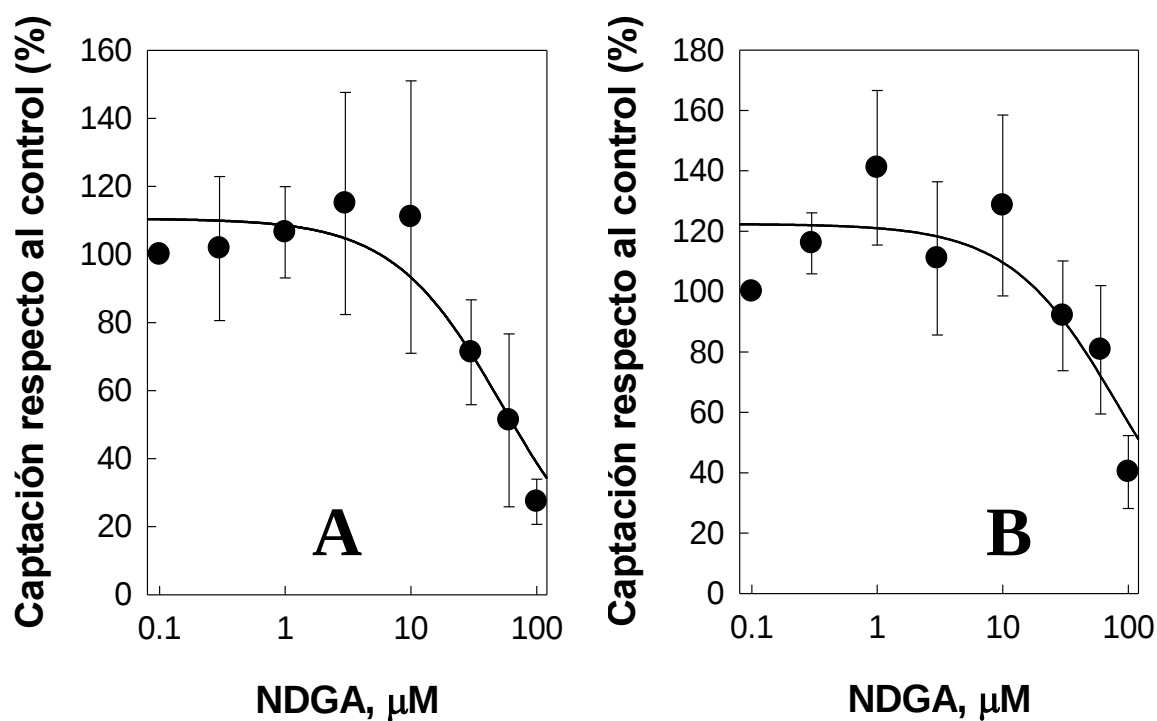


Figura 3.- Inhibición del transporte de 2-DOG en condiciones trans-cero de entrada en las líneas celulares U-937 y HL-60 por NDGA. Panel A y B. Incorporación de 0,25 mM 2-DOG a distintas concentraciones de NDGA en las líneas celulares U-937 y HL-60, respectivamente. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente y por triplicado. Los diagramas representan el promedio de cuatro experimentos independientes, mostrando la media y desviación estándar de cada punto.

concentraciones micromolares es capaz de inhibir la captación de glucosa en ambas líneas celulares leucémicas, y los valores de IC_{50} permiten establecer una concentración de NDGA sobre la cual trabajar para caracterizar el mecanismo de inhibición de este compuesto sobre la captación de glucosa en los modelos celulares usados.

4.5 Caracterización de la inhibición por NDGA del transporte de glucosa en condiciones de entrada

A partir de los valores de IC_{50} determinados en los experimentos anteriores se decidió que para caracterizar la inhibición se utilizarían concentraciones de NDGA de 0, 40 y 80 μ M. Sin embargo no se obtuvieron resultados consistentes, por lo que se decidió cambiar las concentraciones de NDGA a 30 y 60 μ M.

En la Figura 4 se presenta un diagrama de Hanes-Woolf representativo de tres ensayos independientes realizados en la línea celular U-937, en el cual se aprecia que las concentraciones de NDGA utilizadas no desplazaron la K_d respecto a la curva de saturación en ausencia del inhibidor.

Para elegir el modelo que mejor se ajuste a los datos se utilizó el software Prism 5 para realizar una comparación de los modelos competitivo y no competitivo mediante el criterio de información de Akaike. El análisis determinó que la probabilidad de que el modelo no competitivo sea correcto es de 83,62%, en comparación con un 16,38% para el modelo competitivo en células U-937. El mismo análisis determinó que el modelo no competitivo tiene una probabilidad de 80,40% de ser correcto en células HL-60, contra un 19,60% de probabilidad del modelo competitivo.

