



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Expresión y caracterización del transportador SLC16A11 humano en ovocitos de *Xenopus laevis*.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Hilda Sánchez Vidal

TUTOR PRINCIPAL
Dr. Gerardo Gamba Ayala
[IIB-UNAM e INCMNSZ](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dra. María Viridiana Olin Sandoval
[INCMNSZ](#)
Dr. Armando Tovar Palacio
[INCMNSZ](#)

Ciudad Universitaria, CD. MX. junio, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Fisiología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) y en el Laboratorio de Fisiología de la Nutrición del INCMNSZ, bajo la dirección del Dr. Gerardo Gamba Ayala, con quien estoy agradecida por haberme apoyado en mi desarrollo profesional como estudiante de maestría.

A los miembros de mi comité tutorial la Dra. María Viridiana Olin Sandoval, y el Dr. Armando Tovar Palacio, por tan valiosas aportaciones al proyecto.

A los compañeros de laboratorio y equipo de trabajo que hicieron que los días fueran más divertidos.

A Mau, mi mejor amigo y apoyo incondicional en mi vida, por todos los consejos personales como académicos, por tanto, amor y paciencia.

En especial a mi mamá Silvia Vidal, mi mejor amiga y más grande inspiración a quien le dedico mi tesis, a mis hermanos y sobrinos, por todo su amor y comprensión.

Y por supuesto a la Universidad Nacional Autónoma de México y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada y por permitirme concluir con una etapa de mi vida.

Índice

Resumen	6
1. Introducción	8
1.1. Generalidades de diabetes.....	8
1.2. Etiología de la diabetes tipo 2.....	9
1.3. Factores metabólicos y ambientales.....	10
1.4. Factores genéticos de la DT2.....	12
1.4.1. Polimorfismos de un solo nucleótido en población mexicana.....	15
1.5. Familia de monocarboxilatos SLC16.....	15
1.6. Proteínas chaperonas para la localización de transportadores de monocarboxilatos	17
1.7. Transportador SLC16A11.....	18
2. Hipótesis	21
3. Justificación	21
4. Objetivos	21
4.1. Objetivo general.....	21
4.2. Objetivos específicos.....	21
5. Metodología	22
5.1. Obtención y clonación de los genes SLC16A11, SLC16A11 ^{DT2} y basigna.....	22
5.2. Síntesis de cRNA por transcripción <i>in vitro</i>	27
5.3. Expresión heteróloga en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	27
5.4. Biotinilación de proteínas de membrana.....	29
5.5. Ensayos Inmunoprecipitación (IP) de proteínas etiquetadas con Flag.....	30
5.6. Western blot (Inmunoblot)	31
5.7. Identificación del sustrato primario del transportador SLC16A11.....	32
5.7.1. Ensayos de captación con isótopos radioactivos.....	32
5.7.2. Ensayos de transporte con aminoácidos.....	32
5.7.3. Ensayos de Termoestabilidad.....	33
6. Resultados	35
6.1. Clonación de genes y adición de etiquetas para su identificación.....	35
6.2. Síntesis de cRNA por transcripción <i>in vitro</i>	40
6.3. Expresión de SLC16A11 y SLC16A11 ^{DT2} en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	40
6.4. Ensayos de actividad para la identificación del sustrato primario del transportador SLC16A11.....	47
6.4.1. Ensayos de captación con isótopos radioactivos.....	47
6.4.2. Ensayos de transporte con aminoácidos.....	50
6.4.3. Ensayos de Termoestabilidad.....	54
7. Discusión	56
8. Conclusión	61
9. Referencias	62

Índice de Figuras

Figura 1	Modelo simplificado de Sensibilidad y Resistencia a la insulina.....	11
Figura 2	Esquema de las chaperonas basigina y embigina ancladas a la membrana plasmática.	18
Figura 3	Representación del mapa del plásmido pGH19 específico para expresión en <i>Xenopus laevis</i>	22
Figura 4	Clonación por “ensamble <i>in vivo</i> ” optimizando el diseño de primers.....	24
Figura 5	Inserción de etiqueta FLAG y codón de paro a pGH19-SLC16A11.....	35
Figura 6	Obtención de la variante SLC16A11 ^{DT2}	36
Figura 7	Clonación de Basigina variante 2 por “ensamble <i>in vivo</i> ”.....	38
Figura 8	Modificación del SNP no sinónimo de la basigina obtenida de células HeLa.	39
Figura 9	cRNA de SLC16A11, SLC16A11 ^{DT2} y basigina.....	40
Figura 10	Optimización de la expresión del transportador SLC16A11.....	41
Figura 11	Optimización de la expresión de la basigina sola y co-inyectada con SLC16A11.	42
Figura 12	Optimización del tiempo de incubación para la expresión de SLC16A11.....	43
Figura 13	Expresión del transportador SLC16A11 en la membrana plasmática.....	44
Figura 14	Inmunoprecipitación del transportador SLC16A11.....	45
Figura 15	Expresión de la variante SLC16A11 ^{DT2} comparado con la expresión del transportador SLC16A11 en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	46
Figura 16	Expresión del transportador SLC16A11 ^{DT2} en la membrana plasmática comparado con SLC16A11.	47
Figura 17	Transporte de ¹⁴ C ₁ Piruvato por SLC16A11 expresado en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	48
Figura 18	Transporte de ¹⁴ C ₁ Piruvato por SLC16A11 expresado en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> expuesto a diferentes pHs.	49
Figura 19	Transporte de ¹⁴ C ₁ Palmitato por SLC16A11 expresado en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	50
Figura 20	Cromatograma mostrando la detección de aminoácidos y del estándar (STD) presentes en muestras de ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	51
Figura 21	Transporte de aminoácidos mediado por SLC16A11 en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	53
Figura 22	Ensayos de termoestabilidad del SLC16A11 y SLC16A11 más basigina con piruvato.	55

Índice de Tablas

Tabla 1	Algunos genes asociados a diabetes tipo 2.	14
Tabla 2	Características de la Familia de Transportadores de Monocarboxilatos (MTC) caracterizados.	17
Tabla 3	Reacción de PCR utilizando el kit QuickCHange II Site-Directed Mutagenesis (Agilent).....	23
Tabla 4	Programa de PCR utilizando el kit QuickCHange II Site-Directed Mutagenesis (Agilent).....	23
Tabla 5	Reacción de PCR utilizando la enzima DNA polimerasa <i>Phusion</i>	25
Tabla 6	Programa de PCR utilizando la enzima DNA polimerasa <i>Phusion</i>	25
Tabla 7	Oligonucleótidos utilizados para mutagénesis sitio dirigida y para “ensamblaje <i>in vivo</i> ”.	26
Tabla 8	Reacción de síntesis de cRNA con el sistema T7 RNA polimerasa mMACHINE (Ambion).....	27
Tabla 9	Concentraciones de cRNA utilizados para inyección de ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	28
Tabla 10	Valores de velocidad obtenidos por la pendiente al linearizar el transporte de los aminoácidos Phe e Leu.	54

Resumen

La diabetes es consecuencia de una compleja interacción entre múltiples genes, diversos factores ambientales; y además se ha visto influida por factores étnicos.

Recientemente, el consorcio SIGMA identificó un nuevo haplotipo de riesgo en personas mexicanas y latinoamericanas con diabetes tipo 2 (DT2), localizado en el cromosoma 17p13, en la región de los genes correspondientes a los transportadores SLC16A11 y SLC16A13; en donde el gen *SLC16A11* contiene 5 SNPs asociados a DT2, uno silencioso y 4 no sinónimos (*SLC16A11^{DT2}*).

El gen *SLC16A11* pertenece a la familia SLC16 la cual codifica para las proteínas conocidas como “transportadores de monocarboxilatos (MCT)”. A pesar de la importancia del gen *SLC16A11* como factor de riesgo para el desarrollo de DT2, su función no ha sido completamente dilucidada. Estudios previos determinaron que cuando el transportador interactúa con la basigina humana, éste puede localizarse en la membrana plasmática. Por otro lado, se determinó en ensayos *in vitro*, que el SLC16A11 puede transportar piruvato en una reacción acoplada con protones. Sin embargo, no determinaron la actividad de este transportador con otros sustratos por lo que no se puede considerar el sustrato primario. La presencia del haplotipo de riesgo (*SLC16A11^{DT2}*) provoca una disminución de este transportador en la membrana plasmática debido a que estas variantes interactúan menos con la basigina. Este efecto también se ve reflejado en la actividad del transportador.

Por otro lado, estudios metabólicos sugieren que el SLC16A11 tiene como sustrato algún metabolito relacionado con el metabolismo de lípidos, y además estudios en humanos y ratones asocian a este transportador y a su variante con el desarrollo de resistencia a la insulina.

La búsqueda y caracterización de este transportador con sus sustratos fisiológicos es de gran relevancia ya que contribuirá al entendimiento de la función de éste, así como el papel de sus variantes de riesgo en la Diabetes Tipo 2. El objetivo de este trabajo fue caracterizar funcionalmente al transportador de

referencia SLC16A11 y determinar el efecto de la presencia de los 5 SNPs en la variante de riesgo SLC16A11^{T2D}. En este proyecto se expresó al transportador SLC16A11 y a su variante SLC16A11^{DT2} en ovocitos de *Xenopus laevis*. Ambos transportadores se localizan en la membrana plasmática, aunque el haplotipo SLC16A11^{DT2} tiene una menor expresión y se localiza menos en la membrana. Además, se determinó que el piruvato y el palmitato no son sustratos del transportador SLC16A11, y en ensayos preliminares observamos transporte de algunos aminoácidos como fenilalanina y leucina mediado por SLC16A11.

1. Introducción

La diabetes tipo 2 (DT2) es una enfermedad crónica de gran importancia a nivel mundial. El aumento en la prevalencia de diabetes ha ido cada vez más rápido, principalmente en los países de ingresos medianos y bajos (<http://www.who.int/diabetes/en/>). En 2015, la Federación Internacional de Diabetes estimó que hay alrededor de 425 millones de personas en todo el mundo (cerca del 90% diagnosticada como DT2), cifra que probablemente aumentará a 642 millones en 2040. En la actualidad, se estima que hay de 3 a 4 veces más personas con diabetes no diagnosticada (International Diabetes Federation, 2017).

En México existen 12 millones de enfermos con diabetes, lo que representa el quinto lugar en el mundo en prevalencia de este trastorno, justo después de países como China, India, Estados Unidos y Brasil (International Diabetes Federation, 2017).

En México, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino (ENSANUT 2016) reportó una prevalencia de 9.4% de casos de enfermos con diabetes. A partir del año 2000 es considerada la primera causa de muerte en mujeres y la segunda en hombres, presentando el mayor número de casos en la Ciudad de México (Aguilar-Salinas et al., 2015). Además, esta enfermedad está relacionada con las altas tasas de sobrepeso y obesidad (Bello-Chavolla et al., 2017) y, en nuestro país, la prevalencia de sobrepeso y obesidad en adultos mayores a 20 años es de 72.5%, siendo mayor en las comunidades urbanas que en las localidades rurales (ENSANUT MC, 2018).

1.1. Generalidades de Diabetes

La diabetes es una enfermedad crónica en la que el organismo no puede producir ni (o) responder adecuadamente a la hormona insulina. El efecto de la diabetes no controlada es la hiperglucemia (aumento glucosa en la sangre) (https://www.who.int/topics/diabetes_mellitus/es/).

La diabetes se puede clasificar en las siguientes categorías:

1. Diabetes mellitus tipo 1 (DT1): Producción deficiente o en algunos casos, absoluta de insulina, debido a la destrucción autoinmune de los islotes de células β pancreáticas, provocando insulino-dependencia.
2. Diabetes mellitus tipo 2 (DT2): caracterizada por la secreción y/o acción ineficaz de la insulina, que evita la incorporación de los transportadores de glucosa (GLUT4) a la membrana plasmática de las células musculoesqueléticas, de los adipocitos (encargados de la entrada masiva de glucosa) ocasionando hiperglucemia (Deng et al., 2015). La enfermedad está relacionada con sobrepeso y obesidad (Wiebe et al., 2011; García-Chapa et al., 2017).
3. Diabetes mellitus gestacional (DMG): Diagnosticada en el segundo o tercer trimestre del embarazo. En la mayoría de las mujeres, no produce signos ni síntomas perceptibles, y es común que después del parto los valores de glucosa en sangre se normalicen (Jonsdottir, 2009).

Otros tipos específicos de diabetes debido a otras causas: Síndromes de Diabetes Monogénica, como es la diabetes neonatal (hiperglicemia en los primeros meses de vida de los bebés) y la diabetes juvenil de comienzo tardío (MODY por sus siglas en inglés) es una enfermedad asociada con la herencia autosómica dominante, no suelen asociarse con obesidad o sobrepeso y pueden no ser dependientes de insulina (Tapia-Ceballos et al., 2008).

La forma más frecuente de la enfermedad es la diabetes tipo 2 (DT2) representando el 90% de todos los casos reportados y generalmente ocurre en adultos (American Diabetes Association, 2015).

1.2. Etiología de la diabetes tipo 2

La DT2, es consecuencia de una compleja interacción entre múltiples genes y diversos factores ambientales y metabólicos tales como la mala alimentación, estilo

de vida sedentario, la obesidad, la dislipidemia, etc. (Fletcher et. al, 2002; Lyssenko et al., 2008; Wiebe et al, 2011).

1.3. Factores metabólicos y ambientales

La insulina es una hormona anabólica producida por el páncreas encargada de regular las concentraciones de glucosa en sangre. En respuesta a la ingesta de alimentos, la insulina es liberada por las células β de los islotes de Langerhans en el páncreas, promoviendo que la glucosa circulante sea transportada principalmente por el músculo esquelético y tejido adiposo (Dimitriadis et al., 2011). La insulina se une al receptor de insulina (IR) provocando su autofosforilación, lo que desencadena la señalización río abajo a través de la fosforilación de los residuos de tirosina del sustrato del receptor de insulina IRS que constituyen los dos sustratos e intermediarios más comunes de la etapa inicial de propagación de la vía de activación, seguido de la fosforilación de la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K), la cinasa dependiente de fosfoinositida-1, y corriente abajo conduce la activación de la proteína Akt la cual desempeña un papel importante en el transporte de glucosa (Scott et al., 1998; Janus et al., 2016). La cascada de señalización provoca un aumento de síntesis y translocación del transportador de glucosa 4 (GLUT4) a la membrana, facilitando el transporte de glucosa (Bogan et al., 2012). Después de la absorción, la glucosa se fosforila rápidamente a glucosa 6-fosfato (G6P), forma en la que ingresa a la vía de la Glucólisis (Zimmer, 1996).

En tejido adiposo, la señalización de insulina mejora el almacenamiento de lípidos en los adipocitos mediante dos mecanismos, estimulando la lipogénesis e inhibiendo la lipólisis (Choi et al., 2010), a través de la reducción de los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y la inhibición de la actividad de la proteína cinasa A (PKA) (Duncan et al., 2007). En músculo, la insulina suprime el catabolismo proteico, liberando aminoácidos para la gluconeogénesis mediante la activación de la glucógeno sintasa (Wilcox, 2005). En hígado, la insulina inhibe la gluconeogénesis y la glucogenólisis mediante la regulación de la expresión de fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPCK) (Shulman, 2000). Además, la insulina puede

estimular la síntesis de glucógeno a través de la activación de Akt2, y la inhibición de la cinasa 3 de la sintasa de glucógeno (GSK3) así como la activación de la glucógeno sintasa (GS) mediante la desfosforilación de residuos de serina (Hojlund, 2014).

La resistencia a la insulina es una condición en donde se produce una disminución en la respuesta del tejido hepático, músculo esquelético y tejido adiposo a la estimulación por esta hormona, provocando defectos en el transporte y oxidación de la glucosa, aumento de la gluconeogénesis y en la oxidación de los lípidos (Janus et al., 2016). La resistencia a la insulina está asociada con la obesidad, debido a que los sujetos con obesidad presentan valores de ácidos grasos no esterificados anormalmente altos, induciendo un estado de lipotoxicidad que lleva a la activación de distintas respuestas celulares como el estrés oxidante, estrés del retículo endoplásmico, apoptosis e inflamación (Legrand-Poels et al., 2014). Se sugiere que los ácidos grasos y los intermediarios de su metabolismo como: el ácido linoleico, ácido fosfatídico y lisofosfatídico, las ceramidas, y especialmente los diacilgliceroles (DAG) son un potente activador de isoformas clásicas de la proteína cinasa C (PKC) (PKC α , PKC β I, PKC β II Y PKC γ) y de nuevas (PKC δ , PKC ϵ , PKC η y PKC θ), que participan en la regulación negativa de la señalización de la insulina, fosforilando a IRS-1 en residuos de serina (Rachek, 2014).

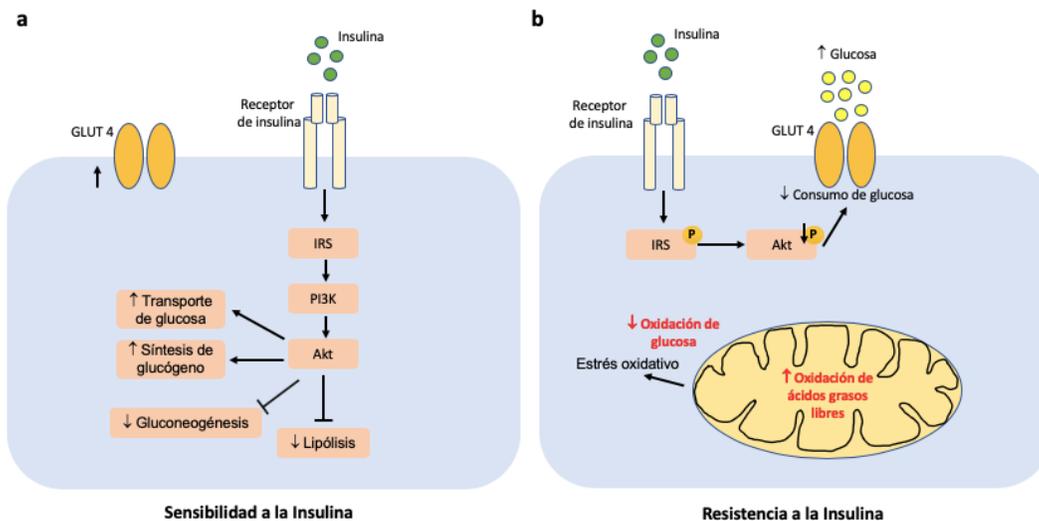


Figura 1. Modelo simplificado de Sensibilidad y Resistencia a la insulina. a) Señalización río abajo en células sensibles a insulina, a través de la fosforilación de los residuos de tirosina de sustrato del receptor de insulina IRS. b) Ejemplo de Regulación negativa de la señalización de la insulina a nivel de Akt, a través de la fosforilación de los residuos de serina.

El estrés oxidante que es provocado por la hiperglucemia crónica inducida por la resistencia a la insulina desencadena una respuesta inflamatoria y conduce a un daño celular (Bornfeldt & Tabas, 2011). Además, puede alterar el metabolismo de lípidos, ocasionando el desarrollo de dislipidemia y la presencia de la tríada lipídica (niveles altos de triglicéridos plasmáticos, niveles bajos de lipoproteína de alta densidad [HDL] y la presencia de lipoproteínas de baja densidad [LDL]). Al unir la tríada con el daño celular puede contribuir a la formación de placa aterosclerótica (Bogan et al., 2012).

1.4. Factores genéticos de la DT2

El componente genético de la DT2 ha sido ampliamente estudiado. Las investigaciones en genética de poblaciones han demostrado que la prevalencia varía considerablemente entre grupos étnicos que comparten el mismo ambiente. Por ejemplo, en Estados Unidos de América se ha observado que la DT2 es de dos a seis veces más prevalente en afroamericanos, indios Pima e hispanos que en la población de origen europeo. Otro estudio demostró que los hijos en que uno de sus padres es diabético tienen un 40% de riesgo de desarrollar DT2, con respecto 7% al que tiene la población en general. Sin embargo, si ambos padres son diabéticos, el riesgo aumenta a un 70%. Por otro lado, se ha observado que en el caso de gemelos homocigóticos, si uno de los hermanos presenta DT2, en un 90% de los casos, el otro hermano desarrollará esta enfermedad (Barnett et al., 1981; Klein et al., 1996; Harris et al., 1998; Wiebe).

