

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE

Facultad de Ciencias
Escuela de Bioquímica

Localización del transportador de glucosa GLUT3 y el receptor del factor estimulador de colonias Granulocito-Macrófago GM-CSF en estructuras tipo caveolas

2. INTRODUCCION

Tesis de Grado presentada como parte de los requisitos para optar al Grado de Licenciado en Bioquímica y al Título profesional de Bioquímico.

Profesor Patrocinante: Sra. Ilona Irina Concha Grabinger - Instituto de Bioquímica - Facultad de Ciencias.

María Eliana Ocampo Bustos

Valdivia Chile 2004

Contenido

Profesor Co-Patrocinante .

Dedicatoria .

Agradecimientos .

LISTA DE ABREVIATURAS .

1. RESUMEN .

2. INTRODUCCION .

1

3. MATERIALES Y METODOS .

4. RESULTADOS . .

5. DISCUSION .

BIBLIOGRAFIA .

2. INTRODUCCION

Las citoquinas constituyen un grupo de moléculas señalizadoras intercelulares de bajo peso molecular, las cuales son liberadas por una gran variedad de tipos celulares controlando eventos importantes como son la supervivencia, crecimiento, diferenciación y función efectora de las células de diferentes tejidos. Estos factores incluyen familias de variadas proteínas reguladoras conocidas como factores de crecimiento, factores estimuladores de colonias, interleuquinas, linfoquinas, monoquinas e interferones (Nicola, 1997).

Entre los factores más estudiados se encuentra el factor estimulador de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF) conocido también como factor estimulador de colonia 2 (CSF-2), inductor macrófago granulocito-1GM (MGI-1GM), factor estimulador de colonia- α (CSF- α) y pluripoiétina α (Nicola, 1997).

El GM-CSF es una citoquina pleiotrópica que estimula la proliferación y diferenciación de las células progenitoras para dar origen a neutrófilos, eosinófilos macrófagos y células progenitoras megacariocíticas (Gasson, 1991). Entre otras acciones biológicas, estimula la función de células hematopoiéticas maduras, aumentando la diferenciación celular, prolongando la supervivencia de neutrófilos, eosinófilos y macrófagos, de esta manera aumenta su capacidad fagocítica, citotoxicidad y su habilidad para responder a estímulos secundarios (Nicola, 1997). En células no hematopoiéticas induce la migración y proliferación de células endoteliales humanas (Busolino *et al.*, 1989), además en líneas celulares tumorales, como sarcoma osteogénico, líneas celulares de carcinoma y adenocarcinoma, puede estimular la

proliferación celular. Muchos usos terapéuticos han sido propuestos para GM-CSF, entre ellos, en los pacientes que han sido transplantados de médula ósea y pacientes con cáncer y que están siendo tratados con quimioterapia y radioterapia (Gasson, 1991). En células mieloides, GM-CSF estimula el incremento en el transporte de glucosa y vitamina C, probablemente mediado por cambios en la actividad funcional de transportadores facilitativos de hexosas (GLUTs) que permiten el transporte celular de estos sustratos por estas células (Vera *et al.*, 1998).

Este factor es producido por una variedad de tipos celulares, tales como células β , macrófagos, células endoteliales, fibroblastos en respuesta a estímulos, pero principalmente por células T activadas en respuesta a otras citoquinas o estímulos inmunes e inflamatorios (Nicola, 1997). Por análisis de Northern blot se demostró la presencia del mRNA de GM-CSF y por análisis de Western blot e inmunohistoquímica, la presencia de la proteína de este factor en útero, ovario y placenta en murinos, como también en endometrio bovino (Brannstrom *et al.*, 1994; Crainie *et al.*, 1990; Imakawa *et al.*, 1993; Kanzaki *et al.*, 1991; Robertson and Seamark, 1990). En humanos, la placenta parece ser la principal fuente de GM-CSF (Nicola *et al.*, 1979). En nuestro laboratorio, fue demostrada la expresión de este factor en células de la línea germinal masculina tanto humana como bovina (Mansilla, 2002).

El GM-CSF es secretado como una glicoproteína monomérica con un rango aparente de masa molecular de 44 a 85 kDa, debido a las N y O-glicosilaciones, las que al parecer reducen la actividad biológica y la afinidad de unión al receptor (Cebon *et al.*, 1990). Este factor posee dos pares de α hélices antiparalelas y dos hebras β antiparalelas entre las hélices α , adoptando una conformación de ovillo, además contiene dos puentes disulfuros intramoleculares (Cis 54 – Cis 96 y Cis 88 – Cis 21 en humano; Cis 51 – Cis 93 y Cis 85 – Cis 118 en ratón) los que son altamente conservados y esenciales para un correcto plegamiento y actividad biológica (Nicola, 1997).

