

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Medicina
Instituto de Investigaciones Biomédicas

**Caracterización funcional de los transportadores de
Na⁺/Monocarboxilatos electroneutro (Slc5a12) y
electrogénico (Slc5a8).**

T E S I S

que para obtener el título de

Licenciada en Investigación Biomédica Básica

Directores de tesis:

Dr. Gerardo Gamba Ayala

Dra. Consuelo Plata Ramos

María Eugenia Nayeli Juárez Ugarte



Directores de tesis:

Dr. Gerardo Gamba Ayala

Dra. Consuelo Plata Ramos

México, D. F., 2007



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.

RECONOCIMIENTOS

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Gerardo Gamba Ayala y la Dra. Consuelo Plata Ramos en la Unidad de Fisiología Molecular del departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, y en el departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral del Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición Salvador Zubirán.

El comité tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Luis Vaca	Instituto de Fisiología Celular
Dr. Gerardo Gamba	Instituto de Investigaciones Biomédicas
Dr. Alejandro Zentella	Instituto de Investigaciones Biomédicas
Dra. Laura Escobar	Facultad de Medicina
Dr. Gabriel Gutiérrez	Instituto de Investigaciones Biomédicas

Se reconoce el gran apoyo y la invaluable asesoría académica y técnica de la Q. Norma Vázquez durante la realización del presente estudio.

Se reconoce la valiosa e imprescindible colaboración de la Dra. Aída Venado durante la realización del presente estudio.

Se reconoce la colaboración y asesoría de la Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval durante la realización del presente estudio.

A Mayela y Fernando

..por su paciencia, cariño y bondad. Por ayudarme a cumplir todos mis sueños, por su apoyo incondicional.

A ti mamá, por dedicarnos tu vida; mi superheroína del casco mágico, el pilar y orgullo de nuestra familia.

A ti papá, por todo tu apoyo y tus consejos; la mitad de mi corazón, mi adversario preferido a quien siempre le daré la contraria.

A mis hermanos Fernando y Gustavo y Rocío

...los quiero mucho. Gracias por compartir día a día su vida conmigo.

A mis hermanas adoptivas Abigail y Cecilia

...una parte muy importante de mi vida. Por todas nuestras aventuras pasadas, y las que nos faltan por vivir.

A Rodrigo

...mi estrella

Al Dr. Gerardo Gamba,

Por darme la oportunidad de hacer ciencia a tu lado, por hacerme descubrir siempre nuevas perspectivas, por generar en mí nuevas interrogantes, por ser un ejemplo de vida.

A la Dra. Consuelo Plata,

Por todas tus enseñanzas, por los buenos y malos momentos.

A la Dra. Norma Bobadilla,

Por todas tus observaciones académicas, pero también por todas esas veces en las que fuera del laboratorio hablamos de la vida.

Al Dr. Gabriel Gutiérrez,

Por tu compromiso constante en formar científicos. Gracias por enseñarme a reflexionar, por tu apoyo incondicional y tu amistad.

A todos mis compañeros del laboratorio y amigos de la carrera,

En especial a Vicky, Joyce, Erika, Pawis, Pedro, Pepe, Rodolfo... gracias a todos por todos nuestros días en el labo, pero también por esos innumerables pasteles, reuniones, fiestas, salidas y viajes.

A Norma Vázquez por estos 2 años de enseñanzas, por su apoyo y compañía. No sé que hubiera hecho sin ti.

A Aída por todo lo que compartimos éste año, mi compañera, mi amiga, mi confidente.

A Diana, por el apoyo incondicional que nos has brindado, por esas largas pláticas, risas, pero sobre todo por tu amistad y confianza.

A Gaby, mi gran amiga; una viajera como yo de corazón.

A José Miguel, por todo lo que hemos compartido juntos, por estar ahí siempre.

A Paco mi hermanito...

A Lili por ser mi mamá adoptiva cuando empecé esta aventura biomédica.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
<i>Generalidades de la familia del cotransportador de Na⁺/glucosa SLC5</i>	6
<i>TSMC: Transportadores de Na⁺/monocarboxilatos, electrogénico y electroneuro</i>	8
<i>Funciones fisiológicas de los TSMC</i>	15
ANTECEDENTES	24
<i>Caracterización en pez cebra de los cotransportadores Na⁺/monocarboxilatos TSMCz electroneuro y electrogénico</i>	24
HIPÓTESIS	31
OBJETIVOS	31
METODOLOGIA	32
<i>Extracción de DNA</i>	32
<i>Síntesis in vitro de cRNA TSMCz electrogénico, TSMCz electroneuro y del TSMCh electrogénico</i>	32
<i>Extracción de ovocitos e inyección del RNAc</i>	32
<i>Ensayos de expresión funcional</i>	33
RESULTADOS	36
<i>Caracterización de los substratos</i>	36
<i>Caracterización farmacológica</i>	38
<i>Efecto de la activación de la PKC</i>	45
DISCUSIÓN	51
REFERENCIAS	59
APÉNDICES	68
A) <i>Transformación de células</i>	68
B) <i>Obtención de DNAc plasmídico (miniprep)</i>	69
C) <i>Gel de agarosa para DNA</i>	70
D) <i>Digestión de DNAc</i>	71
E) <i>Preparación de RNAc (Ambión)</i>	72
F) <i>Gel de agarosa al 1% formaldehído para RNA</i>	73
G) <i>Extracción y preparación de ovocitos de Xenopus laevis</i>	74
H) <i>Captación de ²²Na⁺ en ovocitos de Xenopus laevis</i>	75
I) <i>Mecanismos de regulación de proteínas de membrana, PKC</i>	76
J) <i>Mecanismos de regulación de Proteínas de membrana, PKA</i>	78
ABREVIACIONES	80

RESUMEN

Los ácidos grasos de cadena corta (butirato, propionato) así como otros monocarboxilatos (MCs) tales como el piruvato, el lactato y los cuerpos cetónicos son empleados como fuentes de energía por el organismo. El riñón es capaz de reabsorberlos casi por completo (95%) en el túbulo proximal. Los transportadores responsables de su reabsorción en la membrana basolateral corresponden a aquellos pertenecientes a la familia Slc16 acoplados a protones (MC/H⁺; MCT1-MCT4), y en la membrana apical a los transportadores de Na⁺-Monocarboxilatos (TSMCs): electroneutro (TSMC electroneutro/Slc5a12) y electrogénico (TSMC electrogénico/Slc5a8) recientemente descritos.

Diversos estudios han demostrado la importancia de los TSMC en la reabsorción de monocarboxilatos y de fármacos como el nicotinato y el pirazinoato. Además el Slc5a8 está considerado como un gen supresor de tumores en cáncer de colon, tiroides, estómago y oligodendriomas. Poco se sabe acerca de la regulación de éstos transportadores. Se ha reportado que el ibuprofeno, un antiinflamatorio no esteroideo (AINE) puede inhibir la función del TSMC electrogénico. Por otra parte, tanto el TSMC electrogénico como el TSMC electroneutro presentan sitios potenciales de fosforilación para PKA y PKC, vías potenciales de regulación de éstos transportadores.

El presente trabajo aborda el estudio de la regulación de la función de los TSMC electrogénico y electroneutro del pez cebra (TSMCz) y del TSMC electrogénico humano (TSMCh). Utilizando la técnica de expresión funcional en ovocitos de *Xenopus laevis*, se valoró el efecto de tres AINES (naproxeno, ibuprofeno y ketoprofeno), así como del anticonvulsivante valproato sobre la función de los TSMC. Todos estos fármacos redujeron significativamente la función de los TSMC, (ibuprofeno>ketoprofeno>naproxeno>valproato). El efecto de la activación de la vía de la PKC, utilizando el éster de forbol TPA, resultó en una disminución significativa de la actividad de los TSMC. El estudio preliminar del efecto de la activación de las vías de fosforilación de la PKA, utilizando un análogo de AMPc, produjo un aumento en la actividad del TSMCh, no así de los TSMCz. Con relación al TSMCh, este efecto es reversible con el inhibidor de la vía H89. Aunque los TSMCz no mostraron un cambio en su función en presencia de AMPc, el H89 fue capaz de reducir su función.

INTRODUCCIÓN

Los monocarboxilatos son compuestos orgánicos que en su estructura química presentan un único grupo carboxilo y que representan importantes fuentes energéticas para el organismo. (fig. 1).

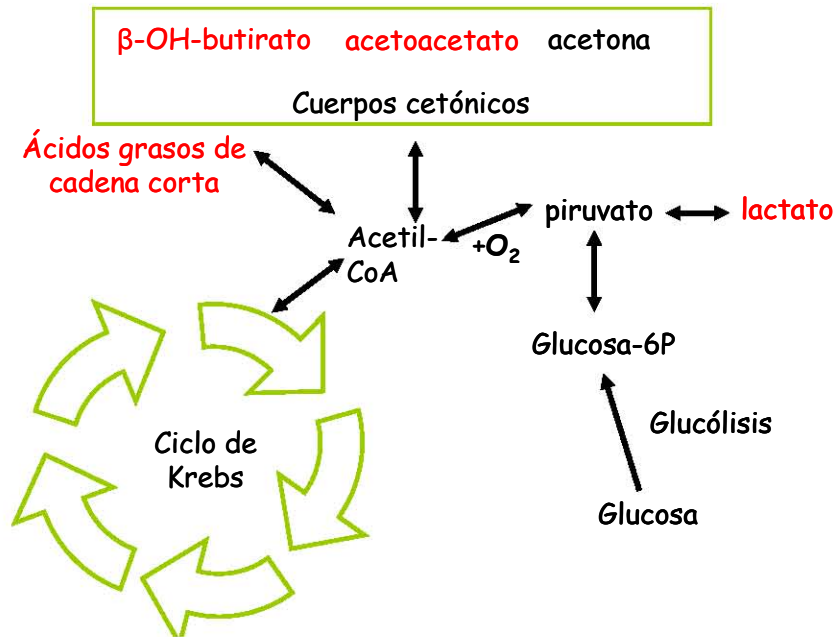


Fig. 1 Esquema que ilustra las vías metabólicas que involucran a los monocarboxilatos.

