



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, Área Biología Celular y Molecular

EXPRESIÓN Y FUNCIÓN MITOCONDRIAL DEL TRANSPORTADOR DE ÁCIDO ASCÓRBICO SVCT2

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas
Área Biología Celular y Molecular

FRANCISCO JAVIER ROA CARTES
CONCEPCIÓN-CHILE
2016

Profesor Guía: Dra. Coralia Rivas Rocco
Depto. de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Fisiopatología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

Dra. Coralía Rivas Rocco
Profesor Guía
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Jorge Toledo Alonso
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Oliberto Sánchez Ramos
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Alejandro Reyes Pinto
Profesor Evaluador Externo
Universidad Austral de Chile

Dr. Juan Pablo Henríquez Hohmann
Director
Programa Doctorado en Ciencias Biológicas
Área Biología Celular y Molecular



1. ÍNDICE GENERAL

	Página
1. ÍNDICE GENERAL	I
2. ÍNDICE DE FIGURAS	IV
3. ÍNDICE DE ABREVIATURAS	VI
4. RESUMEN	1
5. SUMMARY	3
6. INTRODUCCIÓN	5
6.1 Características químicas y propiedades fisiológicas de la vitamina C.	5
6.2 Transportadores de ácido deshidroascórbico.	11
6.3 Transportadores de ácido ascórbico.	13
6.4 Estructura y propiedades funcionales de los transportadores SVCT.	19
6.5 Vitamina C en organelos y compartimentos subcelulares.	26
6.6 Transporte de vitamina C en la mitocondria.	29
7. PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN	34
8. HIPÓTESIS	36
9. OBJETIVOS	37
9.1 Objetivo general	37
9.2 Objetivos específicos	37
10. MATERIALES Y MÉTODOS	38
10.1 Cultivo celular.	38
10.2 Transporte de ácido ascórbico en cultivos celulares.	38
10.3 Ensayos de RT-PCR.	39
10.4 Ensayos de inmunofluorescencia.	41
10.5 Microscopía confocal y de súper resolución.	42
10.6 Purificación de mitocondrias.	43
10.7 Generación de mitoplastos.	45

10.8	Transporte de ácido ascórbico en mitocondrias aisladas.	46
10.9	Ensayos de western blot.	46
10.10	Ensayos de silenciamiento y sobreexpresión de proteínas.	48
11.	RESULTADOS	50
11.1	Estudio de la localización mitocondrial del transportador SVCT2 en la línea celular HEK-293.	50
11.1.1	Caracterización general de la expresión del transportador SVCT2 en la línea celular HEK-293.	50
11.1.2	Localización mitocondrial del transportador SVCT2 en la línea celular HEK-293.	57
11.1.3	Localización mitocondrial del transportador SVCT2 en líneas celulares humanas de distinto origen.	65
11.1.4	Localización submitocondrial específica del transportador SVCT2 en la línea celular HEK-293.	69
11.2	Estudio de la funcionalidad del transportador SVCT2 mitocondrial en la línea celular HEK-293.	77
11.2.1	Transporte de ácido ascórbico en mitocondrias aisladas.	77
11.2.2	Silenciamiento de la expresión del transportador SVCT2.	80
11.3	Participación de otros transportadores en la captación mitocondrial de vitamina C en la línea celular HEK-293.	86
11.3.1	Expresión y localización subcelular del transportador SVCT1.	86
11.3.2	Expresión y localización subcelular de los transportadores GLUT1 y GLUT10.	92
12.	DISCUSIÓN	102
12.1	Localización mitocondrial del transportador SVCT2 en la línea celular HEK-293.	105
12.2	Localización submitocondrial específica del transportador SVCT2.	110
12.3	Funcionalidad del transportador SVCT2 mitocondrial.	116
12.4	Participación de otros transportadores en la captación mitocondrial de vitamina C.	126
12.5	Expresión del transportador SVCT2 en el retículo endoplásmico.	131

13. CONCLUSIÓN

135

14. BIBLIOGRAFÍA

136



2. ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Especies moleculares de la vitamina C.	7
Figura 2.	Modelo propuesto para la estructura secundaria de los transportadores de ácido ascórbico SVCT.	22
Figura 3.	Caracterización general de la expresión del transportador SVCT2 en la línea celular HEK-293.	54
Figura 4.	Distribución intracelular del transportador SVCT2 en la línea celular HEK-293.	56
Figura 5.	Localización mitocondrial del transportador SVCT2 en la línea celular HEK-293.	58
Figura 6.	Colocalización del transportador SVCT2 con distintos marcadores de organelos.	60
Figura 7.	Análisis de Colocalización de Pearson entre el transportador SVCT2 y marcadores de organelos.	62
Figura 8.	Expresión del transportador SVCT2 en fracciones subcelulares obtenidas de células HEK-293.	64
Figura 9.	Distribución intracelular del transportador SVCT2 en líneas celulares humanas de distinto origen.	67
Figura 10.	Localización mitocondrial del transportador SVCT2 en líneas celulares humanas de distinto origen.	68
Figura 11.	Localización submitocondrial del transportador SVCT2 en la línea celular HEK-293.	71
Figura 12.	Localización submitocondrial del transportador SVCT2 en la línea celular HEK-293 (Continuación).	73
Figura 13.	Expresión del transportador SVCT2 en mitoplastos.	75
Figura 14.	Transporte de ácido ascórbico en mitocondrias aisladas de células HEK-293.	79
Figura 15.	Silenciamiento de la expresión del transportador SVCT2 en la línea celular HEK-293.	83

Figura 16.	Silenciamiento de la expresión del transportador SVCT2 y efecto en el transporte mitocondrial de ácido ascórbico.	85
Figura 17.	Análisis de la expresión del transportador SVCT1 en la línea celular HEK-293.	88
Figura 18.	Análisis de la expresión de SVCT1 en células HEK-293 sobreexpresando el transportador.	89
Figura 19.	Localización subcelular de SVCT1 en células HEK-293 sobreexpresando el transportador.	91
Figura 20.	Expresión de los transportadores GLUT de clase I y III en la línea celular HEK-293.	93
Figura 21.	Localización subcelular del transportador GLUT1 en las células HEK-293.	96
Figura 22.	Localización subcelular de GLUT1 en células HEK-293 sobreexpresando el transportador.	97
Figura 23.	Expresión del transportador GLUT1 en fracciones subcelulares obtenidas de células HEK-293.	99
Figura 24.	Expresión de los transportadores GLUT1 y SVCT2 en fracciones mitocondriales ultrapuras.	100

3. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AA:	Ácido ascórbico
ATP:	Adenosin trifosfato
Ca ²⁺ :	Ion calcio
Cloruro de colina:	Cloruro de (2-hidroxietil)-trimetilamonio
DHA:	Ácido deshidroascórbico
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
E°:	Potencial redox
EDTA:	Ácido etilen diamino tetraacético
GFP:	Proteína fluorescente verde
GLUT:	Transportadores facilitativos de hexosas
Hepes:	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etano sulfónico
K ⁺ :	Ion potasio
K _m :	Constante cinética de Michaelis-Menten
MAM:	Membranas asociadas a mitocondria
Mg ²⁺ :	Ion magnesio
MME:	Membrana mitocondrial externa
MMI:	Membrana mitocondrial interna
mRNA:	Mensajero de ácido ribonucleico
mtDNA:	DNA mitocondrial
Na ⁺ :	Ion sodio
Na ⁺ ₅₀ :	Concentración de sodio que produce un 50% del efecto máximo
n _H :	Coeficiente de Hill
PBS:	Tampón fosfato salino
RNA:	Ácido ribonucleico
siRNA:	RNA de interferencia
SVCT:	Cotransportadores de sodio-ascorbato
Tris:	Tris(hidroximetil)aminometano
Tritón X-100:	Polietilen glicol-p-isooctifenil eter
V _{max} :	Velocidad máxima

4. RESUMEN

La mitocondria es la fuente principal de especies reactivas del oxígeno dentro de la célula, las que son generadas como productos secundarios del proceso normal de respiración celular. Estos agentes oxidantes pueden producir serios daños al genoma mitocondrial y las membranas del organelo, por lo que la presencia de antioxidantes como la vitamina C (ácido ascórbico) ayudan a mantener la integridad y el metabolismo de la mitocondria. No obstante, mientras el transporte de vitamina C ha sido ampliamente descrito a nivel de membrana plasmática, poco se conoce acerca de este fenómeno a nivel mitocondrial. Interesantemente, estudios realizados en distintos modelos celulares han reportado que el transportador de ácido ascórbico SVCT2 se distribuye principalmente a nivel intracelular, lo que concuerda con resultados previos de nuestro laboratorio indicando la localización mitocondrial de este transportador en diversas líneas celulares de cáncer de mama. Esta evidencia nos llevó a proponer que SVCT2, clásicamente descrito como un transportador de membrana plasmática que media la captación de ácido ascórbico desde el medio extracelular, podría estar jugando un papel importante a nivel mitocondrial.

El objetivo de esta tesis fue estudiar la expresión y funcionalidad del transportador de ácido ascórbico SVCT2 en la mitocondria, utilizando como modelo la línea celular HEK-293. Ensayos de inmunofluorescencia y microscopía confocal mostraron una clara colocalización entre el transportador SVCT2 y varios marcadores mitocondriales. Esto fue confirmado por medio de ensayos de fraccionamiento subcelular y western blot, donde se observa una marcada

expresión de SVCT2 en la fracción mitocondrial purificada. Además, utilizando microscopía de súper resolución, purificación de mitocondrias y generación de mitoplastos, determinamos la localización submitocondrial específica de SVCT2, encontrando que el transportador es una proteína que se ubica en la membrana mitocondrial interna. Experimentos funcionales en mitocondrias aisladas revelaron que estos organelos son capaces de transportar eficientemente ácido ascórbico, captación que muestra propiedades cinéticas características de un transportador de baja afinidad. Ensayos de silenciamiento de la expresión de SVCT2 por medio de RNA interferente mostraron una marcada disminución en la expresión mitocondrial del transportador. Más importante aún, el silenciamiento de la expresión de SVCT2 se correlaciona con una notable disminución en el transporte de ácido ascórbico en mitocondrias aisladas. En conjunto, estos resultados nos permiten concluir que SVCT2 es el transportador responsable de la captación de ácido ascórbico mitocondrial en las células HEK-293. Adicionalmente, por medio de estudios de expresión endógena y sobreexpresión de transportadores, descartamos en estas células la presencia a nivel mitocondrial tanto de SVCT1 como de GLUT1 y GLUT10, previamente propuestos en literatura como transportadores mitocondriales de vitamina C. Por último, a través de ensayos de inmunofluorescencia, determinamos que SVCT2 se localiza a nivel mitocondrial en un gran número de líneas celulares humanas de distinto origen. Estos resultados nos permiten proponer que la localización mitocondrial del transportador SVCT2 es una propiedad que podría ser compartida entre diferentes células, tejidos y órganos.

5. SUMMARY

Mitochondria are the main source of reactive oxygen species within the cell, which are generated as secondary products of the normal cell respiration process. These oxidant agents can produce severe damage in the mitochondrial genome and membranes, therefore the presence of antioxidants like vitamin C (ascorbic acid) helps to sustain the integrity and the metabolism of the organelle. Nevertheless, meanwhile vitamin C transport has been widely characterized at the cell surface, little is known about this phenomenon at the mitochondrial level. Interestingly, studies performed in different cell models have reported that the ascorbic acid transporter SVCT2 is distributed mainly at intracellular level, which agrees with previous data obtained in our laboratory, showing mitochondrial localization of this transporter in a number of breast cancer cells. This evidence leads us to propose that SVCT2, classically described as a plasma membrane transporter that mediates the ascorbic acid uptake from the extracellular medium, might be playing an important role at mitochondrial level.

The objective of this thesis was to study the expression and functionality of the ascorbic acid transporter SVCT2 in mitochondria, using HEK-293 cells as a model. Immunofluorescence assays and confocal microscopy showed a clear colocalization between the SVCT2 transporter and several mitochondrial markers. This was further confirmed by subcellular fractionation assays and western blot, where a strong expression of SVCT2 is observed in the purified mitochondrial fraction. Even more, using super resolution microscopy, mitochondrial purification and mitoplast generation we determined the specific submitochondrial localization

of SVCT2, showing that the transporter is located in the inner mitochondrial membrane. Functional assays in isolated mitochondria revealed that these organelles are capable of efficiently transport ascorbic acid, uptake that exhibits kinetic properties characteristic of a low affinity transporter. Silencing experiments of the SVCT2 expression using interference RNA showed a strong decrease in the mitochondrial expression of the transporter. More importantly, silencing SVCT2 expression is correlated with a significant decrease in the ascorbic acid uptake of isolated mitochondria. Altogether, these data allow us to conclude that SVCT2 transporter is the responsible of mitochondrial ascorbic acid uptake in HEK-293 cells. Additionally, by endogenous expression analyses and transporters overexpression, we exclude in these cells the presence of SVCT1 at the mitochondria, and the presence of GLUT1 and GLUT10, previously proposed as vitamin C mitochondrial transporters. Finally, through immunofluorescence assays, we determined that SVCT2 is localized at mitochondria in a number of human cells of diverse origin. These results permit us to propose that mitochondrial localization of SVCT2 might be a property shared among different cells, tissues and organs.

6. INTRODUCCIÓN

6.1. Características químicas y propiedades fisiológicas de la vitamina C.

La vitamina C es un antioxidante de amplio espectro y un nutriente esencial requerido para el normal funcionamiento del organismo (Liang et al., 2001). La mayoría de las especies, a excepción del cobayo, los primates, los humanos, y algunos otros vertebrados, son capaces de sintetizar la vitamina C a partir de glucosa en el hígado o en el páncreas, en un proceso denominado ciclo del ácido hexurónico (Charterjee et al., 1961). El proceso de síntesis comprende cuatro etapas, de las cuales la primera ocurre en el citoplasma de la célula, mientras que las siguientes tres ocurren en el retículo endoplasmático (Kiuchi et al., 1980). Tras su síntesis, la vitamina C es distribuida hacia los distintos tejidos del organismo en donde cumple diversas funciones (Rose, 1988).

Durante el proceso de evolución, los seres humanos han perdido la capacidad de sintetizar vitamina C, por lo tanto, deben obtenerla en forma exclusiva a partir de la dieta (Burns et al., 1956; Hodges et al., 1971). La incapacidad de sintetizar este nutriente se debe a que la γ -gulono-lactona oxidasa, enzima que cataliza el último paso de la vía de síntesis de la vitamina C, presenta múltiples mutaciones en el gen que la codifica, lo que impide su función (Ha et al., 2004; Kawai et al., 1992; Nishikimi et al., 1994). La carencia total o deficiencia en la ingesta normal de vitamina C puede generar una serie de desórdenes clínicos y patologías, como anormalidades en el proceso de cicatrización, desorganización en el tejido conectivo y óseo, inestabilidad vasomotora, y finalmente puede

desencadenar en escorbuto, enfermedad que puede ser letal si no es tratada a tiempo (Hodges et al., 1971; England & Seifter, 1986; Padh, 1990; Baker et al., 1993; Weber et al., 1996; Jacob & Sotoudeh, 2002; Margittai et al., 2005).

La vitamina C existe en solución en dos formas químicas biológicamente activas: la forma reducida o ácido ascórbico, y la forma oxidada o ácido deshidroascórbico (Carr & Frei, 1999). La oxidación y reducción de la vitamina C es reversible, constituyendo su propiedad química más importante y la base de sus propiedades fisiológicas como agente antioxidante (Sapper et al., 1982). El ácido ascórbico es un compuesto planar de 6 carbonos ($C_6H_8O_6$), que presenta una estructura de enodiol. Corresponde a un ácido débil, con dos grupos ionizables ($pK_{a1}= 4,04$ y $pK_{a2}= 11,34$), razón por la cual a pH fisiológico se encuentra como anión ascorbato, debido a la deprotonación del carbono 3. Es capaz de oxidarse y reducirse fácilmente al donar o aceptar electrones, presentando dos equilibrios químicos (Figura 1). Al sufrir su primera oxidación producto de la pérdida de un electrón, el ácido ascórbico genera el radical libre ácido semi-deshidroascórbico, compuesto que puede aceptar o donar electrones de acuerdo a las condiciones en las cuales se encuentre (Coassin et al., 1991; Mehlhorn, 1991). Si este radical se oxida producto de la pérdida de un segundo electrón se genera el ácido deshidroascórbico (DHA), el cual puede volver a ser reducido a ácido ascórbico mediante el mismo intermediario (Winkler, 1987). El DHA se puede encontrar como tal o en su forma hidratada de hemiacetal (Figura 1). El DHA es inestable en solución acuosa, con una vida media menor a 30 segundos a pH 7,4, por lo que si no es reducido a ácido ascórbico en forma rápida, es hidrolizado de forma irreversible a ácido 2,3-diceto-L-gulónico, el cual

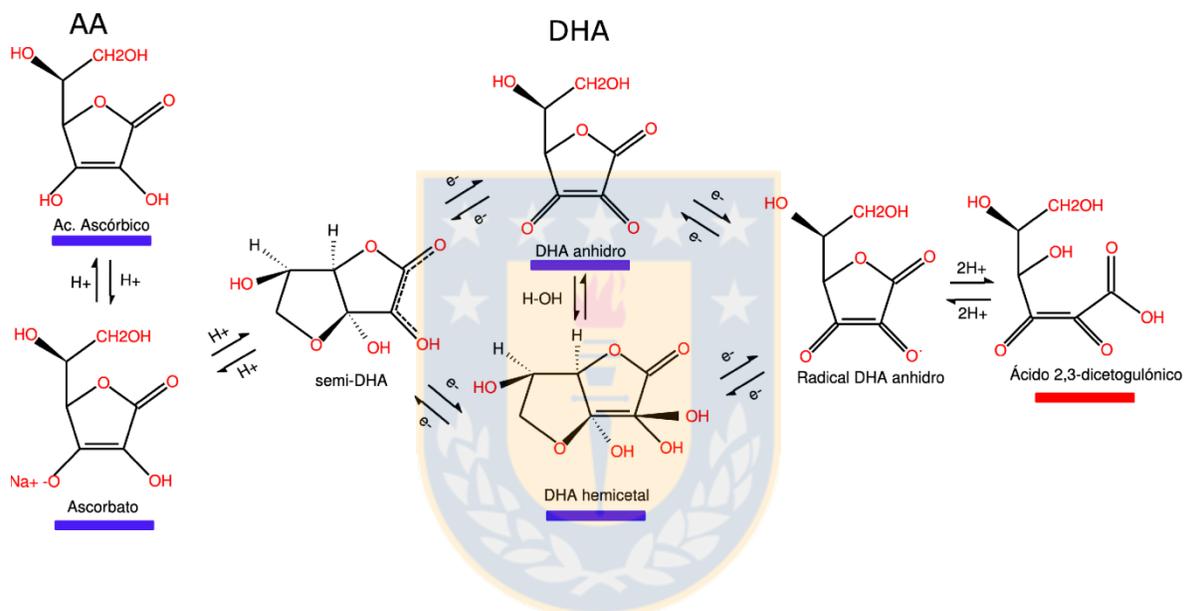


Figura 1. Especies moleculares de la vitamina C. El ácido ascórbico (AA) es capaz de oxidarse y reducirse fácilmente al donar o aceptar electrones, presentando dos equilibrios químicos, el de ácido ascórbico y el de su forma oxidada o ácido deshidroascórbico (DHA). Si el DHA no es reducido a AA, es hidrolizado de forma irreversible a ácido 2,3-diceto-L-gulónico, el cual carece de actividad biológica (Winkler, 1987; Nualart et al., 2003).

carece de actividad biológica (Winkler, 1987; Nualart et al., 2003). En definitiva, el ácido ascórbico es la forma química predominante en el organismo, mientras el DHA está prácticamente ausente en la sangre, células y tejidos. Sin embargo, adquiere un papel esencial en el reciclaje y recuperación de la vitamina C *in vivo* (Nualart et al., 2003; Rivas et al., 2008).

La vitamina C es esencial para la mantención de un correcto metabolismo, participando en diversos procesos biológicos de importancia para el organismo (Liang et al., 2001). Dentro de las primeras funciones descritas para este nutriente encontramos que es esencial para la síntesis de colágeno y proteoglicanos (Bird et al., 1986). En este sentido, la vitamina C interacciona con metales de transición como el hierro y cobre, participando como cofactor de hidroxilasas y monooxigenasas, enzimas que participan en la maduración de proteínas de la matriz extracelular como colágeno y elastina (Peterkofsky, 1991). También es necesaria para el sistema hematopoyético y reproductor, así como para la función leucocitaria y la síntesis de carnitina, péptidos neuroendocrinos y melanina (Englard & Seifter, 1986; Padh, 1990; Sauberlich, 1994). Por otro lado, la vitamina C incrementa la biodisponibilidad y absorción de hierro desde el hierro no hémico consumido a través de la dieta (Bendich, 1990; Liang et al., 2001), y además actúa como donador de electrones a enzimas que participan en el metabolismo de la histamina, del colesterol y de la tirosina (Linster et al., 2006). Por último, ha sido descrita una alta interdependencia funcional entre la vitamina C y otro importante compuesto antioxidante intracelular, el tripéptido glutatión (Montecinos et al., 2007).

Otra de las funciones fundamentales de la vitamina C tiene que ver con su papel como agente reductor, siendo el antioxidante soluble más importante en el organismo. Posee un bajo potencial de óxido-reducción ($E^{\circ}=+0,05V$ a $30^{\circ}C$ y $pH=7$), lo que le permite oxidarse y reducirse reversiblemente con facilidad, actuando como dador o aceptor de una pareja de electrones (Rivas et al., 2008). Así, se le considera un antioxidante de amplio espectro, capaz de neutralizar los radicales libres generados en los diferentes procesos metabólicos, como son el radical peróxido, hidroxilo, superóxido, peroxinitrilo, y otras especies reactivas del oxígeno (ROS) (Hodges et al., 1971; Carr & Frei, 1999). Por esto, ha sido considerado como uno de los antioxidantes más efectivo y menos tóxico identificado en sistemas biológicos (Wang et al., 2000). En este sentido, ya que los agentes oxidantes pueden producir daño en macromoléculas esenciales para la función celular, como son los ácidos nucleicos, proteínas, o componentes estructurales de las membranas celulares, la actividad reductora de la vitamina C resulta imprescindible en la defensa antioxidante celular (Frei et al., 1989; Witenberg et al., 1999). Estas observaciones son apoyadas por diversa evidencia experimental, indicando que el ácido ascórbico protege de daño oxidativo a lípidos y proteínas en el plasma, como por ejemplo, la lipoproteína de baja densidad (LDL) (Frei et al., 1996; Witenberg et al., 1999). La vitamina C puede revertir la oxidación de la vitamina E, la que actúa protegiendo los ácidos grasos poliinsaturados contra la peroxidación lipídica (Niki, 1991; Navas et al., 1994; Frei et al., 1996). Además, ha sido reportada también su capacidad de proteger al DNA de mutaciones producidas por estrés oxidativo (Lutsenko et al., 2002). Por último, otra acción de la vitamina C es la activación de la red enzimática detoxificante en

el hígado, potenciando la biotransformación de xenobióticos y metabolitos naturales (Zannoni et al., 1987).

Debido a la incapacidad de sintetizar vitamina C, los seres humanos deben ingerirla a través de la dieta, por lo que este compuesto es absorbido a nivel del intestino delgado desde donde pasa al plasma para ser distribuido a los distintos tejidos (Savini et al., 2008). La vitamina C se encuentra en el plasma solamente en su estado reducido, en concentraciones de alrededor de 20-50 μM (Capellmann et al., 1994). Interesantemente, los seres humanos muestran requerimientos diarios de ácido ascórbico bastante bajos para mantener un nivel basal constante de la vitamina en el plasma (Levine et al., 1999). Esto puede ser explicado por la presencia de un sistema de reciclaje de vitamina C muy eficiente, con participación de transportadores localizados en las membranas celulares y enzimas reductasas en el interior de las células (Rose, 1988). En este sentido, se ha descrito que dependiendo del tipo celular, el ácido ascórbico está presente en un rango de concentraciones bastante variables, desde valores entre 200-800 μM en cerebro, hígado, bazo y riñón, hasta valores en el orden milimolar en leucocitos, glándula adrenal y pituitaria (Moser, 1987; Rose, 1988). Estos altos niveles de concentración de vitamina C intracelular en comparación a los encontrados en el plasma, apoyan la existencia de sistemas de transporte altamente eficientes para el ingreso y almacenamiento de vitamina C en el interior celular.

En la actualidad se sabe que las células humanas adquieren vitamina C utilizando dos sistemas de transportadores altamente específicos, que difieren tanto en sus aspectos estructurales como funcionales (Liang et al., 2001; Linster et al., 2007). La forma oxidada de la vitamina C, el DHA, es transportada hacia el

interior celular por miembros de la familia de transportadores facilitativos de hexosas GLUT (SLC2) (Vera et al., 1993; Rivas et al., 2008). Por otro lado, la forma reducida de la vitamina C, el ácido ascórbico, es transportada a través de la membrana plasmática por la familia de transportadores de ácido ascórbico acoplados a sodio SVCT (SLC23) (Tsukaguchi et al., 1999; Savini et al., 2008).

6.2. Transportadores de ácido deshidroascórbico.

El ácido deshidroascórbico (DHA) es transportado al interior celular a favor de su gradiente de concentración, de manera específica por proteínas integrales de membrana pertenecientes a la familia de transportadores facilitativos de hexosas GLUT (Vera et al., 1993). La familia de estos transportadores comprende 14 miembros (GLUT1-GLUT14), los que se encuentran ampliamente distribuidos en las células de mamíferos, pudiendo expresarse más de uno en un mismo tipo celular simultáneamente (Flier et al., 1987; Carruthers, 1990; Baldwin, 1993; Mueckler et al., 1994). Las propiedades de cada transportador difieren unas de otras, ya sea por los distintos sustratos que son capaces de transportar o por las diferencias en sus propiedades cinéticas (Vera et al., 1993; Mueckler, 1994). En cuanto a su estructura, usando perfiles de hidrofobicidad y predicción de estructura secundaria, se ha propuesto que los transportadores GLUT se organizan en doce dominios transmembrana altamente hidrofóbicos. Estas proteínas se ubicarían con sus extremos amino y carboxilo terminal orientados hacia la cara citoplasmática de la membrana celular (Gould & Holman, 1993; Barrett et al., 1999), modelo que fue corroborado con la reciente estructura

cristalina del transportador GLUT1 obtenida a 3,2 Å de resolución (Deng et al., 2014).

Estudios de expresión de los transportadores GLUT en ovocitos de *Xenopus laevis* y en otros modelos celulares demostraron que de los catorce transportadores de glucosa descritos, los miembros GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT4, GLUT8 y GLUT10 son también transportadores de DHA (Vera et al., 1993; Rumsey et al., 1997; Rumsey et al., 2000; Lee et al., 2010; Mardones et al., 2011; Corpe et al., 2013). Por otro lado, estudios funcionales realizados en la línea celular HL-60, que no expresa transportadores SVCT, establecieron definitivamente el papel de GLUT1 como un transportador de DHA, y clarificaron la importancia de su transporte en el reciclaje de la vitamina C y mantención intracelular de la forma reducida, ácido ascórbico (Vera et al., 1994). El transporte de DHA por GLUT1 es bidireccional y de baja afinidad, y estudios de competencia mostraron que su transporte fue inhibido por metilglucosa y deoxiglucosa, sustratos de GLUT1 (Vera et al., 1995). Una vez que el DHA ingresa a la célula, es rápidamente reducido y acumulado como ácido ascórbico. Este proceso de reducción puede ser llevado a cabo de forma no enzimática, por compuestos como glutatión o ácido lipoico, o de forma enzimática, a través de reductasas de DHA dependientes de NADPH o de glutatión, como glutarredoxinas y tiorredoxinas reductasas. (Wells et al., 1990; Wells & Xu, 1994; Maellaro et al., 1997; Washburn & Wells, 1999; Nardai et al., 2001; Verrax & Calderon, 2008). Estos estudios permitieron establecer que los transportadores GLUT son centrales en permitir el transporte de la vitamina C oxidada generada en reacciones de óxido-reducción, mecanismo altamente eficiente que permite la acumulación de ácido ascórbico y el

salvataje de la vitamina C oxidada que de otro modo se hidroliza en forma irreversible (Vera et al., 1995; Wang et al., 1997; Nualart et al., 2003). Dado que los transportadores GLUT se encuentran presentes en todas las células del organismo, el transporte, reducción y acumulación de DHA ocurre en todos los tejidos y órganos. Este proceso parece ser de importancia central en los seres humanos, especie incapaz de sintetizar este nutriente, y que paradójicamente posee un requerimiento diario de vitamina C bastante bajo. Así, con una dosis por debajo de los 100 mg diarios, el organismo mantiene una concentración plasmática de alrededor de 50 μM (Levine, 1996). Esta cantidad de vitamina C permite la mantención de los niveles celulares normales, incluso en órganos cuyo concentración asciende hasta por sobre 100 veces la concentración promedio de esta vitamina en el plasma (Rose, 1988; Levine et al., 1995). La baja dosis diaria de vitamina C requerida por los seres humanos es explicada por la existencia de los eficientes sistemas de reducción de DHA recién descritos y la fundamental participación de los transportadores GLUT en este proceso.

6.3. Transportadores de ácido ascórbico.

La forma reducida de la vitamina C, el ácido ascórbico, es transportada al interior celular a través de los transportadores de ácido ascórbico acoplados a sodio SVCT (*Sodium dependent Vitamin C Transporters*) (Savini et al., 2008). Esta familia está compuesta por dos miembros clonados y caracterizados funcionalmente, SVCT1 y SVCT2, los que muestran absoluta especificidad por el ácido ascórbico, mediando su captación a favor del gradiente de concentración de

sodio (Tsukaguchi et al., 1999; Daruwala et al., 1999). Ambos transportadores pertenecen a la familia de transportadores de nucleobase/ascorbato (NCS2, Nucleobase:Cation Symporter-2 o NAT, Nucleobase-Ascorbate transporter) la cual está presente en bacterias, hongos, plantas y vertebrados. Esta familia incluye también a la permeasa de ácido úrico-xantina de *Aspergillus nidulans* (UapA), las permeasa de purinas (UapC y YgfO), el transportador de xantinas de bacterias (PbuX y XanQ), el transportador de uracilo (UraA) y la permeasa de uracilo unida a membrana (PyrP), contribuyendo en procesos de síntesis de ácidos nucleicos y nucleósidos y como una importante fuente de nitrógeno en plantas y microorganismos (Faaland et al., 1998; Meintanis et al., 2000). SVCT1 y SVCT2 humanos son productos de los genes SLC23A1 y SLC23A2, los que se localizan en los cromosomas 5q31.2-31.3 y 20p12.2-12, respectivamente. Ambos transportadores fueron clonados mediante una búsqueda de secuencia por homología, basados en otros miembros de la familia de transportadores de nucleobases siendo denominados inicialmente YSPL3 (SVCT1) y YSPL2 (SVCT2) (Faaland et al., 1998). El transportador SVCT1 es una proteína de 598 aminoácidos, mientras SVCT2 consta de 650 residuos (Savini et al., 2008).

SVCT1 posee una variante de empalme no funcional clonada desde una librería de cDNA de células Caco-2 (cáncer de colon humano), y se ha demostrado su expresión en intestino humano. Esta variante origina una proteína con cuatro aminoácidos extra (VGLH) insertados entre los residuos E155 y V156, denominada SVCT1b, sin embargo, el mecanismo molecular por el cual esta inserción genera una proteína no funcional es desconocido (SeqID: NP_689898) (Eck et al., 2004; Wang et al., 1999). Para SVCT2 se ha encontrado una variante

alternativa de empalme, clonada desde cerebro fetal humano, que elimina 345 bases en su secuencia codificante, desde los nucleótidos 482 y 827, originando una proteína de 525 aminoácidos denominada hSVCT2-corto (Lutsenko et al., 2004). Estudios de transporte revelaron que este “SVCT2-corto” corresponde a una proteína no funcional que inhibe fuertemente la función de SVCT2 y en menor grado a SVCT1, actuando como un dominante negativo, probablemente por interacción proteína-proteína. La expresión de SVCT2-corto es variable en una gran cantidad de células, teniendo un alto nivel de expresión en células incapaces de transportar ácido ascórbico, como las células de leucemia humana HL-60 (Lutsenko et al., 2004).

SVCT1 ha sido descrito como un transportador expresado principalmente en células epiteliales absortivas como las del intestino, riñón, porción S3 del túbulo proximal, hígado y glándula lacrimal, entre otros (Lee et al., 2006; Takanaga et al., 2004). Análisis por Northern blot revelaron también la expresión en próstata, ovario, páncreas y timo, y por búsqueda en la base de datos de secuencias expresadas (EST), se ha encontrado expresión de SVCT1 en linfocitos B (Wang et al., 2000). SVCT2 ha sido descrito como un transportador de expresión más amplia que SVCT1, por lo que se le ha atribuido una función de protección contra el estrés oxidativo y como fuente de vitamina C en reacciones enzimáticas dependientes de metaloenzimas. El mRNA para SVCT2 ha sido detectado en cerebro, ojo, placenta, líneas celulares de origen osteoblástico, condrocitos, tejido neuroendocrino, exocrino, retina, cerebro, glándula pineal, tejido adiposo, piel, linfocitos T activados, útero y tejido endotelial (Tsukaguchi et al., 1999; Takanaga et al., 2004). La expresión de SVCT2 en cerebro parece estar ligada a sitios donde

hay gran acumulación de neuronas, aunque también se ha detectado en otras células del cerebro como tanicitos hipocampales (García et al., 2005).

Estudios de localización subcelular han revelado que SVCT1 es expresado preferencialmente en la superficie apical en líneas celulares epiteliales polarizadas tales como MDCK (células de riñón de perro) y CaCo-2 (células de cáncer de colon humano), mientras que SVCT2 se expresa principalmente en la membrana basolateral (Boyer et al., 2005). Esta distribución diferencial de SVCT1 y SVCT2 sugiere que a pesar de que ambos transportadores son expresados en una misma célula, su función no es redundante. Funcionalmente, la expresión de SVCT1 está relacionada con una mayor actividad de transporte en la membrana apical, en cambio la expresión de SVCT2 sólo incrementa el transporte de ácido ascórbico bajo condiciones en la que la membrana basolateral está expuesta. En el caso de SVCT1, esta distribución preferentemente apical parece estar determinada por una región que comprende los residuos entre la posición 563 y 572 (PICPVFKGFS) que corresponde a la región específica de exportación a la membrana apical de SVCT1, la cual posee un motivo de vuelta β conservado en otros cotransportadores Na^+ /sustrato, los que se distribuyen apicalmente en forma similar a SVCT1 (Subramanian et al., 2004). En el caso de SVCT2, su localización preferentemente basolateral está determinada por un pequeña secuencia presente en su región amino terminal que involucra los residuos 55-59 (ELMAI) los cuales inducen un cambio de localización desde la membrana basolateral hacia la membrana apical cuando son delecionados de la secuencia de SVCT2 expresado en células polarizadas MDCK (Kuo et al., 2013).

La generación de ratones knockout para SVCT1 y SVCT2 ha entregado bastante información acerca de las funciones fisiológicas de ambos transportadores. Los ratones knockout para SVCT1 (SLC23a1^{-/-}) son viables y su crecimiento es similar a lo observado para el ratón silvestre. La concentración plasmática de vitamina C en el knockout para SVCT1 está disminuida entre un 30-50% con respecto al animal control y la pérdida de ácido ascórbico a través de la orina es aproximadamente tres veces mayor, resultando en una disminución de la disponibilidad de ácido ascórbico para los tejidos. Pese a lo anterior, no se observaron cambios en la concentración de vitamina C en tejido neuronal, aunque en otros tejidos la acumulación de vitamina C si se ve afectada por la disminución a nivel plasmático (Corpe et al., 2010). En consecuencia, aunque el ratón no dependa de la absorción intestinal de vitamina C ya que es capaz de sintetizarla a nivel hepático, SVCT1 cumple un rol crucial en la mantención de los niveles normales de vitamina C, principalmente participando en su reabsorción renal.