Los genes de GM-CSF han sido localizados en el brazo largo del cromosoma 5 (q21 - q32) en humano y en el cromosoma 11 de ratón, muy cercano a los genes de IL-3, IL-4, IL-5, M-CSF y c-mfs. El gen abarca alrededor de 2,5 kb y contiene 4 exones (Miyatake *et al.*, 1985).

GM-CSF media sus efectos vía interacción con receptores ubicados en la superficie celular los cuales son altamente específicos (Eder *et al.*, 1993; Hanazono *et al.*, 1993; Ihle, 1995; Isfort and Ihle, 1990; Kanakura *et al.*, 1990; Okuda *et al.*, 1992). El receptor de GM-CSF se expresa en células progenitoras hematopoiéticas, monocitos, neutrófilos, eosinófilos, fagocitos mononucleares y macrófagos (Cannistra *et al.*, 1990; Gasson, *et al.*, 1986; Gasson, 1991; Park *et al.*, 1986), además en algunas células no hematopoiéticas incluidos trofoblastos de placenta, células endoteliales, oligodendrocitos, en el sistema nervioso central (Baldwin *et al.*, 1993; Brosnan *et al.*, 1993; Bussolino *et al.*, 1989; Gearing *et al.*, 1989) y en algunas neoplasias y líneas celulares tumorales (Baldwin *et al.*, 1989; Baldwin *et al.*, 1991; Metcalf *et al.*, 1990; Rivas *et al.*, 1998). En nuestro laboratorio fue demostrada la expresión de receptores de GM-CSF en células germinales masculinas (Noli, 1999). Además, estudios posteriores de Western blot e inmunocitoquímica demostraron la presencia y funcionalidad del receptor de GM-CSF en la línea germinal masculina y en espermatozoides de eyaculados humanos y bovinos (Zambrano *et al.*,

2001). Asimismo, utilizando ensayos funcionales, los autores demostraron que al incubar los espermatozoides con el factor, se produce aumento del transporte de glucosa y vitamina C. En estas células, el transporte de estos sustratos está mediado por los transportadores facilitativos de hexosas (GLUTs) (Angulo *et al.*, 1998).

El receptor de GM-CSF (**Figura 1**) es una glicoproteína compuesta por dos subunidades α y β (Hayashida *et al.*, 1990; Kitamura *et al.*, 1991). La subunidad α del receptor humano es producida como un precursor de 400 aá con una secuencia líder de 22 aá. Esta cadena α tiene un segmento de transmembrana de 26 aá, un dominio extracelular de 298 aá y un corto dominio citoplasmático de 54 aá. El peso molecular predecible según la secuencia de la proteína es de 44 kDa, pero en geles SDS-PAGE se observa un peso molecular de 75-85 kDa, debido a las N-glicosilaciones en 11 sitios descritos. Los 200 aá proximales por el lado extracelular a la región transmembrana, forman un dominio que presumiblemente une GM-CSF, el cual es homólogo en varios receptores de citoquinas. Este dominio consiste en varios elementos de secuencia cortos conservados, incluidos 4 residuos de cisteínas conservadas y elementos Trp-Ser-X-Trp-Ser (Gearing *et al.*, 1989; Kitamura *et al.*, 1991; Nicola, 1997).

En humanos se han descritos 3 transcritos alternativos del gen de la subunidad α del receptor, y han sido clonadas: subunidad α_1 , con 378 aá que corresponde a la antes mencionada; subunidad α_2 , que difiere de la anterior en que de los 54 aá del dominio citoplasmático, 25 son reemplazados por 35 aá ricos en serina y prolina; y la subunidad α soluble.

