



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"CARACTERIZACION DEL TRANSPORTE DEL ACIDO ASCORBICO EN LA RETINA DE LA RATA"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

CECILIA CONTRERAS CUBAS



FACULTAD DE CIENCIAS UNAM

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ROCIO SALCEDA SACANELLES

2005



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

m. 344019



ESTADOS UNIDOS MEXICANOS  
 AVIATION II  
 MEXICO

**ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ**  
**Jefe de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Caracterización del transporte del ácido ascórbico en la retina de la rata".

realizado por Cecilia Contreras Cubas

con número de cuenta 40001285-8 , quien cubrió los créditos de la carrera de: BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
 Propietario

Dra. Rocío Salceda Sacanelles

Propietario

Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte

Propietario

Dr. Rolando Hernández Muñoz

Suplente

Dr. José Edgardo Escamilla Marván

Suplente

Biól. Gustavo Sánchez Chávez

Consejo Departamental de Biología

FACULTAD DE CIENCIAS

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



UNIDAD DE ENSEÑANZA  
 DE BIOLOGIA

## **Dedicatoria**

Dedico esta tesis a mis padres y hermanos por brindarme siempre su cariño y apoyo.

A mis sobrinos Juan Carlos, Rebecca, Luisa y Alejandro.

A Gustavo por, simplemente, todo.

A mis amigos del laboratorio: Gustavo, Naty, Shirley, Jehthro, Luis, Ismael, Claudia y Miguel.

## **Agradecimientos**

Agradezco de manera especial a la Dra. Rocío Salceda Sacanelles por su apoyo, y por el conocimiento adquirido durante mi estancia en su laboratorio.

Agradezco a los Doctores:

María Eugenia Gonsebatt Bonaparte

Rolando Hernández Muñoz

José Edgardo Escamilla Marván

Y al Biól. Gustavo Sánchez Chávez

Por sus valiosos comentarios para la realización del manuscrito final.

Agradezco de manera especial al Biól. Gustavo Sánchez Chávez por su apoyo técnico durante la realización del presente proyecto.

Esta tesis se llevó a cabo en el Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular (IFC), UNAM, bajo la dirección de la Dra. Rocío Salceda Sacanelles, y se contó con una beca de PAPIIT, proyecto IN202403-3.

## ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
RESUMEN.....	ii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. El Ojo de los Vertebrados.....	1
1.1.1. La Organización Estructural de la Retina.....	4
1.1.2. Fotorreceptores.....	5
1. 1. 3. Metabolismo en la retina.....	7
1. 2. El Ácido Ascórbico.....	10
1. 2. 1. Propiedades Físicoquímicas.....	11
1. 2. 2. Importancia del Ácido Ascórbico en los Sistemas Biológicos.....	13
1. 2. 3. Transporte del Ácido Ascórbico.....	16
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	23
III. MÉTODOS.....	23
IV. RESULTADOS.....	26
4.1. Transporte de Ácido Ascórbico en Función del Tiempo.....	26
4.2. Salida del Ácido Ascórbico .....	27
4.3. Transporte de Ácido Ascórbico en Función de la Concentración.....	28
4.4. Efecto de Diferentes Compuestos en la Acumulación de Ácido Ascórbico.....	30
4.5. Transporte de Ácido ascórbico en Función de la Concentración de Glucosa Extracelular.....	31
4.6. Transporte de Ácido ascórbico en la Retina de Ratas Hiperglucémicas.....	32
V. DISCUSIÓN.....	33
VI. CONCLUSIÓN.....	36
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	37

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>Asc<sup>-</sup></b>	Radical Semidehidroascorbato
<b>AscH<sup>-</sup></b>	Ácido Ascórbico en forma reducida
<b>CNE</b>	Capa Nuclear Externa
<b>CNI</b>	Capa Nuclear Interna
<b>CPE</b>	Capa Plexiforme Externa
<b>CPI</b>	Capa Plexiforme Interna
<b>DHA</b>	Ácido Dehidroascórbico
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>ENR</b>	Especies de Nitrógeno Reactivas
<b>EOR</b>	Especies de Oxígeno Reactivas
<b>EPR</b>	Epitelio Pigmentario de la Retina
<b>GLUT</b>	Glucose Transporter (Transportador de Glucosa)
<b>GS<sup>-</sup></b>	Radical Glutatio
<b>GSH</b>	Glutatio
<b>HO<sup>-</sup></b>	Radical Hidroxilo
<b>HRPE</b>	Human Retinal Pigment Epithelial
<b>LGO</b>	L-gulono- $\gamma$ -lactona oxidasa
<b>NADH<sup>+</sup></b>	Nicotinamida Adenin Dinucleótido (en forma oxidada)
<b>PKC</b>	Protein Kinase C (Protein Cínasa C)
<b>PUFA</b>	Polyunsaturated Fatty Acids (Ácidos Grasos Poli-insaturados)
<b>RER</b>	Retículo Endoplásmico Rugoso

<b>RKB</b>	Ringer Krebs Bicarbonato
<b>RO<sup>•</sup></b>	Radical Pert-butil alcoxilo
<b>SDS</b>	Dodecil Sulfato de Sodio
<b>SOD</b>	Super Óxido Dismutasa
<b>hSVCT</b>	human Sodium dependent Vitamin C Transporter (Transportador de Vitamina C dependiente de Sodio de humano)
<b>SVCT</b>	Sodium dependent Vitamin C Transporter (Transportador de Vitamina C dependiente de Sodio)
<b>TO<sup>•</sup></b>	Radical Tocoferoxilo
<b>UH<sup>•</sup></b>	Radical Urato

## RESUMEN

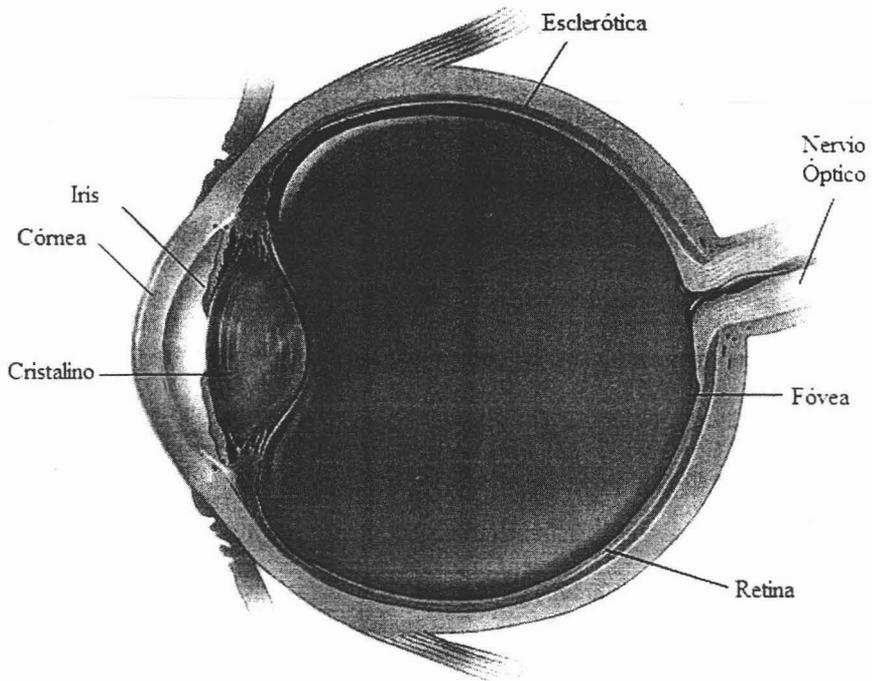
La vitamina C o ácido ascórbico es una molécula esencial en los sistemas biológicos, principalmente por su actividad antioxidante. Esta molécula se encuentra en los organismos en dos formas; una reducida o ácido ascórbico y una oxidada o ácido dehidroascórbico. Por otra parte, la retina es un tejido que, tanto por su composición como por sus características fisiológicas, presenta un metabolismo altamente oxidante, lo que lo hace susceptible al daño causado por estrés oxidativo. El requerimiento de esta molécula antioxidante en los distintos tejidos hace particularmente interesante su mecanismo de transporte. El transporte de la vitamina C ha sido poco estudiado, en particular en la retina, en donde esta molécula altamente antioxidante puede ser esencial en el metabolismo, así como para llevar a cabo un gran número de reacciones, como la síntesis de algunos neurotransmisores, en donde participa como cofactor. En el presente trabajo, se caracterizó el transporte del ácido ascórbico en la retina de la rata. Se encontró que en la retina, el ácido ascórbico se acumula por un sistema específico y, que a diferencia de otros tejidos, en la retina no se acumula la forma oxidada a través de los transportadores de glucosa. Adicionalmente, se observó que en ratas hiperglucémicas incrementó esta acumulación, sugiriendo que esta molécula juega un papel antioxidante que permite equilibrar los posibles daños causados por el estrés oxidativo durante dicha patología.

## I. INTRODUCCIÓN

La interacción de los organismos con su medio ambiente depende principalmente de la percepción del mismo. Los animales han desarrollado sistemas sensoriales que les permiten obtener información del medio que los rodea. Dentro de éstos, el sentido de la visión se ha desarrollado de manera considerable (Kuffler S. *et al.*, 1984). La estructura de los órganos visuales varía enormemente entre los diferentes grupos, desde simples conglomerados de células fotorreceptoras hasta órganos especializados como son el ojo de los artrópodos y el de los vertebrados (Ganong W., 1995). El sistema visual se caracteriza por convertir un estímulo luminoso en una señal eléctrica (fototransducción), la cual es procesada y transformada en una imagen del medio exterior.

### 1.1. El Ojo de los Vertebrados

En general, el ojo de los vertebrados está compuesto por fotorreceptores, un sistema de lentes para enfocar la luz, y un sistema neuronal que transmite la información recibida al cerebro. El ojo de los vertebrados tiene una forma ligeramente esférica y se divide en dos cavidades (figura 1). La cavidad posterior, llamada cámara vítrea, se ubica entre el cristalino y la retina, y contiene el humor vítreo, un material gelatinoso. La cámara anterior, se encuentra bañada de un líquido claro producido por el cuerpo ciliar, el humor acuoso (Martin J., 1996). La función principal del cristalino es enfocar la imagen hacia los fotorreceptores (Davson H., 1980).



**Figura 1. Estructura del ojo de los vertebrados.** Imagen tomada y modificada de la red.

La pared del ojo de los vertebrados se encuentra formada por tres capas, la más externa o esclerótica, es una capa fibrosa que se caracteriza por proveer soporte mecánico y protección física al ojo; está constituida por un denso tejido conectivo formado principalmente por fibras de colágena, y que en la parte anterior del ojo forma la córnea (figura 1), cuya superficie está cubierta por células epiteliales estratificadas. Por su parte, la conjuntiva es una membrana mucosa formada por células epiteliales, que cubre la superficie externa de la esclerótica y permite que el ojo se mantenga humectado (Sttar C., *et al.*, 2001).