A diferencia del knockout para SVCT1, el knockout para SVCT2 (SLC23a2^{-/-}) es letal, los ratones muestran un desarrollo uterino normal, pero mueren minutos después de haber nacido (Sotiriou et al., 2002). Aunque la causa de muerte no fue determinada, los ratones SLC23a2^{-/-} mostraron evidencia de hemorragia cerebral intraparenquimal y falla respiratoria. Los pulmones de estos ratones presentan notorios signos que indican que no hubo expansión de los alvéolos al nacer, a pesar de que la concentración de surfactante se encontró a niveles normales (Sotiriou et al., 2002). Los niveles de ácido ascórbico fueron indetectables en tejidos como cerebro, glándula adrenal, páncreas y pituitaria y fueron reducidos en hígado, riñón y músculo, comparados con el ratón silvestre

(Sotiriou et al., 2002). La concentración de vitamina C en el plasma también fue reducida, sugiriendo que SVCT2 juega un papel importante en el flujo de vitamina C en la barrera placentaria y en la transferencia transplacental de vitamina C desde la madre a la circulación fetal, confirmando la importancia del requerimiento de vitamina C en el período perinatal. En los ratones, la síntesis de vitamina C comienza en una etapa tardía de la gestación, por lo que toma gran importancia la expresión de SVCT2 para el transporte transplacental de vitamina C. Esto es más importante aún en organismos que no la sintetizan, como los humanos, ya que la adquisición por parte del feto depende absolutamente de la madre.

Respecto a la regulación de la expresión de los transportadores SVCT, parece ser que los niveles intracelulares de ácido ascórbico son un importante regulador del nivel de expresión de los mismos. La corteza cerebral y cerebelo de embriones de ratón en etapas tanto tempranas como tardías del desarrollo, presentan altos niveles de vitamina C intracelular a pesar de los bajos niveles de proteína y mRNA para SVCT2 (Buzle et al., 2012). Durante el crecimiento del animal, los niveles de vitamina C disminuyen mientras los niveles de mRNA y proteínas de SVCT2 aumentan. Por otro lado, en ratones transgénicos que no sintetizan vitamina C, la depleción de ácido ascórbico conduce a un aumento de los niveles de mRNA y proteína tanto para SVCT1 como para SVCT2 en hígado, mRNA de SVCT1 en intestino delgado, y proteína para SVCT2 en cerebelo (Buzle et al., 2012). Más aún, la capacidad de captación de ácido ascórbico de hepatocitos derivados de ratón que no sintetizan vitamina C está aumentada comparada con la captación de hepatocitos derivados de un ratón silvestre (Amano et al., 2010).

La expresión de SVCT2 parece estar influenciada además por la activación de la vía de señalización intracelular inducida por proteína quinasa C (PKC). El uso de un activador de esta vía, como forbol 12-miristato-13-acetato (PMA), produce una disminución de la captación de ácido ascórbico debido a la internalización del transportador SVCT1 (Liang et al., 2002). Entre los transportadores de ácido ascórbico, este mecanismo de regulación es altamente específico para SVCT1, ya que SVCT2 no es afectado por activación de esta vía de señalización intracelular. Adicionalmente, otras vías también parecen modular la actividad de los transportadores de ácido ascórbico, tales como la activación de la vía de señalización iniciada por PKA, inhibición de vías conducidas por proteínas tirosina kinasa o el complejo Ca^{2+} /calmodulina que resultan en una disminución significativa de la captación de ácido ascórbico (Wu et al., 2007).

6.4. Estructura y propiedades funcionales de los transportadores SVCT.

Existe muy poca información publicada respecto a la estructura de los transportadores SVCT, siendo la gran mayoría proveniente del análisis de la secuencia primaria a través de modelos diseñados en base a perfiles de hidrofobicidad. Estos modelos muestran una posible estructura secundaria para ambos transportadores que consta 12 hélices de transmembrana, con los extremos amino y carboxilo terminal del transportador localizados en el lado citoplasmático de la membrana celular (Faaland et al., 1998; Liang et al., 2001). Recientemente, la cristalización del transportador de uracilo de E.coli, UraA, ha permitido generar un modelo por difracción de rayos X que presenta 14 segmentos

transmembrana (STM) en este transportador, modelo que sería homologable al resto de los miembros de la familia NAT, entre ellos los SVCT. SVCT1 y SVCT2 son proteínas constituidas por 598 y 650 aminoácidos, respectivamente, y una comparación de su secuencia primaria revela una identidad superior al 65%, con el mayor grado de identidad aminoacídica presente a nivel de las hélices de transmembrana (Figura 2). La homología entre ambos transportadores alcanza un 85%, encontrándose las mayores diferencias de secuencia entre SVCT1 y SVCT2 a nivel de los extremos amino y carboxilo terminal y en la región que en estos modelos corresponde al lazo exofacial que une los STM III y IV (Figura 2). Basado en análisis de bases de datos genómicos, se han identificado dos secuencias relacionadas a estos transportadores, denominadas SLC23A3 y SLC23A4. SLC23A4 exhibe un 50-55% de identidad con SVCT1 y SVCT2, mientras SLC23A3 sólo comparte alrededor de un 24% de identidad, codificando ambos a proteínas huérfanas, cuya función no ha sido determinada (Takanaga et al., 2004).

Los transportadores SVCT poseen varios residuos relevantes para su función. En este sentido, el lazo extracelular entre los STM VII y VIII contiene una serie de residuos de prolina altamente conservados, para los que se ha propuesto un papel importante en la mantención de la estabilidad de la estructura y en la eficiencia de transporte, ya que podrían estar involucrados en la unión y posterior translocación de ácido ascórbico (Liang et al., 2001). Además, se cree que residuos de prolina, conservados entre SVCT1 y SVCT2 y localizados en hélices transmembrana, podrían jugar un papel importante en determinar un correcto plegamiento de la proteína. Por otro lado, un análisis estructural de SVCT1 humano purificado desde membranas de ovocitos de *X. laevis* a través de

microscopía electrónica y uso de agentes entrecruzadores, indican que SVCT1 posee un estado de oligomerización mixto entre monómero y homodímero (Boggavarapu et al., 2013). En el caso de SVCT2, no existe información respecto al estado de oligomerización del transportador.

Tanto SVCT1 como SVCT2 poseen potenciales sitios de N-glicosilación en su región extracelular. Estos son los residuos N138, N144 y N230 para SVCT1 y residuos N188 y N196 para SVCT2 (Figura 2) (Subramanian et al., 2008; Velho et al., 2009). Mutagénesis de los residuos N188 y N196 de SVCT2 revelaron que la glicosilación del transportador es importante para su actividad y no es requerida para su tráfico hacia la membrana plasmática (Subramanian et al., 2008).

Análisis de la secuencia primaria de SVCT1 y SVCT2 revela la presencia de cinco potenciales sitios para fosforilación por proteína quinasa C (PKC), los que actuarían como posibles sitios de regulación post-traducciona (Daruwala et al., 1999) (Figura 2). Estos sitios están localizados preferentemente hacia la región de la cola carboxilo terminal en SVCT1 (T15, S396, S454, S540 y S574) (Wang et al., 1999), o a lo largo de toda la proteína en SVCT2 (T9, S299, S455, S513 y T629) (Rajan et al., 1999). Además, se ha encontrado un posible sitio de fosforilación por proteína quinasa A presente en el extremo carboxilo terminal de SVCT1, pero ausente en SVCT2, sugiriendo una regulación diferente para cada una de estas proteínas (Liang et al., 2001).

Los transportadores SVCT median la captación de ácido ascórbico con alta afinidad, de manera concentrativa, estereoespecífica y dirigida por el gradiente electroquímico del sodio (Tsukaguchi et al., 1999; Liang et al., 2001). En este

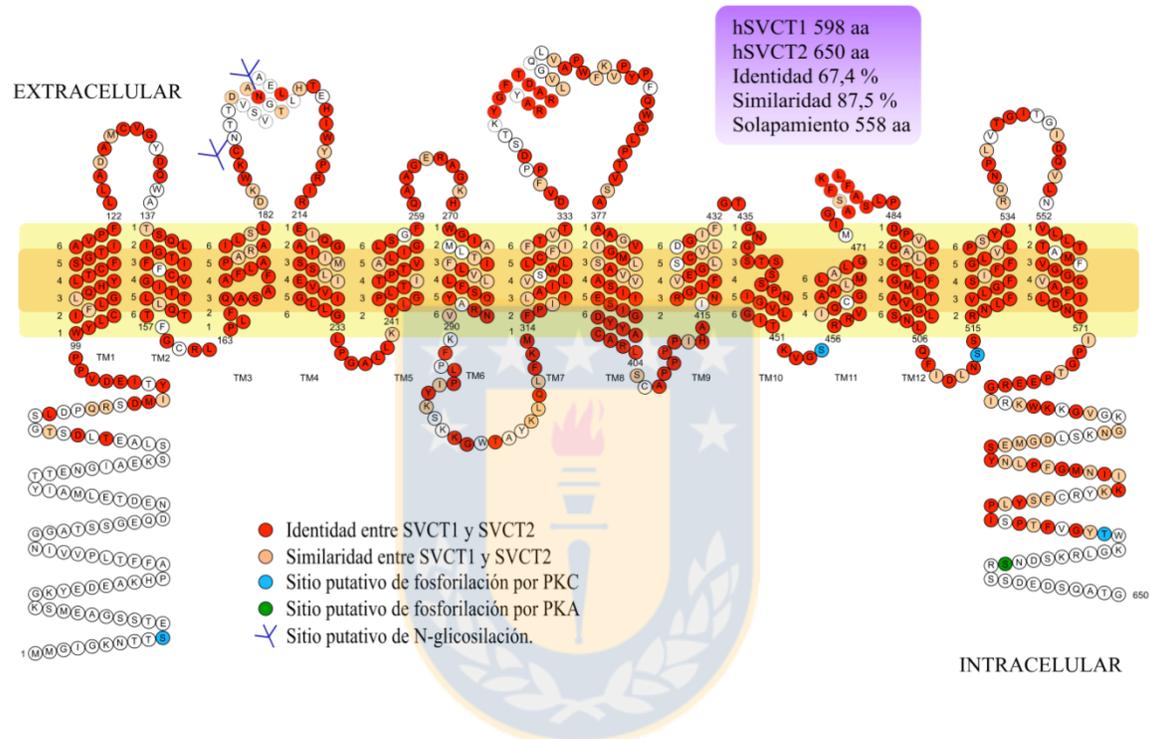


Figura 2. Modelo propuesto para la estructura secundaria de los transportadores de ácido ascórbico SVCT. Se muestra la secuencia de aminoácidos de SVCT2 y la estructura secundaria propuesta a partir de su perfil de hidrofobicidad, en comparación con SVCT1. Los residuos de aminoácidos coloreados en rojo corresponden a aquellos idénticos en SVCT1 y SVCT2, y los de color naranja indican los residuos similares entre ambos transportadores. Los residuos coloreados de celeste corresponden a los sitios de fosforilación por PKC y los de color verde a los sitios de fosforilación por PKA. Además, se indican con un símbolo ramificado azul (Ψ) los sitios de N-glicosilación.

sentido, SVCT1 y SVCT2 muestran una elevada especificidad por el ácido L-ascórbico, siendo incapaces de transportar DHA, ácido D-ascórbico, ácido ascórbico 2-fosfato, ácido ascórbico 2-sulfato y L-gulono- γ -lactona (Tsukaguchi et al., 1999; Rumsey et al., 2000). Las propiedades funcionales de los transportadores SVCT han sido estudiadas en distintos tipos celulares y utilizando diferentes sistemas de expresión. Ensayos de transporte, realizados tanto en SVCT1 como en SVCT2, revelaron que la curva de saturación para ácido ascórbico es de tipo hiperbólica, concordante con una cinética de tipo Michaeliana (Daruwala et al., 1999; Rajan et al., 1999; Tsukaguchi et al., 1999). Estudios de transporte realizados en distintos tipos celulares coinciden en que SVCT2 presenta un valor para la K_m de transporte de ácido ascórbico menor que la de SVCT1. Dependiendo del tipo celular y el sistema de expresión utilizado, para SVCT1 los valores de K_m varían entre 75-250 μ M, mientras que para SVCT2 están entre 8-60 μ M (Savini et al., 2008). Concordante con esto, estudios realizados en nuestro laboratorio en al menos diez sistemas celulares distintos indican que la K_m de transporte de ácido ascórbico para SVCT1 se encuentra dentro de un rango de 80-200 μ M, mientras que para SVCT2 está alrededor de 20-30 μ M.

El ácido ascórbico es transportado en contra de su gradiente de concentración, por lo que el proceso se realiza gracias al transporte simultáneo de sodio a favor de su gradiente de concentración, el que es mantenido por la continua salida de sodio a través de la ATPasa Na^+/K^+ en la membrana plasmática (García et al., 2005). Una característica del transporte de ácido ascórbico mediado por SVCT1 y SVCT2 que ha quedado claramente establecida es que la presencia de iones sodio en el medio extracelular produce una marcada activación del

transporte de ácido ascórbico (Daruwala et al., 1999; Rajan et al., 1999; Tsukaguchi et al., 1999; Wang et al., 1999; Wang et al., 2000; Godoy et al., 2007; Ormazabal et al., 2010). La activación por sodio es altamente específica, ya que otros cationes monovalentes tales como K^+ , Li^+ , NH_4^+ y Cs^+ son incapaces de activar el transporte de ácido ascórbico (Liang et al., 2001; Godoy et al., 2007).

La curva de dependencia del transporte de ácido ascórbico en función de la concentración de sodio extracelular es sigmoideal, con un coeficiente de Hill (nH) cercano a 2. Estos resultados indican que el sodio activa en forma cooperativa el transporte de ácido ascórbico y sugieren la presencia de al menos dos sitios de unión a sodio distinguibles funcionalmente (Rajan et al., 1999; Tsukaguchi et al., 1999; Godoy et al., 2007). Ensayos de transporte en los cuales se varió las concentraciones de sodio extracelular revelaron la importancia de este ión en el transporte de ácido ascórbico, indicando que la K_m para SVCT2 disminuye desde aproximadamente 2 mM hasta 15 μ M cuando el Na^+ aumenta de 5 a 135 mM, sin alterar mayormente la V_{max} de transporte (Godoy et al., 2007). Este efecto podría sugerir que la unión de Na^+ al transportador favorece cambios conformacionales que promueven un aumento en la afinidad para el transporte de ácido ascórbico.

SVCT1 y SVCT2 transportan ácido ascórbico y Na^+ con una estequiometría de transporte de 1:2, respectivamente, siendo ambos sustratos translocados en forma simultánea, proponiéndose un orden de unión de los sustratos de Na^+ :ácido ascórbico: Na^+ (Godoy et al., 2007; Mackenzie et al., 2008). Se ha demostrado que el mecanismo de transporte es electrogénico para SVCT1, con un movimiento neto de una carga positiva hacia el interior de la célula (Mackenzie et al., 2008; Tsukaguchi et al., 1999), pero no para SVCT2 (Godoy et al., 2007). Sin embargo,

el mecanismo por el cual SVCT2 no es electrogénico, a pesar de que transporta dos iones sodio por molécula de ácido ascórbico es desconocido. La respuesta podría estar en el transporte de algún anión junto con los sustratos ya conocidos o la salida de algún catión durante la etapa final de cada ciclo de transporte.

Se ha descrito que los transportadores SVCT muestran una marcada sensibilidad a la presencia o ausencia de los cationes bivalentes calcio y magnesio. (Godoy et al., 2007). Así, se demostró que el transporte de ácido ascórbico mediado tanto por SVCT1 y SVCT2, además de presentar dependencia de la presencia del ión Na^+ , muestra también dependencia de Ca^{2+} y Mg^{2+} . En este sentido, el transportador SVCT2 es completamente funcional en ausencia de Ca^{2+} o Mg^{2+} , sin embargo, en ausencia simultánea de ambos cationes el transporte es prácticamente nulo (Godoy et al., 2007). Por último, se ha descrito que SVCT2 presenta una marcada dependencia del pH extracelular, observándose una marcada disminución en su actividad de transporte a pH bajo 6.5 (Tsukaguchi et al., 1999; Godoy et al., 2007). Estudios de mutagénesis sitio dirigida y tratamiento con dietilpirocarbonato (DEPC) han revelado que cinco (H109, H203, H206, H269 y H413) de los seis residuos de histidina que forman parte de la estructura del transportador son reguladores centrales de la función de SVCT2 y participan en diferentes grados modulando la sensibilidad al pH, la cinética de transporte, la cooperatividad por Na^+ , la estabilidad conformacional y la localización subcelular (Varma et al., 2008; Ormazabal et al., 2010).

6.5. Vitamina C en organelos y compartimentos subcelulares.

El transporte de vitamina C ha sido un fenómeno ampliamente descrito a nivel de membrana plasmática. Los mecanismos de captación han sido exhaustivamente investigados, tanto en modelos animales, como en plantas y levaduras (Szarka et al., 2004; Wilson, 2005; Rivas et al., 2008). Sin embargo, es poco lo que se conoce con respecto al transporte subcelular de vitamina C. De hecho, los transportadores de vitamina C de ubicación intracelular se asocian generalmente a fenómenos de redistribución, que permiten regular la captación de solutos a nivel de membrana, sin poner atención en el papel que podrían jugar a nivel de organelos (Joost et al., 2002; Zorzano et al., 2005). La relevancia de este fenómeno es mayor cuando se toma en cuenta que en los organismos que son capaces de sintetizar vitamina C, esta biosíntesis es llevada a cabo dentro de compartimentos intracelulares. En el caso del modelo animal, la síntesis ocurre mediada por la enzima gulono-lactona-oxidasa de localización microsomal (Brush & May, 1966); en plantas la síntesis es mediada por la enzima galactono-lactona-deshidrogenasa, de ubicación mitocondrial (Oba et al., 1995); y en levaduras es llevada a cabo por la enzima arabino-lactona-oxidasa que también presenta ubicación mitocondrial (Huh et al., 1994).

Por otro lado, estudios de detección de ácido ascórbico por HPLC en células cromafines adrenomedulares productoras de catecolaminas, han evidenciado que el ácido ascórbico se encontraría altamente compartimentalizado a nivel intracelular, almacenándose principalmente en vesículas cromafines productoras de catecolaminas (Daniels et al., 1983; Diliberto et al., 1983). En este

sentido, se sabe que en estas vesículas el ácido ascórbico participa como cofactor de la enzima dopamina β -hidroxilasa, que cataliza la hidroxilación de dopamina a epinefrina (Friedman and Kaufman, 1965). Por otro lado, el ácido ascórbico participa como cofactor enzimático en la hidroxilación de prolina a hidroxiprolina, reacción que es catalizada por la enzima prolil hidroxilasa. Esta reacción enzimática es un paso previo para la síntesis de colágeno en fibroblastos, y se realiza exclusivamente en el lumen del retículo endoplásmico (Al-Adnani et al., 1974). Otro rol esencial de la vitamina C está relacionado con sus funciones en la homeostasis redox. Debido a que la respiración oxidativa en la mitocondria es la principal fuente de producción de ROS dentro de la célula, la presencia de vitamina C en este organelo debería ser fundamental (Bánhegyi et al., 2014). Asimismo, la generación de ROS durante el plegamiento oxidativo de proteínas en el retículo endoplásmico, sugiere un importante rol de este nutriente en la mantención del equilibrio redox intraluminal (Mandl et al., 2009).

Los antecedentes recién descritos ponen de manifiesto la necesidad de las células de contar con sistemas de transporte de vitamina C a nivel intracelular, que faciliten los procesos de compartimentalización de este nutriente en organelos específicos. Así, en relación a estudios funcionales de transporte y reciclaje de vitamina C en organelos, los datos provienen de pocos grupos de investigación.

En lo que se refiere específicamente al retículo endoplásmico, a pesar de la evidencia que establece la importancia del ácido ascórbico a nivel intraluminal, a la fecha no se ha caracterizado molecularmente en este organelo algún transportador relacionado a los SVCT. Existe sin embargo, evidencia mostrando la capacidad del retículo endoplásmico de adquirir vitamina C en su forma oxidada,

como DHA. Estos estudios fueron realizados en microsomas provenientes de hígado de rata, por un mismo grupo de investigación (Bánhegyi et al., 1998; Csala et al., 2000; Szarka et al., 2002). Inicialmente, ensayos funcionales mostraron una captación preferencial de los microsomas por DHA, proceso que fue mediado por un transportador funcionalmente similar a los GLUT. Sin embargo, la identidad molecular de este transportador no fue elucidada (Bánhegyi et al., 1998). En esta misma línea, se observó que el ácido ascórbico difícilmente atraviesa la membrana del retículo endoplásmico, y que su oxidación a DHA es un requisito para el transporte (Csala et al., 2000). Por último, se reportó una actividad ascorbato oxidasa asociada al retículo endoplásmico, la que podría ser un posible promotor de la captación de DHA (Szarka et al., 2002).

En cuanto a trabajos realizados en plantas, existen estudios que indican que los cloroplastos de células de espinaca son capaces de captar vitamina C (Beck et al., 1983). Además, se ha demostrado que estos organelos son capaces de transportar glucosa, y los datos obtenidos permiten concluir que el transportador involucrado en esta captación estaría estrechamente relacionado a la familia de transportadores GLUT presentes en animales (Weber et al., 2000).

Otro punto a destacar es el rol de la vitamina C a nivel nuclear y la regulación de la expresión génica. En este sentido, el ácido ascórbico no sólo permite la hidroxilación de colágeno, sino que también aumenta la transcripción del mRNA para procolágeno, lo que es interpretado como un efecto estabilizador de la vitamina C sobre algunos transcritos (Bánhegyi et al., 2014). Además, este nutriente puede regular la actividad de una variedad de enzimas involucradas en reacciones epigenéticas importantes, como la demetilación e hidroxilación de

histonas. Por último, el tratamiento con ácido ascórbico activa genes involucrados en la neurogénesis en células madres embrionarias y afecta a un gran número de genes en fibroblastos en cultivo (Bánhegyi et al., 2014). A pesar de esta clara evidencia funcional de la vitamina C en el núcleo, no existen datos referidos a transportadores a nivel de este organelo. Aunque no se puede excluir que este nutriente ingrese directamente desde el citosol a través de los poros nucleares, se podría especular sobre la entrada al núcleo de vitamina C presente en la envoltura nuclear, que es un subdominio del retículo endoplásmico. Esto podría ser principalmente efectivo en especies capaces de sintetizar vitamina C en este organelo, de manera que la captación nuclear de este nutriente podría estar mediada por los mismos transportadores tipo GLUT propuestos para el retículo endoplásmico (Bánhegyi et al., 1998; Csala et al., 2000; Szarka et al., 2002).

6.6. Transporte de vitamina C en la mitocondria.

Como fue mencionado anteriormente, la mitocondria es el principal organelo generador de ROS como productos secundarios del proceso normal de respiración celular, por lo que la presencia de antioxidantes como la vitamina C a nivel mitocondrial es crucial para la neutralización efectiva de estas especies (KC et al., 2005; Lee et al., 2010). Las ROS producidas en la mitocondria pueden comprometer la integridad de las membranas de este organelo y producir serios daños a nivel del DNA mitocondrial (mtDNA) (Orrenius et al., 2007), el que codifica para proteínas indispensables en el funcionamiento de la cadena respiratoria y la producción de ATP (Anderson et al., 1981).

A pesar de la importancia fundamental del metabolismo redox mitocondrial bajo condiciones normales y patológicas, el transporte de vitamina C en la mitocondria es un tema que permanece confuso, con información controversial en cuanto a los transportadores involucrados. Aunque las primeras evidencias en relación a la captación de vitamina C mitocondrial fueron reportadas hace más de treinta años (Ingebretsen & Normann, 1982, Fujimoto et al., 1982), muchos detalles del transporte han sido descritos en el último tiempo. Los primeros trabajos provienen del estudio de mitocondrias procedentes de hígado de rata (Fujimoto et al., 1982) y de hígado de cobayo (Ingebretsen & Normann, 1982). En ambos trabajos se demostró que la acumulación de ácido ascórbico mitocondrial puede ser incrementada con la suplementación de vitamina C en la dieta. Sin embargo, los autores no asociaron la captación de este nutriente a un transportador específico (Fujimoto et al., 1982; Ingebretsen & Normann, 1982). Varios autores han propuesto que la vitamina C es ingresada a la mitocondria en su forma oxidada, como DHA, para ser inmediatamente reducida y acumulada como ácido ascórbico (Xu & Wells., 1996; Li et al., 2001; Li et al., 2002; May et al., 2007), lo que propone la existencia de un sistema de reciclamiento de vitamina C mitocondrial similar al encontrado en el citosol después de su captación a nivel de membrana plasmática (Nualart et al., 2003). Estos estudios, realizados en mitocondrias obtenidas de hígado o músculo de rata, sugieren que la reducción del DHA intramitocondrial estaría mediado principalmente por glutatión, y en una menor medida por tioredoxina reductasa (Li et al., 2001) o ácido α -lipoico (Xu & Wells., 1996). Además, la participación de la cadena transportadora de electrones

en la reducción de DHA también fue sugerida, involucrando específicamente al complejo III mitocondrial (Li et al., 2002).

El único trabajo reportado en plantas utilizó como modelo células de tabaco, indicando que las mitocondrias de células vegetales son capaces de transportar la forma oxidada de la vitamina C, el DHA (Szarka et al., 2004). Por medio de ensayos de inhibición, estos estudios propusieron que un mismo transportador mediaría la captación mitocondrial de glucosa y DHA en estas células (Szarka et al., 2004). Siguiendo esta línea, dos trabajos han postulado a los transportadores GLUT como los responsables de la captación mitocondrial de vitamina C. Por una parte, un estudio realizado en fibroblastos de ratón y otras líneas celulares humanas proponen que GLUT1 sería el responsable del transporte de DHA en la mitocondria (KC et al., 2005), mientras que estudios en células musculares de aorta de ratón atribuyen el proceso de captación de DHA al transportador GLUT10 (Lee et al., 2010). La acumulación de ácido ascórbico intramitocondrial redujo los niveles de ROS en el organelo, previniendo el daño al mtDNA y la depolarización de la membrana mitocondrial frente a estrés oxidativo (KC et al., 2005; Lee et al., 2010).

La evidencia recién descrita propone que la vitamina C es transportada hacia el interior de la mitocondria en su forma oxidada. Sin embargo, aun cuando la vitamina C puede ingresar a la célula como DHA, la forma en la que se acumula en el medio intracelular es como ácido ascórbico, debido a la eficiente actividad de las deshidroascorbato reductasas intracelulares (Rivas et al., 2008). Por esta razón, sería esperable encontrar la presencia de transportadores SVCT a nivel intracelular, y en consecuencia en la mitocondria. Particularmente, la expresión

intracelular del transportador SVCT2 es un fenómeno que no ha sido considerado ni discutido, a pesar de la evidencia obtenida en los últimos años por medio de ensayos de inmunolocalización. En este sentido, el transportador SVCT2 ha sido descrito en varios tipos celulares como un transportador de membrana plasmática que media la captación de ácido ascórbico desde el medio extracelular hacia el interior de la célula. Sin embargo, cuando se analizan las imágenes para la inmunolocalización de SVCT2 publicadas en estos trabajos, en los cuales se asume la localización a nivel de membrana plasmática del transportador, es posible observar que la tinción anti-SVCT2 se distribuye principalmente a nivel intracelular (García et al., 2005; Godoy et al., 2007; Angulo et al., 2008; Caprile et al., 2009; Gess et al., 2010; Nualart et al., 2012; Hong et al., 2012; Fulzele et al., 2013). Apoyando esta evidencia, un trabajo reciente describió la localización mitocondrial del transportador SVCT2 en una línea celular de leucemia humana, y la capacidad de mitocondrias aisladas de estas células de transportar ácido ascórbico (Azzolini et al., 2013). Interesantemente, estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente en nuestro laboratorio en varias líneas celulares de cáncer de mama. Estudios funcionales han mostrado que mientras estas células adquieren la forma oxidada de la vitamina C a través de los transportadores GLUT, no son capaces de transportar ácido ascórbico (Rivas, 2003). Consecuentemente con los experimentos de transporte, ensayos de inmunocitoquímica para detectar la presencia de los transportadores SVCT han indicado ausencia de SVCT1 en estas células. Además, a pesar de observar una marcada expresión de SVCT2, su distribución es completamente intracelular, no observándose presencia del transportador a nivel de membrana plasmática

(Maurin, 2005). Más importante aún, estudios de colocalización por inmunofluorescencia y microscopía confocal indicaron que el transportador SVCT2 se localiza principalmente a nivel mitocondrial en estas líneas celulares de cáncer mamario (Muñoz, 2009). Este hallazgo es totalmente consistente con la localización mitocondrial de SVCT2 descrita en células de leucemia (Azzolini et al., 2013). Además, estos resultados concuerdan claramente con lo observado en las imágenes de inmunolocalización para SVCT2 disponibles en literatura, que ya indicaban una marcada presencia del transportador a nivel intracelular.



7. PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN

El proceso normal de respiración oxidativa en la mitocondria es la principal fuente de generación de ROS dentro de la célula. Estos agentes oxidantes pueden producir serios daños al genoma mitocondrial y las membranas del organelo, por lo que la presencia de antioxidantes como la vitamina C ayudan a mantener la integridad y el metabolismo de la mitocondria. La escasa evidencia existente en relación a la captación mitocondrial de vitamina C sugiere que este nutriente ingresa a la mitocondria como DHA, proponiendo a GLUT1 y GLUT10 como posibles transportadores mitocondriales de vitamina C. Sin embargo, la forma en la que se acumula la vitamina C en el medio intracelular es como ácido ascórbico, por lo que la pregunta que surge inmediatamente es si existen transportadores SVCT involucrados en la captación de vitamina C en la mitocondria. Esta interrogante puede ser abordada en base a la evidencia descrita en literatura indicando que el transportador SVCT2 se distribuye principalmente a nivel intracelular en distintos modelos celulares. Más importante aún, resultados previos de nuestro laboratorio revelaron la localización mitocondrial de SVCT2 en varias líneas celulares de cáncer de mama, lo que fue corroborado recientemente en una línea celular de leucemia humana por otro grupo de investigación. En base a esta evidencia, la propuesta central de este trabajo es que SVCT2, clásicamente descrito como un transportador de membrana plasmática, se localiza principalmente a nivel mitocondrial y es el responsable del transporte de ácido ascórbico en este organelo.

Adicionalmente, otras preguntas que derivan de esta propuesta son: ¿Cuál es la localización submitocondrial específica del transportador SVCT2? ¿Cuál es el comportamiento funcional y cinético de este transportador en la mitocondria? ¿Participan efectivamente los transportadores GLUT en el transporte mitocondrial de vitamina C?

Para resolver estas interrogantes utilizaremos como modelo experimental la línea celular HEK-293, debido principalmente a dos razones. Primero, estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio indicaron que estas células expresan el transportador SVCT2, el que se distribuye predominantemente a nivel intracelular. Por otro lado, las células HEK-293 han mostrado ser una línea fácilmente transfectable, obteniéndose eficiencias de transfección superiores al 80%, lo que permite realizar una gran variedad de ensayos que incluyen el silenciamiento y sobreexpresión de proteínas.

En definitiva, en base a los antecedentes recién descritos, en este trabajo nos propusimos establecer la localización mitocondrial del transportador SVCT2 en las células HEK-293 y definir su localización submitocondrial específica. Además, se pretende determinar si SVCT2 mitocondrial es un transportador funcional y caracterizar las propiedades cinéticas del transporte de ácido ascórbico en la mitocondria. Por último, nos propusimos estudiar la participación de otros transportadores en la captación mitocondrial de vitamina C, específicamente SVCT1, GLUT1 y GLUT10.

8. HIPÓTESIS

El transportador SVCT2, clásicamente descrito como un transportador de membrana plasmática, se localiza en la mitocondria donde media la captación de ácido ascórbico.



9. OBJETIVOS

9.1. Objetivo General

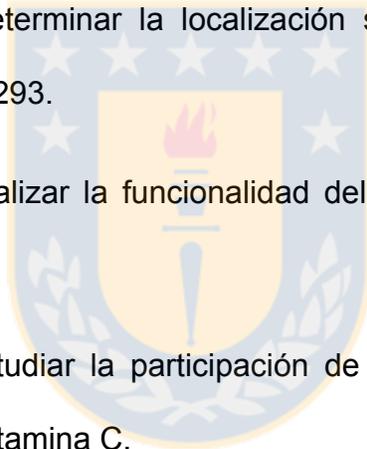
La finalidad de este trabajo es estudiar la expresión y funcionalidad del transportador de ácido ascórbico SVCT2 a nivel mitocondrial, utilizando como modelo la línea celular HEK-293.

9.2. Objetivos Específicos

Objetivo específico 1. Determinar la localización subcelular del transportador SVCT2 en las células HEK-293.

Objetivo específico 2. Analizar la funcionalidad del transportador SVCT2 en la mitocondria.

Objetivo específico 3. Estudiar la participación de otros transportadores en la captación mitocondrial de vitamina C.



10. MATERIALES Y MÉTODOS

10.1. Cultivo celular.

Para el desarrollo de este trabajo se utilizó principalmente la línea celular embrionaria de riñón humano HEK-293, además de las siguientes líneas celulares humanas de distinto origen: células de melanoma GMEL, células endoteliales de microvasculatura cerebral HBMEC, células de vejiga ECV-304, células de cáncer de colon CaCo-2, células de cáncer de próstata DU-145, células de cáncer cérvico uterino HeLa, y las células de cáncer de mama ZR-75 y MDA-231. Por otro lado, también se utilizaron las células endoteliales de vena umbilical HUVEC, las que fueron gentilmente cedidas por el Dr. Marcelo González (Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción) después de obtenerlas desde cordones umbilicales de pacientes sanos. Las distintas células fueron cultivadas con medio RPMI o DMEM, suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 10% (v/v) y los antibióticos penicilina/estreptomicina (P/E) (100 U/ml). Las condiciones de cultivo fueron de una atmósfera de 5% de CO₂ a 37° C, realizando cambio de medio cada 48 horas.

10.2. Transporte de ácido ascórbico en cultivos celulares.

Para los experimentos de transporte se cultivaron células en placas de 24 pocillos, realizando los ensayos cuando se alcanzó un 80% de confluencia celular. Las células fueron incubadas con medio de transporte extracelular (15 mM HEPES, 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 0,8 mM MgCl₂, 0,1mM DTT; pH 7,4)

conteniendo 10 μM L-[^{14}C]-ácido ascórbico y ácido ascórbico no radioactivo para completar la concentración total requerida según el experimento, a 37°C por el tiempo indicado para cada ensayo. Para detener el transporte se agregó un exceso de tampón de detención (0,2 mM HgCl_2 , 15 mM Hepes, 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 0,8 mM MgSO_4 , pH 7,4) a 4°C. Para determinar la radioactividad asociada a la incorporación del sustrato marcado, las células se lisaron con 200 μL de tampón de lisis (10 mM Tris-HCl, 0,4% SDS; pH 8,0), dejándolas en agitación constante durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, cada muestra fue transferida a viales de centelleo conteniendo 800 μL de líquido de centelleo (Ecoscint) y se determinó la radioactividad en un contador de centelleo líquido (LS 6500 Liquid Scintillation Counting System, Beckman). Para los experimentos en ausencia de Na^+ extracelular, el NaCl de la solución de transporte fue reemplazado por cloruro de colina (Sigma). Los datos de transporte obtenidos fueron procesados utilizando el programa IgorPro.