Estos resultados sugieren que NDGA ejerce su efecto inhibitorio en ambas líneas celulares sin desplazar al sustrato de su sitio de unión a los transportadores, por lo que se estaría uniendo a un sitio diferente al sitio de unión a sustrato.

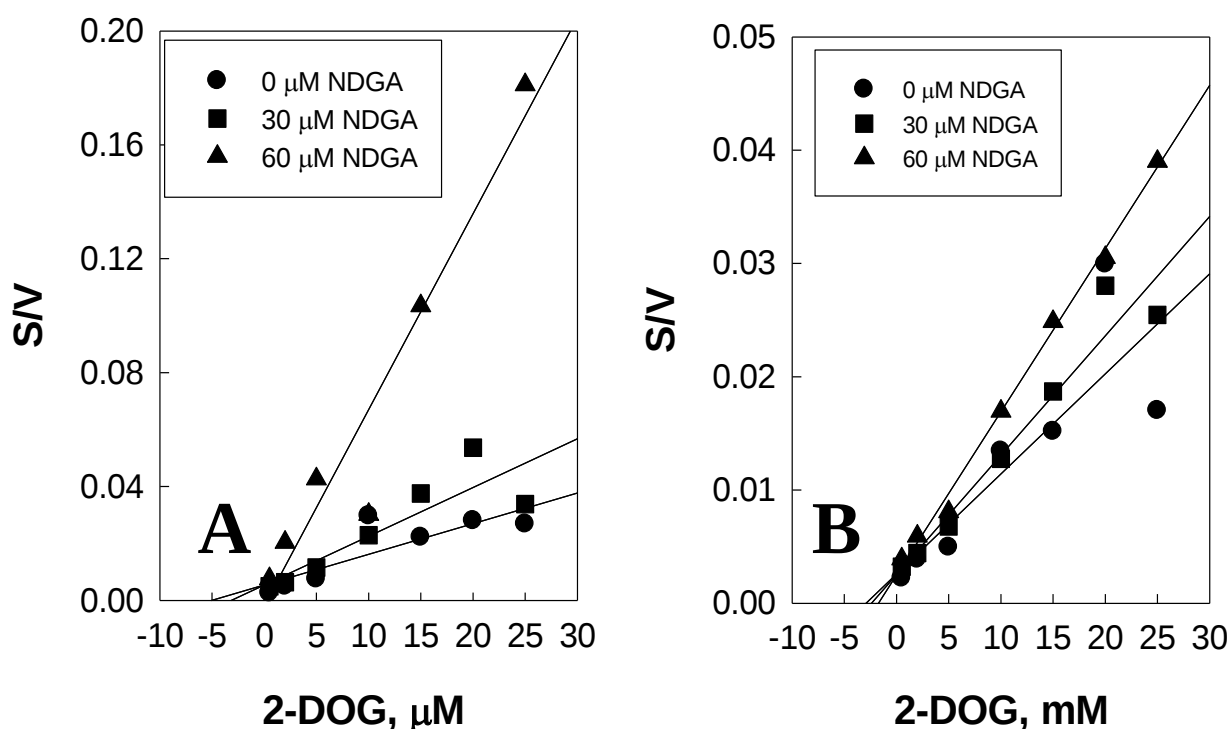


Figura 4.- Caracterización del mecanismo de inhibición de NDGA sobre la captación de 2-DOG en líneas celulares leucémicas humanas. Panel A y B. Efecto de NDGA sobre la captación de 2-DOG en células U-937 y HL-60, respectivamente. Los datos se presentan en un diagrama de Hanes-Woolf. Los diagramas son representativos de tres experimentos independientes, mostrando la media de cada punto. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente y por triplicado.

5. Discusión

Los resultados de esta tesis han demostrado que NDGA, el principal metabolito de *L. tridentata*, es capaz de inhibir el transporte de glucosa en eritrocitos humanos, y de 2-desoxiglucosa en las líneas celulares HL-60 y U-937, con valores de IC_{50} de 85 y 53 μM , respectivamente. Esto sugiere que las células U-937 son más sensibles que las células HL-60. Los estudios de transporte realizados en eritrocitos humanos permiten evaluar el efecto de NDGA sobre el transporte de glucosa facilitado por el transportador GLUT1 gracias a que este tipo celular expresa en su membrana plasmática grandes cantidades de esta proteína. Concentraciones micromolares de NDGA fueron capaces de inhibir la salida de D-glucosa de eritrocitos humanos, por lo que este compuesto es un efectivo inhibidor del transporte de glucosa mediado por GLUT1.

Para determinar de mejor manera el mecanismo mediante el cual NDGA ejerce su efecto inhibitorio, se realizaron experimentos que permitieron discriminar si este compuesto se une al sitio de unión del sustrato o si ejerce su efecto uniéndose a un sitio distinto del transportador. Los ensayos de salida infinito-cis permiten evaluar el mecanismo de inhibición de moléculas pequeñas sobre el sitio externo de unión al sustrato de GLUT1 en condiciones de salida de sustrato de la célula al medio, lo que permitiría discernir el mecanismo de acción de NDGA. Los ensayos realizados demostraron que NDGA fue capaz de desplazar la K_d del sitio externo en condiciones de salida, por lo que compete directamente con D-glucosa por el sitio de unión externo.