La identificación del componente genético de DT2 ha resultado difícil, debido a la presencia de un gran número de genes de susceptibilidad, en donde cada uno tiene una aportación al riesgo de desarrollar la enfermedad; además de que este componente genético depende de la heterogeneidad clínica del padecimiento y de

la etnicidad de la población de estudio (Tusié-Luna, 2008). El progreso de la tecnología juega un papel importante en la obtención de información del componente genético de la DT2. Mediante el estudio de asociación del genoma completo (GWAS por sus siglas en inglés Genome-wide Association Study) se ha logrado principalmente la evaluación imparcial y simultánea de una gran cantidad de variantes genéticas comunes y raras en todo el genoma, identificando variantes comunes para DT2. Las variantes comunes capturan solo aproximadamente el 10% de la heredabilidad de la DT2 (Mahajan et al., 2014; Aguilar-Salinas et al., 2015; Stančáková & Laakso, 2016). En la actualidad, se han reportado más de 120 loci asociados con la DT2 (Prasad, 2015). Estos loci contienen polimorfismos de nucleótido único (SNPs por sus siglas en inglés; Single nucleotide polymorphism) los cuales son variaciones en la secuencia de ADN que afecta a una sola base, una de estas variaciones debe darse al menos en 1% de la población para ser considerada como un SNP (Stančáková & Laakso, 2016). Estos SNPs suelen encontrarse en regiones no codificantes del genoma, aunque también se han encontrado en regiones codificantes, y los mecanismos por los cuales están asociados al riesgo de ocasionar la enfermedad muy comúnmente se desconoce (Imamura & Maeda., 2011; Wiebe, 2011). Algunos de los genes cuyas variantes se han asociado con el desarrollo de DT2 y de los cuales se conoce los mecanismos de afección se muestran en la Tabla 1. (Struan et al., 2006; Wiebe et al., 2011; Sun et al., 2014; Lyssenko et al., 2015; Loya-Mendez et al., 2015; Stancaková & Laakso, 2016; García-Chapa et al., 2017; NIH, Genetics Home Reference).

Tabla 1. Algunos genes asociados a diabetes tipo 2.

Símbolo	Nombre del gen	Función del gen	Mecanismo de afección	SNP	Cita
<i>PPARG</i>	Receptor nuclear PPAR γ	Se expresa de modo preferente en el tejido adiposo, donde regula la transcripción de genes implicados en la adipogénesis.	Inhibe la acción hipoglucemiante, cuyos principales efectos radican en la activación de la oxidación y movilización de lípidos.	rs1801282 rs17793693	Cruz et al., 2010; Martínez-Gómez et al., 2011; Gamboa-Meléndez et al., 2012.
<i>CAPN10</i>	Calpain 10	Neuro de calcio activados por proteasa, miembro de la calpain-cisteína proteasa.	Transporte de glucosa.	rs3792267 rs3842570 rs5030952 rs2975760	Picos-Cárdenas et al., 2015; Del Bosque-Plata et al., 2004; Martínez-Gómez et al., 2011
<i>CDC123</i>	Ciclo de división celular 123 homólogo	Proteína de proliferación celular, asiste el ensamblaje del complejo eIF2 <i>in vivo</i> , en traducción media la unión del tRNA.	Disfunción de células- β .	rs12779790	Gamboa-Meléndez et al., 2012.
<i>CDKAL1</i>	Cinasa dependiente de ciclina-5	Inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina 5 (CDK5).	Disfunción de células- β , el deterioro de la secreción de insulina.	rs10946398 rs9465871 rs7754840	Cruz et al., 2010
<i>KCNJ11</i>	Canal de potasio Kir6.2.	Constituye el poro de la conducción de los canales de potasio sensibles a ATP.	Disfunción de células- β .	rs5215 rs5210 rs5219	Cruz et al., 2010; Gamboa-Meléndez et al., 2012.
<i>KCNQ1</i>	Canal de potasio dependiente de voltaje	Interactúan con las proteínas de la familia KCNE para formar canales funcionales de potasio.	Disfunción de células- β .	rs2237892	Gamboa-Meléndez et al., 2012.
<i>TCF7L2</i>	Factor de transcripción 7	Regula la producción y el procesamiento de proinsulina, modula la función del islote pancreático.	Disfunción de células- β , el deterioro de la secreción de insulina.	rs7903146 rs7903146 rs12255372	Cruz et al., 2010; Martínez-Gómez et al., 2011; Gamboa-Meléndez et al., 2012.
<i>WFS1</i>	Glicoproteína transmembrana de Wolframina en Reticulo endoplásmico	Se cree que regula la cantidad de calcio en las células.	Inhibe el correcto plegamiento de precursor de insulina (proinsulina).	rs6446482 rs752854 rs734312	Franks et al., 2007.

1.4.1. Polimorfismos de un solo nucleótido en población mexicana

Como se mencionó previamente, el factor étnico es un aspecto importante al desarrollo de DT2. En el caso particular de mexicanos, se han descrito alrededor de 21 genes asociados a DT2 (García-Chapa et al, 2017). Algunos de estos genes están implicados en el metabolismo de la glucosa y los lípidos, la función de las células β , y la sensibilidad y secreción de la insulina. Sin embargo, los riesgos genéticos son difíciles de calcular debido a que varios alelos podrían contribuir a un efecto aditivo a la susceptibilidad de diabetes tipo 2 (Lyssenko & Laakso, 2013). El consorcio SIGMA, con el objetivo de encontrar el componente genético de la DT2 en personas mexicanas y latinoamericanas, analizó 9.2 millones de SNPs de 8,214 personas de este origen con y sin DT2. En este estudio se identificó un nuevo haplotipo de riesgo localizado en el cromosoma 17p13, en la región de los genes correspondientes a los transportadores SLC16A11 y SLC16A13, en donde el gen *SL16A11* contiene 5 SNPs ubicados en la región codificante, de los cuales uno es silencioso y 4 no sinónimos (SLC16A11^{DT2}). Este haplotipo es mucho más frecuente en población mexicana y latinoamericana (50%) y confiere un riesgo aproximadamente del 20% de presentar la enfermedad. Con estas propiedades, se esperaría que el haplotipo contribuya a la mayor carga de DT2 en poblaciones mexicanas y latinoamericanas (Florez et al., 2009; Williams et al, 2014).

El transportador que más ha atraído la atención es el SLC16A11 puesto que tiene el haplotipo de riesgo en su región codificante. Sin embargo, se tiene muy poca información acerca de su función por lo que se desconoce cómo es que las alteraciones en éste pudieran ser un factor de riesgo del desarrollo de DT2.

1.5. Familia de monocarboxilatos SLC16

Estos transportadores están involucrados en una amplia gama de vías metabólicas, incluyendo metabolismo energético del cerebro, músculo esquelético, corazón y células tumorales, gluconeogénesis, activación de linfocitos T, metabolismo

intestinal, espermatogénesis, mal funcionamiento de células β pancreáticas, metabolismo de la hormona tiroidea y transporte de drogas (Halestrap, 2013).

De esta familia, doce transportadores han sido caracterizados, dentro de los cuales se encuentran: SLC16A1 (MCT1), SLC16A3 (MCT4), SLC16A7 (MCT2), SLC16A8 (MCT3), SLC16A2 (MCT8) y SLC16A10 (MCT10) (Halestrap, 2013), SLC16A6 (MCT7) (Hugo et al., 2012), SLC16A9 (Suhre et al., 2011), SLC16A12 (Roshanbin et al., 2016), SLC16A4 (MCT5)(Nna et al., 2019) y SLC16A5 (MCT6) (Murakami et al., 2005) (Tabla 2).

Los primeros seis miembros de esta familia que se caracterizaron se clasificaron en 2 categorías:

- Categoría 1: transportan sustratos como cuerpos cetónicos y monocarboxilatos simples (MCT), como el lactato y piruvato, utilizando un mecanismo acoplado a protones (H^+) (Kim-Garcia et al., 1994) y requieren de las proteínas chaperonas, basigina o embigina, para localizarse en la membrana plasmática (Tabla 2).
- Categoría 2: dentro de esta categoría se encuentran los transportadores SLC16A2 y SLC16A10. Los transportadores de esta categoría tienen como sustratos monocarboxilatos hidrofóbicos más grandes tales como la Triyodotironina (T3), Tiroxina (T4) y aminoácidos aromáticos, y el transporte lo llevan a cabo por difusión facilitada (Visser et al., 2011). A diferencia de la categoría 1, estos transportadores no interaccionan con basigina o embigina (Tabla 2) (Halestrap, 2013).

Dentro de los transportadores que ya han sido caracterizados, pero aún no clasificados, se encuentran el transportador SLC16A6, que transporta cuerpos cetónicos como el β -hidroxibutirato y su localización es independiente de la basigina; el transportador SLC16A9 que transporta carnitina; y el SLC16A12 que transporta creatina (Hugo et al., 2012; Suhre et al., 2011; Roshanbin et al., 2016).

Tabla 2. Características de la Familia de Transportadores de Monocarboxilatos (MTC)

Categoría	Gen	Nombre de la proteína	Tipo de transportador	Sustratos	Localización	Interacción con chaperona	Cita
1	SLC16A1 SLC16A3 SLC16A7 SLC16A8	MCT1 MCT4 MCT2 MCT3	Acoplado con H ⁺	Lactato, Piruvato, Cuerpos cetónicos	MP MM P	Basigina y Embigina	Halestrap, 2013
2	SLC16A2 SLC16A10	MCT8 MCT10 / TAT1	Difusión facilitada	T3 y T4 Aa aromáticos (W, T, F, L-DOPA)	MP	NO	Halestrap, 2013
-	SLC16A4	MCT5	Acoplado con H ⁺	Lactato	MP	NO	Nna et al., 2019
-	SLC16A5	MCT6	-	Varios fármacos	MP	NO	Murakami et al., 2005.
-	SLC16A6	MCT7	-	β-Hidroxibutirato	MP	NO	Hugo et al., 2012
-	SLC16A9	MCT9	No acoplado a H ⁺	Carnitina	MP	NO	Suhre et al., 2011
-	SLC16A12	MCT12	Acoplado a H ⁺	Creatina (cido α-metil guanido-acético)	MP	Basigina	Abplanalp et al, 2013
-	SLC16A11 SLC16A11 var	MCT11	Acoplado con H ⁺ ?	Piruvato? ↓ Piruvato?	MP ↓ MP	Basigina ↓ Basigina	Rusu et al., 2017

SLC16A13 y SLC16A14 aún no caracterizados. MP: Membrana Plasmática, MM: Membrana mitocondrial, P: Peroxisomas

1.6. Proteínas chaperonas para la localización de transportadores de monocarboxilatos

Las chaperonas basigina (también conocida como CD147, OX-47, EMMPRIN o HT7) y la embigina (D6RDX7) son glicoproteínas (fig. 3) formadas por un solo

dominio transmembranal que contiene un residuo de glutamato conservado y un extremo glicosilado (Kirk et al., 2000; Wilson et al., 2005).

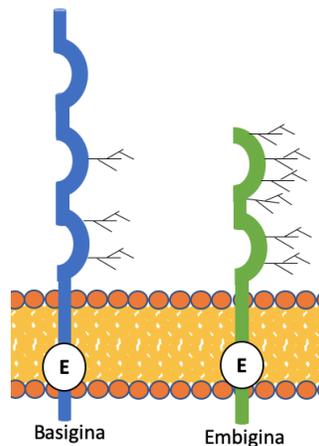


Figura 2. Esquema de las chaperonas basigina y embigina ancladas a la membrana plasmática. Glicoproteínas que tienen un solo dominio transmembrana que contiene un residuo de glutamato conservado, un extremo C-terminal intracelular corto y un gran dominio extracelular glicosilado.

Las chaperonas facilitan la migración de los MCTs de categoría 1 y a los transportadores SLC16A11 y SLC16A12 a la membrana plasmática. De hecho, en su ausencia, estos transportadores no llegan hasta la membrana plasmática y se acumulan en el aparato de Golgi (Kirk et al., 2000; Wilson et al., 2005; Iacono et al., 2007). Su actividad de chaperona la realizan debido a que la porción glicosilada, les permite anclarse a membrana plasmática debido al reconocimiento de lectinas, como la galectina-3 y la E-selectina.

1.7. Transportador SLC16A11

El transportador SLC16A11 ha adquirido mucha importancia debido a que, como se mencionó anteriormente, se ha asociado un haplotipo presente en el gen de este transportador con el riesgo de desarrollar diabetes tipo 2. Sin embargo, cuando se describió este haplotipo este transportador no había sido caracterizado por lo que no existe mucha información acerca de su función.

Hasta el momento se sabe que el transportador SLC16A11 se localiza en membranas intracelulares. Sin embargo, cuando el transportador interactúa con la

basigina humana, éste puede localizarse en la membrana plasmática; lo que sugiere que, al igual que otros MCTs de la categoría 1, el SLC16A11 requiere de una chaperona para poder localizarse en la membrana plasmática (Rusu et al., 2017). Por otro lado, se determinó en ensayos *in vitro*, que el SLC16A11 puede transportar piruvato en una reacción acoplada con protones (Rusu et al., 2017). Sin embargo, a pesar de que la actividad de este transportador se midió utilizando como sustrato al piruvato, no se llevaron a cabo ensayos de transporte con otros sustratos, por lo que no se puede decir que este metabolito sea su sustrato primario (Rusu et al., 2017).

De manera interesante, estos estudios determinaron que la presencia del haplotipo de riesgo (SLC16A11^{DT2}) promueve una disminución en la localización del transportador en la membrana plasmática debido a una menor interacción con la basigina (Rusu et al., 2017). Esto se ve reflejado también en una disminución de la actividad de este transportador con piruvato (Rusu et al., 2017).

Por otro lado, estudios metabolómicos han sugerido que el SLC16A11 tiene como sustrato algún metabolito relacionado con el metabolismo de lípidos. Esto es debido a que expresión de este transportador SLC16A11 en células HeLa o inhibición del transportador con siRNA en cultivos primarios de hepatocitos, promueve un incremento en la concentración intracelular de triacilgliceroles (TAG), acilcarnitinas y diacilgliceroles, metabolitos involucrados en el metabolismo de lípidos (Williams et al, 2014; Rusu et al., 2017).

Más recientemente, se reportó que la delección del transportador SLC16A11 en ratón no tuvo ningún efecto sobre los parámetros bioquímicos ni en las curvas de tolerancia a la glucosa. Sin embargo, cuando expresaron al gen con el haplotipo SLC16A11^{DT2} en estos ratones, se observó un aumento en la acumulación de triglicéridos en sangre y desarrollaron resistencia a la insulina cuando los animales eran alimentados con dieta normal y alta en grasa (Zhao et al., 2019). De manera interesante, al hacer una inhibición parcial del transportador SLC16A11 (knockdown), éstos mostraron una mejora en la tolerancia a la glucosa, se incrementó la fosforilación de la vía de señalización de insulina hepática (disminuyó

la resistencia a la insulina) y disminuyeron los triglicéridos hepáticos, todo esto comparado con ratones alimentados con dieta alta en grasa (Zhang et al., 2019). Además, se ha observado que individuos portadores del haplotipo de riesgo desarrollan resistencia a la insulina y, en el caso de mujeres con normopeso también se observó un aumento significativo en el tamaño de adipocitos en la grasa subcutánea (Almeda-Valdes et al., 2019).

2. Hipótesis

El transportador SLC16A11 tiene como sustratos, intermediarios relacionados con el metabolismo de lípidos. La presencia de los 5 SNPs en el gen *SLC16A11*, además de afectar la localización del transportador en la membrana, afectará la actividad de este transportador y la afinidad por su sustrato.

3. Justificación

Conocer la actividad y función del transportador SLC16A11 y de su variante (SLC16A11^{DT2}), determinará su contribución a la etiología de Diabetes tipo 2.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Caracterizar funcionalmente al transportador de referencia SLC16A11 y determinar el efecto de la presencia de los 5SNPs en la variante de riesgo SLC16A11^{T2D}.

4.2. Objetivos específicos

1. Expresar los transportadores SLC16A11 y su variante SLC16A11^{DT2} en ovocitos de *Xenopus laevis*.
2. Identificar el sustrato del transportador SLC16A11.
3. Caracterizar cinéticamente los transportadores SLC16A11 y SLC16A11^{DT2}.

5. Metodología

5.1. Obtención y clonación de los genes *SLC16A11*, *SLC16A11^{DT2}* y basigina

El gen *SLC16A11* (humano) ya se encontraba previamente clonado en el vector de expresión en ovocitos pGH19 (derivado de pGEMHE Liman et al., 1992) (fig. 3).

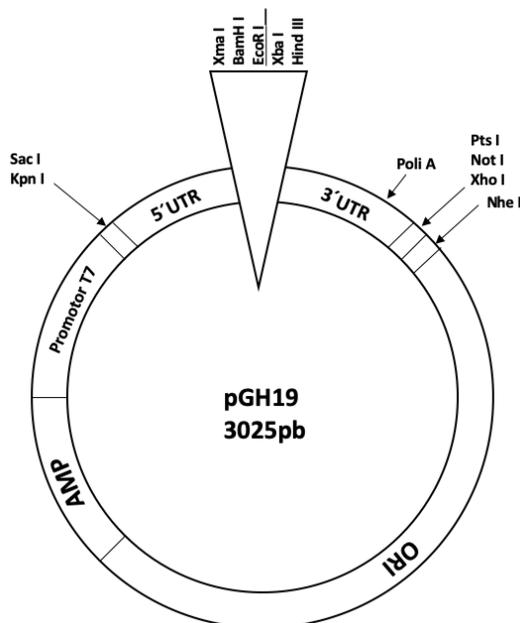


Figura 3. Representación del mapa del plásmido pGH19 específico para expresión en *Xenopus laevis*. El plásmido contiene el promotor T7 y el gen de ampicilina.

A esta construcción se le insertó una secuencia FLAG en el extremo 5' del gen *SLC16A11* y una secuencia codificante para un codón de paro al final de éste (pGH19-*SLC16A11*) utilizando el Kit QuickChange II Site-Directed Mutagenesis (Agilent). Para esto, se tomaron 10 ng de DNA y se utilizó por separado el par de primers 1 y 2 (Tabla 7). Se hicieron reacciones de 25 μ L (Tabla 3) de volumen final y se siguió el programa de PCR mencionado en la Tabla 4. Posteriormente, se transformaron 50 μ L de células de *Escherichia coli* DH5 α o XL1 Blue con el producto de PCR, se sembraron en placas con agar LB más ampicilina (100 μ g/mL) y se incubaron durante 17 h a una temperatura de 37°C. Posteriormente, se

seleccionaron 4 colonias y se crecieron en medio líquido LB con ampicilina (100 µg/mL) durante 16 h a una temperatura de 37°C. Por último, se purificó el plásmido utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN).

Los plásmidos obtenidos se linearizaron con la enzima de restricción *NheI*, y se verificó el tamaño de éste por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. La concentración del plásmido se obtuvo en un espectrofotómetro (Nanodrop DeNovix) a una absorbancia de 260 nm ajustado con agua. Las muestras se conservaron a una temperatura de -20°C. La identidad del gen se verificó por secuenciación (Unidad de Secuenciación, Instituto de Biotecnología, UNAM).

Tabla 3. Reacción de PCR utilizando el kit QuickCHange II Site-Directed Mutagenesis (Agilent).

Reacción de PCR (25 µL)	
DNA (10 ng)	1 µL
Buffer de reacción 10X	2.5 µL
Oligonucleótido forward (100 ng/µL)	1 µL
Oligonucleótido reverse (100 ng/µL)	1 µL
dNTP mix	0.5 µL
Agua grado biología molecular	18.5 µL
<i>PfuUltra</i> HD DNA polimerasa	0.5 µL

Tabla 4. Programa de PCR utilizando el kit QuickCHange II Site-Directed Mutagenesis (Agilent).

