

Universidad Cardenal Herrera-CEU

Departamento de Fisiología, Farmacología y Toxicología.



Estudio de la expresión y regulación del transportador de glucosa GLUT8 en tejido intestinal

TESIS DOCTORAL

Presentada por: Amparo Romero Picó

Dirigida por: José Emilio Mesonero Gutiérrez

José Terrado Vicente

VALENCIA

2004

JOSÉ EMILIO MESONERO GUTIÉRREZ profesor ayudante del Departamento de Farmacología y Fisiología de la Universidad de Zaragoza, y **JOSÉ TERRADO VICENTE** profesor titular del Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Universidad Cardenal Herrera-CEU

INFORMAN

Que la Tesis Doctoral titulada “**Estudio de la expresión y regulación del transportador de glucosa GLUT8 en tejido intestinal**”, de la que es autora **D^a Amparo Romero Picó**, licenciada en Biología, ha sido realizada bajo nuestra dirección, y reúne las condiciones científicas y formales necesarias para ser presentada ante el Tribunal correspondiente, a fin de obtener el Grado de Doctor.

Y para que conste, firmamos el presente en Moncada (Valencia), a 1 de septiembre de 2004.

Fdo: José Emilio Mesonero Gutiérrez

Fdo: José Terrado Vicente

A mi hermana Mónica

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a José Emilio Mesonero y a José Terrado, mis directores, el haberme introducido en el mundo de la investigación, pero, sobretodo, su atención y confianza todos estos años. A Alicia López por estar también implicada en este proyecto y recibir su apoyo en los momentos que más los he necesitado.

A José Penadés y a Nacho por responder a mis preguntas y estar siempre dispuestos a compartir sus conocimientos.

A Laura, a mi compañera “de fatigas” Olga, y también a todos los que forman parte del laboratorio de fisiología por hacer más amenas tantas horas en el laboratorio. Muchas gracias a Elisa, M^a Pilar, Carles, Mila, Enric, Geles, Elisa 2, Carmen, Carlos, Jorge, Pablo, Dani, y demás becarios del pasillo de investigación, por esos momentos tan divertidos vividos dentro y fuera del laboratorio. A Miquel por su apoyo informático. A todos vosotros, muchas GRACIAS, porque haberos conocido ha sido la mayor recompensa de esta experiencia.

A Magdalena y Kike por vuestra amistad, y el apoyo que siempre me habéis mostrado. A Marta Ojeda y a tantos amigos que a pesar de la distancia, habéis estado ahí, animándome para conseguir mis “proyectos”.

A Edith Brot-Laroche por la confianza que depositó en mí cuando estuve en su laboratorio, y a todas aquellas personas que hicieron de mi estancia en Paris una gran experiencia.

Con mucho cariño, a mis padres José y Amparo porque siempre han estado a mi lado. A mi hermana Mónica y a Sergio por la fuerza que siempre me han transmitido y por aconsejarme en las decisiones más importantes. También a mi extensa familia que siempre se ha interesado por lo que estaba haciendo.

Quiero agradecer a la Universidad Cardenal Herrera-CEU y a su Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud la posibilidad de haber podido realizar este trabajo de investigación en sus instalaciones, y en particular a los departamentos de Fisiología, Farmacología y Toxicología; Bioquímica; y a la Unidad de Histología y Anatomía Patológica. También quiero agradecer a la Universidad Cardenal Herrera-CEU y a la Fundación San Pablo-CEU, por los proyectos de investigación PRUCH 02/18 y 03/20; y por la beca de formación de personal docente e investigador que me ha permitido trabajar en lo que me gusta.

Y también deseo agradecer la financiación de los proyectos de la Generalitat Valenciana (AE01-107), y del Ministerio de Ciencia y Tecnología (BFI2002-03590) que han hecho posible la realización de esta tesis.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. TRANSPORTE DE AZÚCARES A TRAVÉS DE LA MEMBRANA CELULAR	2
1.1. Transportadores SGLT	2
1.2. Transportadores de la familia GLUT	5
2. MORFOLOGÍA DEL TRACTO DIGESTIVO	14
2.1. La mucosa intestinal	14
2.2. Intestino delgado	18
2.3. Intestino grueso	19
3. FISIOLÓGÍA DE LA ABSORCIÓN INTESTINAL DE AZÚCARES	20
3.1. Mecanismos de la absorción de azúcares	20
4. ALTERACIONES EN EL PROCESO DE ABSORCIÓN INTESTINAL DE AZÚCARES	23
4.1. Deficiencias congénitas de los transportadores de azúcares implicados en los procesos de absorción intestinal	23
4.1.1. Deficiencias congénitas en SGLT1	23
4.1.2. Deficiencias congénitas en GLUT2 y GLUT5	24
4.2. Alteraciones debidas al ayuno y a la malnutrición	25
4.2.1. Efectos del ayuno y la malnutrición en la mucosa intestinal	25
4.2.2. Efectos en el ayuno y la malnutrición en el transporte intestinal de azúcares	26
4.3. Alteraciones en la absorción intestinal de azúcares en estados de diabetes	27
5. ANTECEDENTES DEL TRANSPORTADOR DE GLUCOSA GLUT8	30
5.1. Estructura y morfología de GLUT8	30
5.2. Expresión de GLUT8 en los diferentes tejidos	32
5.3. Localización celular de GLUT8	32
5.4. Función de GLUT8	33
II. OBJETIVOS	35
III. MATERIAL Y METODOS	36
1. MODELOS EXPERIMENTALES	36
1.1. Animales	36
1.1.1. Estudio de la expresión de GLUT8 en intestino	36
1.1.2. Estudio de la regulación de GLUT8 bajo diferentes condiciones fisiopatológicas	37
1.2. Cultivos celulares	38
1.2.1. Cultivo de células Caco-2	38

1.2.2. Cultivo y diferenciación de células 3T3-L1	39
1.2.2.1. Transfección transitoria de las células 3T3-L1	41
1.2.2.2. Consumo de glucosa en las células 3T3-L1	41
2. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE ARNM GLUT8 EN INTESTINO	42
2.1. Aislamiento de ARN total a partir de tejidos animales	42
2.2. Aislamiento de ARN total a partir de cultivos celulares.....	42
2.3. Síntesis de la primera hebra de ADNc a partir de ARN total mediante Transcriptasa Inversa(RT)	43
2.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	44
2.4.1 Estudio de la expresión de GLUT8 por RT-PCR	44
2.5. Clonación de GLUT8 y los diferentes transcritos amplificados en el vector TOPO	46
2.5.1. Preparación de células competentes por el método del $CaCl_2/Mn$	46
2.5.2. Transformación de <i>E. coli DH5α</i> por choque térmico	47
2.5.3. Purificación del ADN plasmídico	47
2.6. Subclonación de GLUT8 y los diferentes transcritos en el plásmido de expresión eucariota pcDNA 3.1 (+)	48
2.6.1. Construcción pcDNA3.1(+):GLUT8 y pcDNA3.1(+):SP3	49
2.6.2. Construcción pcDNA3.1(+):SP1 y pcDNA3.1(+):SP2	51
2.7. Secuenciación y análisis de las secuencias	53
2.8. Detección de los diferentes transcritos por southern blot	54
2.8.1. Preparación de las muestras	54
2.8.2. Migración electroforética	54
2.8.3. Transferencia y prehibridación	54
2.8.4. Hibridación	55
2.8.5. Detección y visualización del ADN hibridado	55
2.9. Amplificación de los diferentes transcritos GLUT8, SP1, SP2 y SP3 por PCR	55
2.10. Estudio de la regulación de la expresión de GLUT8 por RT-PCR cuantitativa	58
3. ANÁLISIS DE LA PROTEÍNA GLUT8	62
3.1. Detección y localización de GLUT8 en intestino de ratón por inmunohistoquímica	62
3.2. Detección de la proteína GLUT8 en células 3T3-L1 por inmunofluorescencia	64
3.3. Detección de la proteína por western blot	65
3.3.1. Aislamiento de proteínas de membrana.....	65
3.3.2. Cuantificación de proteínas	66
3.3.3. Migración electroforética en gel de acrilamida	66
3.3.4. Transferencia	66
3.3.5. Detección y visualización de la proteína	67
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	67

IV. RESULTADOS	68
1. EXPRESIÓN DE GLUT8 EN INTESTINO DE RATÓN	68
1.1. Estudio de la expresión de ARNm de GLUT8 en intestino de ratón	68
1.2. Detección de la proteína GLUT8 en intestino de ratón mediante western blot	69
1.3. Expresión y localización de GLUT8 mediante estudios de inmunohistoquímica	71
1.4. Variaciones de la expresión de GLUT8 en diferentes estados fisiopatológicos	83
1.4.1. Modelos experimentales	83
1.4.2. Expresión de la proteína GLUT8 en los estados de diabetes y ayuno	85
2. ANÁLISIS DE VARIANTES TRANSCRIPCIONALES DE GLUT8	86
2.1. Clonación e identificación de GLUT8 y sus variantes transcripcionales	86
2.2. Análisis teórico de la secuencia proteica resultante a partir de los transcritos aislados ...	90
2.3. Amplificación de los diferentes transcritos por PCR	93
2.4. Estudio de la posible función de SP1, SP2 y SP3 en la expresión de GLUT8	94
2.4.1. Transfección de células 3T3-L1 con los diferentes transcritos	96
2.4.2. Estudio de la expresión de GLUT8 en células 3T3-L1 transfectadas mediante RT-PCR cuantitativa	97
2.4.3. Estudio de la expresión de la proteína GLUT8 en las células transfectadas	98
2.4.4. Estudio del consumo de glucosa en las células 3T3-L1 transfectadas	98
2.4.5. Estudio de la localización celular de la proteína GLUT8 en células transfectadas	100
3. EXPRESIÓN DE GLUT8 EN CÉLULAS CACO-2	102
3.1. Estudio de la expresión de ARNm de GLUT8 en células Caco-2	102
V. DISCUSIÓN	107
VI. CONCLUSIONES	124
VII. RESUMEN	126
VIII. SUMMARY	127
IX. BIBLIOGRAFÍA	128

I. INTRODUCCIÓN

La mayoría de las células eucariotas dependen de un aporte de glucosa continuo como su principal fuente de generación de ATP y almacenamiento de sustratos energéticos. Por ello, la glucosa constituye una de las más importantes fuentes de energía para mantener la maquinaria metabólica de la mayoría de las células en mamíferos, sin olvidar que en las neuronas supone el mayor sustrato utilizado. La glucosa es distribuida por todo el organismo a través de los fluidos extracelulares y su concentración es heterogénea. Excepto para el hígado y el riñón, que generan y liberan glucosa dentro de su torrente sanguíneo, la concentración de glucosa arterial es mayor que la concentración de glucosa en vena, y esta concentración de glucosa en vena varía a lo largo de los órganos y tejidos dependiendo de la tasa de captación de glucosa y la tasa del flujo sanguíneo.

La glucosa se obtiene a través de la digestión y absorción de los nutrientes ingeridos en la dieta habitual. Una comida típica contiene una mezcla de carbohidratos, proteínas, lípidos, agua, electrolitos y vitaminas. El sistema digestivo procesa cada uno de estos componentes de manera diferente. Mientras que el agua, los electrolitos y las vitaminas pueden ser absorbidas a través de mecanismos específicos de transporte sin ser procesadas previamente, las grandes moléculas orgánicas deben ser digeridas para poder ser absorbidas. De esto se encargan las carbohidrasas, proteasas y lipasas, enzimas secretadas por las glándulas salivares, estómago, intestino y páncreas. Estas enzimas degradan las proteínas, los lípidos y los carbohidratos a lo largo del tracto digestivo. Pero los últimos pasos enzimáticos, antes de ser absorbidos los nutrientes, son llevados a cabo por las enzimas digestivas localizadas en la superficie de las microvellosidades de los enterocitos (Alpers, 1994).

Una vez absorbida, el exceso de glucosa en sangre será almacenado en tejidos como el hígado, y de manera insulino dependiente, en el músculo esquelético y el tejido adiposo, reduciendo así el impacto de futuras carencias. En este periodo de captación celular, al igual que ocurre en el epitelio intestinal es necesaria la existencia de proteínas transportadoras específicas que faciliten la entrada de monosacáridos en las células de los diferentes tejidos.

1. TRANSPORTE DE AZÚCARES A TRAVÉS DE LA MEMBRANA CELULAR

Los azúcares, debido a que son moléculas hidrofílicas, no pueden atravesar por sí mismos la bicapa lipídica de la membrana celular, y por tanto, es necesario la existencia de proteínas transportadoras específicas que faciliten su paso al interior de las células. Este transporte se lleva a cabo a través de mecanismos de difusión facilitada (transportadores de la familia GLUT) y mecanismos de transporte activo secundario (familia SGLT).

1.1. Transportadores SGLT

Son proteínas que realizan un transporte acoplado, en el que aprovechando un gradiente electroquímico favorable para el sodio entre el exterior e interior de la célula, ingresan al mismo tiempo glucosa (y/o galactosa en algunos casos) en contra de un gradiente químico. Se localizan en la membrana apical de las células epiteliales encargadas de la absorción de nutrientes en el intestino delgado, y de células responsables de la reabsorción de dichos nutrientes en el túbulo contorneado proximal del riñón.

Crane en 1960, propuso por primera vez la hipótesis de un transporte de glucosa acoplado al gradiente electroquímico del Na^+ . Sin embargo, no fue hasta 1984 cuando se identificaron las primeras proteínas responsables de un cotransporte de glucosa y/o prolina acoplados al sodio, en el borde en cepillo de los enterocitos (Peerce y Wright, 1984; Wright y Peerce, 1984). La clonación y aislamiento de las proteínas responsables llegaron más tarde, fundamentalmente debido a la pequeña representación proteica de estos co-transportadores en el total de la masa intestinal. Fue en 1987 cuando se produjo la clonación del cotransportador Na^+ /glucosa en el intestino de conejo (Hediger y cols., 1987), mediante un sistema de clonación por expresión funcional. Este sistema consiste en el aislamiento del ARNm del intestino, y su posterior inyección, como ARNc, en ovocitos de *Xenopus laevis*, un sistema de fácil expresión, por la pequeña cantidad de proteínas expresadas en ellos, y de relativa fácil manipulación debido a su tamaño. En este sistema de expresión, se fueron inyectando diferentes fracciones del ARNc de forma secuencial y sobre ellas probando las capacidades de transporte dependiente de sodio que se producía. De esta manera se llegó al aislamiento de un cDNA correspondiente al cotransportador en intestino, que fue denominado con SGLT1 "Sodium Glucose Transporter tipo 1". Este cDNA posteriormente fue utilizado para la clonación de su homólogo en humano (Hediger y cols., 1989), así como un segundo tipo de cotransportador de glucosa, también en humano, que fue denominado SGLT2 (Wells y cols., 1992).

Hasta el momento se han identificado seis transportadores SGLT, todos ellos pertenecientes a la familia de genes SLC5A, en la cual también se engloban otros genes responsables de la síntesis de otras proteínas transportadoras acopladas a iones (Wright y Turk, 2004). Todos los transportadores SGLT poseen características comunes, pero se diferencian en

varios aspectos como la afinidad por la glucosa y el sodio; el grado de inhibición frente a la florzina; la capacidad para transportar glucosa o galactosa y su localización tisular.

En cuanto a la estructura secundaria de los transportadores SGLT, todos ellos presentan 14 dominios transmembrana en orientación α -hélice (Figura I.1). El más estudiado ha sido SGLT1, para el cual se conoce que ambos extremos, el amino- y el carboxi-terminal son extracelulares. (Turk y cols., 1996; Turk y Wright, 1997), estructura que se piensa, poseen también el resto de las proteínas de la familia (Wright, 2001; Wright y Turk, 2004).

SGLT1 (Hediger y cols., 1987; Hediger y cols., 1989) es una proteína de 664 aminoácidos, tiene una alta afinidad por la glucosa, con una constante de Michaelis (K_m) de 0,4 mM. Transporta dos moléculas de sodio por una de glucosa o galactosa, con una K_m para el sodio de 3 mM. Se expresa en el intestino delgado y en el segmento S3 de la nefrona proximal. Presenta un sitio de glucosilación entre los dominios transmembrana 6 y 7. Al parecer, el transporte del sodio y de la glucosa se realiza a través de dos partes diferentes de la proteína; el sodio ingresa por una región de la proteína cercana al extremo N-terminal, mientras que el monosacárido lo hace a través de la región C-terminal. La unión del sodio a la proteína transportadora genera un cambio de conformación en ella que permite la unión y el transporte de glucosa al interior de la célula. Se ha descrito la existencia de mutaciones en el gen SGLT1 que conllevan un gran desorden en la absorción de glucosa-galactosa, y que se intenta paliar cambiando en la dieta la glucosa por la fructosa. Sin embargo, la magnitud de este desorden indica que este transportador de glucosa es esencial en la absorción de nutrientes (Wright, 2001; Wright y Turk, 2004).

SGLT2 (Wells y cols., 1992) es una proteína de 672 aminoácidos. Presenta una K_m para la glucosa de 2 mM. Transporta una molécula de sodio por una de glucosa y su K_m para el sodio es de 100 mM. Se expresa en el riñón, en los segmentos S1 y S2, pero no en el intestino. Es el encargado de reabsorber el 90% de la glucosa filtrada por el riñón. A diferencia de SGLT1 y 3, la estequiometría para el sodio es 1:1.

SGLT3 (Kong y cols., 1993; Mackenzie y cols., 1994) es una proteína de 674 aminoácidos. Se sabe que presenta una K_m para la glucosa de 6 mM y una K_m para el sodio de 1,5 mM. De forma similar que SGLT1, transporta dos moléculas de sodio por una de glucosa.

En los últimos años se han aislado e identificado por homología genética otros transportadores SGLT (SGLT4-6), de los que pocos datos se poseen actualmente (Wright, 2001). SGLT4 y SGLT6 están ampliamente distribuidos por todo el organismo, mientras que SGLT5 parece expresarse únicamente en riñón. Para SGLT6 se ha sugerido que puede ser el buscado transportador de baja afinidad para la glucosa en el intestino (Wright y Turk, 2004).

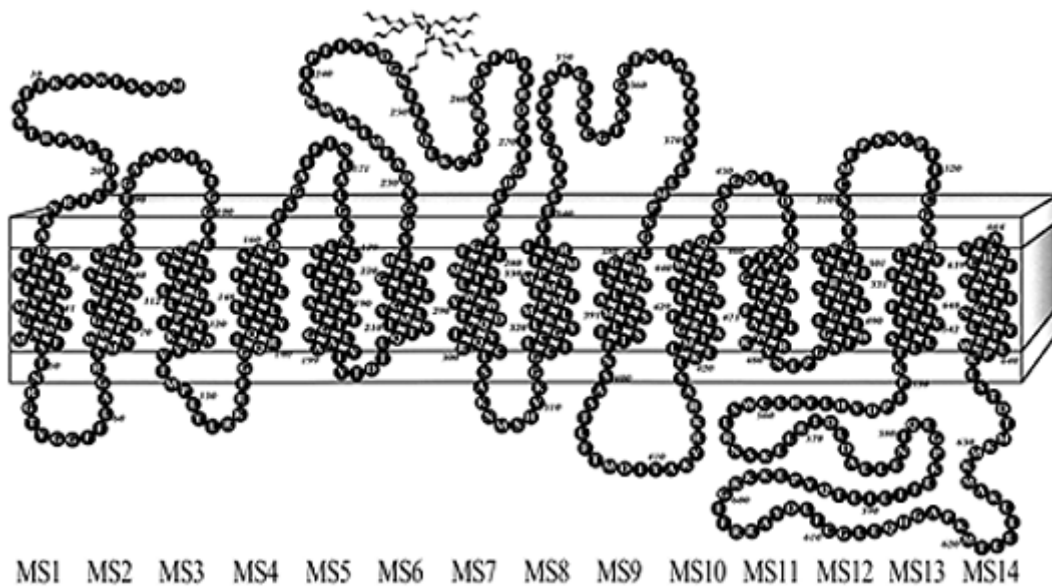


Figura I.1. Modelo de la estructura secundaria de SGLT1 humano, donde están determinadas las 14 hélices transmembrana y el sitio de N-glicosilación. (Según Turk y cols., 1996).

1.2. Transportadores de la familia GLUT

En mamíferos, la difusión facilitada de la glucosa a través de la membrana plasmática de las células es mediada por una gran familia de proteínas de transporte denominada **GLUT**, que están estructuralmente relacionadas, ya que todas ellas presentan 12 hélices transmembrana y varios motivos muy conservados en su secuencia de aminoácidos (Joost y cols., 2002).

Los transportadores GLUT son los encargados del ingreso, y también salida, de los monosacáridos en todas las células del organismo, y a pesar de que todos ellos son transportadores de hexosas, se sabe que estas proteínas difieren en cuanto a su expresión tisular, sus propiedades bioquímicas, la especificidad de sustrato, y la regulación de su expresión en diferentes estados metabólicos.

La clonación de GLUT1 en 1985 (Mueckler y cols., 1985), permitió más tarde la identificación de genes homólogos que fueron constituyendo una pequeña familia de genes responsables de la difusión facilitada de hexosas en las células de mamíferos (Bell y cols., 1990), que dentro de la gran familia de transportadores de difusión facilitada corresponderían a la nomenclatura SLC2A (según el comité de nomenclatura de genes HUGO "Human Genome Organization") (Joost y cols., 2002).

Los miembros de la familia GLUT se han dividido en tres subclases (Joost y Thorens, 2001) (Figura I.2). Dentro de la clase I se incluyen los transportadores de glucosa GLUT1-4 que se distinguen principalmente por su distribución tisular, su afinidad por la glucosa y su regulación hormonal. Los residuos que parecen específicos en esta clase son una glutamina en la hélice 5 (motivo QL que corresponde con Q161 en GLUT1; Mueckler y cols., 1998) y el motivo STSIF en el bucle extracelular 7 (Doege y cols., 1998). La clase II comprende el transportador específico de fructosa GLUT5 y tres proteínas relacionadas, GLUT7, GLUT9 y GLUT11. Lo más característico en la secuencia de estos transportadores es la carencia de triptófano que sigue al motivo GPXXXP en la hélice 10. Este triptófano es importante en la unión de los ligandos citocalasina B y forskolina, pero no para la actividad transportadora de glucosa (García y cols., 1992; Schürmann y cols., 1993). La clase III comprende cinco isotipos: GLUT6, GLUT8, GLUT10, GLUT12, y HMIT1(GLUT13). Esta clase se caracteriza por tener el bucle 1 extracelular muy corto y además no está glucosilado, ya que la glucosilación aparece en el bucle 9 (Figura I.3).

GLUT1 fue clonado por primera vez en humanos (Mueckler y cols., 1985). Es una proteína de 492 aminoácidos. Tiene una K_m para la glucosa de aproximadamente 3 mM y transporta además, galactosa, manosa y glucosamida. Se encuentra en casi todos los tejidos con distintos niveles de expresión en los diferentes tipos celulares. Los niveles de expresión normalmente se correlacionan con la tasa de metabolismo celular de glucosa. Se expresa mayoritariamente en los eritrocitos, las células endoteliales, las células de la retina y las barreras hematoencefálica y placentaria.

GLUT2 fue clonado en rata (Thorens y cols., 1988) y en humano (Fukumoto y cols., 1988). Es una proteína de 524 aminoácidos. A diferencia de los otros GLUT su afinidad por la glucosa es baja, su Km es de 17 mM. Transporta además, galactosa, manosa y fructosa, y tiene una alta afinidad por el transporte de glucosamina. Está presente en la membrana basolateral del intestino y de las células epiteliales absortivas del riñón (Thorens y cols., 1990). En estas células participan con los transportadores sodio dependientes SGLT1 y SGLT2 en el transporte transepitelial de la glucosa. En los hepatocitos, GLUT2 está presente en cantidades elevadas en la membrana sinusoidal donde está involucrado en la captación y liberación de la glucosa a la sangre. GLUT2 está presente en cantidades elevadas en la membrana plasmática de las células β pancreáticas donde cataliza el primer paso en la secreción de insulina estimulada por glucosa (Guillam y cols., 2000; Matschinsky, 1996). Estudios funcionales han demostrado el requerimiento de GLUT2 en otras unidades sensibles a la glucosa, en particular en el sistema porta hepático (Burcelin y cols., 2000), en el hipotálamo y en el tronco del encéfalo. Estas unidades sensibles a la glucosa están involucradas en el control de la regulación, absorción y captación de glucosa en los tejidos periféricos (Burcelin y Thorens, 2001).

GLUT3 fue clonado en tejido humano (Kayano y cols., 1988). Es una proteína de 496 aminoácidos. Su Km para la glucosa es de 1,4 mM. También transporta galactosa, manosa, maltosa y xilosa. En humanos, GLUT3 se expresa en muchos tejidos pero principalmente en cerebro y testículo, donde está presente en los espermatozoides (Haber y cols., 1993), y también en músculo esquelético (Stuart y cols., 1999). En ratón y rata, GLUT3 mayoritariamente es detectado en cerebro. Está presente principalmente en la membrana plasmática de neuronas, aunque una parte se localiza en vesículas intracelulares distintas a las vesículas sinápticas (Thoidis y col., 1999).

GLUT4 ha sido clonado en humano (Fukumoto y cols., 1989), rata (Birnbaum, 1989; Charron y cols., 1989) y ratón (Kaestner y cols., 1989). Es una proteína de 509 aminoácidos. Transporta glucosa con una Km aproximada de 5 mM, pero también transporta glucosamina. Aparece exclusivamente en músculo esquelético y cardíaco, y en tejido adiposo. Está secuestrado dentro de vesículas intracelulares, y la estimulación por la insulina lleva a una rápida y reversible redistribución de GLUT4 hacia la membrana plasmática. La localización subcelular está regulada por la insulina, siendo el principal responsable de la captación de glucosa insulino-dependiente que ocurre en estos tejidos.

Las vesículas intracelulares están sometidas a un ciclo continuo de exocitosis-endocitosis. El mecanismo molecular entre el estímulo y la movilización de las vesículas a la membrana plasmática se conoce parcialmente, y sigue siendo objeto de múltiples investigaciones. El efecto de la insulina es el que se ha estudiado con mayor profundidad. Cuando la insulina se une a su receptor, se induce un cambio conformacional en éste, que estimula la actividad tirosina-cinasa. El receptor activado se autofosforila y, a su vez, fosforila varias proteínas en cascada, las cuales inducen todos los efectos celulares de la insulina. Las principales proteínas fosforiladas por el receptor son las IRS "Insulin Receptor Substrate". Estas IRS, a su vez, activan otras proteínas

entre las cuales se incluyen una que es homóloga del colágeno (proteína SHC) y el Gab 1 (proteína asociada al receptor del factor de crecimiento Grb2) (Shepherd y Kahn, 1999), que desencadenan una cascada de eventos moleculares, incluyendo, entre otros, la translocación de las vesículas. Esta exocitosis de las vesículas incrementa momentáneamente el número de transportadores GLUT4 en la membrana del miocito o del adipocito, y con ello la entrada de glucosa a estas células. Cuando el estímulo cesa se desencadena la endocitosis, que involucra al citoesqueleto y a la clatrina.

GLUT5 fue aislado a partir de células epiteliales intestinales humanas (Kayano y cols., 1990), y de yeyuno de rata (Rand y cols., 1993) y conejo (Miyamoto y cols., 1994). Es una proteína de 501 aminoácidos. Prácticamente es un transportador de fructosa ($K_m \approx 6 \text{ mM}$), ya que su afinidad por otros monosacáridos, incluyendo la glucosa es muy pequeña. Se localiza en la membrana apical de los enterocitos (Kayano y cols., 1990), en los espermatozoides (Burant y cols., 1992), y las células microgliales del cerebro (Mantych y cols., 1993). GLUT5 juega un papel importante en la absorción de fructosa en el intestino. Está localizado principalmente en la membrana apical de las células epiteliales pero también está presente en la membrana basolateral de las células epiteliales humanas (Blakemore y cols., 1995).

La diversidad en cuanto a la distribución tisular y las funciones específicas de cada uno de estos transportadores hizo pensar durante la década de los 80 que estos genes eran suficientes para controlar el movimiento de azúcares en todos los tejidos. Sin embargo, viendo que en algunos tejidos la expresión de los transportadores GLUT conocidos era a niveles muy bajos, en 1990 ya se sugirió la existencia de otros posibles transportadores de hexosas facilitadores adicionales (Kayano y cols., 1990). Los primeros intentos en aislar nuevas isoformas no tuvieron mucho éxito, pero un poco más tarde, ya en el año 2000, gracias a la existencia de amplias bases de datos genómicas, de numerosos ADNc clonados y clasificados por familias, así como la creación de la base de datos EST "Expressed Sequence Tags" (Phay y cols., 2000b) permitieron la búsqueda por homología de nuevos genes pertenecientes a la familia GLUT que presentaran secuencias típicas de dicha familia. Los ADNc de estos genes fueron clonados y amplificados por técnicas PCR.

Siguiendo esta estrategia, se han identificado ocho nuevos transportadores de azúcares que comparten con GLUT1 una homología en su secuencia mayor del 28% (Joost y Thorens, 2001).

GLUT6 ha sido clonado en humanos (Doege y cols., 2000a). Es una proteína de 507 aminoácidos y se expresa predominantemente en cerebro, bazo y leucocitos periféricos, pero la expresión de la proteína no ha sido demostrada.

GLUT7 fue identificada mediante búsqueda por homología genómica (Joost y Thorens, 2001). Trabajos más recientes han clonado su secuencia, y han realizado estudios que indican que la proteína presenta 524 aminoácidos y comparte un 68% de similitud, y un 53% de identidad a GLUT5. GLUT7 tiene una alta afinidad por el transporte de glucosa ($K_m \approx 0,3 \text{ mM}$) y fructosa. En

humanos está presente en intestino delgado, en colon, en testículo y próstata. En ratas se ha estudiado la expresión de la proteína y se ha detectado en intestino delgado predominantemente en la membrana del borde en cepillo de los enterocitos (Li y cols., 2004).

GLUT8 fue clonado independientemente por 3 grupos en humano, rata y ratón: (Carayannopoulos y cols., 2000; Doege y cols., 2000b; Ibberson y cols., 2000). La proteína tiene 477 aminoácidos. Transporta glucosa con una Km aproximada de 2 mM. Se encuentra predominantemente expresado en testículo, y en pequeñas cantidades en otros tejidos, como el cerebro, hígado, riñón e intestino, y tejidos sensibles a la insulina, como por ejemplo corazón y músculo esquelético.

GLUT9 es una proteína de 540 aminoácidos (Phay y cols., 2000a). Es muy similar a GLUT5 sugiriendo que puede ser un transportador de fructosa. Su ARNm se ha detectado fundamentalmente en riñón e hígado y, a niveles muy bajos en intestino delgado, placenta, pulmones y leucocitos.

GLUT10 ha sido aislado a partir de tejido humano y de ratón (Dawson y cols., 2001; McVie-Wylie y cols., 2001). Es una proteína de 541 aminoácidos y presenta gran similitud con GLUT8. Presenta una alta afinidad por el transporte de 2-deoxiglucosa (Km \approx 0,3 mM). El ARNm humano se ha detectado en corazón, pulmones, cerebro, hígado, músculo esquelético, páncreas, placenta y riñón. Posee un motivo de internalización YSRI en la región C-terminal aunque su localización subcelular todavía no se ha estudiado

GLUT11 (Doege y cols., 2001) es una proteína de 496 aminoácidos. Su ARNm se expresa en varios tejidos, principalmente en músculo esquelético y corazón, a niveles intermedios en cerebro, intestino delgado, pulmones y leucocitos; y a bajos niveles en el hígado, riñón y placenta. Es relativamente próximo a GLUT5, y se ha observado que su actividad de transporte de glucosa es inhibida por la fructosa.

GLUT12 ha sido clonada en humano (Rogers y cols., 2002). Es una proteína de 617 aminoácidos. Se expresa en corazón, músculo esquelético, tejido adiposo marrón, próstata y glándula mamaria de rata (Macheda y cols., 2003).

GLUT13 ha sido clonado en rata y humano (Uldry y cols., 2001). Tiene 629 aminoácidos. Es un transportador de mioinositol acoplado al H⁺ por lo que inicialmente fue denominado como HMIT1. Se expresa predominantemente en cerebro, con una alta expresión en hipocampo, hipotálamo, cerebelo y tronco encefálico. Bajos niveles de expresión se han detectado en tejido adiposo blanco, marrón y epididimal, y en el riñón. Se encuentra tanto en neuronas como en células de la glia, donde se expresa, en parte, en la membrana plasmática, lo que sugiere que existe algún estímulo que provoque la translocación a la superficie celular. Como los otros GLUT posee los motivos propios de un transportador de glucosa aunque dicha función no ha sido demostrada todavía.

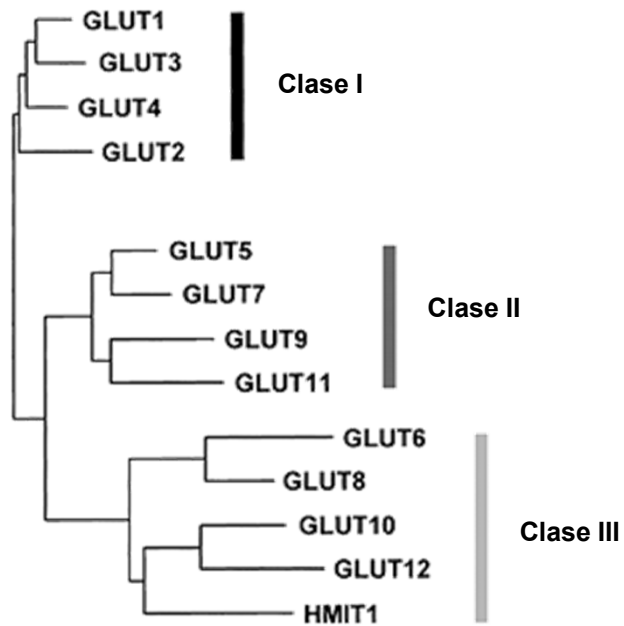


Figura I.2. Dendrograma de la alineación múltiple de todos los miembros de la familia GLUT. (Según Joost y cols., 2002).

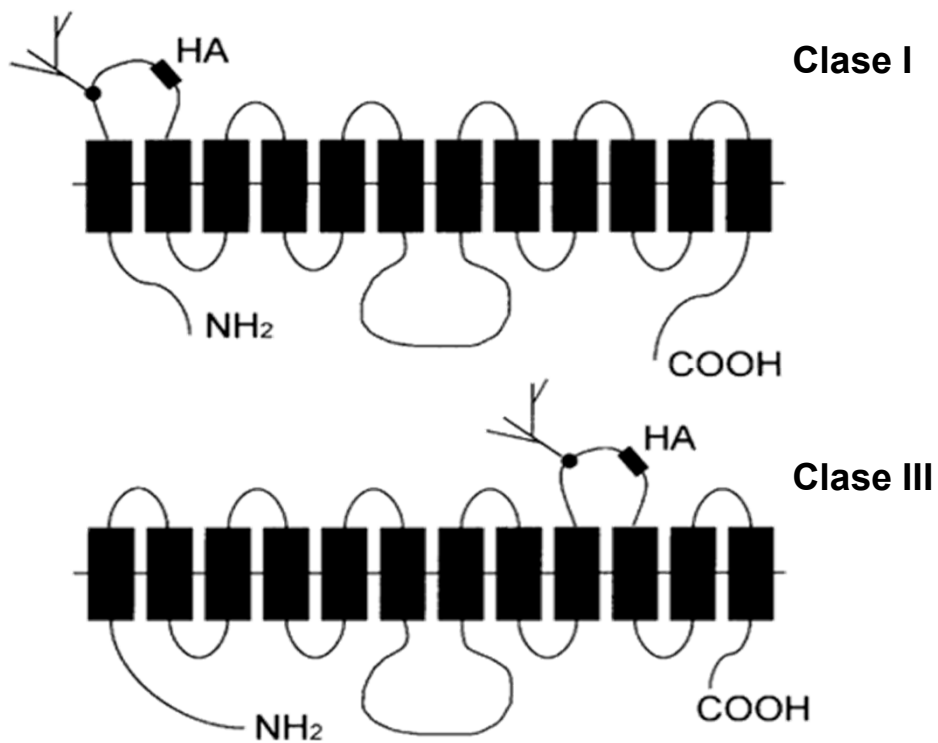


Figura I.3. Modelo de la estructura secundaria de transportadores GLUT pertenecientes a la clase I y clase III, donde se muestran las 12 hélices transmembrana y los sitios putativos de N-glicosilación. (Según Lisinski y cols., 2001).

Tabla I.1. Familia de transportadores de glucosa facilitadores (GLUT). El número de acceso y el número de aminoácidos de la proteína corresponde a humanos.

Proteína	acceso NCBI	referencias	nº de aminoácidos	características de transporte
GLUT1	NP006507	Mueckler y cols., 1985	492	Transporte basal de glucosa
GLUT2	NP000331	Fukumoto y cols., 1988	524	Sensor de glucosa en páncreas, transporte de glucosa en intestino y riñón
GLUT3	P11169	Kayano y cols., 1988	496	Transporte basal de glucosa
GLUT4	AAH69615	Fukumoto y cols., 1989	509	Transporte de glucosa estimulado por insulina
GLUT5	AAH01692	Kayano y cols., 1990	501	Transporte de fructosa
GLUT6	NP060055	Doege y cols., 2000a	507	Transporte de glucosa estimulado por insulina
GLUT7	AAS78590	Li y cols., 2004	524	Transporte de glucosa y fructosa
GLUT8	AAH19043	Carayannopoulos y cols., 2000 Doege y cols., 2000b Ibberson y cols., 2000	477	Transporte de glucosa
GLUT9	NP064425	Phay y cols., 2000a	540	Transporte de glucosa
GLUT10	NP110404	McVie-Wylie y cols., 2001	541	Transporte de glucosa
GLUT11	Q9BYW1	Doege y cols., 2001	496	Transporte de glucosa
GLUT12	AAH70149	Rogers y cols., 2002	617	Transporte de glucosa
GLUT13	NP44317	Uldry y cols., 2001	629	Transporte de mioinositol

Todos los GLUT son glucoproteínas con un peso molecular entre 45 y 55 kDa, que presentan doce dominios transmembrana en estructura α -hélice. Los extremos amino (N) y carboxilo (C) terminales, al igual que una gran asa central, se orientan hacia el lado citoplasmático. Además presentan un sitio de glucosilación en la región externa de la membrana. Cada una de las diferentes isoformas de los GLUT tiene ubicación y características cinéticas propias, adaptadas a las necesidades metabólicas de los distintos tejidos del organismo.

Si se comparan las secuencias de aminoácidos (Figura 1.4) se puede observar varios motivos que están presentes en todas ellas y que parecen ser requeridos para la función general de los transportadores facilitadores. Estos motivos han sido inicialmente identificados mediante alineación de las secuencias, y algunos de ellos además han sido estudiados por mutación dirigida. Se conservan 7 glicinas localizadas en las hélices 1, 2, 4, 5, 7, 8 y 10, indicando que estos residuos son críticos para la estructura de esas hélices. Además también se conservan residuos triptófano en las hélices 6 y 11, y residuos de tirosina en las hélices 4 y 7. El triptófano en la hélice 11 parece ser esencial en la actividad transportadora y en la unión al ligando citocalasina B y forskolina (García y cols., 1992; Schürmann y cols., 1993). Los residuos de tirosina en las hélices 4 y 7 parecen ser importantes para la función de GLUT1 y GLUT4 (Mori y cols., 1994; Wandel y cols., 1994).

Se ha sugerido que varios motivos participan en el reconocimiento del sustrato en GLUT1-4. Estos motivos son QLS en la hélice 7 (Gould y Colman, 1993; Seatter y cols., 1998), el motivo STSIF en el bucle 7 (Doege y cols., 1998), el triptófano 388 y la glutamina 161 en la hélice 5 (Mueckler y cols., 1994). Al igual que GLUT4, sorprendentemente, la mayoría de los recién clonados GLUTs presentan uno o varios motivos implicados en la compartimentalización intracelular de estas proteínas.

En cuanto a la estructura secundaria de los GLUTs, todas las secuencias presentan varias cargas residuales en la superficie intracelular de las proteínas que propician la orientación y el anclaje de las hélices en la membrana plasmática (Sato y Mueckler, 1999), y se sugiere que participan en el cambio conformacional de la proteína durante el proceso de transporte (Schürmann y cols., 1997).

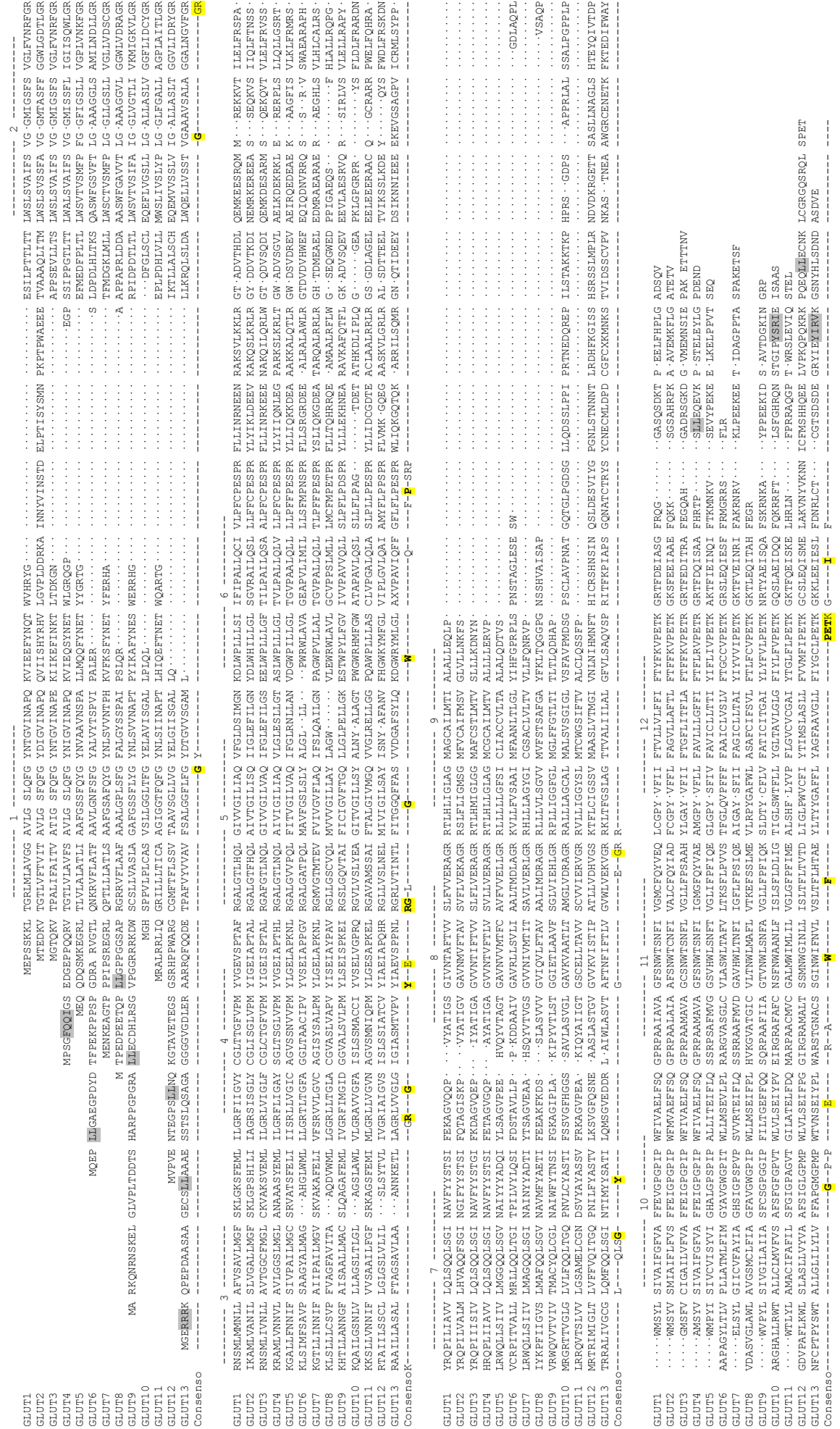
Los segmentos transmembrana 3, 5, 7 y 11 son hidrofílicos en una cara del cilindro α -hélice e hidrofóbicos en la otra, por lo que forman un poro y, de esta manera, permiten el paso del monosacárido a favor de un gradiente de concentración. Se sabe que para que se efectúe el ingreso de la glucosa, se deben formar previamente uniones débiles de tipo puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo y carbamino del transportador y los grupos hidroxilo de la glucosa.

El proceso de ingreso de la glucosa a la célula se describe en cuatro etapas:

1. La glucosa se une al transportador en la cara externa de la membrana.
2. El transportador cambia de conformación y la glucosa y su sitio de unión quedan localizados en la cara interna de la membrana.
3. El transportador libera la glucosa al citoplasma.
4. El transportador libre cambia nuevamente de conformación, expone el sitio de unión a la glucosa en la cara externa y retorna a su estado inicial.

La existencia de esta amplia familia de transportadores de glucosa indica que el control de la homeostasis de la glucosa es mucho más complejo de lo que en un principio se pensaba. Los estudios realizados hasta el momento intentan determinar o explicar el papel de los diferentes transportadores GLUT en el control del flujo de la glucosa en diferentes órganos, y su importancia en el control de la homeostasis completa de la glucosa. La clave de este control supone la absorción de glucosa dentro del organismo a través del epitelio intestinal, para luego alcanzar los diferentes tejidos y ser ingresada en las células bien para la obtención de energía, o bien, para su almacenamiento. De manera que si se producen defectos en algunos de estos mecanismos el organismo podría verse comprometido, llegando, incluso a producirse graves alteraciones fisiopatológicas.

Figura I.4. Comparación de las secuencias de aminoácidos de los transportadores de glucosa de la familia GLUT. En la secuencia se muestran los 12 dominios transmembrana. Los motivos conservados aparecen sombreados en amarillo y los motivos de internalización (LL, YXXIV, RRR) aparecen señalados en gris.



2. MORFOLOGÍA DEL TRACTO DIGESTIVO

Para una mayor comprensión del proceso de absorción intestinal es necesaria una breve descripción de los aspectos morfológicos y fisiológicos del intestino.

El intestino delgado es la parte del tubo digestivo situada entre el estómago y el intestino grueso. Concretamente, se extiende desde el píloro hasta la válvula ileocecal. Presenta una morfología peculiar, lo que permite que entre otras funciones, en él ocurran los procesos de digestión y absorción de nutrientes. La parte final de la digestión de los alimentos y algunos procesos absorptivos se produce en el colon, localizado desde la válvula ileocecal hasta el recto.

El intestino delgado está dividido en tres porciones: duodeno, yeyuno e ileon, diferenciadas no sólo por su situación, sino también por el tipo de fisiología que desarrolla cada una de ellas. El duodeno es la primera porción, se encuentra unido a la pared dorsal mediante el ligamento de Treitz, y en él desembocan las secreciones del hígado y del páncreas. A continuación se encuentra el yeyuno, de gran capacidad enzimática y de absorción y, finalmente, el ileon, en el que son absorbidos los productos de la digestión. El diámetro de la luz se va estrechando distalmente de manera progresiva y es casi la mitad en el ileon que en el duodeno.

La pared del tubo digestivo presenta estructuralmente una serie de capas concéntricas que de la pared más externa a la más interna son: la serosa, una doble capa muscular, la submucosa y la mucosa intestinal (Figura 1.5.).

2.1. La mucosa intestinal

En el intestino, la superficie de absorción intestinal aumenta gracias a la presencia de los pliegues en la mucosa, las vellosidades intestinales y las microvellosidades (Figura 1.6). La combinación de todos estos elementos hace que el área de absorción de la mucosa intestinal se incremente unas 600 veces. Los pliegues de la mucosa son más densos en la parte distal del duodeno y proximal del yeyuno, y menos frecuente en el ileon. En la mucosa se puede diferenciar varias capas: la capa más profunda se denomina **muscularis mucosae**, que separa a la mucosa de la submucosa, por encima de la cual se encuentra la **lámina propia**, en la que se encuentran normalmente células plasmáticas, linfocitos, macrófagos, unos pocos eosinófilos, células mastocitarias, fibroblastos y miofibroblastos, fibras nerviosas, vasos sanguíneos y linfáticos, y células musculares lisas. También están presentes elementos como el colágeno y fibras elásticas. La lámina propia tiene varias funciones entre las que se encuentran funciones inmunológicas, da un importante soporte estructural a las células del epitelio, y también contiene los vasos sanguíneos y linfáticos que captan el material absorbido por el epitelio. La tercera capa de la mucosa intestinal es una monocapa de **células epiteliales** que están en contacto directo con el lumen intestinal. El epitelio se separa de la lámina propia por una membrana basal compuesta por fibroblastos (Madara y Trier, 1994).

En la base de las vellosidades se encuentran las criptas intestinales. Las criptas de Lieberkühn constituyen el compartimiento proliferativo del epitelio del intestino delgado. Cada cripta intestinal contribuye a la renovación del epitelio intestinal durante el estado adulto. Un pequeño número de células intestinales (se estima entre una y seis) residen en la base de cada cripta. Estas células se duplican lentamente dando lugar a una población transitoria de células progenitoras que rápidamente se dividen mientras migran hacia el lumen intestinal. Durante su migración las células progenitoras precursoras se van diferenciando hacia tres posibles linajes: mucosecretora, absorptiva o enteroendocrina. El ciclo celular está detenido y la diferenciación celular tiene lugar una vez que esas células abandonan la cripta y migran a las vellosidades. Este proceso ocurre continuamente y la mayoría de las células diferenciadas son reemplazadas cuando llegan a lo más alto de la vellosidad (cada 4-5 días) (Madara, 1991). Un cuarto tipo de células diferenciadas son las células de Paneth, que se encuentran solamente en el intestino delgado y se diferencian en las criptas (Sancho y cols., 2003). (Figura I.7. y I.8.)

Las **células absorptivas o enterocitos** del intestino están altamente polarizadas. El polo apical presenta un espesor de 0,5 a 1,5 μm . Es la parte más estrecha y está enriquecida de componentes citoesqueléticos, y normalmente está desprovisto de orgánulos citoplasmáticos. El núcleo oval está localizado en la zona basal. El aparato de Golgi está en posición supranuclear, al igual que el material mitocondrial, elementos del REL, microtúbulos, lisosomas, cuerpos multivesiculares y peroxisomas. La parte apical de la membrana plasmática de los enterocitos se organiza en microvellosidades. Se estima que las microvellosidades aumentan la superficie aproximadamente de 14 a 40 veces. La membrana de las microvellosidades es rica en proteínas y glucoproteínas. En la superficie de la membrana plasmática de las microvellosidades se encuentran el glucocálix, que está compuesto de filamentos irregulares de glucoproteínas.

La membrana plasmática lateral está provista de uniones intercelulares, y la membrana basal contiene un sustrato de adhesión a la matriz extracelular que facilita la migración del epitelio y parece que contribuye a la regulación de la diferenciación de dicho epitelio.

La diferente presencia de proteínas específicas entre la membrana plasmática apical y basolateral es esencial para el transporte vectorial de nutrientes. Los procesos absorptivos están localizados en el glucocálix de la membrana de las microvellosidades de los enterocitos. Aquí se encuentran enzimas hidrolíticos (incluyendo varias disacaridasas y peptidasas) que juegan un papel crucial en la digestión final de los carbohidratos y péptidos ingeridos en la dieta antes de la absorción intestinal. También se encuentran aquí las proteínas cotransportadoras que transportan Na^+ y D-glucosa y/o aminoácidos. La actividad Na^+ , K^+ -ATPasa se encuentra en la membrana basolateral. Esta actividad mantiene un gradiente electroquímico favorable a la absorción del Na^+ acoplada al transporte de nutrientes. También se encuentran transportadores facilitadores de glucosa de la familia GLUT (Madara y Trier, 1994).