Para verificar que NDGA se une directamente a GLUT1 y su efecto competitivo no se debe a una interacción inespecífica, se evaluó la capacidad de NDGA de desplazar una concentración fija de citocalasina B; un conocido inhibidor competitivo del transporte de glucosa que se une al sitio endofacial de GLUT1 (Bloch, 1973) y que permite probar si

otros compuestos son capaces de interactuar directamente con el transportador. Los resultados demuestran que NDGA es capaz de desplazar a CCB unida a GLUT1, lo que indica que el efecto inhibitorio de este polifenol se debe a una interacción directa con GLUT1 y no a un efecto inespecífico a nivel de la membrana plasmática.

Uno de los objetivos de esta tesis es probar el efecto de NDGA sobre la captación de glucosa en las líneas leucémicas humanas HL-60 y U-937 con el fin de inhibir el transporte del nutriente a estas células y generar un estado de privación de energía e impedir o retardar su crecimiento. Los resultados demostraron que NDGA fue capaz de inhibir la captación de 2-DOG en ambas líneas celulares de manera dosis dependiente a concentraciones micromolares, lo que indica que este polifenol es un buen candidato para continuar estudios farmacéuticos sobre estas líneas celulares de cáncer, ya sea sólo o en conjunto con otros fármacos naturales. Además, se caracterizó el mecanismo de inhibición de NDGA en experimentos cero-trans en condiciones de entrada, lo que permitió evaluar la K_d del sitio de unión exofacial de los transportadores. Se encontró que NDGA inhibe de manera no competitiva la entrada de glucosa a las células, lo que indicaría que en estas condiciones NDGA no se une al sitio externo de unión a sustrato.

Los experimentos cinéticos realizados en eritrocitos y en células leucémicas humanas evalúan la K_d de un mismo sitio de unión a sustrato (Carruthers, 1990). Sorprendentemente, los resultados obtenidos en ambos modelos son discrepantes, ya que en eritrocitos se observa un comportamiento competitivo, y en células leucémicas un mecanismo no competitivo. Esto da lugar a dos hipótesis que podrían ayudar a explicar para este fenómeno, las cuales serán discutidas a continuación.

El hecho que NDGA es capaz de disminuir la afinidad del transportador por glucosa en ensayos infinito-cis de salida sugiere que existe un sitio de unión a este

compuesto que se encontraría en la cara externa del transportador. Asumiendo el modelo de transportador simple, GLUT1 presenta de manera alternativa un sitio de unión a sustrato endofacial o exofacial, y el mecanismo de transporte involucra cambios conformacionales entre ambas orientaciones, lo que permite el transporte facilitado de glucosa a través de la membrana (Widdas, 1952; Lieb y Stein, 1974; Krupa y Devés, 1981). Este mecanismo consta de cuatro etapas: primero una conformación hacia afuera capaz de aceptar al sustrato, luego un cambio conformacional del transportador inducido por la unión del sustrato (complejo transportador-sustrato), en tercer lugar el transportador se orienta hacia el interior de la célula y libera al sustrato, y por último una lenta regeneración de la orientación hacia afuera del transportador que corresponde al paso limitante (Figura 5).

En los experimentos de Sen-Widdas hay salida de glucosa desde los eritrocitos hacia el medio, lo que implica que la conformación predominante es aquella que orienta al transportador hacia afuera. Esta conformación dejaría al sitio de unión a sustrato exofacial disponible para que NDGA u otros inhibidores competitivos como floretina o pentoxifilina bloqueen el acceso de glucosa al sitio. Por el contrario, en los ensayos cero-trans de entrada realizados en células leucémicas la conformación predominante del transportador es la orientación hacia el interior de la célula.

Es posible que el sitio de unión de NDGA se ubique en una región del transportador que se encuentra cercana al sitio de unión exofacial cuando el transportador