10.3. Ensayos de RT-PCR.

Se realizó extracción de RNA total desde células en cultivo, utilizando el kit Absolutely RNA® Miniprep kit (Stratagene). El RNA extraído fue cuantificado por absorciometría en un espectrofotómetro Agilent 8453 y se evaluó la integridad del RNA por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. La síntesis de cDNA se realizó utilizando el kit de transcripción reversa AffinityScript™ Multiple Temperature Reverse Transcriptase (Stratagene). Se realizaron reacciones de PCR convencionales para SVCT1, SVCT2, GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT4, GLUT6,

GLUT8, GLUT10, GLUT12 y β -actina, utilizando el kit Master Mix (BioLabs) y con las siguientes parejas de partidores (Sentido, S y Antisentido, A):

SVCT1:

S: 5'-CCCGCTACCCACAGAGCCTA-3'

A: 5'-AGGAAGGGCACGGCGATGGT-3'

SVCT2:

S: 5'-GACAGCACAAAGTATGGCTT-3'

A: 5'-GTAATTCCCAAACTCCAAT-3'

GLUT1:

S: 5'-CTGCTCATCAACCGCAAC-3'

A: 5'-CTTCTTCTCCCGCATCATCT-3'

GLUT2:

S: 5'-TGTCAGTGGGACTTGTGCTG-3'

A: 5'-GGCCTGGCCCAATTTCAAAG-3'

GLUT3:

S: 5'-CAGCGAGACCCAGAGATG-3'

A: 5'-TTGGAAAGAGCCGATTGTAG-3'

GLUT4:

S: 5'-TGGGCTTCTTCATCTTCACC-3'

A: 5'-GTGCTGGGTTTCACCTCCT-3'

GLUT6:

S: 5'-ATGCCCTGGTCTACACATCC-3'

A: 5'-GAACACGGACCCAAACCA-3'

GLUT8:

S: 5'-GCCAAGTTCAAGGACAGCA-3'

A: 5'-GACCACACCTGACAAGACCA-3'

GLUT10:

S: 5'-TGGTCTTTGTCAGTGCCTTC-3'

A: 5'-GCTCTTCTCGTATCTCCAC-3'

GLUT12:

S: 5'-GGGCATCGTAAATCTCAACA-3'

A: 5'-CCATAAATCACAGACTCATCCA-3'

β -actina:

S: 5'-GCTCGTCGTCGACAACGGCTC-3'

A: 5'-CAAACATGATCTGGGTATCTTCTC-3'



Las condiciones de reacción fueron de 95°C por 1 minuto, seguida por 40 ciclos integrados por: una etapa de denaturación de 95°C por 30 segundos, una etapa de alineamiento de 1 minuto a temperatura variable y una etapa de elongación de 1 minuto a 68°C. La concentración de magnesio de la mezcla de reacción y la temperatura de alineamiento fueron optimizadas para cada par de partidores. La visualización de los productos de PCR fue realizada por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, marcados con bromuro de etidio y observado en un transiluminador FBTN-816 (FisherBiotech).

10.4. Ensayos de inmunofluorescencia.

Para estos ensayos se cultivaron células en placas de 24 pocillos, sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro. Después de 48 horas, las células se fijaron por 20 minutos en una solución de paraformaldehído al 4% preparado en PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄; pH 7,4). Una vez fijadas, las muestras fueron lavadas con PBS y luego permeabilizadas por 10 minutos en Tritón X-100 al 0,1%. Posteriormente, y después de ser lavadas con PBS, las muestras se bloquearon por 1 hora con solución de albúmina de suero bovino (BSA) al 1% preparada en PBS, y luego fueron incubadas por 18 horas con hasta dos anticuerpos primarios simultáneamente diluidos en solución BSA al 1% en PBS. La dilución de los anticuerpos fue optimizada para cada uno de ellos. Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes:

- anti-SVCT1 (sc-9923, cabra, policlonal) Santa Cruz Biotechnology
- anti-SVCT2 (sc-9926, cabra, policlonal) Santa Cruz Biotechnology
- anti-GLUT1 (ab40084, ratón, monoclonal) Abcam

- anti-COXIV (ab-16056, conejo, policlonal) Abcam
- anti-Citocromo C (sc-13561, ratón, monoclonal) Santa Cruz Biotechnology
- anti-TOM20 (sc-11415, conejo, policlonal) Santa Cruz Biotechnology
- anti-PDI (ab2792, ratón, monoclonal) Abcam
- anti-Golgi 58K (ab27043, ratón, monoclonal) Abcam
- anti-LAMP2 (ab25631, ratón, monoclonal) Abcam
- anti-Calnexina (ab31290, ratón, monoclonal) Abcam

La detección se llevó a cabo con anticuerpos secundarios conjugados a los fluoróforos Cy3 y FITC (Jackson) diluïdos 1/1000, incubando durante 2 horas. Finalmente, las muestras fueron lavadas en PBS y luego montadas utilizando el medio de montaje VectaShield (Vector Laboratories), que contiene la tinción DAPI para el marcaje de núcleos.

10.5. Microscopía confocal y de súper resolución.

Para el caso de microscopía confocal, las muestras fueron observadas usando un microscopio de fluorescencia Olympus IX81, con un sistema confocal de disco rotatorio DSU. Las imágenes fueron obtenidas con una cámara Hamamatsu ORCA-R2 controlada por el programa Olympus Xcellence R. Cada muestra fue examinada por sucesivos cortes ópticos (0,2 μm) a lo largo del eje z (z-stack), y las imágenes fueron procesadas aplicando el filtro de deconvolución Wiener incluido en el programa Olympus. Para el caso de los análisis de colocalización, después de la deconvolución, las imágenes fueron procesadas con el programa ImageJ usando el complemento JACoP (Bolte & Cordelieres, 2006). Utilizamos el coeficiente de Pearson como parámetro para medir el grado de colocalización en nuestras muestras.

Para el caso de microscopía de súper resolución, las imágenes por iluminación estructurada (1024x1024x16 bit) fueron obtenidas en el equipo Zeiss SR-SIM, modelo Elyra S1, que está equipado con un láser Diodo DPSS (488 y 561 nm de excitación). Se utilizó el objetivo de 63X/1,4 NA, de inmersión en aceite, con un lente adicional de 1,6X, por lo que el aumento total utilizado fue de 1008X. Se utilizó un filtro de emisión BP 495-575 + LP750 para la selección del canal de fluorescencia asociado a la marca de FITC y un filtro de emisión BP 570-650 + LP750 para la selección del canal de fluorescencia asociado a la marca de Cy3. El computador asociado a la obtención de imágenes de este equipo es una estación de trabajo Z800 (HP) que posee un procesador Intel® Xeon® 5650 (2,7 GHz) con 24 Gb de memoria RAM, y cuenta con una tarjeta gráfica (GPU) ATI FirePro V5800 con 1 Gb de memoria dedicada GDDR5. Para todas las imágenes adquiridas se utilizó una configuración con 5 posiciones de rejilla (28 μm para el láser de 488 nm y 34 μm para el láser de 561 nm) y cuando se realizó z-stack, el espaciamiento entre distintos planos fue de 110 nm.

10.6. Purificación de mitocondrias.

El fraccionamiento subcelular y purificación de mitocondrias se llevó a cabo por centrifugación diferencial y con todos los pasos a 4°C, realizando algunas modificaciones al protocolo descrito por Frezza y colaboradores (Frezza et al., 2007). Estos ensayos se realizaron a partir de cultivos celulares crecidos por 24-48 horas en placas de 100 mm de diámetro. Las células fueron lavadas con PBS frío y luego cosechadas mediante tripsinización. La suspensión obtenida se

trasladó a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 600g por 10 minutos. El sobrenadante fue descartado y el pellet resuspendido en tampón de resuspensión (10 mM Tris-MOPS, 1 mM EGTA/Tris, 0,2 M sacarosa; pH 7,4). Luego, las células fueron transferidas a un homogenizador manual de vidrio (Potter-Elvehjem) y homogenizadas con 30-40 golpes del vástago. El homogenizado resultante (fracción total) fue transferido a un tubo de centrifuga y centrifugado a 600g por 10 minutos (fracción nuclear). Esta centrifugación fue repetida para obtener un sobrenadante con menos contaminación de fracción nuclear. El sobrenadante (fracción citosólica) se recolectó y centrifugó a 7000g por 10 minutos. El sobrenadante resultante fue separado (fracción de retículo endoplásmico), y el pellet lavado con tampón de resuspensión, transferido a un nuevo tubo y centrifugado a 7000g por 10 minutos. El pellet resultante conteniendo mitocondrias purificadas (fracción mitocondrial) se mantuvo a 4°C hasta su utilización. Muestras de cada fracción subcelular fueron almacenadas a -20°C para su posterior análisis por western blot.

La purificación de mitocondrias ultrapuras libres de membranas provenientes de retículo endoplásmico o MAM (Membranas Asociadas a la Mitocondria), se llevó a cabo en un gradiente de Percoll (Sigma-Aldrich) y con todos los pasos a 4°C, realizando algunas modificaciones al protocolo descrito por Wieckowski y colaboradores (Wieckowski et al., 2009). Para esto, fracciones mitocondriales obtenidas por centrifugación diferencial como fue descrito anteriormente, fueron depositadas en un tubo de ultracentrífuga sobre una solución de percoll (225 mM manitol, 25 mM Hepes, 1 mM EGTA, 30% percoll (vol/vol); pH 7,4). Las muestras fueron centrifugadas a 95000g por 30 minutos en

una ultracentrífuga Sorvall WX Ultra 80 (Thermo Scientific). La banda inferior correspondiente a la fracción mitocondrial y la banda superior correspondiente a la fracción de MAM, fueron recolectadas desde la solución de percoll y centrifugadas a 6300g por 10 min. La fracción mitocondrial ultrapura fue obtenida al resuspender el pellet resultante en tampón de resuspensión (250 mM manitol, 5 mM Hepes, 0,5 mM EGTA; pH 7,4) y centrifugarlo a 6300g por 10 minutos. La fracción de MAM pura fue obtenida al recolectar el sobrenadante resultante de la centrifugación previa de esta fracción.

10.7. Generación de mitoplastos.

Los mitoplastos (mitocondrias con la membrana interna intacta y carentes de membrana externa) se obtuvieron utilizando digitonina (Sigma-Aldrich), realizando algunas modificaciones al protocolo descrito por Paterson y colaboradores (Paterson et al., 2007). Para esto, fracciones mitocondriales obtenidas por centrifugación diferencial como fue descrito anteriormente, fueron resuspendidas en tampón de resuspensión (10 mM Tris-MOPS, 1 mM EGTA/Tris, 0,2 M sacarosa; pH 7,4) conteniendo concentraciones crecientes de digitonina (0-1,5 mg/mg proteína) e incubadas por 20 minutos a 4°C. Las muestras fueron centrifugadas a 7000g por 10 minutos y los pellets (mitoplastos) fueron recolectados, resuspendidos en tampón de resuspensión y centrifugados nuevamente a 7000g por 10 minutos.

10.8. Transporte de ácido ascórbico en mitocondrias aisladas.

Para estos ensayos, se utilizaron fracciones mitocondriales obtenidas por centrifugación diferencial como fue descrito anteriormente. Las mitocondrias fueron incubadas con medio de transporte intracelular (15 mM Hepes, 15 mM NaCl, 120 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂; pH 7,4) conteniendo 100 μM L-[¹⁴C]-ácido ascórbico y ácido ascórbico no radioactivo para completar la concentración total requerida según el experimento, a 37°C por el tiempo indicado para cada ensayo. Para detener el transporte se agregó un exceso de tampón de detención (0,2 mM HgCl₂, 15 mM Hepes, 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 0,8 mM MgSO₄, pH 7,4) a 4°C. Las muestras fueron centrifugadas a 7000g por 10 minutos y el sobrenadante fue descartado. Para determinar la radioactividad asociada a la incorporación del sustrato marcado, las mitocondrias se lisaron con 200 μL de tampón de lisis (10 mM Tris-HCl, 0,4% SDS; pH 8,0), dejándolas en agitación constante durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, cada muestra fue transferida a viales de centelleo conteniendo 800 μL de líquido de centelleo (Ecoscint) y se determinó la radioactividad en un contador de centelleo líquido (LS 6500 Liquid Scintillation Counting System, Beckman Coulter).

10.9 Ensayos de western blot.

Para los ensayos en proteínas totales se utilizaron células cultivadas en placas de 6 pocillos. Las células fueron lisadas con buffer RIPA (ThermoFisher Scientific) (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1%NP-40, 0,5% desoxicolato de sodio, 0,1% SDS; pH 7,4) conteniendo un coctel de inhibidores de proteasas. La

concentración de proteínas de las muestras fue cuantificada utilizando un kit de ensayo de BCA (Bicinchoninic Acid, Thermo Scientific). Para los ensayos en proteínas mitocondriales y fracciones subcelulares, las muestras también fueron cuantificadas con el kit de BCA previo al análisis por western blot.

Para la electroforesis, un gel separador y otro espaciador fueron puestos en la cámara de electroforesis (BioRad) y se sumergieron en tampón de corrida Tris-glicina. Las muestras fueron diluidas en tampón de carga, calentadas y sembradas en los surcos de muestra del gel espaciador, para posteriormente ser corridas. La transferencia de las proteínas a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) se realizó previa activación de la membrana en metanol por 15 segundos. El gel fue colocado en contacto directo con la membrana de PVDF, humedecidos en tampón de transferencia y transferido en una cámara en semi-seco (Bio-Rad). Para la inmunodetección, las membranas de PVDF fueron bloqueadas por 2 horas en leche al 5% en TBS (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4), y luego incubadas por 18 horas con el anticuerpo primario correspondiente, a una dilución optimizada para cada uno de ellos. Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes:

- anti-SVCT2 (sc-9926, cabra, policlonal) Santa Cruz Biotechnology
- anti-GAPDH (sc-47724, ratón, monoclonal) Santa Cruz Biotechnology
- anti-COXIV (ab-16056, conejo, policlonal) Abcam
- anti-lámina B (sc-6216, cabra, policlonal) Santa Cruz Biotechnology
- anti- γ -tubulina (sc-51715, ratón, monoclonal) Santa Cruz Biotechnology
- anti-Calnexina (ab31290, ratón, monoclonal) Abcam
- anti-VDAC (ab-15895, conejo, policlonal) Abcam
- anti-GLUT1 (ab40084, ratón, monoclonal) Abcam

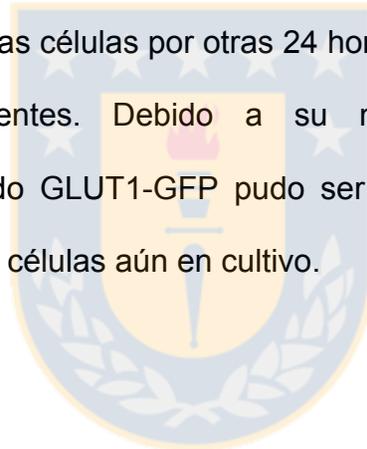
Posterior a la incubación con anticuerpos primarios, las membranas se lavaron en TBS-Tween 20 al 0,05% y fueron incubadas por 2 horas con anticuerpos secundarios conjugados a los fluoróforos Alexa Fluor® 680 y Alexa Fluor® 790 (Jackson) diluidos 1/5000. Finalmente, las membranas se lavaron en TBS-Tween 20 al 0,05% y fueron visualizadas en el equipo de detección infrarroja Odyssey CLx (LI-COR). Las imágenes fueron procesadas con el programa Image Studio. En algunos casos, se realizó un análisis densitométrico de las bandas obtenidas utilizando el programa ImageJ.

10.10. Ensayos de silenciamiento y sobreexpresión de proteínas.

Los ensayos de silenciamiento se realizaron en células en cultivo a un 70% de confluencia. Las células fueron transfectadas de forma transiente con siRNA contra SVCT2 (sc-41008) y siRNA control (scrambled) (sc-37007) (Santa Cruz Biotechnology). Se utilizó el reactivo de transfección SatisFection (Stratagene), el que fue diluido en medio DMEM sin SBF. Los oligonucleótidos también fueron diluidos en medio DMEM sin SBF, para luego de 10 minutos mezclar ambas soluciones. Las células fueron incubadas con esta mezcla de transfección por 24 horas en condiciones normales de cultivo y luego se agregó medio DMEM completo (con SBF al 10% y antibióticos), sin remover la mezcla de transfección. Se incubaron las células por otras 24 horas antes de llevar a cabo los experimentos correspondientes.

Los ensayos de sobreexpresión se realizaron en células en cultivo a un 70% de confluencia. Las células fueron transfectadas de forma transiente con

plásmidos contruidos a partir del vector de expresión pEGFP-N1 (Clontech), conteniendo la secuencia codificante para SVCT1 o la secuencia de GLUT1 unida a la de la proteína fluorescente verde GFP (GLUT1-GFP). Ambos plásmidos (SVCT1 y GLUT1-GFP) están disponibles en nuestro laboratorio. Se utilizó el reactivo de transfección Polietilenimina (PEI) (Toledo et al., 2009), el que fue diluido en medio DMEM sin SBF. El DNA también fue diluido en medio DMEM sin SBF, para luego de 10 minutos mezclar ambas soluciones. Las células fueron incubadas con esta mezcla de transfección por 24 horas en condiciones normales de cultivo y luego se reemplazó por medio DMEM completo (con SBF al 10% y antibióticos). Se incubaron las células por otras 24 horas antes de llevar a cabo los experimentos correspondientes. Debido a su naturaleza fluorescente, la sobreexpresión del plásmido GLUT1-GFP pudo ser verificada directamente por microscopía confocal en las células aún en cultivo.



11. RESULTADOS

11.1. ESTUDIO DE LA LOCALIZACIÓN MITOCONDRIAL DEL TRANSPORTADOR SVCT2 EN LA LÍNEA CELULAR HEK-293.

11.1.1. Caracterización general de la expresión del transportador SVCT2 en la línea celular HEK-293.

Estudios realizados en nuestro laboratorio demostraron la localización mitocondrial del transportador de ácido ascórbico SVCT2 en diversas líneas celulares de cáncer de mama (Muñoz, 2009), lo que fue corroborado recientemente por otro grupo de investigación (Azzolini et al., 2013). Esto planteó la posibilidad de que SVCT2 podría estar jugando un rol preponderante en el transporte de ácido ascórbico a nivel de la mitocondria y de esta manera en el equilibrio redox mitocondrial. Sin embargo, los estudios realizados en los modelos tumorales de mama no permitían ensayos acabados acerca de la funcionalidad de SVCT2, principalmente a causa de los bajos niveles de transfección obtenidos en este tipo de líneas celulares. Debido a esto, nos planteamos la posibilidad de utilizar la línea HEK-293 como modelo de estudio para llevar a cabo ensayos de funcionalidad del transportador a nivel mitocondrial, por dos motivos principales. Primero, estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio demostraron que estas células expresan el transportador SVCT2, el que se encuentra distribuido principalmente a nivel intracelular, y mostrando una expresión prácticamente indetectable a nivel de la membrana plasmática. Por otro lado, las células HEK-

293 han mostrado ser una línea fácilmente transfectable, obteniéndose normalmente eficiencias de transfección superiores al 80%, lo que permite una variedad de ensayos incluyendo el silenciamiento del transportador.

Para validar nuestro modelo experimental, nos propusimos realizar una caracterización general de la expresión y función del transportador SVCT2 en las células HEK-293. En condiciones *in vivo*, la vitamina C existe principalmente en su forma reducida, como ácido ascórbico, forma en la que es ingresada desde el medio extracelular al interior de la célula. Así, en una primera instancia, se analizó la capacidad de las células HEK-293 de transportar ácido ascórbico. Las células fueron crecidas en placas durante 48 horas y posteriormente se realizaron ensayos de captación de ácido ascórbico a una concentración de 100 μM y en un medio de transporte que simula las condiciones iónicas extracelulares. Se trabajó a esta concentración de ácido ascórbico debido a que es cercana a la encontrada en el medio extracelular, y además porque conocemos que la K_m aparente de transporte de ácido ascórbico mediado por SVCT2 se encuentra en el rango de 20-30 μM . Una característica fundamental del transportador es su potente activación por el ión sodio extracelular, por lo que los ensayos de transporte fueron llevados a cabo en presencia y ausencia de este catión. El análisis temporal de transporte reveló que las células HEK-293 poseen una baja capacidad de captación de ácido ascórbico, con una velocidad de transporte de 14 $\text{pmol}/10^6$ células/min. Durante el tiempo del ensayo la velocidad de transporte se mantuvo relativamente constante en el tiempo, llegando a los 10 minutos a un valor máximo de concentración de ácido ascórbico de 145 $\text{pmol}/10^6$ células (Figura 3A). Como era de esperar, el transporte de ácido ascórbico en las células control, es decir en

ausencia de sodio (cloruro de colina), fue prácticamente nulo a lo largo del tiempo del ensayo, mostrando una velocidad de transporte de $2 \text{ pmol}/10^6 \text{ células}/\text{min}$ y una concentración de ácido ascórbico de $18 \text{ pmol}/10^6 \text{ células}$ a los 10 minutos de ensayo. Estos resultados nos permiten concluir que las células HEK-293, a pesar de que son capaces de acumular ácido ascórbico de una manera dependiente del tiempo, transportan bajos niveles de ácido ascórbico en comparación a otros tipos celulares reportados en literatura y por nuestro laboratorio (Maulén et al., 2003; Godoy et al., 2007; Mardones et al., 2012). No obstante, la velocidad de transporte en presencia de sodio fue varias veces mayor que la velocidad de transporte de las células control, lo que indica que el transporte de ácido ascórbico en las células HEK-293 es dependiente de la presencia de sodio, y por lo tanto, mediado por alguno de los transportadores SVCT.

De manera de determinar si SVCT2 está involucrado en el transporte de ácido ascórbico observado en las células HEK-293, se analizó la expresión del transportador por medio de ensayos de RT-PCR convencional y western blot. Para todos los casos las células fueron crecidas en placas durante 48 horas y posteriormente se realizaron los ensayos correspondientes.

Para los experimentos de RT-PCR, las células fueron lisadas, se extrajo RNA total y se realizó la síntesis de cDNA correspondiente. Utilizando como templado de amplificación las muestras de cDNA generadas, se realizaron los ensayos de PCR con partidores específicos para la secuencia de SVCT2. Los resultados muestran que las células HEK-293 son positivas para la expresión de SVCT2, lo que es evidenciado por la presencia de una banda de 338 pb, correspondiente a un producto de amplificación del tamaño esperado. El mismo

producto de amplificación fue observado para las células control CaCo-2 (Figura 3B). Se utilizó cDNA de estas células como control positivo dado que sabemos que las células CaCo-2 expresan tanto SVCT1 como SVCT2 a nivel de RNA mensajero (Maulén et al., 2003). Como era de esperar, no se detectó la presencia de producto de amplificación para el control negativo, correspondiente a una muestra sin RNA templado. Como control interno, se analizó la expresión de β -actina, la cual fue positiva para las células HEK-293 y CaCo-2. Esto fue evidenciado por la presencia de una banda del tamaño esperado de 353 pb. En definitiva, estos resultados nos permiten concluir que la línea celular HEK-293 expresa RNA mensajero codificando para el transportador SVCT2.

Una vez establecida la expresión de SVCT2 a nivel de RNA mensajero en la línea celular en estudio, se analizó la expresión del transportador a nivel de proteína. Las células fueron lisadas y la concentración de proteínas totales fue cuantificada. Los ensayos de western blot mostraron la presencia de una única banda inmunoreactiva para SVCT2, de alrededor de 40 kDa de tamaño. Un resultado similar fue observado para las células control CaCo-2, la que mostró también una única banda inmunoreactiva del mismo tamaño que para las células HEK-293 (Figura 3C). Las células CaCo-2 fueron utilizadas como control positivo dado que en base a experimentos previos realizados en nuestro laboratorio, sabemos que expresan el transportador SVCT2 a nivel de proteína. Como control interno, se analizó la expresión de la proteína GAPDH, la cual mostró una robusta expresión en ambas líneas celulares. En definitiva, estos resultados nos permiten concluir que el transportador SVCT2 es expresado a nivel de proteína en la línea celular HEK-293.

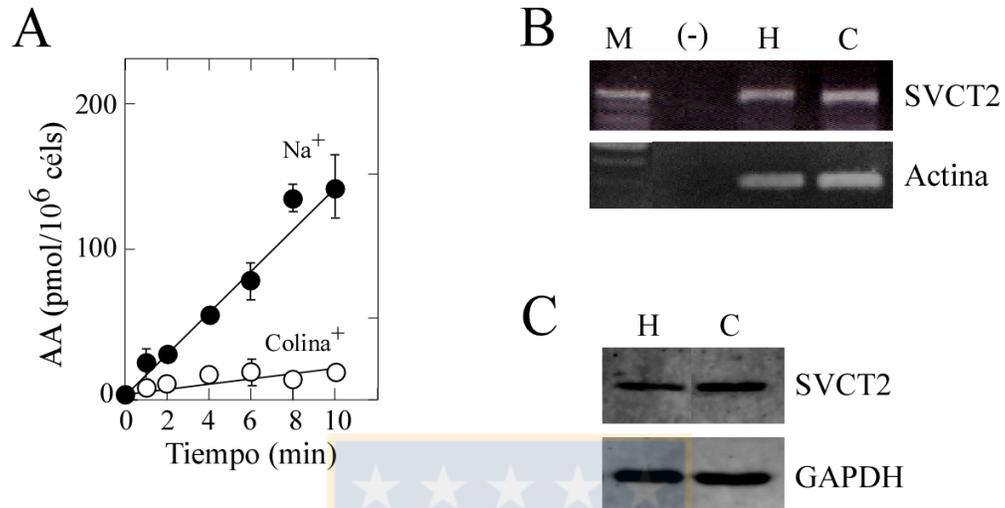


Figura 3. Caracterización general de la expresión del transportador SVCT2 en la línea celular HEK-293.

A. Captación de ácido ascórbico en células HEK-293. Los ensayos de transporte fueron realizados a 37°C por los tiempos indicados, en medio de transporte extracelular conteniendo una concentración final de ácido ascórbico de 100 μ M, en presencia (●) o ausencia (○) de NaCl. **B.** Análisis por RT-PCR de la expresión de SVCT2 en células HEK-293. Se analizó la presencia de SVCT2 utilizando partidores específicos y a partir de cDNA sintetizados desde RNA total extraído de células HEK-293 (H) y CaCo-2 (C) como control positivo. Como control interno se detectó la presencia de β -actina. M: marcador de peso molecular; (-): control negativo correspondiente a muestra sin RNA templado (agua). Los productos de PCR fueron separados en un gel de agarosa al 1% y visualizados por tinción con bromuro de etidio. **C.** Análisis por western blot de la expresión de SVCT2 en células HEK-293. Lisados totales obtenidos desde células HEK-293 (H) y CaCo-2 (C) como control positivo, fueron separados por SDS-PAGE, transferidos a una membrana de PVDF y ensayados utilizando un anticuerpo anti-SVCT2. Como control de carga se detectó la presencia de GAPDH.

Los transportadores SVCT han sido clásicamente descritos como transportadores de membrana plasmática que median la captación de ácido ascórbico desde el medio extracelular hacia el interior de la célula. En este sentido, a la fecha existen en literatura varios estudios realizados en células de distinto origen donde se describe su capacidad para transportar ácido ascórbico a través del transportador SVCT2. Sin embargo, cuando se analizan las imágenes de ensayos de inmunolocalización de SVCT2 publicadas en estos trabajos, en los cuales se asume la localización a nivel de membrana plasmática del transportador, es posible observar que la tinción anti-SVCT2 se distribuye principalmente a nivel intracelular. Debido a lo anterior, quisimos analizar la expresión del transportador SVCT2 por medio de ensayos de inmunofluorescencia en las células HEK-293. Las células fueron crecidas sobre vidrios por 48 horas para posteriormente realizar ensayos con un anticuerpo anti-SVCT2 y un análisis por microscopía confocal. Interesantemente, pudimos observar que la inmunoreactividad para el transportador SVCT2 se localiza principalmente a nivel intracelular, con un patrón de distribución perinuclear y citoplasmático bien definido. Además, se observó prácticamente nula expresión de SVCT2 a nivel de membrana plasmática, lo que concuerda con lo observado en las imágenes de inmunodetección para SVCT2 disponibles en literatura. Interesantemente, el patrón observado para la tinción intracelular de SVCT2 corresponde a estructuras puntiformes o alargadas alrededor del núcleo, que pueden ser interpretadas como una tinción reminiscente a la mitocondria (Figura 4).

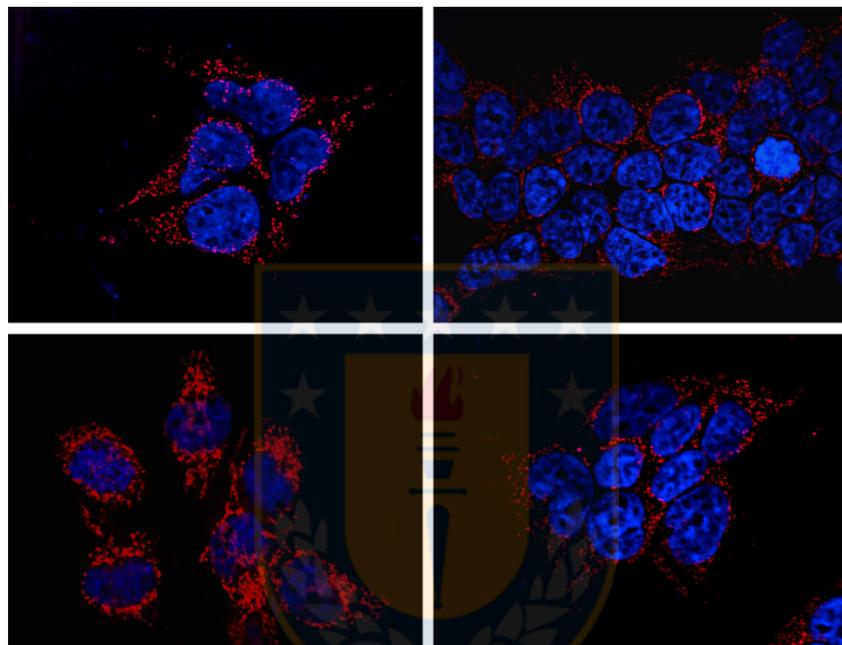


Figura 4. Distribución intracelular del transportador SVCT2 en la línea celular HEK-293.

Células HEK-293 fueron crecidas sobre vidrios y ensayadas por inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo primario (cabra) anti-SVCT2 y un anticuerpo secundario anti-IgG de cabra conjugado a Cy3. Los núcleos fueron marcados con la tinción DAPI. Se muestran cultivos de células ensayadas a distintos porcentajes de confluencia celular. Las fotografías se obtuvieron utilizando microscopía confocal con un aumento de 60X.

En conjunto, estos resultados nos permiten concluir que el transportador SVCT2 es expresado en las células HEK-293 tanto a nivel de RNA mensajero como a nivel de proteína. Además, y lo que resultó más interesante, la localización de SVCT2 es eminentemente intracelular, con un patrón que sugiere una localización mitocondrial del transportador.

11.1.2. Localización mitocondrial del transportador SVCT2 en la línea celular HEK-293.

De manera de analizar con mayor detalle la localización subcelular específica de SVCT2 y confirmar si el transportador efectivamente se encuentra localizado en la mitocondria, se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia de doble marcaje y microscopía confocal en las células HEK-293. Las células fueron crecidas sobre vidrios por 48 horas para posteriormente realizar experimentos de colocación entre el transportador SVCT2 y dos proteínas clásicamente utilizadas como marcadores mitocondriales: COXIV (Citocromo Oxidasa IV) y Citocromo C. En específico, se utilizaron simultáneamente anticuerpos dirigidos contra SVCT2 y COXIV (Figura 5A), o contra SVCT2 y citocromo C (Figura 5B). Las imágenes obtenidas por microscopía confocal confirmaron que la expresión de SVCT2 es esencialmente intracelular en las células HEK-293, observándose además una marcada colocación entre SVCT2 y las proteínas mitocondriales COXIV y citocromo C (Figura 5). En ambos casos, esto es evidenciado claramente al observar la superposición de imágenes (merge)

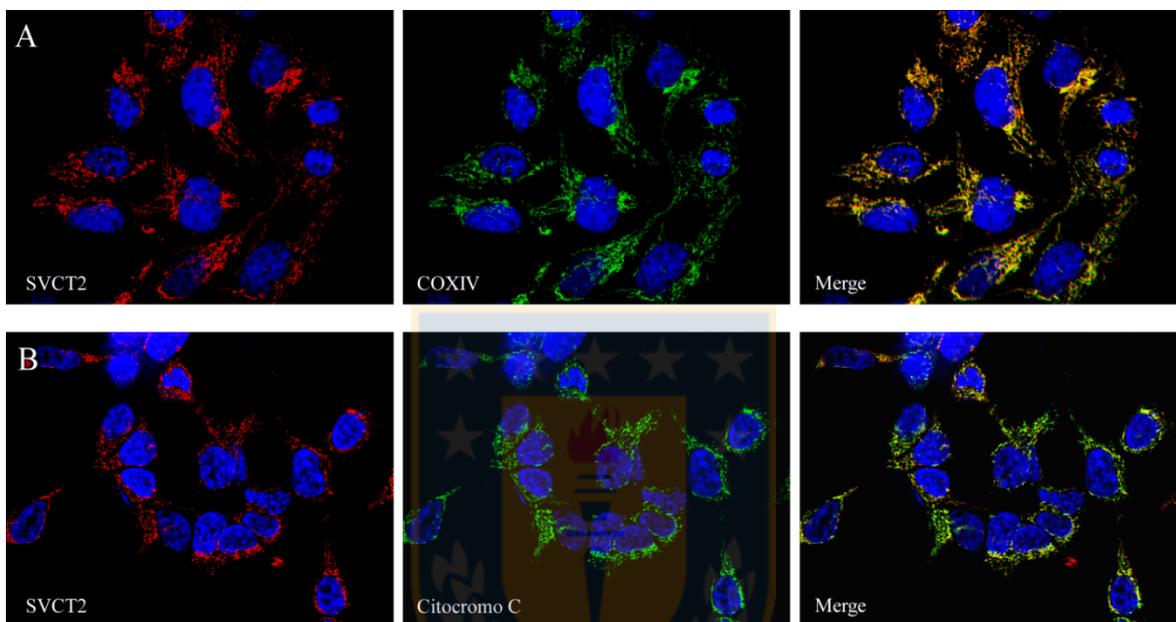


Figura 5. Localización mitocondrial del transportador SVCT2 en la línea celular HEK-293.

Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia de doble marcaje utilizando conjuntamente un anticuerpo anti-SVCT2 y un anticuerpo contra el marcador mitocondrial COXIV (**A**) o contra el marcador mitocondrial Citocromo C (**B**). Se utilizó un anticuerpo secundario conjugado a Cy3 para SVCT2 y un anticuerpo conjugado a FITC para los marcadores mitocondriales. Los núcleos fueron marcados con la tinción DAPI. Las fotografías se obtuvieron utilizando microscopía confocal con un aumento de 60X.

entre la marca del anticuerpo anti-SVCT2 y el anticuerpo contra el marcador mitocondrial. Tanto SVCT2 como las proteínas marcadoras presentan una similar distribución subcelular alrededor del núcleo, mostrando el patrón característico de las proteínas mitocondriales cuando son analizadas por microscopía confocal.

De manera de analizar con mayor detalle la localización subcelular específica de SVCT2 en las células HEK-293, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia con anticuerpos clásicamente utilizados para el marcaje de los principales organelos y compartimientos subcelulares descritos a la fecha. Específicamente, se realizaron experimentos de colocalización entre el transportador SVCT2 y las siguientes proteínas marcadoras: COXIV como marcador mitocondrial, PDI (Proteína Disulfuro Isomerasa) como marcador de retículo endoplásmico, proteína de 58 kDa de Golgi como marcador de aparato de Golgi, LAMP2 (Proteína de Membrana Asociada a Lisosoma 2) como marcador de lisosomas y GLUT1 como marcador de membrana plasmática. Las imágenes obtenidas por microscopía confocal mostraron la expresión intracelular característica de SVCT2 en las células HEK-293, confirmando además la clara colocalización entre SVCT2 y la proteína mitocondrial COXIV. Por otro lado, se observó una menor colocalización de SVCT2 con la proteína de retículo endoplásmico PDI y prácticamente nula colocalización con los marcadores de Golgi, lisosoma y membrana plasmática. Además, tampoco se observó presencia de SVCT2 a nivel del núcleo, organelo que fue teñido con la tinción DAPI (Figura 6).