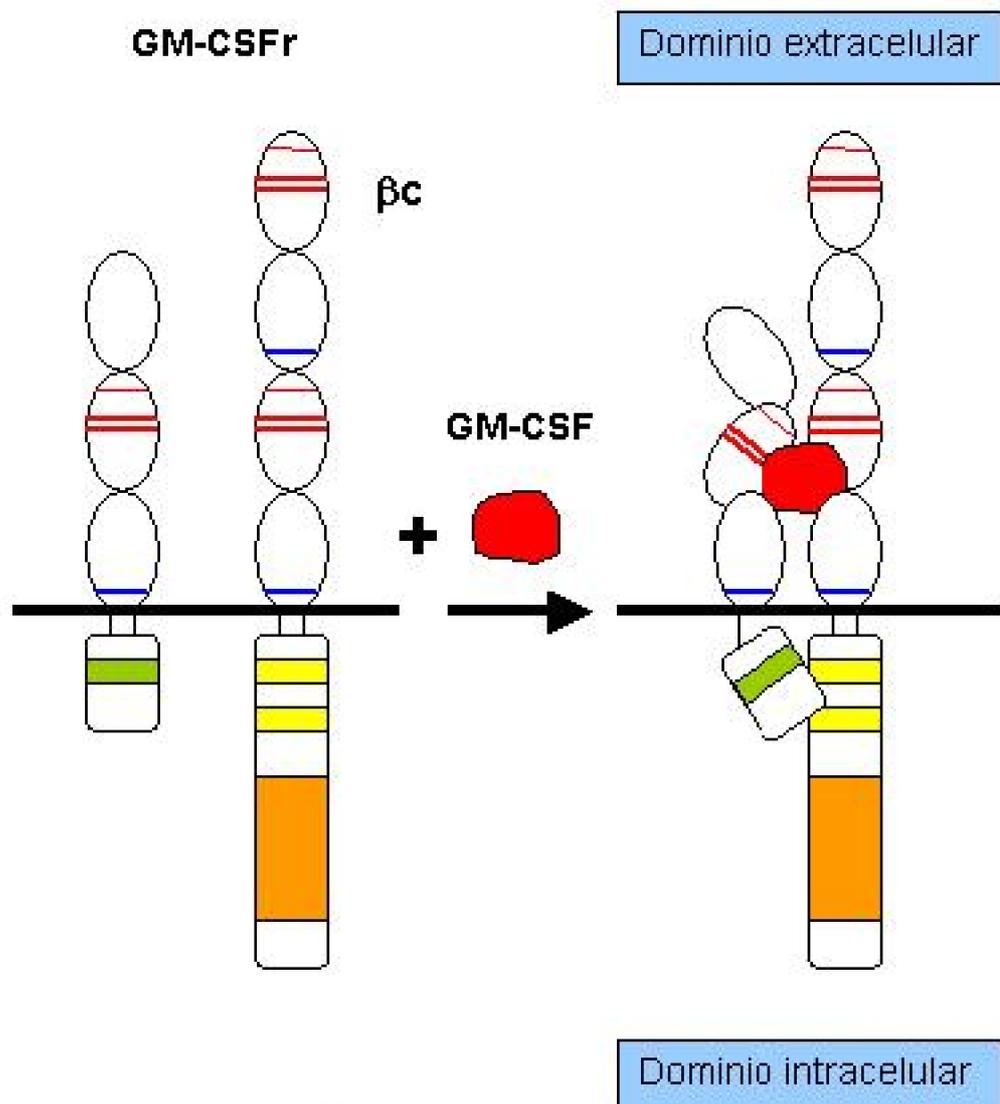


FIGURA 1. Esquema del receptor para GM-CSF. Se esquematizan las subunidades α y β del receptor del factor estimulador de colonias granulocito y macrófago (GM-CSF) unido al factor.

La subunidad β del receptor es un polipéptido de 897 aá que contiene un dominio duplicado en el segmento extracelular, motivo común de la familia de receptores de citoquinas (Hayashida *et al.*, 1990), posee una secuencia líder de 16 aá, una única región transmembrana de 27 aá y una cola citoplasmática de 350 aá. El peso molecular predecible de la proteína es de 110 kDa y en geles SDS-PAGE su peso molecular es de 120 kDa, sugiriendo que sólo posee glicosilaciones superficiales (Kitamura *et al.*, 1991).

El GM-CSF se une a la subunidad α específica aislada, con baja afinidad (Kd: 1-7 nmoles/L). La subunidad β , que es fosforilable, es incapaz de unir el factor por sí sola, sin embargo, lo hace en complejo con la subunidad α y forma un receptor de alta afinidad (Kd: 20-250 pmoles/L). La subunidad α es específica para el receptor de GM-CSF, sin embargo la subunidad β es compartida tanto por este receptor como por el receptor de IL-3 e IL-5 (Nicola and Metcalf, 1991), también denominada subunidad β común (β c). Por

otro lado el dominio C-terminal de la subunidad β del receptor (residuos 626 – 763) es responsable de la fosforilación en tirosina y la activación de las vías de señalización (Nicola, 1997).

Aunque el receptor de GM-CSF no posee un dominio de actividad tirosina quinasa, el proceso de señalización iniciado por la unión del ligando al receptor induce la activación de tirosinas quinasas intracelulares (Kishimoto *et al.*, 1994), gatillando un número de respuestas celulares (Eder *et al.*, 1993; Hanazono *et al.*, 1993; Ihle, 1995; Kanakura *et al.*, 1990; Okuda *et al.*, 1992;). Entre las vías de transducción de señales, se encuentran: la vía JAK/STAT, la vía ras/MAP quinasa y la vía de PI3-quinasa, las que no son mutuamente excluyentes, pudiendo sobrelaparse. En todas las funciones, la señalización a través del receptor de GM-CSF puede ocurrir con la participación de ambas subunidades α y β (Eder *et al.*, 1993; Hayashida *et al.*, 1990; Lopez *et al.*, 1992; Sakamaki *et al.*, 1992) y también por la subunidad α aislada (Ding *et al.*, 1994; Spielholz *et al.*, 1995).