La glucólisis produce dos moléculas de piruvato por cada molécula de glucosa consumida. En presencia de oxígeno, el piruvato puede convertirse en acetil CoA y utilizarse en el ciclo de Krebs o bien, en condiciones anaeróbicas puede generar lactato. Algunas células como los eritrocitos, miocitos de fibras musculares blancas y algunas células tumorales, requieren del lactato para producir ATP en condiciones fisiológicas normales, mientras que otros lo necesitan durante condiciones de hipoxia o isquemia ¹.

Durante periodos prolongados de ayuno o en condiciones donde el metabolismo de la glucosa no es adecuado, como en la diabetes, se pueden generar en el hígado cuerpos cetónicos a partir de acetil coenzima A, que pueden ser utilizados periféricamente como fuente de energía. De éstos el acetoacetato y el β -hidroxibutirato son los mas abundantes siendo la acetona la que se encuentra en menor concentración ¹.

Por otro lado, en el colon, la fermentación bacteriana de los polisacáridos, oligosacáridos, proteínas y péptidos genera ácidos grasos de cadena corta, tales como el butirato, el propionato y el acetato. Estos representan fuentes energéticas para los colonocitos. Sin embargo, su función se extiende más allá de su papel como nutrientes, pues se ha visto que participan también como moduladores del pH intracelular colónico, así como del volumen celular. Su papel como reguladores de proliferación, diferenciación y expresión génica también ha sido descrito ¹.

De esta manera, dado que los monocarboxilatos juegan un papel central en el metabolismo celular de muchos tejidos, los mecanismos a través de los cuales éstos son reabsorbidos y excretados son cruciales para evitar la pérdida de éstos en la orina, o su acumulación excesiva que causa desordenes tales como la acidosis metabólica ¹.

En el organismo, el transporte epitelial representa un mecanismo crucial para los procesos de absorción, secreción y excreción de solutos y metabolitos presentes en la sangre, necesario para mantener en homeostasis el medio interno ¹.

El epitelio sirve como una barrera permeable selectiva que divide las regiones apicales y basolaterales de la membrana celular. Ambas regiones tienen funciones distintas en el transporte de iones, y esta polarización permite el transporte de agua y diferentes solutos de un compartimiento a otro. Este transporte puede ser un proceso activo en algunos casos ¹.

El transporte activo es un proceso que puede transferir un soluto a través de la membrana celular en contra de su gradiente de concentración. La energía necesaria para llevar a cabo este transporte puede provenir, en el caso del transporte activo primario, de la hidrólisis de ATP, o bien en el caso del transporte activo secundario, del acoplamiento del transporte a un soluto que posea una diferencia de potencial electroquímica favorable como el Na^{+1} .

Las proteínas responsables del transporte activo secundario son los cotransportadores y los intercambiadores. Los cotransportadores transfieren ambos solutos en la misma dirección mientras que los intercambiadores lo hacen en dirección opuesta ¹.

Órganos como el intestino delgado, el grueso y el riñón cuentan con un tejido epitelial especializado que permite el movimiento transepitelial que puede ser absortivo o secretor. Mientras que la función principal del intestino delgado y grueso es la absorción y secreción de fluidos y electrolitos, el riñón funciona como un filtro que remueve los productos metabólicos y toxinas de la sangre y las excreta en la orina. El riñón juega un papel clave en la homeostasis regulando el volumen de fluidos extracelular, el balance electrolítico y el balance ácido base ¹.

Desde los años 50s era bien sabido que el riñón es capaz de reabsorber casi por completo en el túbulo proximal al monocarboxilato de mayor concentración en la sangre, el lactato (1.2 mM-10 mM) ², sin embargo fue hasta los años ochenta cuando estudios de electrofisiología sugirieron la identidad de los transportadores involucrados en el transporte apical y basolateral de éste ³⁻⁸.

Evidencias fisiológicas del transporte de monocarboxilatos en el túbulo proximal de la nefrona

Para responder a la pregunta de si el transporte de substratos orgánicos, tales como el lactato, jugaban un papel importante en la determinación del pH intracelular, Boron y colaboradores ^{3,4,6-8}, analizaron el transporte de lactato a la luz del estudio de cambios en el pH_i y del potencial de membrana en túbulos proximales de salamandra.

Ellos observaron que la exposición del lactato en cualquiera de los lados de la membrana (apical, basolateral) o ambos del túbulo proximal, producía alcalinización intracelular no esperada en el caso de que el mecanismo del transporte de lactato fuera pasivo ⁶.

En la membrana apical, la alcalinización resultó ser dependiente de Na^+ , sin cambios en el potencial de membrana, lo que sugiere un mecanismo de cotransporte electroneutro de Na^+ /Lactato para la entrada de lactato luminal ⁶.

Por otro lado, la exposición de lactato en la membrana basolateral ocasionó acidificación intracelular independiente de Na^+ , reversible por CHC, SITS (inhibidores del transporte H^+ /lac⁻) y saturable con la concentración de lactato, lo que sugiere que el transporte basolateral de lactato es vía un contrantransportador de H^+ /lactato electroneutro ⁶.

Aunque varios grupos de investigación concordaban con Boron en la existencia de un cotransportador electroneutro de Na^+ /lactato en la membrana apical ^{6,9,10}, otros más reportaron evidencias de un cotransporte de Na^+ /lactato electrogénico ¹¹⁻¹³.

La controversia originada por ambos resultados llevó a proponer la existencia de dos tipos de cotransportadores de lactato acoplados a Na^+ , uno electroneutro y otro electrogénico; el transportador electroneutro es más difícil de detectar debido a la actividad del electrogénico ⁶.

Sin embargo, la existencia del transporte electroneutro se evidenció mejor cuando se observó que la absorción del pirazinoato ¹⁴, fármaco utilizado en la tuberculosis, y del nicotinato, utilizado en las dislipidemias, se lleva a cabo por un sistema de transporte electroneutro de monocarboxilatos acoplado a Na^+ .¹⁵⁻¹⁷.

A la fecha se sabe que las proteínas responsables del transporte de H^+ /Lac⁻ en la membrana basolateral del túbulo proximal pertenecen a la familia de cotransportadores acoplados a protones (MCTs) ^{18,19}.

La familia génica de los MCTs (Slc16) comprende hasta la fecha 14 miembros. Los primeros cuatro miembros (MCT1-MCT4) se encargan del transporte de monocarboxilatos y ácidos grasos de cadena corta de manera acoplada a protones. En general, los MCTs se expresan en varios tejidos en la membrana basolateral, como

hígado, testículos, cerebro, músculo esquelético y riñón aunque cada isoforma tiene un patrón determinado^{18,19}.

Por otro lado, la identidad de los transportadores electroneutro y electrogénico responsables del transporte apical Na^+ dependiente de lactato y monocarboxilatos no se elucidó sino hasta mediados de esta década cuando Coady et al.²⁰, Miyauchi et al.²¹ y Plata et al.²² identificaron a los miembros 8 y 12 de la familia del cotransportador Na^+ -glucosa, SLC5, el Slc5a8 y Slc5a12 como los cotransportadores luminales electrogénico y electroneutro de Na^+ - monocarboxilatos (TSMC), respectivamente.

Generalidades de la familia del cotransportador de Na^+ /glucosa SLC5

La familia génica SLC5 tiene más de 220 miembros en bacterias y células animales y en el genoma humano esta familia está compuesta por 12 miembros. Estas proteínas de membrana tienen funciones diversas como el transporte activo de solutos, iones, además de funcionar como canales de agua y urea, hasta canales iónicos de compuerta de glucosa en las neuronas (SGLT3) colinérgicas.

Los 12 genes codifican para proteínas entre 60-80k Da que tienen entre 580 y 718 residuos de aminoácidos. El análisis de predicción de estructura secundaria sugiere una estructura de 14 dominios α -hélice transmembrana en todos los miembros salvo en el transportador de Na^+ /glucosa (SGLT1) y el transportador de Na^+ /iodo (NIS) que solo tienen 13. El dominio N-terminal está formado por una asa extracelular que tienen varios sitios consenso para N-glicosilación aunque se ha visto que en SGLT1 y NIS, éstos no son necesarios para el transporte²³.

El grado de homología a nivel de aminoácidos entre los 11 miembros de la familia SLC5 es del 21 al 70% con respecto al SGLT1. El SGLT2 presenta un 59% de identidad, el SGLT3 un 70%, el SGLT4 un 56%, el SGLT5 un 57% el SGLT6 un 50%, el transportador de Na^+ /mioinositol (SMIT) un 55%, el transportador Na^+ /multivitamínico (SMVT) un 24%, el transportador de colina (CHT) un 24% y el transportador de Na^+ /monocarboxilatos (TSMC) un 21% al igual que el NIS (fig.2).

Ocho de los once genes comprenden de 14 a 15 exones, mientras que la organización exónica para el transportador de colina es de 8 exones y el Na⁺ myo-inositol es de uno ²⁴.