Programa de termociclador			
Segmento	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	95°C	1 min
2	18	95°C	50 seg
		54°C	1 min
		68°C	7 min
3	1	68°C	7 min

Después del ciclo se adiciona 1 µL de *Dpn I* y se incuba por 1 h a 37°C

La variante de riesgo (*SLC16A11^{DT2}*) se obtuvo insertando los cambios: G³³⁷A (valina cambió por isoleucina), A³⁸⁰G (aspártico cambió por glicina), T⁵⁶¹C (lisina por lisina no cambió), G¹⁰¹⁸A (glicina cambió por serina) y C¹³²⁷A (prolina cambió por treonina), al pGH19-*SLC16A11* secuenciado, mediante mutagénesis sitio dirigida utilizando el Kit QuickCHange II Site-Directed Mutagenesis (Agilent) y utilizando los primers 3 al 7 (Tabla 7). Posteriormente, se transformaron 50 µL de células de

Escherichia coli DH5 α o XL1 Blue con el producto de PCR, se sembraron en placas con agar LB más ampicilina (100 μ g/mL) y se incubaron durante 17 h a una temperatura de 37°C. Posteriormente se seleccionaron 4 colonias y se crecieron en medio líquido LB con ampicilina (100 μ g/mL) durante 16 h a una temperatura de 37°C. Por último, se purificó el plásmido utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN), los cuales se enviaron a secuenciar.

Por otro lado, se clonó al gen de la basigina humana (variante 2) en el plásmido pGH19 (pGH19-Bsg), utilizando la técnica conocida como “ensamble *in vivo*” (García-Nafría et al., 2016) (fig. 4). Esta técnica es un método de clonación que se utiliza para realizar cualquier modificación de plásmidos; desde inserciones, deleciones y mutagénesis sitio dirigida (fig. 4a), y ensamblaje completo de múltiples genes (fig. 4b).

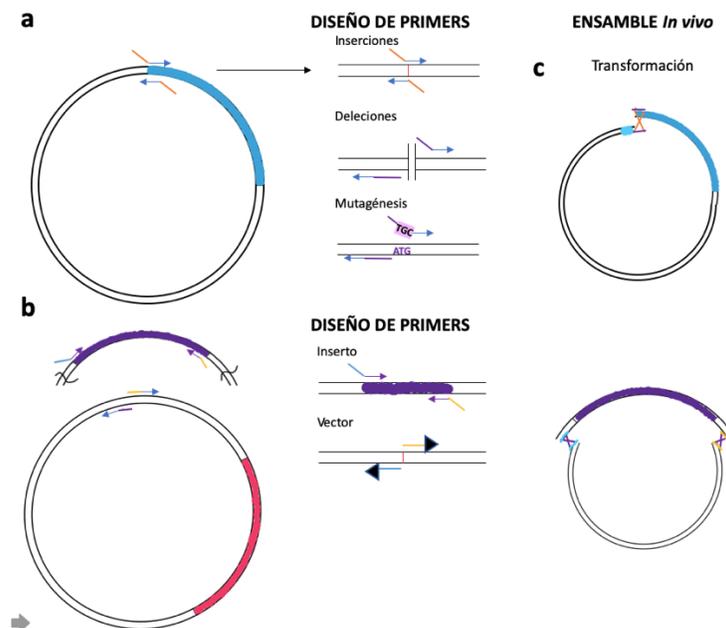


Figura 4. Clonación por “ensamble *in vivo*” optimizando el diseño de primers. a) Inserciones, deleciones y mutagénesis. b) Ensamblaje de genes, ambos métodos generando extremos lineales homólogos obtenidos por PCR. c) Digestión con *DpnI* seguida de transformación donde se ensamblan los extremos homólogos mediante recombinación.

Para realizar esta técnica, se amplificaron por PCR al gen de la basigina, a partir de cDNA de células HeLa, y al plásmido pGH19, siguiendo la reacción de la tabla 5 con los primers 8 y 9 por separado (Tabla 7) y el programa de PCR de la tabla 6. Posteriormente, la ligación libre de ligasa se llevó a cabo transformando 50

μL de células de *Escherichia coli* DH5 α o XL1 Blue con 3 μL de producto de PCR de plásmido y 3 μL de basigina de cDNA de células HeLa, se sembraron placas de agar LB con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubaron por 17 h a 37°C. Se tomaron 4 colonias y se purificó el plásmido. Posteriormente, se le insertó la secuencia de la etiqueta HA por mutagénesis sitio dirigida utilizando el Kit QuickChange II Site-Directed Mutagenesis (Agilent) y utilizando el par de primers 11 (Tabla 7) y la reacción y programa de PCR de las tablas 3 y 4 respectivamente.

Tabla 5. Reacción de PCR utilizando la enzima DNA polimerasa *Phusion*.

Reacción de PCR (25 μL)	
DNA (10 ng)	1 μL
Buffer de reacción <i>Phusion</i> 5X	5 μL
Oligonucleótido forward (10 μM)	1.25 μL
Oligonucleótido reverse (10 μM)	1.25 μL
dNTPs 10 mM	0.5 μL
Agua grado biología molecular	15 μL
DMSO	0.75 μL
<i>Phusion</i> DNA polimerasa	0.25 μL

Tabla 6. Programa de PCR utilizando la enzima DNA polimerasa *Phusion*.

Programa de termociclador			
Segmento	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	98°C	30 seg
2	18	98°C	10 seg
		68°C	30 seg
		72°C	5 min
3	1	72°C	10 min

Después del ciclo se adiciono 1 μL de *Dpn* I y se incubo por 1 h a 37°C

Debido a que encontramos que existía un cambio en la secuencia de la basigina, corregimos esta modificación (A⁶⁹⁹ por G), mediante mutagénesis sitio dirigida utilizando el kit antes mencionado y los primers 10 (Tabla 7). Ya purificado el plásmido, se envió a secuenciar para verificar que la modificación se hubiera insertado.

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados para mutagénesis sitio dirigida y para “ensamblaje *in vivo*”

		Secuencia de oligonucleotidos
Núm. de primers	SLC16A11	
1	Etiqueta FLAG	Fdw 5'-GATTACAAGGATGACGACGATAAGCCAGCTCCCCAG-3' Rev 5'-CGTCGTCATCCTTGTAAATCCATGGCGATCGCGGCGGC-3'
2	Codón de paro	Fdw 5'-CACCACTTGTTAAACGCGTACGCGGCCGCTC-3' Rev 5'-GCGTACGCGTTTAAACAAGTGGTGTCCAGAGTGG-3'
SLC16A11^{DT2}		
3	Cambio de guanina ³³⁷ por adenina	Fdw 5'-GGTTGGGGGCATCCTCGCCTCGCTGGG -3' Rev 5'-GCGAGGCGAGGATGCCCCCAACCATCAC-3'
4	Cambio de adenina ³⁸⁰ por guanina	Fdw 5'-CTTTCGCCAGCGGTCTGCTGCATCTCTACC -3' Rev 5'-GATGCAGCAGACCGCTGGCGAAAGCCGAG-3'
5	Cambio de timina ⁵⁶¹ por citocina	Fdw 5'-GCAGCTTCTCCTCGATACTTTCGGCTG-3' Rev 5'-GAAAGTATCGAGGAGAAGCTGCAAGGCG-3'
6	Cambio de guanina ¹⁰¹⁸ por adenina	Fdw 5'-GAGCTGGGGGAGTCCCCTGCTGGCC-3' Rev 5'-GCAGGGGACTCCCCAGCTCTCTTCG-3'
7	Cambio de citocina ¹³²⁷ por adenina	Fdw 5'-GCCACGCCTACCCCAGAGACGGG-3' Rev 5'-CGTCTCTGGGGTAGGCGTGGCTGGAG-3'
Basigina humana variante 2		
8	Clonación de células HeLa	Fdw 5'-GAATTCGTTGGCACCATGGCGGCTGCGCT-3' Rev 5'-CAAGAAAGTTGGCAAGGAAGAGTTCCTCTGGCGGAC-3'
9	Plásmido pGH19	Fdw 5'-GAGGAACTTTCCTTGCCAACTTTCTTGTACAAGC-3' Rev 5'-GAACAGCGCAGCCGCCATGGTGCCAACGAATTC-3'
10	Modificación de SNP A ⁶⁹⁹ por G	Fwd 5'-CGAGAAGCGCCGGAAGCCCGAGGACGTC-3' Rev 5'-GTCCTCGGGCTCCGCGCTTCTCGTAGATGAAG-3'
11	Etiqueta HA	Fdw 5'-GATGTTCCAGATTACGCTGCCTGATTGCCAACTTTCTTGTACAAGC-3' Rev 5'-GTAATCTGGAACATCGTATGGGTAGGAAGAGTTCCTCTGGCGG-3'

5.2. Síntesis de cRNA por transcripción *in vitro*

Los plásmidos pGH19-*SLC16A11*, pGH19-*SLC16A11*^{DT2} y pHG19-*Bsg* clonados se linearizaron con la enzima *NheI*. Para esto, se utilizaron 2500 ng de DNA de cada una de las construcciones, se adicionaron 1 μL de enzima *NheI*, 2 μL de buffer 10X y agua grado biología molecular hasta llegar a un volumen de 20 μL y se incubó por 2 h a 37°C. Posteriormente, para la transcripción *in vitro* de cRNA (por sus siglas en inglés: RNA complementary, es el RNA mensajero sintetizado a partir de DNA) se utilizó el sistema T7 RNA polimerasa mMMESSAGE mMACHINE (Ambion) debido a que el plásmido pGH19 presenta el promotor T7 en la región 5'. Para esto, se siguió la reacción indicada en la tabla 8.

Tabla 8. Reacción de síntesis de cRNA con el sistema T7 RNA polimerasa mMMESSAGE mMACHINE (Ambion).

Reacción de PCR (25 μL)	
DNA linearizado (2500 ng)	5 μL
RNTPs 2X	10 μL
GTP	1 μL
Buffer 10X	2 μL
RNA polimerasa	1.25 μL

Incubar 2 h a 37°C

DNAsa libre de RNAsa	1 μL
----------------------	-----------------

Incubar 15 min a 37°C

Posteriormente, se comprobó la calidad y el tamaño del cRNA mediante geles desnaturalizantes de agarosa al 1% en MOPS-formaldehído utilizando un marcador de peso molecular de RNA (Promega). La concentración se obtuvo en un espectrofotómetro (Nanodrop DeNovix) a una absorbancia de 260 nm ajustado con agua.

5.3. Expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis*

Los ovocitos de *Xenopus laevis* son un excelente sistema para la expresión y caracterización de proteínas de membrana, ya que pueden sintetizar proteínas

exógenas a partir de mRNA (cRNA) inyectado, pueden ensamblar estas proteínas de manera adecuada y las puede dirigir al compartimento celular adecuado (Wagner et al, 2000; Markovich, 2007). A diferencia de otros sistemas de expresión de proteínas heterólogas como las líneas celulares eucariontes, *Escherichia coli* o levaduras, los ovocitos de *Xenopus laevis* tienen un alto grado de expresión de mRNA o cDNA exógeno y debido a su tamaño son fácilmente manipulables (Wagner et al, 2000; Markovich, 2007). Además, los ovocitos, al no depender de nutrientes exógenos, contienen pocos transportadores en su membrana plasmática lo que permite la sobre expresión heteróloga de transportadores (Wagner et al., 2000).

Los ovocitos se extrajeron de ranas hembra adultas anestesiadas con tricafina al 0.17%. Para quitar la membrana folicular de los ovocitos se realizaron dos lavados de 1.5 h cada uno, en una solución de colagenasa tipo II (Sigma-Aldrich) a una concentración de 3 mg/mL disuelta en una solución fisiológica ND96 sin calcio (96 mM NaCl, 2mM KCl, 1 mM MgCl₂ y 5 mM HEPES-Tris pH 7.4) y se incubaron toda la noche con ND96 (96 mM NaCl, 2mM KCl, 1.8 mM CaCl₂ 1 mM MgCl₂ y 5 mM HEPES-Tris pH 7.4) a 16°C. Al día siguiente, los ovocitos se inyectaron con 50 nL de cRNA de interés previamente calentado a 65°C durante 3 min y con ayuda de un micro manipulador y un micro inyector. Las concentraciones de cRNA utilizadas se indican en la tabla 9.

Tabla 9. Concentraciones de cRNA utilizados para inyección de ovocitos de *Xenopus laevis*.

cRNA	Concentración (µg/µL)
SLC16A11	0.2, 0.4, 0.8 y 1
Basigina	0.2, 0.4 y 0.8
SLC16A11 y basigina	0.2, 0.4 y 0.8
SLC16A11^{DT2}	0.2, 0.4, 0.8 y 1
SLC16A11^{DT2} más basigina	0.2, 0.4 y 0.8
Más grupo control inyectados con 50 nL de agua grado biología molecular	

Los ovocitos después de la inyección se mantuvieron en incubación a 16°C durante 72 h y en cursos temporales 24, 48, 72 y 96 h, con cambios diarios de medio ND96.

Después de la incubación se tomaron de 15 a 20 ovocitos por grupo, se agregó solución amortiguadora de lisis (CellLytic Sigma) adicionada con inhibidor de proteasas (Complete;Roche), en una proporción de 5 µL por cada ovocito y se lisaron utilizando una jeringa de 1 mL. El lisado celular de cada grupo se centrifugó a 4,000 g durante 5 min y el sobrenadante se transfirió a otro tubo. Las muestras se conservaron a -80°C.

La expresión de la proteína de interés se corroboró mediante la técnica de Western Blot. Para esto, cada una de las muestras se preparó agregando el mismo volumen de buffer Laemmli 2X con 5% de 2-mercaptoetanol. Posteriormente, las proteínas se separaron en un gel desnaturizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 7.5% y las proteínas se identificaron por inmunoblot (Veáse abajo).

5.4. Biotinilación de proteínas de membrana

Se seleccionaron de 15 a 20 ovocitos con la membrana intacta por cada grupo experimental. Se lavaron 3 veces con 3 mL de la solución amortiguadora ND96 TEA (Trietanolamina) (96 mM NaCl, 2mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ y 5 mM HEPES-Tris y 10 mM TEA pH 8.8) previamente enfriado en hielo. Posteriormente, los ovocitos se incubaron en 500 µL de una solución 1.5 mg/mL de Sulfo-NHS-LC-Biotina (Thermo, Pierce) disuelta en solución ND96 TEA, durante 30 min en hielo. Posteriormente, los ovocitos biotinilados se lavaron 3 veces con 3 mL de ND96 TEA previamente enfriado y se lisaron en una solución amortiguadora de lisis (CellLytic Sigma) con inhibidor de proteasas (5 µL por cada ovocito) con una jeringa de 1mL. Las muestras se centrifugaron a 4,000 g durante 5 min y el sobrenadante se transfirió a otro tubo. Posteriormente, se determinó la concentración de proteína utilizando el ensayo con ácido bicinconínico basado en la reacción de Biuret (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher). Para la separación de las proteínas biotiniladas, se tomaron 250 mg de proteína del

sobrenadante de cada grupo y se incubaron en rotación con 30 μ L de perlas de agarosa con estreptavidina (Millipore) en una solución amortiguadora TBS (TBS, 100 mM NaCl, 50 mM Tris—HCl pH 7.4), durante toda la noche a una temperatura de 4°C. Al día siguiente se lavaron las perlas de estreptavidina unidas a las proteínas biotiniladas dos veces con 1 mL de solución A (50 mM EDTA, 50 mM NaCl, 50 mM Tris—HCl pH 7.4) y posteriormente se centrifugaron a 8,000 g durante 2 min a 4°C. El mismo protocolo de lavado se repitió con la solución B (500 mM NaCl, 20 mM Tris—HCl pH 7.4) y la solución C (100 mM Tris—HCl pH 7.4). Después, el pellet se resuspendió en 30 μ L de solución de carga Laemmli 2X con 5% de 2-mercaptoetanol. Las proteínas se calentaron a 65°C durante 15 min y se separaron en un gel desnaturizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 7.5% y las proteínas se identificaron por inmunoblot (Veáse abajo).

5.5. Ensayo de Inmunoprecipitación (IP) de proteínas etiquetadas con Flag

Se tomaron de 15 a 20 ovocitos por cada grupo experimental (Agua, basigina, *SLC16A11*, *SLC16A11*-basigina) y se lisaron en una solución amortiguadora de lisis (CellLytic Sigma), (5 μ L por cada ovocito) con inhibidor de proteasas con una jeringa de 1 mL. Las muestras se centrifugaron a 4,000 g durante 5 min y el sobrenadante se transfirió a otro tubo. Se tomó el sobrenadante y se le determinó la concentración de proteína utilizando el ensayo con ácido bicinónico. Se tomaron 0.2 mg de proteína y se incubaron con 10 μ L de perlas de agarosa acopladas al anticuerpo anti-FLAG (Sigma-Aldrich) en 60 μ L de solución amortiguadora PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2HPO_4 1.8 mM, pH 7.4), a una temperatura de 4°C durante dos horas con agitación suave. Las perlas se centrifugaron a 18,800 g (14,000 rpm) durante 1 minuto, se lavaron tres veces con 500 μ L de una solución de PBS enfriado en hielo y dos veces con 500 μ L buffer de lisis con NaCl 0.15 mM previamente enfriado en hielo. Después, el pellet se resuspendió en 20 μ L de solución de carga Laemmli 2X con 5% de 2-mercaptoetanol. Se calentaron a 95°C por 10 min y se separaron en un gel desnaturizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 7.5% y las proteínas se identificaron por inmunoblot (Véase abajo).

5.6. Western blot (Inmunoblot)

Los geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 7.5% se corrieron bajo las siguientes condiciones: 60 V durante 20 min para alinear las muestras en la parte concentradora del gel y posteriormente a 120 V durante 1 h 30 min. Cada carril se carga con aproximadamente 2 ovocitos lo que equivale a 10 mg de proteína, a excepción de biotilación donde se cargan perlas de agarosa acopladas a estreptavidina. Cada gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) se transfirió a una membrana de transferencia de PVDF (polímero de polivinildenedifloride) Millipore Immobilon™-P, utilizando una cámara de transferencia húmeda (Bio-Rad) a 100 V durante 1 h. Posteriormente, la membrana se incubó con una solución bloqueadora de grado de transferencia (Bio-Rad) al 10% (P/V) disuelta en TBS-tween 0.2% (V/V), durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación suave. Después, las membranas se incubaron a una temperatura de 4°C durante toda la noche con los anticuerpos específicos contra las etiquetas de *SLC16A11(FLAG)*, *SLC16A11^{DT2}(FLAG)* y de la basigina (*HA*), los cuales se encuentran acoplados a conjugados de peroxidasa de rabano (HRP por sus siglas en inglés Horseradish peroxidase). Las diluciones de anticuerpos utilizadas fueron: anti-FLAG 1:1000 (Sigma-Aldrich), anti-HA 1:2000 (Sigma-Aldrich) y anti-beta-actin 1:2500 (Santa Cruz Biotechnology) y se prepararon en una solución bloqueadora de grado de transferencia al 5% (P/V) disuelta en TBS-Tween 0.2%. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados de 5 min con TBS-Tween 0.2% a temperatura ambiente y en agitación. Posteriormente, se adicionó a cada membrana 1 mL de revelador de sustrato de HRP quimioluminiscente (Immobilon Western, Millipore) y las imágenes se obtuvieron en un ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad).