A partir de las imágenes obtenidas por microscopía confocal, se realizó un análisis de correlación para cuantificar el grado de colocalización entre el

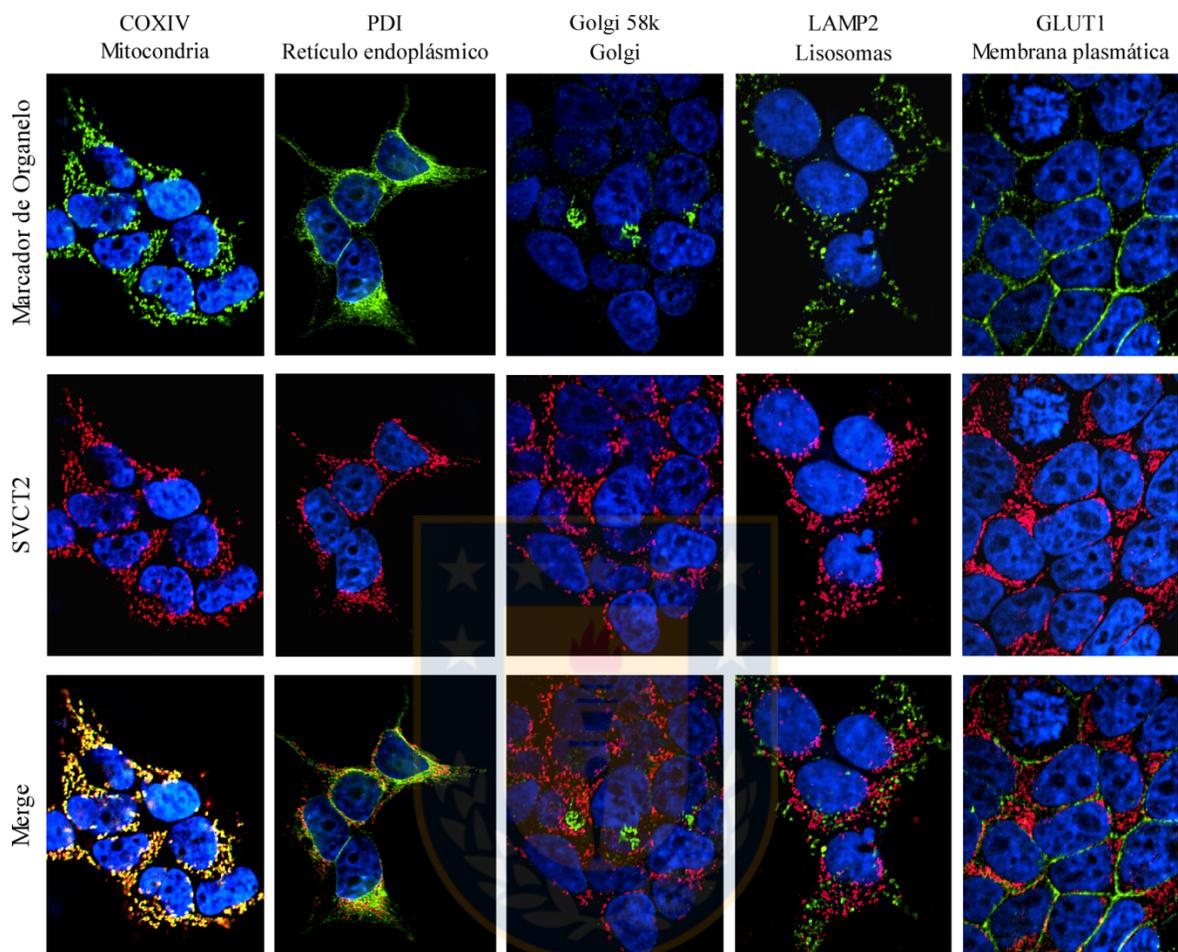


Figura 6. Colocalización del transportador SVCT2 con distintos marcadores de organelos.

La expresión de SVCT2 fue analizada por ensayos de inmunofluorescencia, utilizando conjuntamente un anticuerpo anti-SVCT2 y anticuerpos contra los siguientes marcadores de organelos: proteína mitocondrial COXIV, proteína de retículo endoplásmico PDI, proteína de 58 kDa de Golgi, proteína de lisosoma LAMP2 y la proteína de membrana plasmática GLUT1. Se utilizó un anticuerpo secundario conjugado a Cy3 para SVCT2 y un anticuerpo conjugado a FITC para los distintos marcadores. Los núcleos fueron marcados con la tinción DAPI. Las fotografías se obtuvieron utilizando microscopía confocal con un aumento de 60X.

transportador SVCT2 y los marcadores de organelos. Para esto se utilizó el programa *ImageJ*, que permite determinar el índice o coeficiente de colocalización de Pearson luego de un proceso de deconvolución de las imágenes. Este método de análisis de colocalización es una de las técnicas estándar que permite reconocer los patrones de correspondencia entre dos imágenes, describiendo el grado de superposición que existe entre ambas. Los datos son expresados como un coeficiente de correlación lineal, en el cual los valores cercanos a 1 corresponden a una correlación total, mientras que los valores cercanos a 0 indican que no existe una correlación. A partir de este análisis se estableció que el mayor coeficiente de colocalización se obtuvo entre el transportador SVCT2 y el marcador mitocondrial COXIV, con un índice de Pearson de alrededor de 0,8. La colocalización entre SVCT2 y el marcador de retículo endoplásmico fue de 0,3, mientras que se obtuvieron valores menores a 0,1 para la colocalización entre SVCT2 y los marcadores aparato de Golgi, lisosoma y membrana plasmática (Figura 7). Estos resultados confirman lo observado en las imágenes de microscopía confocal y sugieren que el transportador SVCT2 es expresado principalmente a nivel mitocondrial en la línea celular HEK-293, y en una menor medida en el retículo endoplásmico.

De manera de confirmar la posible localización mitocondrial del transportador SVCT2, se realizaron ensayos de fraccionamiento subcelular por centrifugación diferencial y posterior western blot. Específicamente, células HEK-293 fueron lisadas y sometidas a sucesivas etapas de centrifugación para obtener una fracción mitocondrial purificada y otras fracciones subcelulares. Por medio de western blot se analizó la presencia de SVCT2 y de varias proteínas marcadoras

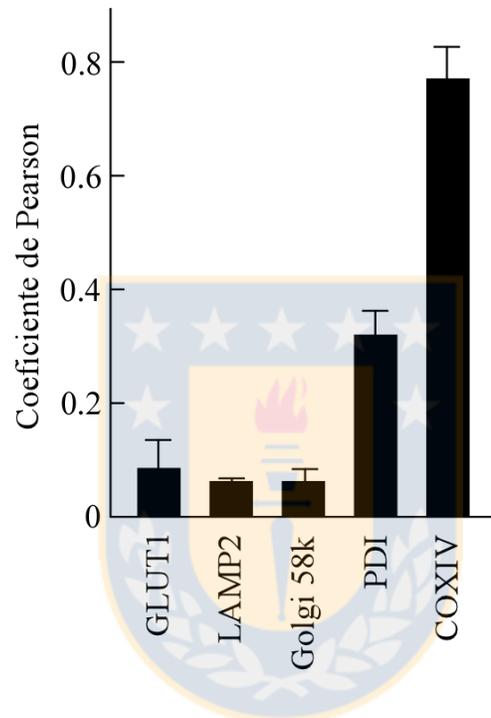


Figura 7. Análisis de Colocalización de Pearson entre el transportador SVCT2 y marcadores de organelos.

Se realizó el análisis de Pearson a partir de las imágenes obtenidas en los ensayos de colocalización entre SVCT2 y los distintos marcadores de organelos (Figura 6 y otros resultados no mostrados). Posterior a la deconvolución de las imágenes, éstas fueron procesadas con el programa *ImageJ* para calcular el coeficiente de Pearson entre SVCT2 y las siguientes proteínas: GLUT1, LAMP2, Golgi 58k, PDI y COXIV.

de organelos en las distintas fracciones obtenidas. Estos experimentos mostraron una marcada expresión de SVCT2 en la fracción mitocondrial, observándose además un importante enriquecimiento de la expresión del transportador en esta fracción en comparación al lisado total inicial (Figura 8). Como era de esperar, también se detectó la expresión de COXIV en la fracción mitocondrial, y más interesante aún, se observó una clara correlación en la expresión de este marcador mitocondrial y SVCT2 en las distintas fracciones. En relación a las otras fracciones subcelulares y como era de esperar, se detectó la expresión de ambas proteínas en el lisado inicial y en la fracción citosólica, de la cual se obtuvo la fracción mitocondrial. Además, no se detectó la expresión de ninguna de las dos proteínas en la fracción de retículo endoplásmico. Contrario a lo esperado, la expresión de ambas proteínas fue detectada en la fracción nuclear, lo que se explica por la probable presencia de células intactas en esta fracción, que no fueron lisadas en el proceso de homogenización.

De manera de verificar la pureza de la fracción mitocondrial y las demás fracciones subcelulares obtenidas, se analizó por medio de western blot la expresión de las siguientes proteínas: Lámina B como marcador nuclear, γ -tubulina como marcador citosólico, y Calnexina como marcador de retículo endoplásmico. Específicamente en relación a la fracción mitocondrial, además de la marcada expresión de COXIV ya mencionada, se observó una menor expresión de calnexina, una mínima expresión de γ -tubulina y no se detectó la presencia de lámina B. Estos resultados indican que la fracción mitocondrial obtenida por medio del proceso de centrifugación diferencial es de alta pureza. Por otro lado y como

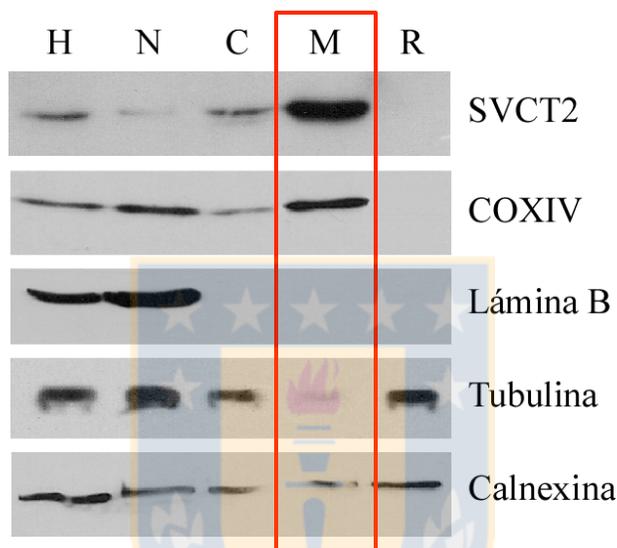


Figura 8. Expresión del transportador SVCT2 en fracciones subcelulares obtenidas de células HEK-293.

Se realizaron ensayos de fraccionamiento subcelular, purificación de mitocondrias y western blot en las distintas fracciones obtenidas. Se analizó la expresión de SVCT2 y de los siguientes marcadores de organelos: proteína mitocondrial COXIV, proteína nuclear Lámina B, proteína citosólica γ -tubulina y proteína de retículo endoplásmico Calnexina. H: Homogenizado total; N: Fracción nuclear; C: Fracción citosólica; M: Fracción mitocondrial; R: Fracción de retículo endoplásmico. Se destaca en rojo el carril correspondiente a la fracción mitocondrial (M).

era de esperar, la expresión de lámina B fue detectada sólo en el lisado inicial y la fracción nuclear, estando ausente en el resto de las fracciones. Asimismo, la expresión de γ -tubulina fue detectada en el lisado inicial y la fracción citosólica. Al igual que para el resto de las proteínas analizadas, γ -tubulina también fue detectada en la fracción nuclear. Contrario a lo esperado, esta proteína también está presente en la fracción de retículo endoplásmico. Por último, y como era de esperar, la expresión de calnexina fue detectada en el lisado inicial, fracción citosólica y fracción de retículo endoplásmico. Al igual que para el resto de las proteínas analizadas, calnexina también fue detectada en la fracción nuclear (Figura 8).

En conjunto, los resultados obtenidos por medio de los ensayos de inmunofluorescencia y western blot de fracciones subcelulares, demuestran que el transportador SVCT2 se localiza principalmente en la mitocondria en la línea celular HEK-293.

11.1.3. Localización mitocondrial del transportador SVCT2 en líneas celulares humanas de distinto origen.

Como se ha comentado anteriormente, a la fecha existen en literatura varios estudios realizados en células de distinto origen donde se muestran imágenes de ensayos de inmunodetección para SVCT2 en los cuales se asume su localización a nivel de membrana plasmática, sin embargo, la tinción anti-SVCT2 se distribuye principalmente a nivel intracelular (García et al., 2005; Godoy et al., 2007; Angulo et al., 2008; Caprile et al., 2009; Gess et al., 2010; Nualart et al.,

2012; Hong et al., 2012; Fulzele et al., 2013). Debido a esto, quisimos analizar la expresión del transportador SVCT2 por medio de ensayos de inmunofluorescencia en distintos tipos celulares humanos, algunos de los cuales han sido utilizados en los trabajos en literatura recién descritos. Se trabajó con varias líneas celulares de distinto origen, que incluyen cultivos primarios y líneas celulares inmortalizadas cancerígenas y no cancerígenas. Específicamente, las células utilizadas fueron las siguientes: cultivos primarios de células HUVEC (células endoteliales de vena umbilical); las líneas celulares ECV-304 (células de vejiga) y HBMEC (células endoteliales de microvasculatura cerebral); y las líneas celulares cancerígenas CaCo-2 (cáncer de colon), DU-145 (cáncer de próstata), HeLa (cáncer cérvico uterino), GMel (melanoma), ZR-75 (cáncer de mama) y MCF-7 (cáncer de mama).

Las células fueron crecidas sobre vidrios por 48 horas para posteriormente realizar ensayos con un anticuerpo anti-SVCT2 y un análisis por microscopía confocal. Para todas las líneas celulares analizadas, la inmunoreactividad para el transportador SVCT2 se localiza principalmente a nivel intracelular, con una distribución similar al patrón mitocondrial observado en las células HEK-293. Es interesante observar que hay pequeñas diferencias en cuanto a la distribución de la tinción entre las distintas líneas celulares, observándose en algunos casos un patrón de aspecto puntiforme y en otras un patrón de estructuras alargadas (Figura 9). Estos dos patrones son característicos de las proteínas mitocondriales, y por lo tanto nos permiten proponer que el transportador SVCT2 está localizado principalmente a nivel mitocondrial en estas células.

De manera de corroborar estos resultados, se realizaron experimentos de colocalización entre el transportador SVCT2 y el marcador mitocondrial COXIV en

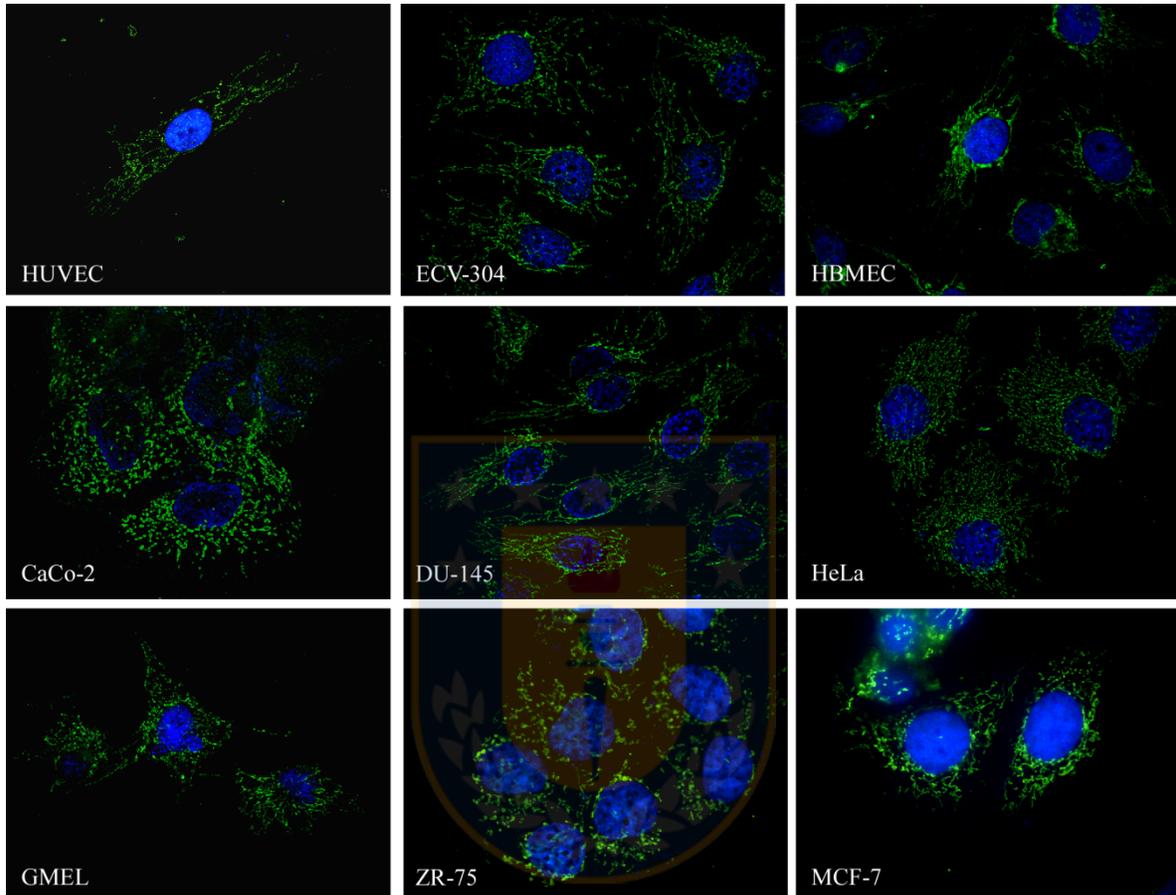


Figura 9. Distribución intracelular del transportador SVCT2 en líneas celulares humanas de distinto origen.

Células HUVEC, ECV-304, HBMEC, CaCo-2, DU-145, HeLa, GMEL, ZR-75 y MCF-7 fueron crecidas sobre vidrios y ensayadas por inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo primario anti-SVCT2 y un anticuerpo secundario conjugado a FITC. Los núcleos fueron marcados con la tinción DAPI. Las fotografías se obtuvieron utilizando microscopía confocal con un aumento de 60X.

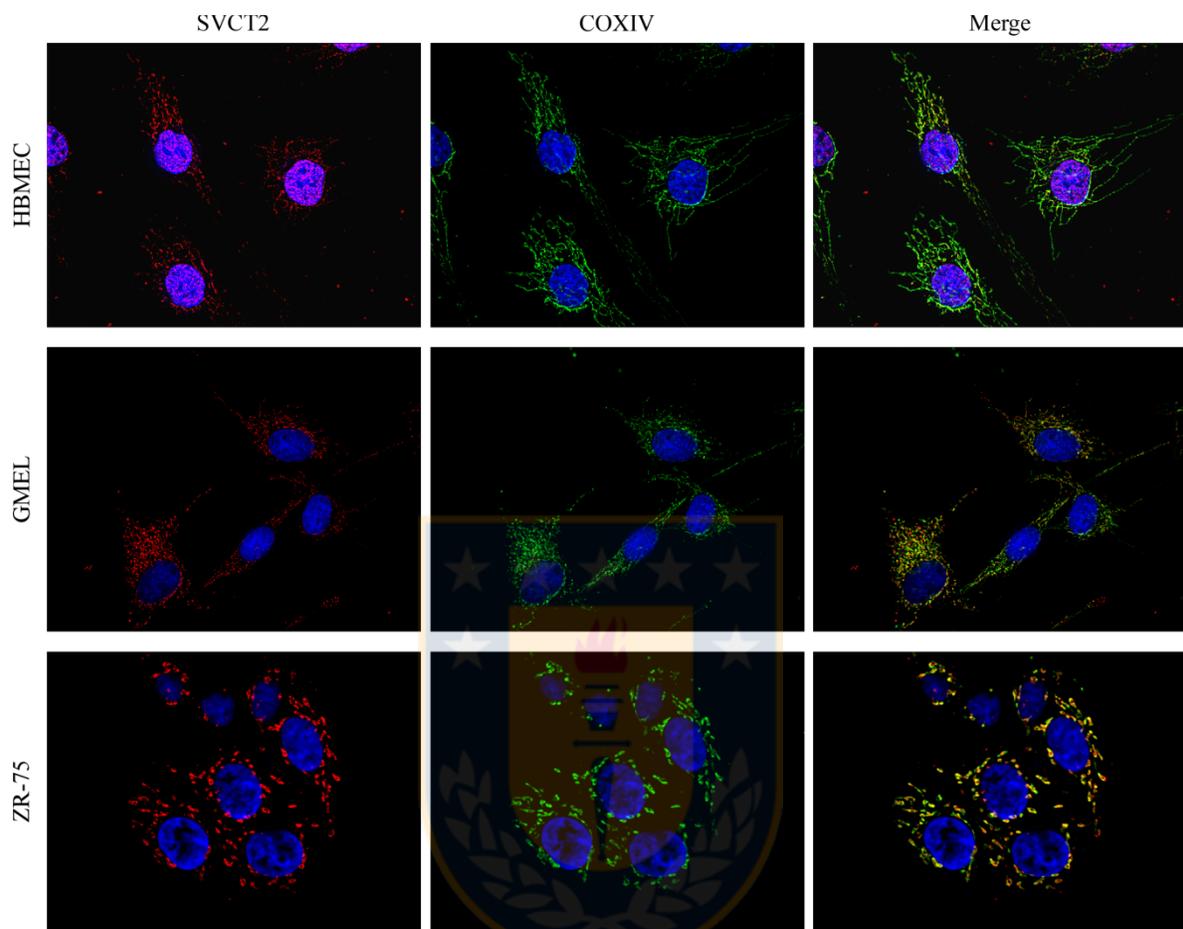


Figura 10. Localización mitocondrial del transportador SVCT2 en líneas celulares humanas de distinto origen.

Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia de doble marcaje utilizando conjuntamente un anticuerpo anti-SVCT2 y un anticuerpo contra el marcador mitocondrial COXIV en células HBMEC, GMEL y ZR-75. Se utilizó un anticuerpo secundario conjugado a Cy3 para SVCT2 y un anticuerpo conjugado a FITC para COXIV. Los núcleos fueron marcados con la tinción DAPI. Las fotografías se obtuvieron utilizando microscopía confocal con un aumento de 60X.

tres de las líneas celulares recién descritas: HBMEC, GMEL y ZR-75. Las imágenes obtenidas por microscopía confocal mostraron una marcada colocalización entre SVCT2 y la proteína mitocondrial COXIV en las tres líneas celulares analizadas, lo que es evidenciado claramente al observar la superposición de imágenes (merge) entre la marca de ambos anticuerpos (Figura 10).

En conjunto, estos resultados nos permiten concluir que en todos los tipos celulares analizados, la expresión de SVCT2 es eminentemente intracelular, con un patrón que sugiere una localización mitocondrial del transportador. La similitud encontrada entre esta variedad de líneas celulares de distinto origen y lo observado en células HEK-293, permiten proponer que la expresión mitocondrial del transportador SVCT2 es una propiedad que es compartida entre diferentes células, tejidos y órganos.

11.1.4. Localización submitocondrial específica del transportador SVCT2 en la línea celular HEK-293.

Los resultados antes descritos establecieron de manera contundente que el transportador SVCT2 se localiza principalmente en la mitocondria de las células HEK-293. Además, resultados similares fueron obtenidos en una serie de líneas celulares humanas de distinto origen. Así, la pregunta que surge inmediatamente es cuál es la localización submitocondrial específica de SVCT2. Principalmente, existen dos posibilidades para la localización de este transportador: membrana mitocondrial interna (MMI) o membrana mitocondrial externa (MME). Para abordar

esta tarea, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia de doble marcaje en las células HEK-293 y posteriormente se analizaron las muestras por microscopía de súper resolución. Concretamente, se llevaron a cabo experimentos de colocación entre el transportador SVCT2 y proteínas marcadoras mitocondriales específicas, utilizando anticuerpos dirigidos simultáneamente contra SVCT2 y las siguientes proteínas: COXIV como marcador de MMI y TOM20 como marcador de MME.

Las imágenes obtenidas por microscopía de súper resolución muestran una clara diferencia entre el patrón de la tinción para COXIV y TOM20 (Figura 11), concordando con lo descrito en literatura para este tipo de experimentos (Fallaize et al., 2015). Aunque ambos patrones son característicos de la clásica morfología mitocondrial, el patrón de COXIV es puntiforme y compacto, mientras el patrón de TOM20 es más fino y marca claramente los bordes de la “red” mitocondrial, delimitando una región interior que corresponde a la MMI y matriz mitocondrial. Los resultados para SVCT2 revelaron que el patrón de tinción para el transportador es mayoritariamente puntiforme, y más importante aún, muestra cierto nivel de colocación con el marcador de MMI COXIV (Figura 11A). Por otro lado, SVCT2 mostró prácticamente nula colocación con el MME TOM20. Específicamente, es posible observar como la tinción para TOM20 rodea a la tinción de SVCT2, o en otras palabras, la presencia de SVCT2 está confinada dentro de los límites definidos por TOM20 (Figura 11B). Esto se hace más evidente al analizar una imagen ampliada de las respectivas colocaciones (Figura 11). Por un lado, se puede observar que aunque SVCT2 y COXIV no se

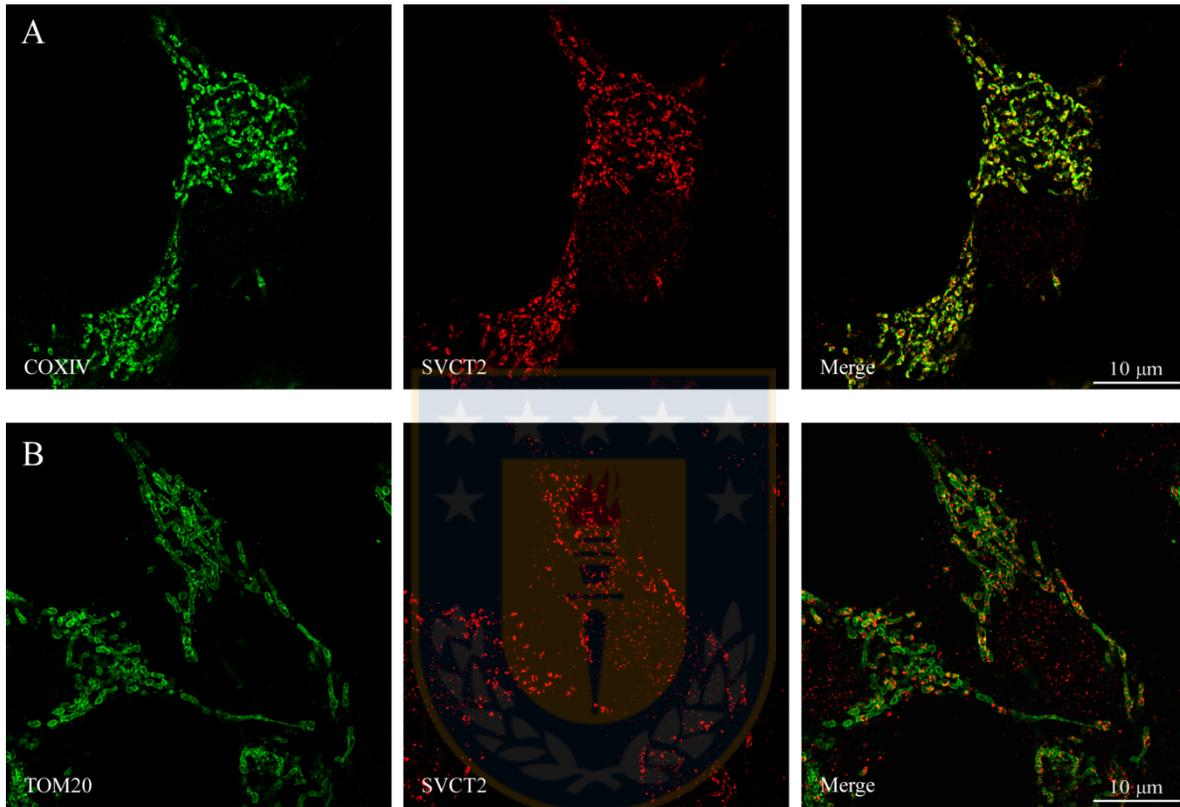


Figura 11. Localización submitocondrial del transportador SVCT2 en la línea celular HEK-293.

Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia de doble marcaje utilizando conjuntamente un anticuerpo anti-SVCT2 y un anticuerpo contra el marcador de membrana mitocondrial interna COXIV (**A**) o contra el marcador de membrana mitocondrial externa TOM20 (**B**). Se utilizó un anticuerpo secundario conjugado a Cy3 para SVCT2 y un anticuerpo conjugado a FITC para los marcadores mitocondriales. Las fotografías se obtuvieron utilizando microscopía de súper resolución con un aumento de 100X.

superponen en todas las regiones de la muestra, la marca puntiforme de ambas proteínas está intercalada y siguiendo el mismo patrón. En contraste, casi no existen zonas de contacto entre SVCT2 y TOM20, pudiéndose observar como los puntos bien definidos correspondientes a SVCT2 se encuentran en el interior de los límites demarcados por TOM20. Estas observaciones fueron corroboradas al hacer un análisis más detallado de las imágenes por medio del programa *ImageJ*. Se seleccionó una región específica de cada imagen de colocalización, se amplió, y se midió la intensidad de fluorescencia de cada señal (SVCT2 y COXIV o SVCT2 y TOM20) a lo largo de una línea trazada de manera transversal al sentido de la red mitocondrial (Figura 12). Este análisis muestra un solo pico de fluorescencia para SVCT2 que se superpone con el también único pico de COXIV, confirmando la colocalización de ambas proteínas (Figura 12C). Por otro lado, TOM20 mostró dos picos de fluorescencia, entre los que se ubica el pico de SVCT2, confirmando que estas proteínas tienen localización claramente distinta dentro de la mitocondria (Figura 12F). En definitiva, estos resultados indican que el transportador SVCT2 mitocondrial es una proteína de membrana interna en las células HEK-293.

De manera de confirmar los resultados obtenidos por microscopía de súper resolución, se realizaron nuevos ensayos de fraccionamiento subcelular para obtener mitocondrias puras desde células HEK-293, y posteriormente se trataron las mitocondrias con digitonina, un detergente no iónico suave. Este procedimiento permite digerir y por tanto separar la MME del organelo generando mitoplastos, es decir, mitocondrias con la MMI intacta y carentes de MME. Las mitocondrias fueron tratadas con concentraciones crecientes de digitonina, centrifugadas, y

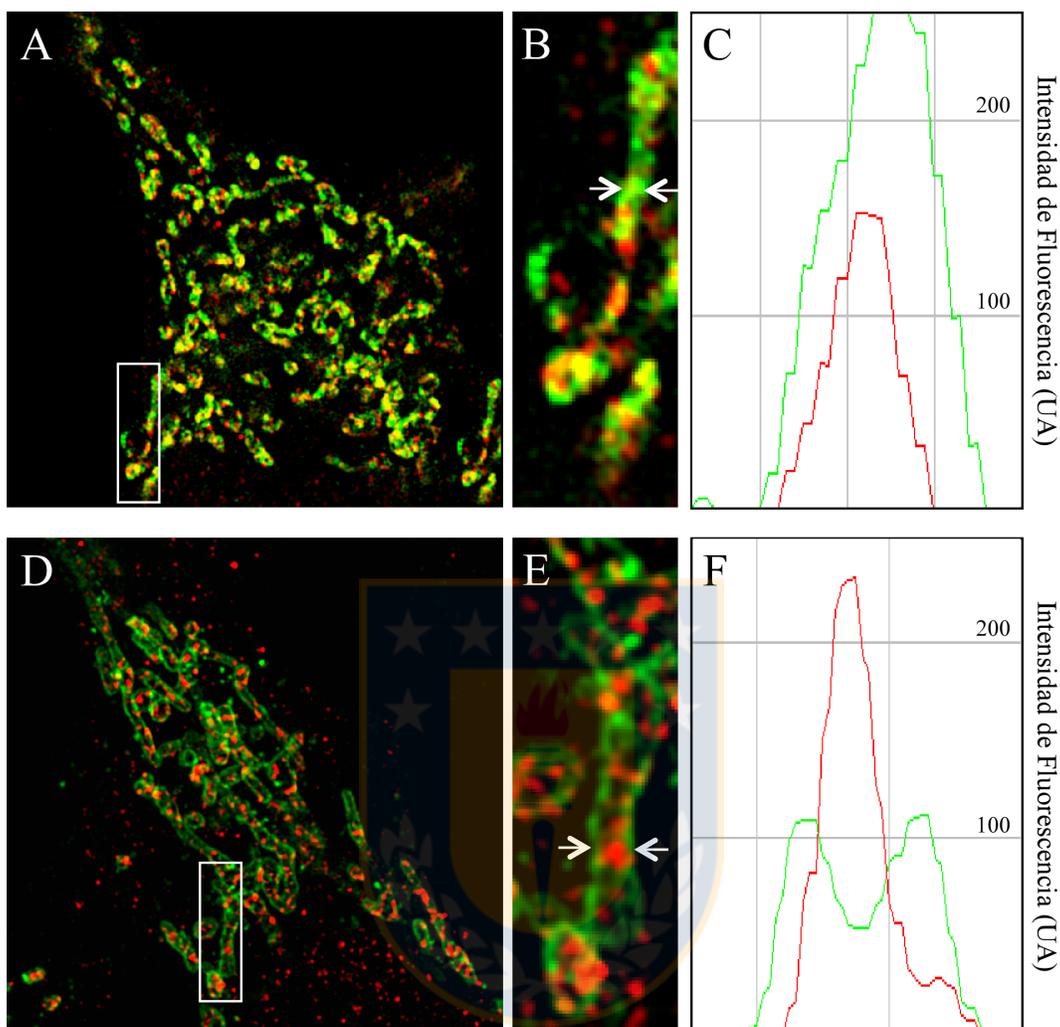


Figura 12. Localización submitocondrial del transportador SVCT2 en la línea celular HEK-293 (Continuación).

Análisis de las imágenes de microscopía de súper resolución mostradas en la Figura 11. Se muestra una ampliación de 2 veces de una región de la imagen de colocalización entre SVCT2 y el marcador COXIV (**A**) y de la colocalización entre SVCT2 y el marcador TOM20 (**D**). **B**. Imagen ampliada (3,5 veces) de la región delimitada por el recuadro blanco marcado en (A). **C**. Perfil de intensidad de fluorescencia para la señal de SVCT2 (rojo) y COXIV (verde) a lo largo de una línea trazada entre las dos flechas indicadas en (B). **E**. Imagen ampliada (3,5 veces) de la región delimitada por el recuadro blanco marcado en (D). **F**. Perfil de intensidad de fluorescencia para la señal de SVCT2 (rojo) y TOM20 (verde) a lo largo de una línea trazada entre las dos flechas indicadas en (E).

posteriormente los pellets fueron ensayados por medio de western blot para analizar la expresión de SVCT2. Además, se analizó la expresión de proteínas marcadoras para fracciones submitocondriales específicas: COXIV como marcador de MMI y VDAC como marcador de MME. Similar a lo observado en los primeros ensayos de western blot en fracciones subcelulares, estos experimentos mostraron una marcada expresión de SVCT2 en la fracción mitocondrial (sin tratar), observándose además un importante enriquecimiento de la expresión del transportador en comparación al homogenizado total de células. Resultados similares se obtuvieron con los dos marcadores mitocondriales utilizados, observándose que tanto COXIV como VDAC se expresan marcadamente en la fracción mitocondrial, en relación a una baja expresión en el homogenizado total (Figura 13).