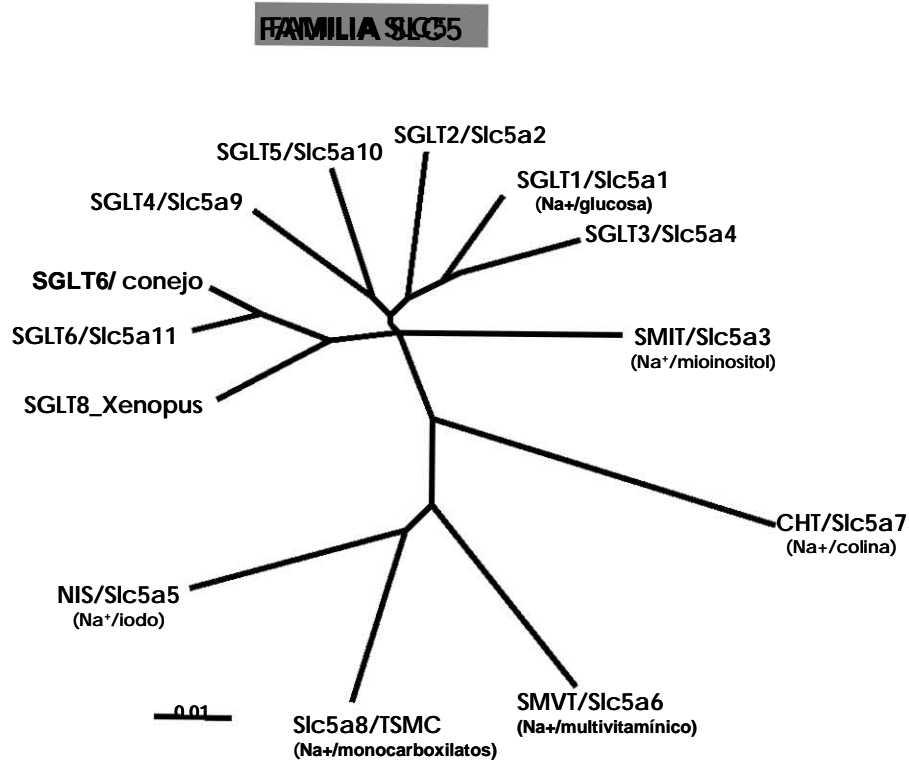


Fig. 2 Esquema que ilustra el árbol filogenético de los 11 miembros de la familia SLC5 y otros dos miembros de vertebrados. (Figura modificada a partir de Wright y Turk²⁴ 2004).

Mutaciones en tres de los genes de esta familia, SGLT3, SCL1, y NIS, se han asociado en desordenes metabólicos como glicosuria renal, mal-absorción de glucosa-galactosa e hipotiroidismo, respectivamente ^{25,26}. Mientras que el silenciamiento del TSMCh electrogénico por un evento de hipermetilación es un evento común en patologías como cáncer de colon, cáncer gástrico y cáncer de tiroides ²⁷⁻³⁰.

La regulación de la expresión de esta familia de cotransportadores ha sido poco estudiada. A la fecha sabe que la expresión del NIS se incrementa en la glándula tiroides bajo la acción de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) vía GMPC ²⁵, y que la hipertonicidad celular ocasionada por el transportador de Na⁺/mioinositol estimula su transcripción vía el enhancer binding protein que responde a tonicidad (TonEBP) ³¹.

La regulación por fosforilación solo ha sido estudiada en el SGLT1. Dada la existencia de secuencias consenso en este transportador para la proteína cinasa A (PKA) y la proteína cinasa C (PKC), Wright y colaboradores estudiaron los cambios en la actividad del transportador, el número de cotransportadores presentes en la membrana, así como el área de ésta, después de la exposición a activadores de ambas cinasas ³².

Ovocitos inyectados con SGLT1, fueron expuestos 30 min con 8-bromo-AMPCíclico (8-Br-cAMP) para analizar el efecto de la activación de la PKA, y sn-1,2-dioctanoylglycerol (DOG) para analizar el de la PKC. En ambos se añadió caliculina A para bloquear la defosforilación de los residuos de serina y treonina, blancos de PKA y PKC ³².

El 8-Br-cAMP incrementó la tasa del cotransporte de Na⁺/glucosa en 27 ± 9%, mientras que el DOG la disminuyó en un 62 ± 5%. En ambos casos ni la Km para la glucosa ni la Ki para florizina (inhibidor del cotransportador) se vieron afectadas, por lo que sugirió un cambio en el número de transportadores en la membrana. En efecto, Wright y colaboradores ³² demostraron que la PKA y la PKC participan en la regulación del transporte de glucosa modulando el número de cotransportadores en la membrana plasmática por mecanismos de exo y endocitosis.

TSMC: Transportadores de Na⁺/monocarboxilatos, electrogénico y electroneutro

Los cotransportadores codificados por los genes Slc5a8 y el Slc5a12, miembros de la familia Na⁺/glucosa, pertenecían al grupo de transportadores huérfanos de esta familia (SLC5a9-12) hasta principios de esta década cuando fueron identificados y caracterizados como cotransportadores de monocarboxilatos acoplados a Na⁺, TSMC, electrogénico y electroneutro, respectivamente.

Si bien desde su caracterización se han sugerido múltiples funciones fisiológicas para ambos transportadores (ver funciones fisiológicas TSMC), la reabsorción de metabolitos energéticos tales como los monocarboxilatos en el riñón y los SCFAs en el colon han sido los mas importantes ³³.

Identificación inicial del TSMC electrogénico

El miembro 8 de la familia génica del humano SLC5, un cotransportador de monocarboxilatos y ácidos grasos de cadena corta acoplado a Na^+ , fue originalmente clonado por Rodríguez et al.³⁴ en un intento de identificar un transportador apical de iodo estructuralmente similar al NIS (SLC5A5).

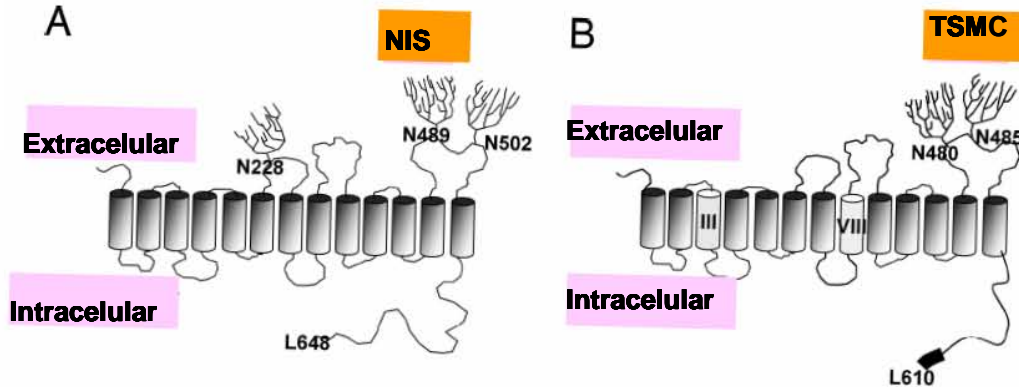


Fig. 3. Esquema que ilustra los modelos de la estructura secundaria del NIS y el TSMC (SMCT). (Figura adaptada a partir de Paroder V⁵¹. 2006).

El cotransportador NIS, perteneciente a la misma familia, está localizado en la membrana basolateral y cataliza el transporte activo de iodo de la sangre a los tirocitos^{25,35-37} utilizando el gradiente del iodo con una estequiometría de dos sodios y un iodo³⁸. En la membrana apical, la única proteína relacionada con el transporte de iodo es la Pendrina, producto del gen del síndrome de Pendre (PDS, SLC26A4). Sin embargo, las variaciones fenotípicas en el síndrome de Pendre sugerían la existencia de un sistema secundario de transporte apical de iodo^{39,40}.

Rodríguez et al.³⁴ diseñaron una estrategia de clonación por RT-PCR basada en una homología de secuencia con hNIS. La búsqueda en una librería de DNAC de riñón llevo a la caracterización de un nuevo gen que resultó 46% idéntico al hNIS. Como se puede observar en la figura 3 ambos poseen 13 dominios transmembranales representados por los cilindros. Los segmentos más conservados entre las dos proteínas son el segmento III y el VIII (blanco), el dominio N-terminal es de carácter extracelular mientras que el dominio carboxiterminal intracelular. Además ambos presentan sitios de glucosilación

representados como ramas. Este transportador homólogo al NIS se encuentra en el cromosoma 12q23 y codifica para 610 aa. Es el octavo miembro de la familia génica SLC5 y por lo tanto fue designado como SLC5A8/TSMC.

Se encontraron dos sitios potenciales de glicosilación (Asn 481 y 485) que corresponden a posiciones equivalentes en NIS, y sitios consenso para la cinasa dependiente de cAMP, la cinasa dependiente de Ca^+ y la tirosina cinasa.³⁴

Experimentos funcionales sugirieron que el TSMCh está involucrado el transporte pasivo de yodo, pero no su acumulación, por lo que fue designada como transportador apical de yodo (AIT)³⁴.

La transfección de células provenientes de riñón COS-7 con AIT no mostró la acumulación de ^{125}I . Sin embargo, la cotransfección con mNIS indujo un decremento significativo de la acumulación de yodo. Por otro lado, la transfección de hAIT en células de ovario de hámster CHO, indujeron incremento en la tasa inicial de influjo de yodo, el cual fue inhibido por perclorato, un inhibidor competitivo de la captación de yodo catalizada por hNIS. El papel del Na^+ no fue estudiado directamente. Sin embargo, Rodríguez et al.³⁴ infirieron que el transporte de yodo es independiente al de Na^+ , a diferencia de todos los miembros de la familia que actúan de una manera Na^+ dependiente.

Estudios de inmunohistoquímica revelaron que la proteína se encontraba en la membrana apical de las células foliculares de la tiroides y que su expresión era diez veces mayor a su expresión en riñón³⁴. Posteriormente, la alteración de la expresión de este cotransportador en tumores tiroideos humanos sería demostrada por Lacroix et al.²⁸.

De manera interesante, el mismo gen fue identificado por Li y colaboradores⁴¹ como un posible gen supresor de tumores involucrado en cáncer de colon humano, debido al silenciamiento del mismo por hipermetilación. De hecho, la reintroducción de este gen permite la supresión del crecimiento tumoral. Posteriormente se demostraría que el

silenciamiento del TSMCh por hipermetilación también estaba involucrado en cáncer gástrico³⁰ y en oligodendroglioma⁴².

Así, en contraste a lo expuesto por Rodríguez et al.³⁴, los estudios de Li et al.⁴¹ sugirieron al TSMCh como un transportador de Na⁺ asociado posiblemente a ácidos grasos de cadena corta como acetato, propionato, y butirato que se generan abundantemente en el colon por fermentación bacteriana de fibra dietética y carbohidratos no absorbidos. Todo esto en conjunto puso en duda que la función primordial del TSMCh fuera la del transporte pasivo de yodo.