5.7. Identificación del sustrato primario del transportador SLC16A11

5.7.1 Ensayos de captación con isótopos radioactivos

Para determinar el transporte de $^{14}\text{C}_1$ Piruvato o $^{14}\text{C}_1$ Palmitato se incubaron 20 a 25 ovocitos por grupo experimental (Agua, basigina, *SLC16A11*, *SLC16A11* más basigina) en una solución de captación (NaCl 100 mM, KCl 2 mM, CaCl_2 1 mM, MgCl_2 1 mM, HEPES 10 mM, Tris 5 mM, pH 7.4) con 0.5 $\mu\text{Ci/mL}$ del isótopo radioactivo (piruvato o palmitato) y diferentes concentraciones de piruvato (1 y 10 mM) o pamitato (0.01, 0.05 y 1 mM) no radioactivos, durante 1 y 2 horas a una temperatura de 32°C.

Al final del período de captación los ovocitos se lavaron cinco veces con 3 mL de solución de captación enfriada en hielo y se colocó un ovocito por vial, se adicionó 1 mL de SDS al 10% para lisarlos y 1 mL de líquido de β -centelleo. De manera paralela se tomaron 10 μL de medio de captación y se le agregó 1 mL de líquido de β -centelleo. La cantidad de trazador en el interior del ovocito y en el medio de captación se cuantificó mediante recuento de centelleo β .

Los datos se analizaron tomando de cada experimento 10 ovocitos, restándole el promedio de los blancos, después se graficó el valor de la captación de $^{14}\text{C} \pm$ desviación estándar. Los datos se presentaron como consumo de captación de ^{14}C (pmol/ovocito/hora).

5.7.2 Ensayos de transporte con aminoácidos

Para estos ensayos se realizaron cursos temporales del transporte de aminoácidos y posteriormente se cuantificó la cantidad de aminoácido en el interior de los ovocitos por HPLC acoplado a fluorescencia. Para esto, se tomaron de 15 a 20 ovocitos de cada grupo experimental (Agua, basigina, *SLC16A11*, *SLC16A11* más basigina) y se incubaron en 3 mL de una solución ND96 con 1 o 10 mM de los

aminoácidos fenilalanina (Phe), isoleucina (Ile) o Leucina (Leu), a temperatura ambiente. Para el caso del transporte de Phe e Ile, se tomaron 3 ovocitos de cada grupo experimental cada 15 min durante una hora. Para los ensayos de transporte de Leu se tomaron 3 ovocitos cada 5 minutos durante 15 min en ambas concentraciones del aminoácido. En el caso de la Phe 10 mM, se tomaron 3 ovocitos cada 5 min durante 15 min.

Después de tomar la muestra, los ovocitos se lavaron dos veces con 1 mL de ND96 previamente enfriado en hielo, y se colocaron en tubos eppendorf que contenían 60 μ L de HCl 0.1 M. Los ovocitos se lisaron con ayuda de una jeringa de 1 mL y se centrifugaron dos veces durante 30 min a 18,800 g (14000 rpm). Posteriormente, se tomaron 30 μ L del sobrenadante de cada muestra y se le adicionaron 0.3 μ L de un estándar interno (STD) L-norvalina (derivado de valina) a una concentración de 15 μ M. Las muestras se inyectaron en un HPLC (High Performance Liquid Chromatography) Agilent 1100, y los aminoácidos presentes se derivatizaron pre-columna con o-ftaldialdehído (OPA), el cual reacciona con las aminas primarias de los aminoácidos y produce compuestos aromáticos que emiten fluorescencia. Los derivados aminoácido-OPA se separaron en una columna ZORBAX Eclipse AAA (Agilent, columna de rápida resolución con un tamaño de partícula: 3.5 y una longitud de 4.6 x 150 mm) utilizando un gradiente formado por una fase acuosa (A) de buffer de fosfatos ((KH_2PO_4 y K_2HPO_4 0.1 M a pH 7.2) y una fase orgánica (B) compuesta por acetonitrilo: metanol: H_2O (45:45:10). Los aminoácidos se detectaron por fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 350 nm y una de emisión de 450 nm. La concentración de aminoácidos se determinó interpolando en curvas de calibración que previamente fueron corridas, para cada aminoácido en un intervalo de concentración de 9 μ M a 500 μ M (región lineal).

5.7.3 Ensayos de Termoestabilidad

Este ensayo evalúa los cambios inducidos por el ligando en la termoestabilidad de las proteínas, y se ha aplicado principalmente a los

transportadores de membrana como los SLC. La técnica se desarrolló en células intactas y en extractos de células HEK293 (Hashimoto et al., 2018).

El ensayo de termoestabilidad se realizó en ovocitos completos y en lisado de ovocitos:

- i) Ovocitos completos. Se incubaron de 15 a 20 ovocitos por cada grupo experimental (Agua, basigina, SLC16A11, SLC16A11 más basigina), en una solución ND96 con 10 mM de piruvato durante 30 min en hielo. Después de la incubación los ovocitos se lavaron tres veces con 1 mL de ND96 frío y se lisaron en una solución amortiguadora de lisis (CellLytic Sigma) con inhibidor de proteasas (5 μ L por cada ovocito) y con ayuda de una jeringa de 1 mL. Posteriormente, el lisado celular se centrifugó a 18800 g (14000 rpm) durante 40 min a 4°C y se tomó el sobrenadante.
- ii) Ovocitos lisados. Se utilizaron de 15 a 20 ovocitos por cada grupo experimental (Agua, basigina, SLC16A11, SLC16A11-basigina), se lisaron de manera similar al paso i). El sobrenadante se incubó con 10 mM de piruvato en hielo durante 30 min.

Posteriormente, se tomaron 5 alícuotas de 30 μ L de las muestras obtenidas en i) y ii), y se calentaron individualmente a diferentes temperaturas: 45, 55, 65, 75 y 85 °C en un Thermoblock (Eppendorf) durante 6 minutos. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 18,800 g (14,000 rpm) durante 40 min a 4°C y se separó el sobrenadante. Se tomaron 10 μ L de cada muestra y se agregaron 10 μ L de solución de carga Laemmli 2X con 5% de 2-mercaptoetanol. Las muestras se separaron en un gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 7.5% y las proteínas se identificaron por inmunoblot.

6. Resultados

6.1. Clonación de genes y adición de etiquetas para su identificación

Previamente, el gen que codifica para el transportador SLC16A11 estaba clonado en el vector de expresión de ovocitos pGH19. Posteriormente, se adicionó por mutagénesis sitio dirigida la etiqueta FLAG al inicio del gen y un codón de paro al final de éste (pGH19-SLC16A11). La inserción de estas secuencias fue verificada por secuenciación (fig. 5b).

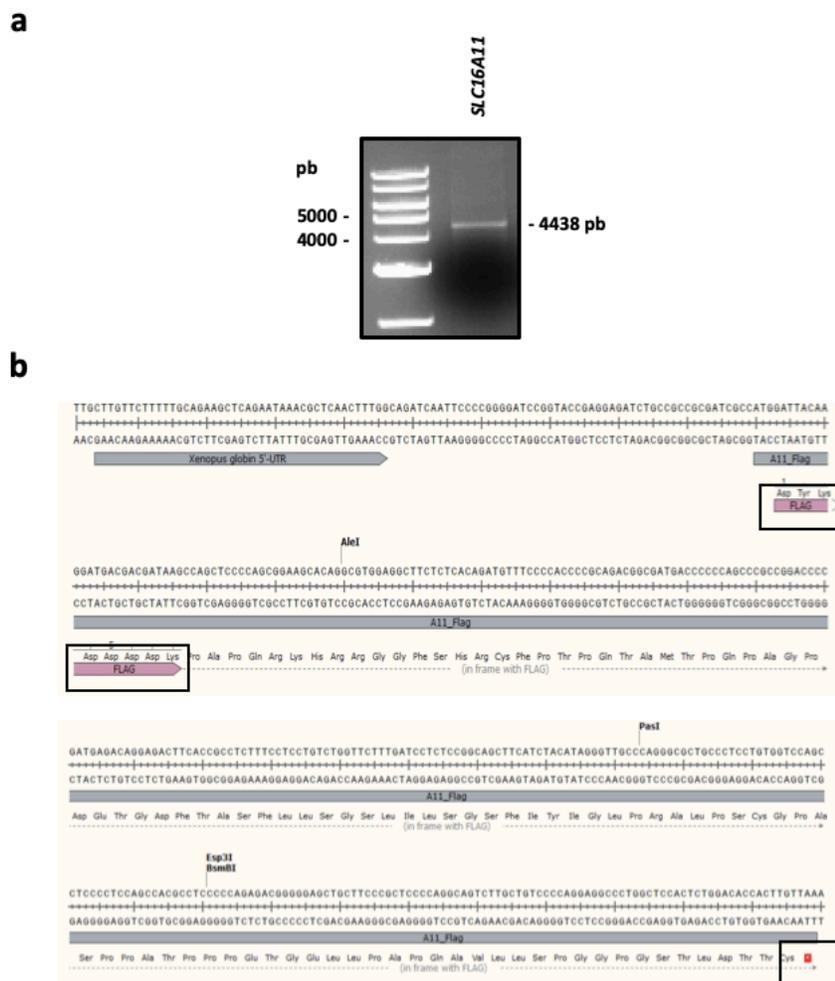


Figura 5. Inserción de etiqueta FLAG y codón de paro a pGH19-SLC16A11. Gel de agarosa al 1% con pGH19-SLC16A11 linealizado con la enzima *NheI*. b) Secuencia de *SLC16A11* mostrando etiqueta FLAG y codón de paro (visualizado con Snapgene viewer).

Posteriormente, la variante de riesgo *SLC16A11^{DT2}* se obtuvo mediante la inserción de los 5 SNPs presentes en la variante (Williams et al., 2014) al pGH19-

SLC16A11 por mutagénesis sitio dirigida. El pGH19-*SLC16A11*^{DT2} se linearizó con la enzima de restricción *NheI*, obteniendo un tamaño de 4438 pb que corresponde a la suma de los tamaños del vector más el gen (fig. 6a). La inserción de los SNPs se verificó por secuenciación (fig. 6b).

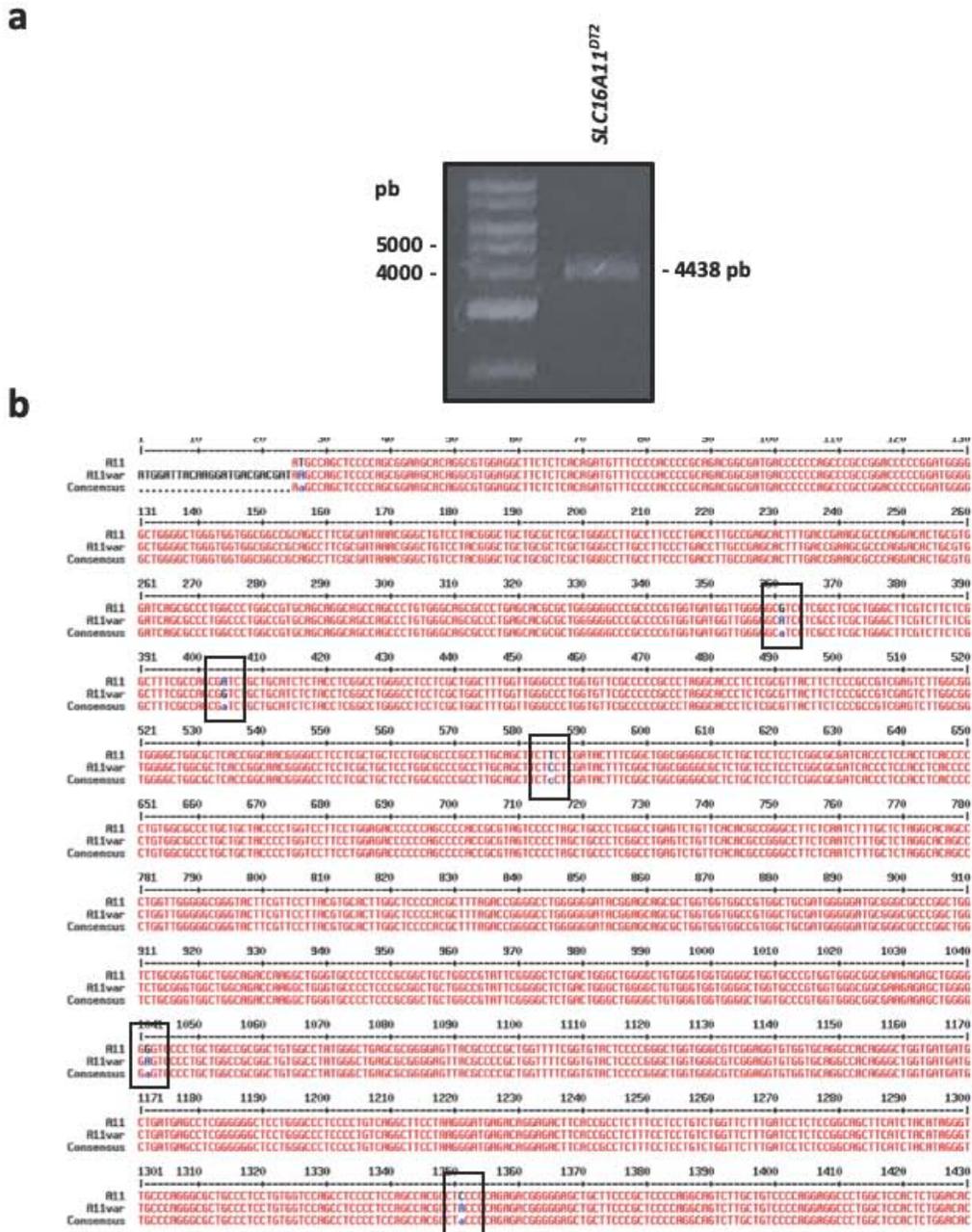
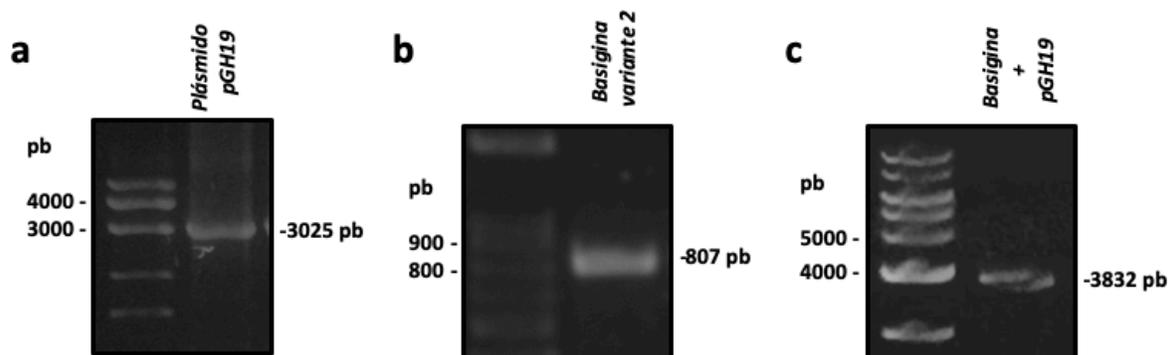


Figura 6. Obtención de la variante *SLC16A11*^{DT2}. a) Gel de agarosa al 1% con pGH19-*SLC16A11*^{DT2} linearizado con la enzima *NheI*. b) Alineamiento de secuencias de *SLC16A11* y *SLC16A11*^{DT2} mostrando los cinco SNPs insertados (visualizado con multalin, Multiple sequence alignment by Florence Corpet).

La basigina humana variante 2 se clonó al vector pGH19 utilizando la técnica de “ensamble *in vivo*”. Para esto, la basigina se amplificó por PCR a partir de un cDNA de células HeLa (fig. 7b). El producto de PCR de basigina tuvo un tamaño de 807 pb, la cual contenía una secuencia complementaria a la secuencia del vector pGH19 donde se insertaría. De manera paralela, se amplificó por PCR el vector pGH19 (fig. 7a) con un tamaño de 3025 pb, donde el producto contenía una secuencia complementaria al gen (fig. 7c). Posteriormente, se transformaron bacterias *E. coli* DH5α o XL1 Blue con ambos productos de PCR en donde ambos productos se ligaron por homología en los extremos de las secuencias. Posteriormente, el plásmido se purificó y se linearizó con la enzima *NheI*. El tamaño de 3832 bp corresponde a la suma de los tamaños del plásmido pGH19 y al de la basigina (fig. 7c). Después, se adicionó la etiqueta HA por mutagénesis sitio dirigida en el extremo 3' del gen de la basigina, se transformaron bacterias *E. coli* DH5α o XL1 Blue y con esta construcción, el plásmido se purificó, se corroboró el tamaño de 3865 pb y la inserción de la etiqueta HA se verificó por secuenciación (fig. 7d).



d



Figura 7. Clonación de Basigina variante 2 por “ensamble *in vivo*”. a) Gel de agarosa 1% con producto de PCR del plásmido pGH19. b) Producto de PCR de basigina variante 2 en gel de agarosa 1%. c) Gel de agarosa 1% con plásmido pGH19-Bsg purificado después de

“ensamble *in vivo*” y linearizado con *NheI*. d) Secuencia de Basigina+pGH19 mostrando la inserción etiqueta HA y codón de paro (visualizado con Snappgene viewer).

Al alinear la secuencia del gen de la basigina clonada en pGH19 con la enzima *NheI* observamos cuatro cambios; C¹⁹⁵_T, C²³⁴_G, T⁵³⁴_C y A⁶⁹⁹_G (fig. 8a). Se buscó en la base de datos de polimorfismos de nucleótido único en NCBI (dbSNP, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) y se corroboró que las variaciones de secuencia obtenidas en el gen de la basigina proveniente del cDNA de células HeLa son polimorfismos de este gen y no fueron ocasionadas por la clonación. Al traducir la secuencia de nucleótidos para identificar las posibles modificaciones en la secuencia primaria de la proteína, pudimos observar que de los cuatro SNPs presentes, tres son silenciosos y uno es no sinónimo. Este último ocasionando el cambio de aminoácido de Glutamina²³³ por Arginina²³³ (fig. 8b).

Para tener la basigina con la misma secuencia primaria que es utilizada en el artículo de Rusu et al., 2017, se modificó la adenina⁶⁹⁹ por una guanina mediante mutagénesis sitio dirigida.