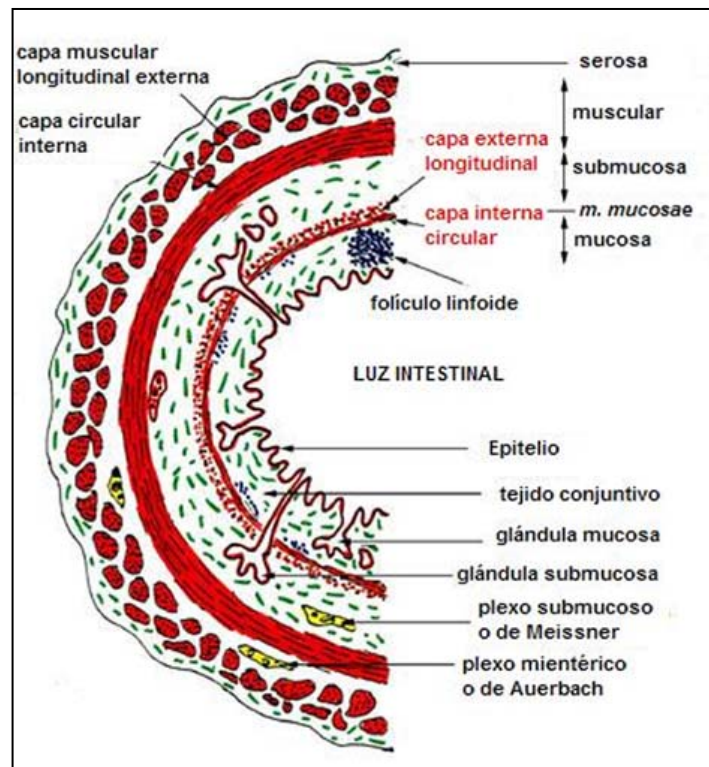


Figura I.5. Sección transversal del intestino delgado, donde se muestran las diversas capas que lo forman.

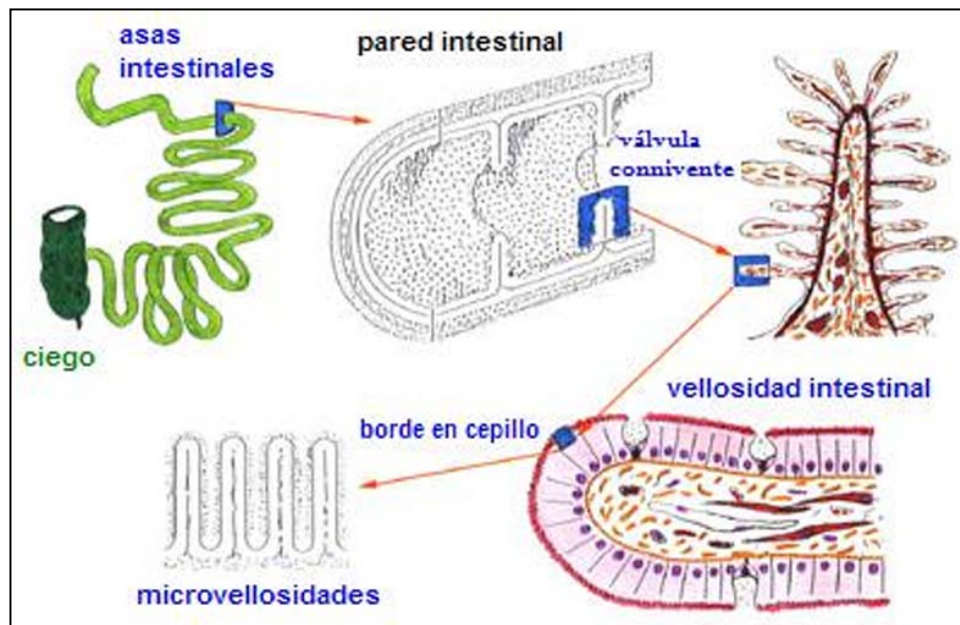


Figura I.6. Características morfológicas intestinales dedicadas al aumento de superficie de contacto con los nutrientes en su función absorbiva (pliegues, vellosidades y microvellosidades).

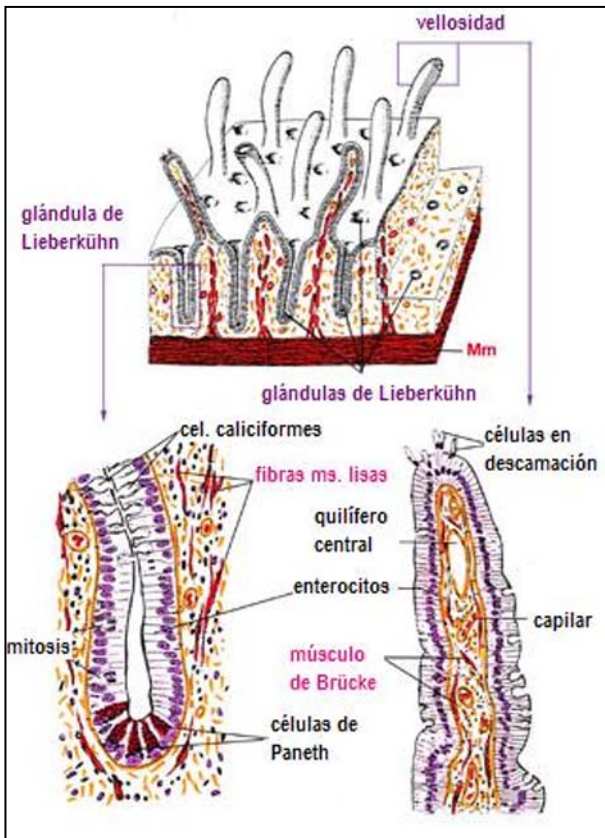


Figura 1.7. Esquema morfológico de las vellosidades y criptas intestinales.

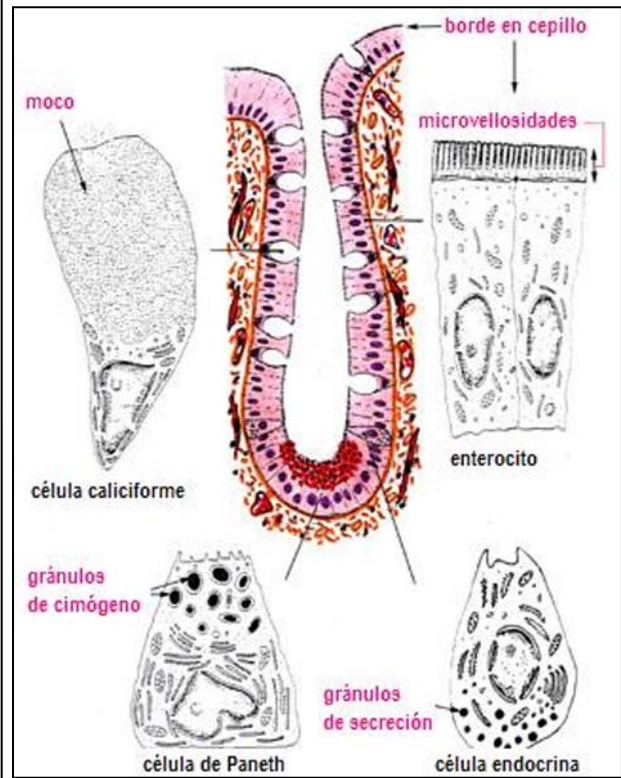


Figura 1.8. Esquema de los diferentes tipos celulares del epitelio intestinal.

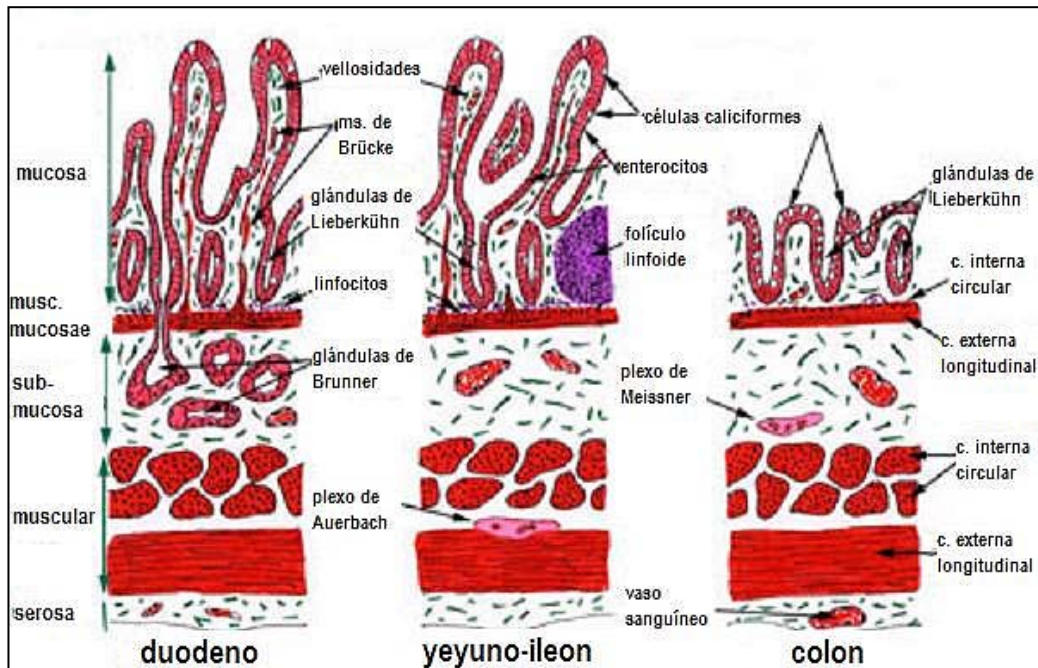


Figura 1.9. Dibujo esquemático de la morfología de las diferentes regiones del tracto intestinal.

La membrana plasmática de las células absortivas es dinámica no sólo debido a su composición, sino también a su tasa de renovación por endocitosis y su tasa de degradación de proteínas de membrana. Hay evidencias de que existen diferencias significativas en la composición de las microvellosidades a diferentes niveles en el intestino. Por ejemplo, la actividad específica de la fosfatasa alcalina, lactasa, trehalasa, y sacarasa-isomaltasa es mucho mayor en la parte proximal que en la distal del intestino. También hay evidencias de que la composición de la membrana apical varía en función de su estado maduro a lo largo del eje cripta-vellosidad, y que además existen variaciones en la expresión de ARNm de diferentes genes.

Las **células calciformes** son células polarizadas que secretan moco que está presente a lo largo del epitelio desde la parte proximal del yeyuno hasta la distal. La función del moco no se conoce muy bien, pero se asume que actúa como protector de sustancias nocivas intraluminares.

Las **células endocrinas** son células columnares más estrechas que las células absortivas que se localizan a lo largo del epitelio entre los enterocitos. Las microvellosidades apicales son irregulares. Por debajo del núcleo aparecen numerosos gránulos o vesículas secretoras. Estas células están especializadas en la síntesis y la secreción de péptidos hormonales, entre los que se encuentran la serotonina, el enteroglucagón, la gastrina, la CCK, el GIP, la somatostatina, la neurotensina y la secretina, que juegan un papel en la regulación de los procesos secretores y absortivos intestinales, así como en la regulación del flujo sanguíneo y de la motilidad intestinal. Bajo estimulación, estas células liberan sus productos por exocitosis de gránulos secretores, y el contenido de esos gránulos ejercen efectos de manera paracrina y endocrina.

Las **células de Paneth** se sitúan en la base y en la mitad inferior de las criptas. En su citoplasma se localizan gránulos eosinófilos y basófilos, que contienen lisozimas, inmunoglobulinas y defensinas. Se encuentran desde el duodeno hasta el ileon. La función de estas células se piensa que es segregar sustancias que regulan la flora microbológica intestinal, al menos en la zona inmediata de la cripta.

2.2. Intestino delgado

El intestino delgado juega el principal papel en la digestión y absorción de nutrientes. El 90% de la digestión de nutrientes ocurre en el intestino delgado y el resto en el intestino grueso.

En el intestino delgado se pueden diferenciar tres fracciones: duodeno, yeyuno e ileon. Cada una de estas regiones presenta especializaciones histológicas relacionadas con la función que desempeñan (Figura 1.9).

El duodeno contiene numerosas glándulas mucosas tanto dentro como por debajo epitelio. En la submucosa se encuentran las glándulas de Brünner, que producen grandes cantidades de moco, que a su vez, protege al epitelio de la acidez del quimo que llega del estómago. También secretan tampones que ayudan a elevar el pH del quimo, de modo que a lo largo del duodeno el

pH pasa de 1-2 a 7-8. Las glándulas de la submucosa también secretan una hormona, el factor de crecimiento epidérmico que inhibe la producción de ácido gástrico y estimula la división de las células intestinales a lo largo del tracto digestivo, y en otras áreas.

En el yeyuno, las vellosidades son muy prominentes y van disminuyendo de tamaño según se acercan al final del ileon. Esta reducción es paralela a la disminución de la actividad absorbiva. En esta región junto con la parte inicial del ileon es donde se localizan la gran mayoría de proteínas encargadas del transporte de nutrientes.

En el ileon adyacente al intestino grueso las vellosidades son muy cortas y cónicas. El ileon contiene nódulos linfáticos agregados a él, también conocidos como placas de Peyer. Los linfocitos en estos nódulos protegen al intestino delgado de bacterias que normalmente no habitan en el intestino. Estos nódulos son más abundantes en la porción final del ileon antes de entrar al intestino grueso.

2.3. Intestino grueso

Dentro de las funciones que desarrolla el intestino grueso se incluyen la reabsorción de agua y electrolitos, la compactación del quimo en heces, la absorción de vitaminas importantes liberadas durante la acción bacteriana, y el almacenamiento de la materia fecal antes de la defecación.

Se divide en tres partes: el ciego, el colon y el recto. La mayor parte de la absorción en el intestino grueso se produce en la mitad proximal del colon, lo que justifica el nombre de colon absorbivo, mientras que el colon distal funciona principalmente como un depósito.

La mucosa del colon está desprovista de vellosidades, pero presenta profundas criptas. Las criptas están recubiertas de un epitelio monoestratificado, formado mayoritariamente de células caliciformes, aunque también se encuentran células endocrinas y células absorbentes. En el fondo de las criptas también existen células indiferenciadas que aseguran la reposición de los diferentes tipos celulares, que son los mismos que en el intestino delgado, excepto las células de Paneth.

Las funciones principales del epitelio cólico son la absorción y la secreción de iones y agua, aunque también se dan procesos absorbivos de otros nutrientes pero en menor medida. Los colonocitos, o células absorbivas, presentan también un borde en cepillo, pero no contienen enzimas digestivas.

3. FISIOLÓGÍA DE LA ABSORCIÓN INTESTINAL DE AZÚCARES

En una dieta normal existen tres fuentes importantes de carbohidratos: la sacarosa, que es el disacárido conocido popularmente como caña de azúcar; la lactosa, que es el disacárido de la leche; y los almidones, grandes polisacáridos presentes en casi todos los alimentos de origen no animal, especialmente en los cereales. Otros carbohidratos que se ingieren en cantidades pequeñas son: glucógeno, alcohol, ácido láctico, ácido pirúvico, pectinas, dextrinas, celulosa y en pequeñas cantidades derivados de los carbohidratos contenidos en las carnes.

Tras la absorción, los azúcares alcanzan la sangre, y a través de la circulación llegan a los diferentes tejidos donde serán captados por las células y utilizados para generar ATP, y con esta energía sintetizar los metabolitos necesarios para que las células puedan desempeñar su función.

La media diaria de carbohidratos ingeridos en una dieta normal es de unos 300 gr. Aproximadamente la mitad es almidón, y el resto es una mezcla de maltodextrinas, sacarosa, lactosa y fructosa. Muchos de los carbohidratos ingeridos son digeridos por las α -amilasas de la saliva y de la secreción pancreática, y por las carbohidrasas del borde cepillo de los enterocitos hasta obtener azúcares libres tales como la D-glucosa, D-galactosa y D-fructosa. La concentración de estos azúcares libres raramente excede los 48 mM y su media es de 2-24 mM. Estos azúcares son absorbidos rápidamente por el intestino delgado en adultos y niños en una situación fisiológica normal. Pero la capacidad de absorción en el intestino se puede ver alterada en determinadas condiciones. Por estas razones, es importante entender las adaptaciones intestinales que modulan las tasas de absorción de azúcar en el intestino en función de las demandas fisiológicas.

3.1. Mecanismos de la absorción de azúcares

Durante muchos años, el esquema que ha descrito el mecanismo de absorción de monosacáridos, glucosa, galactosa y fructosa, desde el lumen intestinal hasta la sangre, implicaba a tres transportadores (Figura I.10(A)) (Wright y cols., 1994):

- SGLT1, transportador que está localizado en la membrana apical y transporta glucosa y galactosa al mismo tiempo que transporta Na^+ desde el lumen intestinal hacia el citosol, en un proceso activo en contra de gradiente de concentración.
- GLUT5, que también está localizado en la membrana apical enterocitaria y transporta fructosa desde el lumen hacia el citosol, en un proceso de transporte facilitado a favor de gradiente de concentración.
- GLUT2, que estaría localizado en la membrana basolateral y es el responsable de transportar los monosacáridos (glucosa, galactosa y fructosa) desde el citosol hacia el espacio intersticial, mediante difusión facilitada, desde donde alcanzarán la circulación sanguínea por simple difusión.

Este modelo es el más conocido, sin embargo, deja sin explicar ciertas peculiaridades de la absorción de monosacáridos. Por ejemplo, se sabe que, *in vivo*, el sistema de cotransporte Na^+ /glucosa se satura a una concentración de 30-50 mM de glucosa, mientras que la absorción de glucosa puede aumentar linealmente hasta 200-300 mM.

Partiendo de esta base, se ha propuesto recientemente la existencia de un mecanismo alternativo para la absorción de glucosa (Kellett y cols., 2000; Kellett, 2001). Según este modelo, GLUT2 constituiría el componente pasivo de absorción de glucosa cuando su concentración en el lumen intestinal es alta. Este mecanismo implica el tráfico rápido de GLUT2 a la membrana apical mediante una regulación dependiente de glucosa y controlada por una proteína cinasa C (PKC), que es activada por el transportador SGLT1. Según este modelo, después de una comida que supone el aumento de concentración de glucosa en el lumen intestinal, el transporte de glucosa y galactosa lo asumiría inicialmente la proteína SGLT1, pero a su vez, este transporte activaría a una proteína, la PKC β II, de modo que GLUT2 que normalmente se encuentra localizado en la membrana basolateral, sería rápidamente translocado a la membrana apical mediante un tráfico vesicular. Este suceso conduce a un estado de activación en las células de absorción, donde el flujo de glucosa a través de GLUT2 sería mayor que la absorción a través de SGLT1 (Figura I.10(B)).

Además, existen estudios con ratones transgénicos (Stümpel y cols., 2001) que muestran que en ausencia de GLUT2, el transporte transepitelial de la glucosa se produce a través de un mecanismo diferente en el que se requiere la fosforilación de la glucosa y la transferencia de la glucosa-6-fosfato dentro del retículo endoplasmático. Más recientemente, un grupo suizo (Santer y cols., 2003) ha reevaluado el papel de GLUT2 como transportador de glucosa en los enterocitos, basándose en estudios realizados con pacientes que presentan una deficiencia congénita del gen GLUT2 denominado Síndrome de Fanconi-Bickel (FBS), y en ratones transgénicos deficientes en dicho gen. En estos modelos experimentales no se ve alterada la absorción intestinal de glucosa, ni de otros monosacáridos. A raíz de estos estudios, estos investigadores también proponen que el transporte de glucosa a través de la membrana basolateral no sólo es mediado por GLUT2, sino que existe un mecanismo basado en el tráfico vesicular de glucosa-6-fosfato (Figura I.10(C)), sin excluir la existencia de otros posibles mecanismos.

Esta vía requeriría una enzima que fosforile la glucosa, la cual una vez fosforilada sería introducida en vesículas intracelulares gracias al transportador de glucosa-6-P (G6PT1). Una vez dentro, la glucosa 6-P sería desfosforilada por una enzima microsomal, la glucosa-6-fosfatasa, que daría lugar a glucosa libre dentro de los microsomas, que sería expulsada al espacio intersticial basolateral por un mecanismo clásico de exocitosis.

Estas recientes aportaciones al modelo general de absorción de monosacáridos en el intestino, refleja la existencia de lagunas por aclarar en dichos procesos, no descartando la existencia de otros transportadores en el intestino que contribuyan a la absorción de glucosa en diferentes condiciones fisiológicas o fisiopatológicas.

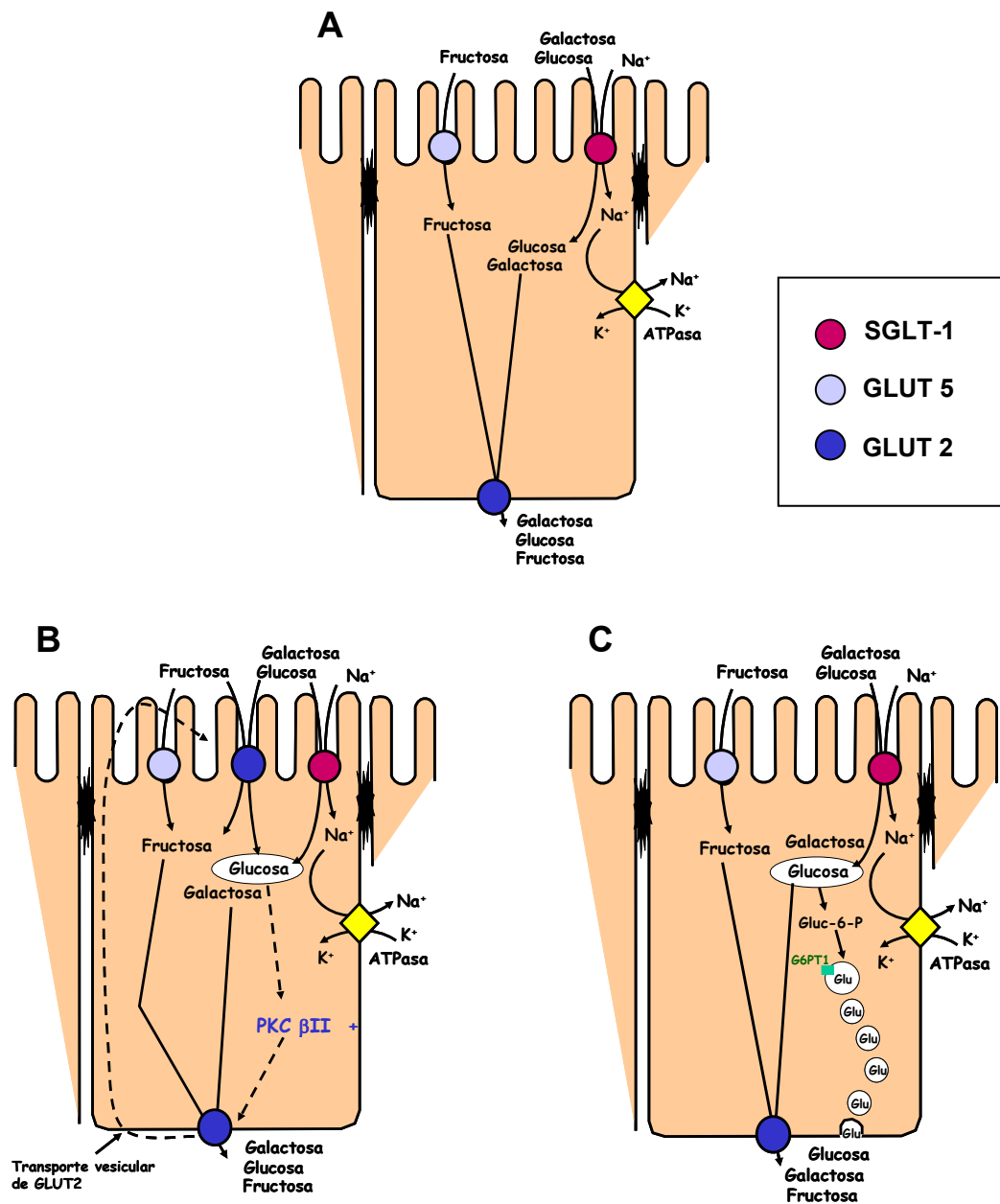


Figura I.10 . Modelo del sistema de absorción intestinal de hexosas y sus modificaciones en función de las recientes aportaciones experimentales. (A) Modelo clásico del sistema de absorción intestinal de hexosas según Wright y cols., 1994; (B) Aportaciones al modelo de absorción intestinal según Kellet, 2001; y (C) Aportaciones al modelo de absorción intestinal según Santer y cols., 2003.

4. ALTERACIONES EN EL PROCESO DE ABSORCIÓN INTESTINAL DE AZÚCARES

Como se ha comentado previamente, para el desarrollo normal del organismo se requiere un aporte constante de azúcares en la dieta, de manera que la glucosa en plasma se mantenga aproximadamente a unas concentraciones de 4 mM.

En completa inanición la concentración de glucosa en plasma cae por debajo de los niveles normales en 2-3 días, y esto causa una severa disfunción cerebral, conduciendo a un estado de coma. A pesar de no ser un nutriente esencial, la glucosa juega un papel importante en la regulación de los niveles normales de glucosa en plasma y en el control de la captación de nutrientes. La glucosa en plasma regula la secreción de insulina por el páncreas, y a su vez, regula la captación de glucosa dentro del músculo y los adipocitos. A los 30 minutos de ingerir una comida rica en carbohidratos, la concentración de glucosa en plasma se eleva a 10 – 12 mM, y es la secreción de insulina lo que hace que dicha concentración vuelva a la normalidad en una hora (Wright y cols., 2003). Actualmente se conoce muy poco acerca de cómo las células sensibles a la glucosa, así como las células pancreáticas responden a los cambios de concentración de glucosa.

La malabsorción de azúcares puede ocurrir bajo una variada serie de circunstancias. Indirectamente, la malabsorción podría estar causada por una reducción de la superficie intestinal dentro del área de absorción, por ejemplo en el síndrome de “short bowel”, una disminución en la intensidad de la motilidad, o por defectos en el proceso digestivo, por ejemplo insuficiencia pancreática. La malabsorción podría ser también debida a defectos específicos en los transportadores de azúcares (Wright y cols., 2003). Independientemente de la causa, la malabsorción produce síntomas de diarrea, dolor abdominal y gases. Por eso, el desafío consiste en descubrir las causas principales que provocan estas alteraciones, y así obtener el tratamiento adecuado para este tipo de enfermedades.

4.1. Deficiencias congénitas de los transportadores de azúcares implicados en los procesos de absorción intestinal.

4.1.1. Deficiencias congénitas en SGLT1

La malabsorción de glucosa-galactosa (GGM) (OMIM 182380) se caracteriza por la existencia de una severa diarrea en neonatos. La diarrea desaparece inmediatamente después de eliminar de la dieta la glucosa, la lactosa y la galactosa. Los primeros estudios realizados en una paciente con GGM (Schneider y cols., 1966) demostraron que había malabsorción de glucosa y galactosa, mientras que la absorción de fructosa y xilosa era normal. Estudios realizados en biopsias intestinales mostraron una histología de la mucosa normal pero con una cierta incapacidad para captar glucosa y galactosa a través de la membrana borde cepillo, y experimentos mediante autorradiografía utilizando florrizina marcada con $[H^3]$ indicaron que el defecto se debía a una reducción del co-transporte Na^+ /glucosa en la membrana borde cepillo

(Schneider y cols., 1966, Stirling y cols., 1972). Estudios posteriores (Martín y cols., 1997) determinaron que esta paciente presentaba en el gen SGLT-1 dos mutaciones separadas, una heredada de su madre (Cys355Ser) y otra heredada de su padre (Leu 147Arg). Cuando las proteínas mutadas fueron expresadas en ovocitos de *Xenopus laevis* fueron traducidas al mismo nivel que la proteína con fenotipo salvaje pero no eran capaces de transportar el azúcar. Mediante medidas electrofisiológicas y microscopía electrónica concluyeron que el defecto en el transporte de azúcares se debía a una proteína localizada en la membrana plasmática, lo cual coincidía con los estudios previamente realizados.

Actualmente existen en todo el mundo aproximadamente unos 300 casos. Los niños afectados tienen un origen muy variado. El estudio de muchos de estos casos ha permitido identificar varias mutaciones en el gen SGLT1, que dan lugar a deficiencias en el transporte y absorción intestinal de azúcares (Wright y cols., 2003). Por tanto, estos estudios evidencian que SGLT1 es el principal responsable del transporte de glucosa y galactosa a través de la membrana borde cepillo en humanos, bien directa o indirectamente.

4.1.2. Deficiencias congénitas en GLUT2 y GLUT5

El síndrome de Fanconi-Bickel (FBS) (OMIN 227810) es debido a un defecto congénito en el transporte por GLUT2, y ha sido identificado y ampliamente caracterizado por Santer y colaboradores (2002a y 2002b). El análisis de las mutaciones del gen GLUT2 en pacientes con el síndrome FBS muestra que, al igual que otras enfermedades autosomales como la GGM, se encuentran múltiples mutaciones, y en gran porcentaje de los pacientes la mutación es homocigótica.

Debido a que GLUT2 normalmente se expresa en el hígado, el páncreas, el riñón y el intestino, deficiencias en su transporte pueden producir un amplio efecto sobre la homeostasis de la glucosa. De hecho, los pacientes con el FBS muestran una nefropatía tubular, una hipoglucemia en ayunas, raquitismo, crecimiento atrofiado, y una hepatomegalia secundaria.

Estudios realizados con ratones transgénicos para el gen GLUT2 (Guillam y cols., 1998) muestran que, curiosamente, estos ratones tienen una tolerancia normal por la glucosa. Sin embargo, cuando se les induce un estado diabético mueren prematuramente debido a un defecto en la secreción de insulina, pero que si se les restablece el defecto pancreático, sobreviven y además muestran una tolerancia normal por la glucosa aunque no presenten el transportador GLUT2.

Otros estudios basados en la inhibición de la enzima glucosa-6-fosfato translocasa, concluyen que aunque GLUT2 juega un papel importante en la absorción de azúcares, existe un segundo mecanismo para la salida pasiva de glucosa desde el interior del enterocito (Stümpel y cols., 2001). Recientes estudios han confirmado estas observaciones en humanos que presentan deficiencias de GLUT2 y G6PT1 (Santer y cols., 2003).

No se conocen mutaciones congénitas del gen GLUT5 responsables de la malabsorción de fructosa (Wasserman y cols., 1996). Las alteraciones en la absorción de fructosa se producen por intolerancia hereditaria a la fructosa (HFI) y esta enfermedad se debe a tres mutaciones comunes en el gen aldolasa B que son detectadas frecuentemente en la población europea (Dursun y cols., 2001), siendo 1 de cada 20000 nacimientos los afectados (James y cols., 1996).

4.2. Alteraciones debidas al ayuno y a la malnutrición

El ayuno y la malnutrición privan al organismo de nutrientes esenciales y esto conlleva siempre una perturbación fisiológica. El tracto gastrointestinal es el primer órgano del sistema que se ve afectado por la privación de nutrientes, y es el que más rápido sufre alteraciones debido a estos cambios en la captación de dichos nutrientes. Estos cambios alteran la estructura de la mucosa intestinal y su función, de tal manera que podría alterarse el procesamiento de la comida cuando se reanuda una alimentación normal (Ferraris y Carey, 2000).

Hay que distinguir entre ayuno, malnutrición y restricción de calorías. El ayuno es bastante común en personas que siguen determinadas prácticas religiosas y en poblaciones con sobrepeso. En personas sanas, el ayuno a corto plazo o la dieta es una opción para controlar el peso sin prácticamente efectos en el sistema gastrointestinal. Sin embargo, la privación crónica de nutrientes y la malnutrición son condiciones que afectan seriamente a muchos animales en la naturaleza, así como a poblaciones humanas en países subdesarrollados. Por otra parte, la restricción de calorías es un tema de elevado interés ya que se ha descrito que prolonga la vida media de un individuo (Weindruch, 1996), se utiliza como tratamiento para la obesidad (Dyer, 1994), y para el tratamiento y cuidado de la diabetes no insulino dependiente (Wing, 1993).

4.2.1. Efectos del ayuno y la malnutrición en la mucosa intestinal

Algunos estudios han demostrado que, tras ayunos de 24 horas o más, se produce una disminución significativa de la masa de la mucosa y del área total de la superficie intestinal, principalmente a nivel de las vellosidades (Mayhew, 1990). Las dimensiones de las vellosidades disminuyen con el ayuno debido a una reducción significativa en el número de células a lo largo del eje cripta-vellosidad (Raul y von der Decken, 1985). Esta disminución del número de células probablemente es debido a la disminución de la proliferación celular y de las tasas de migración a lo largo de dicho eje (Goodlad y cols., 1988; Holt y cols., 1986; Yamauchi y cols., 1996), así como al incremento en las tasas de pérdida celular y apoptosis (Boza y cols., 1999).

Con la malnutrición, el efecto de un aporte inadecuado de proteínas sobre la estructura de la mucosa intestinal es similar al del ayuno. Las dimensiones de las vellosidades también decrecen debido a la disminución de la proliferación celular enterocitaria y la tasa de migración a lo largo del eje cripta-vellosidad (Butzner y Gall, 1988). Además, otros estudios han mostrado que ciertos tipos de malnutrición también producen cambios en la composición de colesterol y

fosfolípidos de la membrana apical enterocitaria, elevando además la proporción entre lípidos y proteínas (Butzner y cols., 1990), y modificando con ello la fluidez y las propiedades absortivas del epitelio enterocitario.

Los cambios anatómicos de la estructura intestinal derivados del ayuno y la malnutrición, a menudo dan lugar a alteraciones en el transporte de iones y nutrientes.

A diferencia del ayuno y la malnutrición, la restricción crónica de calorías conlleva una disminución del peso corporal sin afectar la estructura intestinal, no modificándose ni las dimensiones, ni la masa de las vellosidades (Casirola y cols., 1997).

4.2.2. Efectos del ayuno y la malnutrición en el transporte intestinal de azúcares

Los cambios inducidos por el ayuno y la malnutrición pueden estar involucrados en la alteración de los mecanismos no específicos durante la absorción intestinal de nutrientes. Dentro de estos mecanismos no específicos estaría incluida la reducción de la superficie del área de la mucosa (Diamond y cols., 1984), un incremento en el gradiente electroquímico para el sodio (Debnam y Thompson, 1984) y cambios en la composición de lípidos de la membrana plasmática que alteran la fluidez de dicha membrana (Butzner y cols., 1990; Gupta y Waheed, 1992). Estas alteraciones en la composición de la membrana y su fluidez deberían alterar el número de transportadores encargados de la absorción de nutrientes. Dentro de los mecanismos específicos en el transporte intestinal de azúcares, el incremento de la densidad de estos transportadores hace que aumente las tasas de transporte de sus sustratos (Ferraris y Diamond, 1997). Parece ser que este aumento observado durante el ayuno se debe a señales que actúan sobre elementos promotores y así regulan la expresión de determinados genes involucrados en la absorción de nutrientes (Hodin y cols., 1995), o bien podría deberse a la síntesis de nuevos tipos de transportadores (Brot-Laroche y cols., 1988).

Paradójicamente, muchos estudios muestran un incremento en el transporte de glucosa en la membrana borde cepillo por miligramo de intestino independientemente de la disminución de la masa de la mucosa (Brot-Laroche y cols., 1988; Carey y cols., 1994; Debnam y Thompson, 1984; Gupta y Waheed 1992; Marciani y cols., 1987; Young y cols., 1989). Estos trabajos indican que las tasas de transporte podrían aumentar incluso cuando las concentraciones de azúcar en el lumen son muy bajas. Ante la pregunta de qué es lo que puede regular de manera favorable el transporte de azúcares durante el ayuno, hay estudios que muestran que puede ser debido a la hiperpolarización del potencial de membrana relacionada con el ayuno y la malnutrición (Debnam y Thompson, 1984) y/o la disminución de la concentración de sodio intracelular que aumentaría la fuerza que conduce el transporte de glucosa acoplado al sodio (Butzner y Gall, 1988; Butzner y cols., 1990; Carey y cols., 1994; Debnam y Thompson, 1984; Young y cols., 1989). Sin embargo, otros estudios no apoyan esta hipótesis al no detectar diferencias ni el potencial de membrana ni en la concentración de sodio intracelular relacionados con el ayuno (Marciani y cols., 1987; Muniz y cols., 1993). Además, el transporte sodio independiente también aumenta marcadamente con el ayuno, y estas observaciones no se pueden explicar mediante la hipótesis de hiperpolarización.

Existen muchos estudios que señalan que la expresión de los transportadores de azúcares depende en gran medida de señales captadas por “sensores”, fundamentalmente la propia presencia de azúcares en la luz intestinal. Realmente, la cantidad de transportadores de glucosa en el intestino aumenta con los niveles de carbohidratos ingeridos en la dieta (Ferraris y Diamond., 1997). Debido a que hay muy poca glucosa en el lumen intestinal durante el periodo de inanición, no existe ninguna señal para mantener un elevado número de transportadores, y en consecuencia la absorción de glucosa intestinal en teoría debería disminuir durante este periodo.

Por tanto, el ayuno y la malnutrición disminuyen la concentración de azúcares en lumen intestinal, de modo que se elimina la señal que regula favorablemente el transporte de azúcares en animales bien alimentados. Pero paradójicamente, el transporte intestinal de azúcares por miligramo de intestino aumenta con el ayuno, y este hecho no se puede explicar ni por la ausencia de azúcares en el lumen, ni por la pérdida de masa de la mucosa. De modo que es posible que el ayuno pueda conducir a un aumento directo de la expresión génica de las proteínas transportadoras, y con ello, aumentar su actividad (Ferraris y Carey, 2000). Pero los mecanismos que regulan este proceso todavía se desconocen.

4.3. Alteraciones en la absorción intestinal de azúcares en estados de diabetes

El control de los niveles de glucosa en sangre requiere de una función perfectamente integrada de varios órganos: hígado, músculo, tejido adiposo, el páncreas endocrino y regiones específicas del cerebro. Desórdenes en algunos de estos órganos puede conducir al desarrollo de diversas fisiopatologías.

La diabetes de tipo II se caracteriza principalmente por dos defectos fisiológicos: un relativo decrecimiento de la acción de la insulina sobre sus órganos diana (hígado, músculo y adipocitos), y un defecto en la secreción de insulina por las células β pancreáticas en respuesta a la elevada concentración de glucosa en sangre.

La prevalencia de la diabetes de tipo II, que a menudo es seguida de obesidad, cada vez es mayor. A nivel mundial su incidencia es aproximadamente de un 5%, y se estima que en los próximos 10 años habrá aumentado a un 40% y afectando a unos 220 millones de personas (Zimmet y cols., 2001). La diabetes de tipo II genera el desarrollo de diversas complicaciones a largo plazo como pérdida de visión, fallos renales, daños nerviosos y alteraciones en el corazón, por eso tiene un gran impacto en cuanto a la calidad y la expectativa de vida. Desgraciadamente, la carencia de herramientas moleculares y la escasez de potentes dianas terapéuticas, hace que esta patología no pueda ser tratada adecuadamente.

Este tipo de diabetes no insulino dependiente es típica en poblaciones que consumen dietas hipercalóricas en exceso. En estas dietas, la glucosa representa un elevado porcentaje, lo cual puede contribuir al aumento de la resistencia a la insulina observado en estas poblaciones

(Shafir, 1991). Una estrategia para disminuir los niveles de glucosa en sangre y con ello reducir las complicaciones derivadas de la diabetes, sería la disminución de la entrada de carbohidratos al organismo y/o el uso de agentes hipoglucémicos.

La diabetes insulino dependiente (diabetes de tipo I), debida a una deficiencia de secreción de insulina, es otra condición que altera el transporte de glucosa intestinal, así como otros procesos digestivos y nutricionales. Aparte de provocar una hipertrofia en regiones específicas de la mucosa, se alteran las hidrolasas y la absorción de agua, electrolitos y nutrientes (Burant y cols., 1994).

El transporte de azúcares en estado de diabetes ha sido ampliamente estudiado en ratas a los que se les ha inducido este estado mediante tratamiento con estreptozotocina (STZ). Estos estudios con ratas muestran que la diabetes está asociada con una hipertrofia de la vellosidad de la parte proximal del intestino delgado (Schedl y Wilson, 1971) y un incremento del transporte de glucosa (Debnam y cols., 1990) sobretodo a nivel de la vellosidad inferior y la cripta.

Se ha observado que en ratas con diabetes crónica se produce una hiperplasia de la mucosa aumentando el tamaño de las vellosidades (Debnam y cols., 1995; Dudeja y cols., 1990; Fedorak y cols., 1991; Lorenz-Meyer y cols., 1977). Esta hiperplasia de la mucosa podría aumentar, por sí misma, la absorción de glucosa sin ningún cambio en las propiedades absorptivas intestinales (Lorenz-Meyer y cols., 1977) debido al aumento de la superficie, sin embargo, los estudios de Fedorak y cols. (1991), detectaron que la diabetes producía un incremento del número de transportadores por célula.

Además del incremento de la actividad transportadora en la membrana apical también se ha observado cambios en el transporte de glucosa en la membrana basolateral tanto en yeyuno (Debnam y cols., 1990), como en ileon (Debnam y Chowrimootoo, 1992) de ratas diabéticas. Por tanto, se puede decir que el incremento del flujo de glucosa a través de los enterocitos en animales con diabetes inducida por estreptozotocina se debe al aumento de la expresión de SGLT1 en la membrana apical y a la expresión de GLUT2 en la membrana basolateral.

No se conoce mucho acerca de los cambios en el transporte de fructosa en estados experimentales de diabetes, pero los estudios realizados por Burant y cols. (1994) apuntan que igual que ocurre con la glucosa, la absorción de fructosa debería estar incrementada en la diabetes insulino dependiente. Este trabajo muestra que, en ratas, el aumento de las proteínas transportadoras de hexosas, después de una diabetes inducida con STZ se debe aparentemente al aumento de sus niveles de ARNm en los enterocitos dentro del eje cripta-vellosidad, donde normalmente se expresan esos transportadores. Además, la diabetes parece que cambia el patrón de expresión de esos genes empezando a aparecer en las células relativamente más inmaduras.

Este incremento de los niveles de proteínas transportadoras en el intestino delgado en respuesta a la diabetes insulino dependiente es contrario a lo que ocurre en tejido adiposo y músculo, donde se observa una disminución de los niveles de ARNm y proteína GLUT4 después

de inducir el estado diabético (Kahn y cols., 1989; Kahn y cols., 1991). Por otra parte, los niveles de ARNm y proteína GLUT2 en el hígado no cambian (Thorens y cols., 1990), o existe una respuesta bifásica a la diabetes inducida con STZ (Burcelin y cols., 1992).

Por otra parte, el incremento de la capacidad absorbente del intestino delgado junto a una hiperfagia asociada a una diabetes incontrolada puede conducir a una hiperglucemia exarcebada que es observada en estas condiciones.

En humanos, los estudios realizados por Dyer y colaboradores (2002) muestran que en pacientes con diabetes de tipo II hay un aumento en la expresión de ARNm de SGLT1, GLUT5 y GLUT2 que coinciden con el aumento observado en los niveles de proteínas de estos transportadores en ratas (Burant y cols., 1994).

5. ANTECEDENTES DEL TRANSPORTADOR DE GLUCOSA GLUT8

El gen GLUT8 fue clonado de manera independiente por tres grupos diferentes (Ibberson y cols., 2000; Doege y cols., 2000b; Carayannopoulos y cols., 2000). Cada uno de estos grupos ha estudiado diferentes aspectos del transportador de glucosa GLUT8, entre los que se encuentran la estructura y morfología de la proteína, su localización celular, la distribución tisular y su posible papel fisiológico.

5.1. Estructura y morfología de GLUT8

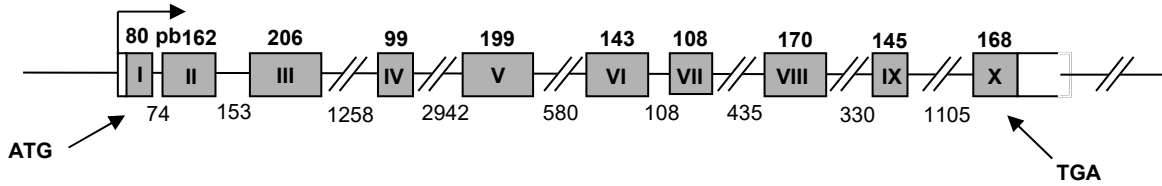
El gen GLUT8 de ratón y humano son idénticos en cuanto al número de exones y su tamaño, y muy similares en cuanto al tamaño de los intrones (Scheepers y cols., 2001). La extensión del gen GLUT8 es de aproximadamente 9 Kb (Figura I.11). Si se eliminan las secuencias intrónicas obtenemos una secuencia compuesta por 10 exones.

En cuanto a la estructura y la morfología de la proteína GLUT8 (Figura I.12), los tres grupos coinciden en que la secuencia de aminoácidos humana y de ratón son idénticas en un 86,2 % y que ambas constituyen una proteína de 477 aminoácidos. Esta secuencia comprende 12 hélices transmembrana y varios motivos conservados dentro de la familia GLUT que son esenciales para la actividad transportadora de azúcares. En particular los motivos GRK en el bucle 2, PETPR en el bucle 6, QQLSGVN en la hélice 7, DRAGR en el bucle 8, GWGPIPW en la hélice 10, y PETKG en la cola terminal (Figura I.12).

Además, conserva residuos de triptófano (Trp³⁸⁸ y Trp⁴¹²) presentes en GLUT1 y que están implicados en la unión del inhibidor de transporte citocalasina B. Sin embargo, GLUT8 presenta otras características estructurales que lo diferencian de otros miembros de la familia GLUT, ya que el bucle 1 es mucho más corto y no está glucosilado. En su lugar, la glucosilación se encuentra localizada en el bucle 9, al igual que GLUT 6, GLUT 10 y GLUT12, todos ellos pertenecientes a la clase III. Además posee un dominio C-terminal considerablemente corto en comparación con otros GLUTs.

Se puede decir que la proteína GLUT8 comparte la estructura general de los transportadores facilitadores de glucosa que componen la familia GLUT y contiene en su secuencia motivos conservados propios de un transportador de glucosa. Sin embargo, muestra características estructurales que lo distinguen, y su secuencia de aminoácidos presenta gran homología con transportadores de azúcares de plantas y bacterias. Por estas razones, GLUT8 ha sido englobado dentro de la clase III junto con otros transportadores que poseen características similares (Joost y Thorens, 2001).

GLUT8 de ratón



GLUT8 humano

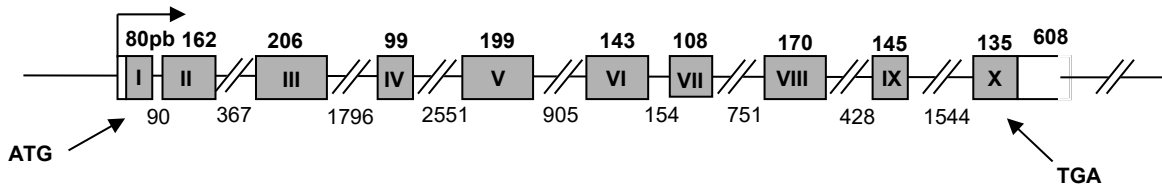


Figura I.11. Organización exónica - intrónica del gen GLUT8 de ratón y humano (según Scheepers y cols., 2001).

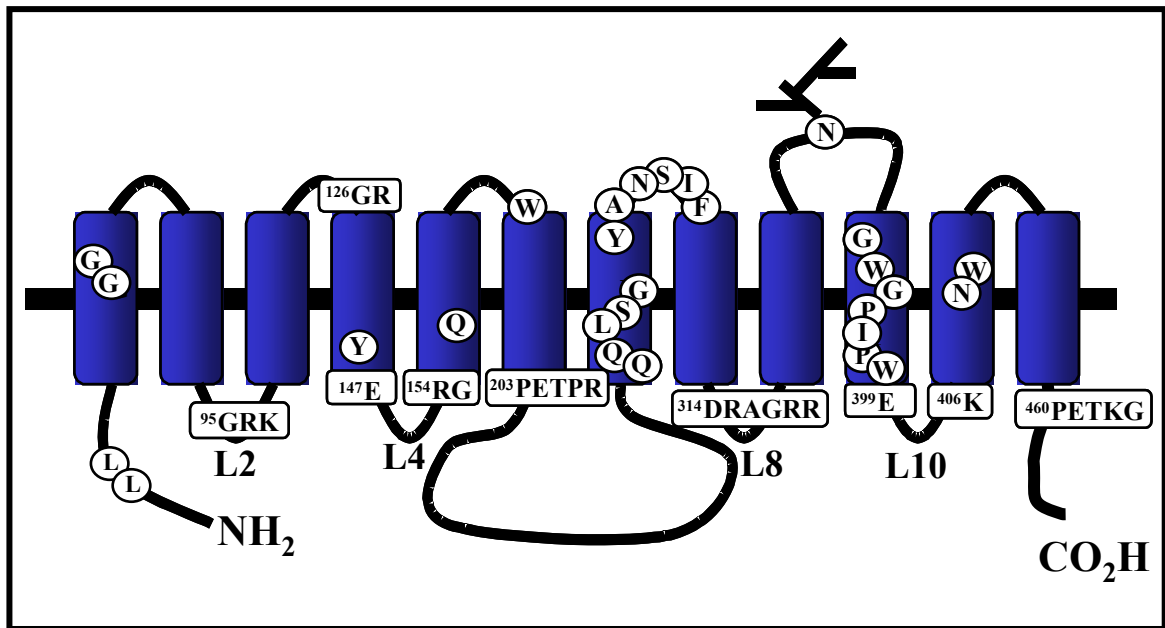


Figura I.12. Estructura de GLUT8 basada en predicciones estructurales obtenidas con el programa HELIXMEM (según Doege y cols., 2000b). GLUT8 tiene 12 hélices transmembrana, un motivo GRR/K en los bucles 2 y 8, residuos de glutamato y arginina en los bucles 4 y 10, los motivos PESPR y PETKG después de las hélices transmembrana 6 y 12. Características diferenciales: la glicosilación en el bucle 9, y posee un motivo dileucina en la región amino-terminal implicado en su internalización.

5.2. Expresión de GLUT8 en los diferentes tejidos

La distribución tisular se ha estudiado mediante análisis por northern blot a partir de ARN total procedente de tejido adulto de rata (Ibberson y cols., 2000), de diferentes tejidos humanos (Doege y cols., 2000b) y tejido fetal y adulto de ratón (Carayannopoulos y cols., 2000).

En todos estos estudios el ARNm de GLUT8 aparece como una banda de 2,1 Kb aproximadamente. Su mayor expresión se encuentra en testículo pero también se expresa de manera moderada en muy diversos tejidos como bazo, próstata, intestino delgado, corazón, cerebro y músculo esquelético (Doege y cols., 2000b), así como en la glándula adrenal, hígado, tejido adiposo, riñón y estómago (Ibberson y cols., 2000). También existe una fuerte expresión en placenta y en el estado embrionario de blastocisto (Carayannopoulos y cols., 2000).

En la mayoría de los estudios realizados para detectar la proteína se utiliza un anticuerpo que reconoce la parte C-terminal de GLUT8 (Doege y cols., 2000b; Carayannopoulos y cols., 2000; Ibberson y cols., 2000; Reagan y cols., 2001) por ser una de las regiones más específicas a la hora de diferenciar los transportadores de la familia GLUT, pero algunos autores, además, también utilizan un anticuerpo dirigido contra una región del bucle citoplásmico que corresponde a los aminoácidos 203-257 (Ibberson y cols., 2000).

En cuanto a la detección de la proteína GLUT8 existe discrepancia de autores sobre su tamaño. Mientras Doege y cols., (2000b) hablan de una proteína de 42 kDa detectada con un anticuerpo contra la parte C-terminal, otros autores describen una proteína de tamaño entre 38 y 47 kDa apareciendo como una banda difusa en células Cos-7 transfectadas, y una banda de aproximadamente 37 kD en tejido de ratón (Carayannopoulos y cols., 2000). Por otra parte, Ibberson y cols. (2000) empleando en sus estudios dos anticuerpos diferentes: uno dirigido contra la parte media del bucle intracelular central (aminoácidos 203-257) y otro contra la cola C-terminal de la proteína, detectaron a partir de fracciones de membranas de células HEK293T transfectadas con GLUT8 una banda difusa entre 37 y 50 kDa. Pero que después de deglucosilar las muestras con PNGaseF, la señal se convertía en una banda definida de 35 kDa.

5.3. Localización celular de GLUT8

Los estudios sobre la localización celular de GLUT8 apuntan a que GLUT8 se localiza intracelularmente, pero que bajo ciertos estímulos podría alcanzar la membrana plasmática.

Estudios basados en la transfección del ADNc de GLUT8 en células HEK293T demostraron que existe una fuerte señal intracelular que mantiene internalizado a GLUT8. Esta señal es un doble motivo dileucina en la cola amino terminal de la proteína, que si era mutado por dos motivos alanina, la proteína aparecía en la membrana plasmática (Ibberson y cols., 2000).