Así, bajo las inferencias de Li et al.⁴¹, la caracterización funcional de este transportador se llevó a cabo por Coady et al.²⁰ y Miyauchi et al.²¹. Ambos demostraron que el TSMCh es un transportador acoplado a Na⁺ de ácidos grasos de cadenas corta, lactato, nicotinato, pirazinocarboxilato, así como de cuerpos cetónicos: β-d-hydroxibutirato, acetoacetato y cetoácidos. Por lo tanto hoy se considera que el yodo debe ser un sustrato débil de este transportador^{20,21}.

Identificación funcional del TSMCh como un transportador acoplado a Na⁺ de ácidos grasos de cadena corta

Coady et al.²⁰ así como Miyauchi et al.²¹ identificaron al TSMCh, un transportador que se encuentra en el cromosoma 12q23, como un cotransportador de Na⁺/monocarboxilatos. Al igual que Rodríguez et al.³⁴ describió a este transportador como un cotransportador de 610 aa con una estructura de trece dominios transmembranales. Posee dos sitios potenciales de glicosilación (Asn 481 y 485) y sitios consenso de fosforilación para la cinasa dependiente de cAMP, la cinasa dependiente de Ca⁺, y la tirosina cinasa^{20,21,34}.

Tomando como antecedente los estudios de Li et al.⁴¹, Miyauchi et al.²¹ amplificaron RNAm del TSMCh de intestino humano, el cual utilizaron para sintetizar DNAc y clonarlo en un vector de expresión. Ese DNAc fue posteriormente utilizado para sintetizar RNAc in vitro para utilizarlo en experimentos de expresión funcional

heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis*. Así, ellos midieron la captación de ácidos grasos de cadena corta marcados radioactivamente (lactato, piruvato, acetato, propionato y butirato). Los resultados mostraron significancia con respecto a los ovocitos no inyectados²¹ Coady et al.²⁰ corroboraron la captación con lactato.

Además la exposición de estos ovocitos indujo corrientes entrantes bajo condiciones de voltaje clamp de manera Na^+ dependiente. Las corrientes eran saturables y las concentraciones de sustrato necesarias para la inducción media máxima de la corriente fueron de 0.08-2.5 mM. Las corrientes inducidas por el sustrato disminuyeron en función a la longitud de la cadena carbonada de los sustratos²¹.

Al mismo tiempo, y debido a la homología entre los cotransportadores de Na^+ -vitaminas (SMVT) y el cotransportador de Na^+ -I (NIS), con el TSMCh, Coady et al.²⁰ sugirieron un transporte de sustratos aniónicos acoplado a Na^+ para el TSMCh. Utilizando el mismo sistema que Miyauchi et al.²¹, la exposición de los ovocitos inyectados con RNAc de TSMCh bajo condiciones de voltaje clamp en mono, di y tri carboxilatos así como I- y Br-, generó corrientes entrantes solo en presencia de los monocarboxilatos.

Relación corriente voltaje y caracterización cinética

La relación corriente voltaje de las corrientes inducidas por los diferentes sustratos fue medida a diferentes concentraciones de Na^+ y del sustrato. Los datos obtenidos seguían una cinética de Michaelis-Menten y se calculó la K_m para estos. La afinidad del transportador con sus diferentes sustratos fue en el siguiente orden: butirato ($81 \pm 17 \mu\text{M}$) > propionato ($127 \pm 14 \mu\text{M}$) > L-lactato ($235 \pm 24 \mu\text{M}$) > D-lactato ($742 \pm 330 \mu\text{M}$) > acetato ($2.46 \pm 0.89 \mu\text{M}$)²⁰.

Aunque los resultados propuestos por Miyauchi et al.²¹ concuerdan con los de Coady et al.²⁰ en cuanto a la especificidad del cotransportador por los monocarboxilatos, los resultados de ambos grupos difieren en los estudios relacionados con la estequiometría propuesta del transporte y la sensibilidad al cloro. Ambos sugirieron el cotransporte de

más de un ion Na^+ . Miyauchi et al. ²¹ calcularon una relación de 4:1²¹, mientras que Coady et al. ²⁰ de 3:1.

En cuanto a la sensibilidad al cloro, Miyauchi et al. ²¹ no observaron cambios significativos en la magnitud de las corrientes inducidas por el substrato cuando el Cl^- fue substituido por gluconato en el medio de perfusión. Sin embargo, Coady et al. ²⁰, observaron que la adición de Cl^- a la solución de perfusión produce una corriente adicional cuya magnitud varia de manera linear con la concentración extracelular de Cl^- . Como la corriente dependiente de Cl^- no fue observada en ausencia de propionato, se sugiere que el Cl^- tiene un efecto directo e estimulante en el cotransporte de Na^+ -propionato.

La relevancia fisiológica de esta posible dependencia del Cl^- no esta clara. Se sugiere que debido a que el TSMCh estaría expuesto a diferentes ambientes iónicos entre el lumen colónico y el lumen de los túbulos renales, es posible que el Cl^- jugara un papel regulador en la actividad de esta proteína. ^{20,21}

Efecto de la función del TSMCh en el pH intracelular

La difusión pasiva de SCFAs no ionizados en la célula produce una acidificación intracelular.

El estudio de la regulación del pH intracelular y extracelular en criptas colónicas por los gradientes de ácidos graso de cadenas cortas (SCFA), demostró una acidificación al interior de la célula debido al transporte de éstos ⁴³.

Corroborando estos resultados, una herramienta utilizada en diversos estudios para bajar el pH intracelular ha sido la adición de butirato ⁴³⁻⁴⁶. La acidificación intracelular ocurre a una tasa de -19×10^{-5} unidades de pH s^{-1} .

Por el contrario, Coady et al. ²⁰ mostraron que el transporte de butirato en ovocitos de *Xenopus laevis* a través del TSMCh produce una alcalinización intracelular a una tasa de $+52 \times 10^{-5}$ unidades de pH s^{-1} . Esto se debe a la reasociación parcial del butirato con los

H⁺ del interior de la célula. Además, ya que varios iones Na⁺ son transportados junto con el butirato, el ovocito que expresa TSMCh también se depolariza (la remoción del Na⁺ extracelular previene este efecto).

Caracterización funcional del TSMCm

El TSMCm, ortólogo murino del TSMCh, fue clonado por Gopal et al.⁴⁷, a partir de tejido renal. El cDNA es de 5346 pares de bases y codifica para una proteína de 611 aa. (GenBank AY484428). La homología de secuencia con respecto al TSMCh es del 95%. La estructura predicha para este cotransportador comprende 13 dominios transmembranales, un dominio amino-terminal extracelular y un dominio carboxi-terminal intracelular. Tiene dos sitios posibles de N-glicosilación entre los dominios transmembrana 12 y 13.

El TSMC murino es el primer transportador conocido de Na⁺/monocarboxilatos que absorbe electrogénicamente al lactato tanto en colon como en riñón de mamíferos. Al igual que el cotransportador de Na⁺/monocarboxilatos clonado a partir de intestino humano, el TSMCm media el transporte electrogénico de SFCAs (ej. acetato, propionato, butirato) y lactato, acoplado a Na⁺. Éste, presenta una afinidad a los monocarboxilatos similar al transportador humano TSMCh. La relación carga-substrato parece diferir con respecto al substrato, mientras que existe una relación de 4:1 para el propionato, la del lactato corresponde a 2:1. Ya que la diferencia estructural entre los dos substratos es un grupo hidroxilo, se sugiere que éste parece influir en la conformación del transportador una vez unido al substrato, probablemente influyendo en las diferencias de acoplamiento con el Na⁺.

Gopal et al.⁴⁸ describieron además el transporte de nicotinato acoplado a Na⁺ tanto en un sistema de expresión mamaria como en ovocitos de *Xenopus laevis*. La Km para este substrato es de ~250 µM y el transporte es electrogénico con una estequiometría de 2:1 Na⁺/ nicotinato.

La nicotinamida no puede ser transportada por el TSMC debido a que carece de un grupo carboxilo probablemente necesario para la unión con el transportador. El transporte de nicotinato vía TSMC es inhibido de manera competitiva por el lactato y por ácidos grasos de cadena corta como el acetato, el propionato y el butirato.

Inhibidores

Se examinaron varios compuestos para determinar algún inhibidor del TSMCh. Los compuestos que bloquean otros transportadores de la familia (florizin y floretina) u otros inhibidores de transporte aniónicos (probenecida, SITS) así como análogos (fenilactado, ibuprofeno). El ibuprofeno, derivado del propionato, así como el probenecida, un anión orgánico, inhibieron con mayor eficiencia las corrientes del transportador en concentraciones de 100 μM y 500 μM respectivamente. Inhibidores de la familia de transportadores de H^+ /monocarboxilatos, MCTs, como el ácido α -Cyanohydroxycinámico no produjeron cambios en las corrientes inducidas por propionato por el TSMCh o el TSMCm .

Tanto el ibuprofeno como el probenecida parece inhibir al propionato de manera competitiva, el ibuprofeno con una $K_i=20 \pm 3 \mu\text{M}$ y probenecida con $K_i=195 \pm 33 \mu\text{M}$ ²⁰.

Funciones fisiológicas de los TSMC

Los TSMC se expresan en varios tejidos, entre ellos, en el tracto digestivo ^{22,30,49,50}, en especial en colon ^{20-22,33,41,51,52}, riñón ^{47,53}, tiroides ^{28,34,54,55} y en músculo esquelético ⁵⁶. Dada su reciente caracterización, se sabe poco acerca de la función fisiológica que ejerce en cada tejido, sin embargo, varios estudios han empezado a especular sobre sus múltiples efectos sobre la reabsorción de monocarboxilatos y SCFAs en el tejido epitelial renal y colónico ^{33,52}.

TSMC en el riñón

En riñón, por su localización en la membrana apical se ha especulado que estos transportadores juegan un papel en la absorción de monocarboxilatos ^{22,33,47,53,57}.