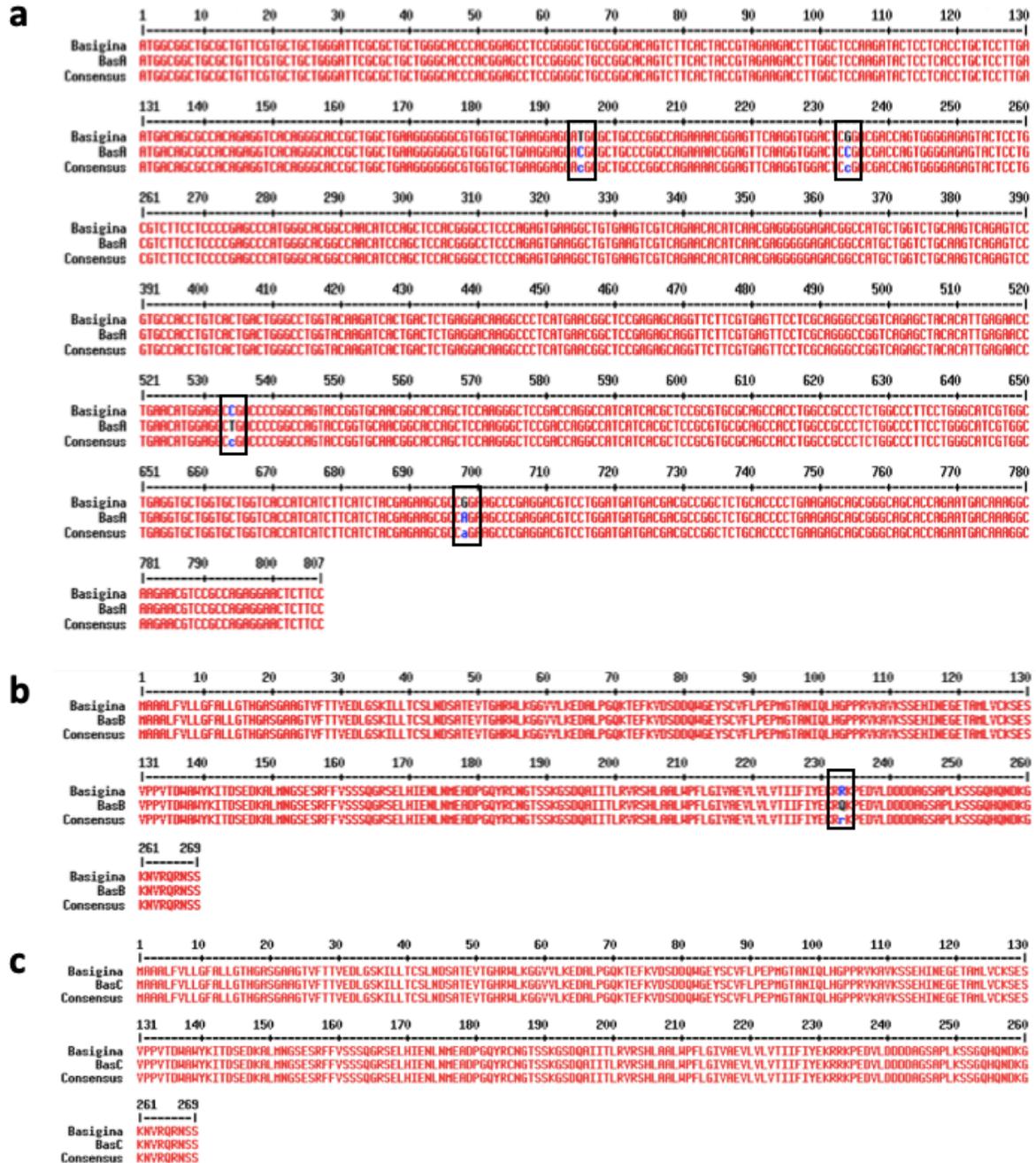


Figura 8. Modificación del SNP no sinónimo de la basigina obtenida de células HeLa. a) Alineamiento de secuencias de nucleótidos de basigina humana variante 2 (CD147) y de la basigina obtenida a partir de células HeLa, señalando los cuatro SNPs (visualizado con multalin, Multiple sequence alignment by Florence Corpet). b) Alineamiento de secuencias de aminoácidos de la basigina humana variante 2 (CD147) y basigina de células HeLa señalado el cambio de aminoácido ocasionado por el SNP no sinónimo (visualizado con multalin, Multiple sequence alignment by Florence Corpet). c) Alineamiento de secuencias de aminoácidos de la basigina humana variante 2 (CD147) y corrección en la secuencia de basigina de células HeLa (visualizado con multalin, Multiple sequence alignment by Florence Corpet).

6.2. Síntesis de cRNA por transcripción *in vitro*

Posteriormente, se sintetizó cRNA del transportador SLC16A11, SLC16A11^{DT2} y de la basigina variante 2 por transcripción *in vitro*. Para esto, linearizamos los plásmidos pGH19-SLC16A11, pGH19-SLC16A11^{DT2} y pHG19-Basigina con la enzima *NheI*. Posteriormente, utilizamos el kit T7 RNA polimerasa mMMESSAGE mMACHINE (Ambion). Después, se verificó el tamaño y su integridad de cada cRNA a través de un gel de agarosa-formaldehído al 1% (fig. 9).

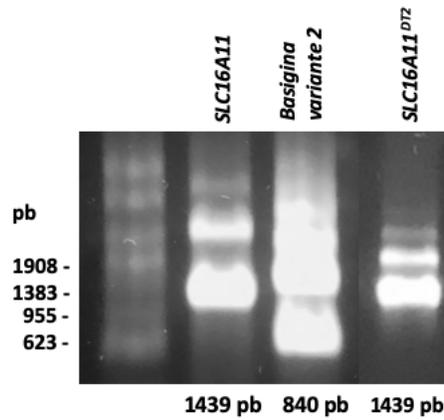


Figura 9. cRNA de SLC16A11, SLC16A11^{DT2} y basigina. Geles de agarosa-formaldehído al 1% mostrando el tamaño e integridad de los cRNAs sintetizados.

6.3. Expresión de SLC16A11 y SLC16A11^{DT2} en ovocitos de *Xenopus laevis*

La expresión del transportador SLC16A11, del SLC16A11^{DT2} y de la basigina variante 2 se verificó por inmunoblot utilizando anticuerpos anti-FLAG (en el caso de los transportadores) y anti-HA (para la basigina). Se utilizaron en cada experimento controles negativos como agua y basigina.

Inicialmente, con el objetivo de estandarizar la cantidad de cRNA del transportador necesaria para obtener una máxima expresión SLC16A11, se inyectaron grupos de ovocitos con cRNA de SLC16A11 con 20, 40, 80 y 100 ng, y se incubaron durante 72 h a 16°C. Posteriormente, la expresión del transportador se verificó por inmunoblot. Los resultados del inmunoblot muestran dos bandas, de las cuales una pertenece al tamaño esperado de la proteína de SLC16A11 con un peso de 47.6 kDa y otra con un peso de 70 kDa aproximadamente (fig. 10). Como se observa en

la figura 10 la banda de 47.6 kDa en la concentración de 20 ng es muy similar a las demás bandas de las concentraciones utilizadas, por lo tanto, consideramos a esta concentración como óptima para observar expresión del transportador en los ovocitos.

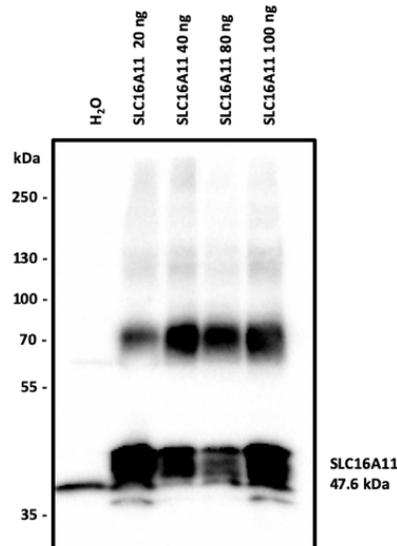


Figura 10. Optimización de la expresión del transportador SLC16A11. Western Blot de extractos de ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con diferentes cantidades de cRNA e incubados a 16°C por 72 h. La expresión se verificó incubando con un anticuerpo anti-FLAG. La banda señalada de 47.6 kDa corresponde al tamaño de la proteína de SLC16A11 y la segunda banda no identificada es de un peso de 70 kDa aproximadamente.

Posteriormente, realizamos la co-inyección de SLC16A11 (20 ng de cRNA) con 20, 40 y 80 ng de la chaperona basigina, y los ovocitos se incubaron a 16°C por 72 h.

La expresión de basigina fue mayor cuando se inyectaron 20 ng de cRNA (fig. 11a) y la expresión del transportador SLC16A11 no se modificó con la co-inyección con basigina (fig. 11b). Por lo tanto, las cantidades óptimas de cRNA de SLC16A11 y basigina que elegimos fueron de 20 ng, respectivamente.

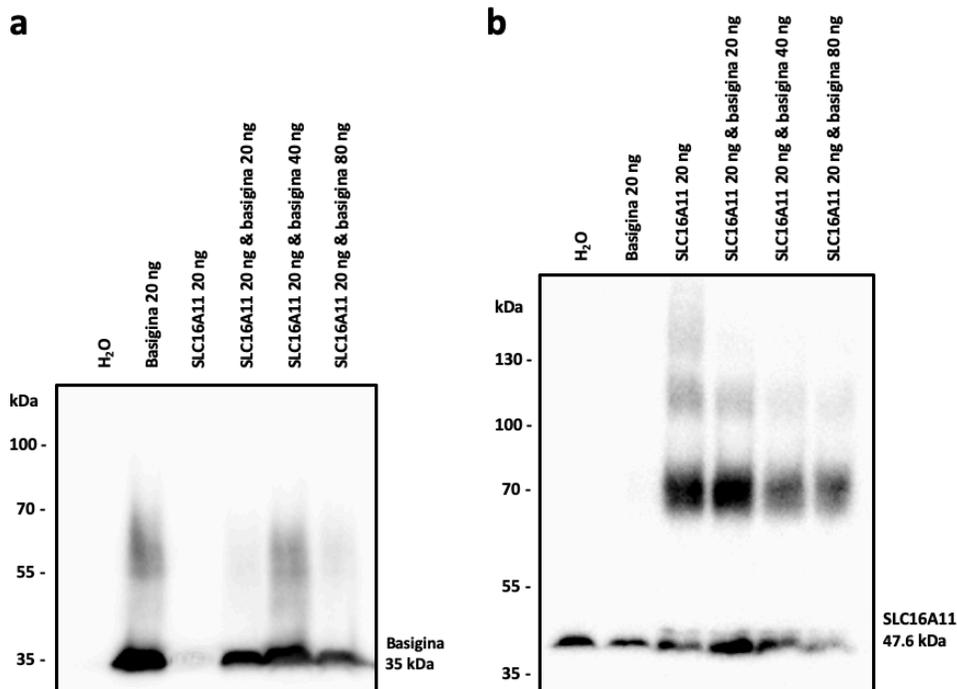


Figura 11. Optimización de la expresión de la basigina sola y co-inyectada con SLC16A11. *Western Blot* mostrando la expresión de la basigina al inyectar diferentes concentraciones de cRNA (a) y co-inyectada con el transportador SLC16A11 (b) en ovocitos de *Xenopus laevis* incubados a 16°C por 72 h. La basigina se identificó utilizando un anticuerpo anti-HA (figura a) y el SLC16A11 con un anticuerpo anti-FLAG (figura b).

Por otro lado, con el fin de estandarizar el tiempo de incubación óptimo de la expresión del transportador SLC16A11 en presencia y ausencia de basigina, se inyectaron ovocitos con 20 ng de cRNA de *SLC16A11* solo o co-inyectado con 20 ng de basigina y se incubaron durante 24, 48, 72 y 96 h. Posteriormente, la expresión de ambas proteínas se verificó por inmunoblot.

La expresión del SLC16A11 (2 bandas) se observó desde las 24 horas de incubación, sin embargo, se observó una mayor expresión a las 72 h (fig. 12). Como se observó previamente, no hubo una diferencia en la expresión de SLC16A11 entre los grupos inyectados con *SLC16A11* solo o co-inyectados con basigina (fig. 12).

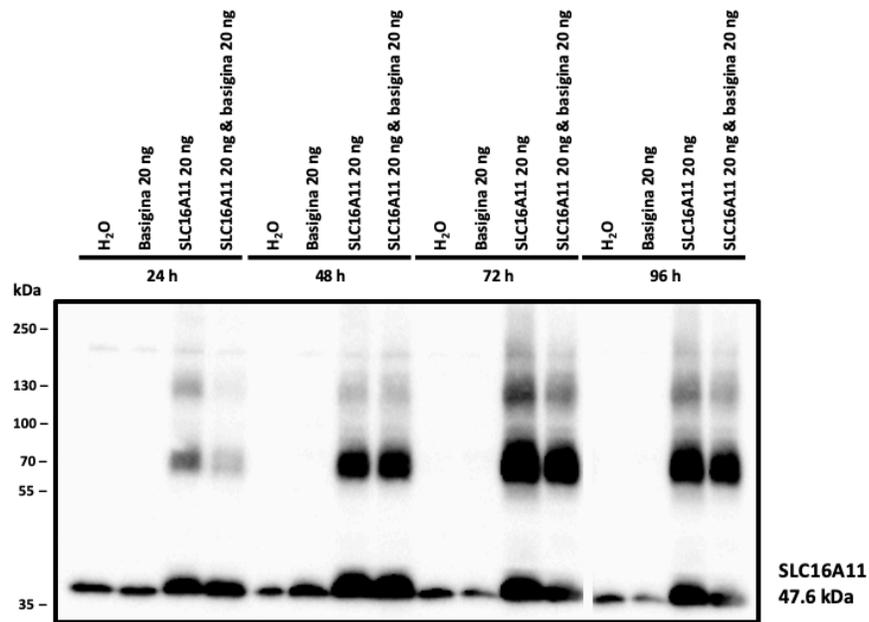


Figura 12. Optimización del tiempo de incubación para la expresión de SLC16A11. Western Blot de curso temporal de expresión del transportador SLC16A11 y de la co-inyección con la basigina variante 2 en ovocitos de *Xenopus laevis* (concentración de 20 ng incubados a 16°C).

Posteriormente, se corroboró la presencia del transportador en la membrana plasmática del ovocito mediante la biotilación de proteínas de membrana. Se inyectaron ovocitos con 20 ng de cRNA de *SLC16A11* con y sin 20 ng de cRNA de basigina y se incubaron a 16°C durante 72 h. Las proteínas presentes en la membrana de los ovocitos se biotinilaron, los ovocitos se lisaron y las proteínas biotiniladas se separaron utilizando estreptavidina y se verificó la expresión del transportador por inmunoblot. El transportador SLC16A11 se encontraba presente en los extractos totales de ovocitos biotinilados (fig. 13a) y en la fracción purificada con estreptavidina (fig. 13b), confirmando la presencia del transportador SLC16A11 en membrana plasmática del ovocito.

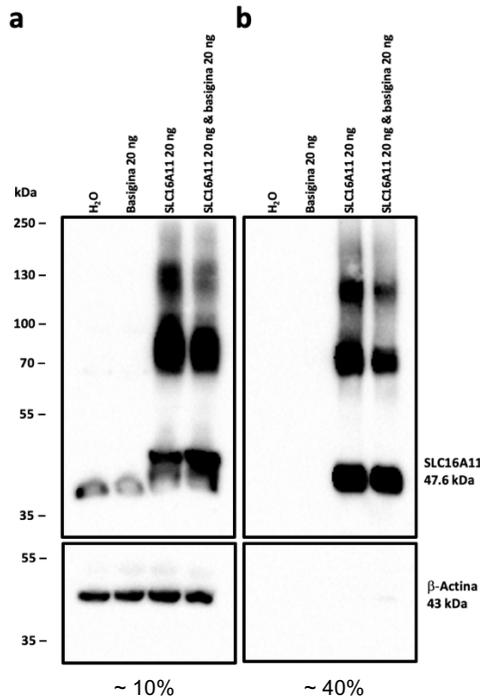


Figura 13. Expresión del transportador SLC16A11 en la membrana plasmática. *Western Blot* de SLC16A11-FLAG localizado en la membrana plasmática de los ovocitos. a) Extracto de ovocitos biotinilados. b) Extracto biotinilado más estreptavidina.

Con el objetivo de verificar si las dos bandas que se observaban en los inmunoblots cuando se expresaba el transportador SLC16A11 correspondían a esta proteína, se realizó una inmunoprecipitación (IP) con perlas de agarosa acopladas al anticuerpo anti-FLAG, utilizando extractos de ovocitos inyectados con 20 ng de cRNA de *SLC16A11* y co-inyectados con 20 y 40 ng de cRNA de basigina e incubados durante 72 h a 16°C. En la fig. 14a se muestra el extracto de los ovocitos previo a la inmunoprecipitación, donde se observan las dos bandas de expresión características del SLC16A11. En la fig. 14b se muestra el resultado de la inmunoprecipitación con las perlas de agarosa con anti-FLAG, donde se corrobora que las dos bandas observadas en el inmunoblot correspondiente a la expresión de SLC16A11 pertenecen al transportador.

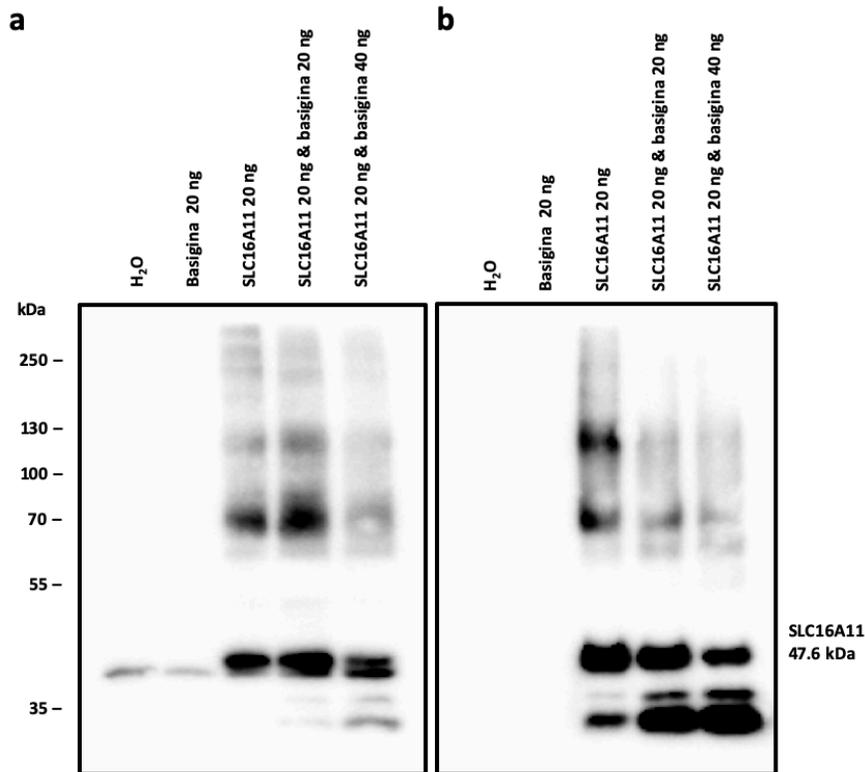


Figura 14. Inmunoprecipitación del transportador SLC16A11. Western Blot de la inmunoprecipitación de SLC16A11-FLAG. a) Extracto total de ovocitos de *Xenopus laevis*. b) Resultado de la inmunoprecipitación revelado con el anticuerpo anti-FLAG.

Posteriormente, inyectamos ovocitos con 20 ng del cRNA de la variante SLC16A11^{DT2} con y sin la presencia de la chaperona basigina. Estos ovocitos se incubaron a 16°C durante 72 h y su expresión se verificó por inmunoblot. Bajo estas condiciones, la variante SLC16A11^{DT2} tiene una menor expresión con respecto al SLC16A11 (fig. 15).

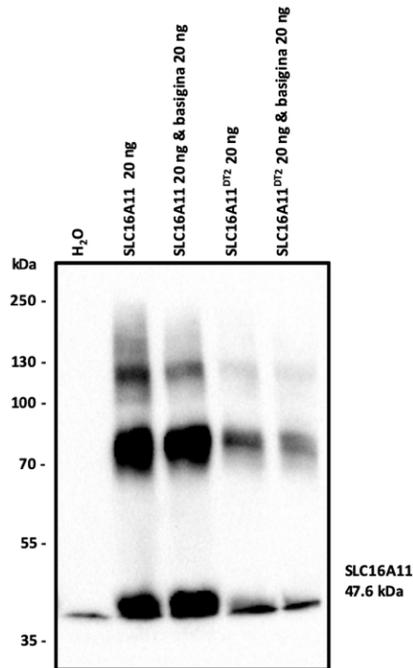


Figura 15. Expresión de la variante SLC16A11^{DT2} comparado con la expresión del transportador SLC16A11 en ovocitos de *Xenopus laevis*. Western Blot de expresión del transportador SLC16A11^{DT2} y de la co-inyección con la basigina variante 2 en ovocitos de *Xenopus laevis* (concentración de 20 ng incubados a 16°C).

Posteriormente, se corroboró la presencia de transportador SLC16A11^{DT2} en la membrana plasmática del ovocito, de la misma manera que el transportador SLC16A11. Se utilizaron ovocitos inyectados con 20 ng de cRNA de *SLC16A11* y de *SLC16A11^{DT2}* con y sin 20 ng de cRNA de basigina y se incubaron a 16°C durante 72 h. El transportador SLC16A11^{DT2} igual que el SLC16A11 se encontraba presente en los extractos totales de ovocitos biotinilados (fig. 16a), y confirmamos la presencia del SLC16A11^{DT2} en la fracción purificada con estreptavidina (fig. 16b), sin embargo, la cantidad de proteína era menor lo que nos indica una menor localización en membrana plasmática.