Carayannopoulos y sus cols. (2000) mediante inmunofluorescencia detectaron la proteína en compartimentos o vesículas intracelulares en blastocistos de ratón en un estado basal. Sin embargo, ante la presencia de insulina, la distribución celular de GLUT8 cambiaba apareciendo la proteína en la membrana plasmática. Otros estudios inmunohistoquímicos en ratas (Reagan y cols., 2001) sugieren también que la proteína GLUT8 está localizada en compartimentos citoplásmicos y que estaría asociado a orgánulos intracelulares aunque no descartan la posibilidad de que pueda translocarse a la membrana plasmática. En estados de diabetes se ha observado la translocación de GLUT8 desde las LDM (vesículas de baja densidad) hasta las HDM (vesículas de alta densidad) del retículo endoplásmico de células de hipocampo de rata, indicando así que GLUT8 participa activamente en el mantenimiento de la homeostasis metabólica hipocampal en el retículo endoplásmico y no en la membrana plasmática (Piroli y cols., 2002). Parece ser, entonces, que el papel de GLUT8 no está directamente asociado a la membrana plasmática, y que sólo se asocia a ella cuando los mecanismos de tráfico intracelular se ven interrumpidos o cuando se muta el motivo dileucina que constituye una señal de internalización.

En el hígado de ratón, estudios de inmunofluorescencia han demostrado altos niveles de expresión de GLUT8 en los hepatocitos que se encuentran en la periferia de las venas. La señal indica una localización perinuclear dentro de la célula, pero tampoco descartan la presencia de GLUT8 cerca de la membrana plasmática (Gorovits y cols., 2003).

Aún conociendo que el estímulo que media la translocación celular y/o subcelular podría ser de tipo hormonal, donde la insulina parece que juega un papel fundamental, el mecanismo que acompaña dicha translocación no se conoce muy bien.

5.4. Función de GLUT8

Estudios previos han demostrado que GLUT8 es un transportador de glucosa. Su actividad transportadora se ha estudiado mediante su expresión en ovocitos de *Xenopus leavis* tras la inyección de ARNc de GLUT8 de rata (Ibberson y cols., 2000), y en liposomas de lecitina donde se incorporaron proteínas de GLUT8 purificadas a partir de membranas celulares de células Cos-7 previamente transfectadas con el ADNc de GLUT8 (Doege y cols., 2000b).

En mamíferos, GLUT8 parece estar involucrado en un mecanismo adicional de transporte de glucosa dentro del blastocisto de ratones con la finalidad de maximizar el uso de glucosa en un momento crítico del desarrollo donde la demanda energética del embrión es muy elevada (Carayannopoulos y cols., 2000). El estado de blastocisto marca un nuevo pico en la proliferación celular, ya que se forma la primera línea epitelial, el trofoectodermo. Estos cambios crean nuevas demandas de energía en el embrión y GLUT8 es expresado en este estado para cubrir dichas demandas, dado que la única fuente de energía es la conversión de glucosa a lactato (vía anaerobia), hasta que se produce su implantación.

En tejidos adultos, el hecho de que GLUT8 se exprese mayoritariamente en testículo parece indicar que tiene una función específica en este órgano, de modo que GLUT8 podría estar involucrado en el aprovisionamiento de glucosa requerido para la síntesis de ADN en las células germinales masculinas (Doege y cols., 2000b). De hecho, se ha estudiado la expresión de GLUT8 en ratones pre-púberes, pubertales y adultos. En pre-púberes no existe expresión de GLUT8 o es muy baja, sugiriendo que su expresión depende de las gonadotropinas y está asociada a las células germinales masculinas (Scheepers y cols., 2001). Mientras unos autores confinan la expresión de GLUT8 en un estado específico dentro del proceso de espermatogénesis (Ibberson y cols., 2002), otros estudios han localizado a GLUT8 específicamente en la cabeza del espermatozoide de ratón y humano (Schürmann y cols., 2002). Por otra parte, se sabe que el mayor aporte de azúcares en espermatozoides es a través de GLUT5 que transporta fructosa, de modo que no se descarta que el metabolismo de azúcares en el espermatozoide esté compartimentalizado, donde GLUT5 se situaría en la cola de los espermatozoides y transportaría fructosa (Angulo y cols., 1998); mientras que GLUT8 se situaría en la región acrosomal para transportar glucosa (Schürmann y cols., 2002).

En cerebro de rata la expresión de GLUT8 puede estar relacionada con mecanismos sensibles a la glucosa. Estudios en ratas demuestran que GLUT8 es un transportador de glucosa específico que se encarga de satisfacer las demandas de glucosa a los cuerpos neuronales del hipocampo en momentos de alta actividad neuronal como puede ser el estrés o el estado de diabetes. De hecho, se ha observado que la expresión de GLUT8 está regulada de manera positiva en el hipocampo de ratas tratadas con STZ, posiblemente para compensar la disminución del transporte de glucosa en los estados de diabetes (Reagan y cols., 2001).

Debido a que la actividad transportadora de GLUT8, según autores, reside en el retículo endoplásmico, su función debería ser transportar la glucosa liberada de los oligosacáridos durante los procesos de glucosilación/deglucosilación (Piroli y cols., 2002).

Otros estudios en hígado de ratón indican que la expresión de GLUT8 varía dependiendo de su estado de desarrollo prenatal y postnatal (Gorovits y cols., 2003). Además, en estados diabéticos, los niveles de ARNm de GLUT8 están correlacionados con la cantidad de insulina circulante: en diabetes de tipo I (ratones tratados con STZ) disminuye la expresión, mientras que en diabetes de tipo 2 (ratones heterocigotos para GLUT4) aumenta su expresión, sugiriendo que la insulina regula la expresión de GLUT8, en relación con la homeostasis de la glucosa.

Por lo tanto, la función celular de este transportador de glucosa parece estar sujeta a su localización tisular y celular.

II. OBJETIVOS

En los mamíferos, una de las funciones primordiales del intestino es la absorción de nutrientes y su transporte hasta el torrente sanguíneo para ser distribuidos por todo el organismo. Dentro de los nutrientes, los hidratos de carbono suponen un gran porcentaje, y entre ellos, hay que destacar la glucosa por su importancia como fuente energética para todos los tejidos del organismo.

Numerosos estudios, fundamentalmente durante las dos últimas décadas, han puesto de manifiesto los mecanismos moleculares implicados en la absorción intestinal de azúcares. Por otro lado, muy recientemente, la clonación e identificación de nuevos transportadores de glucosa, han abierto numerosas perspectivas en el estudio y conocimiento del paso de glucosa a través de la membrana plasmática.

En el año 2000, cuando GLUT8 fue clonado por tres grupos de investigación distintos, nos planteamos el inicio de este trabajo basándonos en los primeros trabajos que apuntaban que GLUT8 era un nuevo transportador de glucosa que se expresaba en diferentes tejidos adultos.

En función de lo expuesto anteriormente nos planteamos los siguientes objetivos:

- 1.- Estudiar la expresión de GLUT8 en el intestino de ratón, tanto a nivel de ARNm, como a nivel de proteína. De esta manera quisimos conocer si este transportador podría estar o no implicado en la absorción intestinal. Además, como se conoce que bajo determinadas condiciones fisiopatológicas existe una regulación del transporte de glucosa intestinal, también quisimos conocer si la expresión de GLUT8 es modulada por la diabetes y/o el ayuno en el intestino de ratones.
- 2.- Algunos de los nuevos transportadores de glucosa recientemente clonados presentan variantes transcripcionales. Los primeros estudios con GLUT8 realizados en nuestro laboratorio detectaron la existencia de diferentes transcritos. Por lo tanto, nuestro segundo objetivo ha sido el estudio y análisis de posibles formas alternativas en la expresión de GLUT8 y el estudio de su posible función.
- 3.- Finalmente, nuestro tercer objetivo ha sido comparar la expresión de GLUT8 en intestino de ratón con su expresión en humano, utilizando para ello la línea celular Caco-2.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MODELOS EXPERIMENTALES

En este trabajo se han empleado dos modelos experimentales sobre los que se han realizado diferentes experimentos para estudiar la expresión y regulación de GLUT8 en intestino.

1.1. Animales

Se utilizaron ratones adultos Balb/cAnNHsd no consanguíneos (Harlan Interfauna Ibérica S.L., Barcelona) adquiridos con aproximadamente 30 gr. de peso y una edad entre 7-8 semanas. Estos animales fueron sometidos a un periodo de adaptación al animalario donde se mantuvieron con libre acceso al agua y fueron alimentados con pienso completo para ratones (Harlan Interfauna Ibérica S.L., Barcelona) *ad libitum* bajo condiciones controladas de temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), humedad (40-45 %) y fotoperiodo de 12 horas (luz de 7:30 horas a 19:30 horas).

Las instalaciones, el manejo, cuidado y sacrificio de los animales se realizó de acuerdo con la legislación vigente en materia de protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos que se contempla en el Real Decreto 223/1988 de 14 de marzo, y la Transposición de la Directiva Comunitaria 86/609/CEE acordada en Estrasburgo.

1.1.1. Estudio de la expresión de GLUT8 en el intestino de ratón

Para el estudio de la expresión de GLUT8, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y las muestras procesadas rápidamente para evitar su deterioro. Los diferentes tejidos fueron congelados inmediatamente después de su extracción, y almacenados en nitrógeno líquido hasta su posterior utilización.

La extracción de los diferentes tejidos fue realizada sin previo ayuno de los animales para evitar posibles alteraciones en la expresión de los transportadores encargados de la absorción de nutrientes a nivel intestinal, dado que la regulación de la expresión de dichos transportadores puede variar en función de la cantidad de nutrientes presentes en el lumen intestinal (Ferraris y Carey, 2000).

A partir de estos animales se obtuvieron muestras de intestino grueso (colon) y delgado separando, en este caso, las diferentes fracciones de duodeno, yeyuno e ileon. Para analizar con más detalle la expresión de GLUT8 en el intestino delgado, en cada uno de los segmentos intestinales se realizó un raspado de la capa mucosa para aislar las correspondientes células epiteliales del resto de las capas de la pared intestinal. También se extrajeron muestras de testículo y cerebro para utilizarlos como control ya que en estos tejidos la expresión de GLUT8 es bien conocida.

1.1.2. Estudio de la regulación de GLUT8 bajo diferentes condiciones fisiopatológicas

Para estudiar si la expresión de GLUT8 en el intestino delgado pudiera estar regulada de manera diferente bajo determinadas condiciones fisiopatológicas como el ayuno y la diabetes, utilizamos ratones adultos Balb/cAnNHsd de 8 semanas de edad mantenidos bajo las mismas condiciones descritas en el apartado anterior. Estos ratones fueron divididos en tres grupos de 5 individuos cada uno:

ANIMALES CONTROL (grupo 1)

Se les administró tampón citrato (3 μ l por gramo de peso), mediante inyección subcutánea, el mismo día que fue tratado el grupo de animales diabéticos (grupo 2). Posteriormente fueron mantenidos en condiciones estándar hasta el momento del sacrificio, que se produjo a los 5 días post-tratamiento.

ANIMALES DIABÉTICOS (grupo 2)

A este grupo se les indujo un estado de diabetes mediante tratamiento con aloxana. El tratamiento consistió en una única dosis con inyección subcutánea de aloxana de 200 mg aloxana/Kg peso (66 mg/ml en tampón citrato fosfato 0,1 M, pH 4,5) inyectando 3 μ l de la solución por gramo de peso (Hermenegildo y cols., 1993). Para comprobar el estado diabético de los ratones se controlaron los niveles de glucosa en sangre el segundo día tras el tratamiento y el quinto día justo antes de ser sacrificados. La sangre se extrajo de la cola con la ayuda de un microcapilar heparinizado y la cuantificación de los niveles de glucemia se realizó utilizando un kit de Glucosa Oxidasa/Peroxidasa (BioSystems) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tanto en los animales control como los diabéticos, la obtención de muestras de los diferentes tejidos tras el sacrificio se realizó sin previo ayuno de los ratones.

ANIMALES AYUNADOS (grupo 3)

Este grupo de ratones fueron ayunados 24 horas antes del sacrificio y la obtención de muestras, manteniéndoles siempre con libre acceso al agua.

1.2. Cultivos celulares

Toda la manipulación de los cultivos celulares fue realizada en atmósfera estéril en una campana de flujo laminar de nivel II HERA safe (Kendro Laboratory Products). La incubación de las células se hizo en un incubador modelo HERA cell (Kendro Laboratory Products).

Todos los medios, antibióticos y suplementos utilizados en el cultivo de esta línea celular proceden de Invitrogen-GibcoBRL.

1.2.1. Cultivo de células Caco-2

Debido a la dificultad de estudiar el transportador GLUT8 en intestino humano, se utilizó, en su lugar, la línea celular humana Caco-2 como modelo experimental *in vitro*.

Esta línea celular fue establecida en 1974 a partir de adenocarcinoma de colon humano (Fogh y cols., 1975), y sus características morfológicas y funcionales fueron establecidas a partir de 1983 (Pinto y cols., 1983). Esta línea celular es la única capaz de desarrollar, de forma espontánea, una diferenciación morfológica y funcional enterocitaria en las condiciones estándar de cultivo. Las células son indiferenciadas durante toda la fase de crecimiento exponencial, es decir, durante la fase de multiplicación celular. Su diferenciación sólo ocurre tras alcanzar la confluencia celular, durante la fase estacionaria de cultivo. Las células Caco-2 diferenciadas forman una monocapa de células polarizadas, que presentan un borde en cepillo apical, con microvellosidades, separado del dominio basolateral por uniones estrechas. Estas células expresan las típicas hidrolasas intestinales y transportadores de hexosas asociados a la función normal del enterocito. Éstas y otras observaciones realizadas sobre esta línea celular resaltan el interés de las células Caco-2 como modelo de estudio del funcionamiento de la célula enterocitaria, a pesar de su origen cólico (Zweibaum, 1991).

La línea celular se obtuvo del laboratorio de la Dra. Brot-Laroche de la U-505 del INSERM (París). Las células Caco-2 fueron cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) que contenía 25 mM de glucosa y que fue completado con un 20% de suero fetal bovino (SFB) (previamente descomplementado durante 30 minutos a 56°C), 100 unidades/ml de Penicilina y 100 µg/ml de Streptomycin, 1% aminoácidos no esenciales (AANE) y 20 mM de L-Glutamina (Invitrogen). El cultivo fue realizado a una temperatura de 37°C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂.

La tripsinización de las células se realizaba cada 6-7 días, cuando las células ocupaban un 80-90 % de la superficie de su soporte de cultivo, es decir, antes de la confluencia. Las células fueron sembradas a una densidad de $1,2 \times 10^4$ células/cm². El medio de cultivo (0,2 ml/cm²) fue cambiado a las 48 horas de la siembra, y los días posteriores de forma diaria.

1.2.2. Cultivo y diferenciación de células 3T3-L1

Para estudiar la posible regulación de GLUT8 se utilizó la línea celular 3T3-L1, células fibroblásticas de ratón. Estas células en cultivo estándar son células indiferenciadas fibroblásticas, pero se les puede inducir un estado de diferenciación de tipo adipocitario si se modifican los componentes del medio de cultivo. Estas células han sido utilizadas por otros grupos de investigación que han demostrado, que la expresión del transportador GLUT8 se ve aumentada considerablemente después de su diferenciación (Scheepers y cols., 2001), convirtiéndose así, en un modelo experimental muy útil para realizar estudios de regulación de la expresión de la proteína.

Las células fueron cedidas por el laboratorio de la Dra. M^a Jesús Moreno del departamento de Fisiología y Nutrición, de la Universidad de Navarra.

Las células fueron cultivadas en las mismas condiciones ambientales que las células Caco-2. Sin embargo, la composición del medio de cultivo se fue cambiando en función de los diferentes estados de diferenciación (ver Tabla III.1).

Para el cultivo estándar de la línea 3T3-L1 en su estado indiferenciado, se utilizó el Medio 1 (medio de cultivo de células indiferenciadas). Con este medio se mantuvo la línea celular, que era tripsinizada cada 3-4 días, hasta un máximo de 10 pases, momento en el cual se realizaba la descongelación de un nuevo vial de células para iniciar un nuevo cultivo y, así, evitar la alteración de las características de la línea celular. Como en el caso de las células Caco-2, la densidad de siembra era siempre de $1,2 \times 10^4$ células/cm². Todos los experimentos de diferenciación y transfección se realizaron entre los pases 3 y 9 tras su descongelación.

Para inducir la diferenciación adipocitaria, las células fueron cultivadas en Medio 2 (medio de cultivo de diferenciación a células adiposas), siempre después de alcanzar la confluencia celular. En este medio eran mantenidas durante 72 horas, y una vez alcanzada la diferenciación, fueron cultivadas en el Medio 3 (medio de post-diferenciación) adicionado de insulina, durante 24 horas más. A las 96 horas de haber iniciado la diferenciación, las células ya podían ser cultivadas únicamente en el Medio 3 (figura III.1). En este estado diferenciado fue cuando se realizaron las transfecciones transitorias con diferentes ADNc (Moreno-Aliaga y cols., 1999; Moreno-Aliaga y cols., 2001).

Tabla III.1. Composición de los medios utilizados en el cultivo y diferenciación de las células 3T3-L1.

Medio 1	cultivo de células indiferenciadas (pre-adipocitos)	Medio DMEM (25 mM glucosa) 10% Suero de ternero 1% Penicilina-Streptomina
Medio 2	diferenciación a células adiposas	Medio DMEM (25 mM glucosa) 10% SFB 1% AANE 1% Penicilina-Streptomina 20 mM L-Glutamina 1 μ M Dexametasona 10 μ g/ml Insulina 0,5 mM IBMX (3-Isobutil-1-metilxantina)
Medio 3	cultivo de células en estado de postdiferenciación	Medio DMEM (25 mM glucosa) 10% SFB 1% AANE 1% Penicilina-Streptomina 20 mM L-Glutamina

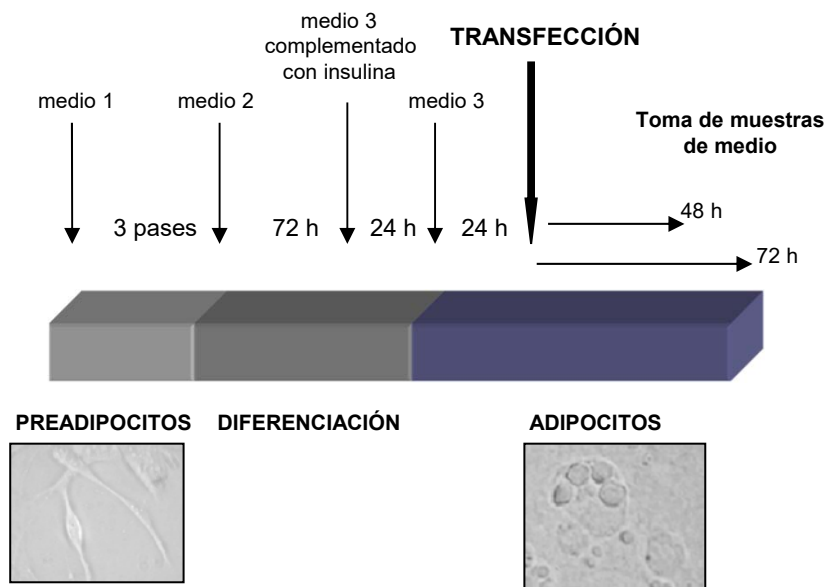


Figura III.1. Esquema del proceso de diferenciación de las células 3T3-L1.

1.2.2.1. Transfección transitoria de las células 3T3-L1

Para estudiar posibles cambios de la expresión de GLUT8, las células diferenciadas en adipocitos fueron transfectadas transitoriamente con diferentes ADNc correspondientes a varios transcritos, previamente clonados en nuestro estudio.

Las células 3T3-L1 fueron transfectadas de manera transitoria por el método del fosfato cálcico (Chen y Okayama, 1987) dos días después de que las células 3T3-L1 alcanzaran el estado de diferenciación adipocitaria. Las células fueron cultivadas en placas de 6 pocillos, mantenidas con 2 ml de medio de cultivo por pocillo. Para transfectarlas, primero se cambiaba el medio por 1,5 ml de medio nuevo, y eran otra vez introducidas en el incubador cambiando la concentración de CO₂ al 3.5%. Mientras tanto, se preparaba una mezcla con el ADN que queríamos introducir en las células con CaCl₂ 0,25 M y BBS 2X (50 mM BES, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄, ajustado a un pH 6,95 con NaOH), dejando la mezcla reposar 20 minutos a temperatura ambiente. La mezcla era preparada con las siguientes proporciones por pocillo: 3,5 µg de ADNc, 100 µl de CaCl₂, y 100 µl de BBS 2X. Después a cada pocillo se le añadía 150 µl de esta mezcla, de manera que cada pocillo era transfectado con aproximadamente 2,5 µg de ADN plasmídico, y se incubaban las células toda la noche a 37°C y 3,5 % de CO₂. Al día siguiente se eliminaba el medio y las células se lavaban 2 veces con 2 ml de PBS (Tampón Fosfato Salino, pH 7,4). Se añadía a continuación 2 ml de Medio 3 nuevo y las células se mantenían en cultivo durante 72 horas a 37°C y 5% de CO₂.

A las 72 horas después de la transfección, las células se lavaron 2 veces con PBS y fueron congeladas a -80°C hasta el momento de realizar la extracción del ARN total y las proteínas.

1.2.2.2. Consumo de glucosa en las células 3T3-L1

Para obtener información acerca de la cantidad de glucosa que era captada por las células cultivadas, después de la transfección se tomaron muestras de medio (150 µl) de cada uno de los pocillos a las 0 (medio de cultivo inicial), 48 y 72 horas (Figura III.1). La cantidad de glucosa se midió mediante espectrofotometría utilizando el kit Glucosa Oxidasa/Peroxidasa (BioSystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de glucosa se expresó en mg/dl.

2. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE ARNm GLUT8 EN INTESTINO

2.1. Aislamiento de ARN total a partir de tejidos animales

La obtención del ARN total a partir de las muestras de tejido homogenizado se realizó mediante el kit comercial Rneasy Mini Kit (Qiagen). Este sistema combina las propiedades de unión selectiva de la membrana silica-gel con la velocidad de centrifugación.

El tejido fue lisado y homogenizado en presencia de un tampón de lisis altamente desnaturante que inactiva inmediatamente las RNasas para asegurar el aislamiento del ARN intacto. El volumen de tampón utilizado fue de 600 μ l por cada 30 mg de tejido y a este tampón se le añadió β -mercaptoetanol (10 μ l por cada ml de tampón) para facilitar la lisis.

Las muestras fueron trituradas y lisadas en primer lugar con un Ultra-Turrax T25 basic (IKA LABORTECHNK) en presencia de tampón de lisis, y después fueron homogenizadas en una columna QIAshredder (Qiagen) mediante centrifugación.

A las muestras homogenizadas se les añadió etanol para conseguir unas condiciones apropiadas de unión a la membrana de la columna. Al pasarlas por la columna, el ARN total mayor de 200 pb queda unido a la membrana, y después de lavar los contaminantes eficientemente con tampón de lavado, se eluyó finalmente el ARN unido a la columna con agua libre de RNasas.

La comprobación de la calidad del ARN obtenido se realizó mediante migración electroforética en gel de agarosa 1%, y visualización en presencia de bromuro de etidio.

Para cuantificar el ARN se midió la absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro de luz ultravioleta modelo GENESYS 10 UV de la marca Thermo Spectronic. La concentración se calculó teniendo en cuenta la siguiente relación: 1 D.O. = 40 μ g ARN/ml.

En algunos casos, las muestras de ARN fueron tratadas con la enzima DNase I-RNase free (Roche) para eliminar posibles restos de ADN genómico durante la preparación del ARN.

2.2. Aislamiento de ARN total a partir de cultivos celulares

El procedimiento que se siguió fue exactamente el mismo que en la obtención de ARN total a partir de tejidos, excepto que en este caso, la homogenización se realizó directamente con una micropipeta utilizando 600 μ l de tampón de lisis (con β -mercaptoetanol) por pocillo.

2.3. Síntesis de la primera hebra ADNc a partir de ARN mediante Transcriptasa Inversa (RT).

Para la síntesis del ADNc se utilizó el kit “SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR” (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando un termociclador modelo GeneAmp®PCRSYSTEM2700 de la marca Applied Biosystems. El protocolo se resume en los siguientes 4 pasos:

1. Desnaturalización:

Preparación de la mezcla ARN/cebadores	1 µg ARN total (1 µg/µl)	1 µl
	10 mM dNTP's	1 µl
	Oligo (dT) (0.5 µg/µl)	1 µl
	Agua tratada con DEPC	7 µl



Incubación de la muestra a 65°C durante 5 min.



Dejar en hielo al menos 1 minuto.



2. Anillamiento:

Preparación de la mezcla de reacción	10X RT buffer	2 µl
	25 mM MgCl ₂	4 µl
	0,1 M DTT	2 µl
	RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor ...	1 µl



Añadir los 9 µl de mezcla de reacción a la mezcla ARN / oligo.



Incubación a 42°C durante 2 min.



3. Síntesis de ADNc: Añadir 1 µl (50 unidades) de SUPERSSCRIPT II RT.



Incubar a 42°C durante 50 minutos.



Terminar la reacción a 70°C durante 15 min

Enfriar en hielo.



4. Eliminación del ARN:

Añadir 1 µl de RNase H e incubar durante 20 minutos a 37°C antes de la amplificación de ADNc diana.

De esta manera se consigue una hebra de ADNc complementaria a la secuencia del ARNm. Las muestras de ADNc fueron conservadas a -20°C hasta su utilización. Cuando las muestras estaban destinadas a realizar un estudio cuantitativo de la expresión de GLUT8, el ADNc obtenido se purificaba antes de preparar la PCR cuantitativa con el objetivo de eliminar cualquier componente capaz de interferir durante la amplificación. Este proceso se llevó a cabo pasando la muestra de ADNc a través de una columna QIAquick PCR Purification kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La amplificación de la primera hebra de ADNc se realizó mediante la técnica PCR (reacción en cadena de la polimerasa) utilizando el termociclador GeneAmp®PCRSystem2700.

Esta técnica permite amplificar de forma exponencial un fragmento de ADN mediante dos cebadores que flanquean un fragmento seleccionado, aplicando repetidos ciclos de temperatura. Dichos ciclos permiten la desnaturalización del ADN, el anillamiento o unión de los cebadores y la extensión de los mismos por acción de una enzima DNA polimerasa termoestable en presencia de una mezcla de nucleótidos.

2.4.1. Estudio de la expresión de GLUT8 por RT-PCR

Partiendo de la secuencia conocida de nucleótidos del ARNm de GLUT8 humano (nº de acceso en GenBank: NM 014580) se diseñaron cebadores (Glut8/BamHI y Glut8/EcoRI) para amplificar la secuencia completa codificante en las células humanas Caco-2 (Tabla III.2).

También se diseñaron dos cebadores que amplificaban un fragmento interno de la secuencia de GLUT8 y que eran válidos tanto para humano como para ratón (HGLUT8-U Y HGLUT8-AS) (Tabla III.2).

Tabla III.2. Cebadores diseñados para amplificar GLUT8 humano a partir de la secuencia NM 014580.

Cebadores	Secuencia 5'→3'	Localización
Glut8/BamHI	CGGGATCCGACATGACGCCCGAGGACC	Exón I
Glut8/EcoRI	CGGATTCAGCTTGGAGTCACAGGCTTGC	Exón X
HGLUT8-U	ATCTCCGAAATCGCCTACCC	Exón IV
HGLUT8-AS	TTGGTGAGGACGACGATGCC	Exón IX

Conociendo la secuencia de nucleótidos del ARNm de GLUT8 de ratón (nº de acceso en GenBank: NM_019488), se diseñaron los cebadores adecuados para amplificar la secuencia entera de GLUT8 de ratón (1447 pb) (Tabla III.3).

Tabla III.3. Cebadores diseñados para amplificar GLUT8 de ratón a partir de la secuencia NM 019488.

Cebadores	Secuencia 5'→ 3'	Localización
MsG8Exon1-up	TGACATGTCTCCCGAGGACC	Exón I
MsG8Exon10-as	AAAGGGTCTGTCATCGTCC	Exón X

La enzima Taq Polimerasa empleada fue la Platinum® Taq DNA polymerase (Invitrogen) y la mezcla de reacción que permitía la amplificación de GLUT8 a partir de una cantidad inicial de 40 a 80 ng de ADNc se indica en el siguiente cuadro:

Tampón de reacción 10X	2,50 µl
Cl ₂ Mg 50 Mm	0,75 µl
dNTP's 10 mM	0,50 µl
Oligo sentido 10 µM	0,50 µl
Oligo antisentido 10 µM	0,50 µl
Taq Polimerasa (Platinum) 1U/µl	0,25 µl
Agua bidestilada estéril	19,00 µl
ADNc	1,00 µl
Volumen final	25,00 µl

Las condiciones habituales de amplificación consistieron en varios ciclos de temperatura que se describen en el siguiente esquema:

Primer ciclo inicial desnaturalización	35 ciclos de amplificación	Ultimo ciclo de elongación
3-5 min. a 94°C	30 seg. a 94°C (desnaturalización) 30 seg. a 55-64°C (anillamiento) 30 seg. a 72°C (elongación)	7 min. a 72°C

La temperatura de anillamiento variaba dentro de un rango determinado en función de la temperatura de fusión de los cebadores utilizados en cada amplificación. Esta temperatura también fue modificada en varios casos para aumentar o disminuir la especificidad de anillamiento de los cebadores al ADNc.

En la mayoría de los casos, los experimentos de amplificación por PCR fueron repetidos utilizando una polimerasa diferente, la Taq Polimerasa High Expand Fidelity (Roche) que presenta mayor fidelidad durante la amplificación.

Ambas enzimas polimerasas, tanto Platinum como High Expand Fidelity, son capaces de añadir una adenina a los extremos del producto de PCR, lo cual permitió clonar el producto de amplificación mediante el sistema de clonación TOPO-PCR.

2.5. Clonación de GLUT8 y los diferentes transcritos amplificados en el vector TOPO.

La clonación de fragmentos obtenidos por PCR se realizó utilizando el kit TOPO TA cloning (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Este sistema utiliza el vector pCR 2.1 TOPO[®] que, debido a que presenta en sus extremos 3' una timidina, puede ligar al azar, directamente los productos amplificados por PCR.

Una vez realizada la ligación del producto, el plásmido resultante fue mantenido y amplificado mediante transformación en bacterias competentes *Escherichia coli DH5 α* previamente preparadas para tal fin y almacenadas a -80°C (Figura III.2).

2.5.1. Preparación de células competentes por el método del Cl_2Mn

A partir de una placa con colonias aisladas de *E. coli DH5 α* se cultivó una colonia en 50 ml de medio Ty2X (16 gr de triptona, 10 gr de extracto de levadura, 5 gr de NaCl completando con agua hasta 1 litro y ajustando el pH a 7,0) durante toda la noche a 30°C en agitación. Al día siguiente, 4 ml de este cultivo primario fueron cultivados en 200 ml de medio Ty2X complementado con 0,2% de glucosa estéril, en agitación a 30°C hasta obtener una DO₆₀₀ entre 0,45 – 0,5 D.O. Las bacterias, se enfriaron rápidamente con hielo y se distribuyeron en tubos estériles de 50 ml para centrifugarlas a 3500 rpm durante 10 minutos a 4°C. El precipitado de bacterias se resuspendió en 100 ml totales de solución salina fría (100 mM CaCl₂, 70 mM MnCl₂, 40 mM acetato sódico, pH 5,2) y se mantuvo 45 minutos en hielo. Luego se centrifugaron a 3500 rpm durante 5 minutos a 4°C, y el precipitado celular se resuspendió en 10 ml de solución salina fría complementada con 2 ml de glicerol al 75%. Las bacterias bien resuspendidas y homogenizadas se repartieron en alícuotas de 200 μ l en tubos previamente enfriados, que fueron congelados inmediatamente en nitrógeno líquido, y almacenados a -80°C.

Para asegurarse de la eficiencia de las bacterias, antes de su uso, se realizaron dos tipos de controles. Por una parte, se transformaron con 1 ng de plásmido pBS y se crecieron en placas de LB-agar-Ampicilina a 37°C durante 12 horas para comprobar si crecían un número deseable de colonias (más de 10⁴ CFU/ng). Por otro lado, se hizo un control negativo donde bacterias no transformadas fueron sembradas en placas LB-agar-Ampicilina para asegurarse de que ninguna colonia era capaz de proliferar, ya que la resistencia a este antibiótico la proporciona el plásmido.

2.5.2. Transformación de *E. coli* DH5 α por choque térmico

Para transformar las bacterias con el plásmido correspondiente, éstas fueron descongeladas lentamente en hielo e incubadas con 2 μ l del producto de ligación TOPO-PCR durante 30 minutos en hielo. Después fueron sometidas a un choque térmico de 42°C durante 45 segundos, pasándolas rápidamente a hielo durante 2 minutos. A las células se les añadió 500 μ l de medio SOC (0,5% extracto de levadura, 2% triptona, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucosa) e incubadas durante 1 hora a 37°C en agitación. Finalmente, se sembraron 100 μ l de la suspensión bacteriana en placas LB-agar complementadas con ampicilina 100 μ g/ml, X-Gal e IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) y se incubaron a 37°C durante 16 horas.

El vector TOPO contiene integrado en su secuencia el gen Lac-Z justo en el sitio de inserción del fragmento. Este gen origina una sustancia que en presencia de X-Gal e IPTG en el medio reacciona produciendo coloración azul, de modo que las bacterias transformadas con plásmido vacío aparecerán de color azul, mientras que las bacterias que contengan plásmido ligado a un fragmento de ADN producto de PCR darán colonias blancas debido a que el gen Lac-Z queda inactivo.

Se escogió un determinado número de colonias blancas para purificar su ADN plasmídico y analizar el fragmento insertado. Para ello cada colonia fue cultivada en 3 ml de LB complementado con ampicilina durante 16 horas en agitación a 37°C (Figura III.2).

2.5.3. Purificación del ADN plasmídico

Para la identificación rutinaria de los ADNc clonados, la purificación del ADN plasmídico se realizó mediante el método clásico de lisis alcalina y separación con fenol/cloroformo a partir de 1 ml de cultivo bacteriano realizado. Sin embargo, el ADN plasmídico de aquellas muestras que querían ser secuenciadas se obtuvo mediante Gen EluteTMPlasmid Miniprep kit (Sigma), basado en el método de extracción por lisis alcalina de las bacterias, y donde el ADN plasmídico es retenido en una columna de sílica, siendo finalmente eluído con 80 μ l de tampón TE (10 mM Tris-HCl, pH 8, 0,1 mM EDTA) para conseguir una mejor calidad del ADN.

Para comprobar la incorporación del fragmento de PCR dentro del plásmido se realizó la digestión con la enzima de restricción Eco RI, que digiere el plásmido en las proximidades del lugar de ligación del vector con el producto de PCR, sin cortar en ningún otro lugar del plásmido ni

de la secuencia insertada (Figura III.2). El producto de digestión fue migrado electroforéticamente en gel de agarosa 1%, y visualizado con bromuro de etidio en una lámpara de rayos ultravioleta.

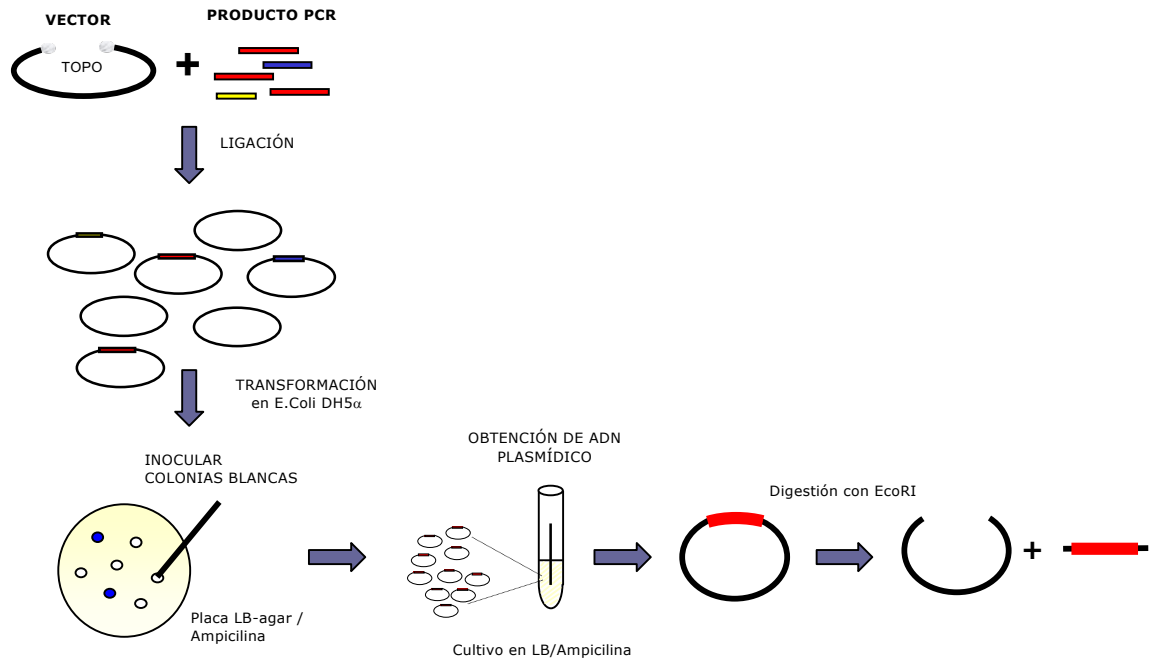


Figura III.2. Esquema del proceso de clonación del producto amplificado por PCR.

2.6. Subclonación de GLUT8 y de los diferentes transcritos en el plásmido de expresión eucariota pcDNA3.1 (+)

Los diferentes transcritos del gen GLUT8 se clonaron en el vector PCR 2.1 TOPO. Este plásmido es de expresión procariota por lo que para poder expresar GLUT8 y sus diferentes transcritos en células eucariotas como las 3T3-L1, era necesario utilizar un plásmido como el pcDNA 3.1 (+) (Invitrogen) cuyas características permiten que sea expresado dentro de un sistema de expresión eucariota.

Como paso previo a la subclonación se verificó la orientación de los fragmentos clonados en TOPO mediante secuenciación. Como resultado de estos experimentos se comprobó que las secuencias GLUT8 y SP3 estaban ligadas en la correcta orientación, es decir, con el "atg" de inicio de la transcripción próximos al promotor, mientras que las secuencias correspondientes a SP1 y SP2 estaban en sentido contrario. Por ello, se siguieron dos estrategias diferentes para la subclonación en el plásmido pcDNA3.1.

2.6.1. Construcción pcDNA 3.1 (+):GLUT8 y pcDNA 3.1(+):SP3

La estrategia para subclonar GLUT8 y SP3 en pcDNA3.1(+) se resume en los siguientes pasos:

1.- Digestión del plásmido pcDNA 3.1(+), y el plásmido PCR TOPO ligado a la secuencia de GLUT8 y SP3, con las enzimas de restricción Hind III y Xho I (Figura III.3).

El protocolo general para digerir el ADN plasmídico con estas enzimas se resume en el siguiente cuadro:

ADN plasmídico	1,0 µg
Hind III (10U/µl)	0,1 µl
Xho I (10U/µl)	0,1 µl
Tampón de digestión 10X	1,0 µl
Agua bidestilada estéril hasta	10 µl

La digestión del plásmido con las enzimas Hind III y Xho I se realizó a 37°C durante 1-2 horas. Esta digestión genera extremos cohesivos tanto en el plásmido como en los extremos de la secuencia de GLUT8 y SP3 insertadas en TOPO, que permiten una correcta reinserción en el nuevo vector.

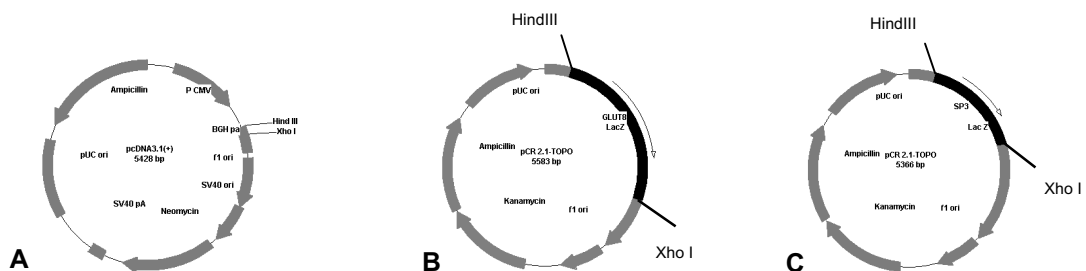


Figura III.3. Representación de los plásmidos pcDNA3.1 (+) (A); y los fragmentos GLUT8 y SP3 ligados al vector TOPO (B y C).

2.- Visualización y purificación de los productos de la digestión enzimática.

El producto de digestión se migró en gel de agarosa 1% para separar los fragmentos de ADN generados y comprobar los tamaños del plásmido y de las secuencias insertadas. Luego, los fragmentos de ADN fueron purificados del gel de agarosa mediante el kit Concert Matriz Gel Extraction System (Life Technologies-GibcoBRL).

3.- Ligación con la enzima T4 ligasa (Invitrogen).

Una vez estimada la cantidad de ADN plasmídico y los fragmentos que se querían subclonar, la reacción de ligación se realizó teniendo en cuenta una proporción 1:3 respecto a su concentración, a una temperatura de 16°C durante 16 horas. La mezcla para la reacción fue la siguiente:

Fragmento ADN digerido	1,5 μ l
Plásmido pcDNA3.1(+) digerido	0,5 μ l
Tampón ligación 5X	4,0 μ l
Enzima T4 ligasa (1U/ μ l)	0,2 μ l
Agua bidestilada estéril	13,8 μ l
Volumen final de la reacción	20 μl

4.- Transformación del producto de ligación pcDNA 3.1(+):GLUT8 y pcDNA3.1(+):SP3 en bacterias competentes *E. coli DH5- α* .

Del volumen total de reacción se utilizaron 15 μ l para transformar 100 μ l de bacterias competentes siguiendo la metodología detallada en el apartado 2.5.2.

5.- Purificación de ADN plasmídico a partir de las colonias crecidas en medio LB-Ampicilina.

20 colonias bacterianas elegidas al azar fueron cultivadas en 3 ml de medio LB-Ampicilina (100 μ g/ml) durante toda la noche a 37° C en agitación. Al día siguiente se realizó la purificación del ADN plasmídico a partir de 1 ml de cultivo utilizando el kit Gen Elute™ PlasmidMiniprep (Sigma).

6.- Análisis del fragmento ligado por digestión enzimática.

Se realizaron dos tipos de comprobaciones. Por una parte se digirió el ADN plasmídico (2 μ l) con las enzimas de restricción Hind III y Xho I para verificar el tamaño de la secuencia ligada al plásmido pcDNA 3.1(+). Por otro lado, el ADN plasmídico también fue digerido con la enzima de Sma I (Invitrogen) para comprobar que la secuencia había sido ligada en la dirección correcta ya que esta enzima solo corta en un punto dentro del fragmento insertado y en un punto dentro del plásmido con lo que se observan diferentes patrones de corte en función de la dirección de inserción del fragmento. La incubación se realizó durante 1-2 horas a 37°C. El protocolo general que se tuvo en cuenta a la hora de preparar la mezcla de reacción para digerir con Sma I fue:

DNA plasmídico	1,0 µg
Sma I (10U/µl)	0,1 µl
Tampón de digestión 10X	1,0 µl
Agua bidestilada estéril hasta	10 µl

2.6.2. Construcción pcDNA 3.1 (+):SP1 y pcDNA 3.1(+):SP2

En el caso de los transcritos SP1 y SP2, los fragmentos insertados en el vector TOPO estaban orientados en dirección contraria, de modo que debían ser reorientados en el plásmido pcDNA 3.1(+), para permitir posteriormente una correcta transcripción del ARNm. En este caso, para subclonar los fragmentos en el vector pcDNA se siguió una estrategia basada en la digestión con la enzima de restricción EcoR I y que se resume en los siguientes siete pasos:

1.- Digestión con EcoR I.

El primer paso fue cortar el ADN plasmídico (30 µg) de TOPO:SP1 y TOPO:SP2 con la enzima EcoR I para separar el fragmento del resto del plásmido (Figura III.4.A y B). La digestión con EcoR I tiene la peculiaridad de generar extremos de corte romos, de manera que al volver a ligar, esta ligación sería completamente al azar en lo que se refiere a la orientación. De esta manera se podía conseguir la orientación deseada.

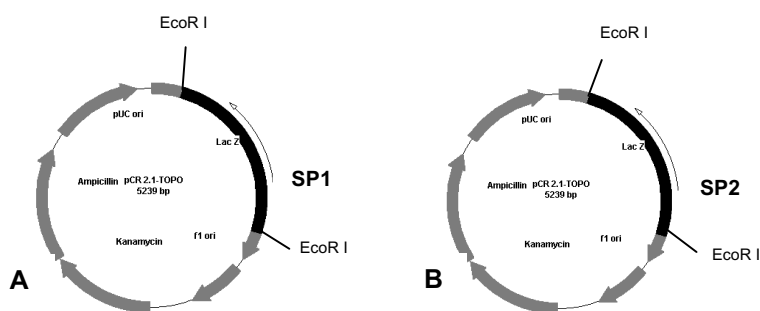


Figura III.4. Representación del plásmido TOPO unidos a los fragmentos SP1 y SP2 donde aparecen los sitios de corte de la enzima de restricción.

La digestión enzimática con EcoR I, se realizó durante 1-2 horas a 37°C, y el protocolo general se describe en el siguiente cuadro:

DNA plasmídico	1,0 µg
EcoR I (10U/µl)	0,1 µl
Tampón de digestión 10X	1,0 µl
Agua bidestilada estéril hasta	10 µl

2.- Purificación del ADN.

El producto de digestión se migró en gel de agarosa 1%, y tanto el plásmido como el ADNc de SP1 y SP2 se purificaron mediante el kit Concert Matriz Gel Extraction System.

3.- Digestión con EcoR I y desfosforilación del plásmido pcDNA 3.1(+) con fosfatasa alcalina.

En primer lugar, se digirió el plásmido pcDNA 3.1 (+) con la enzima de restricción EcoR I (Figura III.5). Posteriormente, se realizó la desfosforilación de sus extremos, de manera que se impidiese la recircularización del plásmido tras su digestión, debido a los cortes romos generados por la enzima.

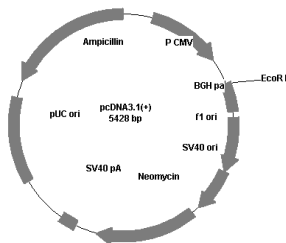


Figura III. 5. Representación del plásmido pcDNA3.1 (+) digerido con EcoR I.

En este caso, la digestión enzimática se realizó incubando la mezcla de reacción durante 10 minutos a 37°C siguiendo el protocolo que se detalla a continuación:

Plásmido pcDNA3.1(+)	(50 ng)	0,5 µl
EcoR I (10U/µl)	1,0 µl	
Tampón de digestión 10X	0,7 µl	
Agua bidestilada estéril	4,8 µl	

Para desfosforilar los extremos del plásmido, al mismo microtubo se le añadió la enzima SAP (Invitrogen) y se incubó durante 10 minutos a 37°C. La inactivación de la enzima se realizó incubando la muestra a 65°C durante 15 minutos.

Tampón de desfosforilación 10X0,9 µl
Enzima SAP (Phosphatase Alkaline Shrimp) (1 U/µl)	... 1,0 µl

4.- Ligación de los diferentes transcritos en el plásmido pcDNA 3.1 (+).

Para la ligación, al mismo tubo eppendorf se añadió la enzima ligasa, y la mezcla de reacción fue incubada durante 16 horas a 16° C:

ADN fragmento a insertar (150 ng)	...2,0 µl
Tampón ligación 5X4,0 µl
T4 DNA ligase (1U/µl)1,0 µl
Agua bidestilada estéril4,5 µl

5.- Transformación del producto de ligación en bacterias competentes *E.coli DH-5α*.

6.- Purificación de ADN plasmídico.

7.- Digestión enzimática con Sma I para verificar el fragmento de ADN ligado.

Los pasos 5, 6 y 7 se realizaron tal y como se detalla en los puntos 4, 5 y 6 del apartado anterior 2.6.1.

2.7. Secuenciación y análisis de las secuencias

La secuenciación de los ADNc seleccionados se realizó de forma automática por el método de la terminación de cadena por incorporación de dideoxinucleótidos marcados con fluorocromos y utilizando un secuenciador automático modelo ABI 377 (PE Biosystems, Foster City, California, USA), en el Servicio de Secuenciación de ADN del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (Universidad Politécnica de Valencia).

La secuenciación fue de doble dirección, utilizando como iniciadores los promotores "M13 reverse" y "M13 forward", presentes en el plásmido pCR 2.1 TOPO[®]. Y en el caso del plásmido pcDNA 3.1 se emplearon los promotores "T7 promoter/priming site" y "pcDNA3.1/BGH reverse priming site".

Las secuencias de nucleótidos obtenidas se compararon con las existentes en la base de datos del GenBank mediante BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), del servidor NCBI (National Center for Biotechnology Information).

2.8. Detección de los diferentes transcritos por southern blot

Esta técnica fue empleada para corroborar que los fragmentos amplificados por PCR correspondían a GLUT8.

2.8.1. Preparación de las muestras

El producto amplificado utilizando los cebadores MsG8Exon1-up y MsG8Exon10-as, y obtenido mediante RT-PCR a partir de muestras de ARN total de intestino y de testículo de ratón se diluyó en TE (1:20 las muestras de testículo, y 1:10 las muestras de intestino).

El producto amplificado utilizando los cebadores Glut8/BamHI y Glut8/EcoRI, y obtenido mediante RT-PCR a partir de muestras de ARN de células Caco-2 diferenciadas se diluyó 10 veces en TE.

De las muestras diluidas se tomó 1 µl para tratarlo con nucleasa S1 (80 U) (Roche) en un volumen de reacción de 10 µl totales durante 10 minutos a 37°C para eliminar restos de ADN de simple cadena que pudieran formar cadenas heteroduplex no específicas. Por otra parte, se cogió 1 µl de muestra diluida y se llevó a un volumen final de 10 µl con TE.

2.8.2. Migración electroforética

Ambas muestras, tratadas y no tratadas con nucleasa S1, fueron migradas lentamente (70 V durante 3 horas) en gel de agarosa 2,4%. Tras la migración, el gel fue lavado con agua bidestilada y dejado 15 minutos en agitación en solución HCl 0,25 M. A continuación, se lavó de nuevo con agua bidestilada y fue sumergido en una solución desnaturalizante de NaOH 0,5 M durante 20 minutos en agitación.

2.8.3. Transferencia y prehibridación

La transferencia del ADN desnaturalizado a la membrana de nitrocelulosa se realizó mediante transferencia húmeda por capilaridad ascendente durante toda la noche. Posteriormente,

la membrana fue lavada con solución SSC 2X prepararla a partir de una solución SSC 20 X (3 M NaCl, 341 mM citrato sódico, pH 7,0), y luego prehibridada con 20 ml de solución de hibridación (formamida 50%, SSC 5X, 2% agente de bloqueo, 0,1% N-laurosilsarcosina, SDS 0,02%) a 37°C durante 1 hora.

2.8.4. Hibridación

La detección de los fragmentos amplificados correspondientes a GLUT8 fue realizada mediante hibridación de la membrana con una sonda específica marcada con digoxigenina. La sonda fue preparada mediante la amplificación por PCR de un fragmento de 1 Kb a partir de la secuencia entera de GLUT8 de ratón con los cebadores HGLUT8-U y MsGlut8Exon10-as, utilizando nucleótidos dUTP marcados con digoxigenina (Roche). La membrana fue hibridada durante 2 horas a 37°C con 2,5 ml de solución de hibridación que contenía la sonda de GLUT8, previamente desnaturalizada. Después fue lavada 2 veces durante 5 minutos en agitación a temperatura ambiente con solución A (SSC 2X, 0,1% SDS); y 2 veces durante 15 minutos en agitación a temperatura ambiente con la solución B (SSC 0,5X, 0,1% SDS). La membrana fue lavada con tampón de lavado (100 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 7,5) durante 1 minuto, e incubada con un anticuerpo específico anti-digoxigenina conjugado con HRP (peroxidasa de rábano) durante 30 minutos en agitación a temperatura ambiente en tampón de bloqueo (10% reactivo bloqueante diluído en ácido málico). Finalmente, la membrana fue lavada 2 veces durante 15 minutos en tampón de lavado, seguido de un lavado con tampón alcalino (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 9,5) durante 2 minutos en agitación.