Como se mencionó anteriormente, (ver evidencias fisiológicas del transporte de Na^+ /monocarboxilatos en el túbulo proximal) en el riñón existe un mecanismo eficiente de reabsorción (95%) de lactato en el túbulo proximal, el monocarboxilato de mayor concentración en la sangre (1.2 mM-15 mM). Dado que estos transportadores apicales pueden transportar a este sustrato, probablemente los TSMC corresponden a los cotransportadores apicales responsables del transporte electrogénico y electroneutro acoplado a Na^+ de monocarboxilatos sugerido en los ochenta por Boron y colaboradores²²(fig. 4).

Adicionalmente se ha propuesto que tanto TSMC electrogénico como Slc5a12 podrían estar involucrados en el transporte renal de urato⁵³.

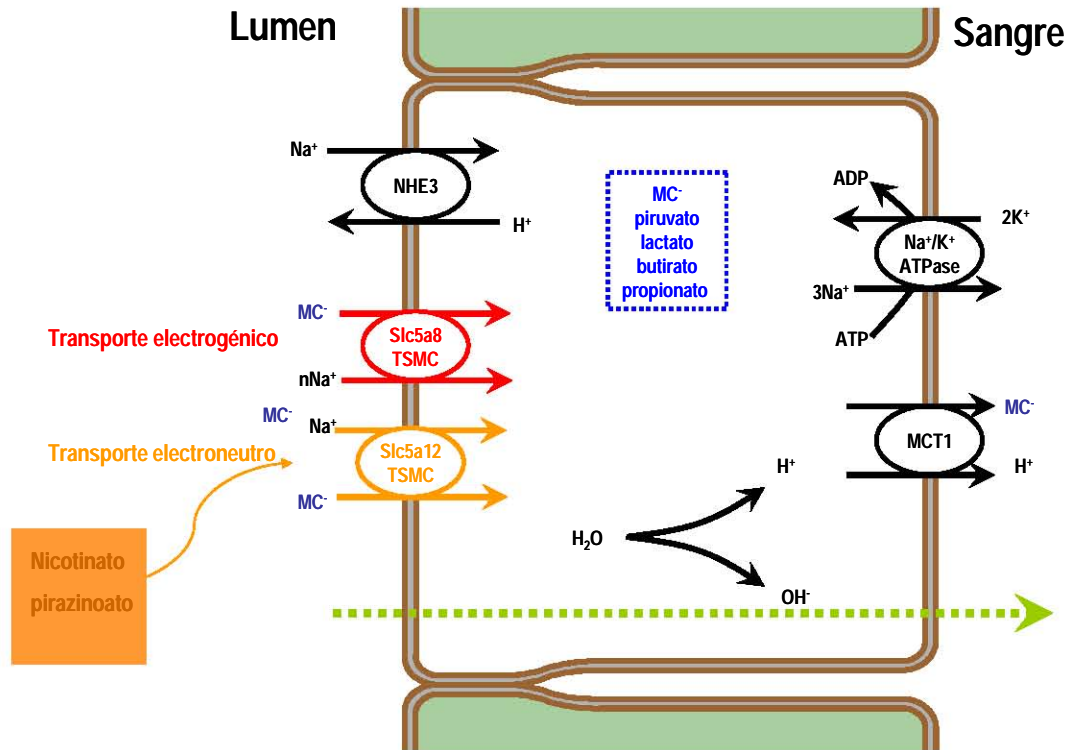


Fig. 4. Esquema que ilustra la reabsorción de monocarboxilatos en las células del túbulo proximal de la nefrona.

Durante décadas la excreción renal de urato se había explicado por el modelo de 4 componentes: filtración glomerular, reabsorción del ultrafiltrado, secreción y un mecanismo de reabsorción postsecretoria⁵⁸. La creación de este modelo deriva del

análisis del efecto de fármacos anti-uricosúrico (disminuyen su excreción) e uricosúricos (que aumentan la excreción) en el transporte renal de urato.

En diversos estudios la administración de pirazinamida, PZA, (un anti-uricosúrico) disminuye considerablemente la excreción urinaria de uratos ⁵⁹, sin embargo, cuando se coadministraba con agentes uricosúricos el efecto de éstos se veía dramáticamente disminuido por el efecto de PZA ⁵⁸⁻⁶⁰. Este efecto del PZA solo podía ser explicado con el modelo de 4 componentes, donde el punto clave radicaba en asumir que el efecto del anti-uricosurico del PZA reside en la inhibición de la secreción de urato del túbulo proximal ⁶¹ y no en su reabsorción como se había propuesto anteriormente ^{59,62}.

De ésta manera el modelo postuló que la mayor parte del urato excretado deriva de su secreción, puesto que después de la administración de PZA, solo 1-2% del urato es excretado en la orina. Al quedar muy poca cantidad de urato en el fluido tubular después de la “inhibición de la secreción de uratos” la reabsorción es despreciable, por lo que la inhibición de la reabsorción por uricosúricos solo pude inducir un pequeño aumento en la excreción de uratos ^{58,60,63}.

Sin embargo, este modelo no concuerda con el hecho de que el PZA no tiene efecto en la secreción de urato en animales que utilizan ese proceso como su único mecanismo para excretar urato ⁶⁴. Aunado a esto, existen evidencias fisiológicas que sugieren que el efecto del PZA no corresponde a una inhibición de la secreción de urato, sino más bien a un aumento en la reabsorción ⁶⁵.

Los recién identificados TSMC son capaces de transportar PZA, lactato β -hidroxibutirato y acetoacetato ^{20-22,47}, substratos de URAT-1 ⁶⁶. Debido a que se ha observado que el transporte dependiente de sodio de lactato o PZA resulta en una estimulación de la captación de urato vesicular vía URAT-1 ⁶⁵, se ha propuesto que los TSMC podrían estar involucrados en la generación de un gradiente para el intercambiador de urato-aniones URAT-1 ^{14,67,68}.

De hecho, apoyando éste modelo Mount y colaboradores ⁶⁹ observaron recientemente que la co-expresión en ovocitos de *Xenopus laevis* de TSMC electrogénico y URAT-1 en presencia de PZA y Na⁺ resulta en un aumento considerable de la captación de urato a diferencia de los ovocitos que expresan solamente URAT-1, o que fueron inyectados con agua.

Por otro lado, Thangaraju et al. diseñaron un modelo de doble knockout para TSMC electrogénico y el TSMC electroneutro. Este modelo es un ratón homocigoto para el factor de transcripción c/ebp delta que abate la transcripción renal de ambos transportadores. En este modelo, ellos demostraron que hay un aumento en la excreción de lactato, así como un decremento en los niveles sanguíneos de éste, en los ratones c/ebpdelta^{-/-}. De manera interesante, también se observó un aumento en la excreción de lactato independiente de la expresión de URAT-1 ⁵⁷.

Dichas evidencias aunadas al hecho de que tanto TSMC electrogénico como TSMC electroneutro, se han localizado por hibridización in situ en diferentes segmentos del túbulo proximal ²², al igual que URAT-1, han sugerido a los TSMC como posibles responsables de la acumulación de aniones luminal necesaria para la reabsorción de urato ^{53,69}.

El modelo de la figura 5 ejemplifica el posible papel de los TSMC en la reabsorción de urato. La entrada de aniones monovalentes (MCs) por los TSMC (electrogénico y electroneutro) estimula la reabsorción de urato luminal vía el intercambiador de aniones URAT1, y la secreción apical de éste debe de ocurrir a través de MRP4 mediante un sistema dependiente de ATP, o bien por un transporte electrogénico sensible a voltaje vía OATv1 y/o UAT1. Por otro lado, la entrada basolateral de urato via OAT1 (Slc22a6) y/o OAT3 (Slc22a8) durante la secreción del túbulo proximal, es estimulada por la captación acoplada a Na⁺ del anión divalente α -cetoglutarato vía Slc13a3. La identidad de las vías de salida de urato durante la reabsorción se desconoce.

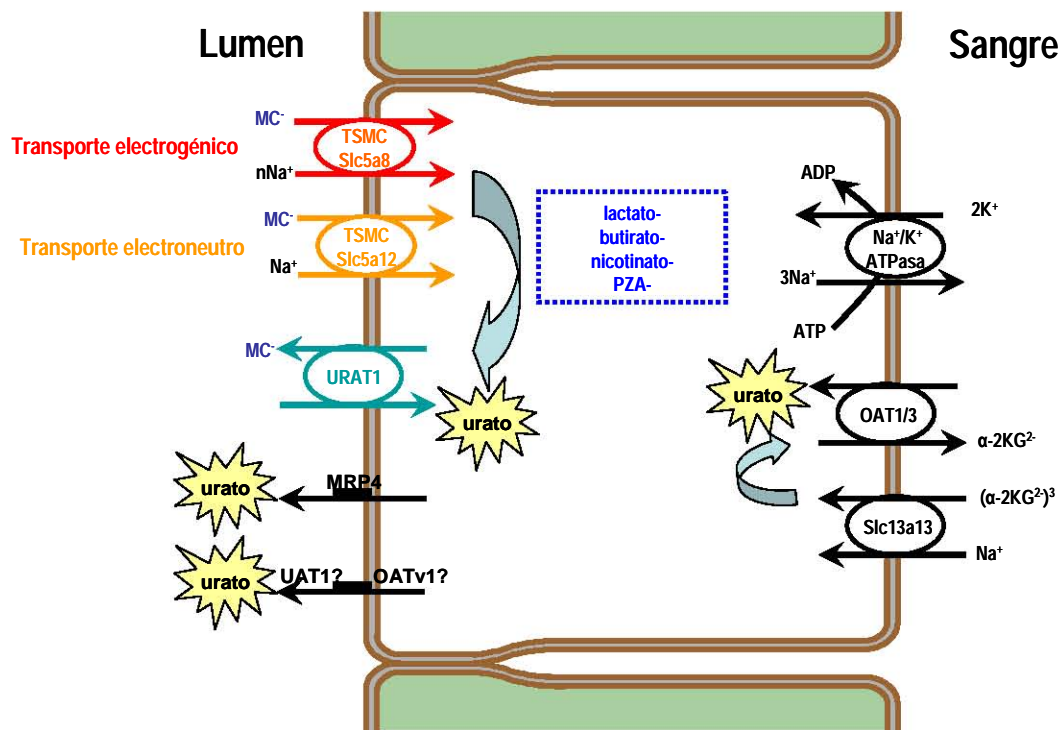


Fig. 5. Esquema de los mecanismos del transporte de urato en el túbulo proximal.