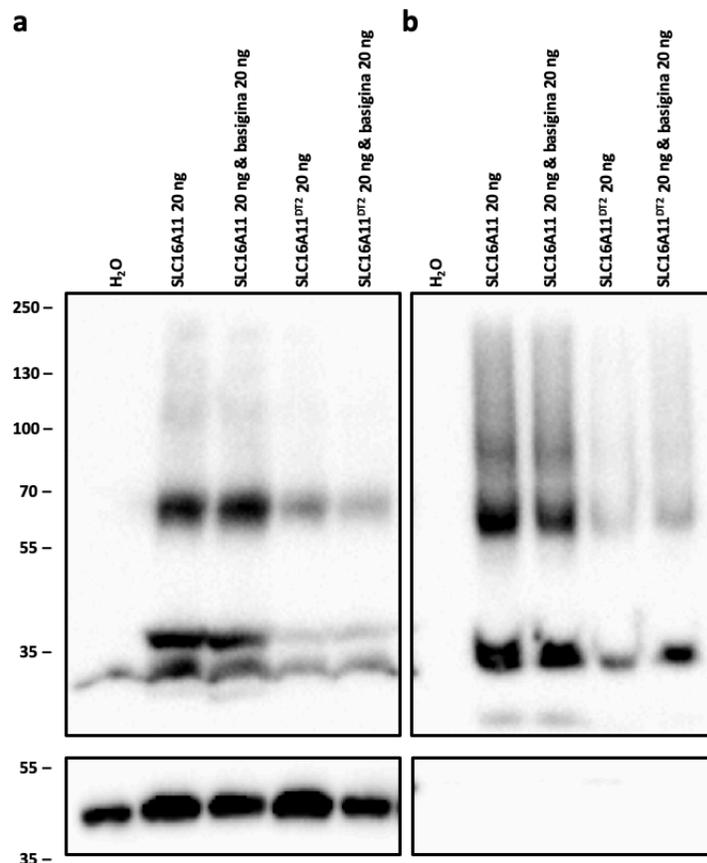


Figura 16. Expresión del transportador SLC16A11^{DT2} en la membrana plasmática comparado con SLC16A11. Western Blot de SLC16A11^{DT2}-FLAG y SLC16A11-FLAG localizado en la membrana plasmática de los ovocitos. a) Extracto de ovocitos biotinilados. b) Extracto biotinilado más estreptavidina.

6.4. Ensayos de actividad para la identificación del sustrato primario del transportador SLC16A11

6.4.1. Ensayos de captación con isótopos radiactivos

Estudios previos han reportado que el SLC16A11 puede transportar piruvato (Rusu et al., 2017; Velentzas et al., 2018). Por lo anterior, se llevaron a cabo dos ensayos de captación de ¹⁴C₁Piruvato. En el primer ensayo se incubaron cuatro grupos de ovocitos previamente inyectados con: Agua, SLC16A11, basigina más SLC16A11, en un medio isotónico ND96 a pH 7.4, con 1 y 10 mM de piruvato no radioactivo y 0.5 μCi/mL de ¹⁴C₁Piruvato durante 1 y 2 h. En todas las condiciones de (1 y 10 mM de Piruvato; 1 y 2 horas de incubación), el grupo de ovocitos

inyectados con *SLC16A11* no transportó $^{14}\text{C}_1$ -Piruvato, ya que la cantidad de piruvato marcado en el interior del ovocito fue similar al de los controles negativos (agua y basigina) (fig 17). Por otro lado, en el grupo de ovocitos que fueron inyectados con *SLC16A11* más basigina en todas las condiciones que se probaron la captación de piruvato fue menor, comparado con los otros grupos (fig. 17), observando un posible efecto de la basigina en los ovocitos que esta ocasionando la disminución en el transporte.

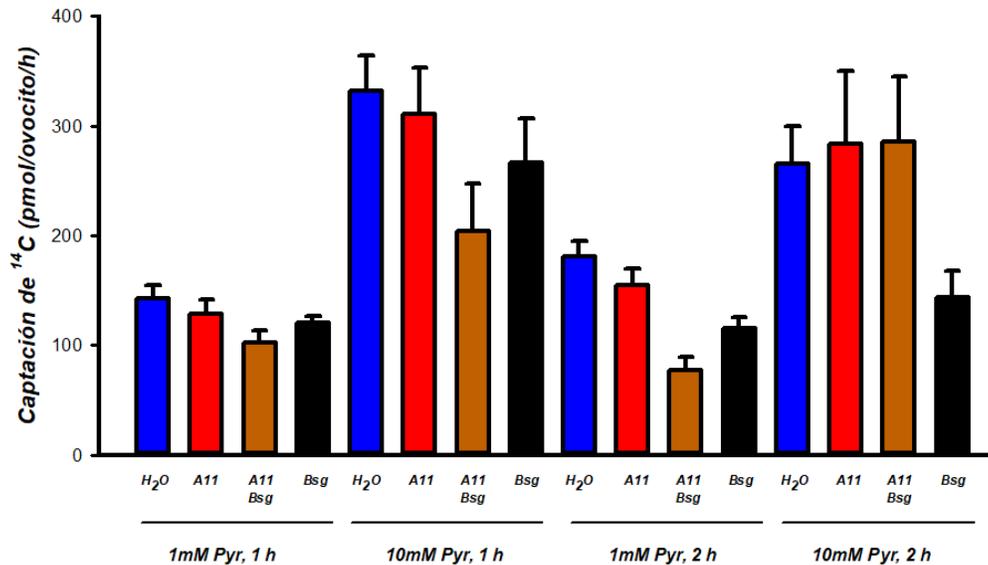


Figura 17. Transporte de $^{14}\text{C}_1$ Piruvato por SLC16A11 expresado en ovocitos de *Xenopus laevis*. Se utilizaron ovocitos inyectados con SLC16A11 y la co-inyección con la basigina variante 2 en concentración de 20 ng incubados a 16°C. Se expusieron a una concentración de 1 y 10 mM de piruvato por 1 y 2 h. Se utilizaron como controles de captación negativa ovocitos inyectados con agua y basigina. A11:SLC16A11 y Bsg: Basigina.

Posteriormente, con el objetivo de descartar que el pH pudiera estar influyendo en el transporte de $^{14}\text{C}_1$ piruvato, en un segundo experimento medimos la captación de $^{14}\text{C}_1$ piruvato a diferentes pHs (5, 5.5, 6 y 7) utilizando 10 mM de piruvato no radioactivo y 0.5 $\mu\text{Ci/mL}$ de $^{14}\text{C}_1$ piruvato, e incubando durante 1 hora. La captación de $^{14}\text{C}_1$ piruvato por SLC16A11 no varió bajo las distintas condiciones de pH y fue similar a los controles negativos (fig. 18), lo que demuestra que el SLC16A11 no transporta piruvato. Por otro lado, el grupo *SLC16A11* más basigina captó menos piruvato que los controles e incluso que el grupo de SLC16A11 en las condiciones de pH de 5.5 y 6 (fig. 18). Sin embargo, esto parece que es un posible efecto de la basigina.

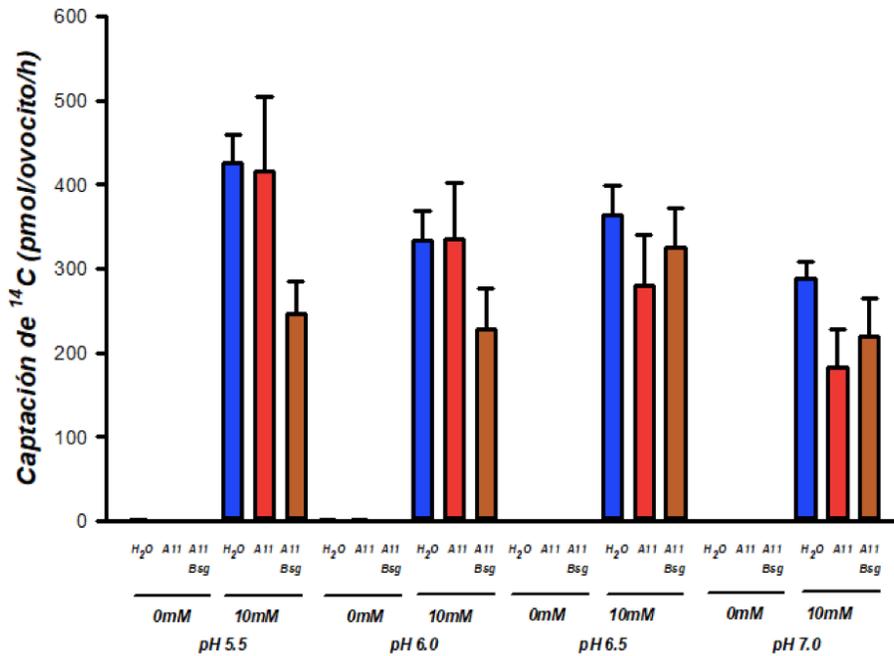


Figura 18. Transporte de ¹⁴C Piruvato por SLC16A11 expresado en ovocitos de *Xenopus laevis* expuesto a diferentes pHs. Se utilizaron ovocitos inyectados con SLC16A11 y la co-inyección con la basigina variante 2 en concentración de 20 ng incubados a 16°C. Se expusieron a una concentración de 0 y 10 mM de piruvato por 1 h en una solución de ND96 pH: 5.5., 6, 6.5 y 7. Se utilizaron como controles de captación negativa ovocitos inyectados con agua y basigina. A11:SLC16A11 y Bsg: Basigina.

Posteriormente, considerando que cambios en la expresión en este transportador en cultivos de hepatocitos primarios humanos y en células HeLa ocasionan alteraciones específicamente en el metabolismo de ácidos grasos y lípidos (Williams et al., 2014, Rusu et al., 2017), probamos si el SLC16A11 podía transportar palmitato. Para esto, se incubaron cuatro grupos de ovocitos previamente inyectados con agua, *SLC16A11*, basigina o *SLC16A11* más basigina en ND96 a pH 7.4 con: 0.01, 0.05 y 1 mM de Palmitato no radioactivo y 0.5 μ Ci de ¹⁴C₁Palmitato durante 1 h.

Como se observa en la fig. 19 la captación de ¹⁴C₁palmitato por el grupo de ovocitos inyectados con *SLC16A11* fue similar a los grupos controles (agua y basigina). Esto se observó en todas las concentraciones de ¹⁴C₁ que se utilizaron. Al igual que lo observado con piruvato, en el caso de 0.1 mM de ¹⁴C₁palmitato, el grupo de ovocitos de SLC16A11 más basigina captó menos de este ácido graso

comparado con los demás grupos, probablemente por un efecto asociado con la basigina.

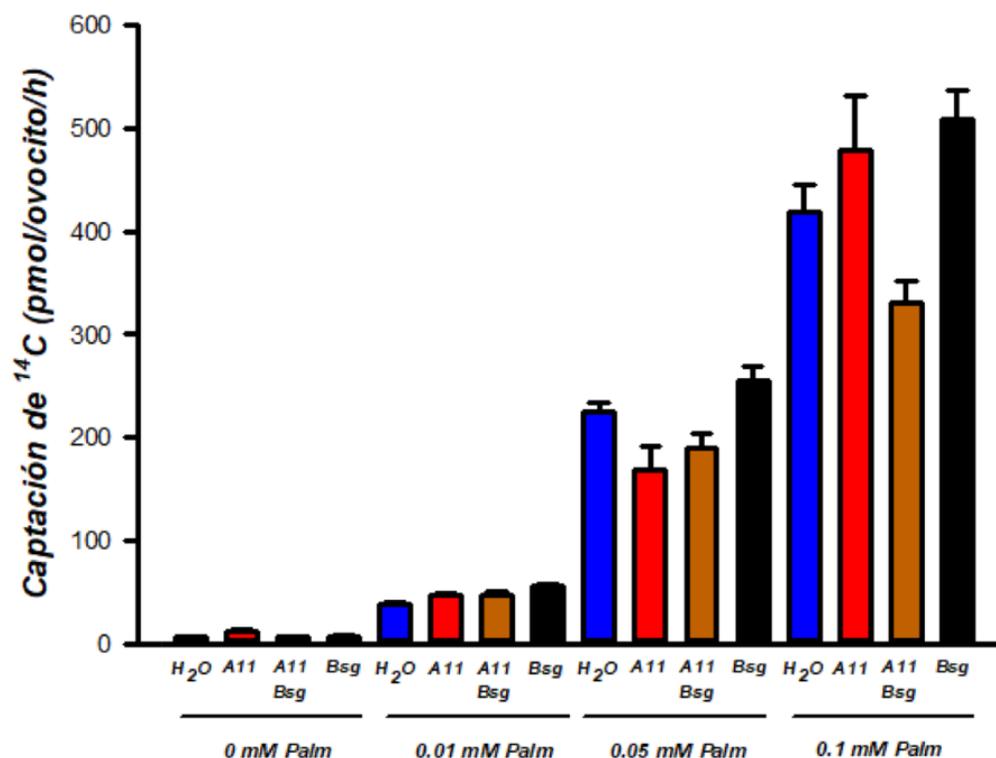


Figura 19. Transporte de ¹⁴C₁-palmitato por SLC16A11 expresado en ovocitos de *Xenopus laevis*. Se utilizaron ovocitos inyectados con SLC16A11 y la co-inyección con la basigina variante 2 en concentración de 20 ng incubados a 16°C. Se expusieron a una concentración de 0.01, 0.05 y 0.1 mM de piruvato por 1 h en una solución de ND96. Se utilizaron como controles de captación negativa ovocitos inyectados con agua y basigina. A11:SLC16A11 y Bsg: Basigina.

6.4.2. Ensayos de transporte con aminoácidos

Considerando que en un análisis de filogenia de la familia SLC16 (Halestrap, 2013), el transportador SLC16A11 es cercano al SLC16A10, quien transporta fenilalanina (Phe) (Kim et al., 2001), decidimos probar si SLC16A11 podía transportar este aminoácido. Por otro lado, considerando la hipótesis de que este transportador podría estar involucrado en el metabolismo de lípidos, decidimos probar si los aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs; leucina, isoleucina y valina) podrían ser sustrato del SLC16A11. Esto debido a que algunos de los intermediarios de la vía de degradación de BCAAs están relacionados con el metabolismo de lípidos (Gannon et

al., 2018) y se acumulan en sangre de personas con obesidad y resistencia a la insulina (Jang et al., 2016).

Para determinar la actividad de SLC16A11 con Phe o Ile, los ovocitos inyectados con agua, basigina, *SLC16A11* y *SLC16A11* más basigina se incubaron en medio ND96 con 1mM y 10 mM de cada aminoácido y se tomaron muestras (tres ovocitos) a diferentes tiempos: 0, 15, 30, 45 y 60 min. Posteriormente, se hizo el extracto y se cuantificó la cantidad del aminoácido de interés derivatizándolos con OPA, separándolos por HPLC y detectándolos por fluorescencia.

La fig. 20 es un cromatograma que ilustra el perfil de aminoácidos obtenido en el Sistema binario de Agilent 1100 HPLC, donde se compara el perfil de aminoácidos de dos muestras de ovocitos (una sin la adición de Phe y otra adicionada con el aminoácido) y la detección del STD norvalina y del aminoácido en estudio.

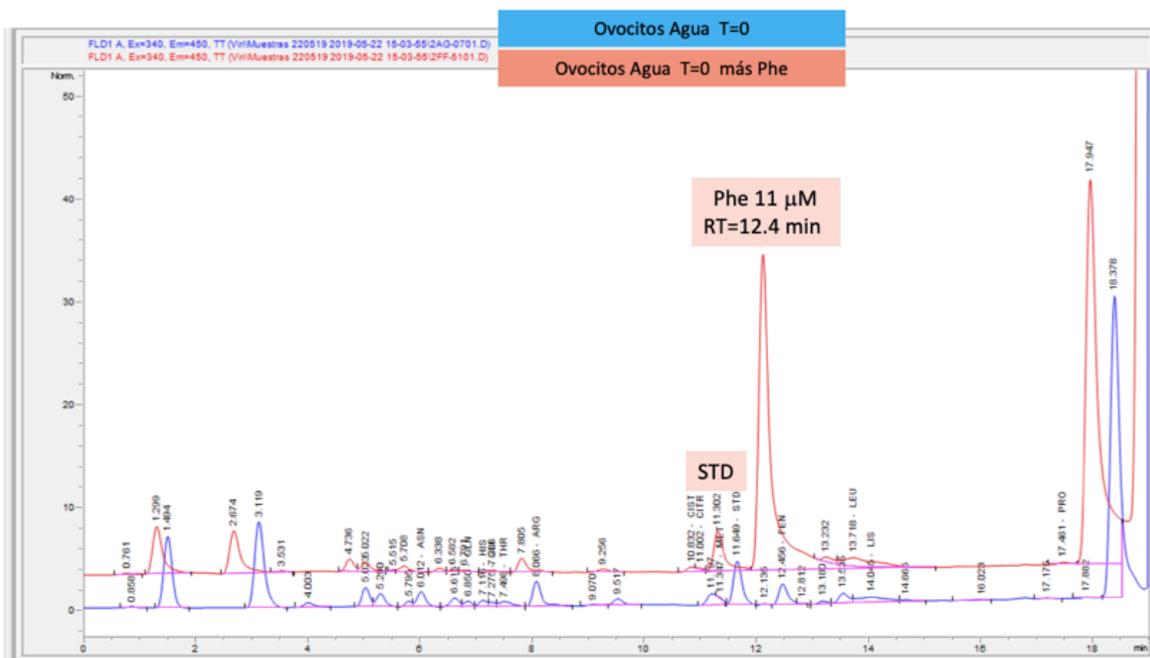


Figura 20. Cromatograma mostrando la detección de aminoácidos y del estándar (STD) presentes en muestras de ovocitos de *Xenopus laevis*. El perfil de aminoácidos de color azul es una muestra de ovocitos control (agua) al tiempo cero y el perfil naranja es una muestra de ovocitos control adicionada con una concentración de 11 μM de Phe.

Durante el curso temporal del transporte de Ile y Phe pudimos observar un aumento en la concentración de Ile y Phe en las muestras de ovocitos donde se

expresó el transportador SLC16A11, tomadas a los 15 min con 1 y 10 mM de los aminoácidos (fig. 21a y b). Después, la concentración de aminoácido disminuyó hasta una concentración similar a la de los ovocitos inyectados con agua.

Con base en estos resultados, decidimos determinar el transporte de Phe antes de los 15 min. Se tomaron muestras cada 5 min durante 15 min utilizando solo 10 mM de Phe (fig. 21c) y observamos que desde el tiempo 0 comienza el transporte de Phe, a los 5 min el transporte aumenta hasta llegar a su máximo a los 10 min, y después en el tiempo 15 el transporte empieza a disminuir. Con estos resultados preliminares sugerimos que el SLC16A11 es capaz de transportar Phe.

Considerando los resultados preliminares que habíamos observado con Ile, decidimos hacer un experimento de transporte utilizando Leu, quien es el BCAA más estudiado debido a que estimula a mTOR que induce síntesis de proteína (Anthony et al., 2001), además de que ha sido reconocida como un estimulador de tejido celular y biogénesis mitocondrial en tejidos como el adiposo (Gannon & Vaughan, 2015). Se llevo a cabo, el experimento de transporte durante 15 min con el aminoácido ramificado Leu a 10 mM (fig. 22d), observando posible transporte desde el tiempo 0, a los 5 min incrementa el transporte hasta llegar a su máximo a los 10 minutos, un comportamiento similar al transporte de Phe.

Después, medimos las pendientes de la parte lineal de los ensayos de 15 minutos de Phe y Leu para poder comparar entre grupos al obtener un valor de velocidad a partir de la pendiente. Como se observa en la tabla 10, en las concentraciones 1 y 10 mM de Leu se observa transporte, sin embargo, es mayor este a 10 mM y también en comparación con el aminoácido Phe a la concentración de 10 mM, indicando que el transportador tiene mayor afinidad por Leu que por Phe.