La capa intermedia es la vascular o uvea. Esta capa sirve principalmente de soporte a los vasos sanguíneos y linfáticos que proveen de sangre al ojo. Está formada por la coroides, el cuerpo ciliar, el iris y la pupila (figura 1) (Daw N., 1995).

La coroides se caracteriza por ser un tejido altamente vascular debido a que contiene un gran sistema de vasos sanguíneos que alimenta a todas las estructuras del ojo. Es un tejido pigmentado; característica que le permite absorber el exceso de la luz que llega a los fotorreceptores evitando que estos se dañen. El cuerpo ciliado comienza al nivel de la unión entre la córnea y la esclerótica y se extiende hacia la parte posterior hasta la *ora serrata*. El iris se encuentra en la parte posterior de la córnea (figura 1) y está formado por tejido conectivo cuya parte posterior está constituida por células pigmentadas que son las que dan el color al ojo. En el centro de éste se encuentra una abertura, la pupila que regula la entrada de la luz mediante la contracción de los músculos circulares y radiales del iris. Los primeros, al contraerse, disminuyen el diámetro del iris evitando que entren los rayos de luz cuando se está en un medio altamente luminoso. Los segundos, se contraen en presencia de luz tenue, provocando el aumento del diámetro de la pupila para captar la mayor cantidad de luz (Davson H., 1980).

En la capa interna de la pared ocular se encuentra la retina, formada por dos capas, una externa, la epitelial, y una interna, la retina neural. Las principales funciones de la capa epitelial o epitelio pigmentario de la retina (EPR) son: participar en la nutrición y renovación de los fotorreceptores, promover la adhesión de la retina y absorber la luz no captada por la retina. La retina es el sitio en donde se lleva a cabo la fototransducción (Daw N., 1995). La retina proyecta la información, a través del nervio óptico, a cuatro núcleos del cerebro en los que se lleva a cabo el análisis y la interpretación de la imagen. Estos núcleos son: el núcleo geniculado lateral, en donde se lleva a cabo la percepción de los objetos; el

colículo superior, que regula el movimiento ocular; el pretectum, que controla la pupila; y el núcleo supraquiasmático, en donde se controlan los ritmos circadianos (Campbell N., *et al.*, 1999). El núcleo geniculado lateral proyecta a su vez a la corteza visual primaria donde finalmente las imágenes son procesadas y analizadas en detalle.

### **1.1.1. La Organización Estructural de la Retina**

Hace más de cien años, Santiago Ramón y Cajal describió la estructura de la retina de los vertebrados (Masland R., 2001). La retina está formada por cinco tipos de neuronas: las células fotorreceptoras, las células bipolares, las células horizontales, las células amacrinas y las células ganglionares.

Estas células se distribuyen en tres capas de núcleos celulares y dos capas sinápticas, también denominadas plexiformes. En la capa nuclear externa (CNE) se encuentran los cuerpos celulares de los fotorreceptores, en la capa nuclear interna (CNI) están los de las células bipolares, horizontales y amacrinas, y la última capa de núcleos corresponde a las células ganglionares. Las interacciones sinápticas entre fotorreceptores, células horizontales y bipolares tienen lugar en la capa plexiforme externa (CPE). La capa plexiforme interna (CPI) está formada por los axones y terminales de las células bipolares, los procesos de las células amacrinas y las dendritas de las células ganglionares (figura 2) (Gayton A., *et al.*, 1996).

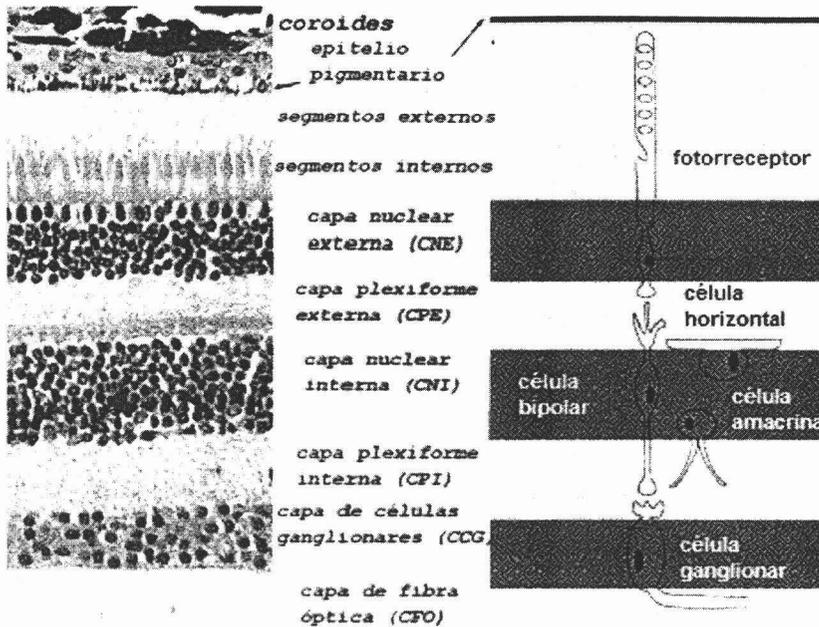


Figura 2. Estructura y organización de la retina de vertebrados. Imagen tomada y modificada de la red ([http://www.phys.ufl.edu/%...ayers\\_washu\\_icon.gif](http://www.phys.ufl.edu/%...ayers_washu_icon.gif)).

Las células de Müller son las principales células gliales en la retina (Randall D. *et al.*, 2002). Sus cuerpos celulares se localizan en la capa nuclear interna, y sus procesos forman la membrana limitante interna en la superficie de la retina y la membrana limitante externa en la capa de los fotorreceptores (Davson H., 1980).

### 1.1.2. Fotorreceptores

Los fotorreceptores son neuronas altamente diferenciadas que están formadas por un segmento externo, donde ocurre la fototransducción; un segmento interno que contiene todos los organelos del fotorreceptor; y una terminal que hace sinapsis con células horizontales y bipolares (Randall D. *et al.*, 2002).

Existen dos tipos de fotorreceptores, los bastones y los conos, que se diferencian principalmente por su morfología y función. Los primeros son generalmente delgados, mientras que los segundos tienen segmentos internos gruesos y segmentos externos cónicos. En 1866, Schultze estableció por primera vez que existía una diferencia entre los dos tipos de fotorreceptores (Gayton A., *et al.*, 1996). Observó que existe una correlación entre la predominancia de un cierto tipo de fotorreceptor y los hábitos diurnos o nocturnos. Los animales estrictamente diurnos tienden a presentar un número considerable de conos, mientras que los nocturnos se caracterizan por tener mayor número de bastones (Gayton A., *et al.*, 1996). En la mayoría de los mamíferos hay aproximadamente 20 veces más bastones que conos (Masland R., 2001).

Los segmentos externos de ambos tipos de fotorreceptores son cilios modificados. El segmento externo de los bastones está formado por un gran número de discos o sacos membranosos aplanados donde se encuentra el pigmento sensible a la luz. En los conos, existen invaginaciones de la membrana plasmática que semejan a estos discos (Davson H., 1980).

Los pigmentos visuales son proteínas conjugadas que están embebidas en la membrana de los discos, en general está formado por una proteína llamada opsina, la cual está unida a un cromóforo carotenoide (Ganong W., 1995). El pigmento de los bastones, la rodopsina, es una combinación de la proteína opsina y del retinaldehído, la cual absorbe en longitudes de onda de la porción azul-verde del espectro visible (Martin J., 1996). Los bastones son extremadamente sensibles, funcionan en condiciones de luz tenue (visión escotópica), detectando el movimiento debido a los cambios en la intensidad de la luz en el campo visual. Por su parte, los conos que se encuentran en la fovea, tienen opsinas que son pigmentos sensibles a las longitudes de onda roja, verde y azul; funcionan con mayor

iluminación (visión fotópica), y son los encargados de la visión detallada y de la percepción del color (Davson H., 1980). La integración en la corteza de la actividad de estos conos es lo que permite la visión de color, rasgo evolutivo que surgió principalmente en los primates al adoptar hábitos diurnos (Adler R., *et al.*, 1986).

El proceso de fototransducción comienza con la llegada de un fotón de luz a las células receptoras, fenómeno que provoca una serie de cambios conformacionales en las moléculas de rodopsina debido a una isomerización cis-trans del retinaldehído (Ganong W., 1995).

Este cambio conformacional desencadena una cascada de reacciones que alteran la actividad de los canales iónicos de la membrana del fotorreceptor, provocando un cambio en la conductancia al  $\text{Na}^+$  en la membrana del fotorreceptor, que lleva a una hiperpolarización de éste y a un decremento en la liberación del neurotransmisor (Ganong W., 1995; Mathews C., 1998). Se ha demostrado que el proceso de fototransducción es esencialmente igual tanto en los bastones como en los conos.

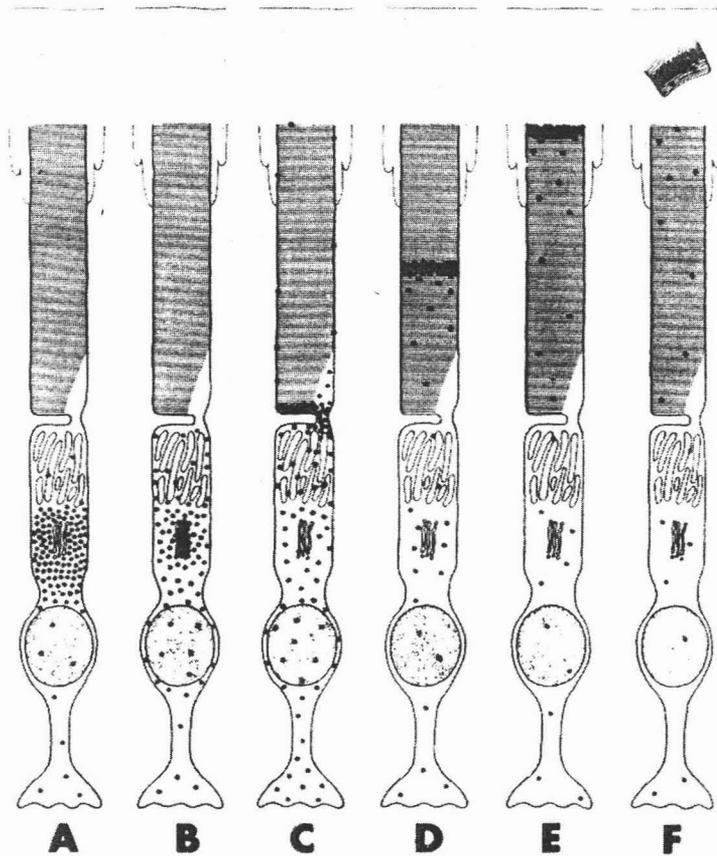
### **1. 1. 3. Metabolismo en la retina**

Por su composición y funcionamiento bioquímico, la retina presenta una tasa de respiración y oxidación mayor a la de cualquier otro tejido. El sustrato energético principal de la retina es la glucosa, la cual se encuentra en todas sus capas celulares, particularmente en los fotorreceptores. Se sabe que una de las características del metabolismo de carbohidratos en la retina es la elevada producción de ácido láctico y el alto requerimiento de  $\text{O}_2$  (Berman E., 1991).