2.8.5. Detección y visualización del ADN hibridado

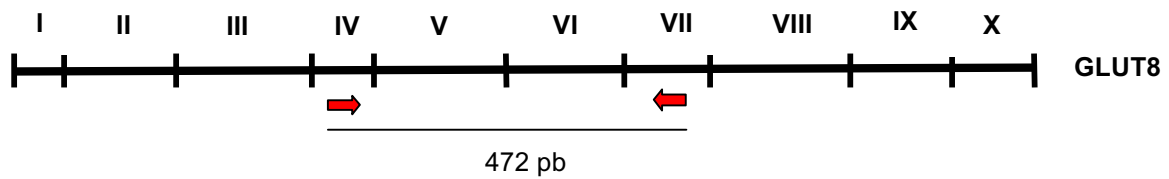
La detección fue realizada mediante quimioluminiscencia utilizando el sistema "ECL+Plus western blotting detection" (Amersham Life Science) y siguiendo las instrucciones del fabricante. La membrana hibridada y excitada por el sistema de quimioluminiscencia fue expuesta sobre una película sensible Hyperfilm™ECL™ (Amersham Pharmacia Biotech) durante diferentes periodos de tiempo (entre 3 a 20 minutos).

2.9. Amplificación de los diferentes transcritos GLUT8, SP1, SP2 y SP3 por PCR

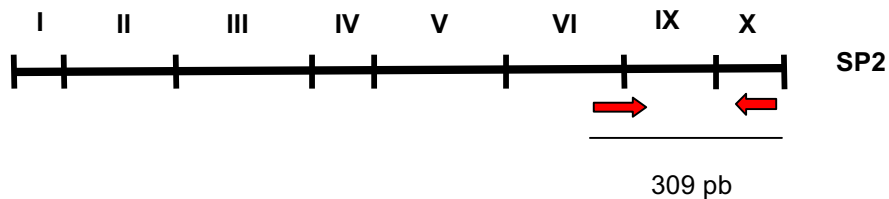
Para poder detectar de manera específica la expresión de ARNm de los diferentes transcritos mediante la técnica PCR, se diseñaron una serie de cebadores específicos a partir de la secuencia de nucleótidos de GLUT8, y las secuencias obtenidas para cada uno de los otros transcritos.

La secuencia entera de GLUT8 consta de diez exones. El exón VII se mantiene solamente en esta forma, de modo que para amplificar GLUT8 de manera específica utilizamos un cebador

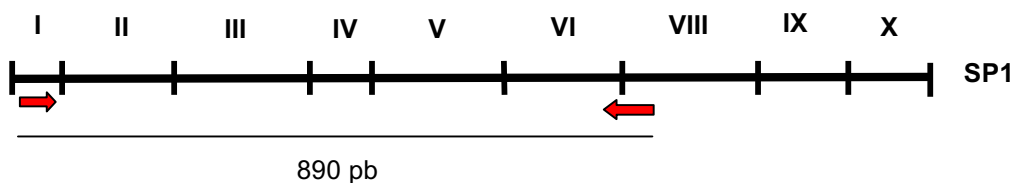
localizado en el exón IV (HGLUT8-U) y un cebador localizado en el exón VII (MsG8Exon7-as) resultando una secuencia de 472 pb.

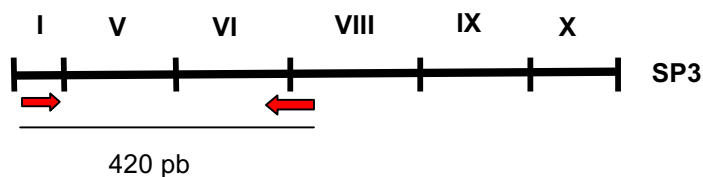


El transcrito SP2 da una secuencia en la que desaparecen los exones VII y VIII, de modo que para amplificar de manera específica este transcrito se utilizó un cebador localizado entre los exones VI y IX (MsSP2-sens) y un cebador localizado en el exón X (MsG8Exon10-as) dando lugar a una secuencia de 309 pb.

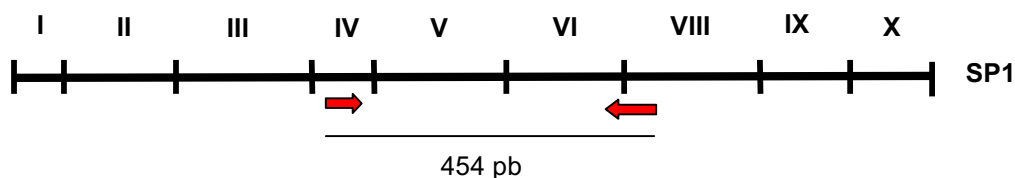


Para amplificar los transcritos SP1 y SP3 utilizamos los cebadores MsG8Exon1-up y MsSP1y3-as, localizados en el exón I y entre el exón VI y VIII respectivamente. Estos dos transcritos tienen en común que carecen del exón VII, pero además el transcrito SP3 pierde los exones II, III y IV; de modo que al amplificar resulta una secuencia de 890 pb para SP1 y 420 pb para SP3.





En algunos casos, cuando interesaba amplificar únicamente el transcrito SP1 se utilizaron los cebadores HGLUT8-U (localizado en el exón IV) y MsS1y3-as (localizado en el exón VI y VIII) dando lugar en, este caso, solamente una banda de 454 pb correspondientes a SP1, dado que SP3 carece del exón IV.



En la siguiente tabla, se recogen los nombres y las secuencias de los cebadores empleados en cada caso (Tabla III.4).

Tabla III.4. Secuencia de los cebadores diseñados y utilizados en la amplificación específica de los diferentes transcritos.

Cebadores	Secuencia de nucleótidos 5' → 3'
HGLUT8-U	ATCTCCGAAATCGCCTACCC
MsG8Exon7-as	ATTATGCCACAGTGACC
MsG8Exon1-up	TGACATGTCTCCCGAGGACC
MsG8Exon10-as	AAAGGGTCTGTCATCGTCC
MsSP2-sens	GGAGGCCAAGTTCAAGGCT
MsSP1y3-as	AGACACCATGATCACACCTT

Para todas las reacciones de PCR, la mezcla de reacción contenía:

Tampón de reacción con MgCl ₂ 2 mM (10X)2,5 µl
dNTPs (10 mM)0,5 µl
Cebador sentido0,5 µl
Cebador antisentido0,5 µl
Taq DNA pol Netzyme (1 U/µl)0,6 µl
Agua bidestilada estéril15,4 µl
ADNc (≈20 ng/µl)5,0 µl
Volumen total / pocillo 25 µl

En este caso, las condiciones de PCR fueron siempre las indicadas en el siguiente cuadro:

Primer ciclo inicial desnaturalización	35 ciclos de amplificación	Último ciclo de elongación
5 min. a 94°C	30 seg. a 94°C (desnaturalización) 30 seg. a 58°C (anillamiento) 1 min. a 72°C (elongación)	7 min. a 72°C

2.10. Estudio de la regulación de la expresión de GLUT8 por RT-PCR cuantitativa

Para detectar las posibles variaciones en la expresión de GLUT8 en células 3T3-L1 transfectadas con los diferentes transcritos utilizamos la técnica de RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR), que permite cuantificar las variaciones de la expresión de un ARNm determinado, bajo determinadas condiciones experimentales.

Para estimar la cantidad de ARNm de un gen determinado es necesario elaborar una recta patrón a partir de la cual poder extrapolar y cuantificar los resultados de la amplificación del ADNc. La recta patrón se estableció usando como molde diluciones seriadas del plásmido pCR2.1-TOPO en el que se había clonado previamente el ADNc de la GAPDH de ratón (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase). Los cebadores diseñados para amplificar el ADNc de la GAPDH se indican en la tabla III.5.

Tabla III. 5. Cebadores para amplificar el ADNc de la GAPDH de ratón.

Cebadores	Secuencia 5'→3'
GAPDH-S	CATCACCATCTTCCAGGAGC
GAPDH-AS	CACGGAAGGCCATGCCAG

Las diluciones del plásmido TOPO-GAPDH se hicieron teniendo en cuenta un factor de dilución 10, de modo que las cantidades de plásmido oscilaban entre 1 ng y 10^{-5} ng.

Para obtener valores normalizados, también es necesario un control interno que permita comparar dentro de una misma muestra, la expresión de un determinado gen con la expresión de un gen altamente conservado y que se conoce que se expresa en todas las células. Por ello, en cada muestra a analizar cuantificamos la expresión del gen GAPDH aprovechando los mismos cebadores utilizados para construir la recta patrón.

El análisis de la expresión de GLUT8 en las células 3T3-L1 transfectadas se realizó utilizando diluciones del ADNc con un factor 10, partiendo de 10 ng.

Los cebadores específicos empleados para amplificar la secuencia de GLUT8 de ratón fueron el HGLUT8-U y el MsG8Exon7-as (Tabla III.4) que originan un fragmento de 472 pb.

Tanto las reacciones de la recta patrón como las reacciones sobre las muestras de tejido a analizar se realizaron por cuadruplicado y en presencia de SYBR Green I (Molecular Probes) en un termociclador iCycler de BioRad utilizando placas de 96 pocillos. En cada pocillo se depositaba 10 μ l de una mezcla de reacción que contenía dNTPs (Roche) a una concentración final de 200 μ M, cebadores a una concentración final de 200 nM, SYBR Green I a una dilución final de 1:250.000, fluoresceína (BioRad) a una concentración final de 10 nM, tampón de reacción con $MgCl_2$ a una concentración final de 200 μ M (N.E.E.D) y NetZyme Taq Polimerasa (N.E.E.D) 0,5 U por reacción.

De este modo, se prepararon dos mezclas de reacción; una con los cebadores específicos para amplificar GLUT8, y otra con los cebadores específicos para amplificar el gen GAPDH. Las cantidades (para n=1) y los demás componentes de la mezcla de reacción se detallan en el siguiente cuadro:

Mezcla de reacción para amplificar GLUT8	Mezcla de reacción para amplificar GAPDH
Tampón de reacción con 2 mM de MgCl ₂ (10X)2,0 µl dNTPs (10 mM)0,4 µl HGLUT8-U (10 µM)0,4 µl MsG8Ex7-As (10 µM)0,4 µl Sybr Green (1:10000)0,8 µl Taq DNA pol Netzyme (1U/µl)0,5 µl Agua bidestilada estéril5,5 µl Volumen final /pocillo 10 µl	Tampón de reacción con 2 mM de MgCl ₂ (10X)2,0 µl dNTPs (10 mM)0,4 µl GAPDH-U (10 µM)0,4 µl GAPDH-AS (10 µM)0,4 µl Sybr Green (1:10000)0,8 µl Taq DNA pol Netzyme (1U/µl)0,5 µl Agua bidestilada estéril5,5 µl Volumen final /pocillo 10 µl

Además de este volumen correspondiente a la mezcla de reacción, en cada pocillo se añadía 10 µl de la muestra a analizar con la cantidad correspondiente de ADNc, consiguiendo, así, un volumen final de 20 µl.

Las condiciones de tiempo y temperatura empleadas en la qRT-PCR para cuantificar la expresión de GLUT8 en las células 3T3-L1 transfectadas fueron las siguientes:

98°C /3 min	1 ciclo
95°C /30 seg; 58°C/30 seg; 72°C /30 seg	40 ciclos
98°C / 1min	1 ciclo
50°C / 1 min	1 ciclo
+0,5°C / 10 seg	100 ciclos

El último paso significa que se produce un aumento gradual de la temperatura de 0,5°C cada 10 segundos, desde 50°C hasta 100°C. Con esto se consigue elaborar una curva de desnaturalización que nos indica la especificidad con la que se ha dado la reacción, lo que nos permite detectar si se han producido errores en la amplificación o si se han formado dímeros entre los oligonucleótidos utilizados.

La recogida y el análisis de los datos se realizó mediante el programa informático iCyclerTMiQ (Optical System Software) de BioRad. Los cálculos finales para determinar la cantidad amplificada de GLUT8 se realizaron en Microsoft Office Excel, teniendo en cuenta en cada muestra las diluciones realizadas y la proporción de la expresión de GLUT8 frente a la expresión del gen control interno GAPDH (GLUT8 / GAPDH).

3. ANÁLISIS DE LA PROTEÍNA GLUT8

Para el estudio de la expresión proteica de GLUT8 se ha utilizado un anticuerpo policlonal, anti GLUT8-COOH, que reconoce la secuencia de los últimos 11 aminoácidos del extremo carboxi terminal de GLUT8 de ratón (LE QVT AHF EGR) por ser la parte más específica de cada GLUT. El anticuerpo fue elaborado en conejos por la empresa Q-Biogene (Francia). Como control interno se utilizó un anticuerpo primario anti-ACTINA.

Para los experimentos de inmunofluorescencia indirecta se utilizó como anticuerpo secundario, un anti-conejo IgG conjugado con FITC (fluorescein-6-isothiocyanate) mientras que en los experimentos de western blotting se utilizó una IgG anti-conejo ligado a HRP (peroxidasa de rábano). En los experimentos de inmunohistoquímica clásica se empleó un anticuerpo secundario biotilizado y conjugado con la HRP presente en el kit Vectastain Elite ABC. La información detallada acerca de los anticuerpos empleados se recoge en la siguiente tabla (Tabla III.6).

Tabla III.6. Descripción de los anticuerpos utilizados en la detección de la proteína GLUT8.

Anticuerpos primarios	Casa comercial	Referencia	Concentración	Descripción
Anti G8-COOH	Q Biogene	L0962	–	Policlonal de conejo
Anti-ACTINA	Sigma	A 5060	–	Policlonal de conejo

Anticuerpos secundarios	Casa comercial	Referencia	Concentración	Descripción
Anti rabbit IG-HRP	Amersham Pharmacia	NA934V	–	Policlonal de burro
Anti rabbit IG-FITC	Sigma	F 0511	–	Policlonal de cabra
Biotilizado-HRP	Vector Laboratories	PK-6103	–	Policlonal de cabra

3.1. Detección y localización de GLUT8 en intestino de ratón por inmunohistoquímica

La fijación del intestino se realizó con paraformaldehído frío inyectado directamente a la luz del intestino, inmediatamente después del sacrificio del animal. Posteriormente, el tejido estuvo 4-5 horas incubado en el fijador bouin (75 ml solución acuosa saturada con ácido pícrico, 25 ml formol, y 5 ml ácido acético glacial). Después fue lavado con alcohol al 30% varias veces hasta

eliminar el color amarillo de fijador, y finalmente puesto en alcohol al 70% para iniciar la inclusión automática utilizando un incluser de parafina modelo HMP110 (MYR) programado con los diferentes tiempos de incubación que se detallan en la figura III.6.

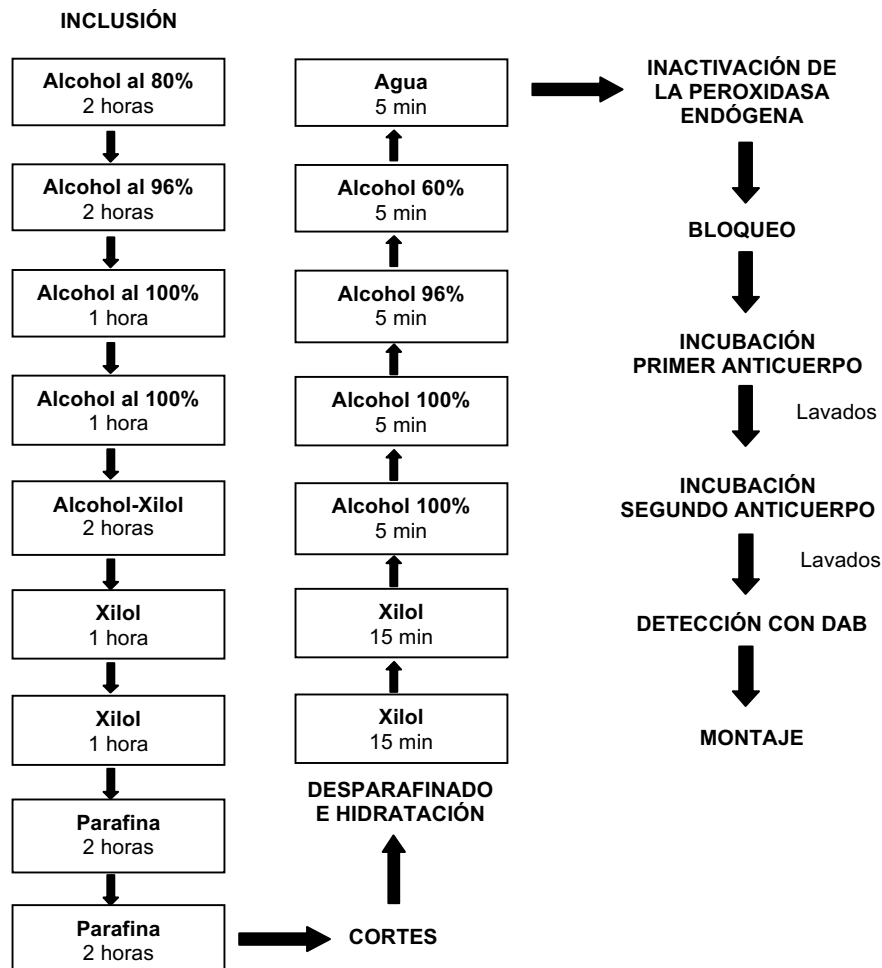


Figura III.6. Esquema del proceso de detección por inmunohistoquímica.

Una vez incluido el tejido en bloques de parafina, se realizaron cortes de 3 μm de grosor con un microtomo de parafina modelo HM310 (Microtom), y fueron montados sobre portaobjetos impregnados de Poly-L-Lisina (Sigma). Los cortes se desparafinaron e hidrataron realizando 2 lavados con xilol durante 15 minutos, 2 lavados de 5 minutos con alcohol 100%, 1 lavado de 5 minutos con alcohol 96 %, 1 lavado de 5 minutos con alcohol de 60% y, finalmente, 5 minutos en agua corriente.

La inactivación de la peroxidasa interna se realizó incubando las muestras 30 minutos en oscuridad con una solución de metanol con agua oxigenada al 0,3%. Esta solución se preparaba

en el momento de su uso a partir de una solución madre de H₂O₂ al 3%. Después se lavaron 2 veces con PBS durante 10 min.

El bloqueo de las reacciones inespecíficas se realizó incubando las muestras durante 20 minutos con suero de oveja proporcionado por el kit Vectastain Elite ABC (Vector Laboratories). Luego se eliminó el exceso de suero y, sin lavar, se incubaron con el primer anticuerpo anti G8-COOH (L0962) diluido 1:500 y, en su caso, el anticuerpo preinmune diluido 1:500 en PBS con 3% de Albúmina Sérica Bovina (Sigma). El tiempo de incubación fue de 16-18 horas a 4°C.

Los cortes de tejidos se lavaron 2 veces con PBS durante 10 minutos, y se incubaron 30 minutos con el segundo anticuerpo biotinilado presente en el kit Elite (1 gota cada 10 ml de PBS). Tras la incubación con el anticuerpo secundario, las preparaciones fueron lavadas 2 veces con PBS durante 10 minutos. Posteriormente, se incubaron unos 40 minutos con el complejo avidina-biotina –peroxidasa que se une a la biotina del segundo anticuerpo.

Finalmente fueron lavados 2 veces con PBS, y siguiendo las instrucciones del fabricante se llevó a cabo la reacción peroxidasa incubando las preparaciones de tejidos con DAB (diaminobenzidina) a temperatura ambiente hasta producirse la coloración (entre 1-5 minutos). Por último, se lavaron las secciones durante 5 minutos en agua destilada. Estos cortes se deshidrataron pasando por los alcoholes de 60%, 96% y 100%, y las preparaciones se montaron con lugol, dejándolas secar un mínimo de 24 horas antes de proceder a su observación al microscopio óptico. Por otro lado, algunas de las preparaciones que no fueron empleadas para la detección inmunohistoquímica fueron coloreadas con hematoxilina durante 3 segundos; luego lavadas con agua, y deshidratadas (pasándolas por alcohol de 60%, 96% y 100%). Finalmente se montaron con lugol y las preparaciones se dejaron secar. Estas últimas preparaciones sirvieron para analizar la integridad del tejido y observar la estructura celular y tisular, y así poder localizar el marcaje obtenido con el anticuerpo anti G8-COOH.

3.2. Detección de la proteína GLUT8 en células 3T3-L1 por inmunofluorescencia

Para la realización de experimentos de inmunofluorescencia indirecta sobre cultivos celulares de células 3T3-L1, las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos, en los cuales previamente se habían colocado 3-4 cubreobjetos redondeados (13 mm de diámetro) preparados para cultivo celular (Sarsted). Tras la realización de un cultivo estándar y de la transfección con los diferentes plásmidos, en el momento de realizar la inmunofluorescencia para la detección de la proteína GLUT8, los cubreobjetos fueron retirados de las placas de 6 pocillos, y fueron colocados de forma individual en los pocillos de placas de cultivo de 24 pocillos, cuyas dimensiones se ajustan a las de los cubreobjetos utilizados.

En primer lugar, las células fueron lavadas 2 veces con 1 ml de PBS para eliminar restos del medio de cultivo. Luego, las células fueron fijadas con una solución al 3% de paraformaldehído durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de la fijación, fueron incubadas con una solución 100 mM de glicina en PBS durante 15 minutos para neutralizar los restos de paraformaldehído. A continuación, las células fueron tratadas con Triton X-100 (Sigma) 0,25 % en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente para permeabilizar la membrana plasmática. Luego se lavaron 3 veces con 1 ml de PBS y una vez más con 1 ml de PBS-0,1% BSA.

Se incubaron con el primer anticuerpo toda la noche a 4°C. Los anticuerpos utilizados fueron el anti G8-COOH en dilución 1:100 en solución tampón (25 mM Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM NaCl, 0,1% BSA) y como control positivo el anti-actina a la dilución 1:300. A continuación, las células se lavaron 3 veces con la solución tampón y se incubaron con el segundo anticuerpo conjugado con FITC durante 90 minutos a temperatura ambiente. Los cubreobjetos se lavaron de nuevo con solución tampón, y se montaron sobre portaobjetos con Mowiol. Las preparaciones fueron secadas a 4°C durante 12 horas antes de proceder a su observación al microscopio de fluorescencia (Olympus BX40 modelo BX40F-3).

3.3. Detección de la proteína GLUT8 por western blot.

3.3.1. Aislamiento de proteínas de membrana.

Para obtener la fracción de proteínas de membrana a partir de tejido se utilizó una solución TES pH 7,1 (Tris 20 mM, EDTA 1 mM, Sacarosa 255 mM). Justo antes de iniciar el aislamiento de proteínas, a esta solución se le añadió un cóctel de inhibidores de proteasas complete EDTA-free y PMSF 10 mM (Roche).

El tejido intestinal extraído de los ratones, que previamente había sido conservado en nitrógeno líquido se homogenizó en TES frío con la ayuda de un Ultra Turrax modelo T25 basic IKA LABORTECHNK. Después de homogenizar las muestras con el UltraTurrax, y siempre trabajando sobre hielo, las muestras fueron sonicadas durante 15 segundos a una potencia de 360 w/cm² para terminar de romper bien el tejido, utilizando un sonicador modelo Ultraschallprozessor UP 200S (dr.hielscher). Luego se centrifugaron durante 20 minutos a 13.200 rpm en una microcentrífuga a 4°C. El sobrenadante con las proteínas solubles se descartó, mientras que el precipitado que contenía las proteínas de membrana y los microsomas de alta densidad se resuspendió en 200 µl de Tris 2 mM / Manitol 50 mM, pH7,1 al que se le añadió previamente inhibidores de proteasas.

Para obtener las proteínas de membrana a partir de las muestras de células, se siguió la misma metodología excepto que en este caso, la primera homogeneización con TES fue realizada directamente utilizando una micropipeta.

3.3.2. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando un kit de detección de BioRad, y siguiendo las instrucciones del fabricante. La absorbancia de la reacción colorimétrica se midió a 595 nm en un espectrofotómetro modelo Spectronic® 20 Genesys™.

3.3.3. Migración electroforética en gel de acrilamida

La electroforesis en gel de acrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) se realizó en cubetas Mini Trans-Blot Transfer Cell de BioRad. Los geles de acrilamida utilizados fueron del 10%, y se prepararon a partir de una solución de acrilamida/BIS 40% (BioRad) al que se le añadía agua, TEMED (BioRad), APS 10% (persulfato amónico) (BioRad) y solución 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 0,4% SDS o solución 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 0,4% SDS en función del tipo de gel preparado. El grosor de los geles fue de 1,5 mm.

Antes de realizar la migración electroforética, las muestras fueron incubadas a 100°C durante 5 minutos para conseguir la completa desnaturización de las proteínas. Las cantidades de proteínas depositadas para su migración oscilaron entre 20 y 50 µg de proteínas junto con el tampón de carga 5X (15% SDS, 50% glicerol, 0,1% azul de bromofenol, 312,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 16% β-mercaptoethanol) a una concentración final de 1X, todo ello para un volumen final de 50 µl. Como marcador de proteínas se utilizó el marcador de pesos moleculares Kaleidoscope Prestained Standard (BioRad). Las muestras fueron migradas durante 60 minutos a 200 V en tampón de electroforesis (25 mM Tris, 0,192 M glicina, 0,1 % SDS, pH 8,3).

3.3.4. Transferencia

Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa Hybond™ECL™ (Amersham Pharmacia Biotech) por el método electroforético húmedo (Sambrook y Rusell, 2001). El tiempo de transferencia fue de 1 hora a 100 V en tampón de transferencia (25 mM Tris, 0.192 M glicina, 20% metanol) preparado en el momento.

Finalizada la transferencia, la membrana fue teñida con Rojo Ponceau (0.1% de rojo ponceau (USB) en 1% de ácido acético) para observar que las proteínas habían sido correctamente transferidas a la membrana. Luego fue lavada con abundante agua destilada y bloqueada durante toda la noche a 4°C en una solución 5% leche desnatada en polvo (Sveltesse, Nestle) en PBS-T (PBS 1X, 0.1% Tween-20).

Antes de incubar las membranas con el primer anticuerpo, se lavaron 4 veces con PBS-T en agitación.

3.3.5. Detección y visualización de la proteína

El primer anticuerpo (L0962) se utilizó a una dilución 1:1000 en PBS-T con 5% de leche desnatada. El tiempo de incubación con el primer anticuerpo fue de 2 horas en agitación suave. Antes de incubar las membranas con el segundo anticuerpo se lavaron con PBS-T.

Las membranas se incubaron, a continuación, con el segundo anticuerpo (anti-conejo IgG ligado a la HRP) diluido 1:3000 en PBS-T durante 1 hora. Este segundo anticuerpo que reconoce IgG de conejo al estar unido al HRP es posible detectarlo mediante un sistema de revelado adecuado basado en la quimioluminiscencia como el sistema ECL+Plus (Amersham Life Science). De modo que, después de la incubación las membranas con el segundo anticuerpo, éstas se lavaron varias veces con PBS-T y se procedió a su detección con el sistema ECL+Plus y a su posterior autorradiografía. Para ello se utilizó una película sensible HyperfilmTMECLTM (Amersham Pharmacia Biotech) y los tiempos de exposición a la película fueron de 5 y 20 minutos.

Como control positivo, las membranas se incubaron con el anticuerpo anti-actina, diluido 1:3000 en PBS-T con 5% de leche desnatada. Esta segunda incubación se realizó después de haber sometido a la membrana a un dekapado con una solución de glicina 200 mM (pH 2,5) y 0,4 % SDS, durante 30 minutos a temperatura ambiente en continua agitación. Después de este proceso, el bloqueo, los lavados las incubaciones con el primer y segundo anticuerpo se realizaron del mismo modo que en el procedimiento anteriormente descrito.

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En algunos casos los resultados estadísticos se expresan como las medias \pm el error estándar. Para la comparación entre los diferentes grupos de datos se ha utilizado el método de comparación del test de la t de Student para un 95% de significación.

IV. RESULTADOS

1. EXPRESIÓN DE GLUT8 EN INTESTINO DE RATÓN

Un objetivo fundamental de nuestro trabajo ha sido estudiar la expresión de GLUT8 en el intestino, y en concreto, en las células epiteliales absortivas, puesto que, como se ha comentado en la introducción, no se descarta que nuevas proteínas de la familia GLUT pudieran estar implicadas en el proceso de absorción intestinal, de manera adicional en los modelos ya establecidos.

1.1. Estudio de la expresión de ARNm de GLUT8 en intestino de ratón

En primer lugar, para asegurarnos de que los cebadores descritos en el apartado de material y métodos amplificaban correctamente el ADNc de GLUT8, antes de comenzar los estudios en intestino probamos los cebadores externos MsG8Exon1-up y MsG8Exon10-as en testículo y cerebro, donde previamente se había estudiado la expresión de dicho gen.

Estos cebadores amplificarían la secuencia completa que codifica la proteína y que, según la secuencia nucleótida de GLUT8 de ratón (NM 019488), deberían amplificar un fragmento de 1447 pb. Como se puede observar en la figura IV.1 el tamaño del fragmento de ADNc amplificado coincide con el tamaño teórico esperado para GLUT8 (1447 pb).

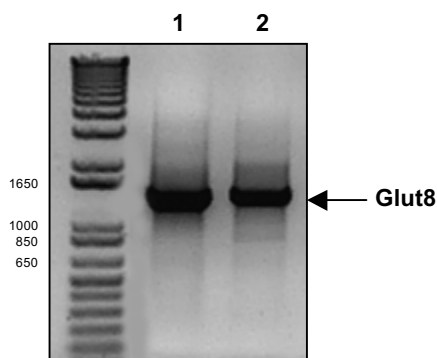


Figura IV.1. Amplificación de GLUT8 a partir de ADNc de testículo (1) y cerebro (2) de ratón mediante RT-PCR utilizando los cebadores externos MsG8Exon1-up y MsG8Exon10-as.

Una vez comprobado que los cebadores funcionaban correctamente, el siguiente paso fue estudiar la expresión de ARNm de GLUT8 mediante RT-PCR en tejido intestinal de ratón. A partir de ratones adultos macho, se extrajo todo el tracto intestinal y se separaron las fracciones de duodeno, yeyuno, ileon y colon. Parte de estos tejidos fueron procesados para la obtención de su ARN total, mientras que otra parte fue sometida a un raspado que nos permitió separar la mucosa para estudiarla de forma aislada, separándola de las otras capas del tejido intestinal. Una vez extraído el ARN total de las muestras, mediante la técnica de RT-PCR y utilizando los cebadores específicos (MsG8Exon1-up y MsG8Exon10-as) se amplificó el ADNc de GLUT8. La figura IV.2

muestra que el ARNm de GLUT8 (1447 pb) se expresa en todos los fragmentos intestinales y, dentro de ellos, también se expresa en las células de la mucosa.

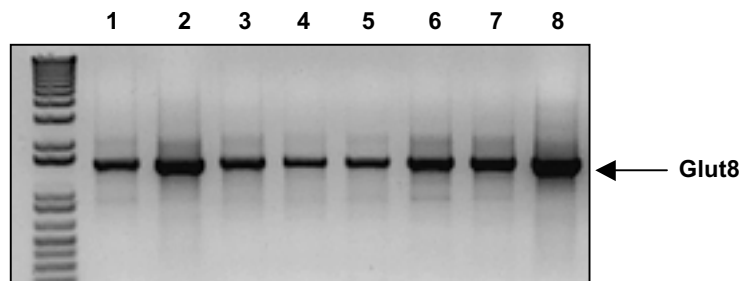


Figura IV.2. Resultados de la PCR realizada a partir de 1 μ l de ADNc de (1) ileon; (2) mucosa de ileon; (3) duodeno; (4) yeyuno; (5) mucosa de yeyuno; (6) colon; (7) mucosa de colon y (8) testículo. Las condiciones de la PCR fueron: temperatura de anillamiento 60°C, y tiempo de elongación 2 minutos a 72°C empleando la enzima Taq Polimerasa Platinum. Migración electroforética en un gel de agarosa al 1%, y visualizada con bromuro de etidio.

1.2. Detección de la proteína GLUT8 en intestino de ratón mediante western blot

Una vez confirmada la expresión de ARNm de GLUT8 en el tejido intestinal y en las células de la mucosa, el siguiente paso fue estudiar la expresión de la proteína.

El anticuerpo utilizado fue el anti G8-COOH (L0962), que reconoce la parte C-terminal de la proteína. Debido a que se trataba de un anticuerpo nuevo sintetizado para nosotros, antes de ser utilizado sobre muestras de tejido intestinal, se realizó una primera prueba en testículo de ratón observando que este anticuerpo reconocía una banda de peso molecular aproximadamente de 42-45 kD (Figura IV.3.A), que coincide con el tamaño de la proteína detectada por el grupo del Dr. Joost utilizando un anticuerpo de características similares, ya que reconocen la misma secuencia de aminoácidos (Doege y cols., 2000b). Esta banda desaparecía cuando el anticuerpo era bloqueado previamente con su correspondiente péptido, a una concentración 50 veces mayor (Figura IV.3.B). También aparece una banda con un peso molecular mayor (aproximadamente 75 kD). La aparición de esta segunda banda también ha sido observada por estos mismos autores (Doege y cols., 2000b).

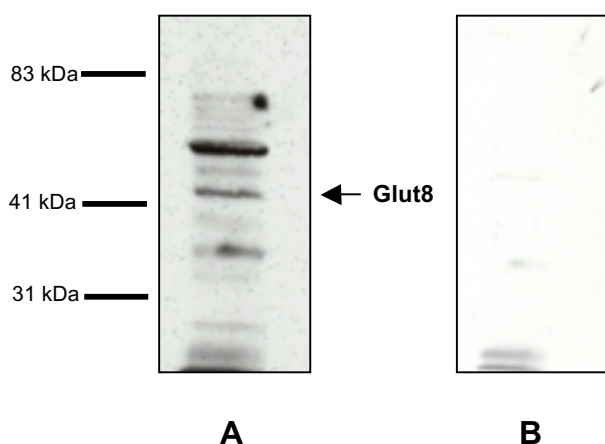


Figura IV.3. Detección de la proteína GLUT8 en testículo de ratón mediante western blot utilizando el anticuerpo anti G8-COOH a una dilución 1:1000 (A); y eliminación de la señal cuando el anticuerpo fue preincubado con su péptido correspondiente (B).

Una vez identificada la proteína GLUT8 en testículo, analizamos la expresión de dicha proteína en tejido intestinal. Para ello, se extrajeron los fragmentos intestinales correspondientes, y se preparó un homogenizado tisular, a partir del cual se aisló la fracción correspondiente a las membranas, tal y como se detalla en el apartado de material y métodos. Después de realizar la cuantificación de las proteínas, se analizó la expresión de GLUT8 en las diferentes fracciones del intestino mediante la técnica de western blot comparándola siempre con testículo.

Como se puede observar en la figura IV.4, GLUT8 se expresa en todos los fragmentos intestinales, aunque presenta unos niveles de expresión bajos en comparación con la observada en testículo.

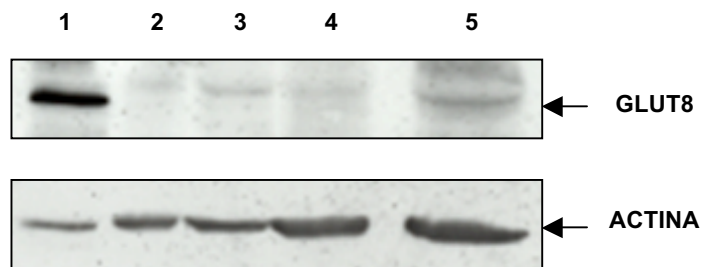


Figura IV.4. Análisis de la expresión de la proteína GLUT8 mediante western blot, en testículo (20 μ g) y en los diferentes tramos del intestino (entre 20-40 μ g) de ratón (1.testículo; 2. duodeno; 3. yeyuno; 4. ileon y 5. colon). Detección de GLUT8 con el anticuerpo L0962 (dilución 1:1000) (parte superior); y detección de la actina con el anticuerpo anti-actina (dilución 1:3000) (parte inferior).

1.3. Expresión y localización de GLUT8 mediante estudios de inmunohistoquímica

Antes de iniciar los ensayos de inmunohistoquímica sobre tejido intestinal, también se realizó en primer lugar una prueba sobre cortes histológicos de testículo de ratón para comprobar la especificidad y sensibilidad del anticuerpo L0962, ya que en este tejido es donde existe una mayor expresión de GLUT8, habiéndose ya descrito, por inmunohistoquímica, su presencia en algunas células testiculares (Ibberson y cols., 2002; Schürmann y cols., 2002). Como se puede observar en las figuras IV.5, existe inmunoreactividad específica en los túbulos seminíferos. Esta señal no aparece en todas las células del túbulo sino que se localiza únicamente en las espermátidas a lo largo de todas sus fases de desarrollo. La localización de la señal es intracelular y perinuclear, correspondiendo probablemente con la posición del acrosoma en desarrollo. Cuando los experimentos se realizaron utilizando suero preinmune la señal desapareció completamente, indicándonos la especificidad de este marcaje.

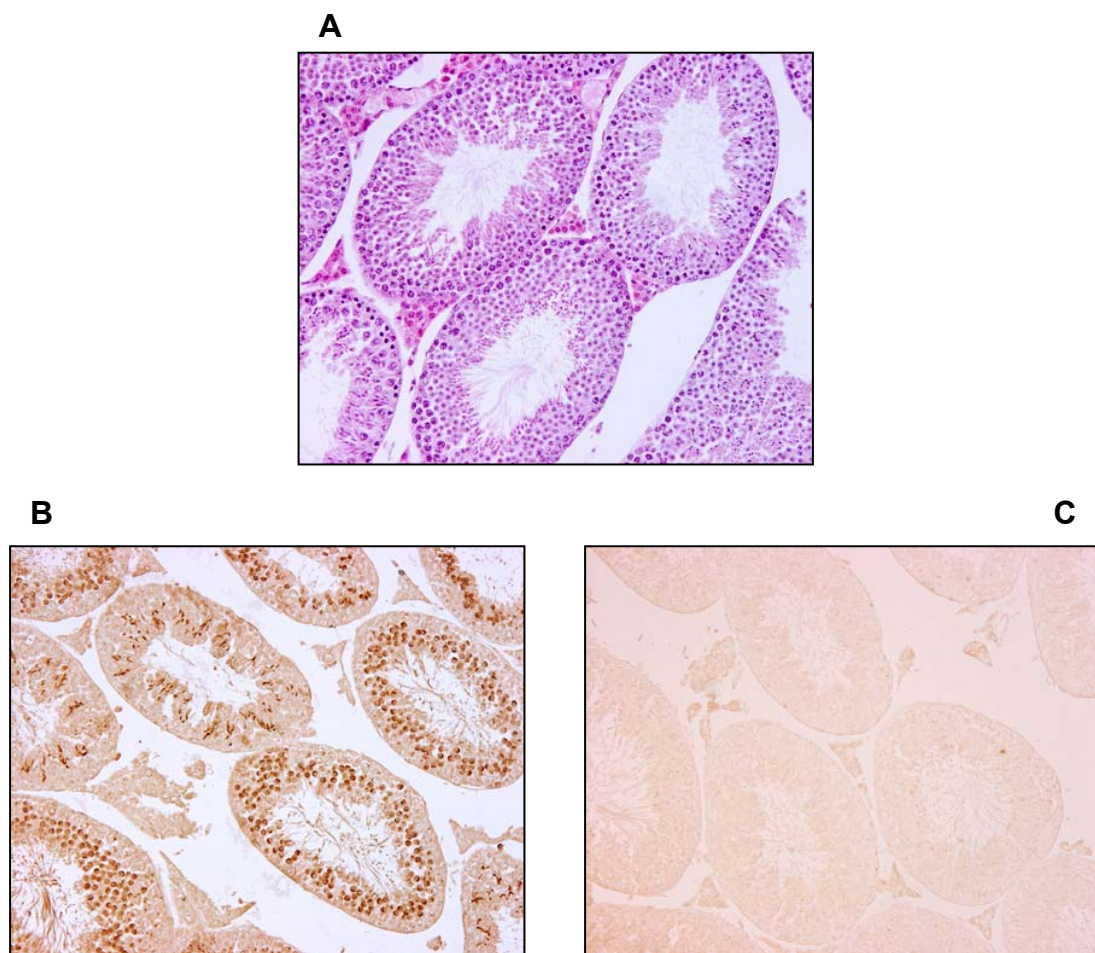


Figura IV.5. Inmunodetección de GLUT8 en testículo de ratón. **A.** Corte histológico teñido con Hematoxilina-Eosina. **B.** GLUT8, incubación con el anticuerpo anti G8-COOH (dilución 1:500). **C.** Incubación con suero preinmune. Aumento de las imágenes 200X.

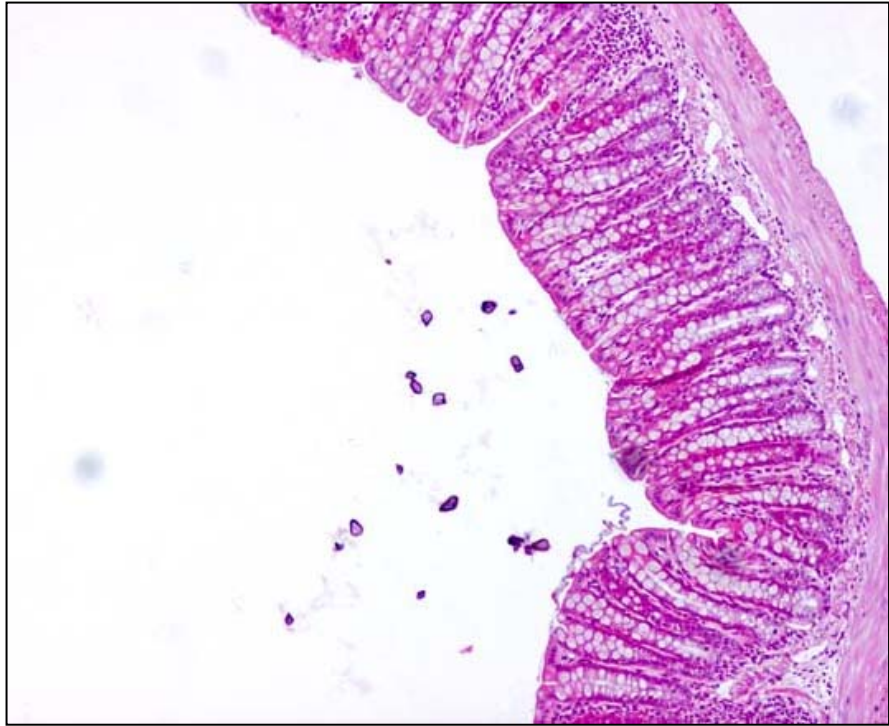
Una vez puesta a punto la técnica, realizamos cortes transversales de intestino para estudiar la localización de la proteína GLUT8 en este tejido. Los ensayos de inmunohistoquímica se realizaron sobre cortes seriados y para la inmunodetección se utilizó el mismo anticuerpo contra el extremo C-terminal de la proteína (L0962) que se había empleado en testículo.

La primera fotografía (Figura IV.6) muestra un corte histológico de colon teñido con hematoxilina-eosina donde se puede apreciar la integridad del tejido y las principales características morfológicas de la mucosa y de las criptas del intestino grueso.

Analizando los resultados obtenidos mediante inmunohistoquímica en cortes histológicos de colon de ratón observamos un claro marcaje en las células epiteliales de la mucosa (Figura IV.7.A). Esta señal no aparecía cuando las secciones se incubaban con suero preinmune (Figura IV.7.B). Estudiando las imágenes a mayores aumentos pudimos comprobar con mayor detalle la expresión de GLUT8 en los colonocitos de la mucosa, apreciando un marcaje en todo el citoplasma, sin embargo, la señal era más intensa entre el núcleo y el borde apical de la célula, en una zona donde aparece concentrarse la mayor expresión (Figura IV.8(A)). En otros cortes histológicos también se identificó una señal en la misma localización celular, observándose un marcaje de tipo granular más detallado (Figura IV.9 y Figura IV.10). Estas observaciones, parecen indicar que la mayor parte de GLUT8 pueda estar localizada de forma intracelular, pero muy próximo al borde apical, quizás almacenado en vesículas y dispuesto a translocarse a la membrana bajo ciertas señales hormonales o bioquímicas.

Posteriormente, estudiamos la expresión de GLUT8 en el ileon de ratón. Las características morfológicas de la mucosa del intestino delgado pueden apreciarse en la figura IV. 11. En comparación con el intestino grueso, se observan las vellosidades bien desarrolladas. La incubación de los cortes histológicos con el anticuerpo anti-GLUT8, en comparación con los cortes incubados con suero preinmune, mostró un claro marcaje en las células del epitelio intestinal, marcaje que también parecía observarse en algunas de las criptas de Lieberkühn (Figura IV.12(A)). Analizando la imagen a mayor aumento, se puede apreciar que a nivel de las vellosidades y de su epitelio (Figura IV.13(A) y 14(A)) aparece un marcaje de tipo granular en la parte superior del núcleo, y también un claro marcaje en la parte apical de la célula, que parece corresponder con el borde en cepillo. Esta distribución sugiere una doble localización de la proteína, intracelular, almacenado en vesículas, y en la membrana de las microvellosidades del borde en cepillo de los enterocitos. Por otro lado, a nivel de las criptas (Figura IV.15(A)), observamos un marcaje de tipo granular entre el núcleo y la membrana apical, pero sin apreciarse ningún marcaje en la membrana de la luz de la cripta, sugiriendo la presencia de esta proteína también en estas células, pero únicamente a nivel intracelular, y no a nivel de la membrana apical como parece observarse en las vellosidades.

A



B

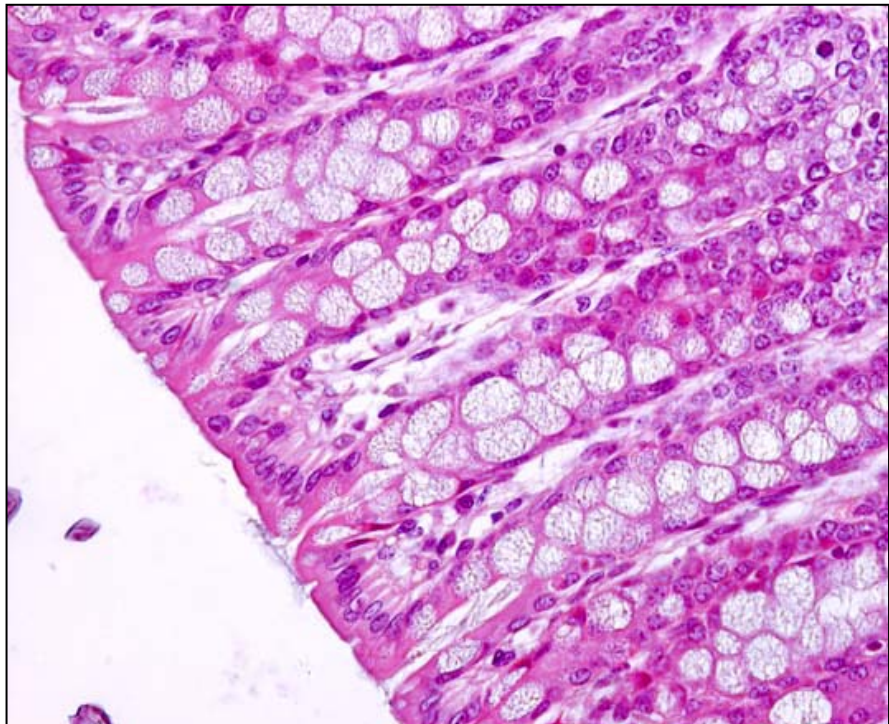


Figura IV.6. Cortes histológicos de colon de ratón teñidos con Hematoxilina-Eosina observados a diferentes aumentos. **(A)** 100X y **(B)** 400X.

A

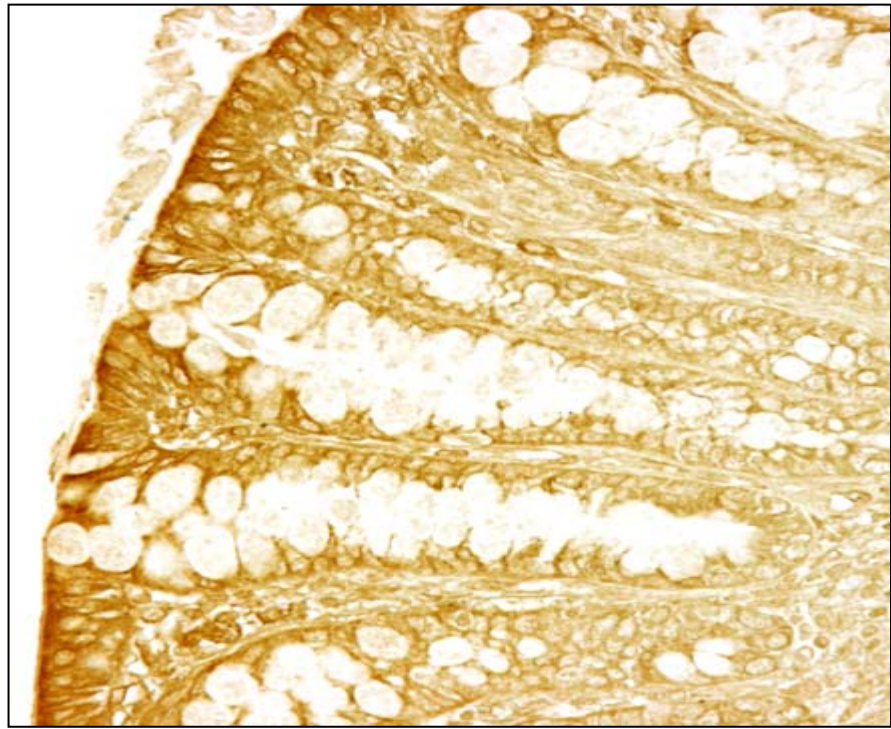


B



Figura IV.7. Inmunodetección de GLUT8 en colon de ratón. **(A)** Incubación con el anticuerpo L0962. **(B)** Incubación con suero preinmune. Aumento de las imágenes 100X.

A



B

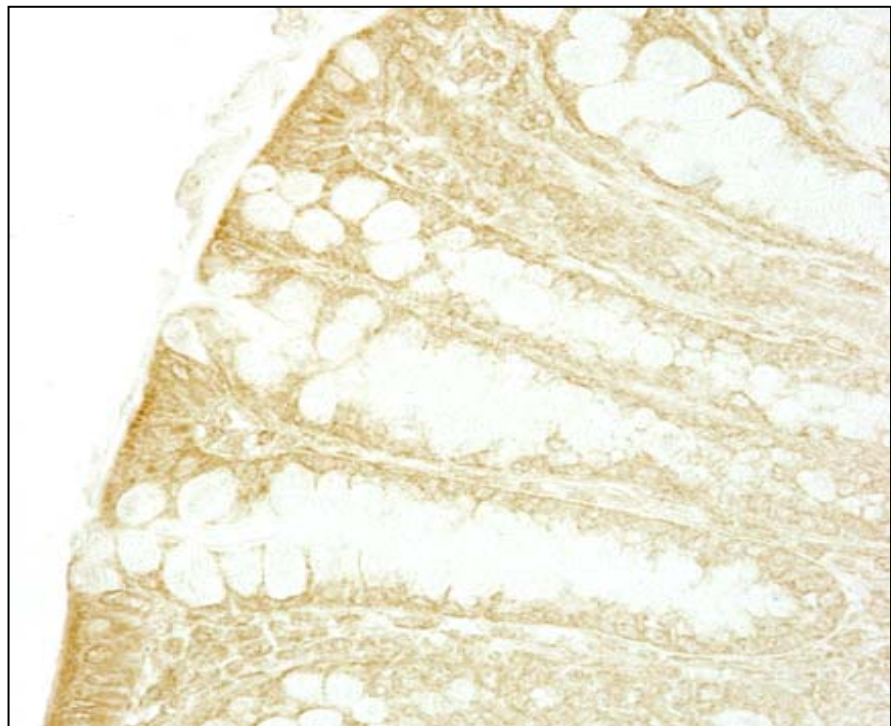
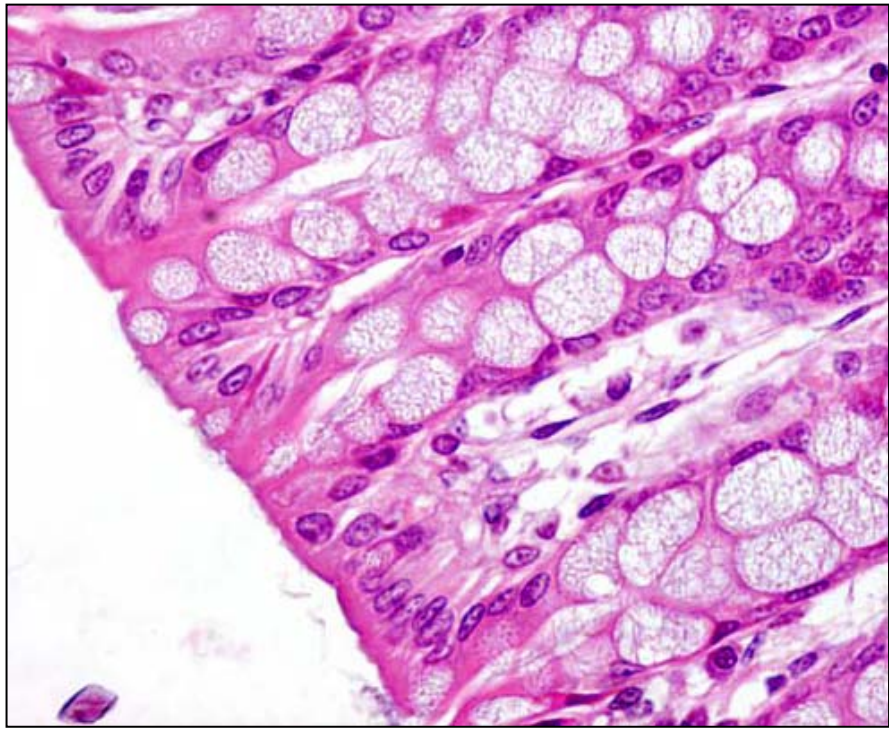


Figura IV.8. Inmunodetección de GLUT8 en colon de ratón **(A)** Incubación con el anticuerpo L0962. **(B)** Incubación con suero preinmune. Aumento de las imágenes 400X.