Algunos autores determinaron el aumento de incorporación de glucosa en macrófagos producido por factores de crecimiento hematopoiéticos, entre ellos, GM-CSF, demostrándose que el aumento de la captación de glucosa se debe a un efecto sobre los transportadores facilitativos de hexosas (GLUTs) (Hamilton *et al.*, 1988). Se ha descrito que la señalización para el aumento de transporte de glucosa, ocurre por un mecanismo independiente de la fosforilación de proteínas, y sólo a través de la subunidad α del receptor (Ding *et al.*, 1994; Spielholz *et al.*, 1995).

Existen dos sistemas de transporte de glucosa en mamíferos, los transportadores facilitativos de hexosas (GLUTs) y el cotransportador de sodio y glucosa. Los transportadores facilitativos de hexosas (GLUTs), permiten la difusión facilitada de hexosas en forma estereoespecífica y saturable a través de la membrana celular a favor de un gradiente de concentración, en un proceso que aparentemente no requiere energía del consumo de ATP y que además es independiente de la presencia de sodio. Este fenómeno se conoce como difusión facilitada o transporte facilitado (Bell *et al.*, 1991; Bell *et al.*, 1993; Carruthers, 1990; Devastar and Mueckler, 1992; Gould and Bell, 1990; Mueckler, 1990, 1994; Simpson and Cushman, 1986; Thorens, 1993). Estas proteínas poseen una actividad transportadora multifuncional, mediando la incorporación de glucosa, fructosa, vitamina C y otros compuestos (Angulo *et al.*, 1998; Concha *et al.*, 1997; Ding *et al.*, 1994; Vera., 1993).

Durante los últimos años nuevos genes que codifican transportadores facilitativos de hexosas han sido identificados y caracterizados (Joost and Thorens, 2001; Medina and Owen, 2002), hasta hoy un total de catorce isoformas han sido designadas basándose en el orden en que fueron aisladas. Estas comparten una estructura similar, una cadena polipeptídica que atraviesa 12 veces la membrana celular y que consta de 6 segmentos transmembrana ubicados en la mitad amino terminal de la proteína, seguido de un largo segmento intracitoplasmático que correspondería a la porción central de la cadena polipeptídica, y luego otros 6 segmentos de transmembrana localizados en la mitad carboxilo terminal de la proteína. Los segmentos amino y carboxilo terminales están localizados intracelularmente (Medina and Owen, 2002; Mueckler *et al.*, 1985).

Sobre la base de características similares, la familia de transportadores de hexosas (GLUTs), han sido divididos en tres subfamilias, la clase I que agrupa a los transportadores de glucosa GLUT1, GLUT2, GLUT3 y GLUT 4, con una expresión tejido específica; clase II, agrupa a los transportadores de fructosa, entre ellos se encuentran GLUT5, GLUT7, GLUT9 y GLUT11; y la clase III que agrupa a los transportadores GLUT 6, GLUT8, GLUT10, GLUT12 y el transportador de myo inositol HMIT1 (Joost and Thorens, 2001). Pudiendo expresarse simultáneamente más de una isoforma en células y tejidos. Además cada proteína presenta diversas propiedades cinéticas y regulatorias que reflejan la función que estas cumplen.

La función fisiológica de los transportadores facilitativos de hexosas (GLUTs) depende de su cinética y especificidad de sustrato. Para analizar las propiedades cinéticas de estas isoformas se han realizado varios estudios, en los cuales no se ha utilizado glucosa, ya que este sustrato puede ser metabolizado rápidamente y su transporte no poseería una velocidad límite. Por esta razón se han utilizado una serie de análogos de glucosa, los más utilizados son 2-desoxi-D-glucosa (desoxiglucosa) y 3-o-metil-D-glucosa (metilglucosa). La ventaja de usar metilglucosa es que esta molécula no es metabolizada intracelularmente, por lo que puede ser utilizada para estudiar exclusivamente la cinética de transporte (Carruthers, 1990; Simpson and Cushman, 1986). Por otro lado aunque en la mayoría de las células estudiadas, desoxiglucosa es fosforilada intracelularmente luego de ser transportada, este análogo es altamente específico para el transportador facilitativo y no es transportado por el cotransportador de sodio y glucosa, por lo que es un excelente sustrato para determinar la presencia de transportadores facilitativos de glucosa en diferentes células (Carruthers, 1990; Simpson and Cushman, 1986).

Como se observa en la **Tabla 1**, GLUT3 parece ser una proteína involucrada en el transporte constitutivo de glucosa, propiedad que comparte con GLUT1. Se expresa abundantemente en tejido nervioso en ratón, asimismo en varios tipos celulares en humanos, como placenta, hígado, riñón, corazón y tejido muscular adulto, sin embargo su máxima expresión es en cerebro, principalmente en neuronas (Nagamatsu *et al.*, 1993; Haber *et al.*, 1993). La observación que el mRNA para GLUT3 se expresa abundantemente en el tejido muscular fetal, pero disminuye a niveles muy bajos en tejido muscular adulto, sugiere un papel importante de este transportador durante el desarrollo fetal del tejido muscular (Mueckler, 1994). También se encuentra preferencialmente en células germinales masculinas (Angulo *et al.*, 1998).