La oxidación de la glucosa ocurre principalmente en los fotorreceptores; el 80% del  $\text{O}_2$  utilizado por los fotorreceptores se obtiene de dicha oxidación, mientras que en el resto de

la retina, solo el 55% del  $O_2$  utilizado proviene de la oxidación de la glucosa (Berman E., 1991).

Debido al constante recambio de los segmentos externos de los fotorreceptores, los cuales son fagocitados por el EPR, la síntesis de proteínas en la retina es un proceso dinámico. Las proteínas del segmento externo de los fotorreceptores se sintetizan en el retículo endoplásmico rugoso (RER) y se transportan a través del cilio hacia el segmento externo, en donde forman las membranas de los discos. El segmento externo es renovado totalmente entre 9 y 10 días en la retina de los mamíferos (figura 3) (Berman E., 1991).



**Figura 3. Síntesis de proteínas en los fotorreceptores.** **A.** Las proteínas sintetizadas se concentran en el retículo endoplasmático rugoso. **B.** Después de dirigen hacia el aparato de Golgi, en donde son glucosiladas. **C.** Las proteínas vesicularizadas pasan del segmento interno del fotorreceptor al segmento externo a través del cilio que los conecta. **D.** Las proteínas se incorporan en los nuevos discos de membrana del fotorreceptor. **E.** Las proteínas se dispersan a lo largo del segmento externo. **F.** La punta del segmento externo es fagocitada por las células del epitelio pigmentario. Tomada de Berman E., 1991.

El mecanismo de renovación de los segmentos externos del fotorreceptor depende también de la síntesis de lípidos, los cuales se acilan y desacilan en las membranas de los segmentos externos de los bastones (Berman E., 1991).

Los lípidos en la retina comprenden cerca del 20% de su peso seco; la capa de los segmentos externos de los fotorreceptores contiene del 20 al 25% del total de los lípidos de la retina. Los fosfolípidos son los más abundantes (65-75% del total), mientras que el resto de los lípidos lo conforman el colesterol (10-12%), diglicéridos, triglicéridos, y ácidos grasos (5-7%), y los esfingolípidos (2%). La retina es el único tejido que presenta una alta concentración de ácidos grasos poli-insaturados (PUFA), principalmente el docosahexaenoato. En la mayoría de las especies, el 50% del total de ácidos grasos son insaturados, y el 60% de estos últimos son PUFA. (Berman E., 1991).

Por su alto contenido en PUFA, las membranas de los fotorreceptores son más susceptibles a la peroxidación. La retina se encuentra constantemente expuesta a la luz; además, la gran cantidad de O<sub>2</sub> consecuencia de su abundante vascularización, y la alta cantidad de mitocondrias que hay en el segmento interno de los fotorreceptores, hacen a este tejido susceptible a la exposición a radicales libres (Berman E., 1991).

El daño causado a la retina por la acción de la luz ha sido un tema muy estudiado. Se ha reportado la degeneración de la retina causada por la intensidad y duración de la exposición

a la luz. En animales experimentales que se expusieron a la luz constante por varios días, se produjo degeneración en el segmento externo, en donde se observó principalmente la peroxidación de los lípidos de membrana, en especial de los PUFA (Berman E., 1991).

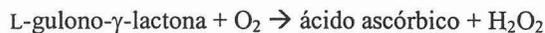
Algunas de las defensas antioxidantes de la retina son la presencia de elevadas concentraciones de moléculas tales como la vitamina C y E, así como la presencia de enzimas encargadas de reducir radicales libres tales como la glutatión peroxidasa, la glutatión S-transferasa y la superóxido dismutasa (SOD).

## 1. 2. El Ácido Ascórbico

La vitamina C o ácido ascórbico es una molécula que desempeña un papel muy importante en los sistemas biológicos, particularmente por su capacidad antioxidante. En la gran mayoría de los vertebrados el ácido ascórbico no se considera una vitamina, ya que tienen la capacidad de sintetizarlo. Los reptiles lo sintetizan en los riñones, mientras que los mamíferos como las ratas, lo sintetizan en el hígado (Hediger M., 2002).

Los primates presentan deficiencia en el gen que codifica para la L-gulono- $\gamma$ -lactona oxidasa (LGO), enzima terminal en la síntesis de la vitamina C. Es por esta razón que los primates la deben adquirir en la dieta (Liang W., *et al.*, 2001).

LGO



Evolutivamente, se considera que esta enzima apareció en los animales cuando éstos invadieron el medio terrestre, lo que aparentemente les permitió contar con un antioxidante que les protegió contra el daño causado por la toxicidad del oxígeno. Los primates perdieron la capacidad de sintetizar ácido ascórbico hace aproximadamente 25 millones de

años (Wiseman H., *et al.*, 2000). Algunos estudios han demostrado que la desaparición de la LGO correlaciona con el aumento en la actividad de la SOD (Nandi A., *et al.*, 1997).

El escorbuto es un padecimiento provocado por la ausencia o disminución de vitamina C en la dieta, que se caracteriza por debilidad en los músculos, hinchamiento y sangrado de las encías, pérdida de dientes, sangrado por debajo de la piel y falta de cicatrización de las heridas (Hediger M., 2002; Wiseman H., *et al.*, 2000).

El interés en este grave padecimiento provocó que en 1922, Albert Szent-Györgyi aislara y cristalizara a la vitamina C a partir de las glándulas adrenales de bovinos, denominándola ácido ascórbico ya que prevenía el escorbuto (Wiseman H., *et al.*, 2000; Buettner G. y Jurkiewicz B., 1996).

### **1. 2. 1. Propiedades Físicoquímicas**

La estructura del ácido ascórbico, determinada por W. M. Harworth en 1933, se caracteriza por tener un anillo lactónico con cinco lados, en el que se encuentra un grupo ene-diol bifuncional con un grupo carbonilo adyacente (figura 5) (Buettner G. y Jurkiewicz B., 1996). El ácido ascórbico ( $\text{AscH}^+$ ) pierde dos electrones y forma al ácido dehidroáscorbico (DHA), su forma oxidada. Al perder un primer electrón, se forma el radical semidehidroascorbato ( $\text{Asc}^{\cdot}$ ) que es muy inestable, por lo que pierde rápidamente su electrón libre para formar al DHA (Buettner G. y Jurkiewicz B., 1996).

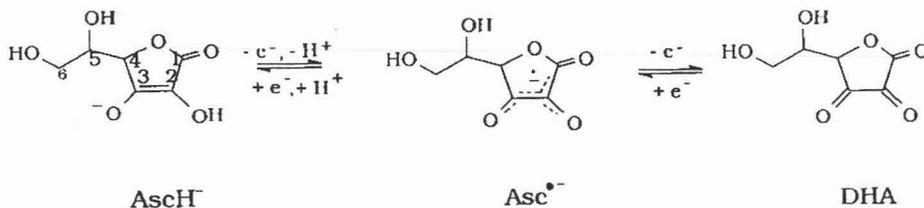
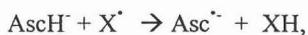


Figura 4. Oxidación del ácido ascórbico. Tomada de Buettner G. y Jurkiewicz B., 1996.

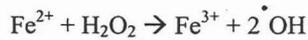
Existen vías metabólicas en las que se puede reestablecer el ácido ascórbico a partir del radical  $\text{Asc}^{\bullet-}$  y del DHA, las cuales utilizan nicotinamida adenin diucleótido oxidada ( $\text{NADH}^+$ ) o glutatión (GSH) como fuentes reductoras (Halliwell B., 2001).

El ácido ascórbico es un diácido, con un  $\text{pK}_{a1}=4.25$  y un  $\text{pK}_{a2}=11.8$ . El  $\text{pK}_{a1}$  le confiere la estabilidad en la resonancia del monoanión  $\text{AsCH}^-$ . Por su parte, el radical libre  $\text{Asc}^{\bullet-}$  es un ácido fuerte con un  $\text{pK}_a=-0.86$ , mientras que DHA tiene un  $\text{pK}_a \approx 9$  (Buettner G. y Jurkiewicz B., 1996). El ácido ascórbico puede reducir moléculas tales como el radical hidroxilo ( $\text{HO}^\bullet$ ), el radical *tert*-butil alcoxilo ( $\text{RO}^\bullet$ ), el radical glutatilo ( $\text{GS}^\bullet$ ), el radical urato ( $\text{UH}^\bullet$ ), y el radical tocoferoxilo ( $\text{TO}^\bullet$ ). La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



donde  $\text{X}^\bullet$  es una de las formas de radicales libres oxidantes (Buettner G. y Jurkiewicz B., *et al.*, 1995).

No obstante, el ácido ascórbico también puede actuar como una molécula pro-oxidante, ya que reduce metales tales como el fierro, cobre, níquel y rutenio, y en condiciones aeróbicas puede catalizar reacciones de Fenton si dichos metales se encuentran presentes:



Los radicales libres producidos en la reacción de Fenton, principalmente hidroxilan a los anillos aromáticos de aminoácidos incluyendo a la histidina y al triptofano y provocan la formación de dímeros de tirosinas (Evans B., *et al.*, 2000).

Existe un efecto diferencial en la acción del ácido ascórbico sobre estos metales. Este efecto depende principalmente de la concentración de los mismos: a bajas concentraciones, el ácido ascórbico actúa como antioxidante; si las concentraciones de los metales aumentan, la presencia de ácido ascórbico puede ser dañina, ya que actúa como pro-oxidante (Buettner G. y Jurkiewicz B., 1995).

### **1. 2. 2. Importancia del Ácido Ascórbico en los Sistemas Biológicos**

En los sistemas biológicos la vitamina C se encuentra en dos formas, una forma reducida, el ácido ascórbico y una forma oxidada, el ácido dehidroascórbico (DHA). A pH fisiológico (7.4) el ácido ascórbico presenta una carga negativa, mientras que el DHA no presenta carga (Liang W., *et al.*, 2001).

La vitamina C se absorbe en el intestino delgado a través de las células epiteliales y de ahí debe ser transportado a los órganos que lo necesitan (Liang W., *et al.*, 2001).