A



B

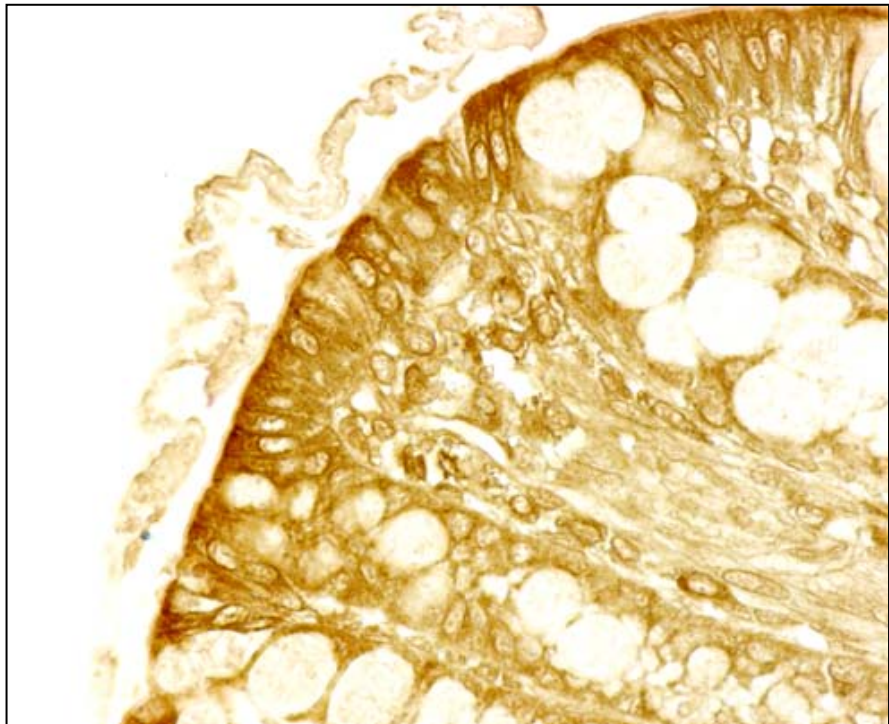
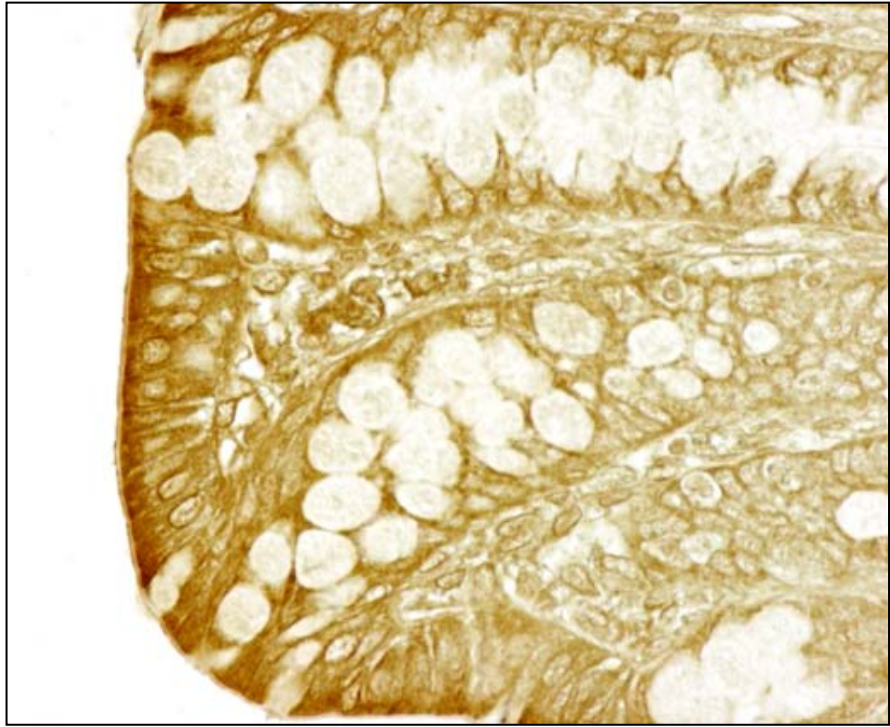


Figura IV.9. Inmunodetección de GLUT8 en colon de ratón. **(A)** Tinción Hematoxilina-Eosina. **(B)** Incubación con el anticuerpo L0962. Aumento de las imágenes 600X.

A



B

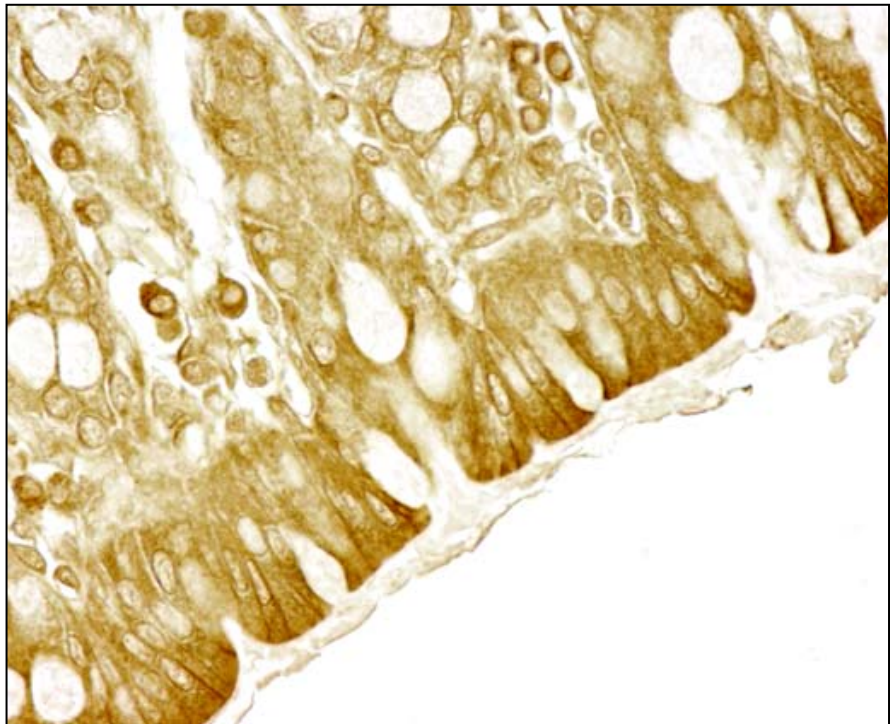


Figura IV.10. Inmunodetección de GLUT8 en colon de ratón. **(A)** y **(B)**. Incubación con el anticuerpo L0962. Aumento de las imágenes 600X.

A



B

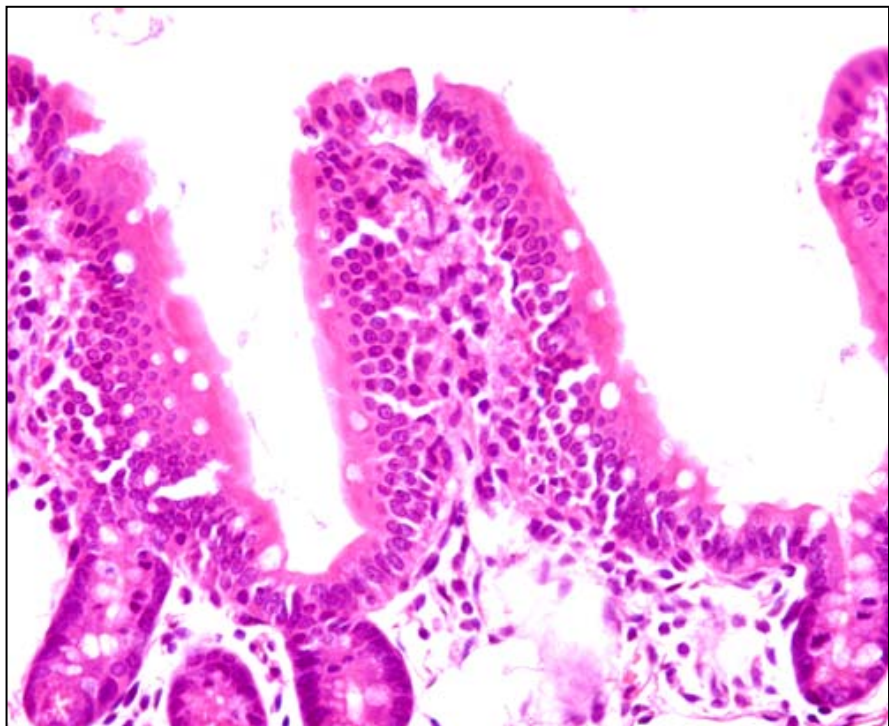
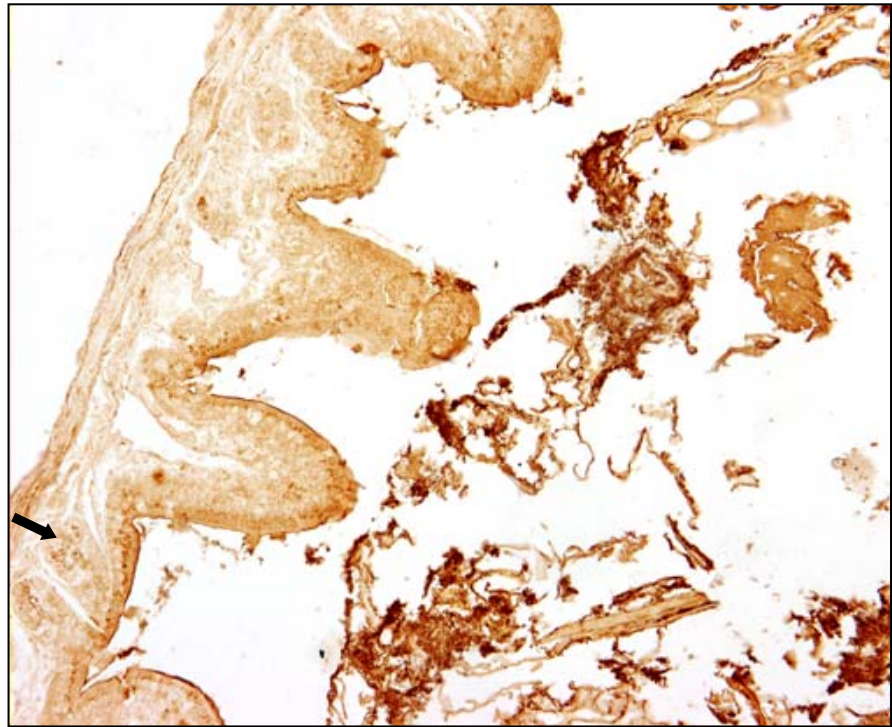


Figura IV.11. Cortes histológicos de ileon de ratón teñidos con Hematoxilina-Eosina. **(A)** Imagen a 200X. **(B)** Imagen a 400X.

A



B

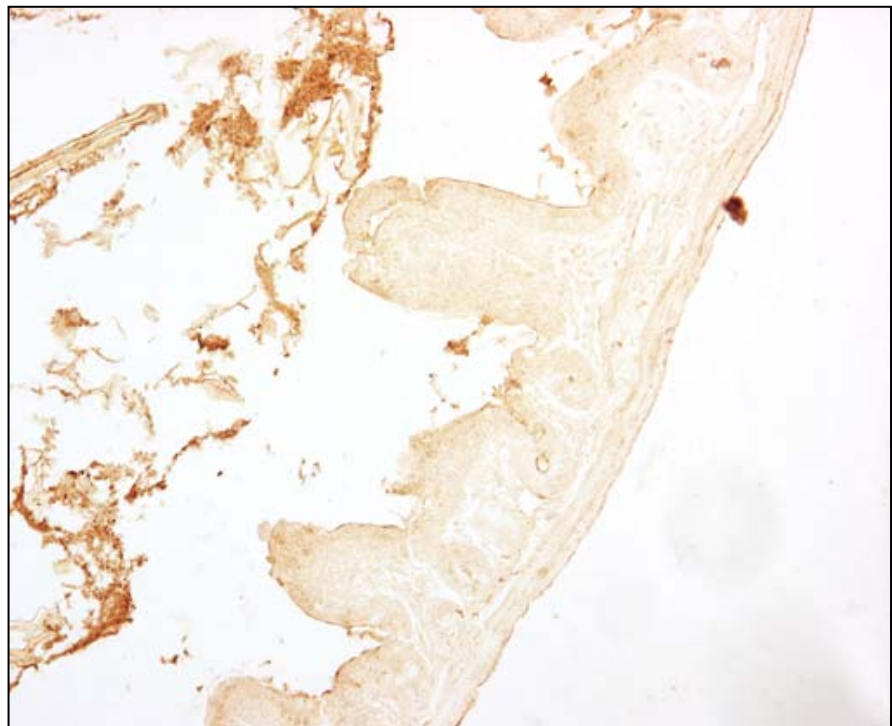


Figura IV.12. Inmunodetección de GLUT8 en ileon de ratón. **(A)** Incubación con el anticuerpo L0962. **(B)** Incubación con suero preinmune. Aumento de las imágenes 200X.

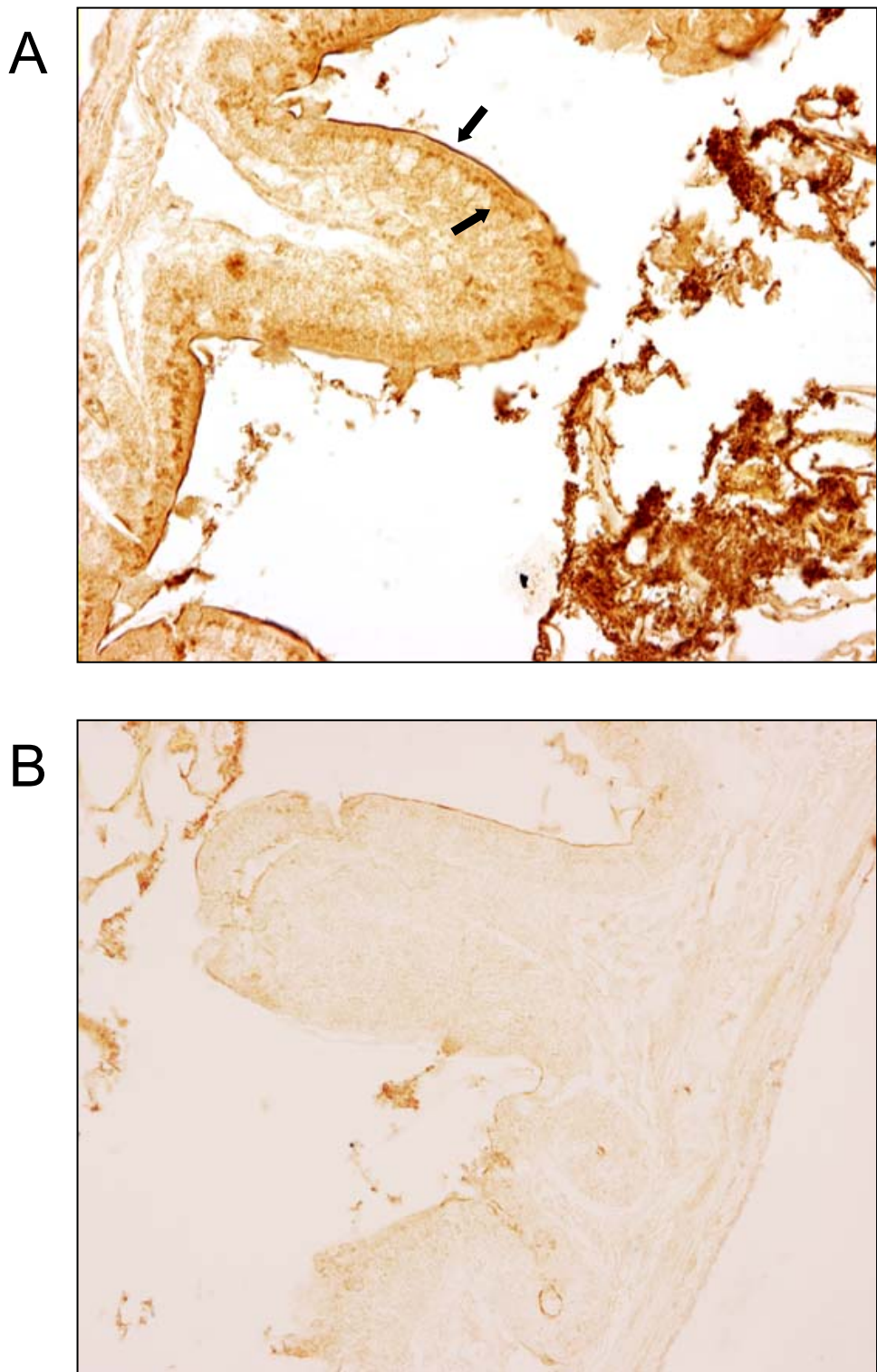


Figura IV.13. Inmunodetección de GLUT8 en las vellosidades de ratón. **(A)** Incubación con el anticuerpo L0962. **(B)** Incubación con suero preinmune. Aumento de las imágenes 400X.

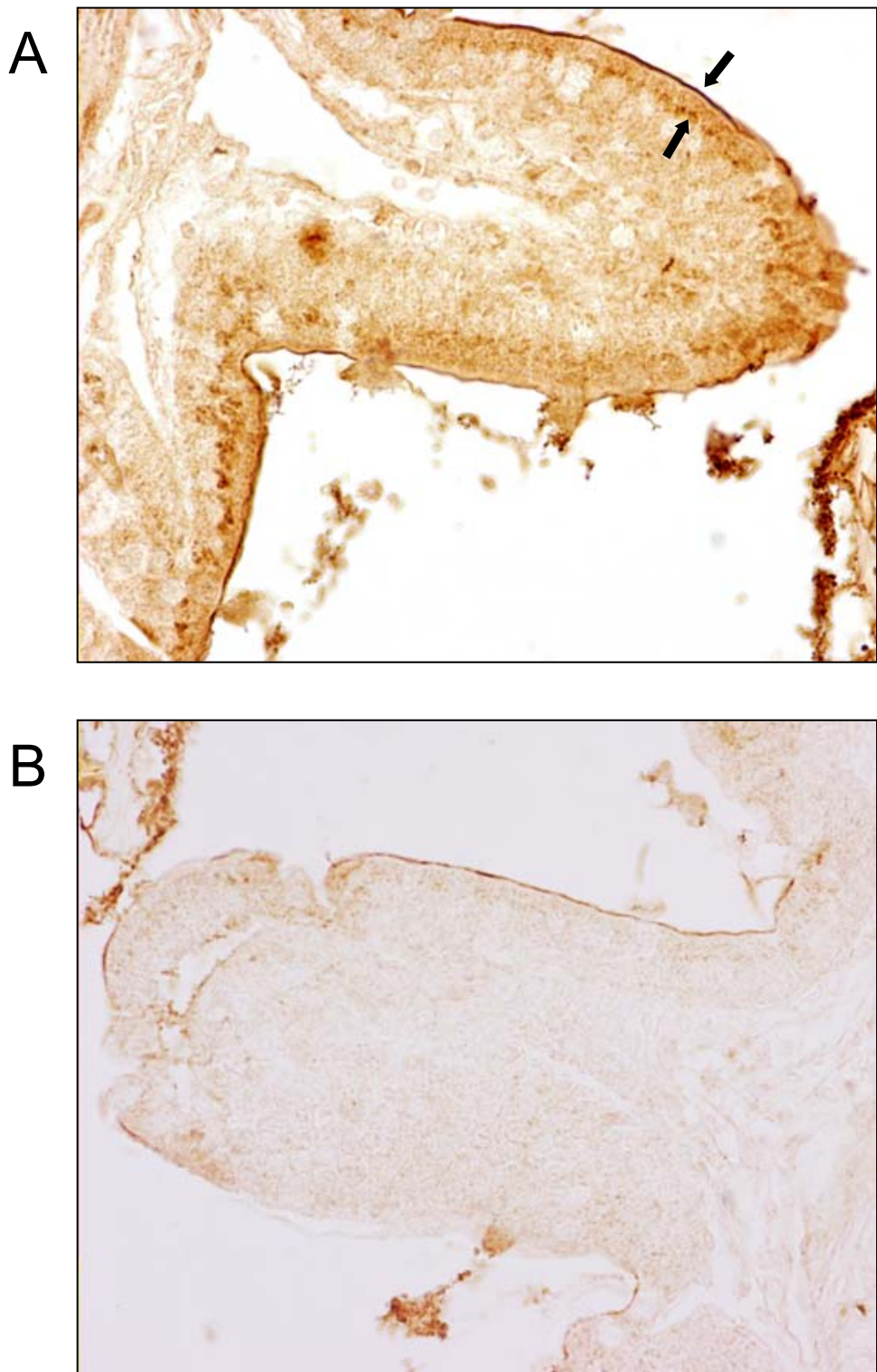


Figura IV.14. Inmunodetección de GLUT8 en ileon en las vellosidades de ileon de ratón. **(A)** Incubación con el anticuerpo L0962. **(B)** Incubación con suero preinmune. Aumento de las imágenes 600X.

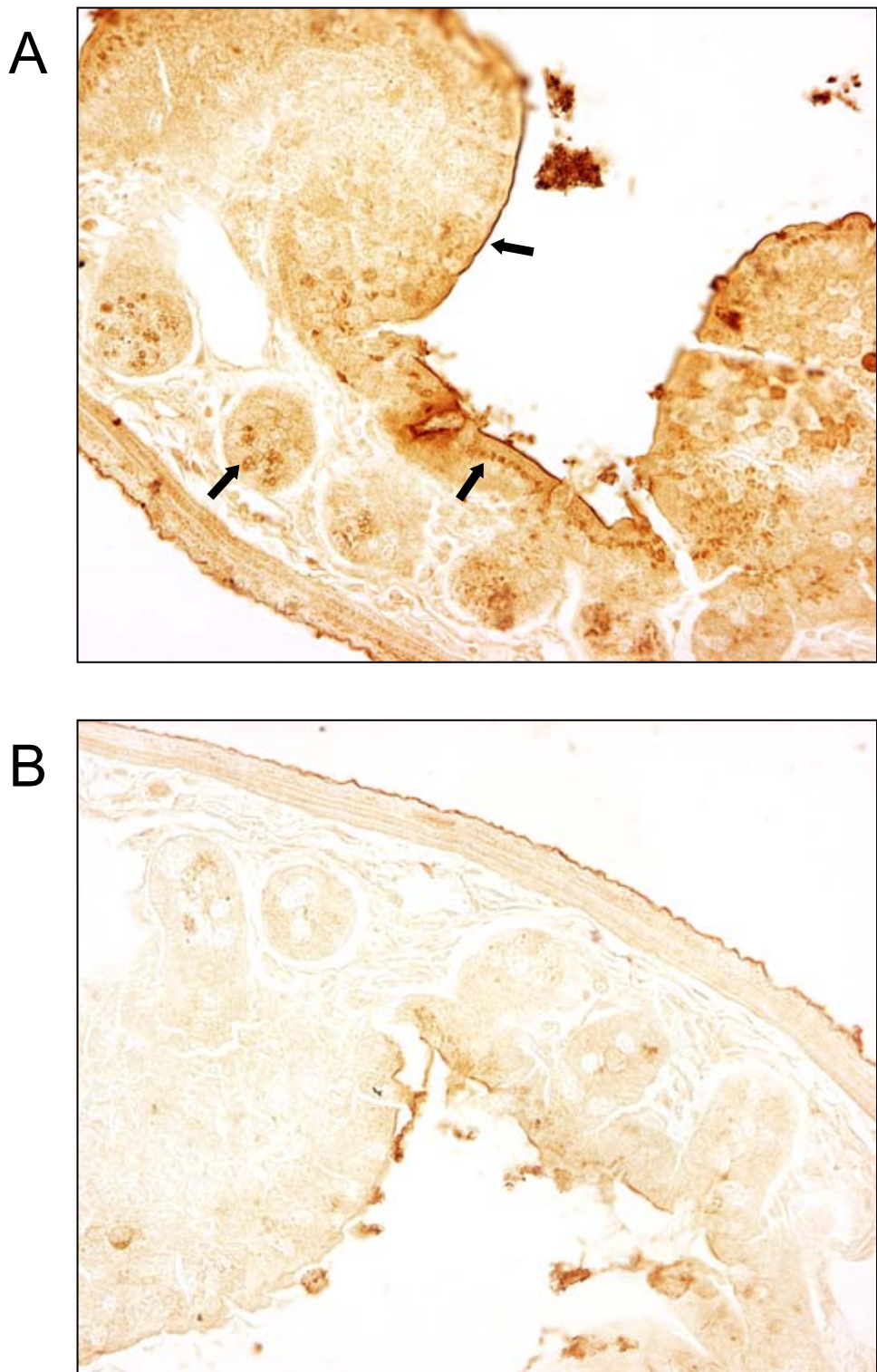


Figura IV.15. Inmunodetección de GLUT8 en las criptas de ileon de ratón. **(A)** Incubación con el anticuerpo L0962. **(B)** Incubación con suero preinmune. Aumento de las imágenes 400X.

1.4. Variaciones de la expresión de GLUT8 en diferentes estados fisiopatológicos

Se conoce que en determinadas situaciones metabólicas el proceso de absorción intestinal se ve alterado y esto normalmente va asociado a cambios en la expresión de los transportadores de nutrientes. El ayuno y la diabetes son dos estados fisiopatológicos que modulan la expresión de los transportadores de azúcares implicados en la absorción intestinal. Puesto que vimos que GLUT8 se expresa en las células epiteliales absortivas del intestino, quisimos conocer su respuesta antes estas dos situaciones.

1.4.1. Modelos experimentales

Para estudiar el efecto de la diabetes y el ayuno, se prepararon tres grupos de ratones macho de 7-8 semanas de edad. A los ratones del primer grupo se les indujo un estado de diabetes de tipo I mediante tratamiento con aloxana. El segundo grupo se consideró como control, y los ratones del tercer grupo fueron ayunados 24 horas antes de su sacrificio.

Se realizó un seguimiento de los tres grupos durante 5 días después del tratamiento. Se controló el peso de los ratones, y en el caso de los ratones diabéticos, adicionalmente se analizó el estado de glucemia en dos ocasiones: 2 días después del tratamiento con aloxana, y justo antes del sacrificio de los animales para comprobar que se había inducido correctamente el estado diabético, y que se mantenía hasta el momento del sacrificio de los animales. Además, en el grupo de ratones diabéticos también fueron observados otros caracteres secundarios propios de un estado de diabetes como es la poliuria y la hiperfagia.

En el análisis del peso de los animales (Figura IV.16 y Tabla IV.1), se puede observar un ligero descenso gradual en los animales tratados con aloxana, mientras que en el grupo control no se observa ninguna variación. En el tercer grupo, se observa un mantenimiento más o menos constante del peso durante los 4 primeros días de seguimiento pero las 24 horas de ayuno provocan en estos ratones una pérdida rápida de peso corporal.

El análisis de los niveles de glucemia de los animales tratados con aloxana comparado con los animales control (Figura IV.17 y Tabla IV.2), muestra una clara diferencia como resultado de la inducción del estado diabético de tipo I en estos animales. Mientras que los niveles normales de glucosa en sangre en un ratón adulto oscila alrededor de 180 mg/dl (estado postprandial), la concentración de glucosa aumenta drásticamente en los ratones diabéticos hasta unos valores de aproximadamente 800 mg/dl.

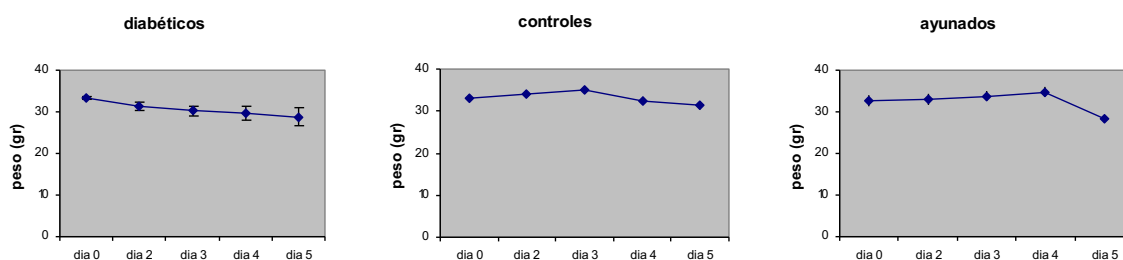


Figura IV.16. Peso de los animales diabéticos (A), controles (B) y ayunados (C), durante los 5 días posteriores al tratamiento.

TABLA IV.1. Pesos medios \pm el error estándar. Entre paréntesis el número de ratones analizados.

PESOS	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Diabéticos	33,40 \pm 0,40 (5)	31,28 \pm 0,90 (5)	30,14 \pm 1,20 (5)	29,68 \pm 1,80 (5)	28,80 \pm 2,29 (5)
Controles	33,07 \pm 0,19 (4)	33,95 \pm 0,05 (4)	35,15 \pm 0,28 (4)	32,55 \pm 0,90 (4)	31,52 \pm 0,97 (4)
Ayunados	32,80 \pm 1,33 (5)	33,04 \pm 1,45 (5)	33,78 \pm 1,21 (5)	34,82 \pm 1,29 (5)	28,24 \pm 0,37 (5)

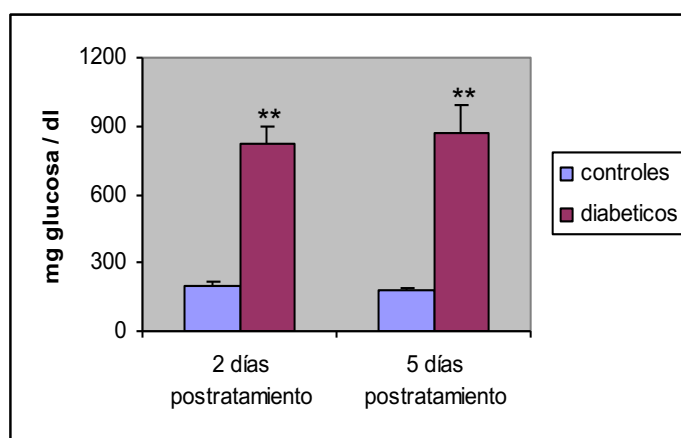


Figura IV.17. Histograma donde se representan los niveles de glucosa en sangre expresados en mg/dl de los animales diabéticos y controles, 2 días y 5 días post-tratamiento. **: $p < 0,005$ animales controles vs diabéticos.

TABLA IV.2. Valores medios de glucosa en sangre (mg/dl) \pm el error estándar (n = número de ratones analizados). **: $p < 0,005$ animales controles vs diabéticos.

GLUCEMIA	2 días post-tratamiento	5 días post-tratamiento
Controles	197,4 \pm 17,2 (4)	179,4 \pm 7,6 (4)
Diabéticos	821,6 \pm 75,8 (5)**	870,4 \pm 124,3 (5)**

1.4.2. Expresión de la proteína GLUT8 en los estados de diabetes y ayuno

La expresión de la proteína GLUT8 en animales diabéticos y ayunados, se estudió mediante western blot a partir de muestras de las diferentes fracciones intestinales obtenidas tal y como se describe en material y métodos. Para ello se utilizaron 50 µg de proteínas de cada muestra. Después de la detección de GLUT8, la membrana fue decapada y reutilizada para detectar la expresión de la actina y así conocer la cantidad relativa de proteínas transferidas a la membrana para cada una de ellas.

En la figura IV.18 se muestran los resultados de la expresión de GLUT8 correspondientes a los cuatro segmentos intestinales estudiados comparados con la actina. Como se puede observar en duodeno no se aprecia ninguna variación en la expresión de GLUT8 ni en los ratones diabéticos ni en los ayunados. Resultados similares se observan en colon. Por el contrario, las fracciones correspondientes a yeyuno e ileon sí que muestran diferencias en la expresión de GLUT8 siguiendo un patrón similar en ambas. En los ratones diabéticos, la expresión de GLUT8 aumenta frente a los animales control. Por otro lado, el estado de ayuno parece inducir una disminución en su expresión.

Estos resultados sugieren que respecto a los animales control, tanto la diabetes como el ayuno modifican la expresión de la proteína en yeyuno e ileon, segmentos intestinales donde la función absorbente es más importante. Sin embargo, en duodeno y colon el patrón de expresión parece no alterarse.

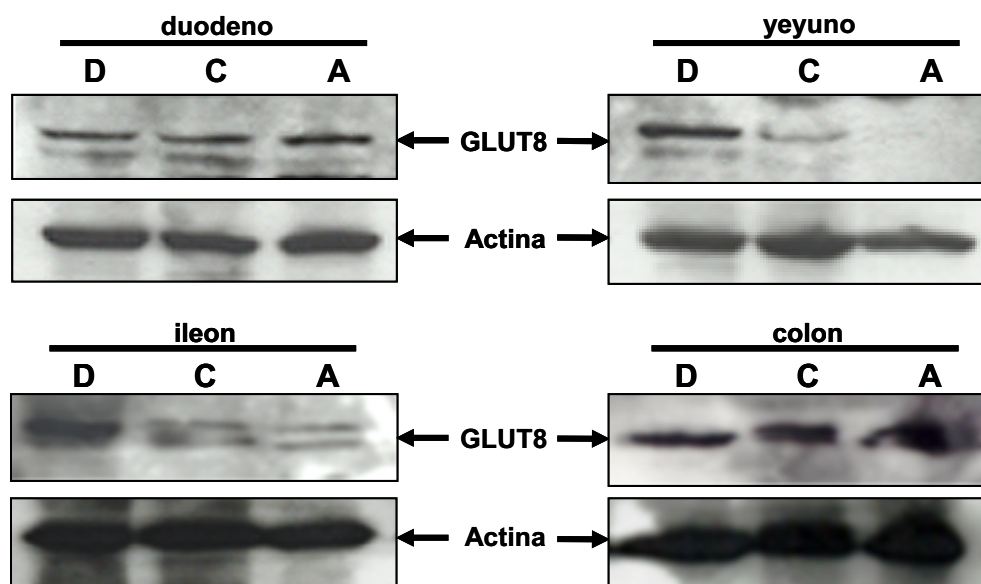


Figura IV.18. Estudio comparativo en los diferentes segmentos intestinales de la expresión de la proteína GLUT8 mediante western blot en animales diabéticos (D) y animales ayunados (A), respecto a animales control (C).

2. ANÁLISIS DE VARIANTES TRANSCRIPCIONALES DE GLUT8

La existencia de variantes transcripcionales ha sido descrita para algunos transportadores pertenecientes a la familia GLUT. Por esta razón, realizamos un estudio para conocer la posible existencia de otros transcritos del gen GLUT8.

2.1. Clonación e identificación de GLUT8 y sus variantes transcripcionales

Para analizar la posible existencia de variantes transcripciones en la expresión de GLUT8 a nivel de su ARNm, en primer lugar amplificamos mediante RT-PCR y a partir de ARN extraído de testículo e intestino la secuencia codante de GLUT8 utilizando los cebadores MsG8Exon1-up y MsG8 Exon10-as. En segundo lugar, clonamos el producto amplificado en la RT-PCR utilizando el sistema vector pCR 2.1 TOPO tal y como se describe en el apartado de material y métodos.

En la figura IV.19 se muestra el resultado de la amplificación por PCR donde se observa una banda de 1447 pb correspondiente al tamaño esperado de GLUT8 tanto en intestino como en testículo. Cuando clonamos el producto amplificado y lo analizamos por digestión enzimática, observamos que en el caso de intestino aparecían fragmentos de diferentes tamaños ligados al vector TOPO, mientras que en testículo, solamente aparecía clonado un fragmento cuyo tamaño correspondía a la secuencia completa de GLUT8.

Para descartar la posibilidad de que los diferentes fragmentos observados en intestino fueran producto de reacciones inespecíficas, repetimos estos experimentos de amplificación y clonación varias veces, tanto a partir de tejido intestinal como de testículo utilizando diferentes temperaturas de anillamiento (55, 60 y 64°C), y diferentes enzimas Taq Polimerasas obteniendo siempre resultados similares. Por lo tanto, estos resultados sugerían claramente la posible existencia de diferentes transcritos de GLUT8.

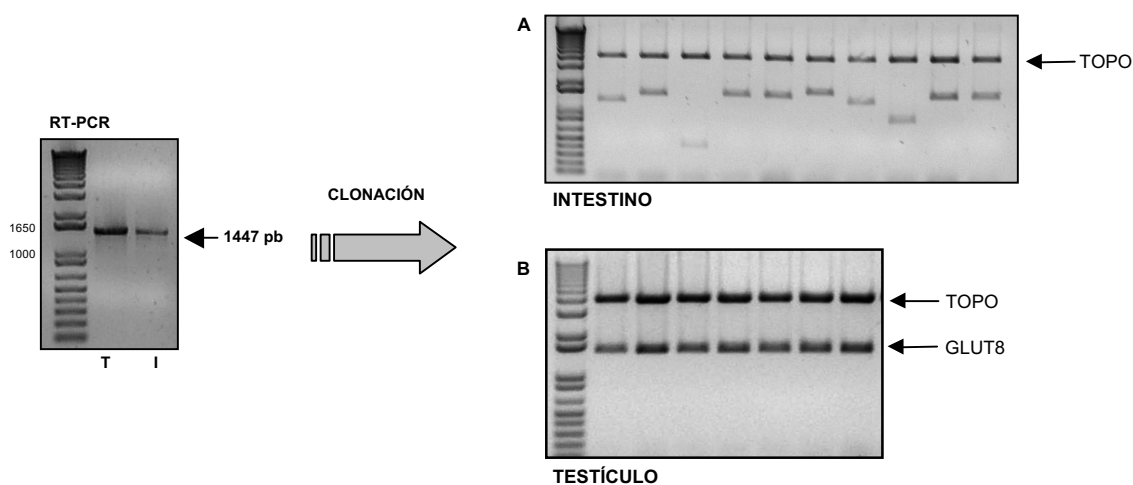


Figura IV.19. RT-PCR a partir de ARN de testículo (T) y de ileon (I). Condiciones de la PCR: temperatura de anillamiento 55°C, 2 minutos de elongación a 72°C, 35 ciclos. Resultados en ileon (A) y testículo (B) de la digestión del plásmido TOPO con la enzima de restricción Eco RI.

Para corroborar estos resultados decidimos identificar mediante southern blot que los fragmentos amplificados por RT-PCR correspondían a la secuencia de GLUT8. De cada muestra se analizamos dos fracciones: una tratada con exonucleasa S1 para eliminar posibles heteroduplex de ADN (hebras de ADN que se aparean de manera inespecífica), y la otra, sin tratamiento con S1. La sonda empleada fue un fragmento de 1011 pb amplificado con los cebadores HGLUT8-U y MsG8Exon10-as. Para comprobar las diferencias observadas entre intestino y testículo, realizamos un southern blot comparativo entre ambos tejidos (Figura IV.20). Tras la exposición de la película a diferentes tiempos comprobamos que en intestino, además de la secuencia entera de GLUT8, aparecían otros transcritos de menor tamaño, que justamente correspondían con el tamaño de algunos de los fragmentos amplificados (Figura IV.19). Sin embargo, la intensidad de la señal de estos fragmentos era menor que la señal que mostraba la secuencia completa de GLUT8, lo cual explica que en una PCR normal los diferentes transcritos no se visualicen. En testículo sólo se identificó el transcrito correspondiente a la secuencia entera de GLUT8 (Figura IV.20).

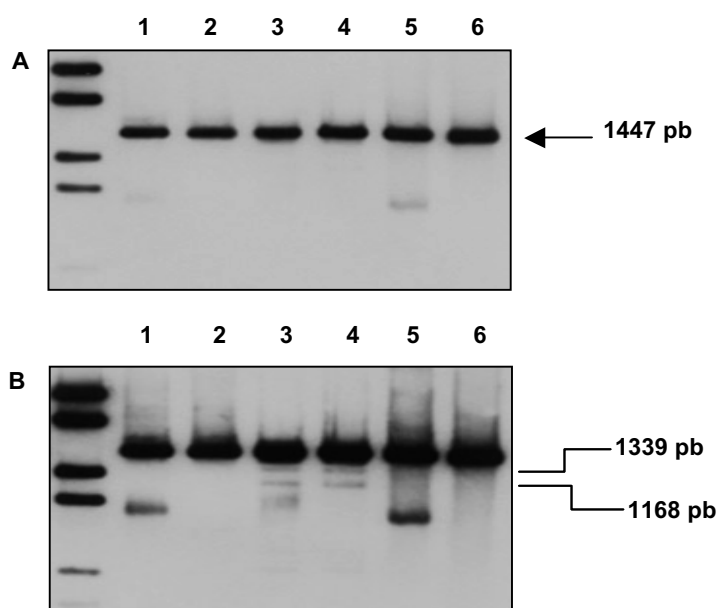


Figura IV.20. Southern blot sobre una RT-PCR de GLUT8 a partir de intestino y testículo de ratón. En ambas fotografías (A y B), las líneas 1 y 2 corresponden al producto de PCR a partir de ADNc de testículo, las líneas 3 y 4 al producto de PCR a partir de ADNc de intestino, y las líneas 5 y 6 al producto de PCR a partir de GLUT8 clonado en TOPO. Las líneas 2, 4 y 6 fueron previamente digeridas con exonucleasa S1. En la fotografía (A) se muestra el resultado de 3 minutos de exposición de la película a la membrana, y en la fotografía (B) se muestra el resultado después de 20 minutos de exposición.

Finalmente, la confirmación definitiva de la existencia de estos transcritos amplificados mediante RT-PCR, se realizó mediante la secuenciación bidireccional de dichos fragmentos. El resultado del análisis de la secuencia de los ADNc clonados nos confirmó definitivamente la existencia de varios transcritos. Estos transcritos se denominaron SP1, SP2 y SP3; y, como se puede observar en la figura IV.21, son consecuencia de un proceso de maduración del transcrito primario dando lugar a fragmentos más cortos en los que desaparecen uno o más exones de la secuencia completa de GLUT8 (1447 pb). De esta manera, en SP1 (1339 pb) faltaría el exón VII, en SP2 (1168pb) desaparecen los exones VII y VIII, mientras que en SP3 (870 pb) faltarían los exones II, III, IV y VII.

Mediante la técnica de southern blot la forma SP3 no se detectó, quizás porque la eliminación de varios exones dificultó la hibridación con la sonda utilizada, o quizás también a una menor expresión de este transcrito.

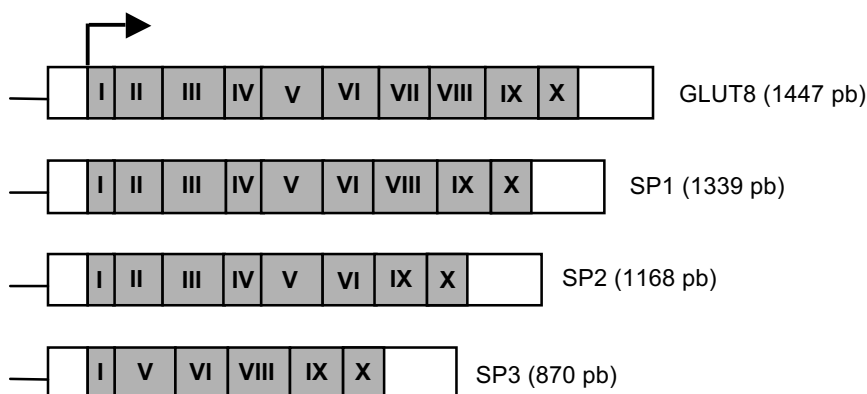


Figura IV.21. Esquema de la secuencia entera de GLUT8 y de los diferentes transcritos. En SP1 desaparece el exón VII; en SP2 se omiten los exones VII y VIII; y en SP3 faltan los exones II, III, IV y VII.

En resumen, los resultados obtenidos tras la secuenciación de los fragmentos clonados puso de manifiesto la secuencia completa de GLUT8 tanto en intestino como en testículo, tal y como había sido publicada por otros grupos. Pero además, en intestino, identificamos tres nuevas secuencias amplificadas (SP1, SP2 y SP3), todas ellas correspondientes a diferentes transcritos como resultado de un procesado alternativo de corte y empalme del gen de GLUT8.

La comparación de las secuencias nucleóticas obtenidas en la secuenciación de los transcritos SP1, SP2 y SP3 con la secuencia entera de GLUT8 de ratón (NM_019488) se muestra en la figura IV.22.

```

GLUT8 1 agttcgcggg tcaggtcctg ctgacatgtc tcccagggac ccccaggaga cgcagccgct attgcggcca ccggaagcca ggactccccg cggccgccgg
SP1 1 agttcgcggg tcaggtcctg ctgacatgtc tcccagggac ccccaggaga cgcagccgct attgcggcca ccggaagcca ggactccccg cggccgccgg
SP2 1 agttcgcggg tcaggtcctg ctgacatgtc tcccagggac ccccaggaga cgcagccgct attgcggcca ccggaagcca ggactccccg cggccgccgg
SP3 1 agttcgcggg tcaggtcctg ctgacatgtc tcccagggac ccccaggaga cgcagccgct attgcggcca ccggaagcca .....

GLUT8101 gtcttctctg cttcctctgc cgcctctctg ggaccctca gcttcggctt cgcctctctg tacagctccc ccgcatccc cagcctcggg cgcaccgcac
SP1 101 gtcttctctg cttcctctgc cgcctctctg ggaccctca gcttcggctt cgcctctctg tacagctccc ccgcatccc cagcctcggg cgcaccgcac
SP2 101 gtcttctctg cttcctctgc cgcctctctg ggaccctca gcttcggctt cgcctctctg tacagctccc ccgcatccc cagcctcggg cgcaccgcac
SP3 .....

GLUT8201 ccccgccctc ggcctctgga gacaatgcgg cctcctggtt cggggccgct gtgaccctgg cgcctctctg agggggcata ctggggcggg ggtcctctga
SP1 201 ccccgccctc ggcctctgga gacaatgcgg cctcctggtt cggggccgct gtgaccctgg cgcctctctg agggggcata ctggggcggg ggtcctctga
SP2 201 ccccgccctc ggcctctgga gacaatgcgg cctcctggtt cggggccgct gtgaccctgg cgcctctctg agggggcata ctggggcggg ggtcctctga
SP3 .....

GLUT8301 ccgtgcaggg cgaagctgga gctctctgct ctgcaaccgt cctctctgta ctggctttgc tgtcatcacc cggcccggg atgtgtggat gctgctcggg
SP1 301 ccgtgcaggg cgaagctgga gctctctgct ctgcaaccgt cctctctgta ctggctttgc tgtcatcacc cggcccggg atgtgtggat gctgctcggg
SP2 301 ccgtgcaggg cgaagctgga gctctctgct ctgcaaccgt cctctctgta ctggctttgc tgtcatcacc cggcccggg atgtgtggat gctgctcggg
SP3 .....

GLUT8401 ggcgcctctc tcaccggcct tgcctctgga gtgcctctac tagtggcacc ggtttacatc tcggaaatcg cctaccocagc tgtcogagga ctgctcggct
SP1 401 ggcgcctctc tcaccggcct tgcctctgga gtgcctctac tagtggcacc ggtttacatc tcggaaatcg cctaccocagc tgtcogagga ctgctcggct
SP2 401 ggcgcctctc tcaccggcct tgcctctgga gtgcctctac tagtggcacc ggtttacatc tcggaaatcg cctaccocagc tgtcogagga ctgctcggct
SP3 .....

GLUT8501 cctgtgtgca gctgatggtt gtaactggca tctcctctgc ctatgtggca gctgggttcc tagagtggcg ctggctggcc gtgctgggct gttgtccccc
SP1 501 cctgtgtgca gctgatggtt gtaactggca tctcctctgc ctatgtggca gctgggttcc tagagtggcg ctggctggcc gtgctgggct gttgtccccc
SP2 501 cccacgtagg cctgtgtgccc atcgcggcgg agcctgtgga ctatgtggca gctgggttcc tagagtggcg ctggctggcc gtgctgggct gttgtccccc
SP3 81 .....

GLUT8601 cacctctcat ctgctgtcca tgtgtctac gcccgaaacc ccacgttttc tctcactca acaccagtac caggaggcca tggctgcctt gcgctctctg
SP1 601 cacctctcat ctgctgtcca tgtgtctac gcccgaaacc ccacgttttc tctcactca acaccagtac caggaggcca tggctgcctt gcgctctctg
SP2 601 cacctctcat ctgctgtcca tgtgtctac gcccgaaacc ccacgttttc tctcactca acaccagtac caggaggcca tggctgcctt gcgctctctg
SP3 131 cgggtgggct ggggaacctc cctctgctc ctcatgtcag agatcttccc tctgcatgto acaccagtac caggaggcca tggctgcctt gcgctctctg

GLUT8701 tggggctctg aggaggctg ggaagagccc cctgttgggg ctgagcacca gggcttccag ctggccctgc tgaggcgccc tggcatctac aagccctca
SP1 701 tggggctctg aggaggctg ggaagagccc cctgttgggg ctgagcacca gggcttccag ctggccctgc tgaggcgccc tggcatctac aagccctca
SP2 701 tggggctctg aggaggctg ggaagagccc cctgttgggg ctgagcacca gggcttccag ctggccctgc tgaggcgccc tggcatctac aagccctca
SP3 231 tggggctctg aggaggctg ggaagagccc cctgttgggg ctgagcacca gggcttccag ctggccctgc tgaggcgccc tggcatctac aagccctca

GLUT8801 tcatcgcat ttcctctcat gtcttccagc agctgtcagg ggtcaatgct atcatgttct atgccaacag catctctcag gaggccaagt tcaagagacg
SP1 801 tcatcgcat ttcctctcat gtcttccagc agctgtcagg ggtcaatgct atcatgttct atgccaacag catctctcag gaggccaagt tcaagagacg
SP2 801 tcatcgcat ttcctctcat gtcttccagc agctgtcagg ggtcaatgct atcatgttct atgccaacag catctctcag gaggccaagt tcaagagacg
SP3 331 tcatcgcat ttcctctcat gtcttccagc agctgtcagg ggtcaatgct atcatgttct atgccaacag catctctcag gaggccaagt tcaagagacg

GLUT8901 cagcctggcc tcggtoactg tgggcataat ccaggtcctg ttcactgctg tggcggcctt catcatggac agagcagggc gaaggctgct cctggccttg
SP1 .....
SP2 .....
SP3 .....

GLUT81001tcgggtgtga tcatggtgtt cagtatgagt gcctttggta cctacttcaa actgaccagc agcctcccca gcaactctct ccactgtagc ctggtgccca
SP1 895...ggtgtga tcatggtgtt cagtatgagt gcctttggta cctacttcaa actgaccagc agcctcccca gcaactctct ccactgtagc ctggtgccca
SP2 .....
SP3 425...ggtgtga tcatggtgtt cagtatgagt gcctttggta cctacttcaa actgaccagc agcctcccca gcaactctct ccactgtagc ctggtgccca

GLUT81101tcgcgcgga gcctgtggtt gtccaagtgg gactggcctg gctggctgta ggcagcatgt gcctctctcat tgcctggctt cgggtgggct ggggacctat
SP1 992 tcgcgcgga gcctgtggtt gtccaagtgg gactggcctg gctggctgta ggcagcatgt gcctctctcat tgcctggctt cgggtgggct ggggacctat
SP2 895 .....
SP3 522 tcgcgcgga gcctgtggtt gtccaagtgg gactggcctg gctggctgta ggcagcatgt gcctctctcat tgcctggctt cgggtgggct ggggacctat

GLUT81201ccccctggctc ctcactgtagc agatcttccc tctgcatgto aagggtgtgg ctacoggcac ctgtgtctctc accaactggt tcatggcctt tctagtgtacc
SP1 1092ccccctggctc ctcactgtagc agatcttccc tctgcatgto aagggtgtgg ctacoggcac ctgtgtctctc accaactggt tcatggcctt tctagtgtacc
SP2 921ccccctggctc ctcactgtagc agatcttccc tctgcatgto aagggtgtgg ctacoggcac ctgtgtctctc accaactggt tcatggcctt tctagtgtacc
SP3 622ccccctggctc ctcactgtagc agatcttccc tctgcatgto aagggtgtgg ctacoggcac ctgtgtctctc accaactggt tcatggcctt tctagtgtacc

GLUT81301aaagagtcca gcagcgtcat ggagatgctc agaccctacg gtgcctctctg gctcaccgct gcctctctcgc ctctcagtgct cctattcaca ctgaccgttg
SP1 1192aaagagtcca gcagcgtcat ggagatgctc agaccctacg gtgcctctctg gctcaccgct gcctctctcgc ctctcagtgct cctattcaca ctgaccgttg
SP2 1021aaagagtcca gcagcgtcat ggagatgctc agaccctacg gtgcctctctg gctcaccgct gcctctctcgc ctctcagtgct cctattcaca ctgaccgttg
SP3 722aaagagtcca gcagcgtcat ggagatgctc agaccctacg gtgcctctctg gctcaccgct gcctctctcgc ctctcagtgct cctattcaca ctgaccgttg

GLUT81401tccctgagac taaaggcagg actctggaac aagtcaacag ccattctcag ggacgatgac agacccttt
SP1 1292tccctgagac taaaggcagg actctggaac aagtcaacag ccattctcag ggacgatgac agacccttt
SP2 1121tccctgagac taaaggcagg actctggaac aagtcaacag ccattctcag ggacgatgac agacccttt
SP3 822tccctgagac taaaggcagg actctggaac aagtcaacag ccattctcag ggacgatgac agacccttt

```

Figura IV.22. Comparación de secuencias de SP1, SP2 y SP3 con la secuencia de GLUT8 (NM_019488) obtenida a partir del NCBI. En sombreado se han marcado los "atg" de inicio de la traducción, y los diferentes codones de finalización para cada uno de los transcritos de GLUT8.