En cuanto al tratamiento con digitonina, a medida que se aumentan las concentraciones de detergente, la expresión del marcador de MME VDAC va disminuyendo notablemente desde de la concentración de 1,0 mg digitonina/mg proteína, hasta llegar a niveles prácticamente despreciables a una concentración de 1,5 mg digitonina/mg proteína. Esto demuestra que se logró la digestión casi completa de la MME por el tratamiento a esta concentración. Por otro lado, la expresión de COXIV se mantuvo inalterable a medida que se aumentan las concentraciones de detergente, lo que indica que la MMI se mantiene intacta incluso a concentraciones altas de digitonina. Estos resultados indican que a una concentración de 1,5 mg digitonina/mg proteína se obtienen mitoplastos intactos con una mínima presencia de MME, lo que concuerda con lo descrito en literatura

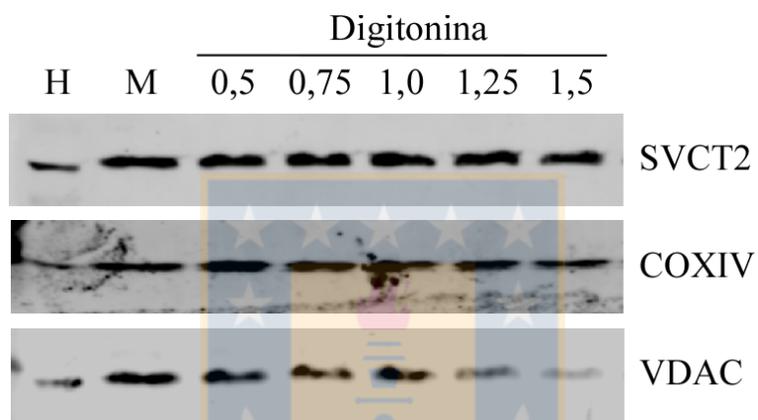
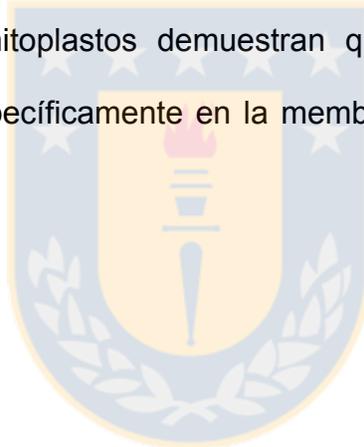


Figura 13. Expresión del transportador SVCT2 en mitoplastos.

Mitocondrias aisladas por fraccionamiento subcelular fueron tratadas con concentraciones crecientes de digitonina (0-1,5 mg/mg proteína), centrifugadas y ensayadas por western blot. Se analizó la expresión de SVCT2, el marcador de membrana mitocondrial interna COXIV y el marcador de membrana mitocondrial externa VDAC. H: Homogenizado total; M: Mitocondrias sin tratar; 0,5-1,5: Mitocondrias tratadas con la concentración de digitonina indicada.

en relación a la generación de mitoplastos por medio de digestión con este tipo de detergentes. Interesantemente, la expresión de SVCT2 se mantuvo inalterable a medida que se aumentan las concentraciones de digitonina hasta 1,5 mg/mg proteína, con un comportamiento prácticamente idéntico al del marcador de MMI COXIV frente al tratamiento (Figura 13). Así, estos resultados demuestran que el transportador SVCT2 se encuentra presente en mitoplastos intactos obtenidos a una alta concentración de digitonina, propiedad que es característica de las proteínas mitocondriales de membrana interna.

En conjunto, tanto los resultados de microscopía de súper resolución como los de western blot en mitoplastos demuestran que el transportador SVCT2 mitocondrial se localiza específicamente en la membrana mitocondrial interna en las células HEK-293.



11.2. ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD DEL TRANSPORTADOR SVCT2 MITOCONDRIAL EN LA LÍNEA CELULAR HEK-293.

11.2.1. Transporte de ácido ascórbico en mitocondrias aisladas.

Con el propósito de determinar si SVCT2 mitocondrial es un transportador funcional, se llevaron a cabo ensayos de transporte de ácido ascórbico en mitocondrias aisladas de la línea celular HEK-293. Al igual que para los experimentos de western blot descritos anteriormente, células HEK-293 fueron lisadas y por medio de centrifugación diferencial se obtuvieron fracciones mitocondriales purificadas, las que fueron inmediatamente ensayadas para su capacidad de transportar ácido ascórbico. En todos los experimentos de transporte realizados, muestras de la fracción mitocondrial fueron almacenadas a -20°C , para ser ensayadas posteriormente por western blot para la expresión de SVCT2 y COXIV. En todos los casos se obtuvo una marcada expresión de ambas proteínas en la fracción mitocondrial.

En un contexto celular, la mitocondria se encuentra expuesta al medio intracelular, el que posee concentraciones iónicas características, como son la baja concentración de sodio (alrededor de 15 mM) y la alta concentración de potasio (alrededor de 135 mM). Por otro lado, la concentración intracelular de ácido ascórbico es mucho mayor que en el plasma, alcanzando valores en el rango milimolar. Debido a lo anterior, los experimentos de transporte en mitocondrias aisladas se realizaron a 37°C en una solución que recrea las condiciones iónicas intracelulares (bajo sodio y alto potasio) y con una

concentración de ácido ascórbico de 1 mM. Bajo estas condiciones las mitocondrias aisladas mostraron una rápida captación de ácido ascórbico en una manera dependiente del tiempo, con una velocidad de transporte de 1,5 nmol/mg proteína/min. Durante el tiempo del ensayo la velocidad de transporte se mantuvo relativamente constante en el tiempo, llegando a los 3 minutos a un valor máximo de concentración de ácido ascórbico de 4,5 nmol/mg proteína (Figura 14A). Posteriormente, realizamos experimentos de concentración-respuesta para determinar la dependencia de la velocidad de transporte en función del aumento de la concentración de ácido ascórbico (0-1,5 mM), en ensayos de transporte de 2 minutos. Interesantemente, la curva de transporte versus concentración de sustrato mostró una forma sigmoideal, observándose que la velocidad de transporte se aproxima a saturación a concentraciones de ácido ascórbico cercanas a 1,5 mM (Figura 14B). El análisis de la sigmoidicidad de la curva de concentración-respuesta usando la ecuación de Hill reveló un AA_{50} de 600 μ M para el transporte de ácido ascórbico, y entregó un valor para el coeficiente de Hill (n_H) de 2,1, lo que es consistente con una interacción cooperativa entre al menos dos sitios de unión a ácido ascórbico en el transportador. Una curva de concentración-respuesta cuadrática modificada nos permitió linealizar los datos obtenidos, utilizando la ecuación de Eadie-Hofstee (Figura 14C). La curva de Eadie-Hofstee cuadrática modificada mostró la participación de un único componente cinético asociado al transporte de ácido ascórbico, entregando un valor de K_m aparente para el transporte de ácido ascórbico de 600 μ M (Figura 14D).

Las propiedades cinéticas de transporte obtenidas difieren claramente de las descritas para el transportador SVCT2, el cual ha sido caracterizado como un

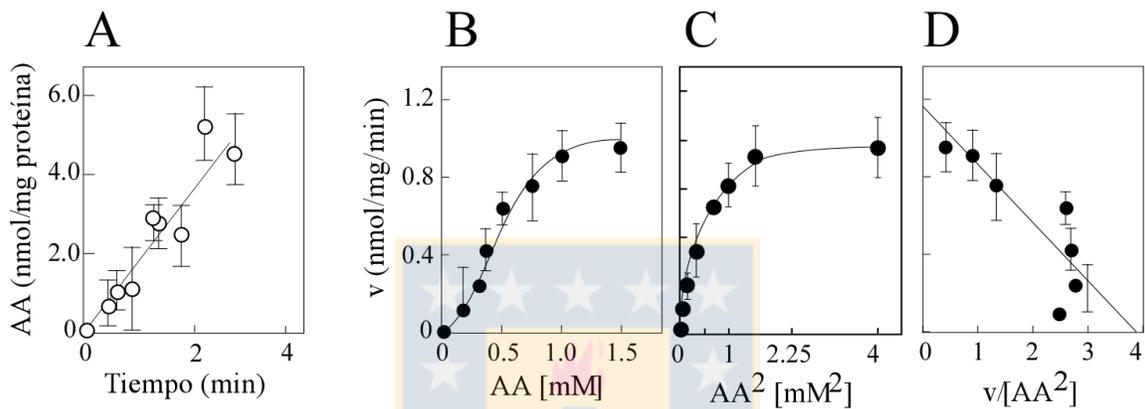


Figura 14. Transporte de ácido ascórbico en mitocondrias aisladas de células HEK-293.

Mitocondrias aisladas por fraccionamiento subcelular fueron ensayadas para el transporte de ácido ascórbico. **A.** Captación de ácido ascórbico en mitocondrias aisladas. Los ensayos de transporte fueron realizados a 37°C por los tiempos indicados, en medio de transporte intracelular conteniendo una concentración final de ácido ascórbico de 1 mM. **B.** Curva de concentración-respuesta para el transporte de ácido ascórbico. Se realizaron ensayos de 2 minutos, utilizando concentraciones crecientes de ácido ascórbico en el rango de 0 a 1,5 mM. **C.** Curva de concentración-respuesta cuadrática modificada para los datos obtenidos en (B). **D.** Curva de Eadie-Hofstee cuadrática modificada.

transportador de ácido ascórbico de alta afinidad. Específicamente, el valor de K_m encontrado para el transporte en mitocondrias aisladas es varias veces mayor al descrito para SVCT2 (20-30 μM), así como también existe una clara diferencia en el comportamiento sigmoideal de la curva de transporte observada en relación a la curva hiperbólica descrita para el transportador. Nuestro laboratorio ha detallado previamente las propiedades funcionales y cinéticas de SVCT2, postulando que bajo condiciones intracelulares (bajo sodio, alto potasio, alto ácido ascórbico) éste funcionaría como un transportador de ácido ascórbico de baja afinidad (Godoy et al., 2007), lo que es completamente consistente con estos resultados obtenidos en mitocondrias aisladas.

En definitiva, los resultados anteriormente descritos permiten concluir que mitocondrias aisladas de células HEK-293 son capaces de transportar eficientemente ácido ascórbico en condiciones intracelulares, captación que es mediada por un transportador de ácido ascórbico de baja afinidad.

11.2.2 Silenciamiento de la expresión del transportador SVCT2.

Los resultados de los experimentos de transporte indicaron que la captación de ácido ascórbico en la mitocondria es mediado por un transportador de baja afinidad, cuyas características cinéticas difieren claramente de las descritas para el transportador SVCT2 (alta afinidad), sin embargo coinciden con lo que se ha propuesto para este transportador cuando está expuesto a condiciones iónicas intracelulares. De manera de determinar fehacientemente si el transporte de ácido ascórbico mitocondrial es mediado por SVCT2, se realizaron experimentos de

silenciamiento de la expresión del transportador utilizando RNA interferente (siRNA). Se transfectaron células HEK-293 con siRNA contra SVCT2 o siRNA control (scrambled), para luego de 48 horas evaluar la expresión del transportador por medio experimentos de inmunofluorescencia y western blot, y analizar el transporte de ácido ascórbico mitocondrial.

Los ensayos de inmunofluorescencia revelaron que las células transfectadas con siRNA contra SVCT2 presentan una menor expresión del transportador que las células control, dada por una menor intensidad de fluorescencia. Como control interno, se analizó la expresión del marcador mitocondrial COXIV, el cual no mostró variaciones en su expresión entre las dos condiciones. Es interesante destacar que la colocalización entre SVCT2 y COXIV es mucho menos evidente en las células transfectadas con siRNA contra SVCT2 que en las células control, dado por la baja intensidad de fluorescencia del transportador (Figura 15A). Por otro lado, observaciones con microscopio de luz mostraron que la transfección con siRNA no produce daño aparente en las células, y además, no existen diferencias morfológicas entre las células transfectadas con siRNA contra SVCT2 o con siRNA control (datos no mostrados).

Los ensayos de western blot en proteínas totales mostraron, al igual que lo obtenido por inmunofluorescencia, que las células transfectadas con siRNA contra SVCT2 presentan una importante disminución en la expresión del transportador en comparación a las células control, evidenciada por una banda inmunoreactiva para SVCT2 de intensidad mucho menor (Figura 15B). Como control de carga, se analizó la expresión de la proteína GAPDH, la cual no mostró variaciones en su expresión entre las dos condiciones. La cuantificación de la densidad de las

bandas utilizando el programa *ImageJ* y posterior corrección con el control de carga GAPDH, indica que la disminución de la expresión de SVCT2 en las células transfectadas con siRNA contra el transportador es de alrededor de un 70% (Figura 15C). En conjunto, los resultados obtenidos por inmunofluorescencia y western blot indican que se logró un efectivo silenciamiento de la expresión de SVCT2 bajo las condiciones utilizadas.

Un resultado similar fue observado cuando se realizaron ensayos de western blot en proteínas de fracciones mitocondriales, purificadas 48 horas después de la transfección de células con siRNA. Estos ensayos mostraron que las mitocondrias aisladas desde células transfectadas con siRNA contra SVCT2 presentan una importante disminución en la expresión del transportador en comparación a las mitocondrias de células control, evidenciada por una banda inmunoreactiva para SVCT2 de intensidad mucho menor (Figura 16A). Como control de carga, se analizó la expresión de la proteína mitocondrial COXIV, la cual no mostró variaciones en su expresión entre las dos condiciones. La cuantificación de la densidad de las bandas y posterior corrección con el control de carga COXIV, indica que la disminución de la expresión mitocondrial de SVCT2 es de alrededor de un 73% (Figura 16B).

Finalmente, se analizó el efecto del silenciamiento de la expresión de SVCT2 en la capacidad de las células HEK-293 de captar ácido ascórbico a nivel mitocondrial. Para esto, se realizaron ensayos de transporte de ácido ascórbico en mitocondrias aisladas desde células transfectadas con siRNA. Notablemente, los resultados obtenidos revelaron una marcada disminución en la capacidad de transporte de ácido ascórbico en las mitocondrias obtenidas desde células

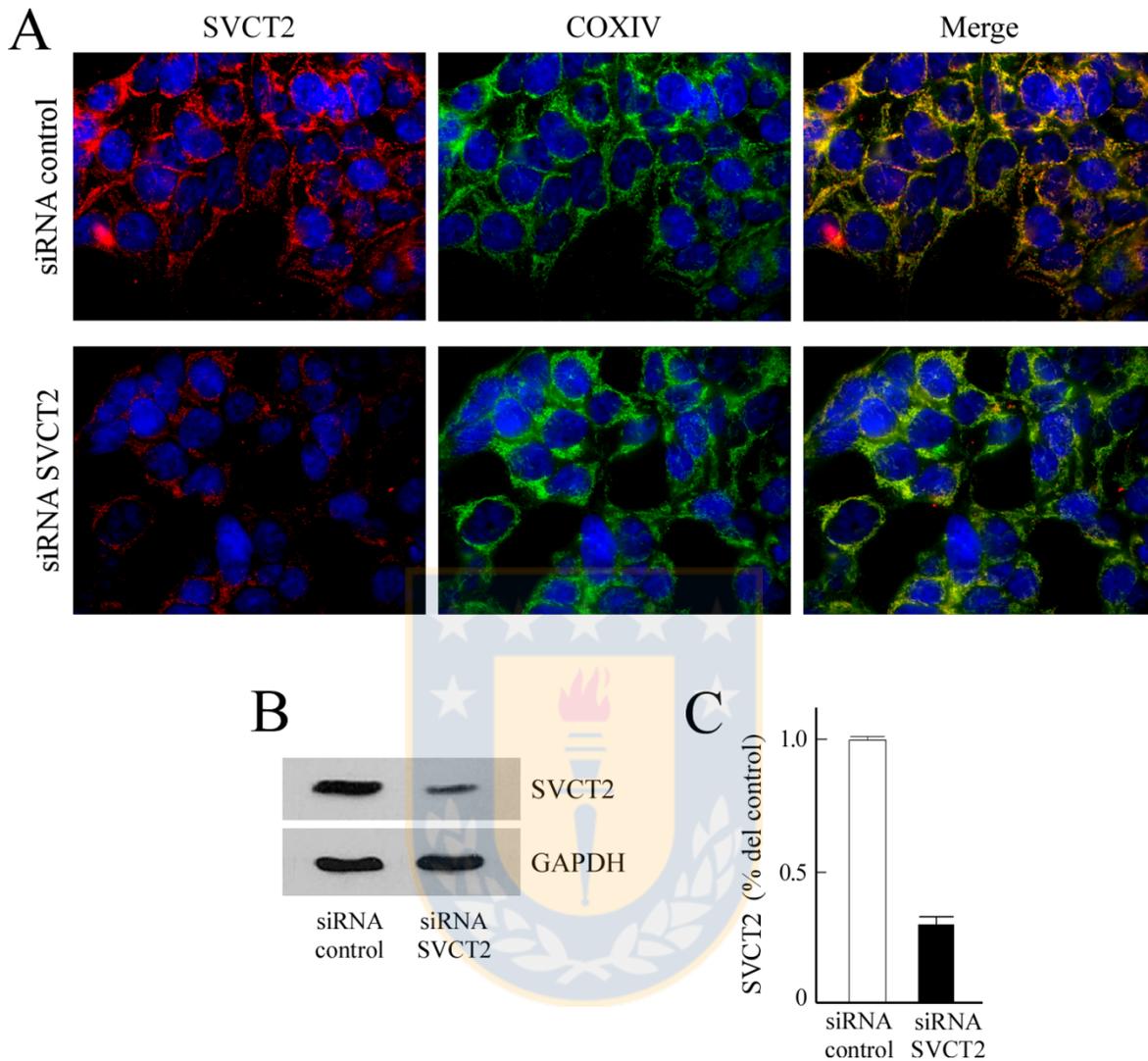


Figura 15. Silenciamiento de la expresión del transportador SVCT2 en la línea celular HEK-293.

A. Ensayos de inmunofluorescencia en células HEK-293 transfectadas con siRNA contra SVCT2 o siRNA control. Se analizó la expresión de SVCT2 y su colocalización con COXIV, como control interno. Las fotografías se obtuvieron utilizando microscopía confocal con un aumento de 60X. **B.** Ensayos de western blot en proteínas totales extraídas de células HEK-293 transfectadas con siRNA contra SVCT2 o siRNA control. Se analizó la expresión de SVCT2 y de GAPDH como control de carga. **C.** Análisis densitométrico para los resultados obtenidos en (B). Utilizando el programa *ImageJ*, se cuantificó la densidad de bandas de SVCT2, normalizando con el control GAPDH.

transfectadas con siRNA contra SVCT2. Estas mitocondrias presentan una disminuci3n en la tasa de transporte de 3cido asc3rbico de alrededor del 75% en comparaci3n a las mitocondrias de c3lulas control (Figura 16C). Esta importante disminuci3n en el transporte de 3cido asc3rbico se correlaciona claramente con el grado de silenciamiento de la expresi3n de SVCT2 observado en mitocondrias aisladas desde c3lulas tratadas con siRNA contra el transportador. En otras palabras, cuando se silencia la expresi3n de SVCT2 mitocondrial, disminuye notablemente la capacidad de transporte de 3cido asc3rbico en la mitocondria.

En conjunto, los resultados anteriormente descritos entregan evidencia consistente que nos permite concluir que SVCT2 es el transportador responsable de la captaci3n de 3cido asc3rbico mitocondrial en las c3lulas HEK-293.



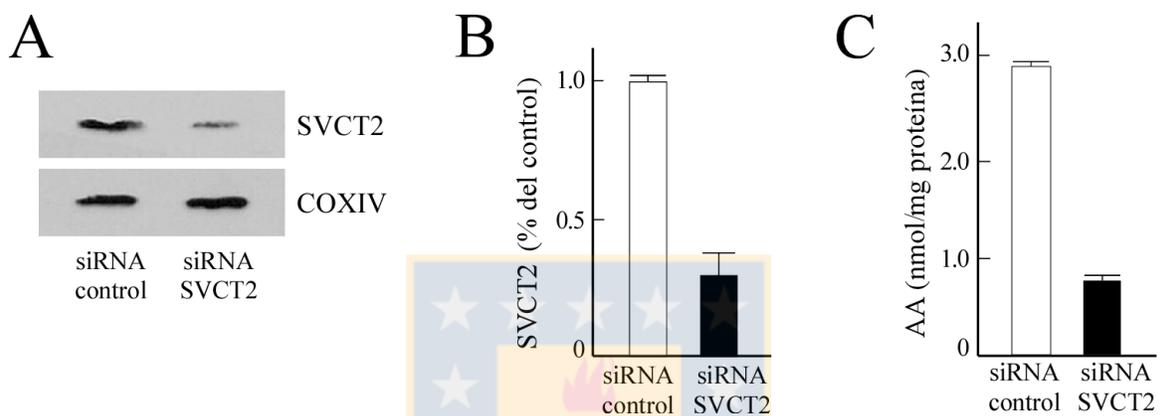


Figura 16. Silenciamiento de la expresión del transportador SVCT2 y efecto en el transporte mitocondrial de ácido ascórbico.

Células HEK-293 fueron transfectadas con siRNA contra SVCT2 y siRNA control, para posteriormente obtener mitocondrias aisladas por fraccionamiento subcelular. **A.** Ensayos de western blot en proteínas mitocondriales obtenidas de mitocondrias aisladas de células transfectadas con siRNA. Se analizó la expresión de SVCT2 y de COXIV como control de carga. **B.** Análisis densitométrico para los resultados obtenidos en (A). Utilizando el programa *ImageJ*, se cuantificó la densidad de bandas de SVCT2, normalizando con el control COXIV. **C.** Transporte de ácido ascórbico en mitocondrias aisladas de células HEK-293 transfectadas con siRNA. Se evaluó la captación de ácido ascórbico de mitocondrias aisladas desde células transfectadas con siRNA contra SVCT2 y con siRNA control. Se realizaron ensayos de transporte de 2 minutos a 37°C, utilizando una concentración de ácido ascórbico de 1 mM.

11.3. PARTICIPACIÓN DE OTROS TRANSPORTADORES EN LA CAPTACIÓN MITOCONDRIAL DE VITAMINA C EN LA LÍNEA CELULAR HEK-293.

11.3.1 Expresión y localización subcelular del transportador SVCT1.

Como fue comentado inicialmente, se han propuesto en literatura otros transportadores como posibles responsables de la adquisición de vitamina C en la mitocondria. De manera de ahondar en este aspecto, estudiamos la posible participación mitocondrial de varios transportadores relacionados a SVCT2.

Inicialmente, y debido a que las células HEK-293 son de origen renal, analizamos si éstas expresan el transportador SVCT1. En primer lugar se realizaron ensayos de RT-PCR utilizando como templado de amplificación muestras de cDNA obtenido a partir de RNA mensajero de células HEK-293, y primers específicos para la secuencia de SVCT1. Los resultados muestran que las células HEK-293 son positivas para la expresión de SVCT1, lo que es evidenciado por la presencia de una banda de 371 pb, correspondiente a un producto de amplificación del tamaño esperado (Figura 17A). El mismo producto de amplificación fue observado para las células control CaCo-2. Se utilizó cDNA de estas células como control positivo dado que sabemos que las células CaCo-2 expresan tanto SVCT1 como SVCT2 a nivel de RNA mensajero (Maulén et al., 2003). Es importante destacar que el producto de amplificación detectado para SVCT1 en las células HEK-293 es bastante más débil que el observado en las células control CaCo-2, lo que podría estar indicando una baja expresión de SVCT1 en las células HEK-293. Como era de esperar, no se detectó la presencia

de producto de amplificación para el control negativo, correspondiente a una muestra sin RNA templado. Como control interno, se analizó la expresión de β -actina, la cual fue positiva para las células HEK-293 y CaCo-2. Esto fue evidenciado por la presencia de una banda del tamaño esperado de 353 pb. En definitiva, estos resultados nos permiten concluir que la línea celular HEK-293 expresa RNA mensajero codificando para el transportador SVCT1.

Una vez establecida la expresión de SVCT1 a nivel de RNA mensajero en la línea celular HEK-293, se analizó la expresión del transportador a nivel de proteína. Interesantemente, ensayos de inmunofluorescencia revelaron ausencia de tinción anti-SVCT1 en las células HEK-293, bajo condiciones en las que se observa la esperada tinción intracelular para SVCT2 (Figura 17B). Estos resultados establecen que a pesar de existir expresión de SVCT1 a nivel de mensajero, el transportador no se expresa a nivel de proteína en las células HEK-293.

Como un control adicional, las células fueron transfectadas con un plásmido codificando la secuencia completa de SVCT1 y posteriormente se analizó la expresión de los transportadores SVCT1 y SVCT2 por medio de inmunofluorescencia. Estos experimentos mostraron que la tinción para SVCT1 se distribuye totalmente en la periferia de la célula, patrón que es característico de una localización a nivel de membrana plasmática. Además, la expresión de SVCT1 en las células transfectadas no altera la localización intracelular característica de SVCT2 observada (Figura 18). De manera de confirmar la localización en membrana plasmática del transportador SVCT1 en las células transfectadas y descartar su presencia a nivel mitocondrial, se realizaron ensayos

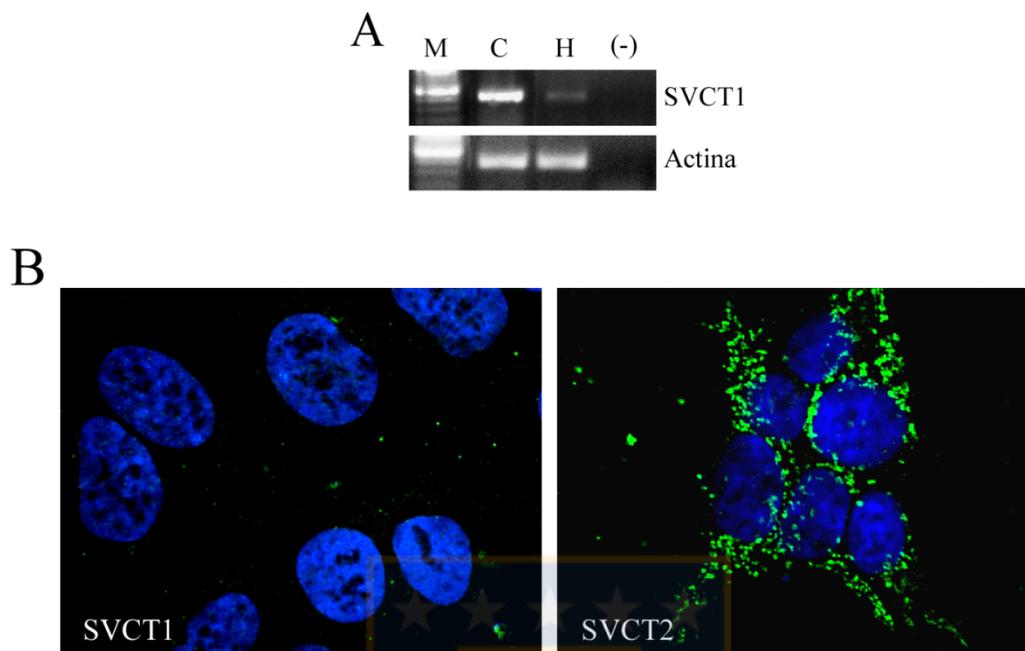


Figura 17. Análisis de la expresión del transportador SVCT1 en la línea celular HEK-293.

A. Análisis por RT-PCR de la expresión de SVCT1 en células HEK-293. Se analizó la presencia de SVCT1 utilizando partidores específicos y a partir de cDNA sintetizados desde RNA total extraído de células HEK-293 (H) y CaCo-2 (C) como control positivo. Como control interno se detectó la presencia de β -actina. M: marcador de peso molecular; (-): control negativo correspondiente a muestra sin RNA templado (agua). Los productos de PCR fueron separados en un gel de agarosa al 1% y visualizados por tinción con bromuro de etidio. **B.** Análisis por inmunofluorescencia de la expresión de SVCT1 en células HEK-293. Las células fueron crecidas sobre vidrios y ensayadas por inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo primario anti-SVCT1. Como control positivo se analizó la expresión de SVCT2. Se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados a FITC para la detección de ambos transportadores. Los núcleos fueron marcados con la tinción DAPI. Las fotografías se obtuvieron utilizando microscopía confocal con un aumento de 100X.

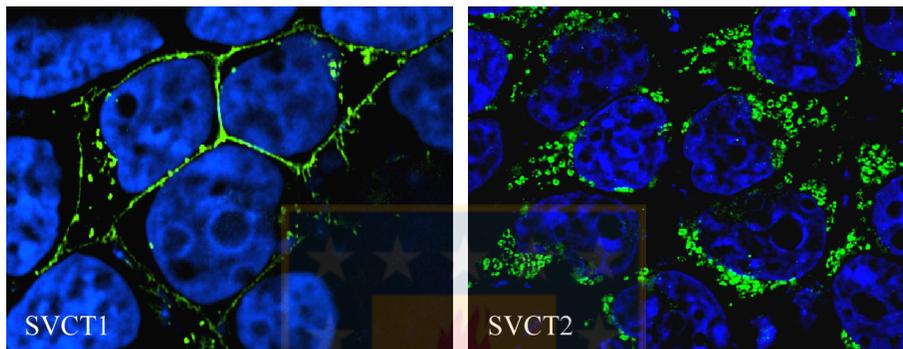


Figura 18. Análisis de la expresión de SVCT1 en células HEK-293 sobreexpresando el transportador.

Células HEK-293 fueron transfectadas con un plásmido codificando la secuencia completa de SVCT1 y posteriormente se analizó la expresión del transportador por medio de inmunofluorescencia, con un anticuerpo anti-SVCT1. Como control positivo se analizó la expresión de SVCT2. Se utilizó un anticuerpo secundario conjugado a FITC para la detección de ambos transportadores. Los núcleos fueron marcados con la tinción DAPI. Las fotografías se obtuvieron utilizando microscopía confocal con un aumento de 100X.

de colocalización entre SVCT1 y los siguientes marcadores de organelos: COXIV y Citocromo C como marcadores mitocondriales y GLUT1 como marcador de membrana plasmática. Las imágenes obtenidas por microscopía confocal mostraron una clara colocalización entre el transportador SVCT1 y GLUT1 en las células transfectadas, localizándose ambas proteínas en la periferia de la célula, y con ausencia de tinción de SVCT1 a nivel intracelular (Figura 19A). En este sentido, se encontró además una nula colocalización entre SVCT1 y los marcadores mitocondriales COXIV o Citocromo C. Estos mostraron el patrón perinuclear característico de las proteínas de localización mitocondrial, mientras SVCT1 mantuvo su localización en la periferia de la célula (Figuras 19B y 19C).

En conjunto, estos resultados demuestran que aunque el transportador SVCT1 se encuentra presente a nivel de RNA mensajero en las células HEK-293, no está expresado a nivel de proteína en estas células. Además, cuando se expresa SVCT1 de forma exógena por medio de transfección, el transportador se localiza a nivel de membrana plasmática, descartado así la participación de SVCT1 en el transporte de ácido ascórbico en la mitocondria.

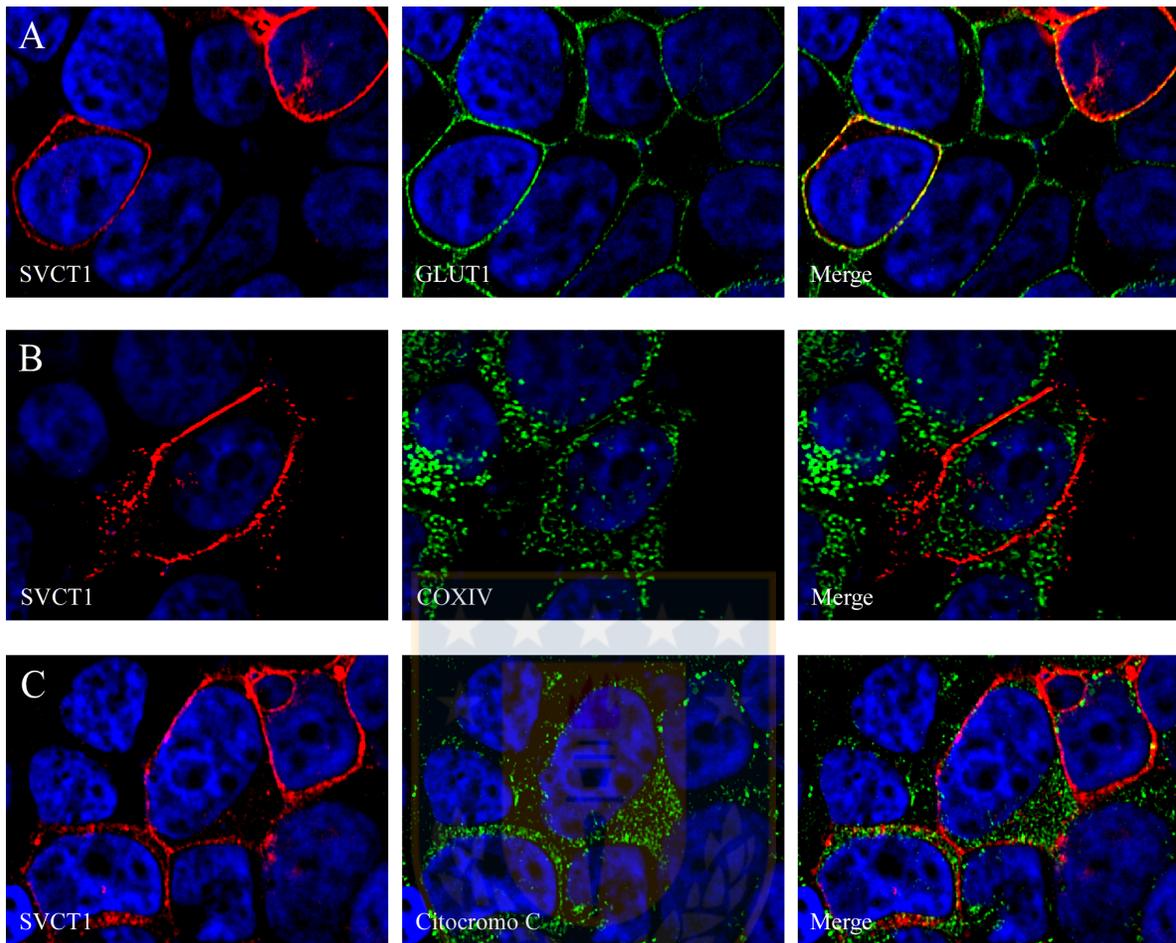


Figura 19. Localización subcelular de SVCT1 en células HEK-293 sobreexpresando el transportador.

Células HEK-293 fueron transfectadas con un plásmido codificando la secuencia completa de SVCT1 y posteriormente se realizaron ensayos de inmunofluorescencia de doble marcaje utilizando conjuntamente un anticuerpo anti-SVCT1 y anticuerpos contra los siguientes marcadores de organelos: proteína de membrana plasmática GLUT1 (**A**), proteína mitocondrial COXIV (**B**) y proteína mitocondrial Citocromo C (**C**). Se utilizó un anticuerpo secundario conjugado a Cy3 para SVCT1 y un anticuerpo conjugado a FITC para los marcadores de organelos. Los núcleos fueron marcados con la tinción DAPI. Las fotografías se obtuvieron utilizando microscopía confocal con un aumento de 100X.

11.3.2 Expresión y localización subcelular de los transportadores GLUT1 y GLUT10.

La evidencia actual indica que los transportadores de glucosa de clase I GLUT1, GLUT2, GLUT3 y GLUT4, y los de clase III GLUT8 y GLUT10 son eficientes transportadores de ácido deshidroascórbico (DHA). De éstos, GLUT1 y GLUT10 han sido propuestos como transportadores de vitamina C en la mitocondria (KC et al., 2005; Lee et al., 2010). Así, evaluamos la posible participación mitocondrial de estos transportadores en la línea celular HEK-293.

En primer lugar se realizaron ensayos de RT-PCR a partir de RNA mensajero de células HEK-293, de manera de estudiar la expresión de los transportadores GLUT de clase I y III. Los resultados de estos experimentos mostraron que las células HEK-293 son positivas para la expresión de GLUT1, y negativas para GLUT2, GLUT3 y GLUT4. Esto fue evidenciado por la presencia de un producto de amplificación del tamaño esperado para GLUT1 y ausencia de producto para GLUT2, GLUT3 y GLUT4. Como control positivo se utilizó cDNA sintetizado a partir de RNA de la línea celular CaCo-2, la cual fue positiva para los cuatro GLUT de clase I (Figura 20).