Los niveles de ácido ascórbico en plasma oscilan entre 10 y 160  $\mu\text{M}$  y cualquier exceso de la vitamina C es desechado por los riñones (Liang W., *et al.*, 2001). La concentración de ácido ascórbico en las glándulas adrenales, la glándula pituitaria, el timo, el cuerpo lúteo, y

una gran variedad de neuronas alcanza valores de hasta 100 veces mayores que los encontrados en plasma. Estos valores están asociados a la presencia de enzimas en las que el ácido ascórbico actúa como cofactor, tales como la síntesis de proteínas de la matriz extracelular y la síntesis de neurotransmisores (Liang W., *et al.*, 2001; Hediger M., 2002).

La vitamina C se requiere en la síntesis de colágena para que se lleve a cabo la hidroxilación de residuos de prolina en la procolágena. Además, la hidroxilación postraduccional de los residuos de prolina y lisina, llevada a cabo por las enzimas prolil- y lisil- hidroxilasas, cuyo cofactor es el ácido ascórbico, es esencial para la formación y secreción de la colágena. Cuando existe deficiencia de ácido ascórbico, no se lleva a cabo la hidroxilación de los residuos de prolina y lisina en la colágena, siendo esta la razón por la que la deficiencia de ácido ascórbico causa inestabilidad del tejido conectivo, los huesos, la dentina, etc. La inestabilidad de la colágena en las paredes de los vasos sanguíneos provoca el rompimiento de capilares pequeños y el consecuente sangrado en los tejidos (Hediger M., 2002).

En el sistema nervioso y en las glándulas suprarrenales, el ácido ascórbico interviene en la síntesis de neurotransmisores, como cofactor de varias enzimas como es el caso de la lisil-, propil- y dopamina- $\beta$ -hidroxilasas, enzimas que catalizan la conversión de dopamina a noradrenalina (Wiseman H., *et al.*, 2000). Entre otras reacciones enzimáticas en las que el ácido ascórbico participa como cofactor podemos mencionar la síntesis de la carnitina, y la amidación de péptidos (donde es cofactor de la  $\alpha$ -amida monooxigenasa) (Hediger M. A., 2002).

Adicionalmente se ha observado que el ácido ascórbico puede tener un efecto benéfico en el sistema inmune y es esencial en la actividad fagocítica de neutrófilos, linfocitos y macrófagos (Evans B., *et al.*, 2000). Además, se ha encontrado evidencia de que reduce los

riesgos de enfermedades crónicas como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y en las cataratas (Maulén N., *et al.*, 2003; Liang W., *et al.*, 2001).

Las células requieren constantemente de moléculas antioxidantes que les proporcionan protección contra algún posible daño causado por la acción de radicales libres, que son resultado de su metabolismo. Entre las especies de oxígeno reactivas (EOR) se pueden mencionar el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el radical perhidroxilo ( $HO_2^{\cdot-}$ ), el radical peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $HO^{\cdot-}$ ); las especies de nitrógeno reactivas (ENR) se derivan del óxido nítrico e incluyen los peroxinitratos (Wiseman H., *et al.*, 2000).

El superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) es el producto de la reducción del oxígeno molecular que se forma en la cadena respiratoria en la mitocondria; el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) se produce en el cerebro por la degradación catalítica de neurotransmisores como la dopamina (Evans B., *et al.*, 2000). Ciertas funciones celulares requieren la presencia de un ambiente oxidante, por ejemplo, el plegamiento de proteínas en el retículo endoplásmico es facilitado al llevarse a cabo en un medio que es más oxidante en comparación a los demás sitios de la célula, permitiendo la formación de puentes disulfuro; la presencia de pequeñas cantidades de EOR estimulan la proliferación celular, ya que algunos de los factores de transcripción necesitan un medio ligeramente oxidante para funcionar (Halliwell B., 2000). Altas concentraciones pueden llegar a causar daños graves. Entre los daños que los radicales libres producen en la célula podemos mencionar la modificación de las bases nitrogenadas del ADN causada por la acción de radicales hidroxilo que pueden provocar cambios importantes en la expresión genética; la oxidación de las cadenas de proteínas causando la disfunción de enzimas, receptores y transportadores; la peroxidación de lípidos, alterando la

funcionalidad de las membranas celulares y la incorporación de nuevos lípidos a éstas (Evans B., *et al.*, 2000).

Cuando un radical libre actúa sobre un ácido graso poli-insaturado (PUFA) se produce la peroxidación de éste, ya que el radical libre reacciona con el hidrógeno de su carbono metilado. Este complejo a su vez experimenta un rearrreglo, interaccionando con el oxígeno molecular para producir un radical peroxilo. Este último radical actúa sobre otro PUFA produciéndose así un daño oxidativo en secuencia. Los hidroperóxidos lipídicos que se producen se rompen después para formar productos que presentan propiedades citotóxicas, mutagénicas y genotóxicas causando un daño severo e irreversible en la célula (Evans B., *et al.*, 2000).

Los peróxidos de hidrógeno, los radicales hidroxilo y los radicales superóxido provocan daño a proteínas y a aminoácidos como la cisteína (en los grupos sulfhidrilo), lisina (en las aminas), la serina (en los grupos hidroxilo), fenilalanina, tirosina, histidina y triptofano (en los anillos aromáticos). Además, la unión de productos de la peroxidación de lípidos, como el malondialdehído, pueden unirse a las bases nitrogenadas del ADN (Halliwell B., 1999).

La generación de radicales libres está en equilibrio con las defensas antioxidantes de las células. Se sabe que, en condiciones normales, el equilibrio entre la producción de radicales libres y los mecanismos antioxidantes se inclina de manera muy ligera hacia el lado de la producción de los radicales libres (Evans B., *et al.*, 2000).

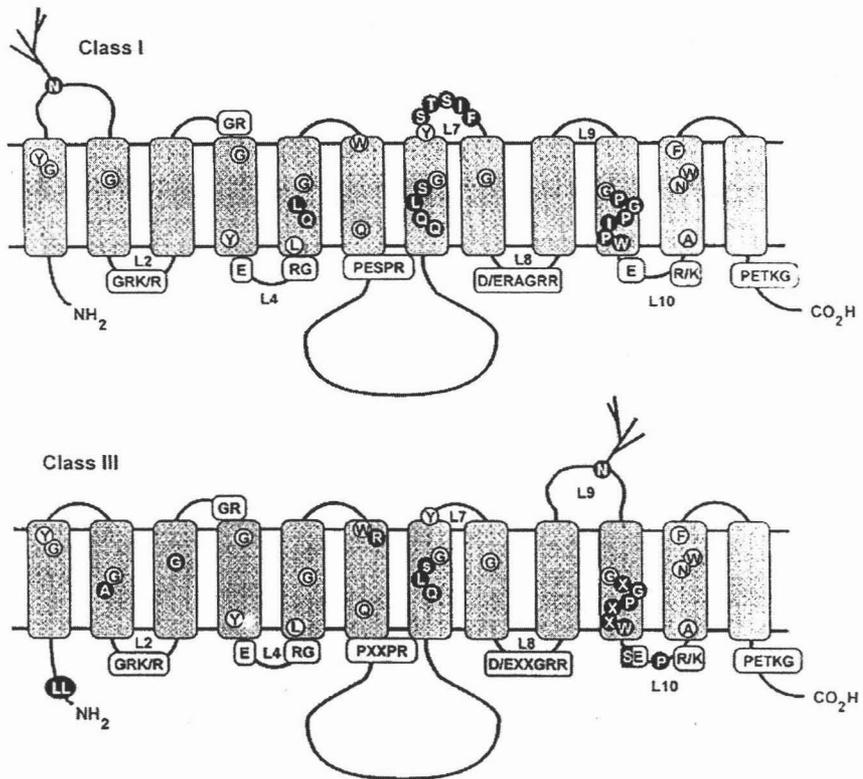
### **1. 2. 3. Transporte del Ácido Ascórbico**

En los cobayos y en los primates, el ácido ascórbico ingerido en la dieta, ya sea en su forma reducida u oxidada, es absorbido en el tracto gastrointestinal, de donde son absorbidos a su vez por enterocitos y después distribuidos a los distintos tejidos por sistemas específicos de

transporte. El DHA se produce cuando el ácido ascórbico reacciona con oxidantes en el lumen del tracto gastrointestinal; después los enterocitos, por la acción de DHA reductasas, convierten el DHA en ácido ascórbico. De esta manera, las concentraciones intracelulares de DHA se mantienen bajas. En el plasma se encuentra preferentemente la forma reducida, el ácido ascórbico; algunos tipos celulares, tales como los neutrófilos, eritrocitos, hepatocitos, astrocitos y osteoblastos tienen la capacidad de transportar DHA y reducirlo a ácido ascórbico (Wilson J., 2002).

La vitamina C se acumula en las células a través de transportadores específicos dependientes de  $\text{Na}^+$  o a través de los transportadores de glucosa. Se sabe que el DHA se transporta por difusión facilitada a través de los transportadores de glucosa (Liang W., *et al.*, 2001). Existen dos tipos de transportadores de glucosa, los cuales son estructural y funcionalmente distintos. Los cotransportadores de glucosa dependientes de  $\text{Na}^+$ , los SGLT, expresados en el intestino y tubo proximal del riñón, tienen 12 segmentos transmembranales con un dominio de leucina en una de las asas extracelulares que puede estar involucrado en la formación de oligómeros (Brown G., 2000). Los transportadores de glucosa no dependientes de  $\text{Na}^+$ , los GLUT, están formados por 12 segmentos transmembranales. Se han reportado 12 tipos de GLUTs, pero se han caracterizado principalmente 5 (GLUT1-5). El GLUT1 ( $K_m \sim 20 \text{mmol/L}$ ), el primer transportador descrito, se encuentra presente principalmente en las membranas de eritrocitos y altamente distribuido en tejidos fetales. El GLUT2, con la  $K_m$  más alta ( $\sim 40 \text{mmol/L}$ ), se encuentra presente principalmente en el hígado, riñón, células  $\beta$ -pancreáticas y en las células de la mucosa intestinal. El GLUT3 ( $K_m \sim 10 \text{mmol/L}$ ) se encuentra distribuido principalmente en las neuronas del sistema nervioso central. Por su parte, el GLUT4 se caracteriza por tener la menor  $K_m$  ( $\sim 3 \text{mmol/L}$ ) y ser sensible a insulina; se localiza en el músculo esquelético y en

el tejido adiposo. El GLUT5 es un transportador de fructuosa. (Brown G., 2000; Wood S., *et al.*, 2003)



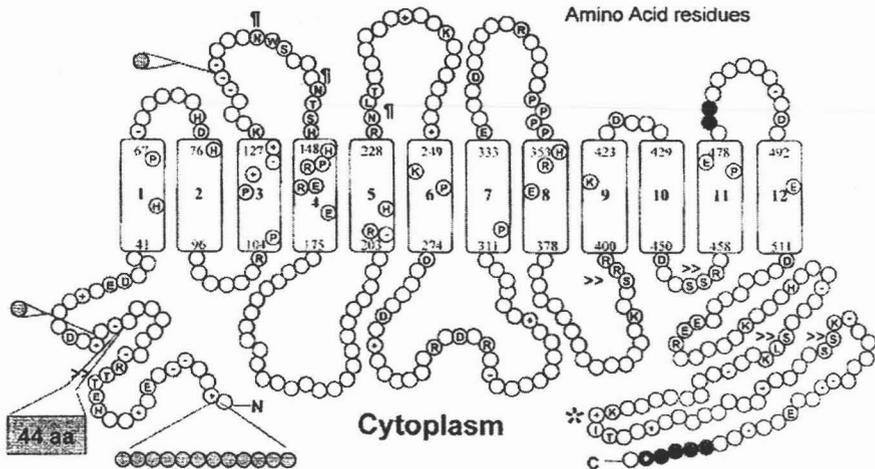
**Figura 5. Modelo esquemático de los GLUT que muestra sus 12 dominios transmembranales.** En la parte superior los GLUT de la clase I (que comprende del GLUT1-4; esta clasificación se basa en la función, estructura y distribución de los transportadores); en la inferior la clase III (que comprende GLUT6, GLUT8, GLUT10, GLUT12 y HMIT; esta clase se caracteriza por tener un sitio de glicosilación en el asa 9). En blanco se muestran los residuos de aminoácidos que se encuentran altamente conservados en todas las clases de GLUT; en negro se muestran los residuos que se consideran característicos de cada clase de GLUT.