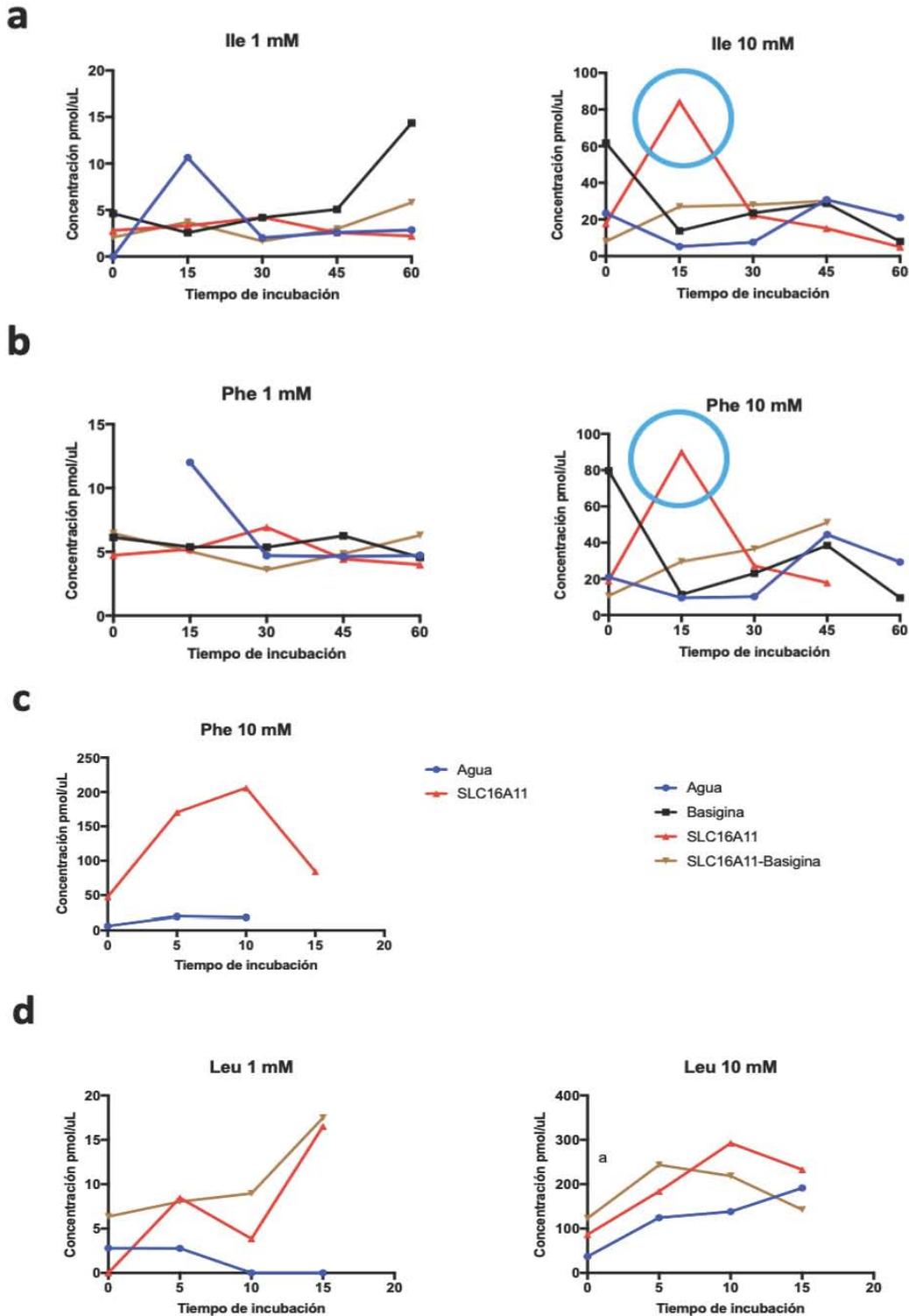


Figura 21. Transporte de aminoácidos mediado por SLC16A11 en ovocitos de *Xenopus laevis*. a) Transporte de Isoleucina (Ile) 1 y 10 mM de 0 a 60 min. b) Transporte de Fenilalanina (Phe) 1 y 10 mM de 0 a 60 min. c) Transporte de Fenilalanina (Phe) 10 mM de 0 a 15 min. d) Transporte de Leucina (Leu) 1 y 10 mM de 0 a 15 min. Azul: Agua, Negro: Basigina, Rojo: SLC16A11 y Café: SLC16A11 más basigina.

Tabla 10. Valores de velocidad obtenidos por la pendiente al linearizar el transporte de los aminoácidos Phe e Leu.

Gráfico	Aminoácido	Concentración	Velocidad de transporte pmol/ μ L * min (m)
c	Phe	10 mM	15.844
d	Leu	1 mM	2.53
d	Leu	10 mM	20.61

6.4.3. Ensayos de Termoestabilidad

Con el objetivo de buscar nuevas alternativas de transporte más económicas para identificar el sustrato de SLC16A11, utilizamos el método “*Thermal Shift Assay*” (Hashimoto et al., 2018). Para estandarizar la técnica, utilizamos como sustrato del SLC16A11 al piruvato, el cual ha sido propuesto como posible ligando del transportador (Rusu et al., 2017). El ensayo se realizó en ovocitos intactos y en lisados de ovocitos. Para esto, se incubaron cuatro grupos de ovocitos: agua, SLC16A11 y SLC16A11 más basigina (incubados a 16°C por 72 h) con 10mM de piruvato en hielo durante 30 min y posteriormente se calentaron a diferentes temperaturas: 45, 55, 65, 75 y 85°C. La muestra se centrifugó para descartar a la proteína desnaturalizada y se verificó la presencia del SLC16A11 en el sobrenadante por inmunoblot.

Nuestros resultados muestran que, en ovocitos intactos incubados con piruvato y calentados a 45°C, el transportador SLC16A11 tiene una termoestabilidad similar en presencia o ausencia del sustrato (fig. 22a). En el caso de los lisados de ovocitos inyectados con SLC16A11 y posteriormente incubados con piruvato, la presencia del sustrato le confirió un ligero aumento en la termoestabilidad a 45°C (fig. 22b).

Por otro lado, en los ovocitos inyectados con SLC16A11 más basigina, la presencia del piruvato le confirió una mayor termoestabilidad a 45°C. Esto se observó tanto los ovocitos intactos como los lisados (fig. 22).

En las temperaturas restantes que se utilizaron, no se observó la presencia del transportador por inmunoblot.

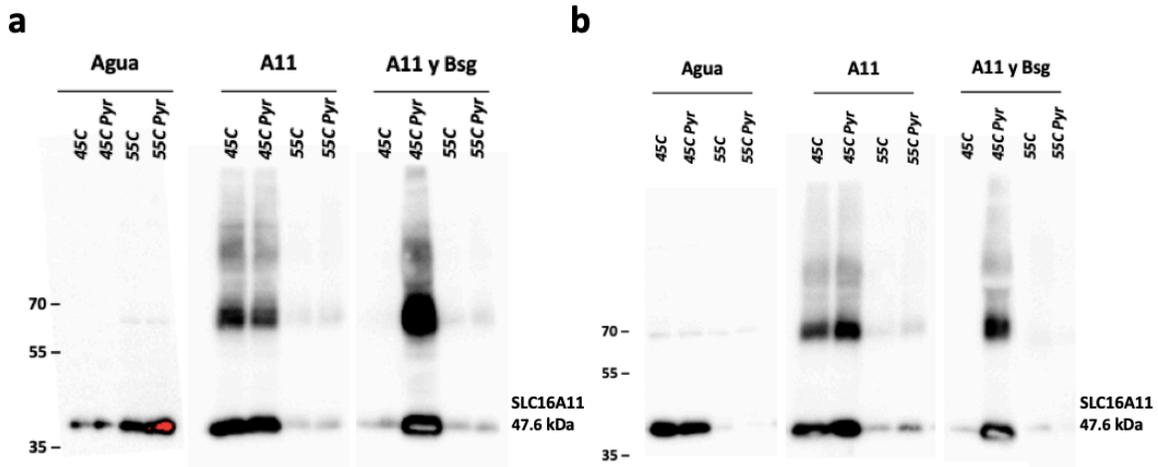


Figura 22. Ensayos de termoestabilidad del SLC16A11 y SLC16A11 más basigina con piruvato. Efecto de la termoestabilidad después del calentamiento a 45 y 55°C, en ovocitos inyectados con SLC16A11 y la co-inyección con la basigina variante 2 en concentración de 20 ng incubados a 16°C. a) Ovocitos intactos b) lisados de ovocitos. Se expusieron a una concentración de 10 mM de piruvato por 30 min en una solución de ND96. A11:SLC16A11 y Bsg: Basigina.

7. Discusión

A pesar de la importancia del gen SLC16A11 como factor de riesgo para el desarrollo de DT2, su función no ha sido completamente dilucidada. Estudios previos han demostrado que el SLC16A11 está estrechamente relacionado con el metabolismo de lípidos y el desarrollo de resistencia a la insulina. Por lo tanto, la búsqueda y caracterización de este transportador con sus sustratos fisiológicos es de gran relevancia ya que contribuirá al entendimiento de la función de éste, así como el papel de sus variantes de riesgo en la DT2.

Para poder caracterizar al transportador SLC16A11 decidimos utilizar como modelo de expresión a los ovocitos de *Xenopus laevis* debido a que es un sistema muy útil para expresar proteínas de membrana, ya que los ovocitos, al no depender de nutrientes exógenos, no contienen muchos transportadores en su membrana plasmática en comparación de un modelo celular que cuenta con más proteínas de membrana que dificultarían la expresión (Wagner et al, 2000; Markovich, 2007). Debido a su tamaño (1-1.2 mm de diámetro), son de fácil manejo y se puede tener un control del medio en el que se encuentran (Markovich, 2007). Además, es un modelo de estudio que ha sido utilizado para caracterizar varios de los transportadores de la familia SLC16 (Bröer et al., 1999; Halestrap & Price, 1999; Halestrap & Meredith, 2004; Hugo et al., 2012; Halestrap, 2013), lo que hizo pensar que la expresión de este transportador (SLC16A11) en este sistema es viable.

Lo primero que realizamos fue optimizar las condiciones a las cuales obtendríamos una mayor expresión del SLC16A11. Para esto, inyectamos diferentes concentraciones de cRNA de *SLC16A11* y realizamos cursos temporales de la expresión del transportador en los que obtuvimos que las mejores condiciones para sobre expresar al transportador SLC16A11 fueron inyectar 20 ng del cRNA e incubar a los ovocitos inyectados durante 72 h a 16°C. Para proteínas que son eficientemente traducidas utilizando el modelo de ovocitos, se inyecta de 1-5 ng de cRNA para obtener una alta expresión. Sin embargo, algunas proteínas necesitan hasta 50 ng de cRNA por ovocito (Wagner et al., 2000). Las condiciones obtenidas en este trabajo son similares a las que se utilizan. En el caso de la expresión de los

transportadores MCT1 (SLC16A1) y MCT2 (SLC16A7), se inyectaron 5 ng de cRNA del transportador (Bröer et al., 1999) y por último el MCT4 (SLC16A3) necesita 15 ng (Dimmer et al. 2000). Por lo tanto, la cantidad de cRNA de *SLC16A11* inyectada para expresar al transportador, se encuentra dentro del rango comúnmente utilizado.

Por otro lado, también decidimos co-inyectar al transportador SLC16A11 con su chaperona basigina. Esto debido a que estudios previos han demostrado la interacción de la chaperona con el transportador para la localización en membrana plasmática (Rusu et al., 2017). Aunque, los ovocitos presentan basigina endógena (Ovens et al., 2010), nosotros quisimos observar el efecto al sobre expresar a esta proteína en presencia del transportador. Pudimos observar que la expresión del transportador SLC16A11 era similar cuando co-inyectábamos con diferentes concentraciones de basigina. Por lo tanto, para experimentos posteriores decidimos realizar las co-inyecciones con 20 ng de cRNA de basigina e incubar a 16°C durante 72 h.

Al expresar a la variante de SLC16A11 con el haplotipo de riesgo con y sin basigina pudimos observar que este transportador se expresa menos en comparación con el transportador de referencia (SLC16A11), lo cual concuerda con lo observado previamente cuando se expresa esta variante en células HEK293T (Rusu et al., 2017). Muy probablemente la presencia de los SNPs esté modificando sitios de plegamiento de la proteína, unión a sustrato o anclaje a la membrana, y/o pueden afectar ciertas características importantes de las proteínas (p.e: plegamiento, punto de fusión, ionización) (Ramírez et al., 2013). Debido a lo antes mencionado tendremos que optimizar la cantidad de ng inyectados en los ovocitos con el fin de obtener una mayor expresión en membrana del haplotipo (SLC16A11^{DT2}) y así poder hacer determinaciones de medición de actividad.

Estudios previos han demostrado que el transportador SLC16A11 se localiza en la membrana plasmática de la línea celular HEK293T y en la de células de

glándulas salivales de *Drosophila melanogaster* (Rusu et al., 2017; Velentzas et al., 2018). Para corroborar la presencia del transportador SLC16A11 en la membrana plasmática del ovocito de *Xenopus laevis*, se llevó a cabo la biotilación de las proteínas presentes en la membrana de ovocitos inyectados con SLC16A11 y co-inyectados con su chaperona basigina. Pudimos confirmar que el SLC16A11 se está expresando en la membrana plasmática de los ovocitos de *Xenopus laevis* y que la co-inyección de la basigina con el transportador SLC16A11 no incrementó la localización de este en la membrana plasmática. Esto sugiere que probablemente la basigina endógena del ovocito (Ovens et al., 2010) es suficiente para localizar al transportador a la membrana plasmática. También observamos que el haplotipo (SLC16A11^{DT2}) se localiza en menor proporción en la membrana plasmática a diferencia del transportador SLC16A11, efecto previamente visualizado también en la línea celular HEK293T (Rusu et al., 2017).

Por otro lado, los resultados de la inmunoprecipitación muestran que las dos bandas que se observan corresponden al transportador SLC16A11. Una de ellas coincide con el peso esperado del transportador SLC16A11 el cual es de 47.6 kDa y la segunda tiene un peso de alrededor de 70 kDa. Una de las razones por las que se pueden presentar otras bandas de otros tamaños es debido a la presencia de modificaciones post-traduccionales, como son las glicosilaciones que pueden estar involucradas en la maduración, plegamiento adecuado y localización de las proteínas (Deribe et al., 2010). También podría estar afectando la localización de SLC16A11^{DT2}, debido a que los cambios inducidos por los SNPs pueden llegar a afectar la unión de reguladores que son clave para el tráfico de transporte intracelular y su localización hacia la membrana plasmática (Marinko et al., 2019), como es el caso de la chaperona basigina que ayuda a la localización en membrana plasmática (Curtin et al., 2005).

Para poder corroborar que es una glicosilación, se requeriría incubar los extractos de ovocitos con la enzima glicanasa durante 1 h previo a realizar Western Blot. Además, sería conveniente llevar a cabo un análisis por espectrometría de masas para corroborar la identidad del transportador SLC16A11.

Previamente se había reportado que el transportador SLC16A11 puede transportar piruvato, aunque se reconoce que no es el sustrato primario (Rusu et al., 2017; Velentzas et al., 2018). Estos ensayos los realizaron mediante la evaluación del flujo de piruvato a una concentración de 0.4 mM por Pyronic, y de protones por BCECF-AM en células HEK293T que expresan SLC16A11, y pudieron observar un transporte muy pequeño. Nuestros ensayos de transporte de piruvato se realizaron utilizando ^{14}C -piruvato y pudimos determinar que el transportador SLC16A11 no transporta piruvato. De hecho, en los grupos de la co-inyección de SLC16A11 más basigina se observó menos captación que los grupos basales, siendo esto un posible efecto de la basigina sobre la estructura de la membrana plasmática probablemente, o la interacción transportador-chaperona que impida estructuralmente el transporte.

Debido a esto, decidimos empezar a probar otros sustratos. Como se menciona anteriormente, cambios en la expresión de este transportador en cultivos de hepatocitos primarios humanos y en células HeLa ocasionan cambios específicamente en metabolismo de ácidos grasos y lípidos (Williams et al., 2014, Rusu et al., 2017) y en células HepG2 en presencia del estímulo con estereato de sodio tienden a acumular triglicéridos (Zhao et al., 2019). Por lo tanto, el segundo metabolito que utilizamos fue el palmitato. Sin embargo, los resultados no mostraron transporte de este sustrato y se observa el mismo efecto en el grupo de la co-inyección con basigina que ocasiona una disminución en la captación de palmitato.

Consideramos utilizar fenilalanina como sustrato debido a que previamente en un análisis de filogenia de la familia SLC16 (Halestrap, 2013), el transportador SLC16A11 es cercano al SLC16A10, quien transporta fenilalanina (Phe) (Kim et al., 2001), y observamos que SLC16A11 podría transportar este aminoácido. Se ha reportado en estudios de perfiles de metabolitos, un aumento de Phe en pacientes normoglucémicos seguidos durante 12 años y que desarrollaron diabetes (Wang et al., 2011). Siguiendo la hipótesis de que este transportador podría estar involucrado en el

metabolismo de lípidos, utilizamos aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs) leucina e isoleucina, observando en ensayos preliminares transporte. El aumento de BCAAs en pacientes con diabetes (Wang et al., 2011), generan que aumenten la carga de sustrato en las mitocondrias, disminuyendo la oxidación de los ácidos grasos del músculo esquelético lo que promueve la acumulación de Acil-CoA de cadena corta y mediana que deriva en lipogénesis (Newgard, 2012).

Paralelamente a los ensayos con aminoácidos y con el motivo de buscar nuevas alternativas para identificar los sustratos de SLC16A11, utilizamos el método “Thermal Shift Assay”. Este método se basa en los cambios inducidos por el ligando en la termoestabilidad de las proteínas, y se ha aplicado principalmente a los transportadores de membrana como los SLC (Hashimoto et al., 2018). Utilizamos piruvato debido a que estudios previos ha demostrado que transporta en células HEK293T (Rusu et al., 2017), y pudimos identificar que el piruvato le confiere estabilidad al transportador, sugiriendo que este metabolito se está uniendo y que la presencia de la chaperona basigina junto con el piruvato, le confiere termoestabilidad, al transportador. Sin embargo, no pudimos ver esa unión de piruvato reflejada en actividad. Sabemos que nuestro transportador está activo puesto que vemos actividad con algunos aminoácidos, por lo que sería importante realizar ensayos de “Thermal Shift” con estos sustratos para corroborar que el ensayo está funcionando como método de identificación de sustratos.

8. CONCLUSIONES

-El transportador SLC16A11 expresado en ovocitos de *Xenopus laevis* se localiza en membrana plasmática.

-La variante del transportador de SLC16A11^{DT2} se expresa menos en membrana plasmática de los ovocitos a diferencia del transportador SLC16A11 de referencia.

-El transportador SLC16A11 no transporta piruvato ni palmitato pero en ensayos preliminares presenta actividad de transporte con los aminoácidos fenilalanina y leucina.