TABLA 1. Transportadores facilitativos de hexosas humanos.

Isoformas	Ubicación tisular	Km (mM)	Azúcar
GLUT1	Universal, eritrocitos, tejido fetal, placenta, cerebro	5-10	Glucosa
GLUT2	Hígado, células β , riñón e intestino	11-16 / 67	Glucosa/fructosa
GLUT3	Cerebro, placenta y riñón	1-2	Glucosa
GLUT4	Músculo esquelético, corazón y adipocitos	5	Glucosa
GLUT5	Intestino delgado, espermatozoides	ND / 6 -10	Glucosa/fructosa
GLUT6	Leucocitos, bazo y cerebro	ND	Glucosa
GLUT7	Desconocido	ND	Fructosa
GLUT8	Testículo, blastocitos, cerebro, músculo, adipocitos	ND	Glucosa
GLUT9	Hígado y riñón	ND	Fructosa
GLUT10	Hígado y páncreas	ND	*
GLUT11	Corazón, músculo esquelético	ND	Glucosa/fructosa
GLUT12	Próstata y corazón	ND	*
HMIT1	Cerebro	ND	Protón/myoinositol
GLUT13	?	ND	*

Los valores de Km para GLUT1 a GLUT5 fueron obtenidos de ensayos realizados en ovocitos de *Xenopus laevis* expresando cada uno de los transportadores de hexosas, para los demás transportadores no han sido determinados los valores (Birbaum *et al.*, 1986; Burant *et al.*, 1992; Gould *et al.*, 1991; Gould and Holman, 1993; Joost and Thorens, 2001; Kayano *et al.*, 1988, 1990; Mueckler *et al.*, 1985; Thorens, 1993) ND: no determinado, *: afinidad por sustrato desconocido.

Muchos tipos de tejidos pueden utilizar una variedad de sustratos tales como glucosa, lactato y ácidos grasos como fuentes de energía. Por el contrario, en el sistema nervioso central, glucosa es el único origen para la producción de ATP. La glucosa llega a las neuronas en el cerebro atravesando el endotelio de la barrera hematoencefálica dentro del espacio intersticial, de esta forma la glucosa puede ser transportada a través de la membrana plasmática neuronal gracias a los transportadores GLUT1 y GLUT3. Sin embargo, la característica más distintiva de GLUT3 es su baja Km para glucosa (Gould *et al.*, 1991), siendo un transportador de alta afinidad, lo que puede asociarse a una adaptación ante la baja concentración de glucosa en el cerebro, comparado con el plasma.

Estudios del aumento en la incorporación de glucosa producido por GM-CSF, en donde la señalización ocurre por un mecanismo independiente de la fosforilación de proteínas y sólo a través de la subunidad α del receptor (Ding *et al.*, 1994; Hamilton *et al.*, 1998; Spielholz *et al.*, 1995), nos indican que debe existir una especie de interacción entre el receptor unido a su ligando y el transportador de hexosas, para poder obtener una respuesta inmediata, a través de la subunidad α del receptor, sin que se desencadene una vía de transducción de señales. Esta interacción entre el receptor y el

transportador podría ocurrir en estructuras especializadas de la membrana, denominadas caveolas, las que pertenecen a los denominados dominios de membrana resistentes a detergente (DMRDs).

Los dominios de membrana resistentes a detergente (DMRDs), también llamados balsas lipídicas (**Figura 2**), poseen una composición especial diferente al resto de la membrana plasmática, presentan un diámetro de 50 a 350 nm, dependiendo del tipo celular y el método de análisis (Abrami, 2001). Se encuentran altamente enriquecidos con glicoesfingolípidos, esfingomiélin y colesterol, además se han descrito proteínas específicas y moléculas de señalización asociados a estos dominios de membrana (Kurzchalia and Parton, 1999; Zajchowski and Robbins, 2002). Entre las proteínas más conocidas se encuentran las modificadas por lípidos, entre ellas, las proteínas unidas a glicosil fosfatidil inositol (GPI), quinasas de la familia src y las subunidades α de la proteína G (Langlet *et al.*, 2000). Además, han sido encontradas recientemente una familia de proteínas integrales de membrana llamadas flotilinas, de las cuales existen dos tipos, flotilina-1 y flotilina-2. Estas proteínas poseen expresión tejida específica, pudiendo formar complejos hetero-oligoméricos estables con caveolina cuando se expresan en algún tipo celular, sin embargo su función es desconocida (Salzer and Prohaska, 2001; Schlegel *et al.*, 1998; Zajchowski and Robbins, 2002). Asimismo, stomatina es la proteína principal presente en los dominios de membrana resistentes de eritrocitos y células epiteliales, cuya expresión ha sido demostrada en plaquetas (Mairhofer *et al.*, 2002).