En el caso de los transportadores GLUT de clase III, los resultados en las células HEK-293 fueron menos contundentes que los anteriores. Nuevamente, como control positivo se utilizó cDNA sintetizado a partir de RNA de la línea celular CaCo-2, la cual fue positiva para los cuatro GLUT de clase III. Para el caso de GLUT6 y GLUT8, en las células HEK-293 se obtuvieron bandas poco definidas en comparación a las obtenidas para las células control, lo que hace difícil la

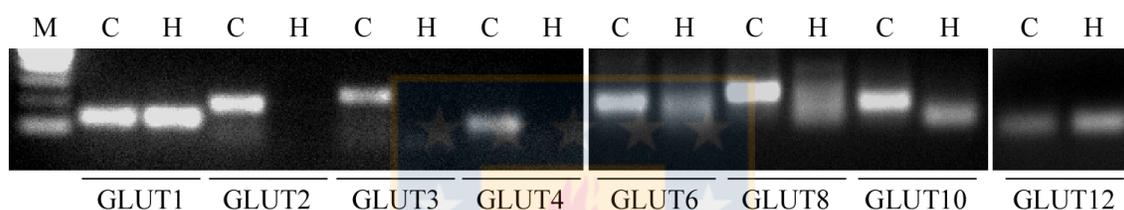


Figura 20. Expresión de los transportadores GLUT de clase I y III en la línea celular HEK-293.

Se realizaron ensayos de RT-PCR a partir de cDNA sintetizados desde RNA total extraído de células HEK-293 (H) y CaCo-2 (C) como control positivo. Utilizando partidores específicos, se analizó la expresión de los transportadores de glucosa de clase I GLUT1, GLUT2, GLUT3 y GLUT4, y los de clase III GLUT6, GLUT8, GLUT10 y GLUT12. Los productos de PCR fueron separados en un gel de agarosa al 1% y visualizados por tinción con bromuro de etidio. M: marcador de peso molecular.

interpretación de los resultados. A pesar de esto, los tamaños de los productos de amplificación son similares a los esperados, lo que nos permite proponer que las células HEK-293 son positivas para la expresión de GLUT6 y GLUT8. En el caso de GLUT10, se obtuvo un producto de amplificación de un tamaño menor al esperado, lo que indica que las células HEK-293 son negativas para la expresión de este transportador. Por último, las células HEK-293 fueron positivas para la expresión de GLUT12, lo que fue evidenciado por la presencia de un producto de amplificación del tamaño esperado para el transportador (Figura 20).

En conjunto, nuestros resultados indican que de los transportadores GLUT analizados, las células HEK-293 expresan GLUT1, GLUT6, GLUT8 y GLUT12 a nivel de RNA mensajero. Así, de los transportadores de DHA que se han descrito a nivel mitocondrial, las células HEK-293 expresan GLUT1, pero no GLUT10.

GLUT1 es una proteína ampliamente expresada que está presente en muchos tipos celulares a nivel de membrana plasmática, observación que hemos confirmado en diferentes líneas celulares y que nos ha permitido utilizar a GLUT1 como un marcador de membrana plasmática. Sin embargo, como ha sido recién mencionado, existe evidencia en literatura que propone la posible localización mitocondrial de GLUT1 (KC et al., 2005). De manera de esclarecer este punto, se realizaron ensayos de colocalización entre GLUT1 y los siguientes marcadores de organelos: COXIV y Citocromo C como marcadores mitocondriales y Calnexina como marcador de retículo endoplásmico. Además, también se ensayó una posible colocalización de GLUT1 con SVCT2. Las imágenes obtenidas por microscopía confocal confirmaron que la tinción para GLUT1 se distribuye totalmente en la periferia de la célula, patrón que es característico de una

localización a nivel de membrana plasmática. Además, se encontró una nula colocalización entre GLUT1 y los marcadores mitocondriales COXIV o Citocromo C, y también ausencia de colocalización entre GLUT1 y el marcador de retículo endoplásmico Calnexina. Por último, estos experimentos confirmaron que no existe colocalización entre GLUT1 y SVCT2, el que mostró su característico patrón mitocondrial (Figura 21).

Como un control adicional, las células fueron transfectadas con un plásmido codificando la secuencia completa de GLUT1 fusionada a la secuencia de GFP (GLUT1-GFP) y posteriormente se analizó la expresión del transportador SVCT2 y del marcador mitocondrial COXIV por medio de inmunofluorescencia. Estos experimentos mostraron que la proteína de fusión GLUT1-GFP se localiza totalmente en la periferia de la célula, con ausencia de marcaje a nivel intracelular. En este sentido, se encontró además una nula colocalización entre GLUT1 y el marcador mitocondrial COXIV. Por último, estos ensayos confirmaron que no existe colocalización entre GLUT1 y SVCT2, el que mostró su característico patrón mitocondrial (Figura 22).

Como un ensayo adicional para descartar la presencia de GLUT1 en la mitocondria de las células HEK-293, se realizaron ensayos de fraccionamiento celular y posterior western blot. Estos experimentos confirmaron la marcada expresión de SVCT2 en la fracción mitocondrial, y el importante enriquecimiento de la expresión del transportador en esta fracción en comparación al homogenizado inicial. Además, se confirma la correlación entre la expresión de SVCT2 y el marcador mitocondrial COXIV en las distintas fracciones (Figura 23).

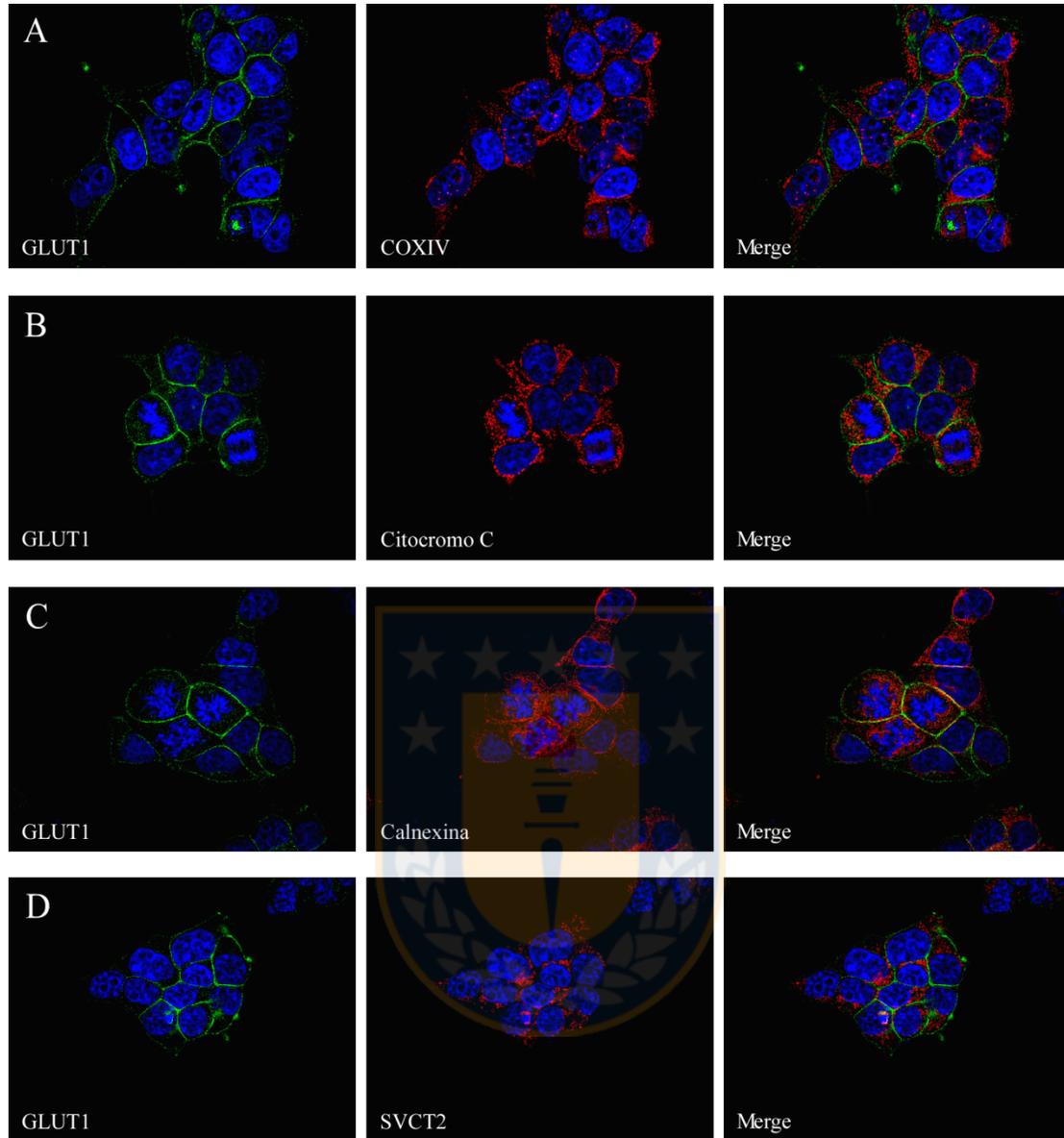


Figura 21. Localización subcelular del transportador GLUT1 en las células HEK-293.

La expresión de GLUT1 fue analizada por ensayos de inmunofluorescencia, utilizando conjuntamente un anticuerpo anti-GLUT1 y anticuerpos contra los siguientes marcadores de organelos: proteína mitocondrial COXIV (**A**), proteína mitocondrial Citocromo C (**B**) y proteína de retículo endoplásmico Calnexina (**C**). Además, también se analizó la colocalización entre GLUT1 y SVCT2 (**D**). Se utilizó un anticuerpo secundario conjugado a FITC para GLUT1 y un anticuerpo conjugado a Cy3 para los distintos marcadores. Los núcleos fueron marcados con la tinción DAPI. Las fotografías se obtuvieron utilizando microscopía confocal con un aumento de 60X.

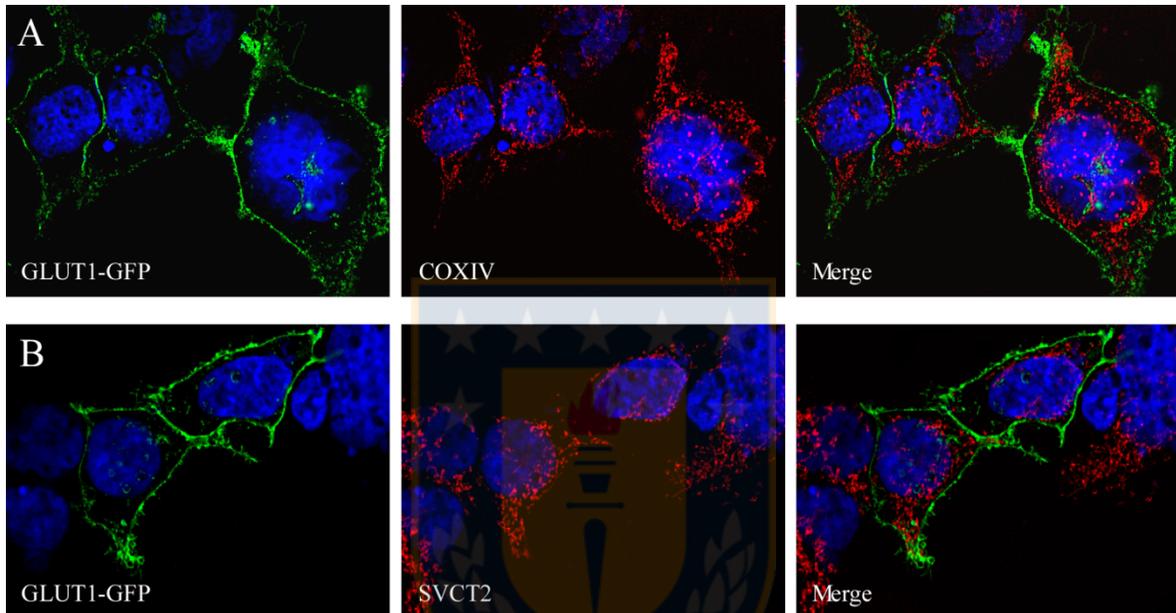


Figura 22. Localización subcelular de GLUT1 en células HEK-293 sobreexpresando el transportador.

Células HEK-293 fueron transfectadas con un plásmido codificando la secuencia completa de GLUT1 unida a GFP (GLUT1-GFP) y posteriormente se realizaron ensayos de inmunofluorescencia para analizar la expresión del marcador mitocondrial COXIV (**A**) y el transportador SVCT2 (**B**). Se utilizó un anticuerpo secundario conjugado a Cy3 para detectar las proteínas COXIV y SVCT2. Los núcleos fueron marcados con la tinción DAPI. Las fotografías se obtuvieron utilizando microscopía confocal con un aumento de 100X.

En contraste, GLUT1 mostró casi nula expresión en la fracción mitocondrial en comparación al homogenizado inicial; esta diferencia se hace aún más notable si comparamos la alta expresión de SVCT2 y la mínima expresión de GLUT1 en la fracción mitocondrial (Figura 23).

Aunque en los experimentos de fraccionamiento celular por centrifugación diferencial se obtienen fracciones mitocondriales altamente purificadas, éstas normalmente se encuentran contaminadas con membranas provenientes de retículo endoplásmico, conocidas como membranas asociadas a mitocondria (MAM) (Wieckowski et al., 2009). Esto puede ser evidenciado por la presencia del marcador de retículo endoplásmico Calnexina en la fracciones mitocondriales puras (Figura 8). De manera de ahondar en este punto, fracciones mitocondriales obtenidas como ha sido descrito previamente, fueron purificadas por medio de ultracentrifugación en un gradiente de Percoll para obtener una fracción mitocondrial libre de MAM (ultrapura). Posteriormente, las distintas fracciones fueron ensayadas por medio de western blot. Estos experimentos mostraron una ausencia total de la expresión de GLUT1 en la fracción mitocondrial ultrapura, así como también en la fracción de MAM (Figura 24). Por otro lado, SVCT2 mostró una marcada expresión en la fracción mitocondrial ultrapura, observándose incluso un enriquecimiento en comparación a la fracción mitocondrial inicial. Interesantemente, también es posible observar una expresión menor de SVCT2 en la fracción de MAM. La pureza de las fracciones obtenidas después del gradiente de Percoll fue verificada al analizar la expresión de calnexina, marcador que como era de esperar está presente en la fracción de MAM, mientras que se encuentra ausente en la fracción mitocondrial ultrapura (Figura 24).

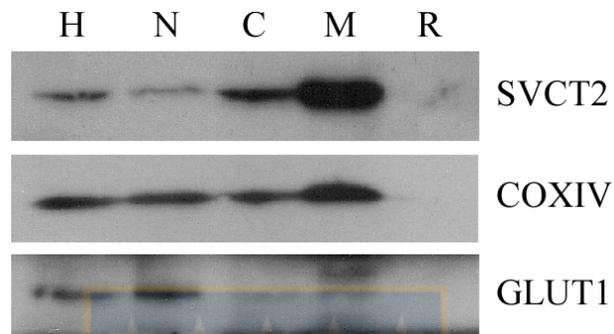


Figura 23. Expresión del transportador GLUT1 en fracciones subcelulares obtenidas de células HEK-293.

Se realizaron ensayos de fraccionamiento subcelular, purificación de mitocondrias y western blot en las distintas fracciones obtenidas. Se analizó la expresión del transportador GLUT1, del marcador mitocondrial COXIV y del transportador SVCT2. H: Homogenizado total; N: Fracción nuclear; C: Fracción citosólica; M: Fracción mitocondrial; R: Fracción de retículo endoplásmico.

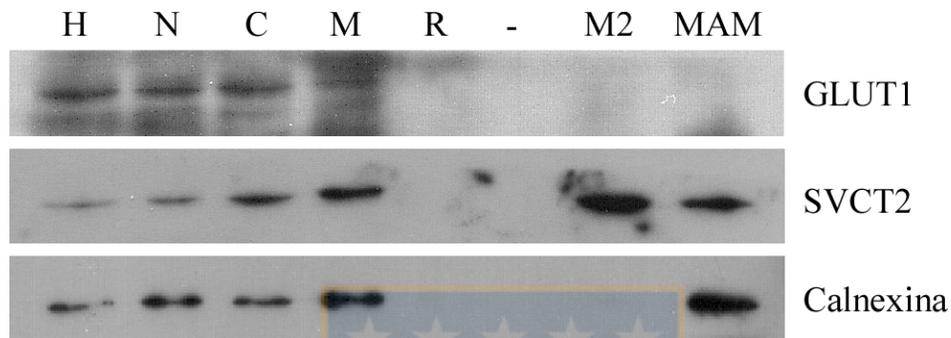


Figura 24. Expresión de los transportadores GLUT1 y SVCT2 en fracciones mitocondriales ultrapuras.

Se realizaron ensayos de fraccionamiento subcelular para obtener mitocondrias aisladas. Posteriormente, las fracciones mitocondriales fueron purificadas por medio de ultracentrifugación en un gradiente de Percoll, para obtener una fracción mitocondrial ultrapura, libre de la fracción de MAM. Se analizó por western blot la expresión del transportador GLUT1, del transportador SVCT2 y del marcador de retículo endoplásmico Calnexina, en las distintas fracciones obtenidas. H: Homogenizado total; N: Fracción nuclear; C: Fracción citosólica; M: Fracción mitocondrial; R: Fracción de retículo endoplásmico; (-): carril libre; M2: Fracción mitocondrial ultrapura; MAM: Fracción de MAM.

En conjunto, estos resultados nos permiten concluir que en las células HEK-293 el transportador GLUT1 (endógeno o exógenamente expresado) está localizado en la membrana plasmática celular y no está presente en la mitocondria, por lo tanto, no participa en el transporte mitocondrial de vitamina C. Por otro lado, los resultados de western blot en fracciones mitocondriales ultrapuras confirmaron que el transportador SVCT2 se expresa predominantemente en la mitocondria, y que interesantemente, también se encuentra presente en menor medida en las regiones MAM. Este hallazgo es compatible con los resultados de inmunofluorescencia iniciales, que revelaron una colocalización parcial de SVCT2 con un marcador de retículo endoplásmico.



12. DISCUSIÓN

Como objetivo de esta tesis nos propusimos estudiar la expresión y funcionalidad del transportador de ácido ascórbico SVCT2 a nivel mitocondrial. Existe muy poca evidencia en literatura que pudiese sugerir la presencia de este transportador a nivel de organelos, sin embargo, varios trabajos describen que SVCT2 se distribuye principalmente a nivel intracelular en distintos modelos celulares (García et al., 2005; Godoy et al., 2007; Angulo et al., 2008; Caprile et al., 2009; Gess et al., 2010; Nualart et al., 2012; Hong et al., 2012; Fulzele et al., 2013), lo que concuerda con resultados previos de nuestro laboratorio. Específicamente, estos estudios demostraron la localización mitocondrial del transportador SVCT2 en diversas líneas celulares de cáncer de mama (Muñoz, 2009). Esta evidencia nos llevó a proponer que SVCT2, clásicamente descrito como un transportador de membrana plasmática que media la captación de ácido ascórbico desde el medio extracelular, podría estar jugando un papel importante al interior de la célula, específicamente a nivel mitocondrial.

A pesar de la importancia fundamental del metabolismo redox mitocondrial bajo condiciones normales y patológicas, el transporte de vitamina C en la mitocondria es un tema que permanece confuso, con información controversial en cuanto a los transportadores involucrados. Aunque las primeras evidencias en relación a la captación de vitamina C mitocondrial fueron reportadas hace más de treinta años (Ingebretsen & Normann, 1982; Fujimoto et al., 1982), muchos detalles del transporte han sido descritos en el último tiempo. En este sentido, varios autores han propuesto que la vitamina C es ingresada a la mitocondria en

su forma oxidada, como ácido deshidroascórbico (DHA), para ser inmediatamente reducida y acumulada como ácido ascórbico (Xu et al., 1996; Li et al., 2001; Li et al., 2002; May et al., 2007). Siguiendo esta línea, dos trabajos han postulado a los transportadores GLUT como los responsables de la captación mitocondrial de vitamina C. Por una parte, un estudio realizado en fibroblastos de ratón y otras líneas celulares humanas proponen que GLUT1 sería el responsable del transporte de DHA en la mitocondria (KC et al., 2005), mientras que estudios en células musculares de aorta de ratón atribuyen el proceso de captación de DHA al transportador GLUT10 (Lee et al., 2010).

Aun cuando la vitamina C puede ingresar a la célula como DHA, la forma en la que se acumula en el medio intracelular es como ácido ascórbico, debido a la eficiente actividad de las deshidroascorbato reductasas intracelulares (Rivas et al., 2008). Por lo tanto, es muy probable (y conveniente en el contexto celular) que la captación mitocondrial de vitamina C ocurra a través de los transportadores SVCT. En este sentido, un trabajo reciente describió la localización mitocondrial del transportador SVCT2 en una línea celular de leucemia humana, y la capacidad de mitocondrias aisladas de estas células de transportar ácido ascórbico (Azzolini et al., 2013). Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente en nuestro laboratorio, que indicaban que SVCT2 se localiza a nivel mitocondrial en diversas líneas celulares de cáncer de mama (Muñoz, 2009). De esta manera, nos propusimos esclarecer el mecanismo por el cual la mitocondria adquiere vitamina C y determinar si el transportador SVCT2 está involucrado en este proceso. Para llevar a cabo este trabajo utilizamos como modelo de estudio la línea celular HEK-293, debido principalmente a dos razones. Primero, estudios preliminares

realizados en nuestro laboratorio indicaron que estas células expresan el transportador SVCT2, el que se distribuye predominantemente a nivel intracelular. Por otro lado, las células HEK-293 han mostrado ser una línea fácilmente transfectable, obteniéndose eficiencias de transfección superiores al 80%, lo que permite realizar una gran variedad de ensayos.

En conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis indican que las células HEK-293 expresan el transportador SVCT2 principalmente a nivel mitocondrial, que mitocondrias aisladas de estas células transportan ácido ascórbico, y que SVCT2 es el responsable de este transporte en la mitocondria. Esto fue determinado por medio de ensayos de PCR, western blot, inmunofluorescencia, microscopía confocal, fraccionamiento subcelular, transporte de ácido ascórbico en mitocondrias purificadas y silenciamiento de la expresión de SVCT2 por medio de RNA interferente (siRNA). Además, determinamos la localización submitocondrial específica de SVCT2, encontrando que el transportador es una proteína que se ubica en la membrana mitocondrial interna. Para esto utilizamos técnicas de microscopía de súper resolución, purificación de mitocondrias y western blot en mitoplastos. Por otro lado, descartamos en las células HEK-293 la presencia a nivel mitocondrial tanto de SVCT1 como de GLUT1 y GLUT10, previamente propuestos en literatura como transportadores mitocondriales de vitamina C. Esto fue determinado realizando ensayos de PCR, inmunofluorescencia, sobreexpresión de transportadores por medio de transfección, fraccionamiento subcelular y western blot en mitocondrias ultrapuras. Finalmente, a través de ensayos de inmunofluorescencia, determinamos que SVCT2 se localiza a nivel mitocondrial en un gran número de líneas celulares

humanas de distinto origen. Estos resultados nos permiten proponer que la expresión mitocondrial del transportador SVCT2 no es una propiedad particular de las células HEK-293, sino que es un fenómeno que podría ser compartido entre diferentes células, tejidos y órganos.

12.1. Localización mitocondrial del transportador SVCT2 en la línea celular HEK-293.

La caracterización inicial para la expresión del transportador SVCT2 en la línea celular HEK-293 reveló que estas células expresan SVCT2 tanto a nivel de RNA mensajero como a nivel de proteína. Estos resultados fueron sólidamente sustentados por ensayos de RT-PCR, western blot e inmunofluorescencia, y concuerdan con la evidencia existente indicando que las células HEK-293 expresan el transportador SVCT2 (KC et al., 2005; Nualart et al., 2012). Interesantemente, ensayos de inmunofluorescencia indicaron que el transportador SVCT2 muestra una localización eminentemente intracelular en estas células, observándose prácticamente nula expresión de SVCT2 a nivel de membrana plasmática. En este sentido, resultados obtenidos en ensayos de captación revelaron que las células HEK-293 transportan bajos niveles de ácido ascórbico, en un proceso dependiente de la presencia de sodio extracelular. La velocidad de transporte para las células HEK-293 es varias veces menor a la reportada para otros tipos celulares, como son las células de cáncer de colon CaCo-2 (Maulén et al., 2003), las células de melanoma SK-MEL (Godoy et al., 2007) y las células de Sertoli 42GPA9 (Angulo et al., 2008). En experimentos de captación similares a los

nuestros, estas líneas celulares acumulan altas concentraciones de ácido ascórbico a los 10 minutos de ensayo, llegando incluso a valores milimolares, lo que contrasta con los bajos niveles de ácido ascórbico acumulados por las células HEK-293 en ese tiempo de ensayo (145 pmol/10⁶ céls). De ser mediada esta captación de ácido ascórbico por SVCT2, la prácticamente nula expresión del transportador observada a nivel de membrana plasmática podría explicar la baja capacidad de transporte de ácido ascórbico de estas células. En este sentido, la marcada expresión intracelular de SVCT2 sugiere que el transportador juega un papel más importante al interior de la célula que en la membrana plasmática, lo que fue la motivación principal para el desarrollo de este trabajo.

El transportador SVCT2 ha sido descrito en varios tipos celulares como un transportador de membrana plasmática que media la captación de ácido ascórbico desde el medio extracelular hacia el interior de la célula. Sin embargo, cuando se analizan las imágenes para la inmunolocalización de SVCT2 publicadas en estos trabajos, en los cuales se asume la localización a nivel de membrana plasmática del transportador, es posible observar que la tinción anti-SVCT2 se distribuye principalmente a nivel intracelular (García et al., 2005; Godoy et al., 2007; Angulo et al., 2008; Caprile et al., 2009; Gess et al., 2010; Nualart et al., 2012; Hong et al., 2012; Fulzele et al., 2013). Nuestros resultados, indicando una localización predominantemente intracelular del transportador SVCT2, concuerdan claramente con lo observado en las imágenes de inmunolocalización para SVCT2 disponibles en literatura.

De manera de determinar la localización subcelular específica del transportador SVCT2 en las células HEK-293, se realizaron ensayos de

colocalización por inmunofluorescencia y microscopía confocal. Interesantemente, los resultados mostraron una marcada colocalización entre SVCT2 y las proteínas mitocondriales COXIV y Citocromo C, y revelaron una menor colocalización entre SVCT2 y un marcador de retículo endoplásmico. El análisis y procesamiento de un gran número de imágenes reveló un alto grado de colocalización entre SVCT2 y el marcador mitocondrial COXIV, lo que fue evidenciado por un coeficiente de Pearson de 0,8. Estos resultados nos permitieron proponer que el transportador SVCT2 es expresado principalmente a nivel mitocondrial en la línea celular HEK-293. Esto fue confirmado por los resultados obtenidos en ensayos de fraccionamiento subcelular, purificación de mitocondrias y posterior western blot, los que mostraron una marcada presencia de SVCT2 en la fracción mitocondrial obtenida, observándose además un importante enriquecimiento de la expresión del transportador en esta fracción en comparación al homogenizado inicial. Más interesante aún, se observó una clara correlación en la expresión del marcador mitocondrial COXIV y SVCT2 en las distintas fracciones. Estos resultados confirman lo observado en los ensayos de colocalización y demuestran que el transportador SVCT2 se localiza principalmente en la mitocondria en la línea celular HEK-293.

Los resultados recién descritos estableciendo la localización mitocondrial de SVCT2 se basan principalmente en estudios de colocalización por inmunofluorescencia y en ensayos de purificación de mitocondrias. Ambas metodologías han sido previamente utilizadas para demostrar la localización mitocondrial de un número importante de proteínas (Donahue et al., 2001; Bolte & Cordelieres, 2006; Hájek et al., 2007; Michel & Bakovic, 2009; Lapointe et al.,

2012), lo que apoya nuestras conclusiones en relación al transportador SVCT2. En este sentido, la utilización de la proteína COXIV como control para la localización mitocondrial está completamente sustentada, debido a que esta proteína ha sido clásicamente establecida como un marcador mitocondrial en una variedad de tipos celulares (Nair & McGuire, 2005; Hájek et al., 2007; Kar, et al. 2008; Shephard et al., 2014).

La localización mitocondrial del transportador SVCT2 no es un hecho particular de las células HEK-293. Esto fue demostrado en ensayos de inmunofluorescencia y microscopía confocal para otras nueve líneas celulares humanas de distinto origen, que incluyen cultivos primarios y líneas celulares inmortalizadas cancerígenas y no cancerígenas. Para todas las líneas celulares analizadas, la inmunoreactividad para el transportador SVCT2 se localiza a nivel intracelular, con una distribución similar al patrón mitocondrial observado en las células HEK-293. Es importante destacar que dentro de las líneas celulares analizadas se encuentran las células HUVEC, correspondientes a cultivos primarios de células endoteliales de vena umbilical. Estas células mostraron el mismo patrón de localización para SVCT2 que las demás líneas celulares, lo que indica que esta distribución intracelular característica del transportador no es producto del cultivo *in vitro* de células inmortalizadas. Por último, se realizaron ensayos de colocalización en tres de las líneas celulares analizadas: células endoteliales de vena umbilical HBMEC, células de melanoma GMEL y células de cáncer de mama ZR-75. Para las tres líneas celulares se observó una marcada colocalización entre SVCT2 y la proteína mitocondrial COXIV. Estos resultados permiten proponer que la expresión mitocondrial del transportador SVCT2 es una

propiedad que es compartida entre diferentes tipos celulares y tejidos. En este contexto, un minucioso análisis de las imágenes de inmunolocalización para SVCT2 disponibles en literatura revela que la tinción anti-SVCT2 intracelular observada en varios de los trabajos, muestra un patrón perinuclear que se asemeja al de nuestros resultados (García et al., 2005; Caprile et al., 2009; Gess et al., 2010; Nualart et al., 2012; Hong et al., 2012; Fulzele et al., 2013). En este sentido, publicaciones previas de nuestro laboratorio son también consistentes con los presentes resultados. Específicamente, en células de melanoma se observó una débil tinción anti-SVCT2 en la periferia celular (y sólo detectable en una pequeña fracción de células), con la mayoría de la tinción localizada intracelularmente (Godoy et al., 2007). Una situación similar fue observada en una línea celular de Sertoli de ratón y en cultivos primarios de células de Sertoli de rata, en las cuales la tinción anti-SVCT2 fue marcadamente intracelular (Angulo et al., 2008). En definitiva, podemos concluir que la localización mitocondrial del transportador SVCT2 observada en células HEK-293 es probablemente un fenómeno general entre diferentes células, tejidos y, posiblemente, especies.

Los resultados descritos en este trabajo establecen por primera vez de manera contundente la localización del transportador SVCT2 a nivel mitocondrial. La única evidencia que existía en relación a esto corresponde a los resultados sugiriendo la expresión mitocondrial de SVCT2 en células de leucemia humana (Azzolini et al., 2013), observación que es completamente consistente con nuestros resultados. Gran parte del trabajo descrito en esta tesis fue publicado por nuestro laboratorio recientemente (Muñoz-Montesino et al., 2014), generando un positivo impacto en el área del estudio de los transportadores de vitamina C. En

este sentido, durante el año 2015 se han publicado dos trabajos que apoyan sólidamente nuestros resultados. En uno de estos estudios, se demostró a través de ensayos de colocalización por inmunofluorescencia y western blot en mitocondrias aisladas que el transportador SVCT2 se localiza a nivel mitocondrial en la línea celular de leucemia humana U937 (Fiorani et al., 2015). Por otra parte, un análisis *in silico* utilizando ocho diferentes programas de predicción de localización subcelular de proteínas apoya también nuestros resultados. Estos programas de predicción, que se basan en el análisis de la secuencia aminoacídica de las proteínas estudiadas, entregaron altos valores de puntuación para la localización de SVCT2 a nivel mitocondrial (Szarka & Balogh, 2015).

12.2. Localización submitocondrial específica del transportador SVCT2.

Una vez establecido que el transportador SVCT2 se localiza en la mitocondria de las células HEK-293, la pregunta que surge inmediatamente es cuál es su localización submitocondrial específica. Principalmente, existen dos posibilidades para la localización del transportador SVCT2: membrana mitocondrial interna (MMI) o membrana mitocondrial externa (MME). Preliminarmente, dada las características de mayor selectividad de la MMI, podríamos predecir que el transportador SVCT2 se localiza en esta membrana. Esta premisa estaría apoyada por los resultados de colocalización y western blot en mitocondrias puras, ensayos en los cuales SVCT2 tuvo un comportamiento similar al del marcador mitocondrial COXIV, proteína localizada en la MMI. Sin embargo, son necesarios estudios más acabados para poder establecer la

localización submitocondrial de una proteína. Uno de estos, es el análisis de la expresión de la proteína en cuestión por medio de microscopía de súper resolución. A diferencia de la microscopía confocal, cuya resolución no es suficiente para resolver compartimientos submitocondriales, la microscopía de súper resolución es una herramienta que si tiene esta capacidad (Fallaize et al., 2015). Este tipo de estrategia ha sido utilizada exitosamente para determinar la localización submitocondrial de la proteína PINK1, la que mostró un comportamiento diferencial dependiendo de señales celulares específicas. Bajo condiciones fisiológicas normales, PINK1 se localiza en la MMI, pero en respuesta a la depolarización mitocondrial es translocada a la MME. Esto fue contundentemente demostrado utilizando microscopía de súper resolución (Fallaize et al., 2015).

Así, de manera de determinar la localización submitocondrial específica de SVCT2 en las células HEK-293, se realizaron ensayos de colocalización con marcadores mitocondriales específicos y posteriormente se analizaron las muestras por microscopía de súper resolución. Estos ensayos mostraron una clara diferencia entre el patrón de localización del marcador de MMI COXIV, el que es puntiforme y compacto, con el patrón de localización del marcador de MME TOM20, que es más fino y marca claramente los bordes de la red mitocondrial, delimitando una región interior que corresponde a la MMI y matriz mitocondrial. Estos resultados indican que la técnica de microscopía utilizada nos permite diferenciar claramente la localización de una proteína de MMI de la de una de MME. Los resultados para SVCT2 revelaron que el patrón de tinción para el transportador es mayoritariamente puntiforme, y más importante aún, muestra

cierto nivel de colocalización con el marcador de MMI COXIV, y prácticamente nula colocalización con el MME TOM20. Interesante es observar como la marca puntiforme de SVCT2 y COXIV está sobrepuesta en algunas regiones, intercalada en otras, y en definitiva, siguiendo el mismo patrón. Por otro lado, la marca para TOM20 envuelve a la de SVCT2, pudiéndose observar como los puntos bien definidos correspondientes a SVCT2 se encuentran en el interior de los límites demarcados por TOM20. La colocalización positiva entre SVCT2 y COXIV (y negativa entre SVCT2 y TOM20) fue corroborada por los perfiles de intensidad de fluorescencia para cada señal, demostrando finalmente que el transportador SVCT2 mitocondrial es una proteína localizada específicamente en la membrana mitocondrial interna en las células HEK-293.

Algo que resulta llamativo en nuestros resultados es que mientras el patrón de localización de TOM20 corresponde a líneas finas y continuas que claramente demarcan una estructura de membrana, el patrón de localización de SVCT2 y COXIV es compacto, grueso, y no define estructuras de tipo membrana. En un contexto celular, la disposición de las dos membranas mitocondriales no es paralela a lo largo de la periferia del organelo (Frey & Mannella, 2000). Basado en ensayos de microscopía electrónica y de súper resolución, se ha observado que mientras la MME sigue un patrón lineal y continuo (que podríamos describir como similar al de la membrana plasmática), la MMI se invagina repetidas veces hacia la matriz mitocondrial formando las crestas mitocondriales (Frey et al., 2002; Fallaize et al., 2015). Los muchos sitios de contacto entre las crestas mitocondriales dispuestas al interior del organelo, explican el patrón de localización observado para las proteínas de SVCT2 y COXIV.