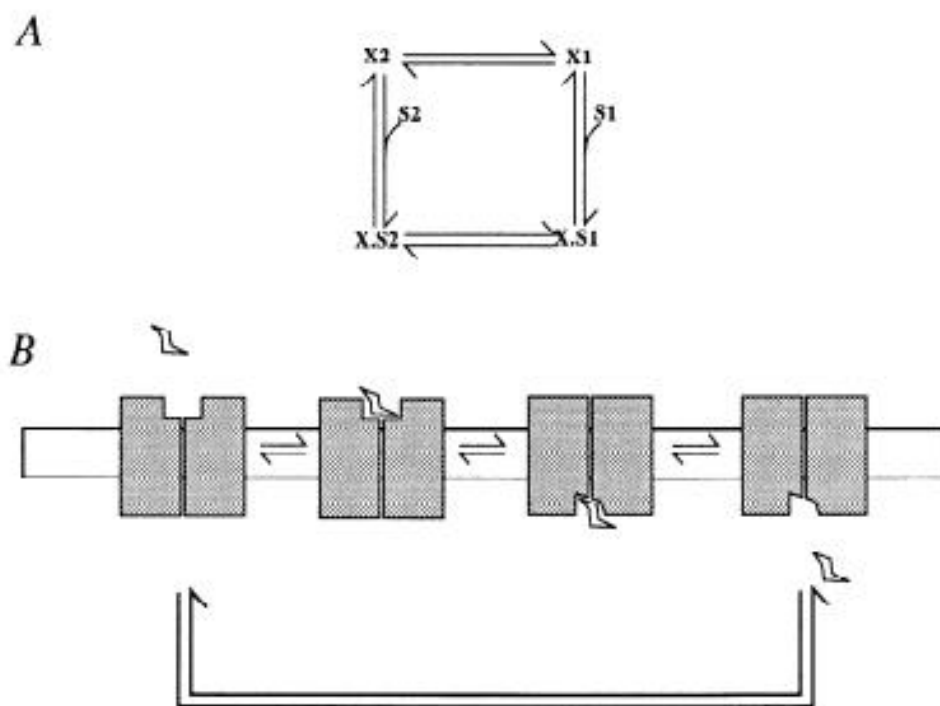


Figura 5.- Modelo de transportador simple (*simple carrier model*). Panel A y B. Diagrama de King-Altman y esquema, respectivamente, del modelo simple (o de conformación alternante) para el transporte de hexosas. En ausencia de sustrato (S), el transportador (X) se puede encontrar en una de dos conformaciones (X_1 o X_2). Al unirse S a X por un lado de la membrana, se genera el complejo sustrato-transportador ($X.S_1$ o $X.S_2$), que cambia de conformación para liberar el sustrato en el lado opuesto (Adaptado de Carruthers, 1990).

se orienta hacia el medio extracelular, y que el inhibidor interactúe con el sitio de unión a sustrato en esta conformación y logre bloquear la unión de glucosa de manera competitiva. La orientación opuesta que predomina en los experimentos de entrada mantendrían alejados a ambos sitios, evitando que ambos interactúen directamente. NDGA es capaz de inhibir la entrada de glucosa de manera no competitiva en esta condición, lo que indica que su unión provoca un cambio conformacional que dificulta la translocación de glucosa mediada por el transportador.

Otra hipótesis que puede explicar las diferencias observadas en los experimentos es que las distintas composiciones de las membranas celulares en los modelos celulares usados (eritrocitos y células leucémicas) puedan afectar cómo NDGA se une a GLUT1. Carruthers y Melchior realizaron estudios cinéticos en bicapas lipídicas reconstituidas con la proteína de membrana eritrocitaria (GLUT1), y demostraron que la longitud de las cadenas alifáticas de los ácidos grasos, el grado de insaturación y la cantidad de colesterol en las bicapas reconstituidas afectan la actividad absoluta del sistema de transporte (Carruthers y Melchior, 1984). Distintos tipos celulares poseen diferentes composiciones de lípidos en sus membranas plasmáticas, por lo que se deberían observar diferencias en la velocidad de transporte de glucosa si se utilizan dos modelos celulares distintos. Aun así, no hay evidencia que tales diferencias puedan afectar el mecanismo de acción de un inhibidor reversible sobre el flujo de glucosa mediado por transportadores, por lo tanto, demostrar que tal efecto es posible puede dar luces sobre cómo el ambiente en el que se encuentra un transportador puede afectar su sensibilidad a inhibidores.

Para probar si la diferencia observada en el mecanismo de inhibición de NDGA ocurre debido a las diferencias en los modelos celulares o si depende de la orientación del transportador predominante durante los experimentos, proponemos realizar experimentos

cero-trans de entrada en eritrocitos, de manera similar a los que se hicieron en las líneas HL-60 y U-937. Si la diferencia ocurre por la orientación del transportador entonces se espera que en ese tipo de experimentos el mecanismo de inhibición sea no competitivo, al igual que en las líneas celulares leucémicas. En cambio, si es el modelo celular el factor que produjo la diferencia, entonces los experimentos deberían mostrar un mecanismo competitivo, de mismo modo que en eritrocitos.