2.2. Análisis teórico de la secuencia proteica resultante a partir de los transcritos aislados

Las secuencias de ADNc obtenidas a partir de los diferentes transcritos amplificados fueron analizadas mediante diferentes programas informáticos del servidor NCBI.

En primer lugar, tratamos de ver cual sería la secuencia de aminoácidos correspondiente a la secuencia de nucleótidos mediante el programa ORF Finder (Open Reading Frame Finder), que localiza los diferentes codones de inicio y de parada de la traducción proteica.

Los resultados obtenidos mediante este análisis nos confirmaron que la secuencia completa correspondiente a GLUT8 codificaba una proteína de 477 aminoácidos. Por otra parte, las secuencias de ADNc correspondientes a los transcritos SP1 y SP2 daban lugar secuencias de aminoácidos de 291 y 329 aminoácidos respectivamente (Figura IV.23), mientras que el transcrito SP3 originaba una secuencia proteica de tan sólo 71 aminoácidos. Esto es debido a que aparece un codón "stop" más temprano en la nueva secuencia generada para cada transcrito.

Una vez obtenida la secuencia teórica proteica, ésta fue analizada para conocer la posible estructura secundaria. Este análisis fue realizado con diferentes programas informáticos disponibles en Internet, y en particular con el servidor SOUSI. Gracias a estos programas analizamos el perfil de hidrofobicidad de dichas secuencias y observamos que tanto los transcritos SP1 y SP2 codificarían una proteína de 7 segmentos transmembrana, mientras que el transcrito SP3 daría lugar a una proteína soluble muy pequeña (Figura IV.24).

En los tres casos se pierde la parte C-terminal. La secuencia de aminoácidos de SP1 y SP2 son idénticas a GLUT8 hasta el aminoácido 290, sin embargo se pierden varios motivos conservados y necesarios para la función transportadora.


```

1  MSPEDPQETQ PLLRPPEART PRGRRVFLAS FAAALGFLLSF GFALGYSSPA IPSLRRTAPP GLUT8
1  MSPEDPQETQ PLLRPPEART PRGRRVFLAS FAAALGFLLSF GFALGYSSPA IPSLRRTAPP SP1
1  MSPEDPQETQ PLLRPPEART PRGRRVFLAS FAAALGFLLSF GFALGYSSPA IPSLRRTAPP SP2
1  MSPEDPQETQ PLLRPPEARL GPRVALAG RAGLCAPHPH AAHVLHARN PTFSPHSTPV SP3
*****
61  ALRLGDNAAS WFGAVVTLGA AAGGILGGWL LDRAGRKLSL LLCTVPFVTG FAVITAARDV GLUT8
61  ALRLGDNAAS WFGAVVTLGA AAGGILGGWL LDRAGRKLSL LLCTVPFVTG FAVITAARDV SP1
61  ALRLGDNAAS WFGAVVTLGA AAGGILGGWL LDRAGRKLSL LLCTVPFVTG FAVITAARDV SP2
61  PGGHGCLALP VGL* 71
*****

121  WMLLGGRLLT GLACGVASLV APVYISEIAY PAVRGLLGSC VQLMVVTGIL LAYVAGWVLE GLUT8
121  WMLLGGRLLT GLACGVASLV APVYISEIAY PAVRGLLGSC VQLMVVTGIL LAYVAGWVLE SP1
121  WMLLGGRLLT GLACGVASLV APVYISEIAY PAVRGLLGSC VQLMVVTGIL LAYVAGWVLE SP2
*****

181  WRWLAVLGCV PPTLMLLLMC YMPETPRFLL TQHQYQEAMA ALRFLWGSEE GWEEPPVGAE GLUT8
181  WRWLAVLGCV PPTLMLLLMC YMPETPRFLL TQHQYQEAMA ALRFLWGSEE GWEEPPVGAE SP1
181  WRWLAVLGCV PPTLMLLLMC YMPETPRFLL TQHQYQEAMA ALRFLWGSEE GWEEPPVGAE SP2
*****

241  HQGFQLALLR RPGIYKPLII GISLMVFQQL SGVNAIMFYA NSIFEEAKFK DSSLASVTVG GLUT8
241  HQGFQLALLR RPGIYKPLII GISLMVFQQL SGVNAIMFYA NSIFEEAKFK V* 291 SP1
241  HQGFQLALLR RPGIYKPLII GISLMVFQQL SGVNAIMFYA NSIFEEAKFK ALRWAGDPSP SP2
*****

301  IIQVLFTAVA ALIMDRAGR LLLALSGVIM VFMSAFGTY FKLTQSLPSN SSHVGLVPIA GLUT8
301  GSSCQRSSLC MSRVWLPASV SSPTGSWPF* 329 SP2

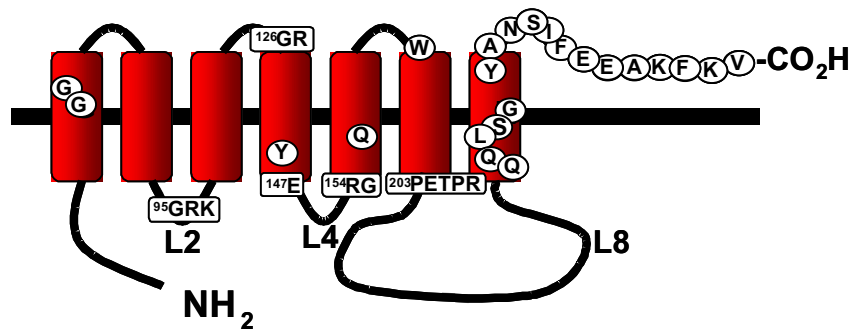
361  AEPVDVQVGL AWLAVGSMCL FIAGFAVGWG PIPWLLMSEI FPLHVKGVAT GICVLTNWFM GLUT8

421  AFLVTKEFSS VMEMLRPYGA FWLTAAFCAL SVLFTLTVVP ETKGRTLEQV TAHFEGR* 477

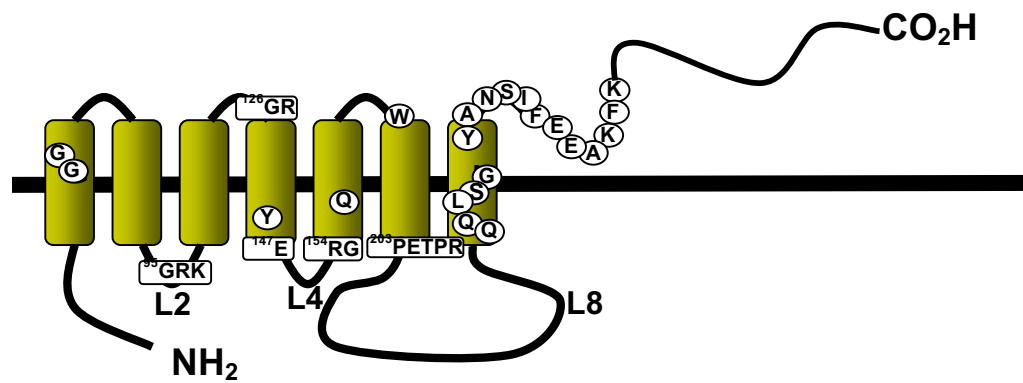
```

Figura IV.23. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de GLUT8 y las posibles isoformas de esta proteína como producto de un procesado alternativo de su gen. El alineamiento fue realizado con el programa ClustalX. Las secuencias sombreadas indican los residuos idénticos para las 4 isoformas. Residuos idénticos en 3 de las secuencias están marcados con asterisco (*). En la parte superior están marcadas las posiciones aproximadas de los dominios transmembrana de GLUT8.

SP1



SP2



SP3

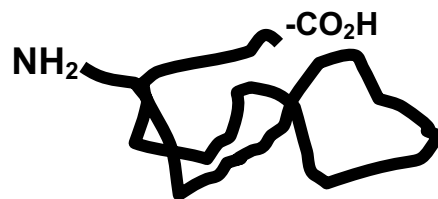


Figura IV.24. Estructura hipotética de las posibles isoformas de SP1, SP2 y SP3 deducidas con la ayuda del programa SOUSI.

2.3. Amplificación de los diferentes transcritos por PCR

Para detectar la existencia de los diferentes transcritos en tejido intestinal mediante la técnica de PCR, se diseñaron cebadores que amplificaban de manera específica cada uno de ellos. Esta estrategia permitió visualizar los transcritos SP1, SP2 y SP3, que dado su bajo nivel de expresión en comparación con GLUT8, no se amplificaban en una PCR normal con los cebadores externos. Para ello se utilizaron los cebadores descritos en el apartado 2.9 de material y métodos (Tabla III.4). En cada caso, como control positivo utilizamos los diferentes transcritos subclonados en el plásmido pcDNA.

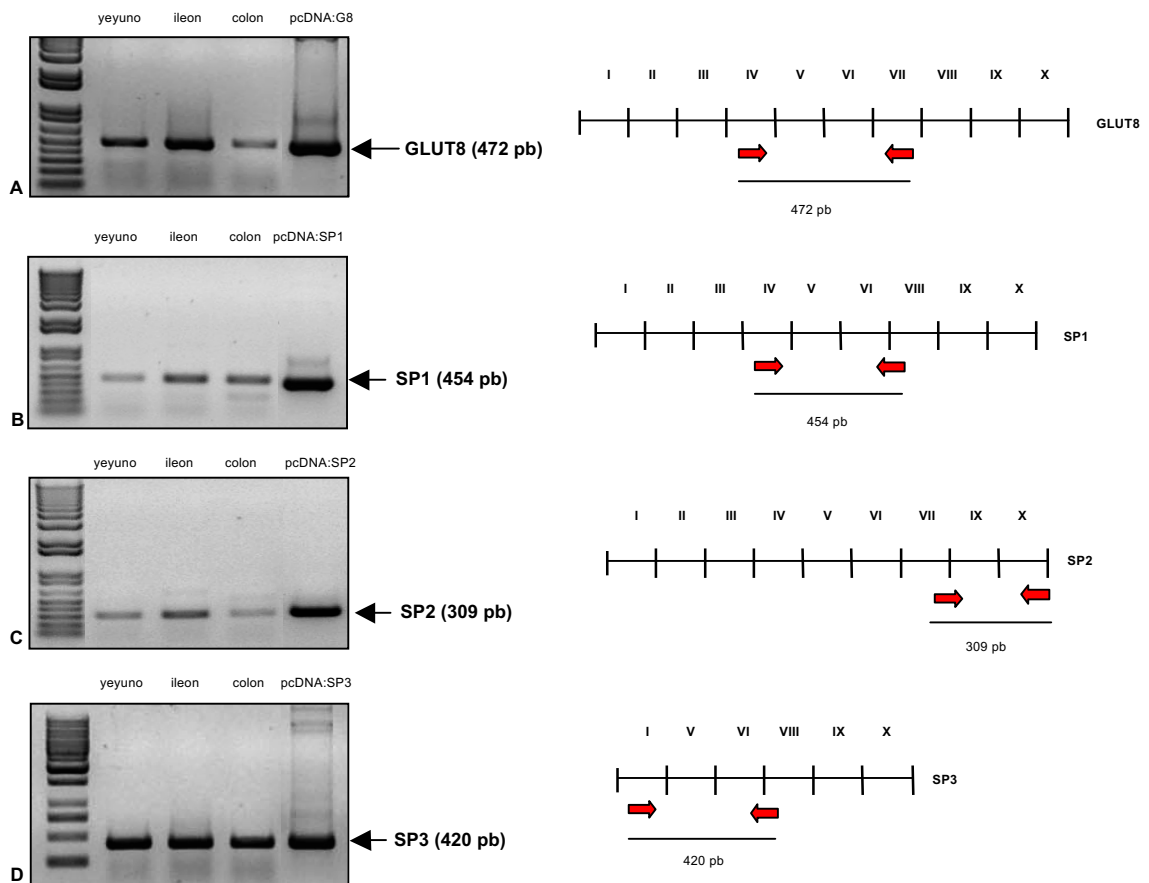


Figura IV.25. Amplificación de los diferentes transcritos por PCR utilizando los cebadores específicos. **(A)** Amplificación de GLUT8 con MsG8Exon1-up y MsG8Exon7-as. **(B)** Amplificación de SP1 con HGLUT8-U y MsSP1y3-as. **(C)** Amplificación de SP2 con MsSP2sens y MsG8Exon7. **(D)** Amplificación de SP3 con MsExon1-up y MsSP1y3-as.

Para amplificar GLUT8 de manera específica se utilizó un cebador localizado en el exón VII (MsG8Exon7-as) ya que este exón desaparece en los otros tres transcritos aislados. Como se puede observar en la figura IV.25.A, GLUT8 se amplifica en todas las fracciones intestinales analizadas como se había comprobando anteriormente utilizando los cebadores externos.

Para amplificar específicamente el transcrito SP1 utilizamos un cebador localizado en el exón IV (HGLUT8-U) que no está presente en el transcrito SP3, y otro cebador cuya secuencia pertenece a la parte final del exón VI y a la parte inicial del exón VIII (MsSP1y3-as), y que no se une ni a la secuencia de GLUT8, ni a la de SP2. Como se puede observar en la figura IV.25.B, SP1 también está presente en todas las fracciones intestinales.

Para amplificar el transcrito SP2 se utilizó el cebador externo localizado en el exón X (MsG8Exon10-as) y un cebador específico cuya secuencia contiene la parte final del exón VI y la inicial del exón IX, por lo que no se une a la secuencia de los otros transcritos. Como se puede observar en la figura IV.25.C, SP2 también se amplifica en todas las fracciones intestinales.

Finalmente, realizamos la amplificación de SP3 utilizando el cebador externo MsG8Exon1-up y el cebador MsSP1y3-as, que amplifica tanto a SP1 como a SP3. Como se puede observar en la figura IV.25.D, estos cebadores amplificaron solamente el transcrito SP3 en todas las fracciones intestinales analizadas. Sin embargo, el transcrito SP1 en este caso no se amplificó, quizás debido a las propias condiciones de la reacción de PCR favorecen la amplificación de SP3.

2.4. Estudio de la posible función de SP1, SP2 y SP3 en la expresión de GLUT8

Para estudiar la posible función de los transcritos aislados sobre la expresión de GLUT8 utilizamos como modelo experimental las células 3T3-L1 que su estado adipocitario expresan GLUT8 (Scheepers y cols., 2001). Para ello, estas células fueron transfectadas transitoriamente con los diferentes transcritos, tal y como se detalla en el apartado de material y métodos.

En primer lugar, comprobamos la expresión de GLUT8 en las células 3T3-L1 diferenciadas mediante la técnica de RT-PCR utilizando los cebadores MsExon1-up y MsExon10-as; y mediante western blot e inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti G8-COOH (L0962).

Los resultados obtenidos mediante RT-PCR (Figura IV.26.A) demuestran la expresión de ARNm de GLUT8 en las células 3T3-L1 diferenciadas ya que se amplifica un fragmento de 1447 pb, como los obtenidos en tejido intestinal y testículo de ratón. Mediante western blot (Figura IV.26.B) se observa la expresión de la proteína GLUT8 que se detecta como una señal de aproximadamente 42-45 kDa. Los ensayos de inmunofluorescencia (Figura IV.26.C) confirmaron la existencia de la proteína GLUT8 en las células 3T3-L1 distribuida intracelularmente. Estos ensayos se realizaron sobre células permeabilizadas con tritón puesto que el epítipo del anticuerpo está localizado en la parte citoplasmática.

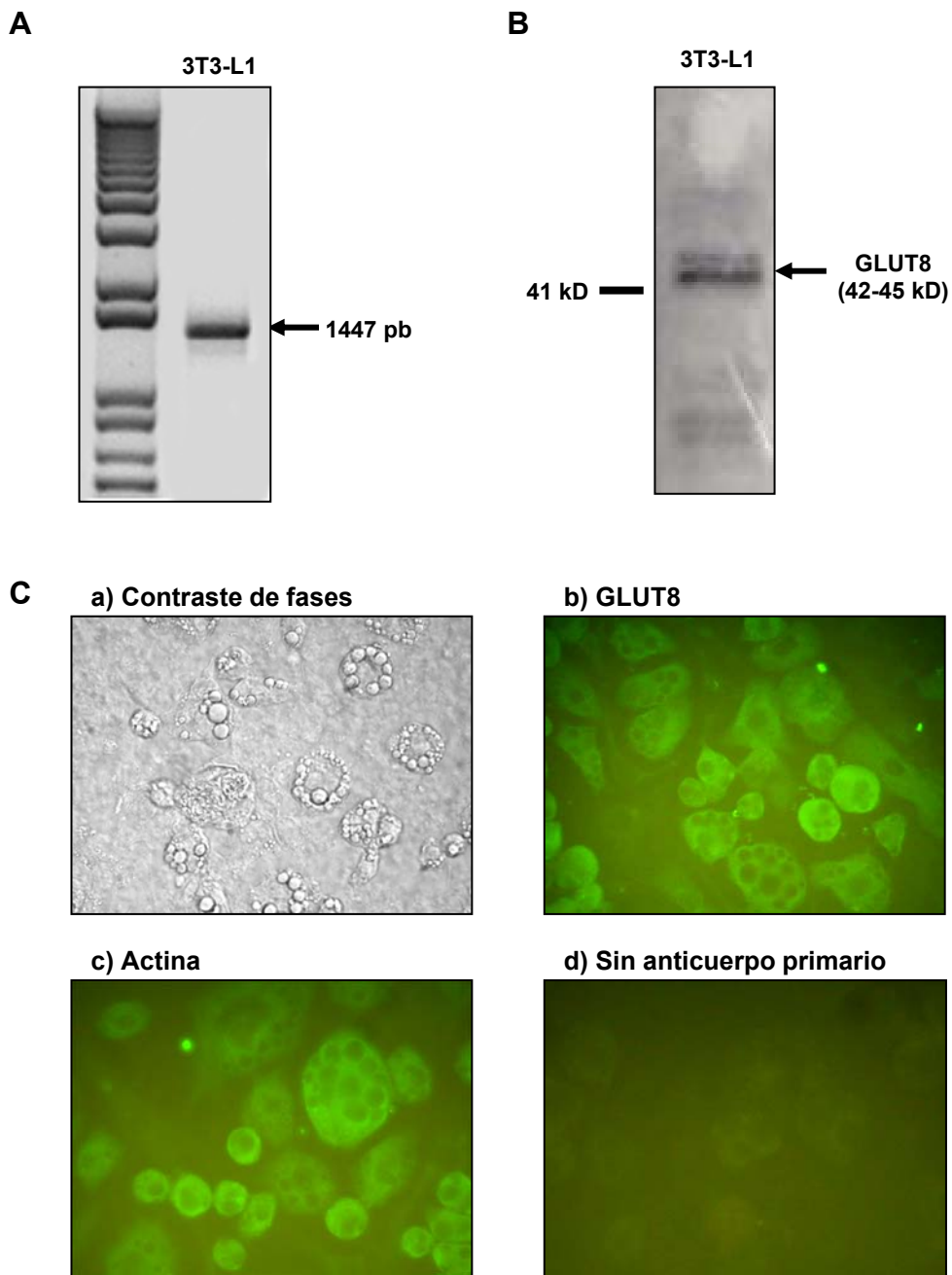


Figura IV.26. Expresión de GLUT8 en las células 3T3-L1. **(A)** RT-PCR a partir de ARN total de células 3T3-L1 diferenciadas utilizando los cebadores externos. **(B)** Detección de la proteína GLUT8 mediante western blot utilizando el anticuerpo anti G8-COOH (dilución 1:1000). **(C)** Células 3T3-L1 diferenciadas observadas en contraste de fases (a), Inmunofluorescencia indirecta de GLUT8 (dilución 1:100) (b), de actina (dilución 1:300) (c), y en ausencia de anticuerpo primario en células 3T3-L1 permeabilizadas con Tritón-X-100 (d). Aumentos 400X.

2.4.1. Transfección de células 3T3-L1 con los diferentes transcritos

Una vez comprobada la existencia de GLUT8 en nuestro modelo experimental y una vez valoradas las técnicas para su detección, para estudiar si los diferentes transcritos ejercían un papel en la regulación de la expresión de GLUT8, transfectamos células 3T3-L1 diferenciadas con el plásmido pcDNA vacío (control) o con los plásmidos que contenían insertos cada uno de los diferentes transcritos (SP1, SP2, SP3).

A partir de las células transfectadas extrajimos por una parte muestras de ARN total y por otra parte, muestras de proteínas.

En primer lugar, para comprobar si la transfección se había producido correctamente, realizamos una RT-PCR a partir del ARN total, utilizando los diferentes cebadores que amplifican de forma específica GLUT8, SP1, SP2 y SP3 (Apartado 2.3 de Resultados).

Como se puede observar (Figura IV.27.A) GLUT8 se expresa en las células 3T3-L1 control (línea 1) y en las células transfectadas con los transcritos (líneas 2, 3 y 4) tal y como esperábamos puesto que GLUT8 se expresa de manera endógena en estas células.

Utilizando los cebadores específicos para SP1, SP2 y SP3 observamos que estos transcritos solamente se expresaron en aquellas muestras donde fueron transfectados (Figura IV.27.B y C).

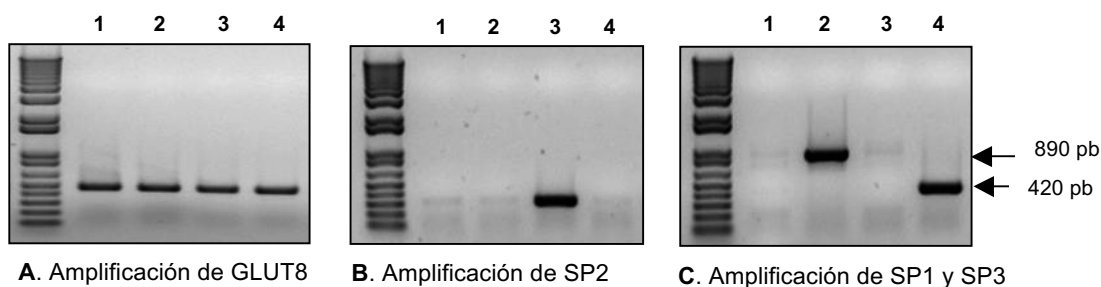


Figura IV.27. Verificación de la transfección de las células 3T3-L1 con los diferentes transcritos mediante RT-PCR. Líneas 1: células transfectadas con el plásmido pcDNA 3.1(+) vacío. Líneas 2: células transfectadas con plásmido pcDNA 3.1:SP1. Líneas 3: células transfectadas con plásmido pcDNA 3.1:SP2. Y líneas 4: células transfectadas con plásmido pcDNA 3.1:SP3. **(A)** Amplificación de GLUT8 con los cebadores HGLUT8-U y MsG8Exon7-as (fragmento de 472 pb); **(B)** Amplificación de SP2 con los cebadores MsSP2sens y MsG8exon10-as (fragmento de 309 pb); **(C)** Amplificación de SP1 y SP3 con los cebadores MsG8Exon1-up y MsSP1y3-as (fragmentos de 890 pb y 420 pb respectivamente).

2.4.2. Estudio de la expresión de GLUT8 en células 3T3-L1 transfectadas, mediante RT-PCR cuantitativa

En primer lugar, sobre las células transfectadas, se estudió si la expresión de los diferentes transcritos inducía alguna variación en la expresión endógena del ARNm de GLUT8. Para ello, se cuantificó la expresión de GLUT8 mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real, utilizando los cebadores y las condiciones descritas en el apartado 2.10 de material y métodos.

Como se puede observar en la figura IV.28 y en la tabla IV.3, la sobreexpresión de los transcritos SP1 y SP2 no alteró la expresión de ARNm de GLUT8 si se compara con las células control. Sin embargo, las células transfectadas con SP3 muestran un pequeño incremento significativo en la expresión de GLUT8 de aproximadamente un 10% cuando fueron comparadas con las células control.

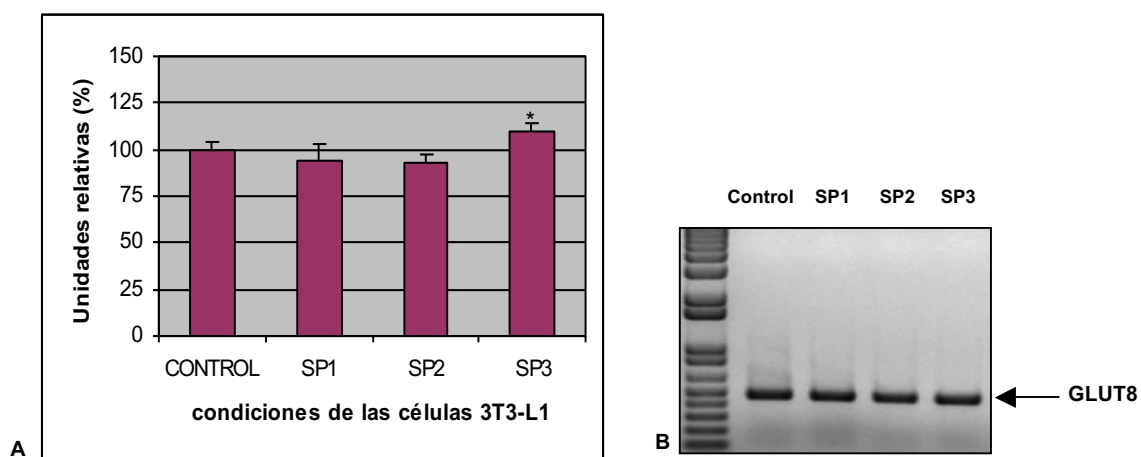


Figura IV.28. Expresión de GLUT8 en células 3T3-L1 control y transfectadas con los diferentes transcritos (SP1, SP2 y SP3). **(A)** Histograma del análisis de la qRT-PCR (* $p < 0,05$). **(B)** Migración electroforética del producto amplificado por PCR utilizando los cebadores HGLUT8-U y MsGLut8Exon10-as.

TABLA IV.3. Cuantificación de la expresión de ARNm de GLUT8 en las células transfectadas. Los valores son unidades arbitrarias expresadas como la media \pm error estándar (n=3). * $p < 0,05$.

	Control	SP1	SP2	SP3
Unidades arbitrarias (%)	100 \pm 4,56	94,26 \pm 9,22	93,03 \pm 4,26	109,50 \pm 4,37*

2.4.3. Estudio de la expresión de la proteína GLUT8 en las células transfectadas

Después de haber observado un aumento en la expresión del ARNm de GLUT8 en las células transfectadas con el transcrito SP3, quisimos conocer si la expresión proteica seguía un patrón similar. Para ello, se estudió mediante western blot la expresión de GLUT8 a partir de preparados celulares correspondientes a las diferentes transfecciones realizadas.

Como se puede observar en la figura IV.29, a nivel de proteína aparentemente no se observan diferencias en la expresión de la proteína GLUT8 entre las células transfectadas con los diferentes transcritos. Es posible que exista un ligero aumento en la expresión de la proteína pero que no es apreciable por esta técnica.

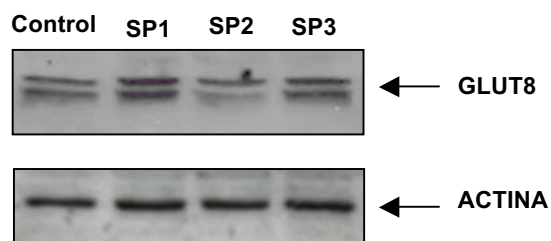


Figura IV.29. Expresión de la proteína GLUT8 y de la actina en las células 3T3-L1 transfectadas mediante western blot con los diferentes transcritos: C (control: plásmido pcDNA3.1 vacío), SP1 (pcDNA3.1:SP1), SP2 (pcDNA3.1:SP2) y SP3 (pcDNA3.1:SP3). Anticuerpo anti G8-COOH (dilución 1:1000) y anti-actina (dilución 1:3000).

2.4.4. Estudio del consumo de glucosa en células 3T3-L1 transfectadas

Puesto que GLUT8 es un transportador de glucosa, decidimos estudiar si el consumo de glucosa realizado por estas células variaba tras la transfección con los diferentes transcritos. Para ello, analizamos el consumo de glucosa a las 48 y 72 horas de haber realizado la transfección de los transcritos SP1, SP2 y SP3.

En la figura IV.30 se observa que en las células transfectadas con el transcrito SP3 se produjo un aumento en el consumo de glucosa de forma significativa, tanto a las 48 horas como a las 72 horas. Por el contrario, en las células transfectadas con SP1 y SP2 no se detectó ninguna variación con respecto al consumo de glucosa de las células control (Tabla IV).

TABLA IV.4: Efecto de la transfección de los diferentes transcritos sobre el consumo de glucosa en las células 3T3-L1. El consumo de glucosa del medio de cultivo fue evaluado a las 48 y 72 post-transfección y se expresa en mg de glucosa. Los valores entre paréntesis indican el número de cultivos analizados. * $p > 0,05$ comparado con la condición control (transfección con plásmido vacío).

	Control	SP1	SP2	SP3
48 horas	4,787 ± 0,088 (11)	4,908 ± 0,120 (11)	4,876 ± 0,127 (11)	5,142 ± 0,137* (11)
72 horas	5,734 ± 0,208 (11)	5,811 ± 0,217 (11)	5,760 ± 0,241 (11)	6,138 ± 0,258* (10)

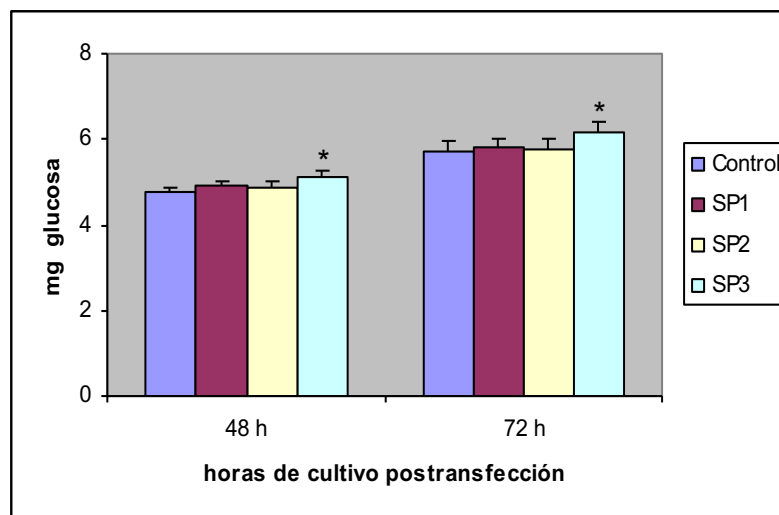


Figura IV.30. Consumo de glucosa en células 3T3-L1 transfectadas con los diferentes transcritos a las 48 y 72 horas de cultivo después de la transfección. * $p > 0,05$ comparado con la condición control (transfección con plásmido vacío).

2.4.5. Estudio de la localización celular de la proteína GLUT8 en células transfectadas

Para estudiar si la localización celular del transportador GLUT8 se modificaba tras la transfección de las células 3T3-L1 con los diferentes transcritos (SP1, SP2 y SP3), realizamos ensayos de inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo dirigido contra el extremo C-terminal.

Como se puede observar en la figura IV.31, tanto en las células control como en las células transfectadas con los transcritos SP1 y SP2 se observa un marcaje intracelular de forma granular que ocupa prácticamente todo el citoplasma, excepto las vesículas adipocitarias que no aparecen marcadas. Sin embargo, en las células transfectadas con el transcrito SP3, se observa una clara redistribución del marcaje celular hacia la zona periférica de las células, indicando una localización más intensa en la propia membrana plasmática, o en una región submembranosa. Estos resultados podrían explicar los obtenidos sobre el consumo de glucosa, donde únicamente las células transfectadas con el plásmido pcDNA 3.1: SP3 mostraban una alteración en dicho consumo, aumentándolo de forma significativa.

En resumen, no observamos ningún efecto de SP1 y SP2 sobre la expresión (ARNm y proteína) de GLUT8, ni tampoco sobre la distribución celular de dicha proteína. Sin embargo, SP3 parece mostrar un efecto regulador de tipo post-traducciona, provocando una translocación de la proteína desde vesículas intracelulares hacia la membrana plasmática. Esta translocación de GLUT8 hacia la membrana plasmática podría ser la causante del aumento de consumo de glucosa que se observa en las células transfectadas con SP3.

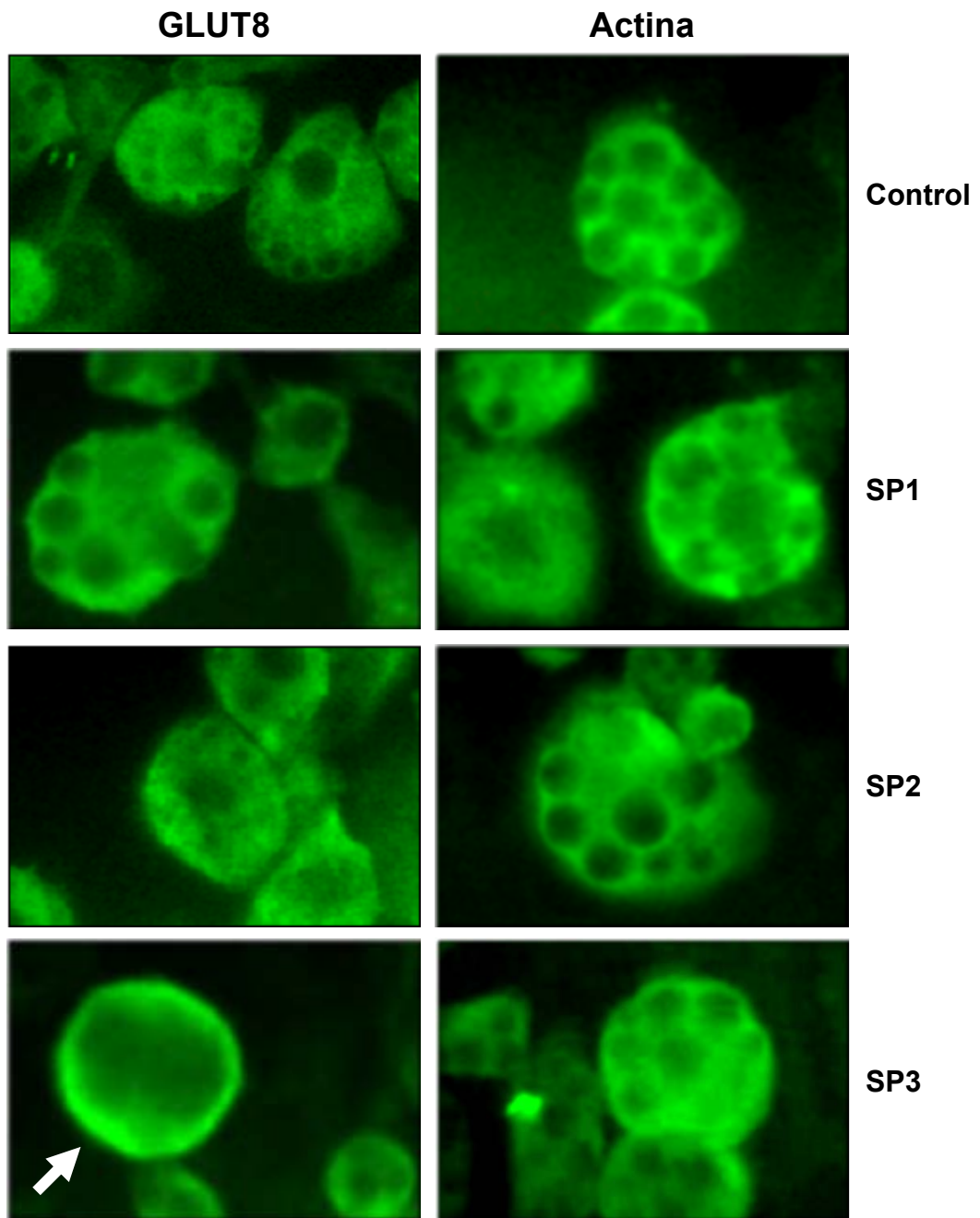


Figura IV.31. Expresión, mediante inmunofluorescencia indirecta, de GLUT8 y actina en células 3T3-L1 diferenciadas en adipocitos, y transfectadas transitoriamente con el plásmido pcDNA 3.1 vacío (Control), o con los transcritos SP1, SP2 o SP3. Se han utilizado el anticuerpo anti G8-COOH (1:100), y el anticuerpo anti-actina (1:300).

3. EXPRESIÓN DE GLUT8 EN CÉLULAS CACO-2

Una vez estudiada la expresión de GLUT8 en intestino de ratón, quisimos estudiar la expresión de GLUT8 en células intestinales humanas. Para ello utilizamos como modelo experimental la línea celular Caco-2, que como se ha comentado previamente en Material y Métodos, son un excelente modelo *in vitro* para el estudio de proteínas enterocitarias humanas, y donde se han estudiado ampliamente otros transportadores, como SGLT1, GLUT2 y GLUT5.

3.1. Estudio de la expresión de ARNm de GLUT8 en células Caco-2

Para estudiar la expresión de ARNm de GLUT8 en las células Caco-2, en primer lugar realizamos una RT-PCR utilizando los cebadores específicos humanos Glut8/BamHI y Glut8/EcoRI. Sin embargo, como se observa en la figura IV.32 (línea 1) estos cebadores no amplificaron el fragmento esperado de 1486 pb. En su lugar se amplificaron dos fragmentos con tamaño aproximado de 1100 y 900 pb. Estos fragmentos se amplificaban incluso cuando se utilizaban condiciones más restrictivas en la reacción de PCR, y utilizando diferentes Taq Polimerasas.

Estos resultados sugerían la no expresión de la secuencia completa de GLUT8 y para corroborar esta hipótesis, realizamos nuevas amplificaciones con diferentes combinaciones de cebadores específicos para GLUT8 humano (Tabla III.2). Utilizando los cebadores Glut8/BamHI y HGLUT8AS, que deberían amplificar un fragmento de 1261 pb, observamos de nuevo que aparecían 2 bandas de tamaño inferior al esperado (Figura IV.32, línea 2). Sin embargo, cuando utilizamos los cebadores HGLUT8U y Glut8/EcoRI que deberían amplificar un fragmento de 1063 pb, obtuvimos también dos bandas, una correspondiente al tamaño esperado y otra de unos 200 pb inferior (Figura IV.32, línea 3).

Estos resultados sugerían la existencia de varios transcritos alternativos de GLUT8 como ya habíamos observado en intestino de ratón. Además, demostraban que una posible delección de nucleótidos debía ocurrir entre el exón I y el exón IV, ya que cuando se utilizaban los cebadores localizados en los exones IV y X, sí que se amplificaba un fragmento del tamaño esperado.

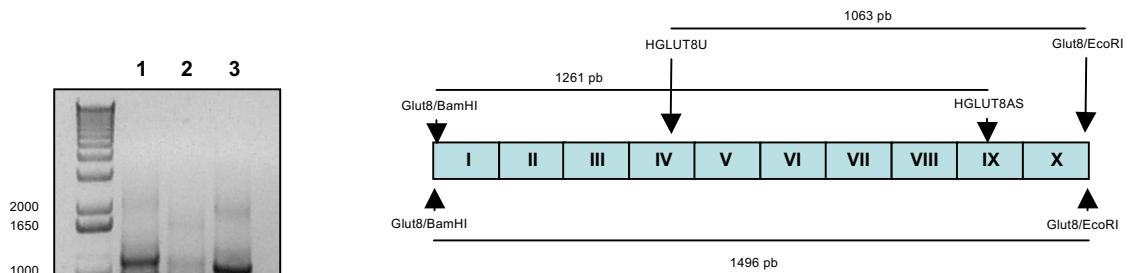


Figura IV.32. (A) Amplificación del ADNc de GLUT8 con los cebadores Glut8/BamHI y GLUT8/EcoRI. (1); con los cebadores Glut8/BamHI y HGLUT8AS (2); y con los cebadores HGLUT8U y Glut8/EcoRI (3). **(B)** Esquema de las amplificaciones esperadas con los diferentes cebadores.

Para verificar los resultados obtenidos por RT-PCR y comprobar que esos fragmentos amplificados correspondían a la secuencia de GLUT8, realizamos un southern blot sobre los fragmentos amplificados con los cebadores externos Glut8/BamH y Glut8/EcoRI. Como sonda utilizamos un fragmento que corresponde a la secuencia entera de GLUT8 de ratón. Además, los productos de amplificación por PCR antes fueron digeridos con la exonucleasa S1 para eliminar posibles heteroduplex de ADN.

Como se puede observar en la figura IV.33, los resultados obtenidos en el southern blot confirmaron que esos fragmentos corresponden a la secuencia de GLUT8, observándose al menos dos transcritos de un tamaño inferior al de la forma entera de GLUT8. Sin embargo, la forma completa de GLUT8 nunca fue detectada.

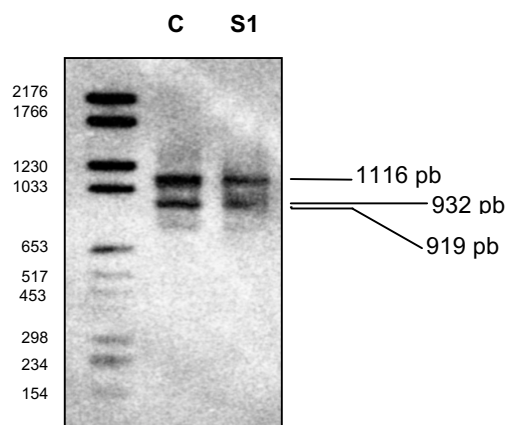


Figura IV.33. Southern blot a partir del producto amplificado por RT-PCR con los cebadores Glut8/BamHI y Glut8/EcoRI (C) y esta misma muestra digerida con la enzima nucleasa S1 (S1). En ambos casos aparecen dos bandas cuyo tamaño coincide con los fragmentos observados por PCR.

Ante los resultados obtenidos, decidimos clonar los fragmentos amplificados utilizando el sistema pcR 2.1 TOPO, tal como se describe en Material y Métodos. Para ello, se partió del producto de PCR amplificado con los cebadores Glut8/BamHI y Glut8/EcoRI.

El resultado de la digestión enzimática con EcoRI sobre las construcciones plasmídicas generadas se muestra en la figura IV.34, donde se puede observar que se habían clonado fragmentos de diferente tamaño pero, como era de esperar, ninguno de ellos correspondía al tamaño de la secuencia completa esperada de GLUT8 (1486 pb).

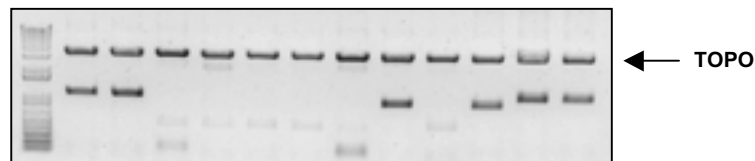


Figura IV.34. Resultado de la clonación del producto amplificado por PCR en el vector TOPO, tras su digestión enzimática con Eco RI para separar el plásmido del fragmento insertado.

Finalmente, los fragmentos clonados por el método anterior fueron secuenciados de forma bidireccional utilizando los cebadores propios del plásmido TOPO. Los resultados de la secuenciación mostraron que los fragmentos amplificados correspondían a tres transcritos diferentes de GLUT8 que nosotros denominamos HSP1, HSP2 y HSP3. Estos fragmentos eran producto de un proceso de corte y empalme de la secuencia original de GLUT8 en los cuales los exones II y III habían sido siempre eliminados. En el caso de HSP2 desaparecía además el exón V y en el caso de HSP3, el exón VIII (Figura IV.35). Los exones V y VIII tienen aproximadamente el mismo tamaño, de modo que las secuencias nucleotídicas de HSP2 y HSP3 tienen un tamaño muy similar, por lo que mediante PCR y southern blot no se pueden apreciar de manera individual.

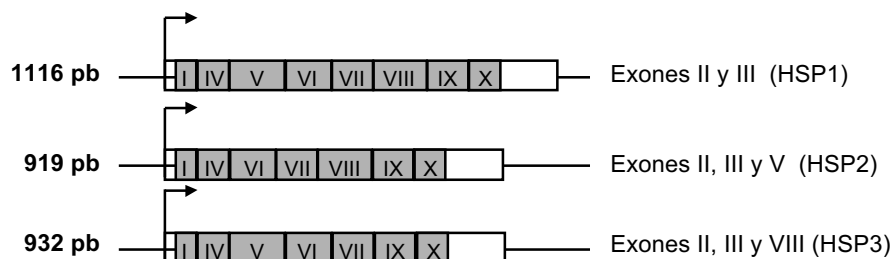


Figura IV.35. Esquema de los diferentes transcritos de GLUT8 humano donde se indican los exones eliminados.

La comparación de las secuencias nucleotídicas de GLUT8 humano con los diferentes transcritos se muestra en la figura IV.36.

En estos nuevos transcritos se produce una alteración en el cuadro de lectura, de forma que la proteína teórica generada en los tres casos es siempre la misma, y su tamaño es tan sólo de 39 aminoácidos (Figura IV.37).

```

4 atg acg ccc gag gac cca gag gaa acc cag ccg ctt ctg ggg cct
  M  T  P  E  D  P  E  E  T  Q  P  L  L  G  P
49 cct ggc ggc agg tct aca tct ccg aaa tcg cct acc cag cag tcc
  P  G  G  R  S  T  S  P  K  S  P  T  Q  Q  S
94 ggg ggt tgc tcg gct cct gtg tgc agc taa
  G  G  C  S  A  P  V  C  S  *

```

1 MTPEDPEETQ PLLGPPGGRS TSPKSPTQQS GGCSAPVCS* 39

Figura IV.37. Secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia de nucleótidos que resulta de la eliminación de los exones II y III.

Del mismo modo que se hizo con los transcritos aislados en intestino de ratón, analizamos la secuencia teórica de la proteína originada a partir de los transcritos aislados en las células Caco-2 mediante el servidor SOUSI. Como era de esperar, dicha secuencia correspondía a una pequeña proteína soluble de tan solo 39 aminoácidos.