Tomada de Joost H. y Thorens B., 2001.

Estudios en donde se expresaron los tipos de transportadores de glucosa GLUT1-5 y SGLT1 en ovocitos de *Xenopus laevis* y en cultivos de células CHO (Chinese Hamster Ovary cells), demostraron que el transporte de DHA se llevaba a cabo por las isoformas GLUT1 con una  $K_m$  de 1.1 mM y GLUT3 con una  $K_m$  de 1.7 mM (Rumsey S, *et al.*, 1997; Wilson J., 2002).

Por su gran actividad metabólica, el cerebro requiere de una gran concentración de glucosa, así como de moléculas antioxidantes; la concentración de la forma reducida de vitamina C en el cerebro es 10 veces mayor que en el plasma (~ 1 mM en cerebro de humanos). Se ha demostrado que es en su forma oxidada que la vitamina C atraviesa la barrera hematoencefálica a través del GLUT1 que expresan las células endoteliales de ésta. Una vez que el DHA atraviesa la barrera hematoencefálica se reduce, aumentando las concentraciones de ácido ascórbico en el cerebro (Agus D., *et al.*, 1997).

Adicional al transporte de DHA por medio de los GLUT, se ha reportado la presencia de transportadores específicos de ácido ascórbico, SVCT (por sus siglas en inglés (Sodium dependent Vitamin C Transporters). Estos transportadores dependientes de  $\text{Na}^+$  y pertenecen a una nueva familia de transportadores de membrana que no muestra homología con otras familias de co-transportadores de  $\text{Na}^+$  (Liang W., *et al.*, 2001).



**Figura 6. Modelo esquemático de los SVCT que muestra la secuencia de aminoácidos y sus 12 dominios transmembranales.** Los dominios potenciales de membrana están enumerados y se muestran los sitios de glucosilación (¶), de proteína cinasa C (>>) y de fosforilación (★). Se muestra igualmente la distribución de algunos residuos de aminoácidos utilizando un código de una sola letra o + y - para representar la carga positiva y negativa de los aminoácidos, respectivamente. Los residuos de aminoácidos que están ausentes en el hSVCT2 se indican como (●), mientras que los residuos que se encuentran presentes solamente en el hSVCT2 están sombreados. Tomada de Liang W. *et al.*, 2001.

Los SVCT presentan 12 dominios transmembranales con sus dominios N y C terminales localizados en la cara citoplásmica. Una de las características estructurales de los SVCT es la presencia de una cadena conservada de residuos de prolina localizada en el asa extracelular 7 entre los dominios transmembranales 7 y 8 que mantienen a éstos en su lugar. Estos dominios constituyen el sitio de unión del sustrato (Liang W., *et al.*, 2001).

Existen dos isoformas de este transportador, el SVCT1 y el SVCT2; la principal diferencia entre estas isoformas es la presencia de una secuencia de 12 y 44 aminoácidos en el dominio N terminal. Ambas isoformas presentan cinco sitios potenciales de fosforilación dependiente de proteína cinasa C (PKC) (Liang W., *et al.*, 2001). Otra diferencia importante entre estas isoformas es su distribución en los tejidos. El SVCT1 se encuentra altamente distribuido en la membrana apical de los epitelios renal e intestinal, mientras que el SVCT2 se encuentra principalmente en el sistema nervioso, sistema endocrino, riñón y

placenta. (Hediger M., 2002; Rajan D., *et al.*, 1999). El transportador SVCT2 en el plexo coroideo, es el encargado de proveer ácido ascórbico al fluido cerebroespinal (Hediger M., 2002; Angelow S., *et al.*, 2003).

Estos transportadores dependientes de  $\text{Na}^+$  parecen jugar un papel importante en los tejidos que están expuestos a un gran estrés oxidativo, ya que los ratones “knock out” para SVCT2 mueren a los pocos minutos de nacer, a causa de severas hemorragias cerebrales y deficiencias respiratorias. Los pulmones de estos ratones no llevan a cabo la expansión alveolar requerida al momento del nacimiento (Sotiriou S., *et al.*, 2002). Estos ratones presentan bajos niveles de vitamina C y su transporte a través de la placenta es notablemente reducido. Los fibroblastos en cultivo pertenecientes a estos ratones, no llevan a cabo el transporte de ácido ascórbico. Estos resultados sugieren fuertemente que el SVCT2 protege a los tejidos contra el estrés oxidativo.

En el sistema nervioso, el transporte de ácido ascórbico resulta particularmente de gran importancia debido a la elevada actividad metabólica de sus células. En algunos estudios en los que se utilizaron cultivos de neuronas y glia del hipocampo de ratas, se observó que estos tipos celulares sólo presentan el transporte dependiente de  $\text{Na}^+$  (Patel M., *et al.*, 2001). La continua exposición de la retina a la luz, así como la gran actividad metabólica y la actividad fagocítica del EPR en el continuo recambio de los segmentos externos de los fotorreceptores, pueden llevar a un daño oxidativo en las células que se presentan en diversas patologías (Evans B., *et al.*, 2000).

La hiperglucemia se caracteriza por el incremento en las concentraciones de glucosa en plasma, lo que lleva a patologías que incluyen a la retinopatía. La hiperglucemia provoca complicaciones microvasculares como la fragilidad capilar en las microangiopatías, lo cual a su vez provoca una falta considerable de  $\text{O}_2$  y de nutrientes a sitios tales como la retina y

cerebro, entre otros (Root-Bernstein R., *et al.*, 2002). Además se ha encontrado que la hiperglucemia incrementa la producción de EOR en órganos afectados por la diabetes, como lo es el ojo. Los EOR parecen tener una gran influencia en las complicaciones durante la diabetes, tales como los observados en la retinopatía diabética (Root-Bernstein R., *et al.*, 2002). La presencia de antioxidantes en el tejido durante este padecimiento puede ser importante para evitar los daños producidos.

El transporte del ácido ascórbico en los sistemas biológicos, y en particular en la retina, ha sido poco estudiado. La existencia en la retina de un sistema de transporte de la forma reducida de ácido ascórbico debe ser relevante para mantener dicho equilibrio. La posible modificación de este transporte durante patologías que causan daños severos en el ojo, tales como las retinopatías características de la diabetes, es de interés particular ya que esta molécula puede proporcionar protección contra radicales libres.

## II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1. Hipótesis

La retina, al igual que otros tejidos del sistema nervioso, presenta el transporte de ácido ascórbico dependiente de  $\text{Na}^+$  (SVCT).

### 2.2. Objetivo

Caracterizar el transporte del ácido ascórbico en la retina de la rata, y su actividad bajo diferentes condiciones experimentales.

## III. METODOS

### 3.1. Animales

En este estudio se utilizaron ratas adultas (~ 12 semanas de edad) de la cepa Long Evans que pesaban entre 150 y 200g. Las ratas se mantuvieron en el bioterio bajo condiciones de luz y oscuridad 12:12 hrs con alimento y agua *ad libitum*.

A un grupo de ratas se les indujo hiperglucemia por la administración intra-peritoneal de estreptozotocina (STZ; 48.7 mg/kg, en buffer de citratos 90 mM con NaCl 10 mM, pH 4.5, durante dos días consecutivos, considerándose al siguiente día como el primer día de tratamiento). Los animales fueron utilizados a los 20 y 45 días después de la administración de estreptozotocina.

La concentración de glucosa en plasma se determinó con un detector Accu Check Active (Roche). Se consideraron animales hiperglucémicos a los que presentaron una concentración de glucosa en plasma mayor o igual a 300 mg/dL.

### **3.2. Extracción de los Tejidos**

Las ratas fueron decapitadas, se extirparon los glóbulos oculares y se seccionaron transversalmente, eliminándose la parte anterior de éstos. Las retinas se extrajeron de la parte posterior y se colocaron en una solución Ringer Krebs Bicarbonato (RKB; 118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.17 mM MgSO<sub>4</sub> y 5.6 mM glucosa, pH 7.4).

### **3.3. Transporte de Ácido Ascórbico**

Las retinas se incubaron a 37° C durante diferentes tiempos en 1 ml de RKB que contenía 0.1 µCi/ml de ácido ascórbico-<sup>14</sup>COOH (13.0 mCi/mmol, Amersham Biosciences) a una concentración final de 100 µM, en presencia o ausencia de 1 mM de ditioneitol (DTT). Al término de la incubación, el tejido se lavó en 5 ml de RKB frío (4° C), se pesó y disolvió en 0.5 ml de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 1% y se incubaron a 40°C durante 30 minutos. La radioactividad en el tejido se midió después de agregar 5ml de tritosol, en un contador de centelleo líquido (LS 6500, BECKMAN, E.U.A.).

En los experimentos efectuados en ausencia de Na<sup>+</sup>, el NaCl se reemplazó por una cantidad equimolar de cloruro de colina y el bicarbonato de sodio se reemplazó por el de potasio.

### **3.4. Salida de Ácido Ascórbico**

Las retinas se preincubaron por 20 minutos con 100µM de ácido ascórbico -<sup>14</sup>C, y después se transfirieron a 1ml de RKB en presencia o ausencia de ácido ascórbico no radioactivo, y se incubaron por diferentes tiempos. Una vez terminada la incubación, la radioactividad remanente en el tejido se determinó como se describió anteriormente.