Estos dominios de membrana ricos en lípidos y proteínas, poseen un gran número de moléculas de señalización, pudiendo agruparse y así formar plataformas, ya que flotan libremente a través de la bicapa lipídica de las membranas celulares (Simons and Ikonen, 1997). De esta forma participan en importantes procesos celulares tales como señalización celular, tráfico de proteínas, transporte de colesterol, homeostasis del calcio e internalización de toxinas, bacterias y virus.

La resistencia de estos microdominios a detergentes es debida a una gran cantidad de lípidos y glicolípidos saturados que interactúan con colesterol, de ahí que se les ha llamado insolubles o resistentes a detergentes (Brown, 1998). Gracias a esta composición lipídica es posible su aislamiento, en presencia de detergentes no iónicos (Schuck *et al.*, 2003).

Un tipo especializado de dominios de membrana resistentes a detergente son las caveolas (**Figura 2**), y corresponden a pequeñas invaginaciones vesiculares de la membrana plasmática de 50 a 90 nm de diámetro que asumen diferentes estados de invaginación, (incluyendo plano, vesicular y tubular), presentándose solas o en grupos (Anderson, 1998; Severs, 1988). Se ha demostrado su presencia en una gran variedad de células de mamíferos, entre ellas, células endoteliales, músculo cardiaco, liso y estriado, adipocitos, fibroblastos y neumocitos tipo I, entre otras (Schlegel *et al.*, 1998), sin embargo no se han descrito caveolas en neuronas.

Además de poseer proteínas integrales de membrana y proteínas de señalización, las caveolas también están enriquecidas con lípidos. Principalmente poseen un centro lipídico formado por glicoesfingolípidos, esfingomiélin y colesterol (Anderson, 1998; Okamoto *et al.*, 1998). La gran cantidad y variedad de lípidos concentrados en estos dominios juegan un rol importante en atraer proteínas de membrana modificadas por

lípidos a caveolas, entre ellas están las modificadas por glicofosfatidilinositol (GPI) y por ácidos grasos (Anderson, 1998; Mayor and Maxfield, 1995). Además, la composición lipídica característica de las caveolas es importante para su aislamiento, ya que le confiere resistencia o insolubilidad a detergentes no iónicos a 4°C, tal como Tritón X-100. (Sargiacomo *et al.*, 1993). Otros detergentes no iónicos menos utilizados son Tritón X-114, CHAPS, Brij 58, Brij 96, Brij 98 y Lubrol WX (Ikonen, 2001; Schuck *et al.*, 2003). Existen además otros métodos de purificación de caveolas menos utilizados, entre ellos están sílica cationizada, sonicación e inmunoadsorción (Anderson, 1998), por lo tanto, para demostrar la existencia de caveolas se debe determinar la presencia de la proteína específica y marcadora de estos dominios.

Una de las principales proteínas integrales de membrana en caveolas es caveolina. Esta proteína, con un peso molecular de 20 a 25 kDa se encuentra anclada a la membrana plasmática por glicofosfatidilinositol (Glennay and Soopet, 1992; Kurzchalia *et al.*, 1992). Se han descrito tres genes que codifican para caveolina (cav-1, 2 y 3), sin embargo el gen que codifica para caveolina-1 transcribe un mRNA, y este traduce dos isoformas, caveolina-1 α de 178 aminoácidos y caveolina-1 β de 147 aminoácidos. Estas dos isoformas de caveolina-1 difieren en aproximadamente 3 kDa, ya que en caveolina-1 β metionina 32 actúa como un sitio de iniciación de traducción interno (Scherer *et al.*, 1996). Caveolina-1 y caveolina-2 (149 aminoácidos) poseen una distribución similar en tejidos, coexpresadas principalmente en células endoteliales, adipocitos y neumocitos tipo I, mientras que la expresión de caveolina-3 (151 aminoácidos) es específica del tejido muscular cardíaco y esquelético, involucrada en ciertos tipos de distrofia muscular (Galbiati *et al.*, 2001; Okamoto *et al.*, 1998; Tang *et al.*, 1996). Caveolina-1 se presenta en la membrana plasmática con un dominio N-terminal citoplasmático de 101 aminoácidos, un dominio de transmembrana hidrofóbico de 33 aminoácidos y un dominio C-terminal citoplasmático de 44 aminoácidos (Schlegel *et al.*, 1998). El dominio C-terminal de caveolina-1 β y caveolina-3 contiene tres residuos de cisteína en las posiciones 134, 144 y 157, que en caveolina-1 β experimentan acilación (Dietzen *et al.*, 1995). Además sólo caveolina-1 β es fosforilada en residuos de serina *in vivo* (Scherer *et al.*, 1996).