Otra estrategia que permite determinar la localización submitocondrial de una proteína es la de obtener mitocondrias aisladas, separar la MME de la MMI y analizar la presencia de la proteína en estudio en cada subfracción. Un método clásicamente utilizado para este propósito es la digestión con el detergente digitonina, estrategia con la cual se ha podido determinar la localización submitocondrial de un gran número de proteínas (Nair & McGuire, 2005; Hájek et al., 2007; Divakaruni et al., 2013; Nishimura et al., 2014). La digitonina es un detergente con la propiedad de unirse y acomplejar el colesterol. Debido a que la MME tiene una mayor concentración de colesterol que la MMI, la digitonina causa la disrupción de la MME, manteniendo relativamente intacta la MMI (Graham et al., 1993). Así, este detergente permite generar mitoplastos, es decir, mitocondrias con la MMI intacta y carentes de MME. Utilizando esta metodología y por medio de ensayos de western blot, pudimos confirmar los resultados obtenidos por microscopía de súper resolución. Después de purificar mitocondrias desde células HEK-293 y tratarlas con concentraciones crecientes de digitonina, las muestras fueron centrifugadas para obtener las 2 subfracciones mitocondriales: mitoplastos (pellets) y MME (sobrenadantes). Ensayos de western blot confirmaron la marcada expresión de SVCT2 en la fracción mitocondrial (sin tratar) y su enriquecimiento en esta fracción en comparación al homogenizado inicial de células, resultado que fue casi idéntico al observado para el marcador de MMI COXIV y para el marcador de MME VDAC. En cuanto al tratamiento con digitonina, a medida que se aumentan las concentraciones de detergente, la expresión del marcador de MME VDAC va disminuyendo hasta llegar a niveles prácticamente despreciables a una concentración de 1,5 mg digitonina/mg proteína. Por otro lado, la expresión del

MMI COXIV se mantuvo inalterable a medida que se aumentan las concentraciones de detergente, lo que indica que la MMI se mantiene intacta incluso a concentraciones altas de digitonina. Estos resultados indican que a medida que se aumentan las concentraciones, el detergente va digiriendo la MME hasta llegar a una digestión casi completa a la concentración máxima utilizada. A esta concentración se obtienen mitoplastos intactos con una mínima presencia de MME, lo que concuerda con lo descrito en literatura en relación a la generación de mitoplastos por medio de digestión con digitonina (Nair & McGuire, 2005; Hájek et al., 2007; Divakaruni et al., 2013; Nishimura et al., 2014). Interesantemente, SVCT2 tuvo un comportamiento prácticamente idéntico al del marcador de MMI COXIV frente al tratamiento, manteniéndose su expresión inalterable a medida que se va perdiendo la MME. Esto demuestra que el transportador SVCT2 se encuentra presente en los mitoplastos obtenidos, y por lo tanto, es una proteína que se localiza específicamente en la membrana mitocondrial interna en las células HEK-293. Como era de esperar, estos resultados son totalmente concordantes con los observados en los ensayos de microscopía de súper resolución.

En base a los resultados recién descritos, un punto que se hace necesario discutir en este trabajo tiene relación con la destinación (sorting) e importe del transportador SVCT2 en la membrana mitocondrial interna. El genoma mitocondrial humano codifica para tan sólo 13 de las proteínas de este organelo. Todo el resto de las proteínas mitocondriales (más del 99%) incluyendo a SVCT2, son codificadas por el genoma nuclear y sintetizadas en ribosomas citosólicos en su forma precursora (Stojanovski et al., 2012). La presencia de señales de importe

en la secuencia aminoacídica y la ayuda de un sistema de chaperonas, guían la destinación de estas proteínas a la mitocondria. La puerta de entrada para todas las proteínas mitocondriales es el complejo TOM (*Translocase of the Outer Mitochondrial Membrane*), para luego ser destinadas a su localización submitocondrial final (Becker et al., 2012). Para el caso de las proteínas localizadas en la MMI, existen dos mecanismos de importe principales, en los cuales participan los complejos TIM (*Translocase of the Inner Mitochondrial Membrane*). El primero involucra la participación del complejo TIM23, y las señales de importe están presentes en el extremo N-terminal de la proteína translocada, caracterizado por la presencia de aminoácidos positivamente cargados, como arginina y lisina (Chacinska et al., 2009). El segundo mecanismo involucra la participación del complejo TIM22, y permite el importe de proteínas que carecen de secuencia señal en el N-terminal, y que en cambio, poseen señales de importe en regiones internas de su secuencia (Chacinska et al., 2009). Este es el caso de la familia de proteínas transportadoras (carriers) mitocondriales SLC25, las que median el intercambio de metabolitos a través de la MMI y que se caracterizan por llevar el motivo o firma molecular Px[D/E]xx[K/R] dentro de su secuencia (Palmieri et al., 2014). Al ser altamente conservado, este motivo ha sido también estudiado en el contexto del importe de estas proteínas en la MMI. En este sentido, existe evidencia indicando que en el transportador mitocondrial de dicarboxilato esta secuencia es indispensable para su translocación desde el citosol a la mitocondria (Zara et al., 2007). En base a todos estos antecedentes, la secuencia aminoacídica de SVCT2 fue analizada para determinar la presencia de señales de importe mitocondrial. Por una parte, este análisis reveló que el extremo N-terminal

de SVCT2 posee pocos aminoácidos positivamente cargados, característicos de la señal de importe mitocondrial mediado por TIM23. Sin embargo, los ensayos *in silico* de Szarka y Balogh apoyando la presencia de SVCT2 en la mitocondria, utilizaron la secuencia N-terminal del transportador para su análisis (Szarka & Balogh, 2015). Esto apoyaría la idea de que SVCT2 pueda ser importado a la MMI por un mecanismo mediado por TIM23. Más interesante aún, nuestro análisis de la secuencia de SVCT2 reveló que la firma molecular que caracteriza a la familia de carriers SLC25 está presente en el transportador. Esta evidencia plantea de manera sólida la posibilidad de que el importe de SVCT2 a la MMI sea mediado por TIM22, a través de un mecanismo similar al de los carriers mitocondriales. De todas formas, resulta completamente necesario un análisis experimental acabado para elucidar el mecanismo involucrado en el importe mitocondrial del transportador SVCT2.

12.3. Funcionalidad del transportador SVCT2 mitocondrial.

La localización mitocondrial del transportador SVCT2 sugiere inmediatamente su participación en la captación de ácido ascórbico en este organelo. De manera de determinar si SVCT2 mitocondrial es un transportador funcional, se realizaron ensayos de transporte de ácido ascórbico en mitocondrias aisladas desde células HEK-293. Un punto importante que fue considerado al diseñar estos experimentos fue realizar los ensayos en un medio de transporte que recrea las condiciones iónicas intracelulares (bajo sodio, alto potasio). Esta consideración es importante, ya que un contexto celular, la mitocondria se

encuentra expuesta a concentraciones iónicas características que son relevantes para su función. En este sentido, de los trabajos que han propuesto la capacidad de la mitocondria de captar vitamina C, ninguno ha considerado usar condiciones iónicas similares al medio intracelular en sus ensayos en mitocondrias aisladas (Ingebretsen & Normann., 1982; Fujimoto et al., 1982; Xu et al., 1996; Li et al., 2001; Li et al., 2002; May et al., 2007; KC et al., 2005; Lee et al., 2010; Azzolini et al., 2013; Guidarelli et al., 2013). Varios de estos trabajos muestran experimentos de transporte realizados en la misma solución en la que se obtienen las mitocondrias después del proceso de fraccionamiento (con presencia de Hepes, sacarosa, y/o EDTA). Estas soluciones, aunque adecuadas para mantener la integridad mitocondrial, carecen de un componente fisiológico fundamental como son las concentraciones intracelulares de los iones sodio y potasio. Para el caso de los trabajos que postulan a GLUT1 y GLUT10 como transportadores mitocondriales de vitamina C se utilizó el mismo medio de transporte, consistente en una alta concentración de sodio y una baja concentración de potasio (KC et al., 2005; Lee et al., 2010). La composición de este medio es similar a la que hemos definido en nuestro laboratorio como “medio extracelular”, utilizado para realizar estudios de transporte a nivel de la membrana plasmática. (Godoy et al., 2007; Ormazabal et al., 2010; Muñoz-Montesino et al., 2014). En definitiva, la evidencia existente en cuanto a la captación de vitamina C por la mitocondria nos muestra que no se ha considerado un aspecto fundamental en el estudio del transporte de moléculas a nivel intracelular, que es el microambiente iónico al cual se encuentran expuestos los distintos organelos. Por lo tanto, resulta fundamental ensayar el transporte de vitamina C mitocondrial en condiciones iónicas

intracelulares, de manera que las conclusiones que se obtengan puedan traducirse en información que realmente contribuya a dilucidar los mecanismos involucrados en este proceso.

Nuestros resultados muestran que mitocondrias aisladas de células HEK-293 transportan ácido ascórbico en una manera dependiente del tiempo. Interesantemente, la curva de concentración-respuesta mostró una forma sigmoideal y un coeficiente de Hill de 2,1, lo que es indicativo de una interacción cooperativa entre al menos dos sitios de unión a ácido ascórbico en el transportador. Además, el análisis reveló la participación de un único componente cinético asociado al transporte, entregando un valor de K_m aparente para el transporte de ácido ascórbico de 600 μM . En definitiva, los experimentos de transporte en mitocondrias aisladas demostraron que éstas transportan ácido ascórbico en una manera consistente con la participación de un sistema de transporte que es saturable y que corresponde a un transportador de ácido ascórbico de baja afinidad. Las propiedades cinéticas de transporte obtenidas difieren claramente de las descritas para SVCT2, el cual ha sido caracterizado como un transportador de ácido ascórbico de alta afinidad, con una K_m varias veces menor (20-30 μM) a la encontrada para mitocondrias aisladas, y una curva de concentración-respuesta hiperbólica para el transporte de ácido ascórbico.

En base a los resultados anteriores, surgió la interrogante acerca de si es SVCT2 u otro transportador el responsable del transporte de ácido ascórbico en la mitocondria. La evidencia actual indica la existencia de dos transportadores de ácido ascórbico en humanos, las proteínas SVCT1 y SVCT2. La familia SLC23 consiste en cuatro miembros, los genes SLC23A1, SLC23A2, SLC23A3 y

SLC23A4, de los cuales se conoce que los genes SLC23A1 y SLC23A2 codifican para las proteínas SVCT1 y SVCT2, respectivamente (Eck et al., 2004). No se ha identificado una proteína completa (full-length) como producto del gen SLC23A3, y el gen SLC23A4 no está expresado en humanos, aunque en rata codifica para un transportador de nucleósidos incapaz de transportar ácido ascórbico (Takanaga et al., 2004; Linster et al., 2007; Rivas et al., 2008). Aunque algunas variantes de SVCT1 y SVCT2 han sido descritas, ninguna cumple con los requerimientos estructurales mínimos para ser un transportador funcional (Eck et al., 2004). En definitiva, SVCT1 y SVCT2 son los principales candidatos para ser los responsables del transporte mitocondrial de ácido ascórbico. Dada la sólida evidencia en cuanto a la localización mitocondrial de SVCT2, nos propusimos determinar si el transporte de ácido ascórbico mitocondrial es mediado por este transportador. Para esto, se realizaron ensayos de silenciamiento de la expresión de SVCT2 utilizando RNA interferente (siRNA), para después analizar el transporte de ácido ascórbico mitocondrial. Los análisis por inmunofluorescencia y western blot en células transfectadas con siRNA indicaron que se logró un efectivo silenciamiento de la expresión de SVCT2 bajo las condiciones utilizadas. En este sentido, ensayos de western blot en mitocondrias aisladas desde células transfectadas con siRNA contra SVCT2 mostraron una marcada disminución en la expresión del transportador en comparación a las mitocondrias de células control. Más importante aún, el silenciamiento de la expresión mitocondrial de SVCT2 observado se correlaciona con una marcada disminución en el transporte de ácido ascórbico mitocondrial. Es decir, las mitocondrias con una baja expresión de SVCT2 tienen una menor capacidad de transporte de ácido ascórbico. En

conjunto, estos resultados entregan evidencia consistente que confirma la identidad de SVCT2 como el transportador responsable de la captación de ácido ascórbico mitocondrial en las células HEK-293.

Un punto central en la discusión de este trabajo es el hecho de que SVCT2 mitocondrial funciona como un transportador de baja afinidad, evidenciado por una curva de concentración-respuesta con forma sigmoideal consistente con una interacción cooperativa, y con una K_m aparente para el transporte de ácido ascórbico de 600 μM . Es decir, SVCT2 mitocondrial muestra propiedades cinéticas de transporte que difieren claramente de las que han sido descritas para este transportador de forma clásica, el cual ha sido caracterizado como un transportador de ácido ascórbico de alta afinidad. Una forma de abordar esta discrepancia es analizar los datos existentes tanto en literatura como los obtenidos por nuestro laboratorio. Las propiedades cinéticas de SVCT2 han sido caracterizadas en distintos modelos celulares que expresan de forma endógena el transportador en membrana plasmática y principalmente, en sistemas exógenos de sobreexpresión de SVCT2 clonado (Savini et al., 2008). Cuando células en cultivo son transfectadas con un plásmido codificando la secuencia completa de SVCT2 fusionada a la proteína fluorescente verde (SVCT2-GFP), las células muestran un alto nivel de sobreexpresión de SVCT2-GFP en la periferia celular, consistente con una localización a nivel de membrana plasmática (Muñoz-Montesino et al., 2014). La ubicación periférica de esta proteína de fusión se debe probablemente a la interrupción de la destinación (sorting) subcelular normal de SVCT2 por la presencia del epítipo GFP (Varma et al., 2009; Kuo et al., 2013; Stadler et al., 2013). Este mismo fenómeno ha sido observado cuando se

sobreexpresa SVCT2 unido a otros epítopes o al propio GFP en diferentes modelos celulares, la que es una de las razones por las cuales SVCT2 ha sido definido como un transportador de membrana plasmática (Savini et al., 2008).

Como se mencionó anteriormente, desde que SVCT2 fue descrito por primera vez, sus propiedades cinéticas han sido establecidas principalmente utilizando sistemas de sobreexpresión. Por lo tanto, una pregunta importante que surge de este trabajo es si las alteradas propiedades cinéticas que observamos en SVCT2 mitocondrial son una propiedad intrínseca del transportador o se deben a su localización en la mitocondria. En este sentido, importantes resultados fueron publicados por nuestro laboratorio recientemente, en los que se realizaron ensayos de transporte de ácido ascórbico en células HEK-293 sobreexpresando SVCT2-GFP en la membrana plasmática (Muñoz-Montesino et al., 2014). Estos experimentos indican que el transportador muestra las propiedades cinéticas esperadas para SVCT2 cuando los ensayos se realizan bajo condiciones iónicas extracelulares (alto sodio y bajo potasio), funcionando como un transportador de ácido ascórbico de alta afinidad. Interesantemente, cuando estos ensayos se realizan bajo condiciones iónicas intracelulares (bajo sodio y alto potasio), SVCT2 funciona como un transportador de ácido ascórbico de baja afinidad, evidenciado por una curva de concentración-respuesta con forma sigmoideal y una K_m aparente para el transporte de ácido ascórbico de alrededor de 600-700 μM (Muñoz-Montesino et al., 2014). Estos resultados, obtenidos para SVCT2 localizado en membrana plasmática pero expuesto a condiciones iónicas intracelulares, son completamente consistentes con los resultados obtenidos para el transporte de ácido ascórbico en mitocondrias aisladas. En conjunto, tanto los resultados de

transporte presentados en este trabajo como los descritos previamente para SVCT2 sobreexpresado en membrana plasmática, nos permiten concluir que los cambios observados en las propiedades cinéticas y funcionales de SVCT2 se deben a la composición del microambiente iónico al cual se encuentra expuesto y no a su localización subcelular como tal. Esta conclusión es totalmente compatible con el conocimiento actual acerca de las propiedades cinéticas de SVCT2. El transportador de membrana plasmática es cooperativamente activado por Na^+ , un efecto usualmente caracterizado por dos parámetros que son centrales en esta discusión, un $n\text{H}$ cercano a 2 y un valor Na^+_{50} de aproximadamente 35 mM (Godoy et al., 2007). Más importante aún, el efecto neto del Na^+ en la función de SVCT2 es inducir una marcada disminución en la K_m de transporte de ácido ascórbico, desde valores en el rango milimolar a concentraciones de Na^+ de alrededor de 5 mM, hasta un valor cercano a 20 μM a concentraciones de Na^+ mayores a 60 mM (Godoy et al., 2007). Cuando la función de SVCT2 es ensayada bajo condiciones iónicas conteniendo una concentración de Na^+ de 135 mM, característica del medio extracelular, el resultado es un transportador con las propiedades funcionales y cinéticas clásicamente reportadas por diversos laboratorios hasta la fecha (Savini et al., 2008). Los resultados consenso indican que SVCT2 de membrana plasmática es un transportador de ácido ascórbico de alta afinidad con una K_m aparente en el rango de 20 a 30 μM . En contraste con esto, y consistente con predicciones previas de nuestro laboratorio, cuando el transporte es realizado en condiciones iónicas conteniendo concentraciones de Na^+ de 15 mM, característica del medio intracelular, el resultado es un transportador de ácido ascórbico de baja afinidad con una K_m aparente de alrededor de 600 μM .

Otro punto importante que fue descrito en nuestra última publicación es el rol del potasio en la modulación de las propiedades funcionales de SVCT2 (Muñoz-Montesino et al., 2014). Primeramente, los resultados obtenidos en células HEK-293 sobreexpresando SVCT2-GFP confirman que la presencia de Na⁺ es esencial para mantener la actividad de transporte de SVCT2. Por otro lado, los resultados indican que el K⁺, a concentraciones usualmente encontradas en el medio intracelular (135 mM), es un potente inhibidor de la función de SVCT2, mostrando nula capacidad de transporte a concentraciones de ácido ascórbico menores a 100 μM. Interesantemente, el efecto inhibitorio del K⁺ disminuye a medida que se aumentan las concentraciones de ácido ascórbico, con el resultado que la curva de concentración-respuesta es sigmoideal mientras la inhibición del K⁺ es progresivamente superada a concentraciones más altas de ácido ascórbico (Muñoz-Montesino et al., 2014). En otras palabras, a concentraciones bajas de ácido ascórbico el transporte mediado por SVCT2 es inhibido por K⁺, mientras que el transportador es completamente activo a concentraciones altas de ácido ascórbico, como son las encontradas en el medio intracelular. Este fenómeno es el mismo que podemos observar en los ensayos de transporte de ácido ascórbico en mitocondrias aisladas presentados en este trabajo.

La forma sigmoideal de la curva de concentración de ácido ascórbico bajo condiciones iónicas intracelulares (bajo sodio y alto potasio), versus la forma hiperbólica observada bajo condiciones iónicas extracelulares (alto sodio y bajo potasio) entrega información crucial en cuanto a las propiedades funcionales del transportador SVCT2 intracelular y tiene implicaciones importantes para entender los mecanismos regulatorios que permiten la acumulación de altas

concentraciones de ácido ascórbico y la capacidad de organelos como la mitocondria para adquirir vitamina C. Diversos estudios han entregado evidencia indicando que la mayoría de las células contienen elevadas concentraciones intracelulares de ácido ascórbico, en un rango que varía desde 200 μM a 5 mM (Levine et al., 1996; Levine et al., 1999). Por lo tanto, un transportador mitocondrial con una K_m aparente de ácido ascórbico de 20 μM o menos podría funcionar a máxima velocidad a una concentración de ácido ascórbico de 200 μM y no sería capaz de responder a un incremento en la concentración de ácido ascórbico intracelular. Por otro lado, un transportador mitocondrial con una K_m aparente de ácido ascórbico de 600 μM o más si puede responder a variaciones en el rango de concentraciones de ácido ascórbico intracelular, resultando en un incremento en la tasa de transporte junto con el aumento de las concentraciones de ácido ascórbico. En otras palabras, en un contexto celular, no resulta razonable (ni conveniente) que el transportador SVCT2 mitocondrial presente las mismas propiedades cinéticas que SVCT2 de membrana plasmática (alta afinidad, bajo valor de K_m), ya que el transportador estaría saturado por las altas concentraciones de ácido ascórbico presentes en el medio intracelular. Así, un transportador con las propiedades cinéticas encontradas en este trabajo (baja afinidad, alto valor de K_m) se ajusta completamente a lo esperado para un transportador de ácido ascórbico localizado en la mitocondria. En definitiva, bajo condiciones iónicas intracelulares, SVCT2 es un transportador de ácido ascórbico de baja afinidad con una aumentada K_m aparente de transporte, y que es completamente efectivo a las concentraciones intracelulares de ácido ascórbico presentes en la mayoría de las células.

Un punto importante a discutir en este trabajo es cuál es la función que cumpliría el ácido ascórbico al interior de la mitocondria y por lo tanto, cual es la importancia de la localización mitocondrial del transportador SVCT2 en un contexto celular. La respuesta más probable a esta interrogante es que la función del ácido ascórbico mitocondrial tiene relación con la naturaleza misma de este nutriente. La vitamina C es un potente antioxidante, capaz de reducir el estrés oxidativo celular y disminuir las mutaciones génicas inducidas por especies reactivas del oxígeno (ROS) (Lutsenko et al., 2002, Lee et al., 2010). En este sentido, la mitocondria es el principal organelo generador de ROS como productos secundarios del proceso normal de respiración celular. Las ROS producidas en la mitocondria pueden comprometer la integridad de las membranas de este organelo y producir serios daños a nivel del DNA mitocondrial (mtDNA), el que codifica para proteínas indispensables en el funcionamiento de la cadena respiratoria y la producción de ATP (Orrenius et al., 2007; Kowaltowski et al., 2009). Así, en la actualidad se considera que la presencia de antioxidantes como la vitamina C a nivel mitocondrial serían cruciales para la neutralización efectiva de estas especies oxidantes. En relación a esto, ha sido demostrado que el ácido ascórbico protege al mtDNA de la formación de aductos y quiebres inducidos por agentes oxidantes (KC et al., 2005; Jarrett et al., 2006). Además, existe evidencia indicando que el ácido ascórbico mitocondrial previene la depolarización de la membrana mitocondrial y la consiguiente liberación de citocromo C en varios modelos celulares expuestos a estímulos oxidantes, lo que propone que el ácido ascórbico mitocondrial ejerce un efecto anti-apoptótico a través de la neutralización de ROS (Bánhegyi et al., 2014; Guidarelli et al., 2015). En definitiva,

el ácido ascórbico mitocondrial juega un papel fundamental en la defensa antioxidante de este organelo, lo que le da sustento a nuestros resultados describiendo la existencia de un transportador SVCT2 mitocondrial funcional.

12.4. Participación de otros transportadores en la captación mitocondrial de vitamina C.

Los resultados en cuanto a la localización subcelular de SVCT2, transporte de ácido ascórbico mitocondrial y silenciamiento con siRNA demostraron de manera contundente que SVCT2 es el transportador responsable de la captación mitocondrial de ácido ascórbico. A pesar de esto, quisimos evaluar la participación de otros transportadores de vitamina C en la mitocondria, basados en la evidencia existente en literatura y que propone la participación de algunos transportadores GLUT a nivel mitocondrial (KC et al., 2005; Lee et al., 2010).

Antes de realizar los ensayos de silenciamiento de la expresión de SVCT2 con la consiguiente disminución en el transporte mitocondrial de ácido ascórbico, la identidad del transportador responsable de este proceso no estaba clara. Los resultados indicando que mitocondrias aisladas transportan ácido ascórbico con una K_m mucho más alta que la descrita para SVCT2, abría la posibilidad de que fuera el transportador SVCT1 el responsable de este proceso. Esto considerando que la K_m para el transporte de ácido ascórbico mediada por SVCT1 varía en un rango de concentraciones más altas (75-250 μM) que la de SVCT2 (8-60 μM) (Savini et al., 2008). Por otro lado, las células HEK-293 son de origen renal, y es sabido que el riñón expresa SVCT1 (Savini et al., 2008), por lo que el análisis de la

expresión de este transportador en nuestro modelo de estudio se hacía completamente necesario. Los resultados de PCR indicaron que las células HEK-293 son positivas para la expresión de SVCT1, sin embargo, el producto de amplificación detectado para el transportador es bastante débil en comparación al observado en las células control CaCo-2. Se realizaron repeticiones de estos experimentos en varios cultivos de células HEK-293, usando tres pares de partidores específicos para distintos exones de la secuencia de SVCT1. Estos resultados mostraron una débil expresión de SVCT1 en relación a las células control CaCo-2, observándose incluso ausencia de producto de amplificación en algunos de los ensayos (datos no mostrados). En definitiva, podemos concluir que las células HEK-293 muestran una baja expresión de SVCT1 a nivel de RNA mensajero. Interesantemente, ensayos de inmunofluorescencia revelaron ausencia de tinción anti-SVCT1 en las células HEK-293, bajo condiciones en las que se observa la esperada tinción intracelular para SVCT2. Lo mismo ocurrió en ensayos de western blot, donde tampoco se detectó la presencia de SVCT1 en esta línea celular (datos no mostrados). En definitiva, nuestros resultados indican que las células HEK-293 presentan una baja expresión de SVCT1 a nivel de RNA mensajero y que este transportador no se expresa a nivel de proteína. Ensayos adicionales demostraron que al sobreexpresar SVCT1 por medio de transfección, el transportador se localiza en la periferia de la célula, patrón que es característico de una localización a nivel de membrana plasmática. Esto fue confirmado por ensayos de inmunofluorescencia donde se observa que SVCT1 sobreexpresado colocaliza con el marcador de membrana plasmática GLUT1. Al contrario, se detectó una nula colocalización entre SVCT1 y los marcadores mitocondriales

COXIV o Citocromo C. Por último, estos ensayos revelaron que la sobreexpresión de SVCT1 no altera la localización intracelular característica de SVCT2. En conjunto, nuestros resultados demuestran de manera contundente la ausencia de SVCT1 en la mitocondria de las células HEK-293, y por consiguiente, descartan su participación en el transporte de ácido ascórbico mitocondrial. Estos resultados fueron confirmados recientemente por los estudios *in silico* realizados por Szarka y Balogh, los que describieron muy bajos valores de puntuación para la localización de SVCT1 en la mitocondria (Szarka & Balogh, 2015).

La evidencia actual indica que los transportadores de glucosa GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT4, GLUT8 y GLUT10 son transportadores de ácido deshidroascórbico (DHA), con publicaciones que postulan a GLUT1 y GLUT10 como transportadores de vitamina C en la mitocondria. Mientras los datos que apoyan la presencia de GLUT10 a nivel mitocondrial son sólidos (Lee et al., 2010), la localización mitocondrial de GLUT1 no está completamente sustentada (KC et al., 2005). De manera de estudiar la presencia de estos transportadores en las células HEK-293, realizamos un análisis de la expresión de los transportadores GLUT de clase I y III por RT-PCR. Los resultados de estos experimentos mostraron que las células HEK-293 expresan GLUT1, GLUT6, GLUT8 y GLUT12 a nivel de RNA mensajero. Así, de los transportadores de DHA que se han descrito a nivel mitocondrial, estas células expresan GLUT1, pero no GLUT10.

GLUT1 es una proteína ampliamente expresada que está presente en muchos tipos celulares a nivel de membrana plasmática, observación que hemos confirmado en diferentes líneas celulares y que nos ha permitido utilizar a GLUT1 como un marcador de membrana plasmática. Esto contrasta con la evidencia que

propone la posible localización mitocondrial de GLUT1 (KC et al., 2005). De manera de esclarecer este punto, se realizaron ensayos de colocalización entre el transportador GLUT1 y distintos marcadores de organelos. Nuestros resultados muestran que GLUT1 se localiza en la periferia de la célula, patrón que es característico de una localización a nivel de membrana plasmática. Además, se encontró una nula colocalización entre GLUT1 y los marcadores mitocondriales COXIV o Citocromo C, y también ausencia de colocalización entre GLUT1 y el marcador de retículo endoplásmico Calnexina. Más importante aún, estos ensayos confirmaron que no existe colocalización entre GLUT1 y el transportador SVCT2 mitocondrial. Lo mismo ocurrió cuando se sobreexpresó la proteína de fusión GLUT1-GFP, la que mostró localización a nivel de membrana plasmática, y nula colocalización con el transportador SVCT2 y con el marcador mitocondrial COXIV. A pesar de los resultados contundentes en relación a la ausencia de GLUT1 en la mitocondria recién descritos, ensayos de fraccionamiento subcelular y posterior western blot mostraron una mínima expresión de GLUT1 en la fracción mitocondrial. Aunque la presencia de GLUT1 en esta fracción podría ser interpretada como despreciable, decidimos analizar con más detalle si esto se debe a contaminación de las mitocondrias con componentes de otras fracciones subcelulares. Así, cuando las mitocondrias fueron ensayadas por ultracentrifugación en un gradiente de Percoll para obtener una fracción mitocondrial ultrapura, no se detectó la presencia de GLUT1. En conjunto, estos resultados nos permiten concluir que en las células HEK-293 el transportador GLUT1 (endógeno o exógenamente expresado) está localizado en la membrana plasmática celular y no está presente en la mitocondria, por lo tanto, descartamos

su participación en el transporte mitocondrial de vitamina C. Estos resultados, y otros similares obtenidos en nuestro laboratorio en diferentes líneas celulares, apoyan consistentemente la utilización de GLUT1 como un marcador de membrana plasmática.

En lo que se refiere a GLUT10, la evidencia que apoya la localización mitocondrial de este transportador en células especializadas es contundente, sin embargo, los datos en cuanto a sus propiedades funcionales y cinéticas son escasos (Lee et al., 2010). Los resultados de nuestro trabajo en relación a este transportador se limitan a la demostración de que no está expresado en células HEK-293, y que por lo tanto, GLUT10 no participa en el transporte mitocondrial de vitamina C en estas células.

En relación a los otros transportadores GLUT encontramos que, además de GLUT1, también GLUT6, GLUT8 y GLUT12 son expresados a nivel de RNA mensajero en las células HEK-293. En este sentido, GLUT8 es un transportador de DHA cuya localización subcelular está limitada a endosomas tardíos y lisosomas, y se encuentra ausente en la mitocondria (Augustin et al., 2005; Schmidt et al., 2009). Por otro lado, GLUT6 y GLUT12 son transportadores intracelulares cuya localización subcelular específica no ha sido completamente elucidada, y de los que aún se desconoce si son transportadores de DHA (Pyla et al., 2013).

12.5. Expresión del transportador SVCT2 en el retículo endoplásmico.

Los resultados de los experimentos de inmunofluorescencia y microscopía confocal mostraron una colocalización parcial del transportador SVCT2 con el marcador de retículo endoplásmico PDI, con un índice de Pearson de 0,3. Esto es apoyado por los resultados de western blot en fracciones subcelulares, donde se observa la presencia del marcador de retículo endoplásmico calnexina en la fracción mitocondrial. Estos resultados estarían indicando que el transportador SVCT2, además de expresarse en la mitocondria, se encuentra presente también a nivel del retículo endoplásmico en las células HEK-293. Al analizar en detalle los ensayos de colocalización entre SVCT2 y PDI se puede observar que la superposición entre las dos proteínas ocurre sólo en ciertos puntos específicos del espacio intracelular. Lo mismo hemos observado en otros experimentos realizados en nuestro laboratorio cuando se analiza la colocalización entre SVCT2 y calnexina (datos no mostrados). Una posible explicación para estos resultados es que SVCT2 pueda estar parcialmente localizado en las regiones MAM (membranas asociadas a mitocondria), que corresponden a membranas de retículo endoplásmico que se encuentran unidas a la mitocondria, y que son puntos de contacto entre ambos organelos (Wieckowski, et al., 2009; Poston et al., 2013). Esta propuesta fue confirmada en los ensayos de western blot realizados después de la obtención de fracciones mitocondriales altamente purificadas y libres de MAM (ultrapuras). En la actualidad es sabido que calnexina no sólo es un marcador de retículo endoplásmico, sino también una de las proteínas más abundantes en las regiones MAM (Poston et al., 2013). Nuestros experimentos de

fraccionamiento subcelular confirmaron este antecedente, mostrando que calnexina se encuentra claramente presente en la fracción de MAM purificada. En lo que se refiere a SVCT2, se pudo observar una marcada expresión del transportador en la fracción mitocondrial ultrapura, mostrando incluso un enriquecimiento en comparación a la fracción mitocondrial inicial. Estos resultados ratifican de manera contundente la localización de SVCT2 en la mitocondria en células HEK-293. Por otro lado, y confirmando la idea planteada anteriormente, también fue posible observar una expresión menor de SVCT2 en la fracción de MAM. Las regiones MAM han sido descritas para jugar un papel importante como elementos estructurales en la comunicación entre retículo endoplásmico y mitocondria, con fuertes implicaciones regulatorias. Estas regiones podrían ser cruciales para la síntesis y transporte intracelular de fosfolípidos, así como para la señalización del Ca^{2+} intracelular (Wieckowski, et al., 2009; Poston et al., 2013). En este sentido, la posibilidad de una función del transportador SVCT2 en las regiones MAM es una materia que requiere un análisis experimental a futuro.

Aunque de manera preliminar, nuestros resultados apoyan el concepto de que SVCT2 podría tener un rol en el retículo endoplásmico. A la fecha, no existen datos indicando la presencia de algún transportador de ácido ascórbico a nivel de este organelo, en contraste con la evidencia funcional que establece que en el retículo endoplásmico el ácido ascórbico participa como un cofactor enzimático en varias reacciones de hidroxilación que ocurren en el lumen del organelo (Mandl et al., 2009). Existe sin embargo, evidencia mostrando la capacidad del retículo endoplásmico de adquirir vitamina C en su forma oxidada, como ácido deshidroascórbico (DHA). Estos estudios fueron realizados en microsomas de

hígado de rata, y mostraron que la captación de DHA por el retículo endoplásmico es mediada por transportadores funcionalmente similares a los GLUT. Sin embargo, la identidad molecular de estos transportadores no fue elucidada (Bánhegyi et al., 1998; Csala et al., 2000; Szarka et al., 2002).

Al igual que en el caso de la mitocondria, los antioxidantes son fundamentales para reducir el estrés oxidativo en el retículo endoplásmico (Malhotra et al., 2008). En este sentido, durante el proceso normal de plegamiento de proteínas que es llevado a cabo en el espacio intraluminal, se generan ROS con un gran potencial dañino para este organelo (Mandl et al., 2009). Así, la presencia de ácido ascórbico en el retículo endoplásmico, y por lo tanto la expresión del transportador SVCT2 a este nivel, podría estar jugando un papel relevante en la mantención del equilibrio redox del organelo.

De acuerdo a nuestros resultados, el hecho de que no se haya detectado a la fecha un transportador de ácido ascórbico de retículo endoplásmico se debe probablemente al alto valor de K_m que debería tener un transportador de ácido ascórbico intracelular. En este sentido, los ensayos funcionales reportados han sido adaptados para detectar la presencia subcelular de un transportador de alta afinidad, similar a los transportadores SVCT de membrana plasmática (Bánhegyi et al., 1998; Csala et al., 2000; Szarka et al., 2002). Esto puede explicar por qué no fue posible observar transporte de ácido ascórbico en estos ensayos. En definitiva, el estudio de los transportadores intracelulares de vitamina C requiere que se consideren dos aspectos fundamentales: el microambiente iónico intracelular y las altas concentraciones de ácido ascórbico a las cuales se encuentran expuestos los distintos organelos. Sin duda alguna, estas

consideraciones son fundamentales para traducir los resultados obtenidos en ensayos *in vitro* a conclusiones dentro de un contexto celular.



13. CONCLUSIÓN

En esta tesis demostramos que el transportador SVCT2 se localiza en la mitocondria y media la captación de ácido ascórbico en este organelo.

En base a lo anterior, proponemos que el transportador SVCT2 juega un papel fundamental en la reducción del estrés oxidativo en la mitocondria. Además, nuestros resultados nos permiten sugerir que la localización mitocondrial del transportador SVCT2 no es una propiedad particular de las células HEK-293, sino un fenómeno general entre diferentes células, tejidos y órganos.