9. REFERENCIAS

- Abplanalp J., Laczko E., Philp N.J., Neidhardt J. Zuercher J., Braun P., Schorderet D.F., Munier F.L., Verrey F., Berger W., Camargo S.M. & Kloeckener-Gruissem B. The cataract and glucosuria associated monocarboxylate transporter MCT12 is a new creatine transporter. *Hum Mol Genet.* 2013.
- Aguilar-Salinas C.A., Hernández Jiménez S., Hernández Ávila M. & Hernández Ávila J.E. Acciones para enfrentar a la diabetes. Academia Nacional de Medicina, 2015.
- Almeda-Valdes P., Gómez-Velasco D., Arellano-Campos O., Bello-Chavolla O., Sevilla-González M, Viveros-Ruiz T., Martagón-Rosado A., Bautista C., Muñoz-Hernandez L., Cruz-Bautista I., Moreno-Macias H., Alicia Huerta-Chagoya, Karen Guadalupe Rodríguez-Álvarez , Walford G., Jacobs S., Guillen-Pineda L., Ordoñez-Sánchez M., Roldan-Valadez E., Azpiroz J., Furuzawa-Carballeda J., Clark P., Herrera-Hernández M., Zambrano E., Florez J., Tusié-Luna M., Aguilar-Salinas C. The SLC16A11 risk haplotype is associated with decreased insulin action, higher transaminases and large-size adipocytes *Eur J Endocrinol.* 2019 Feb 1;180(2):99-107.
- American Diabetes Association. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care* 2015 Jan; 38(Supplement 1): S8-S16.
- Anthony, J. C., Anthony, T. G., Kimball, S. R., Jefferson, L. S., Signaling pathways involved in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. *J Nutr* 2001, 131, 856S-860S.
- Barnett A.H., Eff C., Leslie R.D. & Pyke D.A. Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs. *Diabetology* 1981;20(2):87-9
- Bello-Chavolla O.Y., Rojas-Martinez R., Aguilar-Salinas C.A., Hernández-Avila M. Epidemiology of diabetes mellitus in Mexico. *Nutr Rev.* 2017 Jan;75(suppl 1):4-12.
- Bogan J.S. Regulation of glucose transporter translocation in health and diabetes. *Annu Rev Biochem.* 2012;81:507–532.
- Bornfeldt K.E. & Tabas I. Insulin resistance, hyperglycemia, and atherosclerosis. *Cell Metabolism* 2011;14(5):575–585.
- Bosshart P.D., Kalbermatter D., Bonetti S. & Fotiadis D. Mechanistic basis of L-lactate transport in the SLC16 solute carrier family. *Nature Communications* volume 10, 2019. Article number: 2649
- Choi S.M., Tucker D.F., Gross D.N., Easton R.M., DiPilato L.M., Dean A.S., Monks B.R. & Birnbaum M.J. Insulin regulates adipocyte lipolysis via an Akt-independent signaling pathway. *Mol Cell Biol.* 2010;30(21):5009–5020. doi: 10.1128/MCB.00797-10.
- Cruz M., Valladares-Salgado A., García-Mena J., et al. Candidate gene association study conditioning on individual ancestry in patients with type 2 diabetes and metabolic syndrome from Mexico City. *Diabetes Metabolism Research and Reviews.* 2010;26(4):261–270.
- Curtin, K.D., Meinertzhagen, I.A., and Wyman, R.J. (2005). Basigin (EMMPRIN/ CD147) interacts with integrin to affect cellular architecture. *J. Cell Sci.* 118, 2649–2660.
- Del Bosque-Plata L., Aguilar-Salinas C. A., Tusié-Luna M. T., et al. Association of the calpain-10 gene with type 2 diabetes mellitus in a Mexican population. *Molecular Genetics and Metabolism.* 2004;81(2):122–126.
- Deng D., Sun P., Yan C., Ke M., Jiang X., Xiong L., Ren W., Hirata K., Yamamoto M., Fan S. & Yan N. Molecular basis of ligand recognition and transport by glucose transporters. *Nature.* 2015 Oct 15;526(7573):391-6.

- Deribe Y. L., Pawson T. & Dikic I. Post-translational modifications in signal integration. *Nat Struct Mol Biol*, 2010 17, 666-672.
- Dimitriadis G., Mitrou P., Lambadiari V., Maratou E., Raptis S.A. Efectos de la insulina en el músculo y el tejido adiposo. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011; 93: S52-S59.
- Dimmer K.S., Friedrich B., Lang F., Deitmer J.W. & Bröer S. The low-affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells. *Biochem J*. 2000 Aug 15;350 Pt 1:219-27.
- Duncan R.E., Ahmadian M., Jaworski K., Sarkadi-Nagy E. & Sul H.S. Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annu Rev Nutr*. 2007;27:79–101. doi: 10.1146/annurev.nutr.27.061406.093734.
- Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2018. Informe final de Resultados, México, Secretaría de Salud.
- Fletcher B., Gulanick M. & Lamendola C. Risk factors for type 2 diabetes mellitus. *Journal Cardiovascular Nurs*. 2002 Jan;16(2):17-23.
- Florez J. C., Price A. L., Campbell D., Riba L., Parra M. V., Yu F., Duque C., Saxena R., Gallego N., Tello-Ruiz M., Franco L., Rodríguez-Torres M., Villegas A., Bedoya G., Aguilar-Salinas C.A., Tusié-Luna M.T. Ruiz-Linares A., & Reich D. Strong association of socioeconomic status with genetic ancestry in Latinos: implications for admixture studies of type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2009;52:1528–1536.
- Franks P.W., Rolandsson O., Debenham S.L., Fawcett K.A., Payne F., Dina C., Froguel P., Mohlke K.L., Willer C., Olsson T., Wareham N.J., Hallmans G., Barroso I. & Sandhu M.S. Replication of the association between variants in the WFS1 gene and risk of type 2 diabetes in European populations. *Diabetologia*. 2008 Mar; 51(3): 458–463.
- Gamboa-Meléndez M. A., Huerta-Chagoya A., Moreno-Macías H., et al. Contribution of common genetic variation to the risk of type 2 diabetes in the Mexican Mestizo population. *Diabetes*. 2012;61(12):3314–3321.
- García-Chapa E.G., Leal-Ugarte E., Peralta-Leal V., Durán-González J. & Meza-Espinoza J.P. Genetic Epidemiology of Type 2 Diabetes in Mexican Mestizos. *Biomedical Research Int*. 2017; 2017: 3937893.
- García-Nafría J., Watson J.F. & Greger I.H. IVA cloning: A single-tube universal cloning system exploiting bacterial In Vivo Assembly. *Sci Rep*. 2016 Jun 6;6:27459.
- Gannon N.P., Schnuck J.K. & Vaughan R.A. BCAA Metabolism and Insulin Sensitivity - Dysregulated by Metabolic Status? *Mol Nutr Food Res*. 2018 Mar;62(6):e1700756.
- Halestrap, A.P., Price, N.T. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem Journal*, 1999 343, 281–299.
- Halestrap A.P. & Meredith D. The SLC16 gene family—from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* (2004) 447:619–628
- Halestrap, A.P. (2013). The SLC16 gene family - structure, role and regulation in health and disease. *Mol. Aspects Med*. 34, 337–349.
- Harris M.I., Flegal K.M., Cowie C.C., Eberhardt M.S., Goldstein D.E., Little R.R., Wiedmeyer H.M. & Byrd-Holt D.D. Prevalence of diabetes, impaired fasting glucose, and impaired glucose tolerance in U.S. adults. The Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Diabetes Care* 1998;21(4):518-24.

- Hashimoto M., Girardi E., Eichner R. & Superti-Furga G. Detection of Chemical Engagement of Solute Carrier Proteins by a Cellular Thermal Shift Assay. 2018 Jun 15;13(6):1480-1486.
- Hojlund K. Metabolism and insulin signaling in common metabolic disorders and inherited insulin resistance. *Dan Med J.* 2014;61(7):B4890.
- Hugo S., Cruz-Garcia L., Karanth S., Anderson R., Stainier D., Schlegel A. A monocarboxylate transporter required for hepatocyte secretion of ketone bodies during fasting. 2012 1;26(3):282-93.
- Iacono K.T., Brown A.L., Greene M.I., Saouaf S.J. CD147 immunoglobulin superfamily receptor function and role in pathology. 2007 *Exp. Molecular Pathology* 83, 283–295.
- International Diabetes Federation. *IDF diabetes atlas 8th.* Brussels, Belgium: 2017.; pp.1–144.
- Imamura M. & Maeda S. Genética de la diabetes tipo 2: la era GWAS y las perspectivas de futuro (Revisión) *Endocrinology Journal.* 2011; 58 : 723–739.
- Jang, C., Oh, S. F., Wada, S., Rowe, G. C., Liu, L., Chan, M. C., Rhee, J., Hoshino, A., Kim, B., Ibrahim, A., Baca, L. G., Kim, E., Ghosh, C. C., Parikh, S. M., Jiang, A., Chu, Q., Forman, D. E., Lecker, S. H., Krishnaiah, S., Rabinowitz, J. D., Welijie, A. M., Baur, J. A., Kasper, D. L., Arany, Z., A branched-chain amino acid metabolite drives vascular fatty acid transport and causes insulin resistance. *Nat Med* 2016,
- Janus A., Szahidewicz-Krupska E., Mazur G., Doroszko A. Insulin resistance and endothelial dysfunction constitute a common therapeutic target in cardiometabolic disorders. *Mediators Inflamm.* 2016;2016:3634948.
- Jonsdottir, S. S. Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes. *MCN, The American Journal of Maternal/Child Nursing,* 2009, 34(4), 266.
- Kim D., Kanai Y., Chairoungdua A., Matsuo H., Cha S., Endou H. Expression Cloning of a Na-independent Aromatic Amino Acid Transporter with Structural Similarity to H/Monocarboxylate Transporters. *JBC Papers in Press,* February 20, 2001.
- Kim-Garcia C., Goldstein J.L., Pathak R.K., Anderson R.G.W., Brown M.S. Molecular characterization of a membrane transporter for lactate, pyruvate, and other monocarboxylates—implications for the Cori cycle. 1994 *Cell* 76:865–873.
- Kirk P., Wilson M.C., Heddle C., Brown M.H., Barclay A.N. & Halestrap A.P. CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression. 2000 *EMBO J.* 19, 3896–3904.
- Klein B.E., Klein R., Moss S.E. & Cruickshanks K.J. Parental history of diabetes in a populationbased study. *Diabetes Care* 1996;19(8):827-30
- Legrand-Poels S., Esser N., L'homme L. Free fatty acids as modulators of the NLRP3 inflammasome in obesity/type 2 diabetes. *Biochem Pharmacol.* 2014;92:131-41.
- Liman E.R., Tytgat J., Hess P. Subunit stoichiometry of a mammalian K⁺ channel determined by construction of multimeric cDNAs. *Neuron.* 1992;9:861–871
- Loya-Méndez Y., Reyes Leal G., Sánchez González A., Portillo Reyes V., Reyes Ruvalcaba D., Bojorquez Rangel G. SNP-19 genotypic variants of CAPN10 gene and its relation to diabetes mellitus type 2 in a population of Ciudad Juárez. *Nutrición Hospitalaria.* 2015;31(2):744–750.
- Lyssenko V., Jonsson A., Almgren P., Pulizzi N., Isomaa B., Tuomi T., Berglund G., Altshuler D., Nilsson P. & Groop L. Clinical risk factors, DNA variants, and the

development of type 2 diabetes. *New England Journal Medicine*, 2008 Nov 20;359(21):2220-32

- Lyssenko V., Laakso M. Genetic screening for the risk of type 2 diabetes: worthless or valuable? *Diabetes Care*. 2013;36(supplement 2):S120–S126.
- Lyssenko V. Leif group & Rashmi B. Genetics of Type 2 Diabetes: It Matters from Which Parent We Inherit the Risk. *Review of Diabetic Studies*. 2015 Fall-Winter; 12(3-4): 233–242.
- Mahajan A, Go MJ, Zhang W, Below JE, et al. Genome-wide trans-ancestry meta-analysis provides insight into the genetic architecture of type 2 diabetes susceptibility. *Nat Genet*. 2014;46(3):234–244.
- Markovich, D. Expression cloning of membrane proteins in *Xenopus oocytes*. Protocol Exchange, 2007, Nature.
- Marinko J.T., Huang H., Penn W.D., Capra J.A., Schleich J.P. & Sanders C.H. Folding and Misfolding of Human Membrane Proteins in Health and Disease: From Single Molecules to Cellular Proteostasis *Chem Rev*. 2019 May 8; 119(9): 5537–5606.
- Martínez-Gómez L. E., Cruz M., Martínez-Nava G. A., et al. A replication study of the IRS1, CAPN10, TCF7L2, and PPARG gene polymorphisms associated with type 2 diabetes in two different populations of Mexico. *Annals of Human Genetics*. 2011;75(5):612–620.
- Murakami Y., Kohyama N., Kobayashi Y., Ohbayashi M., Ohtani H., Sawada Y. & Yamamoto T. Functional characterization of human monocarboxylate transporter 6 (SLC16A5). *Drug Metab Dispos*. 2005 Dec;33(12):1845-51.
- Newgard C.B. Interplay between lipids and branched-chain amino acids in development of insulin resistance. *Cell Metab*. 2012 May 2; 15(5): 606–614.
- NIH, Genetics Home Reference: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/WFS1>
- NIH, SNP: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>
- Ovens M.T., Manoharan C., Wilson M.C., Murray C.M. & Halestrap A.P. The inhibition of monocarboxylate transporter 2 (MCT2) by AR-C155858 is modulated by the associated ancillary protein. *Biochem J*. 2010 Oct 15; 431(Pt 2): 217–225.
- Picos-Cárdenas V. J., Sáinz-González E., Miliar-García A., et al. Calpain-10 gene polymorphisms and risk of type 2 diabetes mellitus in Mexican mestizos. *Genetics and Molecular Research*. 2015;14(1):2205–2215.
- Prasad R.B., Groop L. Genetics of type 2 diabetes-pitfalls and possibilities. *Genes (Basel)* 2015;6(1):87–123.
- Rachek LI. Free fatty acids and skeletal muscle insulin resistance. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2014;121:267-92.
- Ramírez-Bello J. & Jiménez-Morales M. Implicaciones funcionales de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en genes codificantes de proteínas y no codificantes en enfermedades multifactoriales *Gac Med Mex*. 2017;153:238-50
- Roshanbin S., Lindberg F.A., Lekholm E., Eriksson M.M., Perland E., Åhlund J., Raine A., Fredriksson R. Histological characterization of orphan transporter MCT14 (SLC16A14) shows abundant expression in mouse CNS and kidney. *BMC Neuroscience* 2016 Jul 1;17(1):43.
- Rusu V., Hoch E., Mercader J.M., Tenen D.N., Gymrek M., Hartigan C.R., DeRan M., Von Grotthuss M., Fontanillas P, Spooner A., Guzman G., Deik A.A., Pierce K.A., Dennis C., Clish C.B., Carr S.A., Wagner B.G., Schenone M., C.Y. M., Chen B.H., Centeno-Cruz

- F., Zerrweck C., Orozco L., Altshuler D.M., Schreiber S.L., Florez J.C., Jacobs S.B.R., Lander E.S. (2017). Type 2 Diabetes Variants Disrupt Function of SLC16A11 through two distinct Mechanisms. *Cell* 170, 199–212 June 29, 2017 ^a. Elsevier Inc.
- Shulman G.I. Cellular mechanisms of insulin resistance. *Journal Clinical Invest.* 2000;106(2):171–176. doi: 10.1172/JCI10583.
 - Stančáková A & Laakso M. Genetics of Type 2 Diabetes. *Endocrinology Dev.* 2016;31:203-20.
 - Stefan Bröer, Bröer Angelika, Schneider Hans-Peter, Stegen Carola, Halestrap Andrew P. y Deitmer Joachim W. Characterization of the high-affinity monocarboxylate transporter MCT2 in *Xenopus laevis* oocytes. University of Bristol, University Walk, Bristol BS8 1TD, U.K. *Biochem. J.*, 1999, 341.
 - Struan F.A., Thorleifsson G. & Stefansson. Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nature Genetics*, 2006, 38, 320-323.
 - Suhre K., Shin S.Y, Petersen A.K., Mohny R.P., Meredith D., Wägele B., Altmaier E.; CARDIoGRAM, Deloukas P., Erdmann J., Grundberg E., Hammond C.J., de Angelis M.H., Kastenmüller G., Köttgen A., Kronenberg F., Mangino M., Meisinger C., Meitinger T., Mewes H.W., Milburn M.V., Prehn C., Raffler J., Ried J.S., Römisch-Margl W., Samani N.J., Small K.S., Wichmann H.E., Zhai G., Illig T., Spector T.D., Adamski J., Soranzo N. & Gieger C. Human metabolic individuality in biomedical and pharmaceutical research *Nature*. 2011 Aug 31; 477(7362): 10.
 - Sun X., Yu W. & Hu C., Genetics of Type 2 Diabetes: Insights into the Pathogenesis and Its Clinical Application. Department of Endocrinology and Metabolism, Wenzhou Medical University Affiliated First Hospital, Wenzhou 325000, China, 2014.
 - Tapia-Ceballos L., Córdoba-Borras E., Picazo-Angelín B. & Ranchal-Pérez, P. Diabetes MODY. Una causa frecuente de hiperglucemia. *Anales de Pediatría*, 2008, 69(6), 565–567.
 - Tusié-Luna M.T. El componente genético de la Diabetes Tipo 2. Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM e Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México, D.F, 2008, Mensaje Bioquímico, Vol XXXII.
 - Vaughan R.A., Gannon N.P., Carriker C.R. Nitrate-containing beetroot enhances myocyte metabolism and mitochondrial content. *J Tradit Complement Med.* 2015 Jan 8;6(1):17-22.
 - Velentzas A.D., Velentzas P.D., Katarachia S., Mpakou V.E., Papassideri I.S. & Stravopodis D.J. Data of sperm-entry inability in *Drosophila melanogaster* ovarian follicles that are depleted of s36 chorionic protein. *Data Brief.* 2017 Apr 8;12:180-183.
 - Visser W.E., Friesema E.C. & Visser T.J. Minireview: thyroid hormone transporters: the knowns and the unknowns. *Molecular Endocrinology* 2011 25, 1–14.
 - Wagner, C.A., Friedrich, B., Setiawan, I., Lang, F., Bröer, S. (2000) The use of *Xenopus laevis* oocytes for the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins. *Cell Physiol. and Biochem.* 10, 1-12.
 - Wang T.J., Larson M.G., Vasan R.S., Cheng S., Rhee E.P., McCabe E., Lewis G.D., Fox C.S., Jacques P.F., Fernandez C., O'Donnell C.J., Carr S.A., Mootha V.K.,4,5, Florez J.C.,4, Souza A., Melander O., Clish C.B. & Gerszten R.E. Profiles and the Risk of Developing Diabetes. *Nat Med.* 2011 Apr; 17(4): 448–453

- Wiebe J.C., Wagner A.M. & Mogoll3n-Novoa F.J. Nefrologa Suplemento Extraordinario: Genética de la Diabetes mellitus, 2011, 111-9.
- Wild S., Roglic G., Green A., Sicree R. & King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004;27:1047–1053.
- Wilcox G. Insulin and Insulin Resistance. *Clin Biochem Rev*. 2005 May; 26(2): 19–39.
- Williams A.L., Jacobs S.B., Moreno-Macías H., Huerta-Chagoya A., Churchhouse C., Márquez-Luna C., García-Ortz H., G3mez-Vázquez M.J., Burt N.P., Aguilar-Salinas C.A. & SIGMA Type 2 Diabetes Consortium. Sequence variants in SLC16A11 are a common risk factor for type 2 diabetes in Mexico. 2014 *Nature* 506, 97–101.
- Wilson M.C., Meredith D., Fox J.E.M., Manoharan C., Davies A.J. & Halestrap A.P. Basigin (CD147) is the target for organomercurial inhibition of monocarboxylate transporter isoforms 1 and 4 – The ancillary protein for the insensitive MCT2 is embigin (Gp70). 2005 *Journal Bio. Chem.* 280, 27213–27221.
- World Health Organisation: <http://www.who.int/diabetes/en/>
- Zhang T., Qi Z., Wang H. & Ding S. Adeno-Associated Virus-Mediated Knockdown of SLC16A11 Improves Glucose Tolerance and Hepatic Insulin Signaling in High Fat Diet-Fed Mice. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2019 ISSN 0947-7349.
- Zhao Y., Feng Z., Zhang Y., Sun Y., Chen Y., Liu X., Li S., Zhou T., Chen L., Wei Y., Ma D., Lui K., Ying H, Chen Y., Ding O. Gain-of-Function Mutations of SLC16A11 Contribute to the Pathogenesis of Type 2 Diabetes
- Zimmer H.G. Regulation of and intervention into the oxidative pentose phosphate pathway and adenine nucleotide metabolism in the heart. *Mol Cell Biochemistry*. 1996;160–161:101–109.