Caveolina-1 sufre dos estados de oligomerización. Primero, en el retículo endoplásmico los monómeros de caveolina-1 son ensamblados formando discretos homo-oligómeros de 14 a 16 moléculas de caveolinas individuales. Luego, estos homo-oligómeros individuales de 4 a 6 nm de diámetro pueden interactuar formando un grupo de partículas de 20 a 25 nm de diámetro. La homo-oligomerización es mediada por residuos 61 al 101 de la región proximal a la membrana del dominio N-terminal (Schlegel *et al.*, 1998).

Caveolina-1 interactúa con glicoesfingolípidos y colesterol, ya que se requiere un alto contenido de colesterol para formar parte del modelo lipídico de la membrana caveolar, estimando una molécula de colesterol por molécula de caveolina (Okamoto *et al.*, 1998; Schlegel *et al.*, 1998). Estos antecedentes nos sugiere que caveolina es una proteína que organiza y estabiliza el colesterol, permitiendo la formación de caveolas, y que colesterol es importante para su estructura y función (Liu *et al.*, 2002). La expresión de caveolina-1 en las células se relaciona con la aparición de invaginaciones del tipo caveolas (Smart *et*

al., 1996), de esta manera para la formación de la membrana caveolar, caveolina-1 representa una importante proteína estructural y además como proteína marcadora de caveolas (Rothberg, 1992).

Ha sido demostrada la importancia de colesterol en la membrana caveolar utilizando drogas y toxinas capaces de disminuir su contenido en las células. Entre las drogas más utilizadas se encuentran nistatina y filipina, las cuales unen colesterol, y agentes como metil β ciclodextrina que eliminan el colesterol de la célula. Las ciclodextrinas son oligómeros cíclicos de glucosa que tienen la capacidad de secuestrar lípidos en su centro hidrofóbico, permeabilizando la membrana celular (Gustavsson *et al.*, 1999; Ikonen, 2001; Neufeld *et al.*, 1996; Rothberg, 1992; Schnitzer *et al.*, 1994). El colesterol es muy importante para la mantención de la estructura y de la función de la membrana caveolar. Existen antecedentes de que la unión de proteínas ancladas a la membrana plasmática por glicofosfatidilinositol es dependiente del colesterol, (Rothberg, 1990a; Rothberg, 1990b; Smart, 1996) y, que al eliminar el colesterol, las caveolas pierden su morfología característica.

La función de las caveolas se ha relacionado con diferentes áreas de la fisiología celular, como son procesos de transporte mediado por receptor incluyendo endocitosis (Gilbert *et al.*, 1999; Graf *et al.*, 1999), trancitosis no dependiente de clatrina (Milici *et al.*, 1987; Montesano *et al.*, 1982) y potocitosis (Anderson 1993), tráfico de colesterol (Fielding and Fielding, 1995; Smart *et al.*, 1994; Smart *et al.*, 1996; Uittenbogaard *et al.*, 1998), regulación del ingreso de calcio a las células (Fujimoto, 1993), transducción de señales (Okamoto *et al.* 1998; Smart *et al.*, 1999) y tumorogénesis. Además, recientes estudios han permitido relacionar diversas enfermedades humanas como cáncer, enfermedades cardiovasculares, distrofia muscular, enfermedad de Alzheimer y encefalopatía esponjiforme transmisible, entre otras, con caveolas (Anderson, 1998; Schlegel *et al.*, 1998).

Las caveolas se encuentran enriquecidas con múltiples moléculas implicadas en señalización celular, entre ellas óxido nítrico sintetasa, quinasas de la familia Src, receptor del factor de crecimiento epidermal, receptor del factor de crecimiento, derivado de plaquetas, receptor de insulina, entre otros (Li *et al.*, 1996).