La decisión de estudiar las propiedades de NDGA sobre la captación de glucosa en células leucémicas nace de la búsqueda de compuestos naturales que posean propiedades anticancerígenas. Dentro de estos compuestos, resveratrol es una fitoalexina que posee propiedades antiproliferativas y antioxidantes, y cuyo efecto inhibitor sobre el transporte de glucosa en células leucémicas ha sido estudiado a cabalidad en el laboratorio (Salas *et al.*, 2013). Dada la similitud estructural entre RSV y NDGA, y los estudios que demuestran que ambos polifenoles tienen efectos citotóxicos y antiproliferativos en distintos modelos de células cancerígenas, surge la posibilidad de evaluar el efecto de ambas drogas en conjunto para poder determinar si pueden ser usadas en combinación para lograr un mayor efecto anticancerígeno. Parada (2012) evaluó en el efecto combinado de distintas concentraciones de RSV y NDGA sobre la viabilidad de las líneas celulares U-937 y HL-60. Su trabajo reveló que la acción combinada de ambos compuestos produce un efecto citotóxico sinérgico dependiente de la activación de caspasa-3 sobre ambas líneas celulares.

Dados estos antecedentes y los resultados obtenidos en esta tesis, se puede plantear la posibilidad de que la combinación de NDGA y RSV puedan generar un efecto inhibitorio aditivo o sinérgico sobre la captación de glucosa en las líneas celulares leucémicas estudiadas. Esto gracias a que ambos compuestos actúan sobre sitios distintos

del transportador GLUT1. Los experimentos publicados el año 2013 por el laboratorio demuestran que RSV se comporta como un inhibidor competitivo en condiciones de equilibrio y en experimentos cero-trans de salida en eritrocitos humanos, y como un inhibidor no competitivo en experimentos cero-trans de entrada, lo que sugiere que sitio de unión a resveratrol en GLUT1 sólo es accesible por la cara interna del transportador (Salas *et al.*, 2013). Por otro lado, los resultados de esta tesis sugieren que NDGA se comporta como un inhibidor competitivo en condiciones de salida, y que su sitio de unión se encuentra en la cara externa del transportador. Estos resultados apoyan la posibilidad de que los efectos de ambos compuestos combinados puedan sumarse o tener un efecto sinérgico, por lo que probar esta hipótesis es una opción a considerar si se quiere avanzar en la implementación de una terapia combinada con estos compuestos naturales.

En conclusión esta tesis demuestra que NDGA es un inhibidor no competitivo de la captación de glucosa en las líneas celulares leucémicas humanas HL-60 y U-937. En eritrocitos humanos, NDGA se comportó como un inhibidor competitivo de la salida de glucosa, uniéndose directamente al transportador GLUT1.

6. Bibliografía

1. Andersson L., 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.
2. Arteaga S., Andrade-Cetto A., Cárdenas R. (2005). *Larrea tridentata* (Creosote bush), an abundant plant of Mexican and US-American deserts and its metabolite nordihydroguaiaretic acid. *Journal of Ethnopharmacology* **98**, 231-239.
3. Asano T., Katagiri H., Takata K., Lin JL., Ishihara H., Inukai K., Tsukuda K., Kikuchi M., Hirano H., Yazaki Y. (1991). The role of N-glycosylation of GLUT1 for glucose transport activity. *J Biol Chem* **266**, 24632-24636.
4. Bachelard HS. (1972). Deoxyglucose and brain glycolysis. *Biochem J* **127**, 83P.
5. Basturk O., Singh R., Kaygusuz E., Balci S., Dursun N., Culhaci N., Adsay NV. (2011). GLUT-1 expression in pancreatic neoplasia. *Pancreas*. **40**, 187– 192.
6. Bianchi J., Rose RC. (1986). Glucose-independent transport of dehydroascorbic acid in human erythrocytes. *Proc Soc Exp Biol Med* **181**, 333-337.
7. Bloch, R. (1973). Inhibition of glucose transport in the human erythrocyte by cytochalasin B. *Biochemistry* **12**, 4799-4801.
8. Cairns MT., Alvarez J., Panico M., Gibbs AF., Morris HR., Chapman, D., Baldwin SA. (1987). Investigation of the structure and function of the human erythrocyte glucose transporter by proteolytic dissection. *Biochim Biophys Acta* **905**, 295-310.
9. Carruthers A. (1990) Facilitated Diffusion of Glucose. *Physiol Rev*. **70**, 1135-1176.
10. Coole K., Arundel S. (2004). Past, Recent, and Twenty-first Century Vegetation Change in the Arid Southwest: Final Report to the USGS Global Change Research Program. USGS Southwest Biological Science Center; Flagstaff, Arizona. 7 pp.