La relevancia fisiopatológica de la interacción de los TSMC con URAT-1 se evidencia en la hiperuricemia que se presenta tanto en la cetoacidosis diabética ^{70,71} como en la intoxicación por alcohol ⁷², puesto que en ambas circunstancias existe un aumento en la concentración de aniones luminales; en caso de la cetoacidosis diabética existe un incremento de β- hidroxibutirato y acetoacetato, mientras que en la intoxicación por alcohol, hay un aumento de lactato. Además, el tratamiento con nicotinato para la hipercolesterolemia ^{41,73} así como el tratamiento con PZA para la tuberculosis ^{74,75} puede complicarse con hiperuricemia.

TSMC en el colon

En colon la función de los TSMC se ha asociado al igual que en el riñón, con procesos de reabsorción, pero además, en el caso del TSMC electrogénico, con funciones anticancerígenas ^{20,21,41,51,52,76,77}.

La absorción de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) en el ciego y en el colon es un proceso muy eficiente siendo solamente excretados en las heces del 5 al 10% ⁷⁸. Ésta se ha visto acoplada a la absorción de sodio y a la excreción de bicarbonato por lo que se especula que los TSMC en el colon deben de participar en este proceso ⁵².

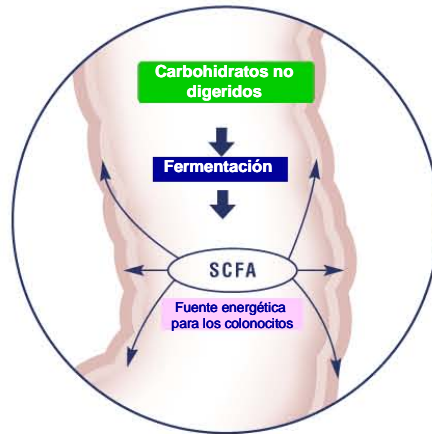
Los SCFAs se componen de 1 a 6 átomos de carbono y representan los principales aniones producto de la fermentación bacteriana de los polisacáridos, oligosacáridos, proteínas, péptidos y precursores de glicoproteínas en el colon ⁷⁹ (fig. 6A).

El efecto principal de los SCFAs es en el metabolismo de los colonocitos, aunque también son substratos metabólicos para otros tejidos. Sin embargo, la función de los SCFAs se extiende más allá de su papel como nutrientes para el epitelio del colon puesto que se ha observado que participan también como moduladores del pH intracelular colonico así como del volumen celular y como reguladores de proliferación, diferenciación y expresión génica ⁷⁸⁻⁸⁰ (fig. 6B).

De manera interesante se ha asociado la cantidad total de SCFAs y las diferencias de concentración de éstos en cada región en el colon con patologías tales como cáncer y desordenes gastrointestinales ⁸⁰⁻⁸³. El butirato, en particular, ha sido uno de los SCFAs más estudiado puesto que se ha visto que puede jugar un papel importante en la prevención de estas enfermedades.

El butirato se ha visto involucrado en procesos celulares relacionados con carcinogénesis tales como la supresión de la proliferación celular, la inducción de la apoptosis e inflamación. Los efectos anticancerígenos de éste se han asociado a la inhibición que ejerce sobre las desacetilasas de histonas ^{84,85}. En general, los inhibidores de desacetilasas de histonas ocasionan un arresto en la proliferación celular y apoptosis en una variedad de tumores y son considerados como agentes potenciales terapéuticos para el tratamiento del cáncer ⁸⁶.

A



I

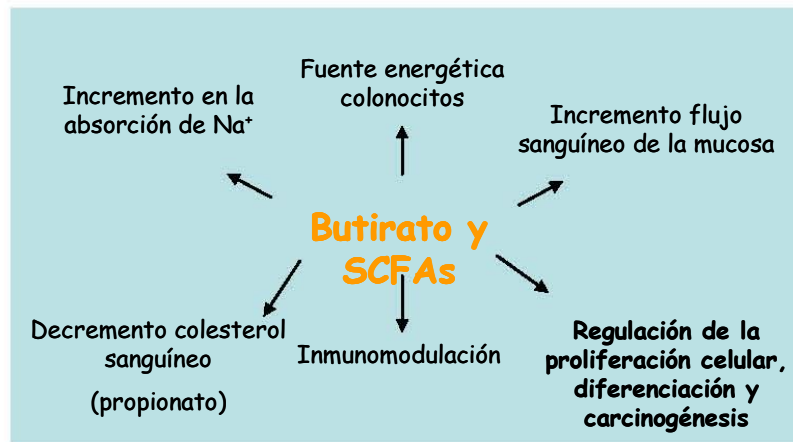


Fig.6. Esquema que ilustra el papel de los SCFAs en el colon y su relevancia fisiológica.

El butirato es uno de los substratos que transporta el TSMC electrogénico²⁰⁻²². De manera interesante se ha documentado que el gen *Slc5a8*, que codifica para el TSMC electrogénico se encuentra silenciado por un evento de hipermetilación de las islas CpG en diversos tipos de cáncer en humanos, entre ellos en un 60% de líneas celulares de cáncer de colon^{41,51}. Dado que numerosos estudios han asociado los niveles de butirato con un decremento en la incidencia de cáncer de colon, se ha sugerido que el posible papel de *Slc5a8* como gen tumor supresor en el colon radique en el transporte de este SCFA⁵².

TSMC en otros tejidos

Como se mencionó anteriormente, el gen *Slc5a8* se encuentra silenciado en otros tipos de cánceres tales como cáncer de tiroides²⁸, cáncer gástrico³⁰ y gliomas⁸⁷ sin embargo, su papel como gen tumor supresor no se ha estudiado a profundidad. Dado que el cotransportador fue identificado inicialmente como transportador apical de iodo, AIT,³⁴ sabemos que en la tiroides éste puede mediar el transporte de este ion.

TSMC y su relación con el sistema inmune

Recientemente se caracterizaron receptores específicos acoplados a proteínas G cuyos ligandos son los SCFAs⁸⁸⁻⁹⁰. Dado que estos se expresan en células inmunes en la lamina propia, y que la concentración de los SCFAs en el lumen del colon son muy altas, se ha sugerido que los TSMC podrían facilitar la transferencia transcelular de estos ácidos grasos del lumen a la lamina propia donde las células inmunes residen, proveyendo así una conexión entre la flora intestinal y el sistema inmune³³. Ningún estudio se ha llevado a cabo a este respecto.

TSMC y su relación con el nicotinato y las dislipidemias

El nicotinato, mejor conocido como niacina, es una vitamina soluble del complejo B, denominada B3. La niacina es utilizada por el organismo para formar NAD requerido por varias enzimas para las reacciones de oxido-reducción, sin embargo, terapéuticamente éste es utilizado como un fármaco lipídico de amplio espectro aunque puede presentar reacciones secundarias como rash.

Utilizado en dosis altas, el nicotinato tiene la propiedad de disminuir los niveles de las lipoproteínas que son consideradas como factores de riesgo para enfermedades coronarias, aterosclerosis y diabetes (VLDL, VDL y triglicéridos), así como de elevar los niveles de la lipoproteína protectora de alta densidad HDL. Por esta razón el nicotinato se ha usado como una droga en el tratamiento de dislipidemias^{91,92}.

Se han propuesto varias hipótesis acerca del mecanismo de acción de ésta vitamina, sin embargo, la más factible parece ser la inhibición de la lipólisis en el tejido adiposo que

resulta en una disminución en ácidos grasos libres (FFAs), precursores importantes para los triglicéridos hepáticos disponibles para la síntesis de VLDL, y por consiguiente de LDL. Ésta hipótesis, sin embargo requiere que el ácido nicotínico sea inmediatamente absorbido por el tejido adiposo ^{91,92}.

Los TSMC transportan nicotinato con afinidades y capacidades diferentes, y se ha sugerido que el nicotinato pueda estar compitiendo por el sitio de unión a los monocarboxilatos en TSMCz electroneutro reduciendo así la absorción de ácidos grasos de cadena corta en tejido que expresan TSMC o MCTs en hiperlipidemias ²².

Por otro lado el TSMC electrogénico se ha localizado en adipositos de rata (datos no publicados), al igual que el recién identificado receptor de nicotinato (GPR109A/PUMAG) ⁹³. Dado que en el genoma humano, GPR109A se localiza en 12q24.31 ⁹⁴ y el Slc5a8 en 12q22-24 ⁴¹ es factible pensar que la actividad de estas proteínas podría estar coordinada.

De manera interesante, el β -hidroxibutirato sustrato de los TSMC es capaz de inhibir la lipólisis vía el receptor de ácido nicotínico PUMA-G ⁹⁵, sugiriendo así un mecanismo homeostático durante largos periodos de ayuno en los que éste regula negativamente su propia producción previniendo la cetoacidosis y promoviendo la utilización eficiente de los lípidos almacenados. Hasta la fecha, se desconoce si los TSMC o los receptores de monocarboxilatos GPR41 y GPR43 que también se expresan en adipositos están involucrados en éste mecanismo.

ANTECEDENTES

Caracterización en pez cebra de los cotransportadores Na^+ /monocarboxilatos TSMCz electroneutro y electrogénico

Aunque el pez cebra y el humano están muy distantes de la escala evolutiva de vertebrados, es un modelo que nos permite comparar la función de ciertos órganos y tejidos, especialmente el corazón, riñón, páncreas, huesos y cartílagos.

Dado que el pez cebra es un modelo ampliamente utilizado para el estudio de la embriogénesis, así como de la proliferación celular, Plata y colaboradores²² se dieron a la tarea de identificar los cotransportadores de Na^+ /monocarboxilatos en éste organismo con el objeto de elucidar posteriormente algunas de las funciones fisiológicas de estos transportadores durante el desarrollo.