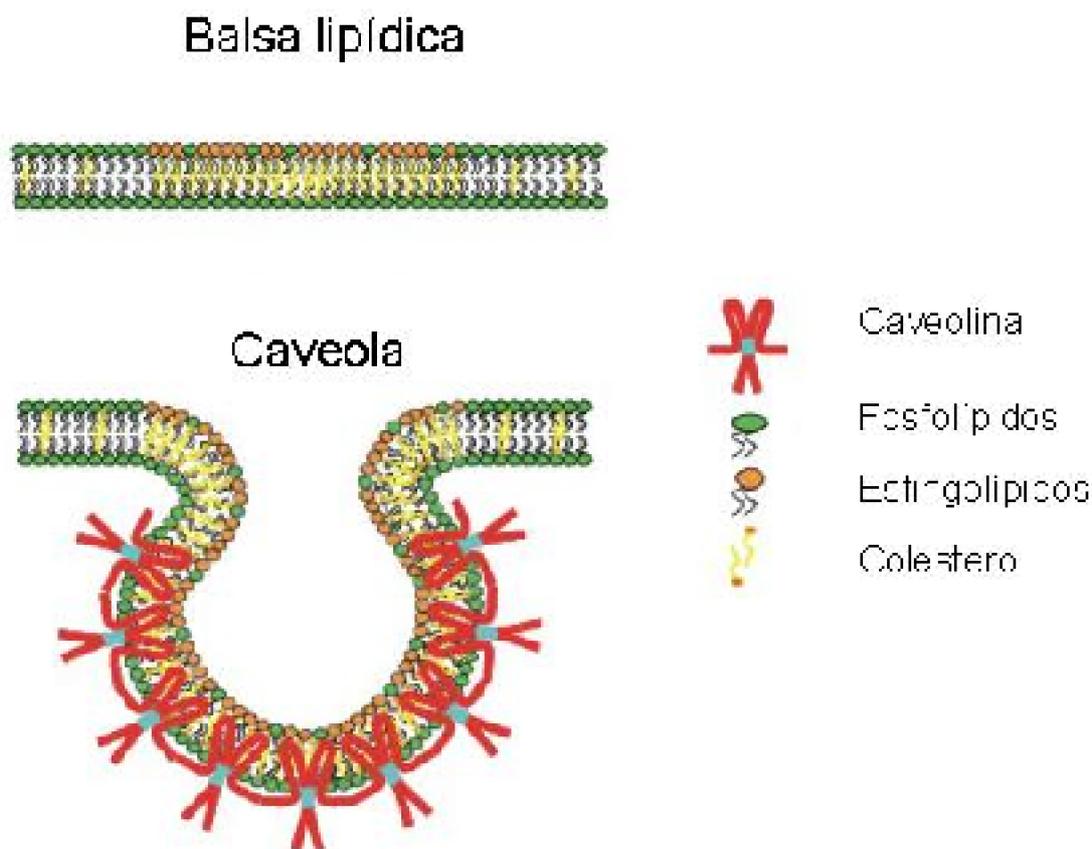


FIGURA 2. Diagrama que indica la composición bioquímica de balsas lipídicas y caveolas.

Un ejemplo de respuesta celular, facilitada por la localización preferencial en caveolas, es el caso de la modulación de receptores del factor de crecimiento epidermal (EGFr) por el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Los receptores para el factor de crecimiento epidermal (EGFr) y para el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFr), se encuentran en caveolas, lo que facilita su interacción al encontrarse en el mismo espacio. Al unirse PDGF a sus receptores localizados en caveolas, se produce una disminución en la población de receptores EGF, en la misma fracción de membrana, para ser fosforilados en tirosina (Liu and Anderson, 1999). Otro ejemplo ocurre en adipocitos, en donde el receptor de insulina unido a su ligando y el transportador facilitativo de hexosas GLUT4, se localizan en caveolas (Goldberg *et al.*, 1997). En respuesta a la estimulación con insulina, caveolina-1 se asocia rápidamente con una fosfoproteína desconocida de aproximadamente 30 kDa y un "pool" intracelular de caveolina-1 es translocado a la membrana plasmática (Corley-Mastick *et al.*, 1995; Scherer *et al.*, 1994). De esta manera caveolas podrían jugar un rol importante en el transporte vesicular de GLUT4 hacia o desde la membrana plasmática (Scherer *et al.*, 1994).

Si se considera la presencia de GM-CSF en el tracto femenino (Brannstrom *et al.*, 1994; Crainie *et al.*, 1990; Imakawa *et al.*, 1993; Kanzaki *et al.*, 1991; Robertson and Seamark, 1990), y que el espermatozoide expresa el receptor GM-CSF (Mansilla, 2002), se podría sugerir que el espermatozoide tiene la necesidad de aumentar la captación de

nutrientes que le proporcionan energía durante su trayecto hacia el óvulo. Este receptor, al unírsele su factor, es capaz de aumentar la incorporación de glucosa, gracias a la existencia de una interacción proteína-proteína, provocada por la unión de GM-CSF a su receptor. Por lo tanto se plantea una nueva interrogante, si en las células germinales, es decir, espermatoцитos y espermátidas, y en neuronas, existe una interacción proteína-proteína entre los transportadores de hexosas y el receptor de GM-CSF unido a su ligando, en estructuras del tipo caveolas.

De acuerdo a los antecedentes recopilados, la hipótesis de esta tesis es: **El transportador de glucosa GLUT3 y el receptor del factor estimulador de colonias granulocito-macrófago GM-CSF, se encuentran presentes en caveolas, tanto en células germinales masculinas como en una línea celular neuronal.**

Por lo tanto los objetivos específicos de la presente tesis son:

1.- Detectar la presencia de caveolas en células germinales de testículo de rata y en neuroblastoma N2a de cerebro de ratón.

2.- Determinar si en estos dominios de membrana se encuentran presentes GLUT3 y GM-CSFr.

3.- Analizar parámetros cinéticos del transporte de glucosa (2-desoxiglucosa) en espermátidas, a diferentes concentraciones de GM-CSF, en presencia y ausencia de metil β ciclodextrina.