11. Cori CF., Cori GT. (1925). The Carbohydrate Metabolism of Tumors: I.the Free Sugar, Lactic Acid, and Glycogen Content of Malignant Tumors. *J Biol. Chem.* **64**, 11-22.
12. Deng D., Xu C., Sun P., Wu Y., Yan C., Hu M., Yan N. (2014). Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1. *Nature* **510**, 121-125.
13. Doege H., Bocianski A., Scheepers A., Axer H., Eckel J. Joost HG., 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.
14. Domin J., Higgins T., Rozengurt E. (1994) Preferential inhibition of platelet-derived growth factor-stimulated DNA synthesis and protein tyrosine phosphorylation by nordihydroguaiaretic acid. *J Biol Chem* **269**, 8260-8267.
15. Elstrom RL, Bauer DE, Buzzai M, Karnauskas R, Harris MH, Plas DR, Zhuang H, Cinalli RM, Alavi A, Rudin CM, Thompson CB. (2004). Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res* **64**, 3892-3899.
16. Frezza C., Gottlieb E. (2009). Mitochondria in cancer: not just innocent bystanders. *Semin Cancer Biol* **1**, 4-11.
17. Gatenby RA., Gawlinski ET. (1996). A reaction-diffusion model of cancer invasion. *Cancer Res.* **56**, 5745-5753.
18. Gatenby RA., Gillies RJ. (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* **4**, 891-899.
19. Gautam SC., Xu YX., Dumaguin M., Janakiraman N., Chapman RA. (2000). Resveratrol selectively inhibits leukemia cells: a prospective agent for ex vivo bone marrow purging. *Bone Marrow Transplantation* **25**, 639-645.

20. Gottlieb RA., Giesing HA., Zhu JY., Engler RL., Babior BM. (1995). Cell acidification in apoptosis: Granulocyte colony-stimulating factor delays programmed cell death in neutrophils by up-regulating the vacuolar H⁺-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**, 5965-5968.
21. Goswitz VC., Brooker RJ. (1995). Structural features of the uniporter/symporter/antiporter superfamily. *Protein Sci.* **4**, 534-537.
22. Gottschalk S, Anderson N, Hainz C, Eckhardt SG, Serkova NJ. (2004). Imatinib (STI571)-mediated changes in glucose metabolism in human leukemia BCR-ABL-positive cells. *Clin Cancer Res* **10**, 6661-6668.
23. Griffith JK., Baker ME., Rouch DA., Page MGP., Skurray RA., Paulsen IT., Chater KF., Baldwin SA., Henderson PJF. (1992). Membrane transport proteins: implications of sequence comparisons. *Curr Opin Cell Biol* **4**, 684-695.
24. Guha P., Dey A., Sen R., Chatterjee M., Chattopadhyay S. y Bandyopadhyay S.K. (2011). Intracellular GSH depletion triggered mitochondrial Bax translocation to accomplish resveratrol-induced apoptosis in the U937 cell line. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics.* **336**, 206-214.
25. Hatanaka M. (1974). Transport of sugars in tumor cell membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **355**, 77-104.
26. Hediger MA., Turk E., Wright EM. (1989). Homology of the human intestinal Na⁺/glucose and Escherichia coli Na⁺/proline cotransporters. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **86**, 5748-5752.
27. Helmlinger G., Netti PA., Lichtenbeld HC., Melder RJ., Jain RK. (1997). Solid stress inhibits the growth of multispheroid tumors. *Nature Biotechnology* **15**, 778-783.

28. Hill SA., Pigott KH., Saunders MI., Powell MEB., Arnold S., Obeid A., Ward G., Leahy M., Hoskin PJ., Chaplin DJ. (1996). Microregional blood flow in murine and human tumours assessed using laser Doppler microprobes. *Br J Cancer* **74** (Suppl XXVII), S260–S263.
29. Hirai T., Heymann JAW., Maloney PC., Subramaniam S. (2003). A structural model for 12-helix transporters belonging to the major facilitator superfamily. *J. Bacteriol.* **185**, 1712-1718.
30. Hruz PW., Mueckler MM. (2001). Structural analysis of the GLUT1 facilitative glucose transporter (review). *Mol Membr Biol.* **18**, 183-193.
31. Ito S., Fukusato T., Nemoto T., Sekihara H., Seyama Y., Kubota S. (2002). Coexpression of glucose transporter 1 and matrix metalloproteinase-2 in human cancers. *J Natl Cancer Inst.* **94**, 1080-1091.
32. Jay TM., Dienel GA., Cruz NF., Mori K., Nelson T., Sokoloff L. (1990). Metabolic stability of 3-O-methyl-D-glucose in brain and other tissues. *J Neurochem* **55**, 989-1000.
33. Joost HG., Bell GI., Best JD., Birnbaum MJ., Charron MJ., Chen YT., Doege H., James DE., Lodish HF., Moley KH., Moley JF., Mueckler M., Rogers S., Schurmann A., Seino S., Thorens B. (2002). Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. *American Journal of Physiology* **282**, 974–976.
34. Joost HG., Thorens B. (2001). The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *MolMembr Biol.* **18**, 247-256.
35. Kanai Y., Lee WS., You G., Brown D., Hediger MA. (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.