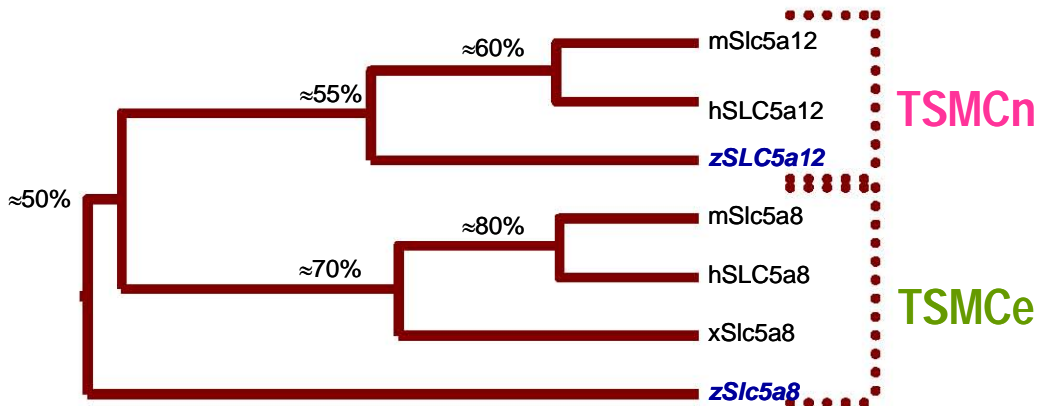


Figura 7. Esquema que ilustra la homología de los TSMCs. mSlc5a12, hSLC5a12, zSLC5a12 (TSMC electroneutro murino, humano y del pez cebra) mSlc5a8, hSLC5a8, xSlc5a8, zSlc5a8 (TSMC electrogénico murino, humano, de rana, y del pez cebra). (Figura modificada a partir de Plata et al.²², 2007).

Así Plata y colaboradores²² identificaron, localizaron y caracterizaron funcionalmente dos cotransportadores diferentes de Na^+ /monocarboxilatos (TSMC) del pez cebra (*Danio rerio*), uno electrogénico, TSMCz electrogénico, homólogo al posible gen supresor de tumores en humanos Slc5a8, y un nuevo cotransportador electroneutro, TSMCz electroneutro, ortólogo del miembro 12 de la familia de Na^+ /glucosa Slc5²², previamente reportado como un segundo cotransportador electrogénico de Na^+ /monocarboxilatos⁵⁶.

Al realizar un estudio con el motor de búsqueda BLAST para encontrar cDNAs homologos al del TSMC electrogénico, se observó que dos secuencias de *Danio reiro* compartían al menos un 50% de homología con la del TSMCh electrogénico. El TSMCz, homólogo al gen tumor supresor hSlc5a8, codifica para una proteína de 610 aa, mientras que un nuevo cotransportador el TSMCz eletroneutro codificado por el gen Slc5a12 posee 623 aa. El TSMCz electrogénico y TSMCz eletroneutro tienen entre ellos una homología de secuencia del 46%. En la figura 7 se puede observar que estos dos transportadores de monocarboxilatos forman una rama independiente en ésta familia y que ambas secuencias de TSMCz son 50% idénticas a las de humano y ratón Slc5a8, mientras que TSMCz eletroneutro presenta un 65% de identidad. La longitud de las líneas horizontales representa la distancia evolutiva de cada clona.

El análisis de estructura secundaria para el TSMCz eletrogénico predice 13 dominios transmembrana al igual que para el TSMCh. Éste presenta 3 sitios potenciales de N-glicosilación en las asas extracelulares en los residuos de asparagina (N112, N439, N485). Los sitios potenciales de fosforilación comprenden 19 residuos de serina, 8 de treonina, y el de 4 tirosina, sin embargo solo 7 de serina (S477, S523, S541, S556, S568, S570, S588), 2 de treonina (T75, T84) y uno de tirosina (Y80) se encuentran en las asas intracelulares y por lo tanto son sitios de fosforilación probables.

Al igual que para el TSMCz eletrogénico, el análisis de estructura secundaria para el TSMCz eletroneutro predice una estructura de 13 dominios transmembranales con dos sitios de glicosilación posibles (N478, N614). Los sitios de fosforilación probables que se encuentran en asas intracelulares corresponden a 7 residuos de serina (111, 216, 232, 266, 303, 314, 379, 547, 597) 3 de treonina (217, 495, 587) y dos de tirosina (12, 82).

Aunque en la familia humana Slc5, solo se habían reportado 11 miembros ²⁴, un análisis de BLAST realizado en este estudio, identificó un posible ortólogo humano al TSMCz eletroneutro ²². Adicionalmente, Srinivas et al. ⁵⁶ reportaron una clona de ratón homóloga al TSMCz eletroneutro por lo que la existencia de homólogos de mamífero no queda descartada.

La función de los TSMCz fue analizada por la medición simultánea del potencial de membrana (V_m) y pH intracelular (pH_i) o concentración intracelular de sodio ($[Na^+]_i$) con microelectrodos en ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con cRNA de TSMCz eletrogénico o TSMCz eletroneuro. Para medir las corrientes generadas en presencia de monocarboxilatos se utilizó la técnica de voltaje clamp con dos electrodos ²².

Efecto de la función de los TSMCz en el pH intracelular

Al igual que Coady et al. ²⁰, Plata et al. ²² observaron que los ovocitos inyectados con el TSMCz eletrogénico y el TSMCz eletroneuro mostraron una alcalinización celular después de la adición de monocarboxilatos, en especial con propionato o butirato. Ésta alcalinización es mayor en los ovocitos inyectados con el TSMCz eletroneuro ($\Delta pH = 0.48 \pm 0.07$, $n=6$) que en los ovocitos inyectados con TSMCz eletrogénico ($\Delta pH = 0.27 \pm 0.02$, $n=7$). Solo el TSMCz eletrogénico y el TSMCh eletrogénico, son capaces de ocasionar una depolarización celular en presencia de monocarboxilatos.

Identificación funcional de los TSMCz como transportadores de Na^+ /monocarboxilatos

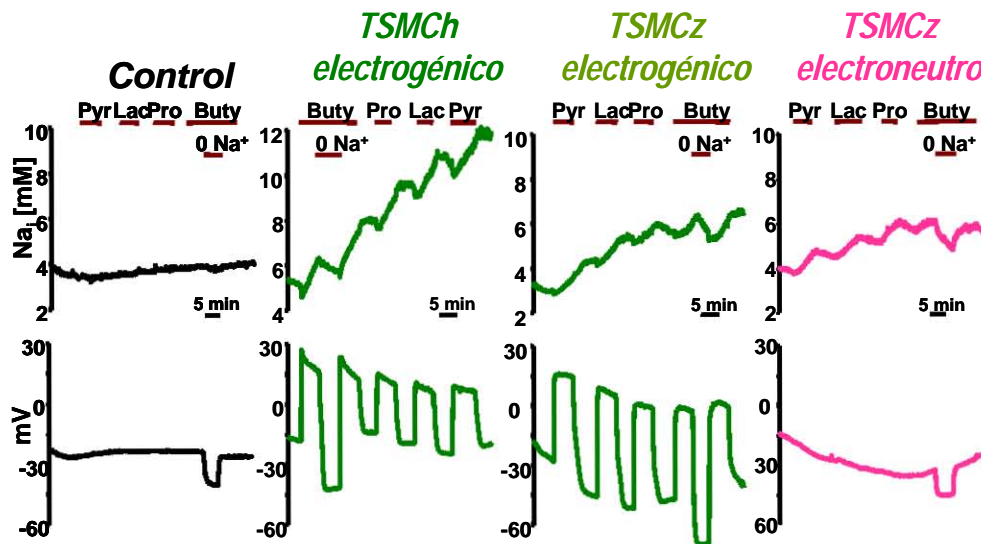


Fig. 8. Gráficos que muestran la medición simultánea del incremento en la $[Na^+]_i$ y cambios en el potencial de membrana en ovocitos inyectados con cRNA TSMC en presencia de 1mM de monocarboxilatos y Na^+ . (Negro, control; verde, TSMC electrogénicos de humano y del pez cebra; rosa, TSMC electroneuro del pez cebra). Figura modificada a partir de Plata et al ²², 2007

Para determinar si los TSMCz eran capaces de transportar monocarboxilatos se midieron simultáneamente los cambios $[Na^+]_i$ en presencia de 1mM de éstos en ovocitos control e inyectados TSMCs eletrogénico y TSMCz eletroneutro. Como se puede observar en el panel superior de la figura 8 todos los MCs indujeron un aumento en la $[Na^+]_i$ en ambos TSMCz en comparación con los ovocitos inyectados con agua ($\Delta[Na^+]_i^{TSMCz\ eletrogénico} = 2.76 \pm 0.29$ mM n=8, $\Delta[Na^+]_i^{TSMCz\ eletroneutro} = 2.28 \pm 0.33$ mM n=9, $\Delta[Na^+]_i^{H_2O} = 0.47 \pm 0.2$ mM n=9), este incremento fue menor que el observado en la clona de humano TSMCz eletrogénico ($\Delta[Na^+]_i^{TSMCh\ eletrogénico} = 3.47 \pm 0.77$ mM). El incremento de $[Na^+]_i$ es dependiente de la presencia del $[Na^+]_{extracelular}$.

En el panel inferior de la misma figura se observan los cambios de potencial de membrana inducidos por la presencia de 1mM de monocarboxilatos y Na^+ . En los ovocitos inyectados con TSMCh eletrogénico y TSMCz eletrogénico, en presencia de algún MC, se observó un cambio en el potencial de membrana pero no en TSMCz eletroneutro ni en los ovocitos inyectados con agua ²².

El cambio en el potencial de membrana en los ovocitos inyectados con el TSMCz y el TSMCh, (codificados por el gen respectivo Slc5a8) en presencia de MC, sugiere que éstos son transportadores de Na^+ /monocarboxilatos eletrogénicos, mientras que el TSMCz eletroneutro (codificado por el Slc5a12) es un transportador eletroneutro por no mostrar cambio alguno en éste. Plata et al. ²² corroboraron esta diferencia midiendo las corrientes generadas en presencia de Na^+ y butirato 1mM. Como se esperaba solo el TSMCz eletrogénico fue capaz de generar una corriente de -250 nA. Cuando se removió el Na^+ esta corriente desaparece. Por el contrario, el TSMCz eletroneutro, no es capaz de generar una corriente en concentraciones de 1-40mM de lactato o nicotinato ²².