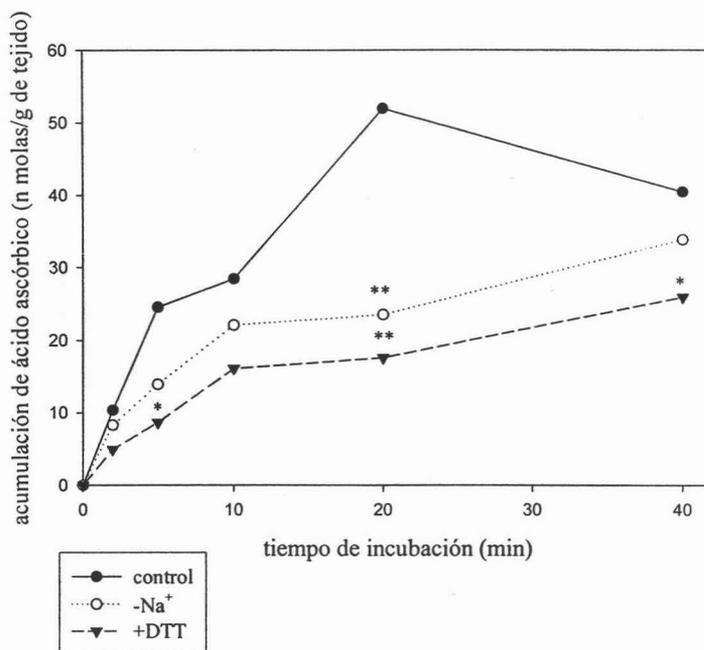
### **3.5. Análisis estadístico**

Los resultados se analizaron con una prueba de  $t$  no pareada y se consideraron significativos con una  $p < 0.05$ .

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Transporte de Ácido Ascórbico en Función del Tiempo

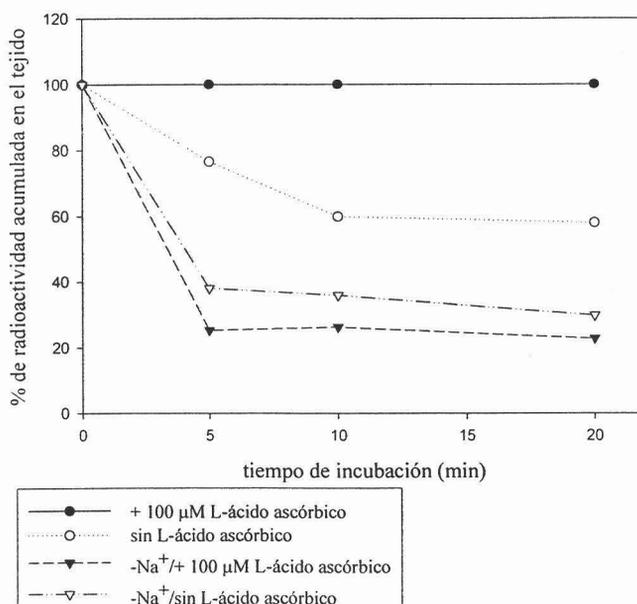
Inicialmente se estudió la acumulación de ácido ascórbico en las retinas, en un medio de incubación RKB, a diferentes tiempos de incubación observándose que aumenta en función del tiempo, y comienza a saturarse a los 20 minutos. La acumulación del ácido ascórbico fue significativamente menor en ausencia de  $\text{Na}^+$  y en presencia de DTT (70-80%) (figura 1).



**Figura 1. Transporte de ácido ascórbico en función del tiempo.** Las retinas se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  en presencia de  $100\mu\text{M}$  de ácido ascórbico como se indica en los Métodos, bajo diferentes condiciones. Los valores expresan la media de 3-7 datos, el error estándar fue siempre menor del 10%. \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$  con respecto al control.

#### 4.2. Salida del Ácido Ascórbico

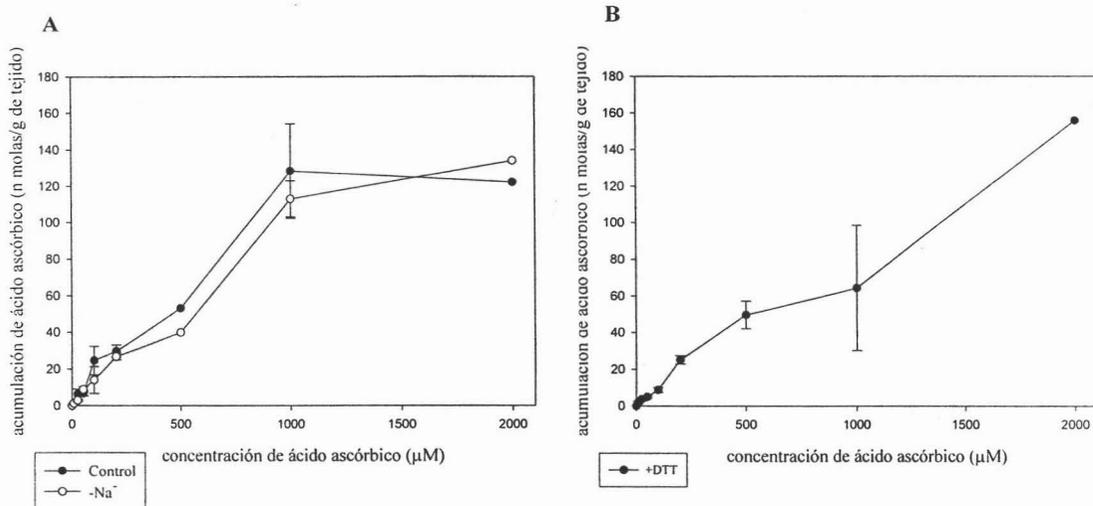
La salida de ácido ascórbico-<sup>14</sup>C previamente acumulado en las retinas se muestra en la figura 2. En presencia de Na<sup>+</sup> y de ácido ascórbico en el medio de incubación, la radioactividad acumulada se mantiene constante en función del tiempo. En ausencia de ácido ascórbico en el medio de incubación, la radioactividad acumulada disminuyó considerablemente en los primeros 10 minutos de incubación. La ausencia de Na<sup>+</sup> causó una liberación del 75%, tanto en presencia como en ausencia de ácido ascórbico.



**Figura 2. Salida de Ácido ascórbico.** Las retinas se preincubaron con ácido ascórbico radioactivo durante 20 minutos y posteriormente se incubaron en un medio que contenía 100 μM de ácido ascórbico no radioactivo, en presencia o ausencia de Na<sup>+</sup>, como se indica en los Métodos. Los valores expresan la media de 2-3 experimentos.

### 4.3. Transporte de Ácido Ascórbico en Función de la Concentración

Las retinas se incubaron durante cinco minutos en presencia de diferentes concentraciones de ácido ascórbico (7-1000  $\mu\text{M}$ ). Los resultados indican que la acumulación de ácido ascórbico se satura a concentraciones del orden de 1 mM (figura 3 A y B).



**Figura 3. Transporte de ácido ascórbico a distintas concentraciones.** La acumulación de ácido ascórbico se llevó a cabo durante 5 minutos bajo diferentes condiciones de incubación. Los valores expresan la media  $\pm$  el error estándar de 3-6 datos. **A.** Acumulación de ácido ascórbico en ausencia de DTT. **B.** Acumulación de ácido ascórbico en presencia de DTT.

El análisis de los datos de la gráfica de Michaelis Menten obtenida a partir de la figura 3, reveló una  $K_m$  aparente de 769  $\mu\text{M}$  en las retinas incubadas en medio normal (RKB), mientras que en ausencia de  $\text{Na}^+$  fue de 833  $\mu\text{M}$ ; en presencia de DTT se observó una  $K_m$  de 1.5 mM (tabla 1).

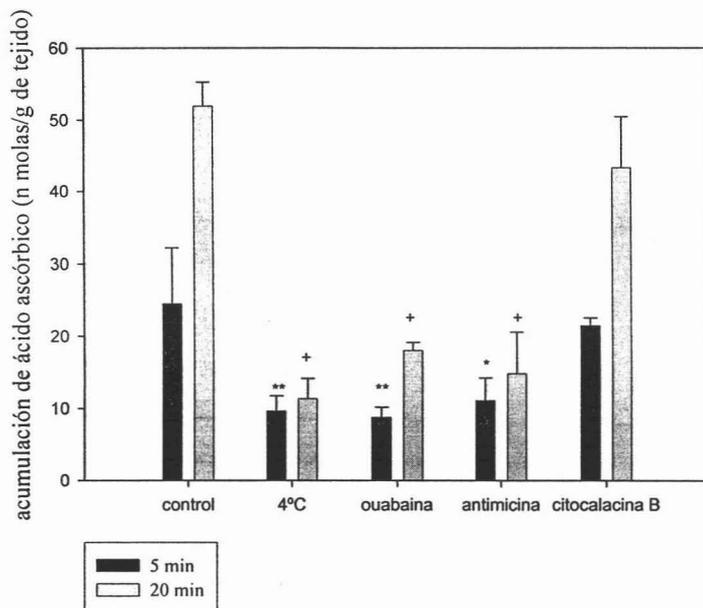
*Tabla 1. Constantes Cinéticas de la Acumulación de Ácido Ascórbico*

Condición	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{max}$ (n molas/g)
Control	769 $\pm$ 92	100 $\pm$ 12
- $\text{Na}^+$	833 $\pm$ 99	151 $\pm$ 18
+ DTT	1551 $\pm$ 180	66 $\pm$ 8

*Los valores se obtuvieron con la formula de Michaelis-Menten a partir de los datos de la figura 3.*

#### 4.4. Efecto de Diferentes Compuestos en la Acumulación de Ácido Ascórbico.

La acumulación de ácido ascórbico disminuyó en presencia de inhibidores metabólicos tales como ouabaina y antimicina y durante la incubación a baja temperatura (4° C) (figura 4). Sin embargo, la acumulación de ácido ascórbico no se modificó en presencia de citocalacina B, compuesto que inhibe el transporte de glucosa (figura 4).



**Figura 4. Acumulación de ácido ascórbico en distintas condiciones.** La acumulación de ácido ascórbico se llevó a cabo durante 5 y 20 minutos bajo diferentes condiciones de incubación. Ouabaina 1 mM; antimicina 10  $\mu$ M; citocalacina B 20  $\mu$ M. Los valores expresan la media  $\pm$  el error estándar de 3-5 datos. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y + $p < 0.01$  en relación a los respectivos controles.

#### 4.5. Transporte de Ácido ascórbico en Función de la Concentración de Glucosa Extracelular

Cuando las retinas se incubaron en presencia de distintas concentraciones de glucosa extracelular no se observó efecto alguno en la acumulación de ácido ascórbico (figura 5).