36. Kayano T., Burant CF., Fukumoto H., Gould GW., Fan YS., Eddy RL., Byers MG., Shows TB., Seino S., Bell GI. (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.
37. Kimura H., Braun RD., Ong ET., Hsu R., Secomb TW., Papahadjopoulos. D, Hong K., Dewhirst MW. (1996). Fluctuations in red cell flux in tumor microvessels can lead to transient hypoxia and reoxygenation in tumor parenchyma. *Cancer Res* **56**, 5522–5528.
38. Komina O., Wesierska-Gadek J. (2008). Action of resveratrol alone or in combination with roscovitine, a CDK inhibitor, on cell cycle progression in human HL-60 leukemia cells. *Biochemical Pharmacology.* **76**, 1554-1562.
39. Krupa RM., Devés R. (1981). An experimental test for cyclic versus linear transport models. The mechanisms of glucose and choline transport in erythrocytes. *J Biol Chem* **256**, 5410-5416.
40. Kunkel M., Reichtert T., Benz P., Lehr HA., Jeong JH., Wieland S., Bartenstein P., Wagner W., Whiteside T. (2003). Overexpression of Glut-1 and Increased Glucose Metabolism in Tumors Are Associated with a Poor Prognosis in Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma. *Cancer* **97**, 1015-1024.
41. Langcake PM, W. (1979). The relationship of resveratrol production to infection of grapevine leaves by *Botrytis cinerea*. *Vitis* **18**, 244-253.
42. Larance M., Ramm G., James DE. (2008). The GLUT4 code. *Mol Endocrinol* **22**, 226–233.

43. Lee CH., Jang YS., Her SJ., Moon YM., Baek SJ., Eling T. (2003). Nordihydroguaiaretic acid, an antioxidant, inhibits transforming growth factor-beta activity through the inhibition of Smad signaling pathway. *Exp Cell Res* **289**, 335-341.
44. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. (2000) Principles of Biochemistry. 3^{ra} edición. Worth; New York. 1255 pp.
45. Leitch JM., Carruthers A. (2009). Alpha- and beta- monosaccharide transport in human erythrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* **296**, C151-C161.
46. Lieb WR., Stein WD. (1974). Testing and Characterising the Simple Carrier. *Biochim. Biophys. Acta* **373**, 187-196.
47. Macheda ML., Rogers S., Best JD. (2005). Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J Cell Physiol* **202**, 654-662.
48. Maher F., Simpson IA. (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.
49. Martin N., Gaffney E., Maini P. (2010). Tumour-Stromal Interactions in Acid-Mediated Invasion: A Mathematical Model. *J Theor Biol* **265**, 461-470.
50. Martinez-Zaguilán R., Lynch RM., Martinez GM., Gillies RJ. (1993). Vacuolar-type H⁺-ATPases are functionally expressed in plasma membranes of human tumor cells. *Am. J. Physiol.* **265**, C1015-C1029.
51. Mate A., De La Hermosa MA., Barfull A., Planas JM., Vázquez CM. (2001). Characterization of D-fructose transport by rat kidney brush-border membrane vesicles: Changes in hypertensive rats. *Cellular and Molecular Life Sciences.* **58**, 12-13.
52. McDonald RW., Bunjobpon W., Liu T., Fessler S., Pardo OE., Freer IK., Glaser M., Seckl MJ., Robins DJ. (2001) Synthesis and anticancer activity of

nordihydroguaiaretic acid (NDGA) and analogues. *Anticancer Drug Des* **16**, 261-270.

53. McLean LA., Roscoe J., Jorgensen NK, Gorin FA, Cala PM. (2000). Malignant gliomas display altered pH regulation by NHE1 compared with nontransformed astrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* **278**, C676-C688.

54. Montcourrier, P., Silver, I. A., Farnoud, R., Bird, I. and Rochefort, H. (1997). Invasive breast cancer cells have a high capacity to acidify extracellular milieu. *Exp. Clin. Metast.* **15**, 382-392

55. Moreno-Sanchez R., Rodriguez-Enriquez S., Marin-Hernandez A., Saavedra E. (2007). Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J* **274**, 1393-1418.

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

57. Mueckler M., Caruso C., Baldwin SA., Panico M., Blench I., Morris HR., Allard WJ., Lienhard GE., Lodish HF. (1985). Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* **229**, 941-945.

58. Nolop KB., Rhodes CG., Brudin LH., Beaney RP., Krausz T., Jones T., Hughes JM. (1987). Glucose utilization in vivo by human pulmonary neoplasms. *Cancer* **60**, 2682-2689.

59. Ojeda, P.G. (2005) Interacción de las metilxantinas con el transportador de hexosas GLUT1. Tesis de pregrado, Escuela de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Univ. Austral de Chile, 83 pp.

60. Parada, D.E. (2012) Efecto citotóxico de resveratrol y ácido nordihidroguayarático sobre las líneas celulares leucémicas humanas, HL-60 y U937. Tesis de pregrado, Escuela de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Univ. Austral de Chile, 94 pp.

