

UNIVERSIDAD DE CONCEPCION



TITULO:

**Dinámica de expresión y polarización de los transportadores de vitamina C en células epiteliales de riñón.**



Tesis de Doctorado presentada a la Escuela de Graduados de la Universidad de Concepción como parte de los requisitos para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, área Biología Celular y Molecular

Por

Tamara Valentina Castro Lezano

2007

## Resumen

La vitamina C es un micronutriente esencial para la mantención de la homeostasis normal del organismo. La concentración plasmática de ácido ascórbico (AA) en humanos fluctúa entre 60 y 75  $\mu\text{M}$  y su deficiencia crónica causa escorbuto, el cuál se caracteriza por múltiples fallas metabólicas. Los seres humanos, cobayos y algunos primates no pueden sintetizar AA, de ésta forma la mantención de los niveles de AA plasmáticos depende de la ingesta de la vitamina C en la dieta, la absorción intestinal y la reabsorción renal.

El AA puede ingresar a las células mediante los transportadores de AA, SVCT1 y SVCT2. SVCT1 se encuentra principalmente expresado en tejidos de tipo epitelial, mientras que SVCT2 se encuentra expresado ampliamente en los distintos tejidos adultos. Se ha descrito la presencia de SVCT1 y SVCT2 en tejido renal adulto, sin embargo no existe un estudio detallado de cómo estos transportadores varían su expresión y distribución durante el desarrollo renal y la vida adulta. En esta tesis hemos estudiado la expresión, localización y funcionalidad de los transportadores de AA, SVCT1 y SVCT2 presentes en el tejido renal en estadios embrionarios, post-natales y adultos de ratón y humano. La expresión y localización se definió utilizando técnicas de RT-PCR, *Western blot*, hibridación *in situ* e inmunocitoquímica. Los análisis funcionales los realizamos mediante ensayos de captación de AA en las líneas celulares HEK293 (derivadas de riñón embrionario humano) y LLC-PK1 (derivadas de tubulo proximal adulto). Encontramos que durante la vida embrionaria y primeros 3 días de desarrollo post-natal, SVCT2 se encuentra fuertemente expresado, en comparación con SVCT1. Nuestros análisis inmunocitoquímicos en tejido embrionario mostraron que SVCT2 se

expresa en la membrana plasmática de las células epiteliales más diferenciadas, las que corresponden a células de los tubos colectores, mientras que las células epiteliales que se diferencian más tardíamente como los de la región cortical, localizan SVCT2 en la región citoplasmática. Sorpresivamente, durante los 3 primeros días de desarrollo post-natal SVCT2 se localiza en la membrana basal de los túbulos proximales y distales, mientras que en los tubos colectores se localiza citoplasmáticamente. Los estudios funcionales que realizamos en células HEK293, mostraron parámetros cinéticos comparables a los ya descritos para SVCT2. La expresión de SVCT1 comienza levemente al día 5 post-natal y va aumentando hasta llegar al estadio adulto. Mediante estudios de hibridación *in situ* e inmunocitoquímica determinamos que SVCT1 se localiza a lo largo de los túbulos proximales renales, específicamente en la región apical de sus células epiteliales. Los estudios de expresión para SVCT1 y SVCT2 en células LLC-PK1 mostraron que estas células expresan ambas isoformas con localizaciones subcelulares diferentes; SVCT1 se localiza en la membrana plasmática y SVCT2 se localiza en la región citoplasmática de las células. Los estudios funcionales demostraron que la polarización apical y la captación de AA son directamente regulados por la concentración de vitamina C extracelular. Las células sometidas a una alta concentración de AA (similar al segmento S1) muestran una baja polarización apical del transportador y una alta capacidad de transporte, mientras que células incubadas con una baja concentración de AA (similar al segmento S3) muestran una alta polarización apical del transportador y una baja capacidad de transporte.

Con estos resultados podemos concluir que durante la vida embrionaria y los primeros días de desarrollo post-natal, la incorporación de AA a las células renales epiteliales depende sólo de la expresión de SVCT2, esta situación cambia a medida que aumenta

la edad post-natal, donde la incorporación de AA desde el ultrafiltrado glomerular depende de la expresión de SVCT1 en la región apical de las células epiteliales de los túbulos proximales y que esta puede ser regulada por las distintas concentraciones de AA a la que son expuestas las células de los distintos segmentos del túbulo proximal.