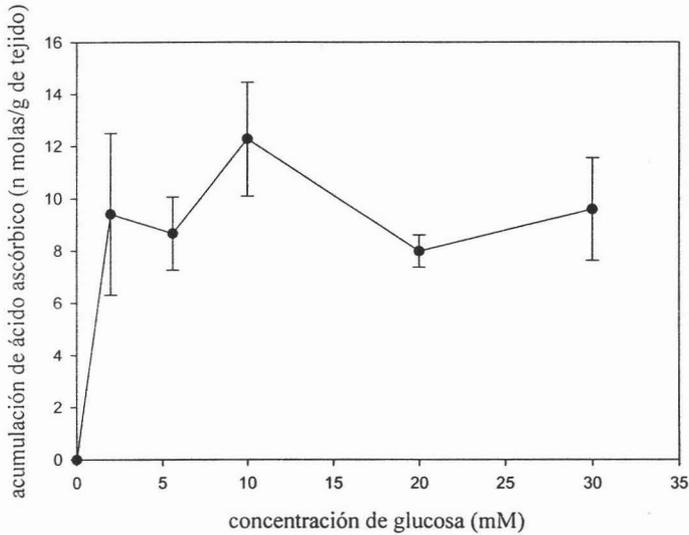
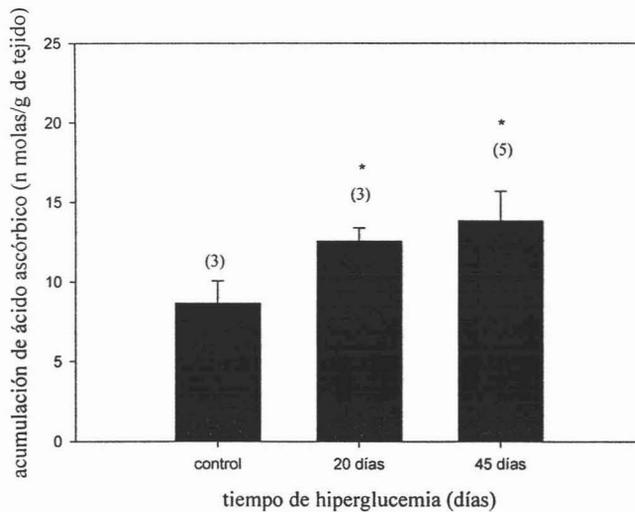


Figura 5. Efecto de distintas concentraciones de glucosa. Las retinas se incubaron durante 5 minutos, como se indica en Métodos, en un medio que contenía 100  $\mu$ M de ácido ascórbico y en presencia de distintas concentraciones de glucosa (2-30 mM). Los valores expresan la media  $\pm$  el error estándar de 3-4 datos.

#### 4.6. Transporte de Ácido ascórbico en la Retina de Ratas Hiperglucémicas

La acumulación de ácido ascórbico se estudió en las retinas de ratas a las que se les indujo hiperglucemia por la administración de estreptozotocina. Las ratas tratadas muestran en promedio niveles de glucosa en plasma de  $497.12 \pm 20$  mg/dL, mientras que los animales control presentan valores de  $140 \pm 6$  mg/dL. El transporte de ácido ascórbico en la retina de ratas diabéticas después de 20 y 45 días del tratamiento con estreptozotocina presentó un aumento significativo (35 %) (figura 6).



**Figura 6. Transporte de ácido ascórbico en las retinas de ratas hiperglucémicas.** Las retinas de ratas hiperglucémicas de 20 y 45 días se incubaron durante cinco minutos en presencia de una concentración  $100\mu\text{M}$  de ácido ascórbico y en presencia de DTT y de  $\text{Na}^+$ . Los valores expresan la media  $\pm$  el error estándar, el número entre paréntesis muestra el número de experimentos, \* $p < 0.05$  en relación al control.

## V. DISCUSIÓN

En los sistemas biológicos el ácido ascórbico es una molécula esencial que participa en un gran número de reacciones enzimáticas, además de desempeñar un papel muy importante como antioxidante. Los niveles de vitamina C en plasma oscilan entre 10 y 160  $\mu\text{M}$  siendo la forma reducida la que predomina (90 % del total de vitamina C en plasma) (Agus D. *et al.*, 1997; Rice M. 2000; Hosoya K. *et al.* 2004), por lo que se pensaría que la acumulación de ácido ascórbico en los distintos tejidos ocurre preferentemente por medio de los transportadores dependientes de  $\text{Na}^+$ . En el cerebro la vitamina C se acumula a través de la barrera hematoencefálica donde el DHA es transportado a través del GLUT1; una vez que el DHA atraviesa la barrera, se reduce y es acumulado en los distintos tipos celulares en forma de ácido ascórbico (Agus D. *et al.*, 1997). Varios estudios han demostrado que en un gran número de tipos celulares, incluyendo células del cristalino, astrocitos y neuronas, la acumulación de vitamina C ocurre a través del SVCT2 (Rice M. 2000; Patel M. *et al.*, 2001; Castro M. *et al.*, 2001; Kannan R. *et al.*, 2001). Estos tipos celulares presentan un alto requerimiento de ácido ascórbico, donde las concentraciones de éste alcanzan valores de 1-10 mM (Rice M. 2000).

La retina es un tejido con una tasa metabólica elevada. Su alto contenido en ácidos grasos poli-insaturados, su elevada tasa respiratoria, así como por sus características fisiológicas (absorción de la luz), hacen a este tejido susceptible al daño causado por el estrés oxidativo. El requerimiento de una molécula antioxidante como la vitamina C puede ser importante en un tejido con tales características. Una proporción importante de este antioxidante se obtiene de la dieta, lo que sugiere que los diferentes tipos celulares tienen mecanismos especiales para su acumulación.

Con el fin de caracterizar el transporte de la vitamina C en la retina de la rata, se estudió la acumulación de ácido ascórbico bajo distintas condiciones de incubación. Los resultados de los experimentos realizados muestran que existe una mayor acumulación saturable de ácido ascórbico en función del tiempo. En ausencia de  $\text{Na}^+$  en el medio de incubación la acumulación disminuye de manera considerable, indicando que la acumulación de ácido ascórbico en la retina es dependiente de  $\text{Na}^+$ . De igual manera, los experimentos de eflujo de ácido ascórbico mostraron esta dependencia de  $\text{Na}^+$ , ya que al incubar los tejidos en ausencia del mismo se observó un incremento en su liberación. Sin embargo, se observó que en presencia de  $\text{Na}^+$  la acumulación de ácido ascórbico depende de la concentración extracelular de éste, ya que al incubar el tejido en un medio carente de ácido ascórbico se observó una disminución considerable del ácido ascórbico previamente acumulado.

Los estudios cinéticos mostraron un sistema saturable con una  $K_m$  aparente de 769  $\mu\text{M}$ . La  $K_m$  no se modificó en un medio libre de  $\text{Na}^+$ . Esta afinidad es baja en comparación con las reportadas para los transportadores SVCT clonados a partir de riñón de humanos, donde la  $K_m$  aparente es de 252  $\mu\text{M}$  y 21.3  $\mu\text{M}$  para el hSVCT1 y hSVCT2 respectivamente (Daruwala R. *et al.*, 1999). Asimismo, en cultivos de células HRPE (human retinal pigment epithelial) en los que se expresó el transportador SVCT2 clonado a partir de trofoblastos de placenta humana se obtuvo una  $K_m$  aparente de 69  $\mu\text{M}$  (Rajan P., *et al.*, 1999); en cultivos de células del epitelio pigmentario de bovino la  $K_m$  aparente reportada es de 125  $\mu\text{M}$  (Khatami M., 1988). Sin embargo, la  $K_m$  observada es acorde con los niveles de ácido ascórbico reportados en la retina de la rata y el cuyo (1.6 mM; Hosoya K. *et al.* 2004). Con el fin de mantener la vitamina C en su estado reducido y favorecer de esta manera su acumulación, se adicionó al medio de incubación DTT. Sin embargo, la

presencia de DTT disminuyó la acumulación de ácido ascórbico. Los estudios cinéticos muestran un cambio significativo en la  $V_{max}$  (tabla 1).

Estos resultados nos sugieren que la presencia de DTT provoca una modificación del transportador. En la secuencia de aminoácidos del SVCT, se encuentran 9 cisteínas en los dominios transmembranales, las cuales probablemente estén formando grupos S-S en la estructura terciaria del transportador, siendo estos últimos susceptibles a la reducción por la presencia de DTT (Daruwala R. *et al.*, 1999).

La acumulación de ácido ascórbico ocurre a través de un mecanismo dependiente de temperatura y energía. La presencia de antimicina A, inhibidor de la cadena respiratoria, y de ouabaina, inhibidor de la ATPasa  $Na^+/K^+$ , en el medio de incubación, disminuyen considerablemente la acumulación de ácido ascórbico. Estos resultados están de acuerdo con los reportados para el SVCT (Castro M. *et al.*, 2001).

Con el fin de conocer si en la retina los GLUT participan en la acumulación de ácido ascórbico se utilizó un compuesto que inhibe el transporte de glucosa, la citocalacina B. La acumulación de ácido ascórbico no se afectó por citocalacina B. Adicionalmente, la glucosa, aún a concentraciones elevadas (20 y 30 mM), no compitió por el transporte de ácido ascórbico. Estos resultados sugieren fuertemente que en la retina, los GLUT no participan significativamente en la acumulación de ácido ascórbico.

Los estudios con ratas diabéticas demostraron un incremento en la acumulación de ácido ascórbico en la retina de estas ratas, efecto que puede deberse a un incremento en el número de transportadores y/o a cambios en sus características cinéticas. Estos resultados pueden sugerir mecanismos de adaptación del tejido a un mayor requerimiento de agentes reductores, causado por el aumento de radicales libres producidos por la diabetes (Root-Bernstein *et al.*, 2002; Lindsay R. *et al.*, 1998). En este sentido es interesante que en

pacientes y animales experimentalmente diabéticos, el ácido ascórbico protege al cristalino del efecto causado por las especies reactivas de oxígeno (EOR) y que altas concentraciones de ácido ascórbico protegen de la formación de cataratas (Hegde K. & Varma S., 2004).

## VI. CONCLUSIÓN

- La retina acumula ácido ascórbico por un mecanismo específico y no a través de los transportadores de glucosa.
- El incremento en la acumulación de ácido ascórbico en la retina de ratas diabéticas sugiere un mecanismo de respuesta a los posibles daños causados por el estrés oxidativo que caracteriza a este padecimiento.