14. BIBLIOGRAFÍA

- Al-Adnani, M. S., Patrick, R. S., and McGee, J. O. (1974). The subcellular distribution of prolyl hydroxylase determined immunohistochemically. *J Cell Sci* 16, 639-650.
- Amano, A., Aigaki, T., Maruyama, N., and Ishigami, A. (2010). Ascorbic acid depletion enhances expression of the sodium-dependent vitamin C transporters, SVCT1 and SVCT2, and uptake of ascorbic acid in livers of SMP30/GNL knockout mice. *Archives of biochemistry and biophysics* 496, 38-44.
- Anderson, S. et al. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290, 457–465.
- Angulo, C. et al. (2008). Molecular Identification and Functional Characterization of the Vitamin C Transporters Expressed by Sertoli Cells. *J. Cell. Physiol.* 217: 708-716.
- Augustin R, Riley J, Moley KH. (2005). GLUT8 contains a [DE]XXXL[LI] sorting motif and localizes to a late endosomal/lysosomal compartment. *Traffic* 6: 1196–1212.
- Azzolini, C., Fiorani, M., Cerioni, L., Guidarelli, A., Cantoni, O. (2013). Sodium-dependent transport of ascorbic acid in U937 cell mitochondria. *IUBMB Life* 65:149-153.
- Baker, E. M., R. E. Hodges, et al. (1993). Metabolism of ascorbic-1-14C acid in experimental human scurvy. 1969. *Nutrition* 9(1): 75-84.
- Baldwin, S. A. (1993). Mammalian passive glucose transporters: members of an ubiquitous family of active and passive transport proteins. *Biochim Biophys Acta* 1154(1): 17-49.
- Bánhegyi, G., Marcolongo, P., Puskás, F., Fulceri, R., Mandl, J., Benedetti, A. (1998). Dehydroascorbate and ascorbate transport in rat liver microsomal vesicles. *J. Biol. Chem.* 273:2758-2762.
- Bánhegyi, G., Benedetti, A., Margittai, E., Marcolongo, P., Fulceri, R., Németh, C.E., Szarka, A. (2014). Subcellular compartmentation of ascorbate and its variation in disease states. *Biochim. Biophys. Acta* 1843, 1909–1916.
- Barrett, M. P., A. R. Walmsley, et al. (1999). Structure and function of facilitative sugar transporters. *Curr Opin Cell Biol* 11(4): 496-502.
- Beck, E., Burkert, A. & Hofmann, M., 1983. Uptake of L-Ascorbate by Intact Spinach Chloroplasts. *Plant physiology*, 73(1), 41–45.
- Becker, T. et al. (2012). Mitochondrial protein import, from transport pathways to an integrated network. *Trends in Biochemical Sciences.* 37, 3.

Bendich, A. (1990). Antioxidant micronutrients and immune responses. *Ann N Y Acad Sci* 587: 168-180.

Bird, T.A., Spanheimer, R.G. & Peterkofsky, B., 1986. Coordinate regulation of collagen and proteoglycan synthesis in costal cartilage of scorbutic and acutely fasted, vitamin C-supplemented guinea pigs. *Archives of biochemistry and biophysics*, 246(1), 42–51.

Boggavarapu, R., Jeckelmann, J.M., Harder, D., Schneider, P., Ucurum, Z., Hediger, M., and Fotiadis, D. (2013). Expression, purification and low-resolution structure of human vitamin C transporter SVCT1 (SLC23A1). *PloS one* 8, e76427.

Bolte, S. & Cordelieres, F.P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J. Microscopy* 224(3):213-232.

Boyer, J.C., Campbell, C.E., Sigurdson, W.J., and Kuo, S.M. (2005). Polarized localization of vitamin C transporters, SVCT1 and SVCT2, in epithelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* 334, 150-156.

Brush, S. & May, E., 1966. A Kinetic Study of the Mechanism of Action of L-Gulonolactone Oxidase. *The Journal of biological chemistry*, 241(12), 2907–2912.

Burns, J. J., A. Moltz, et al. (1956). Missing step in guinea pigs required for the biosynthesis of L-ascorbic acid. *Science* 124(3232): 1148-1149.

Burzle, M., and Hediger, M.A. (2012). Functional and physiological role of vitamin C transporters. *Current topics in membranes* 70, 357-375.

Capellmann, M., M. Becka, et al. (1994). A note on distribution of human plasma levels of ascorbic and dehydroascorbic acid. *J Physiol Pharmacol* 45(1): 183-187.

Caprile, T., Salazar, K., Astuya, A., Cisternas, P., Silva-Alvarez, C., Montecinos, H., Millan, C., de Los Angeles Garcia, M., and Nualart, F. (2009). The Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporter SVCT2 expressed in brainstem cells, neurons, and neuroblastoma cells is inhibited by flavonoids. *J Neurochem* 108, 563-577.

Carr, A., and Frei, B. (1999). Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 13, 1007-1024.

Carruthers, A. (1990). Facilitated diffusion of glucose. *Physiol Rev* 70(4): 1135-1176.

Castro, M., Caprile, T., Astuya, A., Millan, C., Reinicke, K., Vera, J.C., Vasquez, O., Aguayo, L.G., and Nualart, F. (2001). High-affinity sodium-vitamin C co-transporters (SVCT) expression in embryonic mouse neurons. *Journal of neurochemistry* 78, 815-823.

Chacinska, A. et al. (2009). Importing Mitochondrial Proteins: Machineries and Mechanisms. *Cell* 138, 628-44.

Chatterjee, I. B., N. C. Kar, et al. (1961). Biosynthesis of L-ascorbic acid: missing steps in animals incapable of synthesizing the vitamin. *Nature* 192: 163-164.

Coassin, M., A. Tomasi, et al. (1991). Enzymatic recycling of oxidized ascorbate in pig heart: one-electron vs two-electron pathway. *Arch Biochem Biophys* 290(2): 458-462.

Corpe, C.P., Tu, H., Eck, P., Wang, J., Faulhaber-Walter, R., Schnermann, J., Margolis, S., Padayatty, S., Sun, H., Wang, Y., Nussbaum, R.L., Espey, M.G., and Levine, M. (2010). Vitamin C transporter Slc23a1 links renal reabsorption, vitamin C tissue accumulation, and perinatal survival in mice. *The Journal of clinical investigation* 120, 1069-1083.

Corpe, C.P., Eck, P., Wang, J., Al-Hasani, H., and Levine, M. (2013). Intestinal dehydroascorbic acid (DHA) transport mediated by the facilitative sugar transporters, GLUT2 and GLUT8. *The Journal of biological chemistry* 288, 9092-9101.

Csala, M. et al., (2000). Ascorbate oxidation is a prerequisite for its transport into rat liver microsomal vesicles. *The Biochemical journal*, 349, 413–415.

Daniels, A. J., Dean, G., Viveros, O. H., and Diliberto, E. J., Jr. (1983). Secretion of newly taken up ascorbic acid by adrenomedullary chromaffin cells originates from a compartment different from the catecholamine storage vesicle. *Mol Pharmacol* 23, 437-444.

Daruwala, R., Song, J., Koh, W.S., Rumsey, S.C., and Levine, M. (1999). Cloning and functional characterization of the human sodium-dependent vitamin C transporters hSVCT1 and hSVCT2. *FEBS letters* 460, 480-484.

Deng, D., C. Xu, et al. (2014). Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1. *Nature* 510(7503): 121-125.

Diliberto, E.J., Daniels, A.J. & Viveros, H., 1991. Multicompartmental secretion of ascorbate and its dual role in dopamine beta-hydroxylation. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 54(6), 1163–1172.

Divakaruni, A.S. et al. (2013). Thiazolidinediones are acute, specific inhibitors of the mitochondrial pyruvate carrier. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 110(14):5422-7.

Donahue, R.J. et al. (2001). Direct influence of the p53 tumor suppressor on mitochondrial biogenesis and function. *FASEB J*, 15, 635–644.

Eck, P., Erichsen, H.C., Taylor, J.G., Yeager, M., Hughes, A.L., Levine, M., and Chanock, S. (2004). Comparison of the genomic structure and variation in the two human sodium-dependent vitamin C transporters, SLC23A1 and SLC23A2. *Human genetics* 115, 285-294.

Englard, S. and S. Seifter (1986). The biochemical functions of ascorbic acid. *Annu Rev Nutr* 6: 365-406.

Faaland, C.A., Race, J.E., Ricken, G., Warner, F.J., Williams, W.J., and Holtzman, E.J. (1998). Molecular characterization of two novel transporters from human and mouse kidney and from LLC-PK1 cells reveals a novel conserved family that is homologous to bacterial and *Aspergillus* nucleobase transporters. *Biochimica et biophysica acta* 1442, 353-360.

Fallaize, D. et al. (2015). Differential submitochondrial localization of PINK1 as a molecular switch for mediating distinct mitochondrial signaling pathways. *Cellular Signalling* 27, 2543–2554.

Fiorani, M. et al. (2015). The mitochondrial transporter of ascorbic acid functions with high affinity in the presence of low millimolar concentrations of sodium and in the absence of calcium and magnesium. *Biochimica et Biophysica Acta* 1848, 1393–1401.

Flier, J. S., M. Mueckler, et al. (1987). Distribution of glucose transporter messenger RNA transcripts in tissues of rat and man. *J Clin Invest* 79(2): 657-661.

Frei, B., England, L. & Ames, B.N., 1989. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(16), 6377–81.

Frei, B., J. F. Keaney, Jr., et al. (1996). Vitamins C and E and LDL oxidation. *Vitam Horm* 52: 1-34.

Frey, T.G. & Mannella, C.A. (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci.* 25(7):319-24.

Frey, T.G. et al. (2002). Insight into mitochondrial structure and function from electron tomography. *Biochimica et Biophysica Acta* 1555, 196–203.

Frezza, C., Cipolat, S. & Scorrano, L., 2007. Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nature protocols*, 2(2), 287–95.

Friedman, S., and Kaufman, S. (1965). 3,4-dihydroxyphenylethylamine betahydroxylase. Physical properties, copper content, and role of copper in the catalytic activity. *J Biol Chem* 240, 4763-4773.

Fujimoto, Y., Matsui, M. & Fujita, T., 1982. The accumulation of ascorbic acid and iron in rat liver mitochondria after lipid peroxidation. *Japan Journal of Pharmacology*, 32(2), 397–399.

Fulzele, S. et al. (2013). Sodium-dependent vitamin C transporter SVCT2: expression and function in bone marrow stromal cells and in osteogenesis. *Stem Cell Res.* 10: 36-47.

Garcia Mde, L., Salazar, K., Millan, C., Rodriguez, F., Montecinos, H., Caprile, T., Silva, C., Cortes, C., Reinicke, K., Vera, J.C., Aguayo, L.G., Olate, J., Molina, B., and Nualart, F. (2005). Sodium vitamin C cotransporter SVCT2 is expressed in hypothalamic glial cells. *Glia* 50, 32-47.

Gess, B. et al., (2010). Sodium-dependent vitamin C transporter 2 (SVCT2) is necessary for the uptake of L-ascorbic acid into Schwann cells. *Glia* 58: 287-299.

Godoy, A., Ormazabal, V., Moraga-Cid, G., Zuniga, F.A., Sotomayor, P., Barra, V., Vasquez, O., Montecinos, V., Mardones, L., Guzman, C., Villagran, M., Aguayo, L.G., Onate, S.A., Reyes, A.M., Carcamo, J.G., Rivas, C.I., and Vera, J.C. (2007). Mechanistic insights and functional determinants of the transport cycle of the ascorbic acid transporter SVCT2. Activation by sodium and absolute dependence on bivalent cations. *The Journal of biological chemistry* 282, 615-624.

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

Graham, J.M. (1993). Isolation of Mitochondria, Mitochondrial Membranes, Lysosomes, Peroxisomes, and Golgi Membranes from Rat Liver. From *Methods in Molecular Biology*, Vol 19. Biomembrane Protocols: Isolation and Analysis.

Guidarelli, A. et al. (2013). Mitochondrial ascorbic acid is responsible for enhanced susceptibility of U937 cells to the toxic effects of peroxynitrite. *Biofactors*, 40(2):236-46.

Guidarelli, A. et al. (2015). U937 cell apoptosis induced by arsenite is prevented by low concentrations of mitochondrial ascorbic acid with hardly any effect mediated by the cytosolic fraction of the vitamin. *Biofactors*, 41(2):101-10.

Ha, M.N. et al., 2004. Functional rescue of vitamin C synthesis deficiency in human cells using adenoviral-based expression of murine L-gulonogamma-lactone oxidase. *Genomics*, 83(3), 482–92.

Hájek, P., Chomyn, A., Attardi, G. (2007). Identification of a novel mitochondrial complex containing mitofusin 2 and stomatin-like protein 2. *J Biol Chem*, 282(8): 5670-81.

Hodges, R.E., Hood, J., Canham, J.E., Sauberlich, H.E., and Baker, E.M. (1971). Clinical manifestations of ascorbic acid deficiency in man. *The American journal of clinical nutrition* 24, 432-443.

Hong, S. et al., 2012. SVCT-2 in breast cancer acts as an indicator for L -ascorbate treatment. *Oncogene*, (March), 1–10.

Huh, W. et al., 1994. Characterisation of D-arabinono-1,4-lactone oxidase from *Candida albicans* ATCC 10231. *European journal of biochemistry*, 225(3), 1073–1079.

Ingebretsen, O.C. & Normann, P.T., 1982. Transport of ascorbate into guinea pig liver mitochondria. *Biochimica et biophysica acta*, 684(1), 21–26.

Jacob, R. A. and G. Sotoudeh (2002). Vitamin C function and status in chronic disease. *Nutr Clin Care* 5(2): 66-74.

Jarrett, S.G., Cuenco, J., Boulton, M. (2006). Dietary antioxidants provide differential subcellular protection in epithelial cells. *Redox Rep.* 11, 144–152.

Joost, H. G., Bell, G. I., Best, J. D., Birnbaum, M. J., Charron, M. J., Chen, Y. T., Doege, H., James, D. E., Lodish, H. F., Moley, K. H., et al. (2002). Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282, E974-976.

Kar, P. et al. (2008). Submitochondrial localization of associated μ -calpain and calpastatin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 470, 176–186.

Kawai, T., M. Nishikimi, et al. (1992). A missense mutation of L-gulonolactone oxidase causes the inability of scurvy-prone osteogenic disorder rats to synthesize L-ascorbic acid. *J Biol Chem* 267(30): 21973-21976.

KC, S., Carcamo, J. M., and Golde, D. W. (2005). Vitamin C enters mitochondria via facilitative glucose transporter 1 (Glut1) and confers mitochondrial protection against oxidative injury. *Faseb J* 19, 1657-1667.

Kiuchi, K., M. Nishikimi, et al. (1980). L-gulonolactone oxidase activity and vitamin C status in riboflavin-deficient rats. *Biochim Biophys Acta* 630(3): 330-337.

Koukaki, M., Vlanti, A., Goudela, S., Pantazopoulou, A., Gioule, H., Tournaviti, S., and Dhalluin, G. (2005). The nucleobase-ascorbate transporter (NAT) signature motif in UapA defines the function of the purine translocation pathway. *Journal of molecular biology* 350, 499-513.

Kowaltowski, A.J. et al. (2009). Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Biology & Medicine* 47, 333–343.

Kuo, S.M., Wang, L.Y., Yu, S., Campbell, C.E., Valiyaparambil, S.A., Rance, M., and Blumenthal, K.M. (2013). The N-terminal basolateral targeting signal unlikely acts alone in the differential trafficking of membrane transporters in MDCK cells. *Biochemistry* 52, 5103-5116.

Lapointe, J. et al. (2012). The submitochondrial distribution of ubiquinone affects respiration in long-lived Mclk1 mice. *J. Cell Biol*, 199(2), 215–224.

Lee, J.H., Oh, C.S., Mun, G.H., Kim, J.H., Chung, Y.H., Hwang, Y.I., Shin, D.H., and Lee, W.J. (2006). Immunohistochemical localization of sodium-dependent L-ascorbic acid transporter 1 protein in rat kidney. *Histochemistry and cell biology* 126, 491-494.

Lee, Y.-C. et al., 2010. Mitochondrial GLUT10 facilitates dehydroascorbic acid import and protects cells against oxidative stress: mechanistic insight into arterial tortuosity syndrome. *Human molecular genetics*, 19(19), 3721–3733.

Levine, M., K. R. Dhariwal, et al. (1995). Determination of optimal vitamin C requirements in humans. *Am J Clin Nutr* 62(6 Suppl): 1347S-1356S.

Levine, M., C. Conry-Cantilena, et al. (1996). Vitamin C pharmacokinetics in healthy volunteers: evidence for a recommended dietary allowance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(8): 3704-3709.

Levine, M. et al., 1999. Criteria and recommendations for vitamin C intake. *Journal of the American Medical Association*, 281(15), 1415–1423.

Li, X., Cobb, C. E., Hill, K. E., Burk, R. F., and May, J. M. (2001). Mitochondrial uptake and recycling of ascorbic acid. *Arch Biochem Biophys* 387, 143-153.

Li, X., Cobb, C.E., May, J.M. (2002). Mitochondrial recycling of ascorbic acid from dehydroascorbic acid: dependence on the electron transport chain. *Arch Biochem Biophys* 403: 103–110.

Liang, W.J., Johnson, D., and Jarvis, S.M. (2001). Vitamin C transport systems of mammalian cells. *Molecular membrane biology* 18, 87-95.

Liang, W.J., Johnson, D., Ma, L.S., Jarvis, S.M., and Wei-Jun, L. (2002). Regulation of the human vitamin C transporters expressed in COS-1 cells by protein kinase C [corrected]. *American journal of physiology. Cell physiology* 283, C1696-1704.

Linster, C. L., and Van Schaftingen, E. (2006). Glucuronate, the precursor of vitamin C, is directly formed from UDP-glucuronate in liver. *Febs J* 273, 1516-1527.

Linster, C., Van Schaftingen, E. (2007). Vitamin C biosynthesis, recycling and degradation in mammals. *FEBS J.* 274:1-22.

Lutsenko, E.A., Cárcamo, J.M. & Golde, D.W., 2002. Vitamin C prevents DNA mutation induced by oxidative stress. *The Journal of biological chemistry*, 277(19), 16895–9.

Lutsenko, E.A., Carcamo, J.M., and Golde, D.W. (2004). A human sodium-dependent vitamin C transporter 2 isoform acts as a dominant-negative inhibitor of ascorbic acid transport. *Molecular and cellular biology* 24, 3150-3156.

Mackenzie, B., Illing, A.C., and Hediger, M.A. (2008). Transport model of the human Na⁺-coupled L-ascorbic acid (vitamin C) transporter SVCT1. *American journal of physiology. Cell physiology* 294, C451-459.

Maellaro, E., B. Del Bello, et al. (1997). Purification and characterization of glutathione-dependent dehydroascorbate reductase from rat liver. *Methods Enzymol* 279: 30-35.

Malhotra, J. D., Miao, H., Zhang, K., Wolfson, A., Pennathur, S., Pipe, S.W., and Kaufman, R. J. (2008). Antioxidants reduce endoplasmic reticulum stress and improve protein secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 18525-18530.

Mandl, J., Szarka, A., Bánhegyi, G. (2009). Vitamin C: update on physiology and pharmacology. *British J. Pharmacol.* 157:1097-1110.

Mardones, L., Ormazabal, V., Romo, X., Jaña, C., Binder, P., Peña, E., Vergara, M., Zúñiga, F. (2011). The glucose transporter-2 (GLUT2) is a low-affinity dehydroascorbic acid transporter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 410:7-12.

Mardones, L., Zuniga, F.A., Villagran, M., Sotomayor, K., Mendoza, P., Escobar, D., Gonzalez, M., Ormazabal, V., Maldonado, M., Onate, G., Angulo, C., Concha, II, Reyes, A.M., Carcamo, J.G., Barra, V., Vera, J.C., and Rivas, C.I. (2012). Essential role of intracellular glutathione in controlling ascorbic acid transporter expression and function in rat hepatocytes and hepatoma cells. *Free radical biology & medicine* 52, 1874-1887.

Margittai, E., G. Banhegyi, et al. (2005). Scurvy leads to endoplasmic reticulum stress and apoptosis in the liver of Guinea pigs. *J Nutr* 135(11): 2530-2534.

Maulen, N. P., E. A. Henriquez, et al. (2003). Up-regulation and polarized expression of the sodium-ascorbic acid transporter SVCT1 in post-confluent differentiated CaCo-2 cells. *J Biol Chem* 278(11): 9035-9041.

Maurin, M., 2005. Caracterización del transporte de vitamina C en células de cáncer de mama. Tesis presentada a la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción para optar al título de Bioquímico. Universidad de Concepción. Concepción, Chile.

May, J.M., Huang, J., and Qu, Z.C. (2005a). Macrophage uptake and recycling of ascorbic acid: response to activation by lipopolysaccharide. *Free radical biology & medicine* 39, 1449-1459.

May, J.M., and Qu, Z.C. (2005b). Transport and intracellular accumulation of vitamin C in endothelial cells: relevance to collagen synthesis. *Archives of biochemistry and biophysics* 434, 178-186.

May, J.M., Li, L., Qu, Z.C., Cobb, C.E. (2007). Mitochondrial recycling of ascorbic acid as a mechanism for regenerating cellular ascorbate. *Biofactors* 30: 35–48.

Mehlhorn, R. J. (1991). Ascorbate- and dehydroascorbic acid-mediated reduction of free radicals in the human erythrocyte. *J Biol Chem* 266(5): 2724-2731.

Michel, V. & Bakovic, M. (2009). The solute carrier 44A1 is a mitochondrial protein and mediates choline transport. *FASEB J.* 23, 2749–2758.

Montecinos, V. et al., 2007. Vitamin C is an essential antioxidant that enhances survival of oxidatively stressed human vascular endothelial cells in the presence of a vast molar excess of glutathione. *The Journal of biological chemistry*, 282(21), 15506–15.

Moser, U. (1987). Uptake of ascorbic acid by leukocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 498, 200-215.

Mueckler, M., Roach, W., and Makepeace, C. (2004). Transmembrane segment 3 of the Glut1 glucose transporter is an outer helix. *The Journal of biological chemistry* 279, 46876-46881.

Muñoz, C., 2009. Transportadores Intracelulares de Vitamina C en Cáncer Mamario como un modelo de compartimentalización de Vitamina C. Tesis presentada a la Escuela de Graduados de la Universidad de Concepción para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, Área Biología Celular y Molecular. Universidad de Concepción. Concepción, Chile.

Muñoz-Montesino, C., Roa, F.J., Peña, E., González, M., Sotomayor, K., Inostroza, E.,A., Muñoz, C., González, I., Maldonado, M., Soliz, C., Reyes, A.M., Vera, J.C., Rivas, C.I. (2014). Mitochondrial ascorbic acid transport is mediated by a low-affinity form of the sodium-coupled ascorbic acid transporter-2. *Free Radical Biol. Med.* 70, 241–254.

Nair, J.R. & McGuire, J.J. (2005). Submitochondrial localization of the mitochondrial isoform of folic polyglutamate synthetase in CCRF-CEM human T-lymphoblastic leukemia cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1746, 38–44.

Navas, P., J. M. Villalba, et al. (1994). Ascorbate function at the plasma membrane. *Biochim Biophys Acta* 1197(1): 1-13.

Nardai, G., L. Braun, et al. (2001). Protein-disulfide isomerase- and protein thiol-dependent dehydroascorbate reduction and ascorbate accumulation in the lumen of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 276(12): 8825-8828.

Niki, E. (1991). Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals. *Am J Clin Nutr* 54(6 Suppl): 1119S-1124S.

Nishimura, N., Gotoh, T., Oike, Y., Yano, M. (2014). TMEM65 is a mitochondrial inner-membrane protein. *PeerJ*, 10;2:e349. doi: 10.7717/peerj.349.

Nishikimi, M., R. Fukuyama, et al. (1994). "Cloning and chromosomal mapping of the human nonfunctional gene for L-gulonogamma-lactone oxidase, the enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis missing in man." *J Biol Chem* 269(18): 13685-13688.

Nualart, F.J., Rivas, C.I., Montecinos, V.P., Godoy, A.S., Guaiquil, V.H., Golde, D.W., and Vera, J.C. (2003). Recycling of vitamin C by a bystander effect. *The Journal of biological chemistry* 278, 10128-10133.

Nualart, F.J. et al. (2012). Dynamic expression of the sodium-vitamin C co-transporters, SVCT1 and SVCT2, during perinatal kidney development. *Histochem Cell Biol.* 139: 233-247.

Oba, K. et al., 1995. Purification and properties of L-galactono-gamma-lactone dehydrogenase, a key enzyme for ascorbic acid biosynthesis, from sweet potato roots. *Journal of Biochemistry*, 117(1), 120–124.

Ormazabal, V., Zuniga, F.A., Escobar, E., Aylwin, C., Salas-Burgos, A., Godoy, A., Reyes, A.M., Vera, J.C., and Rivas, C.I. (2010). Histidine residues in the Na⁺-coupled ascorbic acid transporter-2 (SVCT2) are central regulators of SVCT2 function, modulating pH

sensitivity, transporter kinetics, Na⁺ cooperativity, conformational stability, and subcellular localization. *The Journal of biological chemistry* 285, 36471-36485.

Orrenius, S., Gogvadze, V. & Zhivotovsky, B., 2007. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 47, 143–83.

Padh, H. (1990). Cellular functions of ascorbic acid. *Biochem Cell Biol* 68(10): 1166-1173.

Palmieri, F. (2014). Mitochondrial transporters of the SLC25 family and associated diseases, a review. *J Inherit Metab Dis* 37:565–575.

Paterson, J.K. et al. (2007). Human ABCB6 Localizes to Both the Outer Mitochondrial Membrane and the Plasma Membrane. *Biochemistry* 2007, 46, 9443-9452.

Peterkofsky, B. (1991). Ascorbate requirement for hydroxylation and secretion of procollagen: relationship to inhibition of collagen synthesis in scurvy. *Am J Clin Nutr* 54(6 Suppl): 1135S-1140S.

Poston, C.N. et al. (2013). In-depth proteomic analysis of mammalian mitochondria-associated membranes (MAM). *Journal of Proteomics*, 79, 219–230.

Pyla, R., Poulouse, N., Jun, J, Segar, L. (2013). Expression of conventional and novel glucose transporters, GLUT1, -9, -10, and -12, in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 304:C574-C589.

Rajan, D.P., Huang, W., Dutta, B., Devoe, L.D., Leibach, F.H., Ganapathy, V., and Prasad, P.D. (1999). Human placental sodium-dependent vitamin C transporter (SVCT2): molecular cloning and transport function. *Biochemical and biophysical research communications* 262, 762-768.

Rivas, C.I. (2003). Obtención y Reciclaje de Vitamina C en células humanas por un mecanismo acoplado de tres etapas: Oxidación, Transporte y Reducción. Tesis presentada a la Facultad de Ciencias de la Universidad Austral de Chile para optar al grado de Doctor en Ciencias. Universidad Austral. Valdivia, Chile.

Rivas, C.I., Zuniga, F.A., Salas-Burgos, A., Mardones, L., Ormazabal, V., and Vera, J.C. (2008). Vitamin C transporters. *Journal of physiology and biochemistry* 64, 357-375.

Rose, R.C. (1988). Transport of ascorbic acid and other water-soluble vitamins. *Biochimica et biophysica acta* 947, 335-366.

Rumsey, S.C., Kwon, O., Xu, G.W., Burant, C.F., Simpson, I., and Levine, M. (1997). Glucose transporter isoforms GLUT1 and GLUT3 transport dehydroascorbic acid. *The Journal of biological chemistry* 272, 18982-18989.

Rumsey, S.C., Daruwala, R., Al-Hasani, H., Zarnowski, M.J., Simpson, I.A., and Levine, M. (2000). Dehydroascorbic acid transport by GLUT4 in *Xenopus* oocytes and isolated rat adipocytes. *The Journal of biological chemistry* 275, 28246-28253.

Sapper, H., Kang, S.O., Paul, H.H., and Lohmann, W. (1982). The reversibility of the vitamin C redox system: electrochemical reasons and biological aspects. *Zeitschrift für Naturforschung. Section C: Biosciences* 37, 942-946.

Sauberlich, H.E., 1994. Pharmacology of vitamin C. *Annual review of nutrition*, 14, 371–391.

Savini, I., Rossi, A., Pierro, C., Avigliano, L., and Catani, M.V. (2008). SVCT1 and SVCT2: key proteins for vitamin C uptake. *Amino acids* 34, 347-355.

Shephard, F. et al. (2014). A mitochondrial location for haemoglobins—Dynamic distribution in ageing and Parkinson's disease. *Mitochondrion*, 14, 64–72.

Schmidt, S., Joost, H-G., Schurmann, A. (2009). GLUT8, the enigmatic intracellular hexose transporter. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296:E614-E618.

Sotiriou, S., Gispert, S., Cheng, J., Wang, Y., Chen, A., Hoogstraten-Miller, S., Miller, G.F., Kwon, O., Levine, M., Guttentag, S.H., and Nussbaum, R.L. (2002). Ascorbic-acid transporter Slc23a1 is essential for vitamin C transport into the brain and for perinatal survival. *Nature medicine* 8, 514-517.

Stadler, C. et al. (2013). Immunofluorescence and fluorescent-protein tagging show high correlation for protein localization in mammalian cells. *Nature Methods* 10, 315–323.

Stojanovski, D. et al. (2012). Mechanisms of protein sorting in mitochondria. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:a011320.

Subramanian, V.S., Marchant, J.S., Boulware, M.J., and Said, H.M. (2004). A C-terminal region dictates the apical plasma membrane targeting of the human sodium-dependent vitamin C transporter-1 in polarized epithelia. *The Journal of biological chemistry* 279, 27719-27728.

Subramanian, V.S., Marchant, J.S., Reidling, J.C., and Said, H.M. (2008). N-Glycosylation is required for Na⁺-dependent vitamin C transporter functionality. *Biochemical and biophysical research communications* 374, 123-127.

Szarka, A., Stadler, K., Jenei, V., Margittai, E., Csala, M., Jakus, J., Mandl, J., Bánhegyi, G. (2002). Ascorbyl free radical and dehydroascorbate formation in rat liver endoplasmic reticulum. *J. Bioenerg. Biomembr.* 34 (4) 317–323.

Szarka, A. et al. (2004). Facilitated glucose and dehydroascorbate transport in plant mitochondria. *Archives of biochemistry and biophysics*, 428(1), 73–80.

Szarka, A. & Balogh, T. (2015). In silico aided thoughts on mitochondrial vitamin C transport. *Journal of Theoretical Biology* 365, 181–189.

Takanaga, H., Mackenzie, B., and Hediger, M.A. (2004). Sodium-dependent ascorbic acid transporter family SLC23. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 447, 677-682.

Toledo, J.R. et al. (2009). Polyethylenimine-based transfection method as a simple and effective way to produce recombinant lentiviral vectors. *Applied biochemistry and biotechnology*, 157(3), 538–44.

Tsukaguchi, H., Tokui, T., Mackenzie, B., Berger, U.V., Chen, X.Z., Wang, Y., Brubaker, R.F., and Hediger, M.A. (1999). A family of mammalian Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporters. *Nature* 399, 70-75.

Varma, S., Campbell, C.E., and Kuo, S.M. (2008). Functional role of conserved transmembrane segment 1 residues in human sodium-dependent vitamin C transporters. *Biochemistry* 47, 2952-2960.

Varma, S., Sobey, K., Campbell, C., Kuo, S.M. (2009). Hierarchical Contribution of N- and C-Terminal Sequences to the Differential Localization of Homologous Sodium-Dependent Vitamin C Transporters, SVCT1 and SVCT2, in Epithelial Cells. *Biochemistry* 48:2969–2980.

Velho, A.M., and Jarvis, S.M. (2009). Topological studies of hSVCT1, the human sodium-dependent vitamin C transporter and the influence of N-glycosylation on its intracellular targeting. *Experimental cell research* 315, 2312-2321.

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

Vera, J. C., C. I. Rivas, et al. (1994). Human HL-60 myeloid leukemia cells transport dehydroascorbic acid via the glucose transporters and accumulate reduced ascorbic acid. *Blood* 84(5): 1628-1634.

Vera, J. C., C. I. Rivas, et al. (1995). Resolution of the facilitated transport of dehydroascorbic acid from its intracellular accumulation as ascorbic acid. *J Biol Chem* 270(40): 23706-23712.

Verrax, J. & Calderon, P., 2008. The controversial place of vitamin C in cancer treatment. *Biochemical pharmacology*, 76(12), 1644–52.

Washburn, M. P. and W. W. Wells (1999). Identification of the dehydroascorbic acid reductase and thioltransferase (Glutaredoxin) activities of bovine erythrocyte glutathione peroxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 257(2): 567-571.

Wang, Y., T. A. Russo, et al. (1997). Ascorbate recycling in human neutrophils: induction by bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(25): 13816-13819.

Wang, H., Dutta, B., Huang, W., Devoe, L.D., Leibach, F.H., Ganapathy, V., and Prasad, P.D. (1999). Human Na(+)-dependent vitamin C transporter 1 (hSVCT1): primary structure, functional characteristics and evidence for a non-functional splice variant. *Biochimica et biophysica acta* 1461, 1-9.

Wang, Y., Mackenzie, B., Tsukaguchi, H., Weremowicz, S., Morton, C.C., and Hediger, M.A. (2000). Human vitamin C (L-ascorbic acid) transporter SVCT1. *Biochemical and biophysical research communications* 267, 488-494.

Weber, P., A. Bendich, et al. (1996). Vitamin C and human health--a review of recent data relevant to human requirements. *Int J Vitam Nutr Res* 66(1): 19-30.

Weber, A. et al., 2000. Identification, purification, and molecular cloning of a putative plastidic glucose translocator. *The Plant cell*, 12(5), 787-801.

Wells, W. W., D. P. Xu, et al. (1990). Mammalian thioltransferase (glutaredoxin) and protein disulfide isomerase have dehydroascorbate reductase activity. *J Biol Chem* 265(26): 15361-15364.

Wells, W. W. and D. P. Xu (1994). Dehydroascorbate reduction. *J Bioenerg Biomembr* 26(4): 369-377.

Wieckowski, A., Giorgi, G., Lebedzinska, M., Dusynski, J., Pinton, P. (2009). Isolation of mitochondria-associated membranes and mitochondria from animal tissues and cells. *Nat. Protocols* 4:1582-1590.

Wilson, J.X., 2005. Regulation of vitamin C transport. *Annual review of nutrition*, 25, 105-25.

Winkler, B. S. (1987). In vitro oxidation of ascorbic acid and its prevention by GSH. *Biochim Biophys Acta* 925(3): 258-264.

Witenberg, B. et al., 1999. Inhibition by ascorbic acid of apoptosis induced by oxidative stress in HL-60 myeloid leukemia cells. *Biochemical pharmacology*, 57(7), 823-32.

Wu, X., Zeng, L.H., Taniguchi, T., and Xie, Q.M. (2007). Activation of PKA and phosphorylation of sodium-dependent vitamin C transporter 2 by prostaglandin E2 promote osteoblast-like differentiation in MC3T3-E1 cells. *Cell death and differentiation* 14, 1792-1801.

Xu, D.P. & Wells, W.W. (1996). a-Lipoic acid dependent regeneration of ascorbic acid from dehydroascorbic acid in rat liver mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 28: 77-85.

Zannoni, V. G., J. I. Brodfuehrer, et al. (1987). Ascorbic acid, alcohol, and environmental chemicals. *Ann N Y Acad Sci* 498: 364-388.

Zara, V., Ferramosca, A., Capobianco, L., Baltz, K. M., Randel, O., Rassow, J., Palmieri, F., and Papatheodorou, P. (2007). Biogenesis of yeast dicarboxylate carrier: the carrier signature facilitates translocation across the mitochondrial outer membrane. *J Cell Sci* 120, 4099-4106.

Zorzano, A., Palacin, M., and Guma, A. (2005). Mechanisms regulating GLUT4 glucose transporter expression and glucose transport in skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 183, 43-58.