HGLUT8	1	ggcaacgagg	gcggttcagg	cgccagagct	ggccgatcgg	cggtggccgc	cgacatgacg	cccgaggacc	cagaggaaac	ccagccgctt	ctggggcctc
HSP1	1	ggcaacgagg	gcggttcagg	cgccagagct	ggccgatcgg	cggtggccgc	cgacatgacg	cccgaggacc	cagaggaaac	ccagccgctt	ctggggcctc
HSP2	1	ggcaacgagg	gcggttcagg	cgccagagct	ggccgatcgg	cggtggccgc	cgacatgacg	cccgaggacc	cagaggaaac	ccagccgctt	ctggggcctc
HSP3	1	ggcaacgagg	gcggttcagg	cgccagagct	ggccgatcgg	cggtggccgc	cgacatgacg	cccgaggacc	cagaggaaac	ccagccgctt	ctggggcctc
HGLUT8	101	ctggcggcag	cgcgcccgcg	ggcgcgcgcg	tcttctctgc	cgcccttgcg	gctgccctgg	gcccaactcag	cttccgcttc	gcgctcggct	acagctcccc
HSP1	101	ctggcggcag	cgcgcccgcg	ggcgcgcgcg	tcttctctgc	cgcccttgcg	gctgccctgg	gcccaactcag	cttccgcttc	gcgctcggct	acagctcccc
HSP2	101	ctggcggcag	cgcgcccgcg	ggcgcgcgcg	tcttctctgc	cgcccttgcg	gctgccctgg	gcccaactcag	cttccgcttc	gcgctcggct	acagctcccc
HSP3	101	ctggcggcag	cgcgcccgcg	ggcgcgcgcg	tcttctctgc	cgcccttgcg	gctgccctgg	gcccaactcag	cttccgcttc	gcgctcggct	acagctcccc
HGLUT8	201	ggccatccct	agcctgcagc	gcgcgcgcgc	cccgcccgcg	cgccctggag	acgcgcgcgc	ctcctggctc	ggggctgtcg	tgaccctggg	tgcccgcgcg
HSP1	201	ggccatccct	agcctgcagc	gcgcgcgcgc	cccgcccgcg	cgccctggag	acgcgcgcgc	ctcctggctc	ggggctgtcg	tgaccctggg	tgcccgcgcg
HSP2	201	ggccatccct	agcctgcagc	gcgcgcgcgc	cccgcccgcg	cgccctggag	acgcgcgcgc	ctcctggctc	ggggctgtcg	tgaccctggg	tgcccgcgcg
HSP3	201	ggccatccct	agcctgcagc	gcgcgcgcgc	cccgcccgcg	cgccctggag	acgcgcgcgc	ctcctggctc	ggggctgtcg	tgaccctggg	tgcccgcgcg
HGLUT8	301	gggggagtg	tgggcgctg	gctggtggac	cgcgcccgcg	gcaagctgag	cctcttggct	tgctccgtgc	ccttctgtgc	cggtttggcc	gtcatcaacc
HSP1	301	gggggagtg	tgggcgctg	gctggtggac	cgcgcccgcg	gcaagctgag	cctcttggct	tgctccgtgc	ccttctgtgc	cggtttggcc	gtcatcaacc
HSP2	301	gggggagtg	tgggcgctg	gctggtggac	cgcgcccgcg	gcaagctgag	cctcttggct	tgctccgtgc	ccttctgtgc	cggtttggcc	gtcatcaacc
HSP3	301	gggggagtg	tgggcgctg	gctggtggac	cgcgcccgcg	gcaagctgag	cctcttggct	tgctccgtgc	ccttctgtgc	cggtttggcc	gtcatcaacc
HGLUT8	401	cgcccaggga	cggtgtgatg	ctgctggggg	ggcgcctcct	caccggcctg	gcttgcgggt	ttgcctccct	agtggccccc	gtctacatct	ccgaaatcgc
HSP1	110	cgcccaggga	cggtgtgatg	ctgctggggg	ggcgcctcct	caccggcctg	gcttgcgggt	ttgcctccct	agtggccccc	gtctacatct	ccgaaatcgc
HSP2	110	cgcccaggga	cggtgtgatg	ctgctggggg	ggcgcctcct	caccggcctg	gcttgcgggt	ttgcctccct	agtggccccc	gtctacatct	ccgaaatcgc
HSP3	110	cgcccaggga	cggtgtgatg	ctgctggggg	ggcgcctcct	caccggcctg	gcttgcgggt	ttgcctccct	agtggccccc	gtctacatct	ccgaaatcgc
HGLUT8	501	ctaccacgca	gtccgggggt	tgctcggctc	ctgtgtgcag	ctaaatggctg	tgctcggcat	cctcctggcc	taccctggca	gctgggtgtc	ggagtggcgc
HSP1	131	ctaccacgca	gtccgggggt	tgctcggctc	ctgtgtgcag	ctaaatggctg	tgctcggcat	cctcctggcc	taccctggca	gctgggtgtc	ggagtggcgc
HSP2	131	ctaccacgca	gtccgggggt	tgctcggctc	ctgtgtgcag	ctaaatggctg	tgctcggcat	cctcctggcc	taccctggca	gctgggtgtc	ggagtggcgc
HSP3	131	ctaccacgca	gtccgggggt	tgctcggctc	ctgtgtgcag	ctaaatggctg	tgctcggcat	cctcctggcc	taccctggca	gctgggtgtc	ggagtggcgc
HGLUT8	601	tggtcggctg	tgctgggctg	cgctcccccc	tcctctatgc	tgcttctcat	gtgcttoatg	cccgagacc	cgcccttcc	gctgactcag	caacggcgc
HSP1	231	tggtcggctg	tgctgggctg	cgctcccccc	tcctctatgc	tgcttctcat	gtgcttoatg	cccgagacc	cgcccttcc	gctgactcag	caacggcgc
HSP2	231	tggtcggctg	tgctgggctg	cgctcccccc	tcctctatgc	tgcttctcat	gtgcttoatg	cccgagacc	cgcccttcc	gctgactcag	caacggcgc
HSP3	231	tggtcggctg	tgctgggctg	cgctcccccc	tcctctatgc	tgcttctcat	gtgcttoatg	cccgagacc	cgcccttcc	gctgactcag	caacggcgc
HGLUT8	701	aggaggccat	ggccgcccctg	cggttctctg	ggggctccga	gcaggctggg	gaagaccccc	ccatcggggc	tgagcagagc	tttcaactgg	ccctgctcgc
HSP1	331	aggaggccat	ggccgcccctg	cggttctctg	ggggctccga	gcaggctggg	gaagaccccc	ccatcggggc	tgagcagagc	tttcaactgg	ccctgctcgc
HSP2	210	aggaggccat	ggccgcccctg	cggttctctg	ggggctccga	gcaggctggg	gaagaccccc	ccatcggggc	tgagcagagc	tttcaactgg	ccctgctcgc
HSP3	331	aggaggccat	ggccgcccctg	cggttctctg	ggggctccga	gcaggctggg	gaagaccccc	ccatcggggc	tgagcagagc	tttcaactgg	ccctgctcgc
HGLUT8	801	gcagcccgcg	atctacaagc	ccttcatcat	cgccgtctcc	ctgatggcct	tcacagcagc	gtcgggggtc	aacgcctgca	tggtctatgc	agagaccatc
HSP1	431	gcagcccgcg	atctacaagc	ccttcatcat	cgccgtctcc	ctgatggcct	tcacagcagc	gtcgggggtc	aacgcctgca	tggtctatgc	agagaccatc
HSP2	234	gcagcccgcg	atctacaagc	ccttcatcat	cgccgtctcc	ctgatggcct	tcacagcagc	gtcgggggtc	aacgcctgca	tggtctatgc	agagaccatc
HSP3	431	gcagcccgcg	atctacaagc	ccttcatcat	cgccgtctcc	ctgatggcct	tcacagcagc	gtcgggggtc	aacgcctgca	tggtctatgc	agagaccatc
HGLUT8	901	tttgaagagg	ccaagttoaa	ggacagcagc	ctggcctcgg	tcgtctggg	tgatccacag	gtgctgttca	cagctgtggc	ggctctcatc	atggacagag
HSP1	531	tttgaagagg	ccaagttoaa	ggacagcagc	ctggcctcgg	tcgtctggg	tgatccacag	gtgctgttca	cagctgtggc	ggctctcatc	atggacagag
HSP2	334	tttgaagagg	ccaagttoaa	ggacagcagc	ctggcctcgg	tcgtctggg	tgatccacag	gtgctgttca	cagctgtggc	ggctctcatc	atggacagag
HSP3	531	tttgaagagg	ccaagttoaa	ggacagcagc	ctggcctcgg	tcgtctggg	tgatccacag	gtgctgttca	cagctgtggc	ggctctcatc	atggacagag
HGLUT8	1001	caggcgggag	gctgctcctg	gtcttctcag	gtgtggtcat	ggtgttccag	acagtgctct	tcggcgccta	cttcaagctg	accacgggtg	gccttggcaa
HSP1	631	caggcgggag	gctgctcctg	gtcttctcag	gtgtggtcat	ggtgttccag	acagtgctct	tcggcgccta	cttcaagctg	accacgggtg	gccttggcaa
HSP2	434	caggcgggag	gctgctcctg	gtcttctcag	gtgtggtcat	ggtgttccag	acagtgctct	tcggcgccta	cttcaagctg	accacgggtg	gccttggcaa
HSP3	631	caggcgggag	gctgctcctg	gtcttctcag	gtgtggtcat	ggtgttccag	acagtgctct	tcggcgccta	cttcaagctg	accacgggtg	gccttggcaa
HGLUT8	1101	ctctctgcac	gtggccatct	cgccgcctgt	ctctgcacag	cctgtttgat	ccagcgtggg	gctggcctgg	ctggcctgg	gcagcatgtg	cctcttcatc
HSP1	731	ctctctgcac	gtggccatct	cgccgcctgt	ctctgcacag	cctgtttgat	ccagcgtggg	gctggcctgg	ctggcctgg	gcagcatgtg	cctcttcatc
HSP2	534	ctctctgcac	gtggccatct	cgccgcctgt	ctctgcacag	cctgtttgat	ccagcgtggg	gctggcctgg	ctggcctgg	gcagcatgtg	cctcttcatc
HSP3	534	ctctctgcac	gtggccatct	cgccgcctgt	ctctgcacag	cctgtttgat	ccagcgtggg	gctggcctgg	ctggcctgg	gcagcatgtg	cctcttcatc
HGLUT8	1201	gccgctttg	cggtgggctg	ggggcccctc	ccctggctcc	tcattgtcaga	gatcttccct	ctgcatgtca	aggcctggc	gacaggaatc	tgcttctcga
HSP1	831	gccgctttg	cggtgggctg	ggggcccctc	ccctggctcc	tcattgtcaga	gatcttccct	ctgcatgtca	aggcctggc	gacaggaatc	tgcttctcga
HSP2	634	gccgctttg	cggtgggctg	ggggcccctc	ccctggctcc	tcattgtcaga	gatcttccct	ctgcatgtca	aggcctggc	gacaggaatc	tgcttctcga
HSP3	660	...gctttg	cggtgggctg	ggggcccctc	ccctggctcc	tcattgtcaga	gatcttccct	ctgcatgtca	aggcctggc	gacaggaatc	tgcttctcga
HGLUT8	1301	ccaactggct	catggccttt	ctcgtgacca	aggagttcag	cagcctcatg	gaggtcctca	ggccctatgg	agccttctg	cttgcctcgg	ctttctgcat
HSP1	931	ccaactggct	catggccttt	ctcgtgacca	aggagttcag	cagcctcatg	gaggtcctca	ggccctatgg	agccttctg	cttgcctcgg	ctttctgcat
HSP2	734	ccaactggct	catggccttt	ctcgtgacca	aggagttcag	cagcctcatg	gaggtcctca	ggccctatgg	agccttctg	cttgcctcgg	ctttctgcat
HSP3	757	ccaactggct	catggccttt	ctcgtgacca	aggagttcag	cagcctcatg	gaggtcctca	ggccctatgg	agccttctg	cttgcctcgg	ctttctgcat
HGLUT8	1401	cttcagtgtc	cttttcaact	tggtctgtgt	ccctgaaact	aaaggaaaga	ctctggaaca	aatcacagcc	cattttgagg	ggcgatgaca	gccactcact
HSP1	1031	cttcagtgtc	cttttcaact	tggtctgtgt	ccctgaaact	aaaggaaaga	ctctggaaca	aatcacagcc	cattttgagg	ggcgatgaca	gccactcact
HSP2	834	cttcagtgtc	cttttcaact	tggtctgtgt	ccctgaaact	aaaggaaaga	ctctggaaca	aatcacagcc	cattttgagg	ggcgatgaca	gccactcact
HSP3	857	cttcagtgtc	cttttcaact	tggtctgtgt	ccctgaaact	aaaggaaaga	ctctggaaca	aatcacagcc	cattttgagg	ggcgatgaca	gccactcact
HGLUT8	1501	aggggatgga	gcaagcctgt	gactccaagc	tg						
HSP1	1131	aggggatgga	gcaagcctgt	gactccaagc	tg						
HSP2	934	aggggatgga	gcaagcctgt	gactccaagc	tg						
HSP3	957	aggggatgga	gcaagcctgt	gactccaagc	tg						

Figura IV.36. Comparación de las secuencias de nucleótidos correspondientes a GLUT8 humano y las diferentes variantes transcripcionales HSP1, HSP2 y HSP3. En sombreado se ha marcado los "atg" de inicio de la traducción, y los codones de finalización para cada uno de los transcritos.

V. DISCUSIÓN

El propósito de este trabajo ha sido el estudio del transportador GLUT8 en intestino, con el objetivo de conocer su expresión y posible función en este tejido. Cuando se planteó el proyecto de investigación, GLUT8 era un nuevo transportador de glucosa recientemente clonado en rata, en ratón y en la especie humana (Carayannopoulos y cols., 2000; Doege y cols., 2000b; Ibberson y cols., 2000), del cual se habían realizado algunos estudios en testículo y cerebro, y cuya función en estos tejidos todavía estaba por esclarecer.

Dos aspectos convertían a este transportador en un buen candidato para facilitar el transporte de glucosa en las células absortivas intestinales junto con los transportadores clásicos en diferentes condiciones fisiológicas. En primer lugar, se había detectado previamente mediante northern blot una pequeña expresión en tejido intestinal (Doege y cols., 2000b); y en segundo lugar, también se observó su expresión en tejidos insulino-dependientes (músculo y adipocitos). Estas dos características nos llevaron al planteamiento del estudio de la expresión de GLUT8 en tejido intestinal, partiendo de la hipótesis de que pudiera ser un transportador de glucosa que participara en la absorción intestinal de glucosa apoyando los sistemas de transporte ya conocidos, bien en condiciones basales o bajo determinadas condiciones como puede ser la diabetes, en los que se ven alterados los estímulos hormonales por parte de la insulina, y/o estados postprandiales en los que se ve alterada la concentración de glucosa tanto en el lumen intestinal como en el torrente sanguíneo.

El modelo que describe el proceso de absorción intestinal de azúcares (Wright y cols. 1994), implica a tres proteínas transportadoras (SGLT1, GLUT2 y GLUT5) que se encargan del transporte transcelular de azúcares. Sin embargo, varios autores han planteado interrogantes sobre si la capacidad absortiva en el intestino puede explicarse únicamente por la existencia de estos transportadores, sugiriendo la posible presencia de otras proteínas transportadoras y/o vías alternativas o complementarias en el proceso absortivo (Wright y cols., 1994). Si en la década de los años 80 fue la aplicación de técnicas de biología molecular las que fueron poniendo nombre y apellido a los transportadores implicados en la absorción intestinal de azúcares, ha sido en los inicios de este nuevo siglo donde se ha producido un nuevo salto en el conocimiento gracias a la secuenciación del genoma completo de varias especies y a la existencia de amplias bases de datos de secuencias genómicas y de ARNm. Gracias a estas nuevas herramientas, en estos últimos 4 años se han ido clonando nuevas proteínas transportadoras pertenecientes a la familia SGLT y GLUT (Uldry y Thorens, 2004; Wright y Turk, 2004).

El trabajo de la presente tesis se ha centrado en el estudio de GLUT8 en el intestino, estudiando su expresión tanto a nivel de ARNm como a nivel proteico, analizando además su expresión tisular y celular mediante inmunohistoquímica. Asimismo, hemos analizado como varía, bajo diferentes condiciones fisiopatológicas (diabetes y ayuno) la expresión intestinal de este transportador. Finalmente, describimos la existencia de varios transcritos de ARNm de GLUT8 y hemos realizado estudios preliminares sobre su posible papel en la regulación de la expresión del transportador tanto a nivel transcripcional como post-traducciona.

Expresión de GLUT8 en intestino en condiciones basales

Los resultados que hemos obtenido en este trabajo demuestran que GLUT8 se expresa a lo largo de todo el intestino de ratón, y que esta expresión se produce tanto a nivel de ARNm como a nivel de proteína. En el intestino se conocen tres transportadores de azúcares (SGLT1, GLUT5 y GLUT2) cuya expresión, tanto de ARNm como proteica, ha sido bien estudiada y caracterizada por diferentes grupos de investigación.

Algunos estudios demuestran que la expresión del ARNm de SGLT1 no es constante a lo largo del intestino de rata. Mediante northern blot, se ha observado que la expresión de SGLT1 alcanza los niveles más elevados en duodeno, para ir disminuyendo gradualmente hasta encontrar los niveles más bajos en la unión ileo-cecal (Kojima y cols., 1999). Estos autores no detectaron ARNm de SGLT1 en colon (Kojima y cols., 1999). Sin embargo, en otros estudios realizados mediante RT-PCR (Lee y cols., 1994) sí que detectan la expresión de SGLT1 en colon, pero en cantidades traza en comparación con el intestino delgado. Por tanto, estos estudios indican que la expresión de ARNm de SGLT1 es mucho mayor a nivel del intestino delgado que en colon, donde solamente es visible en función de la sensibilidad de la técnica empleada.

Estudios similares han sido realizados para GLUT5, donde se ha observado que la mayor expresión de ARNm se localiza en duodeno y en las porciones proximales del yeyuno, siendo inferior en las porciones distales del yeyuno e ileon (Castello y cols., 1995).

En cuanto a GLUT2, estudios realizados mediante RT-PCR demuestran la expresión de ARNm de GLUT2 en mucosa de colon (Noguchi y cols., 2000), pero como en el caso de SGLT1 y GLUT5 su mayor expresión se encuentra a nivel de intestino delgado (Fukumoto y cols., 1988).

Los resultados obtenidos mediante RT-PCR sobre la expresión de GLUT8 en intestino indican que, a diferencia de los transportadores clásicos, su expresión se produce en todos los fragmentos intestinales, incluyendo colon.

La expresión de nuevos transportadores facilitadores de glucosa en las células absortivas intestinales también ha sido estudiada por otros grupos. Recientemente se ha clonado un nuevo transportador en tejido intestinal denominado GLUT7 (Li y cols., 2004), cuya expresión ha sido detectada tanto en intestino delgado como grueso. Por lo tanto, en este caso, el patrón de expresión de su ARNm sería muy similar al que nosotros hemos observado para GLUT8.

Analizando a continuación la expresión de la proteína, nuestros resultados sugieren que GLUT8 presenta una distribución un tanto atípica si la comparamos con la localización celular de los transportadores clásicos SGLT1, GLUT2 y GLUT5. Se sabe que SGLT1 se localiza solamente en la membrana apical de los enterocitos donde realiza su función transportadora (Wright, 1993). GLUT5 también se encuentra asociado a la membrana de borde en cepillo del intestino delgado (Davidson y cols., 1992; Mahraoui y cols., 1992), aunque algunos trabajos indican que también

podría localizarse en la membrana basolateral de las células enterocitarias aunque en pequeñas cantidades (Blakemore y cols., 1995). Por otro lado se ha descrito la ausencia de GLUT5 en cortes histológicos de colon de humano (Mahraoui y cols., 1992). Por otra parte, GLUT2 siempre se ha asociado a la membrana basolateral (Cheeseman, 1993), sin embargo estudios recientes basados en inmunohistoquímica muestran que GLUT2 también se localiza en la membrana de borde en cepillo (Au y cols., 2002; Affleck y cols., 2003). Esta localización se debe a la translocación de la proteína hacia la membrana apical como consecuencia de la activación de un mecanismo dependiente de SGLT1 que media dicha translocación cuando la concentración de azúcares en el lumen es elevada tras la ingesta de alimentos (Kellett, 2001).

En primer lugar, y basándonos en los resultados observados mediante western blot, podemos afirmar que en tejido intestinal y en condiciones basales, GLUT8 se expresa a niveles bajos si se compara con los niveles de expresión que alcanza en testículo. Y dentro de los diferentes tramos intestinales, parece observarse una mayor expresión a nivel del colon.

Por otra parte, los resultados obtenidos mediante inmunohistoquímica confirman que la proteína GLUT8 se encuentra en intestino delgado y en colon. En intestino delgado hemos detectado GLUT8 en los enterocitos de las vellosidades intestinales, tanto a nivel intracelular, posiblemente asociado a vesículas, como a nivel de la membrana plasmática. En ileon, además de observarse expresión en las vellosidades, también hemos detectado un marcaje intracelular en las células epiteliales de las criptas. En colon, se observa una clara expresión intracelular de tipo perinuclear, pero sobretodo se observa una fuerte expresión en el tercio superior de la célula, muy próxima a la membrana plasmática. Esta expresión solo se localiza en células epiteliales, sin observarse marcaje en las criptas donde predominan fundamentalmente las células caliciformes.

La distribución de GLUT7 en las células absortivas del intestino ha sido descrita por Li y colaboradores (2004) indicando que la expresión de la proteína parece ser mayor en la parte más distal del intestino delgado (ileon), lo cual contrasta con SGLT1, GLUT5 y GLUT2, que se expresan predominantemente en yeyuno alcanzando niveles de expresión más bajos en ileon. A diferencia de GLUT8, la expresión de GLUT7 en ileon se encuentra solamente a nivel de la membrana apical. Sorprendentemente, la expresión de la proteína GLUT7 no se observa en colon a pesar de expresarse fuertemente a nivel de ARNm (Li y cols., 2004). Por lo tanto, el hecho de que la proteína GLUT8 esté presente en colon puede ser fisiológicamente relevante puesto que a este nivel todavía no se había descrito ninguna proteína transportadora de azúcares.

Por otra parte, la localización intracelular de GLUT8 en otros tejidos ha sido estudiada por diferentes autores y existe cierta discrepancia. Estudios previos con ratas han demostrado que GLUT8 también tiene una distribución atípica en las neuronas, donde aparece asociada a compartimentos citosólicos intracelulares (Piroli y cols., 2002). Sin embargo, otros estudios demuestran que GLUT8 es capaz de alcanzar la membrana plasmática bajo determinados estímulos que todavía no están claros (Reagan y cols., 2001), pero que podrían tratarse de señales de tipo hormonal.

En hígado, y en condiciones basales, la localización de GLUT8 es intracelular, de tipo perinuclear, pero también se observa próxima a la membrana plasmática (Gorovits y cols., 2002). Su localización preferentemente intracelular sugiere que la función principal de GLUT8 debe estar relacionada con el tráfico intracelular de azúcares (Gorovits y cols., 2002).

Por tanto, atendiendo a la bibliografía citada y comparándola con nuestros resultados se puede decir que la expresión de GLUT8 en los enterocitos y colonocitos sigue un patrón muy similar al descrito en los anteriores tejidos, sobretodo en hígado. La doble distribución de GLUT8 en las células absortivas (perinuclear y muy próximo de la membrana apical) sugiere que GLUT8 podría jugar un papel importante en el movimiento de glucosa que se produce a nivel intracelular, y que sólo en momentos determinados podría encargarse del transporte de glucosa a través de la membrana apical hacia el interior de la célula actuando como apoyo a los sistemas de transporte ya conocidos.

La localización intracelular de GLUT8 en los enterocitos del ileon sugiere que esta proteína podría estar implicada en el movimiento de glucosa en el citoplasma de la célula, y formar parte de alguna ruta alternativa basada en el tráfico vesicular para la salida de glucosa de la célula desde el interior de la célula enterocitaria hacia el exterior, actuando por ejemplo, cuando GLUT2 no está presente en la membrana basolateral debido a alguna deficiencia congénita para este gen. Esta ruta alternativa sería muy similar en hepatocitos (Hosokawa y Thorens, 2002) y en células enterocitarias (Stümpel y cols., 2001). Estos trabajos proponen que la glucosa entraría a las células epiteliales mediante el cotransporte catalizado por SGLT1 y, que en ausencia de GLUT2, la glucosa acumulada intracelularmente podría difundir fuera de la célula a través de un mecanismo por el que dicha glucosa tendría que ser fosforilada y convertida a glucosa 6-fosfato. En este estado entraría dentro del retículo endoplásmico donde sería hidrolizada dando lugar a una molécula de glucosa y un fosfato. La glucosa sería entonces liberada fuera de la célula por un mecanismo basado el tráfico de membranas. Recientemente, otros estudios (Santer y cols., 2003) también muestran una ruta alternativa muy similar a la propuesta por Stümpel y sus colegas (2001) basada en el transporte de glucosa por vesículas intracelulares para la salida de glucosa desde el interior de la célula al intersticio. Este mecanismo vesicular alternativo a GLUT2 resulta interesante porque sugiere una ruta de salida de glucosa de la célula por un mecanismo que no se explica directamente por transporte activo o facilitado. Sin embargo, no pensamos que GLUT8 pueda estar implicado en esta ruta porque se conoce que el transportador específico que transporta la glucosa 6-P al interior de las vesículas es el G6PT1 (Santer y cols., 2003) y porque recientemente se ha mostrado que en ratones que carecen del gen GLUT2, la expresión de ARNm de GLUT8 no varía frente a ratones normales (Stümpel y cols., 2001). Por lo tanto, a nivel intracelular GLUT8 podría participar en otros procesos relacionados con la propia fisiología de la célula y el metabolismo de glucosa intracelular.

Intentando explicar cuál sería el papel que podría desempeñar un transportador de glucosa facilitador como GLUT8 asociado a orgánulos intracelulares, habría que revisar el

metabolismo celular de los carbohidratos. La glucosa es un sustrato que se utiliza en muy diversos procesos desde la glucosilación de proteínas que se están formando, hasta su oxidación completa para obtener energía en forma de ATP. La glucosa destinada para la obtención de energía debe ser captada por el resto de las células y los diferentes tejidos que componen el organismo, y de esta captación se encargan los transportadores de glucosa ya sea a través de un transporte activo (SGLT) o facilitado (GLUT). Además, la glucosa también es utilizada en el proceso de síntesis de proteínas, en particular durante su maduración en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi para ser conducidas a su destino final.

Este hecho podría explicar la expresión de GLUT8 intracelular en células cuya función exija una importante síntesis de glucoproteínas y glucolípidos. Un ejemplo sería la localización de GLUT8 en el acrosoma de las espermatozoides durante el proceso de espermatogénesis (Schürmann y cols., 2002; Ibberson y cols., 2002). Además, la implicación de GLUT8 en los procesos de glucosilación ya ha sido sugerida anteriormente por otros autores en otros tejidos como el cerebro de rata (Piroli y cols., 2002).

Por otro lado, la presencia de GLUT8 en las criptas del ileon es un dato curioso porque a este nivel no existe absorción intestinal, de modo que en las criptas, GLUT8 no estaría relacionado con el proceso de absorción de azúcares como se podría esperar en las células absortivas. Aquí, su posible función podría estar relacionada, bien con los procesos de glucosilación descritos anteriormente y/o con la elevada actividad celular que se produce en esta región. Cabe recordar que en las criptas se encuentran las células progenitoras indiferenciadas que se dividen constantemente y que siguen un proceso de diferenciación para dar lugar a los diferentes tipos de células epiteliales intestinales, lo cual exige una alta demanda energética. Esta demanda podría ser comparable a la que se produce en las células del blastocisto en sus primeros estadios de desarrollo (Pinto y cols., 2002). Pero también es comparable con los hepatocitos, que son células con capacidad de proliferación. Por tanto, todas estas células tienen algo en común y es que están sometidas a un proceso de proliferación y diferenciación celular, lo cual podría sugerir que GLUT8 fuera un transportador principalmente asociado a células con una gran demanda energética debida a estos procesos.

En colon, la función de GLUT8 podría estar relacionada con el proceso de absorción en determinados momentos específicos, como por ejemplo en los que la absorción en intestino delgado se ve interrumpida siendo necesaria la captación de azúcares por otro vía alternativa en tramos posteriores del intestino. Se conoce que en colon se produce absorción aunque no es tan importante como en yeyuno e ileon, y básicamente se resume a agua, vitaminas y electrolitos, mientras que la absorción de azúcares es muy baja. No obstante, además de ser un órgano en el que se produce absorción, existe bibliografía a favor de que esta capacidad se puede aprovechar para el tratamiento de enfermedades como el síndrome de "short bowel" (SBS) (Sidhu y cols., 1984; Weser, 1979). De hecho, estudios con ratas muestran que tras la eliminación de un 80% de la fracción yeyuno-ileon, la interposición de un fragmento de colon distal aumenta la capacidad de

absorción de glucosa respecto al grupo de ratas control a las que no se les ha reinsertado la fracción de colon. Además, el segmento reinsertado, al mismo tiempo, sufre un proceso de adaptación funcional con el desarrollo del pseudo-villi (Taha y cols., 2004) propio del intestino delgado.

Por otra parte, recientemente se han realizado estudios de caracterización cinética de los sistemas que transportan D-glucosa en colon (Tomei y cols., 2003b) habiéndose encontrado que estos sistemas de transporte en colon tienen una alta afinidad y una baja capacidad de transporte en comparación con el intestino delgado. Además, sugieren que el transportador de D-glucosa en colon es sodio dependiente (Tomei y cols., 2003a) y parece ser que se trata de una forma SGLT ya que es completamente inhibido por la florzina, un inhibidor específico de SGLT. Se ha visto expresión de ARNm de SGLT1 en colon, pero en cantidades traza en comparación con el intestino delgado (Lee y cols., 1994), de manera que este transportador podría estar modulado de diferente manera en colon. Otra posible alternativa para el transporte de D-glucosa en colon es que otras isoformas SGLT no identificadas como SGLT2 y SGLT3 sean las responsables de dicho transporte.

Sin embargo, puesto que la expresión de SGLT1, GLUT2 y GLUT5 es muy pequeña o no existe, quizás a este nivel, podría expresarse algún transportador facilitador de azúcares que en determinados casos muy concretos en los que se vieran limitados los demás sistemas de transporte en intestino delgado, pudiera asumir la función de transportar glucosa a través del epitelio intestinal. Por eso la presencia de GLUT8 en colon en el interior de la célula y en posición supranuclear muy cerca de la membrana plasmática, sugiere que este nuevo transportador podría asumir esta función. De manera que esta proteína estaría secuestrada intracelularmente esperando algún tipo de señal para translocarse a la membrana plasmática. Estudios de inmunohistoquímica sobre la expresión de GLUT8 en colon de ratones a los que se les ha delecionado una porción del intestino delgado nos ayudaría a corroborar esta hipótesis y ver si la proteína alcanza la membrana plasmática. Por otra parte, quizás su localización esté limitada al espacio intracelular sugiriendo así su participación en procesos relacionados con la propia fisiología enterocitaria, de modo que no podemos descartar un posible papel en procesos intracelulares como la glucosilación que ya hemos comentado para el intestino delgado.

Por tanto, ante los resultados obtenidos se puede decir que en condiciones basales, GLUT8 no parece estar implicado primordialmente en el transporte de glucosa a través de la membrana apical junto con SGLT1 y GLUT2 puesto que su expresión es baja, comparada con el resto de transportadores implicados en el proceso de absorción, y además, su distribución intracelular indica que podría estar implicado en otros procesos al margen del transporte transcelular de azúcares. Sin embargo, debido a su doble localización no se puede descartar que en momentos muy específicos pueda asumir esta función compensando la deficiencia de los demás sistemas de transporte.

Así pues, podemos proponer una doble función en intestino para GLUT8 como transportador de glucosa dependiendo de su localización celular. Por una parte, en condiciones basales GLUT8 podría estar implicado en el movimiento de la glucosa intracelular. Y por otra parte, puede que bajo ciertos estímulos, que aún no conocemos, alcance la membrana plasmática, y sirva de apoyo a los demás sistemas de transporte en la captación de glucosa desde el lumen intestinal, cuando los demás sistemas de transporte se ven saturados y/o alterados, o exista un importante estrés metabólico que produzca una gran demanda de glucosa por parte del organismo. Este estímulo podría tratarse de tipo hormonal como la insulina, o determinados factores que conllevan un estrés inducido, como puede ser una alta demanda energética causada por diferentes y variadas condiciones fisiológicas o estados celulares.

Dentro de los posibles estímulos que pudieran controlar la expresión celular de GLUT8, el más estudiado ha sido la insulina. La respuesta de GLUT8 a la insulina ha sido descrita en blastocistos de ratón, donde la insulina induce la translocación de GLUT8 desde compartimentos intracelulares a la membrana plasmática para asegurar una entrada de glucosa y con ello, la viabilidad (Carayannopoulos y cols., 2000; Pinto y cols., 2002). Por el contrario, se ha visto que células que expresan GLUT4, como los adipocitos, no translocan GLUT8 a la membrana plasmática bajo el estímulo de la insulina (Lisinski y cols., 2001). A raíz de estos estudios surge el planteamiento de si la proteína GLUT8 responde directamente a la insulina o si existe otro tipo de señales que puedan regular la expresión de dicha proteína.

Expresión de GLUT8 en intestino en estados de diabetes y ayuno

Un aspecto importante de los transportadores de glucosa es su regulación ante determinadas situaciones fisiopatológicas. Puesto que GLUT8 se expresa en las células epiteliales absortivas quisimos ver si, como ocurre con otros transportadores, esta proteína también modifica su expresión en estados de diabetes y en procesos de ayuno. Esta alteración en el patrón de expresión puede producirse tanto a nivel de ARNm como a nivel de proteína. Nosotros hemos estudiado la proteína como una primera aproximación para ver la expresión de GLUT8 en respuesta a la diabetes y el ayuno.

Los resultados obtenidos mediante western blot muestran que GLUT8 experimenta una modulación diferente de su expresión en respuesta a la diabetes y el ayuno. Además, esta regulación también varía en función de la región intestinal observada.

Ratones a los que se les ha inducido un estado diabético, muestran un claro aumento de la expresión proteica de GLUT8 tanto en yeyuno como en ileon, pero no se observa ninguna variación ni en duodeno ni en colon. Curiosamente, en la expresión de la proteína sólo se ven afectadas las dos regiones intestinales implicadas principalmente en la absorción de azúcares.

Por otro lado, el estado de ayuno de 24 horas induce una pequeña disminución en la expresión proteica de GLUT8 en yeyuno e ileon, mientras que en colon y duodeno de nuevo no se aprecian variaciones.

Uno de los trabajos más completos que describe la variación de la expresión de los transportadores SGLT1, GLUT2 y GLUT5 en los enterocitos bajo estados de diabetes es el realizado por Burant y colaboradores (1994) en ratas diabeticas inducidas experimentalmente con STZ. Según estos estudios existe un aumento significativo de la cantidad de la proteína GLUT2 tanto en yeyuno como en ileon. Y debido a que los niveles basales de expresión de GLUT2 en ileon son más bajos que en yeyuno, el incremento de la expresión en diabetes es más significativo en ileon que en yeyuno. La expresión de la proteína GLUT5 también aumenta bajo un estado de diabetes en yeyuno e ileon. La expresión de SGLT1 en estados de diabetes es más variable ya que el aumento de su expresión es mucho mayor en yeyuno comparado con ileon (Burant y cols., 1994). Este trabajo también describe que el aumento de la proteína viene acompañado por un aumento en la expresión de ARNm. Este incremento se produce tanto en yeyuno como en ileon, y son mayores para GLUT2 y SGLT1 que para GLUT5 (Burant y cols., 1994).

Por tanto, a pesar de que la expresión y distribución celular de GLUT8 en condiciones basales sea un tanto atípica respecto a los transportadores clásicos, los resultados observados sobre la expresión de GLUT8 por el efecto de la diabetes están en correlación con los efectos observados sobre la expresión de los transportadores de glucosa SGLT1, GLUT2, y GLUT5 en las células intestinales de la región del yeyuno e ileon. El aumento general de la expresión de estos transportadores en estados de diabetes frente a un estado basal podría explicarse como una respuesta adaptativa del organismo a una falta de captación de glucosa en los tejidos. Y dado que en yeyuno e ileon es donde se produce la mayor parte de la absorción de nutrientes, esta zona podría ser la más sensible a cambios en la concentración de glucosa en sangre.

Una de las características más relevantes de GLUT8 cuando empezaron a realizarse los primeros estudios funcionales fue el hecho de que esta proteína podría ser insulino-dependiente, de un modo similar a lo que ocurre con GLUT4. El efecto de la diabetes sobre la expresión de GLUT8 en otros tejidos ha sido estudiada por diferentes grupos de investigación.

Algunos trabajos utilizan como modelo experimental animales diabéticos para estudiar la expresión de GLUT8 en cerebro (Reagan y cols., 2001) y en hígado (Gorovits y cols., 2003).

Los trabajos realizados en cerebro muestran que en algunas células del hipocampo bajo un estado de diabetes incrementa la expresión de ARNm de GLUT8, de modo que los niveles de ARNm responden a la hiperglucemia o a la insulinopenia como en el caso de la diabetes de tipo I, mientras que los niveles de proteína se mantienen inalterados. Sin embargo, no descartan que la proteína GLUT8 pueda ser modulada y que por cuestiones de estabilidad de la proteína siempre se mantenga en su expresión basal (Reagan y cols., 2001). Otra cuestión, es la posible translocación de GLUT8 a la membrana plasmática y, en su caso, cuál sería el estímulo para dicha

translocación. Ante esta cuestión, recientemente se ha utilizado la línea celular N2A de neuroblastoma de ratón, para estudiar si la translocación de GLUT8 en neuronas responde a la insulina (Shin y cols., 2004). Estos autores estudian el posible efecto de la insulina y el IGF-I (insulin-like growth factor-I) en células transfectadas con GLUT8, y en ninguno de los dos casos se producía la translocación de GLUT8 a la membrana plasmática. De esta manera parece que la translocación de GLUT8 en neuronas no responde a la insulina, y el estímulo endógeno necesario para esta translocación se desconoce.

Por otra parte, otros estudios realizados también en hipocampo de rata (Piroli y cols., 2002) muestran que el suministro de glucosa produce un aumento de la proteína GLUT8 en el RE rugoso mientras que en ratas a las que se les ha inducido un estado de diabetes tratándolas con STZ, este aumento no se observa, de modo que no se produce la translocación de GLUT8 desde los compartimentos de baja densidad a los de alta densidad. Por eso, estos autores, proponen que la insulina constituiría un importante estímulo para mediar dicha translocación, pero en este caso no hacia la membrana plasmática sino una translocación hacia diferentes orgánulos intracelulares.

En hígado, estudios realizados con ratones diabéticos, muestran que los niveles de ARNm están correlacionados con los niveles de insulina en sangre, de modo que el ARNm de GLUT8 disminuye en diabetes de tipo I (ratones tratados con STZ) y aumenta en modelos de diabetes de tipo II (ratones heterocigotos para GLUT4), sugiriendo que la insulina regula la expresión del ARNm de GLUT8. Mientras que en ambos modelos, la expresión de la proteína se ve aumentada, pero sólo en los ratones diabéticos tratados con STZ se ve alterada la localización de GLUT8 mediante una regulación traduccional o post-traduccional apareciendo, en este caso, expresada en los hepatocitos que rodean la vena central. Estos estudios sugieren que la expresión de ARNm GLUT8 y la proteína está regulada de manera diferente en el hígado en respuesta a la diabetes, y sugiere que GLUT8 está íntimamente relacionado con la homeostasis de la glucosa (Gorovits y cols., 2004). Por tanto, la expresión del gen GLUT8 es significativamente modificada cuando los niveles de glucosa e insulina en suero son alterados.

Estudios sobre blastocistos de ratones tratados con insulina adicionada al medio, han mostrado que esta hormona induce una translocación desde compartimentos intracelulares hacia la membrana plasmática (Carayannopoulos y cols., 2000). Por tanto, parece ser que GLUT8 responde a la insulina modulando su patrón de expresión, pero no se sabe con certeza si esta respuesta es directa o está asociada a los cambios fisiológicos que se producen cuando se altera dicha hormona.

Resumiendo, nuestros resultados muestran que a los 5 días después del tratamiento de los ratones con aloxana, la expresión de la proteína GLUT8 en yeyuno e ileon aumenta respecto a los ratones control. Estos resultados sugieren que bajo un estrés metabólico como es la diabetes, GLUT8 podría cumplir un papel importante de apoyo intentando absorber glucosa para abastecer la falta de este azúcar en los tejidos. El aumento de su expresión en estados de diabetes está en

correlación con el patrón general de aumento de la actividad transportadora observado en SGLT1, GLUT2 Y GLUT5 bajo esta situación fisiopatológica.

Sin embargo, los mecanismos por los cuales la diabetes aumenta la expresión de los transportadores intestinales no están claros. Algunos estudios sugieren que no sólo la carencia de insulina es lo que causa los cambios de expresión de los transportadores de hexosas, ya que desde una infusión de glucosa hasta una alimentación rica en carbohidratos puede incrementar dicha expresión, de modo que incrementos de glucosa tanto en sangre como en el lumen intestinal pueden aumentar la actividad transportadora (Debnam y Unwin, 1996).

La señal primaria responsable de la regulación del transporte intestinal es muy difícil de identificar ya que con los estudios realizados hasta la fecha no ha sido posible alterar solo una variable al mismo tiempo. La respuesta a la diabetes es un ejemplo de los problemas a los que está sujeto este tipo de estudios. Hay que pensar que niveles bajos de insulina o/y hiperglucemia constituyen un claro estímulo para la respuesta en cuanto al transporte renal e intestinal, pero la diabetes está asociada a cambios en la secreción de otras hormonas como el glucagón o la hormona del crecimiento, y estas hormonas deben ser consideradas también como posibles candidatas que podrían estar implicadas en la adaptación de las capacidades absorbivas del intestino.

El ayuno es también un estado en el que se puede modificar la expresión de los transportadores de glucosa. Teóricamente, cuando no hay ingesta de comida se produce la reducción de la concentración de azúcares en el lumen intestinal, lo cual provoca la disminución de una de las señales que regula el transporte en los animales bien alimentados. Sin embargo, paradójicamente se ha observado que el transporte intestinal de azúcares aumenta con el ayuno, y este aumento no se puede explicar por la ausencia de azúcares en el lumen. Por tanto, es posible que el ayuno produzca un aumento directo de la expresión de los genes encargados del transporte y, con ellos, su actividad transportadora, pero los mecanismos que regulan este hecho todavía se desconocen (Ferraris y Carey, 2000).

Numerosos estudios demuestran que la señal que aumenta la expresión de los transportadores es la presencia de azúcares. Los cambios de ARNm de SGLT1 inducidos por la dieta son de menor magnitud que los de la abundancia de la proteína, por lo que se sugiere que la regulación de SGLT1 por la dieta debe estar modulada principalmente por mecanismos postranscripcionales. Se ha visto que la cantidad de ARNm de SGLT1 aumenta en ratas alimentadas con grandes cantidades de glucosa, galactosa, glicerol, fructosa, xilosa, manosa y otros azúcares de la dieta (Miyamoto y cols., 1993; Kishi y cols., 1999). En el intestino delgado humano, SGLT1 también está regulado por la dieta (Dyer y cols., 1997), ya que se ha comprobado que el transporte de glucosa es mayor en la membrana de borde cepillo de vesículas obtenidas de tejido intestinal normal expuesto a nutrientes luminales, que en vesículas obtenidas con una exposición limitada de nutrientes.

A diferencia de SGLT1, el aumento de la expresión en intestino delgado de GLUT5 está relacionado solamente con dietas que contienen fructosa y la regulación de dicha expresión es rápida. Además, los cambios en el transporte de fructosa son paralelos a cambios similares en la abundancia de ARNm de GLUT5 y de la proteína. La proteína GLUT5 aumenta 5 veces justo un día después de empezar a consumir grandes cantidades de fructosa, y continúa incrementándose gradualmente durante el tiempo que continúa el consumo de fructosa (Burant y Saxena, 1994). En ratas, los niveles de ARNm se doblan dentro de las 3 horas después de una perfusión intestinal con una solución de fructosa (Kishi y cols., 1999).

En cuanto a GLUT2, se ha observado que la regulación de su expresión depende del origen de la señal. La hiperglucemia inducida por la perfusión de glucosa conlleva dentro de las 2 primeras horas un incremento de la captación de glucosa en vesículas preparadas a partir de membrana basolateral de células epiteliales de yeyuno (Maenz y Cheeseman, 1987). Curiosamente este incremento de la tasa de transporte de glucosa no viene acompañado del aumento de la expresión de la proteína GLUT2. Sin embargo cuando se expone a las ratas a una dieta rica en carbohidratos, el incremento de la tasa de transporte sí que viene acompañado por el incremento de la expresión de la proteína (Cheeseman y Harley, 1991). Ambas observaciones juntas sugieren que la tasa de transporte a través de la membrana basolateral después de producir una hiperglucemia por perfusión se debe a cambios en la actividad intrínseca de los transportadores sin afectar la expresión de estos genes, mientras que la exposición crónica a una elevada concentración de glucosa luminal debe estimular la síntesis de nuevos transportadores de glucosa en la membrana de los enterocitos.

Todos estos estudios indican que la propia presencia de azúcares en el lumen intestinal parece ser la principal señal que estimula o aumenta la expresión de SGLT1, GLUT2 y GLUT5. Por lo tanto, explicar el aumento de transporte de azúcares durante el ayuno resulta un poco ambiguo. Sin embargo, una posible explicación del aumento del transporte de azúcares sería el cambio en la fluidez de la membrana (Gupta y Waheed, 1992). Ambos aspectos, el aumento de la expresión de los transportadores y la fluidez, favorecerían el paso de azúcares a través de la membrana. No obstante, se han realizado muy pocos estudios sobre este tema. Otra posible explicación sería una reacción al organismo ante la ausencia de hidratos de carbono, aumentando el número de transportadores para intentar captar más azúcares.

Nosotros hemos observado que, en yeyuno e ileon, GLUT8 disminuye ligeramente su expresión durante el ayuno, mientras que en duodeno y colon no parece alterarse. Una posible explicación sería que al no estar implicado GLUT8 en el transporte basal de glucosa en la membrana apical, las variaciones de concentración de glucosa en el lumen no debe ser un factor decisivo en la regulación de su expresión proteica.

En principio, nuestro trabajo se ha limitado al estudio de la regulación de la proteína GLUT8 en los estados de diabetes y ayuno, pero actualmente estamos completando estos estudios para ver que ocurre a nivel de ARNm y de su localización celular.

Identificación de diferentes transcritos del gen GLUT8

En nuestro trabajo hemos detectado la expresión de tres transcritos diferentes de GLUT8 generados por la pérdida de diferentes exones. Los resultados de la clonación y secuenciación de estos transcritos indican que además de la forma completa de GLUT8 existen, en intestino de ratón, tres transcritos adicionales, que hemos denominamos como SP1, SP2 y SP3. El transcrito SP1 es generado por la delección del exón VII, SP2 por la delección de los exones VII y VIII, mientras que SP3 ha perdido los exones II, III, IV y VII.

La existencia de diferentes transcritos originados a partir del gen GLUT8 mediante un procesado alternativo de corte y empalme de varios exones de la secuencia genómica, no es un fenómeno único dentro de los transportadores de la familia GLUT. Recientemente han sido publicados varios artículos que describen la existencia de formas alternativas para otros transportadores de la familia GLUT, como GLUT9 y GLUT11. La cuestión que se plantea ahora es el significado funcional de estos transcritos dentro de la célula, que podría ser de tipo regulador o interaccionando con otras proteínas o complejos proteicos.

Muy recientemente se ha descrito una variante transcripcional para el transportador GLUT9 (Augustin y cols., 2004). Estos autores han observado, además de la forma completa, la existencia de una forma alternativa, originada por la pérdida de un exón en el extremo 5', originándose de esta manera dos proteínas que difieren únicamente en su región N-terminal. Ambos transcritos están regulados por promotores diferentes, y se expresan en diferentes tejidos, lo que sugiere que podrían tener funciones distintas. Además, la diferencia de secuencia aminoacídica en el extremo N-terminal, hace que una de las formas alternativas sea más corta en su extremo amino terminal, perdiendo el motivo -LL- responsable de su internalización, o como sugieren los autores, responsable de una localización celular específica. De hecho, ambas isoformas se localizan con patrones diferentes dentro de la célula. Por ejemplo en estudios realizados en células MDCK (células epiteliales de riñón de perro), se ha observado que, mientras que GLUT9 se localiza exclusivamente en la membrana basolateral, la forma alternativa más corta, se dirige a la membrana apical de estas células en su estado diferenciado y polarizado.

En relación a GLUT11, dos grupos han publicado la existencia de variantes transcripcionales para este transportador (Sasaki y cols., 2001; Wu y cols., 2002).

Los primeros estudios sobre GLUT11 (Sasaki y cols., 2001) mostraron la presencia de numerosos transcritos, que fueron agrupados en tres tipos de variación. El primer tipo de variación es debida a la existencia de tres diferentes primeros exones, controlados por tres promotores distintos. Esta variación genera 3 proteínas distintas (denominadas GLUT11a, GLUT11b y GLUT11c), que se diferencian únicamente en los primeros aminoácidos del extremo N-terminal de su secuencia, y que se expresan de forma específica en diferentes tejidos, por lo que estas variantes transcripcionales constituirían un mecanismo para controlar su expresión tisular, similar a lo que se ha observado en las isoformas de GLUT9. Esta variación transcripcional también ha sido

observada en GLUT11 por otro grupo (Wu y cols., 2002), aunque únicamente han detectado la existencia de dos de las tres variantes transcripcionales. Estas dos variantes originarían dos productos proteicos diferentes en su extremo N-terminal y que corresponden con las variantes GLUT11a y GLUT11b. La diferencia entre ambos trabajos estriba en que los primeros describen la existencia de tres primeros exones con promotores diferentes, mientras que los segundos autores explican la aparición de estas dos isoformas por la delección de un exón que no tenían en cuenta el grupo de Sasaki y colaboradores (2001).

El segundo tipo de variación ocurre por la delección del sexto exón, lo que provoca un corte en la secuencia codante que generaría una nueva proteína, en la que se elimina una gran porción del extremo C-terminal, concretamente toda la secuencia comprendida entre los dominios transmembrana 5 y 12 de GLUT11.

Finalmente, la tercera variación descrita para GLUT11 está causada por una parada prematura en la transcripción del gen que se localiza entre el exón 8 y 9, generando como en el caso anterior una proteína similar a GLUT11 pero truncada a ese nivel, y por lo tanto eliminando la secuencia polipeptídica situada entre los dominios transmembrana 8 y 12.

Las variantes transcripcionales que nosotros hemos encontrado en nuestro estudio para GLUT8 son de características similares al segundo tipo de variación descrito para GLUT11 (Sasaki y cols., 2001). En efecto, el análisis de la secuencia proteica deducida para SP1 y SP2 indica que serían proteínas truncadas de GLUT8, en las que se pierden los últimos 5 dominios transmembrana. Como estos autores, nosotros pensamos que estas variantes, al perder varios motivos comunes de la familia GLUT presentes en esos dominios truncados, pierden también su capacidad como transportadores de glucosa, por lo que podrían jugar otro papel fisiológico, todavía sin identificar. En el caso del transcrito SP3, se pierde completamente toda la secuencia correspondiente a GLUT8, exceptuando los primeros aminoácidos, y generando así una pequeña proteína soluble de pequeño peso molecular.

Es muy probable que las proteínas originadas a partir de las secuencias de SP1, SP2 y SP3 pierdan su función transportadora, sin embargo podrían tener un papel regulador sobre la expresión de GLUT8.

Una posible función reguladora sería actuando sobre la síntesis proteica de GLUT8. No debemos olvidar que la síntesis proteica supone un alto coste energético a la célula, por eso la regulación de la expresión génica es esencial para que una célula pueda hacer un uso óptimo de la energía disponible. Existen varios puntos potenciales en los que la cantidad de proteína sintetizada puede ser regulada. Uno de ellos es el procesamiento post-transcripcional del ARNm mediante un mecanismo de maduración por corte y empalme ("splicing") diferencial. De esta manera los transcritos primarios producen un ARNm maduro que origina un producto polipeptídico específico, mientras que cuando se produce una maduración por corte y empalme diferencial, se generan dos o más moléculas de ARNm que dan lugar a diferentes proteínas. Los transcritos

primarios poseen varias rutas alternativas de maduración para generar los diferentes transcritos, que serán activadas en función del tipo celular donde se exprese o en función de las etapas del desarrollo donde se encuentra, pudiendo así generar un transcrito u otro.

Parece lógico pensar que la generación de transcritos mediante corte y empalme de la secuencia exónica tiene algún significado para la biología de la célula. Por un lado, se puede tratar simplemente de la generación de productos proteicos que son rápidamente degradados, contribuyendo de esta manera a la regulación de la expresión de la proteína del transcrito primario, en nuestro caso GLUT8. Y por otro lado, puede ser la síntesis de nuevas proteínas con un significado o función completamente distinta a la proteína originaria, pero que puede estar relacionada con la regulación o control de dicha proteína primaria.

Para intentar investigar esa posible función de los transcritos alternativos de GLUT8 realizamos estudios de transfección transitoria de los mismos en células 3T3-L1 diferenciadas en adipocitos. Estas células al expresar de forma endógena la proteína GLUT8 nos han permitido estudiar si los transcritos alternativos ejercen algún papel sobre su expresión, tanto a nivel de ARNm como de la proteína.

Los resultados obtenidos mediante PCR cuantitativa a tiempo real, nos permitieron cuantificar de forma comparativa la expresión del ARNm de GLUT8 entre células control, y células transfectadas con los diferentes transcritos. Como se ha descrito en los resultados, únicamente en las células transfectadas con el transcrito SP3 se observa un pequeño, pero significativo, aumento de la expresión del ARNm de GLUT8. Sin embargo, este pequeño aumento no se vio reflejado cuando se estudió la expresión proteica. Esta diferencia entre un efecto observable en la expresión de ARNm, pero no en la proteína, es quizás debido a la sensibilidad de la técnica de western blot, donde pequeñas variaciones no puedan ser visibles o claramente cuantificables. Otra posibilidad es que como se ha observado para otros transportadores como GLUT5 (Mesonero y cols., 1995), exista una diferencia de tiempo sustancial, entre dos o tres días, desde que se observan unos efectos estimulantes sobre la expresión de ARNm, hasta que estos efectos se trasladan a nivel proteico.

Por tanto, según estos resultados, únicamente SP3 parece tener algún papel regulador, aunque pequeño, sobre la expresión del transcrito primario GLUT8. Los otros dos transcritos SP1 y SP2 no muestran ningún efecto, por lo que nosotros pensamos que podrían ser simplemente rutas alternativas de la expresión del transcrito primario para modular una mayor o menor expresión del mismo, y donde los productos polipeptídicos originados no serían traducidos o simplemente degradados de forma rápida.

Otro posible punto donde los transcritos podrían ejercer una función sería en la regulación post-transcripcional, modulando la localización celular de la proteína. Como ya se ha descrito, GLUT8, debido a su motivo -LL-, normalmente está localizado en compartimentos intracelulares (Ibberson y cols., 2000), esperando alguna señal para ser translocado hacia la membrana

plasmática de la célula u otros compartimentos celulares. Para estudiar esta posibilidad realizamos estudios de inmunofluorescencia indirecta sobre células 3T3-L1 control, y células transfectadas con los diferentes transcritos para conocer si existía alguna variación en la localización intracelular de la proteína. Como se ha mostrado en el apartado de resultados, de nuevo, únicamente las células transfectadas con el transcrito SP3 mostraron una variación en la localización intracelular de GLUT8. Estos resultados indican que en las células transfectadas con SP3, GLUT8 es redistribuido hacia una zona periplasmática o plasmática, mostrando una localización diferente de la de las células control, donde la distribución es homogénea y de tipo granular, por todo el citoplasma.

Los resultados anteriores sugieren pues que SP3 podría tener un papel regulador sobre la expresión celular de GLUT8, induciendo una translocación desde compartimentos intracelulares hacia la membrana plasmática. Estos resultados inducen a pensar que la captación de glucosa por estas células debería estar aumentada, debido a la expresión de un mayor número de transportadores en su membrana plasmática. Para verificarlo, realizamos estudios para conocer el consumo de glucosa en las diferentes células transfectadas, que depende del estado metabólico de la célula y también del número de transportadores que expresa en su membrana. Estos estudios confirmaron nuestra hipótesis, puesto que de nuevo, las células transfectadas con SP3 mostraron un aumento significativo en el consumo de glucosa, mientras que las células transfectadas con los otros transcritos no modificaron dicho consumo.