61. Park JB. (2001). Inhibition of glucose and dehydroascorbic acid uptakes by resveratrol in human transformed myelocytic cells. *J Nat Prod* **64**, 381-384.

62. Park JW., Choi YJ., Jang MA., Lee YS., Jun DY., Suh SI., Baek WK., Suh MH., Jin IN., Kwon TK. (2001). Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, reversibly inhibits progression through S and G2 phases of the cell cycle in U937 cells. *Cancer Lett* **163**, 43-49.
63. Ramasamy S., Drummond GR., Ahn J., Storek M., Pohl J., Parthasarathy S., Harrison DG. (1999). Modulation of expression of endothelial nitric oxide synthase by nordihydroguaiaretic acid, a phenolic antioxidant in cultured endothelial cells. *Mol Pharmacol* **56**, 116-123.
64. Reddy VS., Shlykov MA., Castillo R., Sun EI., Saier MH Jr. (2012). Major facilitator superfamily (MFS) revisited. *FEBS J.* **279**, 2022-2035.
65. Salas M., Obando P., Ojeda L., Ojeda P., Pérez A., Vargas-Uribe M., Rivas C., Vera JC., Reyes A. (2013). Resolution of the direct interaction and inhibition of the human GLUT1 hexose transporter by resveratrol from its effect on glucose accumulation. *Am J Physiol Cell Physiol*, publicada en línea.
66. Sasaki T., Minoshima S., Shiohama A., Shintani A., Shimizu A., Asakawa S., Kawasaki K., 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.
67. Secomb TW., Hsu R., Braun RD., Ross JR., Gross JF., Dewhirst MW. (1998). Theoretical Simulation of Oxygen Transport to Tumors by Three-Dimensional Networks of Microvessels. *Advances in Experimental Medicine and Biology Volume* **454**, 629-634.
68. 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.

69. Seufferlein T., Seckl MJ., Schwarz E., Bei, M., Wichert G., Baust H., Luhrs H., Schmid RM., Adler G. (2002) Mechanisms of nordihydroguaiaretic acid induced growth inhibition and apoptosis in human cancer cells. *Br J Cancer* **86**, 1188-1196.
70. Simpson I., Dwyer D., Malide D., Moley K., Travis A., Vannucci S. (2008). The facilitative glucose transporter GLUT3: 20 years of distinction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **295**, 242-253.
71. Suzuki K., Kono T. (1980). Evidence that insulin causes translocation of glucose transport activity to the plasma membrane from an intracellular storage site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 2542-2545.
72. Thorens B., Mueckler M. (2010). Glucose transporters in the 21st Century. *American Journal of Physiol* **298**, 141-145.
73. Warburg O., Posener K., Negelein E. (1924). Über den Stoffwechsel der Carcinomzellei. *Naturwissenschaften* **50**, 1131-1137.
74. Warburg O., Wind F., Negelein E. (1926). Über den Stoffwechsel von Tumoren im Körper. *J Mol Med* **5**, 829-832.
75. Warburg O. (1956). On The Origin of Cancer Cells. *Science* **123**, 309-314.
76. Weinhouse S. (1976). The Warburg hypothesis fifty years later. *Z Krebsforsch Klin Onkol Cancer Res Clin Oncol* **87**, 115-126.
77. Wick A., Drury D., Nakada H., Wolfe J. (1957). Localization of the Primary Metabolic Block Produced by 2-Deoxyglucose. *J. Biol. Chem.* **224**, 963-969.
78. Widdas WF. (1952). Inability of Diffusion to Account for Placental Glucose Transfer in the Sheep and Consideration of the Kinetics of a Possible Carrier Transfer. *J. Physiol.* **118**, 23-39.
79. Wright E. (2001). Renal Na⁺-glucose cotransporters. *Renal Physiol* **280**, 10-18.

80. Wu X., Li W., Sharma V., Godzik A., Freeze HH. (2002). Cloning and characterization of glucose transporter 11, a novel sugar transporter that is alternatively spliced in various tissues. *Molec. Genet. Metab.* **76**, 37-45.
81. Younes M., Brown RS., Stephenson M., Gondo M., Cagle PT. (1997). Overexpression of Glut1 and Glut3 in stage I nonsmall cell lung carcinoma is associated with poor survival. *Cancer* **80**, 1046–1051.
82. Youngren JF., Gable K., Penaranda C., Maddux BA., Zavodovskaya M., Lobo M., Campbell M., Kerner J., Goldfine ID. (2005) Nordihydroguaiaretic acid (NDGA) inhibits the IGF-1 and c-erbB2/HER2/neu receptors and suppresses growth in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* **94**, 37-46.
83. Zuniga FA., Chi G., Halber JF., Rubaskin A., Flynn DR., Isorovich P., Fishbarg J. (2001). A three dimensional model of the human facilitative transporter Glut1. *J. Biol. Chem* **276**, 44970–44975.