## VI. BIBLIOGRAFÍA

- 1) **Adler R., Faber D.** *The retina: a model for cell biology studies*. USA: Academic Press Inc., 1986.
- 2) **Agus D. B, Gambhir S. S., Pardridge W. M., Spielholz C., Baselga J., Vera J. C., Golde D. W.** "Vitamin C crosses the blood-brain barrier in the oxidized form through the glucose transporters." *J. Clin. Invest.* , 1997, 100pp. 2842-2848.
- 3) **Angelow S., Haselbach M., Galla H. J.** "Functional characterization of the active ascorbic acid transport into cerebrospinal fluid using primary cultured choroids plexus cells." *Brain. Res.*, 2003, 988 pp. 105-113.
- 4) **Berman E.** *Biochemistry of the eye*. New York: Plenum press, 1991. pp. 304-410.
- 5) **Brown G.** "Glucose transporters: Structure, function and consequences of deficiency." *J. Inherit. Metab. Dis.*, 2000, 23(23), pp. 237-246.
- 6) **Buettner G. & Jurkiewicz B.** "Chemistry and biochemistry of ascorbic acid," *Handbook of antioxidants*: Marcel Dekker, Inc., 1996, pp. 91-115.
- 7) **Buettner G., Jurkiewicz B.** "Ascorbate radical: A valuable marker of oxidative stress," *Analysis of Free Radicals in Biological Systems*. Germany: Birkhäuser Verlag, 1995, pp. 145-164.
- 8) **Campbell N., Reece J., Mitchell L.** *Biology*. Canada: Addison-Wesley, 1999.
- 9) **Castro M., Caprile T., Astuya A., Millán C., Runicke K., Vera J. C., Vásquez O., Aguayo L. G, Nualart F.** "High-affinity sodium-vitaminC co-transporters (SVCT) expression in embryonic mouse neurons." *J. Neurochem.* , 2001, 78 pp. 815-823.

- 10) **Daruwala R., Song J., Koh W. S., Rumsey S. C., Levine M.** "Cloning and functional characterization of the human sodium-dependent vitamin C transporters hSVCT1 and hSVCT2." *FEBS Lett.* , 1999, 460 pp. 480-484.
- 11) **Davson H.** *Physiology of the eye*. U.K.: Academic Press, 1980.
- 12) **Daw N.** *Visual development*. USA: Plenum Press, 1995.
- 13) **Evans B., Woodward J.** "Protein Injury: Prevention by Antioxidants," *Biomolecular Free Radical Toxicity: Causes and Prevention*. West Sussex, UK: John Wiley & Sons, LTD, 2000, pp. 73-100.
- 14) **Ganong W.** *Review of medical physiology*. USA: Appleton & Lange, 1995.
- 15) **Gayton A., Hall J.** *Textbook of Medical Physiology*. USA: Saunders Company, 1996.
- 16) **Halliwell B.** "Vitamin C: poison, prophylactic or panacea?" *Trends in Biochemical Sciences*, 1999, 24(7), pp. 255-259.
- 17) **Halliwell B.** "The antioxidant paradox." *The Lancet*, 2000, 355(1), pp. 1179-1180.
- 18) **Halliwell B.** "Vitamin C and genomic stability." *Mutation Research*, 2001, 475(475), pp. 29-35.
- 19) **Hedge K. R., Varma S. D.** "Protective effect of ascorbate against oxidative stress in the mouse lens." *Biochim. Biophys. Acta*, 2004, 1670pp. 12-18.
- 20) **Hediger M. A.** "New view at C." *Nature Med.* , 2002, 8 pp. 445-446.
- 21) **Hosoya K., Minamizono A., Katayama K, Terasaki T., Tomi M.** "Vitamin C transport in oxidized form cross the rat blood-retinal barrier." *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2004, 45 pp. 1232-1239.
- 22) **Joost H. & Thorens P.** "The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel member (Review)." *Molecular Membrane Biology*, 2001, (18), pp. 247-256.

- 23) **Kannan R., Stolz A., Ji Q., Prasad P. D., Ganapathy V.** "Vitamin C transport in human lens epithelial cells: evidence for the presence of SVCT2." *Exp. Eye Res.*, 2001, 73pp. 159-165.
- 24) **Khatami M.** "Na<sup>+</sup>-linked active transport of ascorbate into cultured bovine retinal pigment epithelial cells: heterologous inhibitions by glucose." *Membrane Biochemistry*, 1988, 7pp. 115-130.
- 25) **Korcok J., Dixon S. J., Lo T. C. Y., Wilson J. X.** "Differential effects of glucosa on dehydroascorbic acid transport and intracellular ascorbate accumulation in astrocytes and skeletal myocytes." *Brain Res.*, 2003, 993 pp. 201-207.
- 26) **Korock J., Yan R., Siushansian R., Dixon S. J., Wilson J.X.** "Sodium-ascorbate cotransport controls intracellular ascorbate concentration in primary astrocyte cultures expressing the SVCT2 transporter." *Brain Res.*, 2000, 881pp. 144-151.
- 27) **Kuffler S., Nicholls J., Martin A.** *From neuron to brain*. USA: Sinauer Associates Inc. Publishers, 1984. pp. 651.
- 28) **Li X., Huang J., May J. M.** "Ascorbic acid spares a-tocopherol and decreases lipid peroxidation in neuronal cells." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, 305 pp. 656-661.
- 29) **Liang W. J., Johnson D., Jarvis S. M.** "Vitamin C transport systems of mammalian cells." *Mol. Membr. Biol.*, 2001, 18 pp. 87-95.
- 30) **Lindsay R. M., Jamieson N. S. D., Walker S. A., McGuigan C. C., Smith W., Baird J. D.** "Tissue ascorbic acid and polyol pathway metabolism in experimental diabetes." *Diabetologia*, 1998, 41 pp. 516-523.
- 31) **Masland, R. H.** "The fundamental plan of the retina." *Nature Neurosci.* , 2001, 4 pp. 877-886.
- 32) **Mathews C.** *Neurobiology*. USA: Black well Science, 1998.

- 33) **Maulén N. P., Henríquez E. A., Kempe S., Cárcamo J. G., Schmid-Kotsas A., Bachem M., Grünert, A. Bustamante M. E., Nualart F., Vera J. C.** "Up-regulation and polarized expression of the sodium-ascorbic acid transporter SVCT1 in post-confluent differentiate CaCo-2 cells." *J. Biol. Chem.*, 2003, 278 pp. 9035-9041.
- 34) **Martin J.** *Neuroanatomy*. USA: Appleton & Lange, 1996.
- 35) **Nandi A., Mukhopandhyay C. K., Ghosh M. K., Cattopadhyay D. J., Chatterjee I. B.** "Evolutionary significance of vitamin C biosynthesis in terrestrial vertebrates." *Free Radical Biology & Medicine*, 1997, 22 pp. 1047-1054.
- 36) **Patel M., McIntosh L., Bliss T., Ho D., Saplosky R.** "Interactions among ascorbate and glucose transport in cultured hippocampal neurons and glia." *Brain Res.*, 2001, 916 pp. 127-135.
- 37) **Rajan D. P., Huang W., Dutta B., Devoe L. D., Leibach F. H., Ganapathy V., Prasad P. D.** "Human placental sodium-dependent vitamin C transporter (SVCT2): molecular cloning and transport function." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999, 262pp. 762-768.
- 38) **Randall D., Burggre W., French K.** *Eckert, Animal Physiology*. : W. H. Freeman ad company, 2002. pp. 259-271.
- 39) **Rice M. E.** "Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain." *Trends Neurosci.*, 2000, 23(5), pp. 209-216.
- 40) **Root-Bernstein R., Busik J. V., Henry D. N.** "Are diabetic neuropathy, retinopathy and nephropathy caused by hyperglycemic exclusion of dehydroascorbate uptake by glucose transporters?" *J. Theor. Biol.*, 2002, 216 pp. 345-359.

- 41) **Rumsey S. C., Kwon O., Xu G. W., Burant C. F., Simpson I., Levine M.** "Glucose transporter isoforms GLUT1 and GLUT3 transport dehydroascorbic acid." *J. Biol. Chem.*, 1997, 272 pp. 18982-18989.
- 42) **Rumsey S. C., Daruwala R., Al-Hasani H., Zarnowski M. J., Simpson I. A., Levine M.** "Dehydroascorbic acid transport by GLUT4 in *Xenopus* oocytes and isolated rat adipocytes." *J. Biol. Chem.*, 2000, 275pp. 28246-28253.
- 43) **Sotiriou S., Gispert S., Cheng J., Wang Y., Chen A., Hoogstraten-Miller S., Miller G. F., Miller G. F., Kwon O., Levine M., Guttentag S. H., Nussbaum R. L.** "Ascorbic-acid transporter Slc23a1 is essential for vitamin C transport into the brain and for perinatal survival." *Nature Medicine*, 2002, 8pp. 514-517.
- 44) **Sttar C., Taggart R.** *Biology*. USA: Brooks Cole, 2001.
- 45) **Tsukaguchi H., Tokui T., Mackenzie B., Berger U. V., Chen X. Z., Wang Y., Brubaker R. F., Hediger M. A.** "A family of mammalian Na<sup>+</sup>-dependent L-ascorbic acid transporters." *Nature*, 1999, 399pp. 70-75.
- 46) **Upston J. M., Karjalainen A., Bygrave F. L., Stocker R.** "Efflux of hepatic ascorbate: a potential contributor to the maintenance of plasma vitamin C." *J. Biochem.*, 1999, 342 pp. 49-56.
- 47) **Vannucci S. J., Clark R. R., Koehler-Stec E., Li K., Smith C. B., Davies P., Maher F., Simpson I. A.** "Glucose transporter expression in brain: relationship to cerebral glucose utilization." *Dev. Neurosci.*, 1998, 20 pp. 369-379.
- 48) **Wang H., Dutta B., Huang W., Devoe L. D., Leibach F. H., Ganapathy V., Prasad P. D.** "Human Na<sup>+</sup>-dependent vitamin C transporter 1 (hSVCT1): primary structure, functional characteristics and evidence for a non-functional splice variant." *Biochim. Biophys. A.*, 1999, 1461pp. 1-9.

- 49) **Wang Y., Mackenzie B., H. Tsukaguchi B., Weremowicz S., Morton C. C., Hediger M.** "Human vitamin C (L-ascorbic acid) transporter SVCT1." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000, 267 pp. 488-494.
- 50) **Welch R. W., Wang Y., Crossman Jr.,A., Park J. B., Kirk K. L., Levine M.** "Accumulation of vitamin C (ascorbate) and its oxidized metabolite Dehydroascorbic Acid occurs by separate mechanisms." *J. Biol. Chem.*, 1995, 270 pp. 12584-12592.
- 51) **Wilson J. X.** "The physiological role of dehydroascorbic acid." *FEBS Letters*, 2002, 527 pp. 5-9.
- 52) **Wiseman H., Ridgway T.** "Membrane lipid and lipoprotein injury: prevention by antioxidants," *Biomolecular Free Radical Toxicity: Causes and Prevention*. West Sussex, UK: John Wiley & Sons, LTD, 2000, pp. 3-46.
- 53) **Wood S. & Trayhurn P.** "Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins." *British Journal of Nutrition*, 2003, (89), pp. 3-9.
- [http://www.phys.ufl.edu/%...ayers\\_washu\\_icon.gif](http://www.phys.ufl.edu/%...ayers_washu_icon.gif)