Todos estos resultados sugieren que SP1 y SP2 no tienen importancia en lo que se refiere a la regulación de GLUT8, y además, dado que pierden una gran porción de la secuencia proteica primaria de GLUT8, tampoco podrían tener un papel "*per se*" como transportadores de glucosa. Por otra parte, no hemos encontrado ninguna homología en la secuencia de aminoácidos con otras proteínas pertenecientes a la gran familia de siete dominios transmembrana, que pudiera sugerir otras posibles funciones para estas variantes transcripcionales.

Por otro lado, el transcrito SP3 revela cierto interés por ejercer un efecto sobre la expresión del ARNm de GLUT8, pero sobre todo por ejercer un efecto post-traduccionale inducir la translocación de la proteína GLUT8 desde compartimentos intracelulares a la membrana plasmática. Por todo ello, nosotros pensamos que SP3 podría ser un candidato a pertenecer al grupo de proteínas de unión a transportadores de glucosa (GTBP: glucose transporter binding protein), donde se engloban una serie de proteínas que interactúan con transportadores de la familia GLUT y que parecen también estar implicadas en los mecanismos de endocitosis y exocitosis de GLUT4 en adipocitos (Jung, 1996). Otra posibilidad es que SP3 esté relacionado con las proteínas SNAP (soluble NSF attachment proteins), implicadas en la maquinaria celular para la fusión de vesículas a la membrana plasmática y que se han descrito para los procesos de translocación de GLUT4 desde su localización intracelular (Watson y Pessin, 2001) hacia la membrana plasmática.

Evidentemente, son necesarios otros experimentos para poder asegurar el papel modulador de SP3, empezando por la identificación de la proteína, y posteriormente por estudiar su posible interacción proteína-proteína con GLUT8 y otros transportadores de la familia GLUT.

Finalmente, hay que destacar el hecho de que estas variantes transcripcionales hayan sido detectadas en intestino, pero no en testículo, sugiriendo diferentes tipos de regulación en función de su expresión tisular, como ocurre con otros transportadores.

Expresión de GLUT8 en la línea celular humana Caco-2

El último objetivo que nos planteábamos en este trabajo era la comparación de la expresión de GLUT8 en las células absortivas de intestino de ratón con su homólogo humano.

Para realizar el estudio de la expresión de GLUT8 en células epiteliales absortivas intestinales utilizamos el modelo celular Caco-2. Como se ha descrito en material y métodos, esta línea celular realiza una diferenciación morfológica y funcional espontánea de tipo enterocitario, y ha sido ampliamente utilizada para el estudio de proteínas enterocitarias (Zweibaum y cols., 1991), y entre ellas los transportadores de glucosa (Mahraoui y cols., 1994; Mesonero y cols., 1994).

Contrariamente a lo que inicialmente esperábamos, los primeros experimentos sobre ARNm extraído de estas células nos indicaron que las células Caco-2 no expresan la forma completa de GLUT8. En su lugar, mediante RT-PCR, amplificamos fragmentos correspondientes a GLUT8, que tras su análisis y secuenciación mostraron ser variantes transcripcionales del mismo, producidas por un procesado alternativo de corte y empalme, igual que en intestino de ratón.

De esta manera, hemos aislado e identificado tres nuevas variantes transcripcionales de GLUT8 humano, que hemos denominado como HSP1, HSP2 y HSP3. Como ocurrían en el caso del ratón, estas variantes son el resultado de la delección de varios exones. Sin embargo, estas variantes no son idénticas a las detectadas en ratones. No obstante, en todas ellas se produce un hecho común, que es la pérdida de los exones II y III. El análisis de la proteína teórica deducida de los tres transcritos nos indicó que todos originarían una pequeña proteína de 39 aminoácidos, que como la deducida para SP3 solo conserva los primeros 18 aminoácidos idénticos a la proteína GLUT8. La comparación entre la proteína deducida para SP3 y las tres variantes aisladas en Caco-2 no mostró ninguna homología salvo los primeros aminoácidos.

Todos estos resultados obtenidos en las células Caco-2 nos inducen a pensar que la formación de variantes transcripcionales se produce en detrimento de la forma completa de GLUT8, o que pudiera ser simplemente una estrategia celular para no transcribir la secuencia correspondiente a GLUT8, quizás porque no sea necesaria para su función

No debemos olvidar sin embargo, que las células Caco-2, a pesar de ser un excelente modelo *in vitro* para el estudio de ciertas funciones enterocitarias, son células de origen canceroso. Por ello, también es posible que la no expresión de GLUT8, y en su lugar la expresión

de unos transcritos determinados, fuera una consecuencia de su origen canceroso. Esto estaría en concordancia con otros datos ya observados para GLUT8, que aun siendo un transportador con una gran expresión en testículo no se detecta en muestras de carcinoma testicular (Doege y cols., 2000).

Estas observaciones podrían igualmente sugerir que el transportador GLUT8 no sea un elemento esencial en toda la maquinaria celular para realizar la absorción de azúcares en los enterocitos, puesto que los otros componentes hasta ahora descritos y conocidos, SGLT1, GLUT5 y GLUT2, sí que son expresados correctamente en estas células (Mahraoui y cols., 1994; Mesonero y cols., 1994). De hecho, la línea celular Caco-2 expresa tanto el ARNm como la proteína GLUT5, GLUT2 y SGLT1, con la misma especificidad de localización celular y de membrana que en los enterocitos, y sigue patrones de expresión y regulación similares a los conocidos en animales (Mahraoui y cols., 1994; Matosin-Matekalo, 1998 y 1999). Por ello, podríamos pensar que GLUT8 no es un elemento esencial en la absorción de azúcares, sino más bien, podría ser un elemento de apoyo para situaciones puntuales, como la llegada de grandes cantidades de carbohidratos a la luz intestinal, o como una respuesta antes estados de diabetes, que como hemos observado previamente en ratones induce un aumento en su expresión.

Otro aspecto a tener en cuenta, es que las células Caco-2, debido justamente a su origen cancerígeno, también expresan otros transportadores, en menor cantidad, como son GLUT1 y GLUT3 (Mahraoui y cols., 1994; Mesonero y cols., 1994). Es posible, entonces, que la expresión de estos transportadores condicione la expresión de GLUT8, puesto que ya le aseguran una captación de glucosa extra para sus funciones.

Por el momento no hemos realizado experimentos similares a partir de tejidos humanos. Sin embargo, estamos convencidos que se debería estudiar la expresión de este transportador en tejido intestinal humano, fundamentalmente para comprobar si lo observado en las células Caco-2 es debido a su origen canceroso, y además, para poder extrapolar los resultados obtenidos en otras especies como la rata o el ratón.

VI. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos y del análisis de los mismos, hemos llegado a las siguientes conclusiones:

1.- GLUT8 es un transportador de glucosa que se expresa en tejido intestinal de ratón, tanto a nivel de ARNm como de proteína.

2.- La expresión proteica de GLUT8 es baja a lo largo de todo el tracto intestinal y, a diferencia de otros transportadores, se expresa en colon.

3. En ileon, la expresión de la proteína GLUT8 se localiza en las células epiteliales absortivas de la mucosa, tanto en las vellosidades como en las criptas. En las células de las vellosidades se observa una localización intracelular supranuclear, y también una localización que parece estar asociada a la membrana del borde en cepillo. Sin embargo en las células de las criptas su localización es únicamente intracelular.

4.- En colon, la expresión de GLUT8 está también limitada a las células epiteliales absortivas de la mucosa, sin observarse en las criptas. Dentro de estas células su localización es intracelular, alrededor del núcleo, y en el tercio superior de la célula, próximo a la membrana apical.

5.- La inducción de un estado experimental de diabetes en ratones provoca un aumento de la expresión proteica de GLUT8 en yeyuno e ileon.

6.- Un estado de ayuno de 24 horas en ratones, induce una ligera disminución de la expresión de GLUT8 en yeyuno e ileon.

7.- En duodeno y colon, la expresión proteica de GLUT8 no se ve alterada ni en estado de ayuno, ni en estados de diabetes.

8.- En intestino de ratón hemos detectado, aislado e identificado la expresión adicional de tres variantes transcripcionales producidas por un procesado alternativo de corte y empalme del gen GLUT8.

9.- La variante transcripcional SP3 parece tener una función sobre GLUT8, aumentando su expresión a nivel transcripcional, y también realizando una regulación a nivel post-traducciona, induciendo una translocación de la proteína desde compartimentos intracelulares hacia la membrana plasmática. Sin embargo, los transcritos denominados SP1 y SP2 no parecen tener ninguna función, y podrían ser simplemente un mecanismo de control de la transcripción de GLUT8.

10.- Las células Caco-2 no expresan GLUT8, pero sí variantes transcripcionales que darían lugar todas ellas a un mismo producto proteico teórico de muy pequeño peso molecular, diferente al observado en ratón.

A partir de todos los resultados obtenidos podemos entonces llegar a una conclusión global, en la que GLUT8 es un transportador de glucosa expresado en las células epiteliales absortivas intestinales, y que estados como la diabetes y el ayuno ejercen sobre él una regulación en su expresión. Por otro lado, la existencia de variantes transcripcionales sugieren que este transportador posee además un sistema complejo de regulación, donde una de esas variantes transcripcionales podría estar implicada en la translocación de la proteína desde compartimentos intracelulares a la membrana plasmática.

VII. RESUMEN

RESUMEN

GLUT8 es un transportador de glucosa recientemente clonado, que se expresa fundamentalmente en testículo, aunque también se ha detectado en otros tejidos como cerebro e intestino. En este trabajo hemos analizado la expresión y localización de GLUT8 en intestino de ratón en diferentes situaciones, utilizando técnicas de RT-PCR, western blot e inmunohistoquímica, y hemos estudiado la regulación de su expresión y su función utilizando métodos de transfección y cultivo celular. Nuestros resultados indican que GLUT8 se expresa en las células epiteliales absortivas de la mucosa en todo el tracto intestinal del ratón, incluido el colon, en una localización fundamentalmente supranuclear. Hemos observado también que en animales sujetos a ayuno durante 24 horas la expresión de GLUT8 disminuye ligeramente en yeyuno e ileon, mientras que la inducción experimental de un estado de diabetes provoca el incremento de la expresión del transportador en esos mismos segmentos intestinales. Asimismo, hemos detectado, aislado e identificado la expresión adicional de tres variantes transcripcionales producidas por un procesado alternativo de corte y empalme del gen GLUT8 en intestino de ratón, a las que hemos denominado SP1, SP2 y SP3. Hemos estudiado la posible función de estas tres variantes en la regulación de la expresión y función de GLUT8 transfectando células 3T3-L1 con los diferentes transcritos y hemos observado que tan solo la variante SP3, la más corta de las tres, tiene un efecto sobre la función de GLUT8, ya que la transfección de las células con esta variante induce un aumento de la expresión de su ARNm y un cambio en la localización de la proteína, que se transloca hacia a la membrana plasmática, provocando con ello, un aumento en el transporte de glucosa al interior de las células. Finalmente hemos estudiado la expresión de GLUT8 en la línea celular de carcinoma de colon humano Caco-2. Hemos observado que, sorprendentemente, estas células no expresan la forma entera de GLUT8, pero sí que expresan variantes transcripcionales que darían lugar a productos proteicos teóricos de muy bajo peso molecular, diferentes a los detectados en intestino de ratón. Estos resultados indican que GLUT8 es un transportador de glucosa que se expresa en células epiteliales absortivas intestinales, y que estados como la diabetes o el ayuno ejercen sobre él una regulación de su expresión. Por otra parte, la existencia de diversas variantes transcripcionales producidas por corte y empalme alternativo sugieren un complejo sistema de regulación de este transportador, sistema en el que las propias variantes, especialmente SP3, podrían estar directamente implicadas. Asimismo, la diferente regulación de GLUT8 en células Caco-2 respecto a lo observado en intestino de ratón sugiere la existencia de diferencias en la regulación del gen en función de la especie o del tipo celular.

VIII. SUMMARY

SUMMARY

GLUT8 is a recently cloned glucose transporter mainly expressed in testis, although it has also been detected in other tissues like brain or intestine. In this work we have analyzed GLUT8 expression and localization in mouse intestine in different situations by RT-PCR, western blot and immunohistochemistry techniques, and we have studied the regulation of its expression and function by gene transfection and cell culture methods. Our results show that GLUT8 is expressed in the epithelial cells throughout the intestinal tract, mainly in a supranuclear location. We also show that 24 hours of fasting causes a slight decrease of GLUT8 expression in jejunum and ileum, while experimentally-induced diabetes increases GLUT8 expression in the same intestinal segments. Furthermore we have detected, isolated and identified the additional expression of three transcriptional variants that we have named SP1, SP2 and SP3, produced by alternative splicing of GLUT8 in mouse intestine. We have studied a possible role of these alternative variants in the regulation of GLUT8 expression and function by transfecting 3T3-L1 cells with the three different transcripts. We have observed that only the shortest splice variant, SP3, have an effect on GLUT8 expression and function, since cell transfection with this variant increases on RNAm expression, and induces a change in protein localization which moves to the cell membrane, therefore enhancing glucose transport. We also have studied GLUT8 expression in a human colon carcinoma cell line, Caco-2. We have seen that surprisingly, these cells do not express the complete form of GLUT8; however they express some transcriptional variants that at least theoretically, would produce peptides of low molecular weight, different to the splice variants detected in mouse intestine. These results show that GLUT8 is a glucose transporter expressed in epithelial intestinal cells and that conditions like diabetes or fasting can regulate its expression. In addition, the presence of several transcriptional splice variants suggest a complex system for GLUT8 regulation, a system in which the splice variants, specially SP3, could be involved. Finally, the different regulation of GLUT8 in Caco-2 cells and in mouse intestine suggest a different regulation of GLUT8 depending on the species and/or the cell type.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Alpers DH. (1994). Digestion and absorption of carbohydrates and proteins. In: *Physiology of the gastrointestinal tract*. Johnson, L.R. ed., New York: Raven Press 1994. pp. 1723-1749.
- Angulo C, Rauch MC, Droppelmann A, Reyes AM, Slebe JC, Delgado-Lopez F, Guaiquil VH, Vera JC, Concha II. (1998). Hexose transporter expression and function in mammalian spermatozoa: cellular localization and transport of hexoses and vitamin C. *J. Cell. Biochem.*, **71(2)**: 189-203.
- Au A, Gupta A, Schembri P, Cheeseman CI. (2002). Rapid insertion of GLUT2 into the rat jejunal brush-border membrane promoted by glucagon-like peptide 2. *Biochem. J.*, **367(1)**: 247-254.
- Augustin R, Carayannopoulos MO, Dowd LO, Phay JE, Moley JF, Moley KH. (2004). Identification and characterization of human glucose transporter-like protein-9 (GLUT9): alternative splicing alters trafficking. *J Biol Chem.*, **279(16)**: 16229-16236.
- Bell GI, Kayano T, Buse JB, Burant CF, Takeda J, Lin D, Fukumoto H, Seino S. (1990). Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care.*, **13(3)**: 198-208.
- Birnbaum MJ. (1989). Identification of a novel gene encoding an insulin-responsive glucose transporter protein. *Cell*, **57(2)**: 305-315.
- Blakemore SJ, Aledo JC, James J, Campbell FC, Lucocq JM, Hundal HS. (1995). The GLUT5 hexose transporter is also localized to the basolateral membrane of the human jejunum. *Biochem. J.*, **309(1)**: 7-12.
- Boza JJ, Moennoz D, Vuichoud J, Jarret AR, Gaudard-de-Weck D, Fritsche R, Donnet A, Schiffrin EJ, Perruisseau G, Balleve O. (1999). Food deprivation and refeeding influence growth, nutrient retention and functional recovery of rats. *J. Nutr.*, **129(7)**: 1340-1346.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**: 248-254.
- Brot-Laroche E, Dao MT, Alcalde AI, Delhomme B, Triadou N, Alvarado F. (1988). Independent modulation by food supply of two distinct sodium-activated D-glucose transport systems in the guinea pig jejunal brush-border membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **85(17)**: 6370-6373.
- Burant CF, Flink S, DePaoli AM, Chen J, Lee WS, Hediger MA, Buse JB, Chang EB. (1994). Small intestine hexose transport in experimental diabetes. Increased transporter mRNA and protein expression in enterocytes. *J. Clin. Invest.*, **93(2)**: 578-585.
- Burant CF, Saxena M. (1994). Rapid reversible substrate regulation of fructose transporter expression in rat small intestine and kidney. *Am. J. Physiol.*, **267(1 Pt 1)**: G71-G79.
- Burcelin R, Dolci W, Thorens B. (2000). Glucose sensing by the hepatoportal sensor is GLUT2-dependent: in vivo analysis in GLUT2-null mice. *Diabetes*, **49(10)**: 1643-1648.
- Burcelin R, Eddouks M, Kande J, Assan R, Girard J. (1992). Evidence that GLUT-2 mRNA and protein concentrations are decreased by hyperinsulinaemia and increased by hyperglycaemia in liver of diabetic rats. *Biochem. J.*, **288(2)**: 675-679.
- Burcelin R, Thorens B. (2001). Evidence that extrapancreatic GLUT2-dependent glucose sensors control glucagons secretion. *Diabetes*, **50(6)**: 1282-1289.
- Butzner JD, Brockway PD, Meddings JB. (1990). Effects of malnutrition on microvillus membrane glucose transport and physical properties. *Am. J. Physiol.*, **259(6 Pt 1)**: G940-G946.
- Butzner JD, Gall DG. (1988). Effects of chronic protein-calorie malnutrition on small intestinal repair after an acute bacterial enteritis: a study in infant rabbits. *Pediatr. Res.*, **23(4)**: 408-413.

- Carayannopoulos MO, Chi MM, Cui Y, Pingsterhaus JM, McKnight RA, Mueckler M, Devaskar SU, Moley KH. (2000). GLUT8 is a glucose transporter responsible for insulin-stimulated glucose uptake in the blastocyst. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **97(13)**: 7313-7318.
- Carey HV, Hayden UL, Tucker KE. (1994). Fasting alters basal and stimulated ion transport in piglet jejunum. *Am. J. Physiol.*, **267(1 Pt 2)**: R156-R163.
- Casirola DM, Lan Y, Ferraris RP. (1997). Effects of changes in calorie intake on intestinal nutrient uptake and transporter mRNA levels in aged mice. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, **52(6)**: B300-B310.
- Castello A, Guma A, Sevilla L, Furriols M, Testar X, Palacin M, Zorzano A. (1995). Regulation of GLUT5 gene expression in rat intestinal mucosa: regional distribution, circadian rhythm, perinatal development and effect of diabetes. *Biochem. J.*, **309(1)**: 271-277.
- Charron MJ, Brosius FC 3rd, Alper SL, Lodish HF. (1989). A glucose transport protein expressed predominately in insulin-responsive tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **86(8)**: 2535-2539.
- Cheeseman CI, Harley B. (1991). Adaptation of glucose transport across rat enterocyte basolateral membrane in response to altered dietary carbohydrate intake. *J. Physiol.*, **437**: 563-575.
- Cheeseman CI. GLUT2 is the transporter for fructose across the rat intestinal basolateral membrane. (1993). *Gastroenterology*, **105(4)**: 1050-1056.
- Chen C, Okayama H. (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.*, **7**: 2745-2752.
- Crane RK. (1960). Intestinal absorption of sugars. *Physiol. Rev.*, **40**: 789-825.
- Davidson NO, Hausman AM, Ifkovits CA, Buse JB, Gould GW, Burant CF, Bell GI. (1992). Human intestinal glucose transporter expression and localization of GLUT5. *Am. J. Physiol.*, **262(3 Pt 1)**: C795-C800.
- Dawson PA, Mychaleckyj JC, Fossey SC, Mihic SJ, Craddock AL, Bowden DW. (2001). Sequence and functional analysis of GLUT10: a glucose transporter in the type 2 diabetes-linked region of chromosome 20q12-13.1. *Mol. Genet. Metab.*, **74**: 186-199.
- Debnam ES, Chowrimootoo G. (1992). Streptozotocin diabetes and sugar transport by rat ileal enterocytes: evidence for adaptation caused by an increased luminal nutrient load. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1107(1)**: 86-92.
- Debnam ES, Ebrahim HY, Swaine DJ. (1990). Diabetes mellitus and sugar transport across the brush-border and basolateral membranes of rat jejunal enterocytes. *J. Physiol.*, **424**: 13-25.
- Debnam ES, Smith MW, Sharp PA, Srani SK, Turvey A, Keable SJ. (1995). The effects of streptozotocin diabetes on sodium-glucose transporter (SGLT1) expression and function in rat jejunal and ileal villus-attached enterocytes. *Pflugers Arch.*, **430(2)**: 151-159.
- Debnam ES, Thompson CS. (1984). The effect of fasting on the potential difference across the brush-border membrane of enterocytes in rat small intestine. *J. Physiol.*, **355**: 449-456.
- Debnam ES, Unwin RJ. (1996). Hyperglycemia and intestinal and renal glucose transport: implications for diabetic renal injury. *Kidney Int.*; **50(4)**: 1101-1109.
- Diamond JM, Karasov WH, Cary C, Enders D, Yung R. (1984) Effect of dietary carbohydrate on monosaccharide uptake by mouse small intestine in vitro. *J. Physiol.*, **349**: 419-440.
- Doerge H, Bocianski A, Joost HG, Schurmann A. (2000a). Activity and genomic organization of human glucose transporter 9 (GLUT9), a novel member of the family of sugar-transport facilitators predominantly expressed in brain and leucocytes. *Biochem. J.*, **350(3)**: 771-776.

- Doege H, Bocianski A, Scheepers A, Axer H, Ecke, J, Joost, HG, Schurmann A. (2001). Characterization of human glucose transporter (GLUT) 11 (encoded by SLC2A11), a novel sugar-transport facilitator specifically expressed in heart and skeletal muscle. *Biochem. J.*, **359**: 443-449.
- Doege H, Schurmann A, Bahrenberg G, Brauers A, Joost HG. (2000b). GLUT8, a novel member of the sugar transport facilitator family with glucose transport activity. *J. Biol. Chem.*, **275(21)**: 16275-16280.
- Doege H, Schurmann A, Ohnimus H, Monser V, Holman GD, Joost HG. (1998) Serine-294 and threonine-295 in the exofacial loop domain between helices 7 and 8 of glucose transporters (GLUT) are involved in the conformational alterations during the transport process. *Biochem J.*, **329(2)**: 289-293.
- Dudeja PK, Wali RK, Klitzke A, Brasitus TA. (1990). Intestinal D-glucose transport and membrane fluidity along crypt-villus axis of streptozocin-induced diabetic rats. *Am. J. Physiol.*, **259(4 Pt 1)**: G571-G577.
- Dursun A, Kalkanoglu HS, Coskun T, Tokatli A, Bittner R, Kocak N, Yuce A, Ozalp I, Boehme HJ. (2001). Mutation analysis in Turkish patients with hereditary fructose intolerance. *J. Inherit. Metab. Dis.*, **24(5)**: 523-526.
- Dyer J, Hosie KB, Shirazi-Beechey SP. (1997). Nutrient regulation of human intestinal sugar transporter (SGLT1) expression. *Gut*, **41(1)**: 56-59.
- Dyer J, Wood IS, Palejwala A, Ellis A, Shirazi-Beechey SP. (2002). Expression of monosaccharide transporters in intestine of diabetic humans. *Am. J. Physiol. (Gastrointest. Liver Physiol.)*, **282(2)**: G241-G248.
- Dyer RG. (1994) Traditional treatment of obesity: does it work?. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.*, **8(3)**: 661-688.
- Fedorak RN, Cheeseman CI, Thomson AB, Porter VM. (1991). Altered glucose carrier expression: mechanism of intestinal adaptation during streptozotocin-induced diabetes in rats. *Am. J. Physiol.*, **261(4 Pt 1)**: G585-G591.
- Ferraris RP, Carey HV. (2000). Intestinal transport during fasting and malnutrition. *Annu. Rev. Nutr.*, **20**: 195-219.
- Ferraris RP, Diamond J. (1997). Regulation of intestinal sugar transport. *Physiol. Rev.*, **77(1)**: 257-302.
- Fogh J, Trempe G. New human tumor cell lines., In: *Human Tumor Cells "in vivo"*., J. Fogh, Editor, (1975), Plenum Press: New York. p. 115-141.
- Fukumoto H, Kayano T, Bose JB, Edwards Y, Pilch PF, Bell GI, Seino S. (1989). Cloning and characterization of the major insulin-responsive glucose transporter expressed in human skeletal muscle and other insulin-responsive tissues. *J. Biol. Chem*, **264**: 7776-7779.
- Fukumoto H, Seino S, Imura I, Seino Y, Eddy RL, Fukushima Y, Byers MG, Shows TB, Bell GI. (1988). Sequence, tissue distribution, and chromosomal localization of mRNA encoding a human glucose transporter-like protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **85**: 5434-5438.
- Garcia JC, Strube M, Leingang K, Keller K, Mueckler MM. (1992). Amino acid substitutions at tryptophan 388 and tryptophan 412 of the HepG2 (Glut1) glucose transporter inhibit transport activity and targeting to the plasma membrane in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.*, **267(11)**: 7770-7776.
- Goodlad RA, Plumb JA, Wright NA. (1988) Epithelial cell proliferation and intestinal absorptive function during starvation and refeeding in the rat. *Clin. Sci. (Lond.)*, **74(3)**: 301-306.

- Gorovits N, Cui L, Busik JV, Ranalletta M, Hauguel de Mouzon S, Charron MJ. (2003). Regulation of hepatic GLUT8 expression in normal and diabetic models. *Endocrinology*, **144(5)**: 1703-1711.
- Gould GW, Holman GD. (1993). The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. *Biochem. J.*, **295(2)**: 329-341.
- Guillam MT, Burcelin R, Thorens B. (1998). Normal hepatic glucose production in the absence of GLUT2 reveals an alternative pathway for glucose release from hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **95(21)**: 12317-12321.
- Guillam MT, Dupraz P, Thorens B. (2000). Glucose uptake, utilization, and signalling in GLUT2-null islets. *Diabetes*, **49(9)**: 1485-1491.
- Gupta PD, Waheed AA. (1992). Effect of starvation on glucose transport and membrane fluidity in rat intestinal epithelial cells. *FEBS Lett.*, **300(3)**: 263-267.
- Haber RS, Weinstein SP, O'Boyle E, Morgello S. (1993). Tissue distribution of the human GLUT3 glucose transporter. *Endocrinology*, **132(6)**: 2538-2543.
- Hediger M, Coady MJ, Ikeda TS, Wright EM. (1987). Expression cloning and cDNA sequencing of the Na/glucose co-transporter. *Nature*, **330**: 379-381.
- Hediger MA, Turk E, Wright EM. (1989). Homology of the human intestinal Na⁺/glucose and Escherichia coli Na⁺/proline cotransporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 5748-5752.
- Hermenegildo C, Raya A, Roma J, Romero FJ. (1993). Decreased glutathione peroxidase activity in sciatic nerve of alloxan-induced diabetic mice and its correlation with blood glucose levels. *Neurochem. Res.*, **18(8)**: 893-896.
- Hodin RA, Chamberlain SM, Meng S. (1995). Pattern of rat intestinal brush-border enzyme gene expression changes with epithelial growth state. *Am. J. Physiol.*, **269(2 Pt 1)**: C385-C391.
- Holt PR, Wu S, Yeh KY. (1986). Ileal hyperplastic response to starvation in the rat. *Am. J. Physiol.*, **251(1 Pt 1)**: G124-G131.
- Hosokawa M, Thorens B. Glucose release from GLUT2-null hepatocytes: characterization of a major and a minor pathway. (2002). *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **282(4)**: E794-E801.
- Ibberson M, Riederer BM, Uldry M, Guhl B, Roth J, Thorens B. (2002). Immunolocalization of GLUTX1 in the testis and to specific brain areas and vasopressin-containing neurons. *Endocrinology*, **143(1)**: 276-284.
- Ibberson M, Uldry M, Thorens B. (2000). GLUTX1, a novel mammalian glucose transporter expressed in the central nervous system and insulin-sensitive tissues. *J. Biol. Chem.*, **275(7)**: 4607-4612.
- James CL, Rellos P, Ali M, Heeley AF, Cox TM. (1996). Neonatal screening for hereditary fructose intolerance: frequency of the most common mutant aldolase B allele (A149P) in the British population. *J. Med. Genet.*, **33(10)**: 837-841.
- Joost HG, Bell GI, Best JD, Birnbaum MJ, Charron MJ, Chen YT, Doege H, James DE, Lodish HF, Moley KH, Moley JF, Mueckler M, Rogers S, Schurmann A, Seino S, Thorens B. (2002). Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **282**: E974-E976.
- Joost HG, Thorens B. (2001). The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members. *Mol. Membr. Biol.*, **18(4)**: 247-256.

- Jung CY. (1998). Proteins that interact with facilitative glucose transporters: implication for function. *Exp. Physiol.*, **83(2)**: 267-273.
- Kaestner KH, Christy RJ, McLenithan JC, Braiterman LT, Cornelius P, Pekala PH, Lane MD. (1989). Sequence, tissue distribution, and differential expression of mRNA for a putative insulin-responsive glucose transporter in mouse 3T3-L1 adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **86(8)**: 3150-3154.
- Kahn BB, Charron MJ, Lodish HF, Cushman SW, Flier JS. (1989). Differential regulation of two glucose transporters in adipose cells from diabetic and insulin-treated diabetic rats. *J. Clin. Invest.*, **84(2)**: 404-411.
- Kahn BB, Rossetti L, Lodish HF, Charron MJ. (1991). Decreased in vivo glucose uptake but normal expression of GLUT1 and GLUT4 in skeletal muscle of diabetic rats. *J. Clin. Invest.*, **87(6)**: 2197-2206.
- Kayano T, Burant CF, Fukumoto H, Gould GW, Fan YS, Eddy RL, Byers MG, Shows TB, Seino S, Bell GI. (1990). Human facilitative glucose transporters. Isolation, functional characterization and gene localization of cDNAs encoding an isoform (GLUT5), expressed in small intestine, kidney, muscle and adipose tissue and an unusual glucose transporter pseudogene-like sequence (GLUT6). *J. Biol. Chem.*, **265**: 13276-13282.
- Kayano T, Fujimoto H, Eddy RL, Fan YS, Byers MG, Shows TB, Bell GI. (1988). Evidence for a family of human glucose transporter-like proteins. Sequence and gene localization of a protein expressed in fetal skeletal muscle and other tissues. *J. Biol. Chem.*, **263**: 15245-15248.
- Kellett GL, Helliwell PA. (2000). The diffusive component of intestinal glucose absorption is mediated by the glucose-induced recruitment of GLUT2 to the brush-border membrane. *Biochem. J.*, **350(1)**: 155-162.
- Kellett GL. (2001). The facilitated component of intestinal glucose absorption. *J. Physiol.*, **531(3)**: 585-595.
- Kishi K, Tanaka T, Igawa M, Takase S, Goda T. (1999). Sucrase-isomaltase and hexose transporter gene expressions are coordinately enhanced by dietary fructose in rat jejunum. *J. Nutr.*, **129(5)**: 953-956.
- Kojima T, Nishimura M, Yajima T, Kuwata T, Suzuki Y, Goda T, Takase S, Harada E. (1999). Developmental changes in the regional Na⁺/glucose transporter mRNA along the small intestine of suckling rats. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, **122(1)**: 89-95.
- Kong CT, Yet SF, Lever JE. (1993). Cloning and expression of a mammalian Na⁺/amino acid cotransporter with sequence similarity to Na⁺/glucose cotransporters. *J. Biol. Chem.*, **268**: 1509-1512.
- Lee WS, Kanai Y, Wells RG, Hediger MA. (1994). The high affinity Na⁺/glucose cotransporter. Re-evaluation of function and distribution of expression. *J. Biol. Chem.*, **269(16)**: 12032-12039.
- Li Q, Manolescu A, Ritzel M, Yao S, Slugoski M, Young JD, Chen XZ, Cheeseman CI. (2004). Cloning and functional characterization of the human GLUT7 isoform SLC2A7 from the small intestine. *Am. J. Physiol (Gastrointest. Liver Physiol.)*, **287**: G236-G242.
- Lisinski I, Schurmann A, Joost HG, Cushman SW, Al-Hasani H. (2001). Targeting of GLUT6 (formerly GLUT9) and GLUT8 in rat adipose cells. *Biochem. J.*, **358**: 517-522.
- Lorenz-Meyer H, Thiel F, Menge H, Gottesburen H, Riecken EO. (1977). Structural and functional studies on the transformation of the intestinal mucosa in rats with experimental diabetes. *Res. Exp. Med. (Berl.)*, **170(2)**: 89-99.

- Macheda ML, Williams ED, Best JD, Wlodek ME, Rogers S. (2003). Expression and localisation of GLUT1 and GLUT12 glucose transporters in the pregnant and lactating rat mammary gland. *Cell. Tissue Res.*, **311(1)**: 91-97.
- Mackenzie B, Panayotova-Heiermann M, Loo DD, Lever JE, Wright EM. (1994). SAAT1 is a low affinity Na⁺/glucose cotransporter and not an amino acid transporter. A reinterpretation. *J. Biol. Chem.*, **269**: 22488–22491.
- Madara JL, Trier JS. (1994). The functional morphology of the mucosa of the small intestine. In: *Physiology of the gastrointestinal tract*. Johnson, L.R. ed., New York: Raven Press 1994. pp. 1577-1622.
- Madara JL. (1991). Functional morphology of epithelium of the small intestine. In: *Intestinal Absorption and Secretion. Handbook of Physiology, section 6. The Gastrointestinal System*. M. Field & R.A. Frizzell, Editors. 1991. Am. Physiol. Soc.: Bethesda. pp. 83-120.
- Maenz DD, Cheeseman CI. (1987). The Na⁺-independent D-glucose transporter in the enterocyte basolateral membrane: orientation and cytochalasin B binding characteristics. *J. Membr. Biol.*, **97(3)**: 259-266.
- Mahraoui L, Rodolosse A, Barbat A, Dussaulx E, Zweibaum A, Rousset M, Brot-Laroche E. (1994). Presence and differential expression of SGLT1, GLUT1, GLUT2, GLUT3 and GLUT5 hexose-transporter mRNAs in Caco-2 cell clones in relation to cell growth and glucose consumption. *Biochem. J.*, **298**: 629-633.
- Mahraoui L, Rousset M, Dussaulx E, Darmoul D, Zweibaum A, Brot-Laroche E. (1992). Expression and localization of GLUT-5 in Caco-2 cells, human small intestine, and colon. *Am. J. Physiol.*, **263(3 Pt 1)**: G312-G318.
- Mantych GJ, James DE, Devaskar SU. (1993). Jejunal/kidney glucose transporter isoform (Glut-5) is expressed in the human blood-brain barrier. *Endocrinology*, **132(1)**: 35-40.
- Marciani P, Lindi C, Faelli A, Esposito G. (1987). Effects of semistarvation on transintestinal D-glucose transport and D-glucose uptake in brush border and basolateral membranes of rat enterocytes. *Pflugers Arch.*, **408(3)**: 220-223.
- Martin MG, Lostao MP, Turk E, Lam J, Kreman M, Wright EM. (1997). Compound missense mutations in the sodium/D-glucose cotransporter result in trafficking defects. *Gastroenterology*, **112(4)**: 1206-1212.
- Matosin-Matekalo M, Mesonero JE, Delezay O, Poiree JC, Ilundain AA, Brot-Laroche E. (1998). Thyroid hormone regulation of the Na⁺/glucose cotransporter SGLT1 in Caco-2 cells. *Biochem. J.*, **334(3)**: 633-640.
- Matosin-Matekalo M, Mesonero JE, Laroche TJ, Lacasa M, Brot-Laroche E. (1999). Glucose and thyroid hormone co-regulate the expression of the intestinal fructose transporter GLUT5. *Biochem. J.*, **339(2)**: 233-239.
- Matschinsky FM. (1996). Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes*, **45(2)**: 223-241.
- Mayhew TM. (1990). Striated brush border of intestinal absorptive epithelial cells: stereological studies on microvillous morphology in different adaptive states. *J. Electron. Microsc. Tech.*, **16(1)**: 45-55.
- McVie-Wylie AJ, Lamson DR, Chen YT. (2001). Molecular cloning of a novel member of the GLUT family of transporters, SLC2A10 (GLUT10), localized on chromosome 20q13.1: a candidate gene for NIDDM susceptibility. *Genomics*, **72**: 113–117.

- Mesonero J, Mahraoui L, Matosin M, Rodolosse A, Rousset M, Brot-Laroche, E. (1994). Expresión of the hexose transporters GLUT1-GLUT5 and SGLT1 in clones of Caco-2 cells. *Biochem. Soc. Trans.*, **22(3)**: 681-684.
- Mesonero J, Matosin M, Cambier D, Rodriguez-Yoldi MJ, Brot-Laroche E. (1995). Sugar-dependent expression of the fructose transporter GLUT5 in Caco-2 cells. *Biochem. J.*, **312(3)**: 757-762.
- Miyamoto K, Hase K, Takagi T, Fujii T, Taketani Y, Minami H, Oka T, Nakabou Y. (1993). Differential responses of intestinal glucose transporter mRNA transcripts to levels of dietary sugars. *Biochem. J.*, **295(1)**: 211-215.
- Miyamoto K, Tatsumi S, Morimoto A, Minami H, Yamamoto H, Sone K, Taketani Y, Nakabou Y, Oka T, Takeda E. (1994). Characterization of the rabbit intestinal fructose transporter (GLUT5). *Biochem. J.*, **303(3)**: 877-883.
- Moreno-Aliaga MJ, Matsumura F. (1999). Endrin inhibits adipocyte differentiation by selectively altering expresión pattern of CCAAT/enhancer binding protein- α in 3T3-L1 cells. *Mol. Pharmacol.*, **65**: 91-101.
- Moreno-Aliaga MJ, Stanhope KL, Havel PJ. (2001). Transcriptional regulation of the leptin promoter by insulin-stimulated glucose metabolism in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **283**: 544-548.
- Mori H, Hashiramoto M, Clark AE, Yang J, Muraoka A, Tamori Y, Kasuga M, Holman GD. (1994). Substitution of tyrosine 293 of GLUT1 locks the transporter into an outward facing conformation. *J. Biol. Chem.*, **269(15)**: 11578-11583.
- Mueckler M, Caruso C, Baldwin SA, Panico M, Blench I, Morris HR, Allard WJ, Lienhard GE, Lodish HF. (1985). Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science*, **229**: 941-945.
- Mueckler M, Weng W, Kruse M. (1994). Glutamine 161 of Glut1 glucose transporter is critical for transport activity and exofacial ligand binding. *J. Biol. Chem.*, **269(32)**: 20533-20538.
- Muniz R, Burguillo L, del Castillo JR. (1993). Effect of starvation on neutral amino acid transport in isolated small-intestinal cells from guinea pigs. *Pflugers Arch.*, **423(1-2)**: 59-66.
- Noguchi Y, Okamoto T, Marat D, Yoshikawa T, Saitoh A, Doi C, Fukuzawa K, Tsuburaya A, Satoh S, Ito T. (2000). Expression of facilitative glucose transporter 1 mRNA in colon cancer was not regulated by k-ras. *Cancer Lett.*, **154(2)**: 137-142.
- Peerce BE, Wright EM. (1984). Conformational changes in the intestinal brush border Na-glucose cotransporter labelled with fluorescein isothiocyanate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 2223-2236.
- Phay JE, Hussain HB, Moley JF. (2000a). Cloning and expression analysis of a novel member of the facilitative glucose transporter family, SLC2A9 (GLUT9). *Genomics*, **66**: 217-220.
- Phay JE, Hussain HB. & Moley. JF. (2000b). Strategy for identification of novel glucose transporter family members by using internet-based genomic databases. *Surgery*, **128**: 946-951.
- Pinto AB, Carayannopoulos MO, Hoehn A, Dowd L, Moley KH. (2002). Glucose transporter 8 expression and translocation are critical for murine blastocyst survival. *Biol. Reprod.*, **66(6)**: 1729-1733.
- Pinto M, Robine-Leon S, Appay MD, Kedinger M, Triadou N, Dussaulx E, Lacroix B, Simon-Assmann P, Haffen K, Fogh J, Zweibaum A. (1983). Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. Cell.*, **47**: 323-330.

- Piroli GG, Grillo CA, Hoskin EK, Znamensky C, Katz EB, Milner TA, McEwen BS, Charron MJ, Reagan LP. (2002). Peripheral glucose administration stimulates the translocation of GLUT8 glucose transporter to the endoplasmic reticulum in the rat hippocampus. *J. Comp. Neurol.*, **452(2)**: 103-114.
- Rand EB, Depaoli AM, Davidson NO, Bell GI, Burant CF. (1993). Sequence, tissue distribution, and functional characterization of the rat fructose transporter GLUT5. *Am. J. Physiol.*, **264(6 Pt 1)**: G1169-G1176.
- Raul F, von der Decken A. (1985). Changes in chromatin structure and transcription activity by starvation and dietary sucrose in mature and immature intestinal epithelial cells of the rat. *Cell. Mol. Biol.*, **31(4)**: 299-304.
- Reagan LP, Gorovits N, Hoskin EK, Alves SE, Katz EB, Grillo CA, Piroli GG, McEwen BS, Charron MJ. (2001). Localization and regulation of GLUTX1 glucose transporter in the hippocampus of streptozotocin diabetic rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **98(5)**: 2820-2825.
- Real Decreto 223/1988, de 14 de marzo, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. Boletín Oficial de Estado nº 67 de 18 de marzo de 1988, pp. 8509-8512.
- Rogers S, Macheda ML, Docherty SE, Carty MD, Henderson MA, Soeller WC, Gibbs EM, James DE, Best JD. (2002). Identification of a novel glucose transporter-like protein-GLUT-12. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **282(3)**: E733-E738.
- Sambrook J, Russell DW. (2001). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sancho E, Batlle E, Clevers H. (2003). Live and let die in the intestinal epithelium. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **15(6)**: 763-770.
- Santer R, Groth S, Kinner M, Dombrowski A, Berry GT, Brodehl J, Leonard JV, Moses S, Norgren S, Skovby F, Schneppenheim R, Steinmann B, Schaub J. (2002a). The mutation spectrum of the facilitative glucose transporter gene SLC2A2 (GLUT2) in patients with Fanconi-Bickel syndrome. *Hum. Genet.*, **110(1)**: 21-29.
- Santer R, Hillebrand G, Steinmann B, Schaub J. (2003). Intestinal glucose transport: evidence for a membrane traffic-based pathway in humans. *Gastroenterology*, **124(1)**: 34-39.
- Santer R, Steinmann B, Schaub J. (2002b). Fanconi-Bickel syndrome--a congenital defect of facilitative glucose transport. *Curr. Mol. Med.*, **2(2)**: 213-227.
- Sasaki T, Minoshima S, Shiohama A, Shintani A, Shimizu A, Asakawa S, Kawasaki K, Shimizu N. (2001). Molecular Cloning of a Member of the Facilitative Glucose Transporter Gene Family GLUT11 (SLC2A11) and Identification of Transcription Variants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **289**: 1218-1224.
- Sato M, Mueckler M. (1999). A conserved amino acid motif (R-X-G-R-R) in the Glut1 glucose transporter is an important determinant of membrane topology. *J. Biol. Chem.*, **274(35)**: 24721-24725.
- Schedl HP, Wilson HD. (1971). Effects of diabetes on intestinal growth in the rat. *J. Exp. Zool.*, **176(4)**: 487-495.
- Scheepers A, Doege H, Joost HG, Schurmann A. (2001). Mouse GLUT8: genomic organization and regulation of expression in 3T3-L1 adipocytes by glucose. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **288(4)**: 969-974.
- Schneider AJ, Kinter WB, Stirling CE. (1966). Glucose-galactose malabsorption. Report of a case with autoradiographic studies of a mucosal biopsy. *N. Engl. J. Med.*, **274(6)**: 305-312.

- Schurmann A, Axer H, Scheepers A, Doege H, Joost HG. (2002). The glucose transport facilitator GLUT8 is predominantly associated with the acrosomal region of mature spermatozoa. *Cell. Tissue Res.*, **307(2)**: 237-242.
- Schurmann A, Doege H, Ohnimus H, Monser V, Buchs A, Joost HG. (1997). Role of conserved arginine and glutamate residues on the cytosolic surface of glucose transporters for transporter function. *Biochemistry*, **36(42)**: 12897-12902.
- Schurmann A, Keller K, Monden I, Brown FM, Wandel S, Shanahan MF, Joost HG. (1993). Glucose transport activity and photolabelling with 3-[125I]iodo-4-azidophenethylamido-7-O-succinyldeacetyl (IAPS)-forskolin of two mutants at tryptophan-388 and -412 of the glucose transporter GLUT1: dissociation of the binding domains of forskolin and glucose. *Biochem. J.*, **290(2)**: 497-501.
- Seatter MJ, De la Rue SA, Porter LM, Gould GW. (1998). QLS motif in transmembrane helix VII of the glucose transporter family interacts with the C-1 position of D-glucose and is involved in substrate selection at the exofacial binding site. *Biochemistry*, **37(5)**: 1322-1326.
- Shafir E. (1991). Metabolism of disaccharides and monosaccharides with emphasis on sucrose and fructose and their lipogenic potential. In: *Sugars and Nutrition*, edited by Gracy M., Dretchmer N, and Rossi E. New York: Vevey/Raven, p. 131-152.
- Shepherd PR, Kahn BB. (1999). Glucose transporters and insulin action – implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *New Engl. J. Med.*, **341**: 248–257.
- Shin BC, McKnight RA, Devaskar SU. (2004). Glucose transporter GLUT8 translocation in neurons is not insulin responsive. *J. Neurosci. Res.* **75(6)**: 835-844.
- Sidhu GS, Narasimharao KL, Usha Rani V, Sarkar AK, Mitra SK. (1984). Absorption and urinary excretion of oxalates following massive small bowel resection and colon interposition in rhesus monkeys. *Biochem. Int.*, **9(4)**: 421-427.
- Stirling CE, Schneider AJ, Wong MD, Kinter WB. (1972). Quantitative radioautography of sugar transport in intestinal biopsies from normal humans and a patient with glucose-galactose malabsorption. *J. Clin. Invest.*, **51(2)**: 438-451.
- Stuart CA, Wen G, Jiang J. (1999). GLUT3 protein and mRNA in autopsy muscle specimens. *Metabolism*, **48(7)**: 876-880.
- Stumpel F, Burcelin R, Jungermann K, Thorens, B. (2001). Normal kinetics of intestinal glucose absorption in the absence of GLUT2: evidence for a transport pathway requiring glucose phosphorylation and transfer into the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **98(20)**: 11330-11335.
- Taha MO, Ribeiro EB, Sardinha FL, Fraga MM, Fagundes DJ, Caricati-Neto A. (2004). Interposition of a distal colon segment following 80% jejunum-ileal resection: evaluation of glucose absorption in rats. *Transplant. Proc.*, **36(2)**: 370-372.
- Thoidis G, Kupriyanova T, Cunningham JM, Chen P, Cadel S, Foulon T, Cohen P, Fine RE, Kandror KV. (1999) Glucose transporter Glut3 is targeted to secretory vesicles in neurons and PC12 cells. *J. Biol. Chem.*, **274(20)**: 14062-14066.
- Thorens B, Flier JS, Lodish HF, Kahn BB. (1990). Differential regulation of two glucose transporters in rat liver by fasting and refeeding and by diabetes and insulin treatment. *Diabetes*, **39(6)**: 712-719.
- Thorens B, Sarkar HK, Kaback HR, Lodish HF. (1988). Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and beta-pancreatic islet cells. *Cell*, **55(2)**: 281-290.

- Tomei S, Hayashi Y, Inoue K, Torimoto M, Ota Y, Morita K, Yuasa H, Watanabe J. (2003a). Search for carrier-mediated transport systems in the rat colon. *Biol. Pharm. Bull.*, **26(2)**: 274-277.
- Tomei S, Torimoto M, Hayashi Y, Inoue K, Yuasa H, Watanabe J. (2003b). Kinetic characterization of carrier-mediated transport systems for D-glucose and taurocholate in the everted sacs of the rat colon. *Biol. Pharm. Bull.*, **26(6)**: 899-901.
- Transposición de la Directiva Comunitaria 86/609/CEE acordada en Estrasburgo, sobre protección de los animales utilizados con fines experimentales y otros fines científicos. BOE nº 256 de 25 de octubre de 1990, pp: 31348-31362.
- Turk E, Kerner CJ, Lostao MP, Wright EM. (1996). Membrane topology of the human Na⁺/glucose cotransporter SGLT1. *J. Biol. Chem.*, **271**: 1925-1934.
- Turk E, Wright EM. (1997). Membrane topology motifs in the SGLT cotransporter family. *J. Membr. Biol.*, **159**: 1-20.
- Uldry M, Ibberson M, Horisberger JD, Chatton JY, Riederer BM, Thorens B. (2001). Identification of a mammalian H⁺-myo-inositol symporter expressed predominantly in the brain. *EMBO J.*, **20(16)**: 4467-4477.
- Uldry M, Thorens B. (2004). The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Pflugers. Arch. – Eur. J. Physiol.*, **447**: 480-489.
- Uldry M, Thorens B. (2004). The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters (erratum). *Pflugers. Arch. – Eur. J. Physiol.*, **448**: 259-260.
- Wandel S, Schurmann A, Becker W, Summers SA, Shanahan MF, Joost HG. (1994). Substitution of conserved tyrosine residues in helix 4 (Y143) and 7 (Y293) affects the activity, but not IAPS-forskolin binding, of the glucose transporter GLUT4. *FEBS Lett.*, **348(2)**: 114-118.
- Wasserman D, Hoekstra JH, Tolia V, Taylor CJ, Kirschner BS, Takeda J, Bell, GI, Taub R, Rand EB. (1996). Molecular analysis of the fructose transporter gene (GLUT5) in isolated fructose malabsorption. *J. Clin. Invest.*, **98(10)**: 2398-2402.
- Watson RT, Pessin JE. (2001). Subcellular compartmentalization and trafficking of the insulin-responsive glucose transporter, GLUT4. *Exp. Cell. Res.*, **271(1)**: 75-83.
- Weindruch R. (1996). Caloric restriction and aging. *Sci. Am.*, **274(1)**: 46-52.
- Wells RG, Pajor AM, Kanai Y, Turk E, Wright EM, Hediger MA. (1992). Cloning of a human kidney cDNA with similarity to the sodium-glucose cotransporter. *Am. J. Physiol.* **263**: F459-F465.
- Weser E. (1979). Nutritional aspects of malabsorption. Short gut adaptation. *Am. J. Med.*, **67(6)**: 1014-1020.
- Wing RR. (1993). Behavioral treatment of obesity. Its application to type II diabetes. *Diabetes Care.* **16(1)**: 193-199.
- Wright EM, Loo DD, Panayotova-Heiermann M, Boorer KJ. (1994) Mechanisms of Na(+)-glucose cotransport. *Biochem. Soc. Trans.*, **22(3)**: 646-650.
- Wright EM, Loo DD, Panayotova-Heiermann M, Lostao MP, Hirayama BH, Mackenzie B, Boorer K, Zampighi G. (1994). "Active" sugar transport in eukaryotes. *J. Exp. Biol.*, **196**: 197-212.
- Wright EM, Martin MG, Turk E. (2003) Intestinal absorption in health and disease-sugars. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, **17(6)**: 943-956.
- Wright EM, Pearce BE. (1984). Identification and conformational changes of the intestinal proline carrier. *J. Biol. Chem.*, **259**: 14993-14996.

- Wright EM, Turk E. (2004). The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflügers Arch. – Eur. J. Physiol.*, **447**: 510-518.
- Wright EM. (2001). Renal Na⁺-glucose cotransporters. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **280**: F10–F18.
- Wright EM. (1993). The intestinal Na⁺/glucose cotransporter. *Annu. Rev. Physiol.*, **55**: 575-589.
- Wu X, Li W, Sharma V, Godzik A, Freeze HH. (2002). Cloning and characterization of glucose transporter 11, a novel sugar transporter that is alternatively spliced in various tissues. *Mol. Gen. Metabol.*, **76**: 37-45.
- Yamauchi K, Kamisoyama H, Isshiki Y. (1996). Effects of fasting and refeeding on structures of the intestinal villi and epithelial cells in White Leghorn hens. *Br. Poult. Sci.*, **37(5)**: 909-921.
- Young EA, Cantu TL, Harris MM. (1989). Gastrointestinal and cardiac response to refeeding after low-calorie semistarvation. *Am. J. Clin. Nutr.*, **50(5)**: 922-929.
- Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, **414(6865)**: 782-787.
- Zweibaum A, Laburthe M, Grasset E, Louvard D. (1991). Use of cultured cell lines in studies of intestinal cell differentiation and function., In: Intestinal Absorption and Secretion. *Handbook of Physiology, section 6. The Gastrointestinal System.*; M. Field and R.A. Frizzell, Editors. 1991. Am. Physiol. Soc.: Bethesda. pp. 223-255