En estudios cinéticos, midiendo los cambios de la $[Na^+]_i$ con la técnica de electrodo ion selectivo y con la técnica de expresión funcional con ²² Na^+ , se observó que el TSMCz eletroneutro tiene baja afinidad para lactato y nicotinato con respecto al TSMCz eletrogénico. La K_m para el lactato y el nicotinato se calculó a partir de mediciones en la generación de corriente en presencia de diferentes concentraciones de estos substratos

con 96mM de Na⁺. Ellos demostraron que la afinidad de TSMCz electroneutro para el lactato y el nicotinato es ~10 veces y ~30 veces menor que la afinidad del TSMCz eletrogénico por estos sustratos ²².

Plata y colaboradores ²² también mostraron que ambos TSMCz pueden transportar cuerpos cetónicos como aceto-acetato y β hidroxibutirato. El TSMCz electroneutro presenta una menor afinidad por el β hidroxibutirato que el TSMCz eletrogénico.

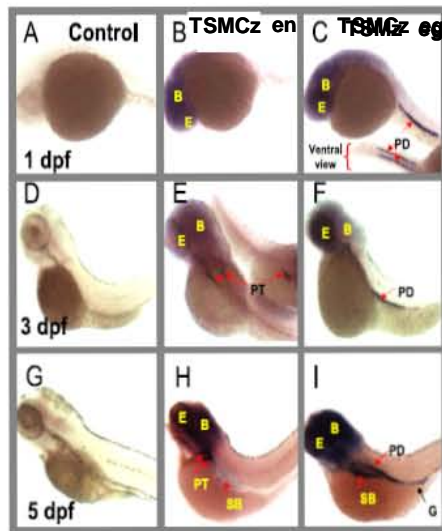


Figura 9. Fotografías que ulstran los patrones de expresión del RNAm de los TSMCz en embriones del pez cebra. Hibridación in situ de embriones completos del pez cebra de 1, 3 y 5 días post fertilización. Panel A, D y G controles, B, E, H; TSMCz en (electroneutro) y C, F, I, TSMCz eg (eletrogénico). En amarillo B (cerebro), E (ojo); en negro y flechas rojas PD (ducto pronefrótico), PT (túbulo pronefrótico), SB (vejiga de nado), G (intestino). Plata et al. ²² 2007.

La distribución de los TSMCz se determinó por hibridación in situ en embriones de pez cebra con una sonda de RNAc marcada con digoxigenina respectiva para TSMCz eletrogénico y TSMCz electroneutro. Como se puede observar en la fig. 9 se detectó la presencia de TSMCz en cerebro y ojo en embriones de 24 h, 3 días y 5 días después de la fertilización (dpf). De manera interesante TSMCz eletrogénico se encuentra localizado en la posición distal del intestino embrionario en 5dpf, no así TSMCz electroneutro. Los TSMCz se encuentran ambos en la estructura correspondiente al riñón embrionario, los pronefros, sin embargo, el TSMCz electroneutro se encuentra en el túbulo pronefrótico a partir de los 3 dpf (región proximal de los pronefros), mientras que TSMCz eletrogénico

se encuentra en los ductos pronefróticos desde las 24 h dpf (región más distal de los pronefros).

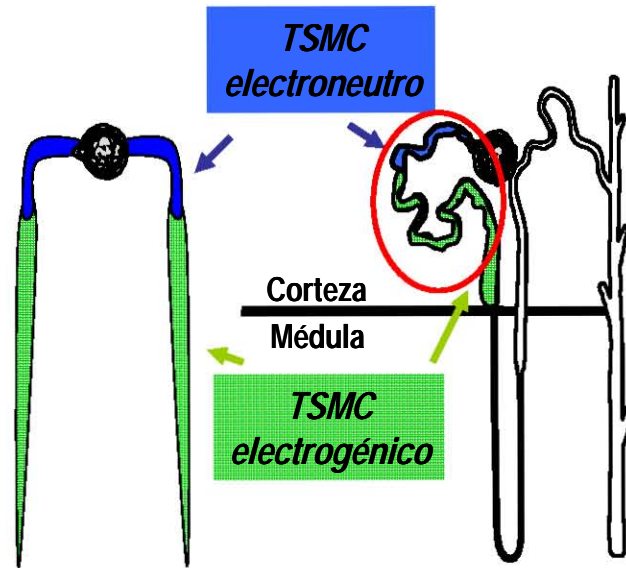


Fig.10 Esquema que ilustra el papel fisiológico de los TSMz en el riñón. El túbulo proximal de la nefrona (encirculado en rojo) reabsorbe MCs de dos maneras: $1\text{Na}^+:1\text{MC}$ realizado por el TSMn electroneutro (*azul*) en el túbulo proximal temprano, y $n\text{Na}^+:1\text{MC}$ vía el TSMe electrogénico (verde) en el túbulo proximal tardío (Figura modificada a partir de Plata et al.²² 2007).

Esta distribución heterogénea a lo largo de los pronefros correlaciona con las diferencias en afinidad de ambos transportadores. El TSMCz electroneutro que tiene una menor afinidad por los MCs se encuentra en una región más proximal donde la concentración del substrato en el fluido tubular es mayor, mientras que el TSMCz electrogénico se encuentra en una región más distal donde la concentración de MCs en el túbulo es menor²² (fig. 10).

Dada su reciente caracterización, poco se sabe de la regulación de la función de éstos transportadores. Coady y colaboradores así como Itagaki y colaboradores^{20,96} reportaron una disminución de la función en presencia del antiinflamatorio no esteroideo ibuprofeno y del anticonvulsivante valproato, sin embargo hasta la fecha no se ha estudiado el efecto de otros AINES sobre la actividad del transportador.

Por otro lado, ningún estudio se ha llevado a cabo sobre la posible regulación de la actividad de los TSM por proteínas cinasas; sin duda el estado de fosforilación de los transportadores podría modificar su actividad.

HIPÓTESIS

1. El TSMCh electrogénico es inhibido por antiinflamatorios no esteroideos como el ibuprofeno, naproxeno y ketoprofeno, así como el anticonvulsivo valproato. Posiblemente éstos disminuyan la función de TSMCz electrogénico, y TSMCz electroneutro con cinéticas diferentes.
2. Tanto el TSMCz electrogénico como el electroneutro tienen aminoácidos potenciales a ser fosforilados por PKA, PKC y cinasas de residuos tirosina por lo que posiblemente el estado de fosforilación de ellos juegue un papel importante en su función.

OBJETIVOS

1. Validación de los ensayos de captación de $^{22}\text{Na}^+$ en ovocitos de *Xenopus laevis* como un modelo de estudio de la función tanto del cotransportador electroneutro y electrogénico del pez cebra.
2. Valoración del efecto de fármacos antiinflamatorios no esteroideos naproxeno, ketoprofeno e ibuprofeno, así como del anticonvulsivante valproato sobre la función tanto del TSMCz electrogénico, como del TSMCz electroneutro realizando curvas dosis respuesta.
3. Estudiar el efecto de la activación de las vías de fosforilación para la PKA, PKC sobre la función de los TSMCz electrogénico y electroneutro.

METODOLOGIA

El siguiente trabajo incluye técnicas de biología molecular y análisis de expresión funcional en ovocitos de *Xenopus laevis*.

Extracción de DNA

Se transformaron células ultracompetentes de *Escherichia coli* XL-10 Gold (Stratagene) mediante choque térmico con el plásmido pGEM-HE que contiene un templado de la secuencia para el TSMCz electrogénico (apéndice A). De la misma manera se realizó lo mismo con la construcción PGEM-HE/TSMCz electroneutro y con PT7-T3/TSMCh electrogénico. Posteriormente, se extrajo el DNA de cada clona por medio de la realización de minipreps (apéndice B). La calidad del DNA se verificó por medio de un gel de agarosa para DNA (apéndice C).

Síntesis in vitro de cRNA TSMCz electrogénico, TSMCz electroneutro y del TSMCh electrogénico

Para la síntesis in vitro de RNAc de los transportadores TSMCz electrogénico, TSMCz electroneutro y TSMCh electrogénico, el cDNA de cada clona fue linearizado previamente en el extremo 3' con EcoRI para TSMCh electrogénico y Nhe I para TSMCz electrogénico y TSMCz electroneutro respectivamente (apéndice D). La digestión se corroboró por medio de un gel de agarosa para DNA (apéndice C); el RNAc se sintetizó in vitro utilizando el estuche de reactivos T7 mMessage mMachine de Ambion (apéndice E).

La calidad del RNAc se corroboró mediante electroforesis en gel de agarosa/formaldehído al 1% (apéndice F). La concentración se midió por espectrofotometría a 260 nm (Beckman). Para obtener una concentración de 0.5ng/nl se llevaron a cabo las diluciones de las clonas utilizando H₂O biología molecular.

Extracción de ovocitos e inyección del RNAc

Los lóbulos de ovocitos fueron removidos de una rana hembra *Xenopus laevis* por cirugía. La rana fue anestesiada 30 min con triclaína 0.17% (etil 3 aminobenzoato de

metano sulfonato). Los ovocitos disectados se colocaron en una solución salina libre de calcio (200mOsm), y se sometieron a un tratamiento con colagenasa. Se seleccionaron solamente ovocitos maduros, correspondientes al estadio V-VI. Posteriormente, éstos fueron colocados en solución salina ND96 filtrada (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 5 mM Hepes-Tris, pH 7.4) y desfoliculados manualmente (apéndice G).

Los ovocitos fueron inyectados con 50 nl de RNAc a 0.5 ng/nl (25 ng/ovocito) de las respectivas clonas (TSMCz electrogénico, TSMCz electroneutro y TSMCh electrogénico) o agua. Éstos se mantuvieron a 18 °C en medio ND96 filtrado.

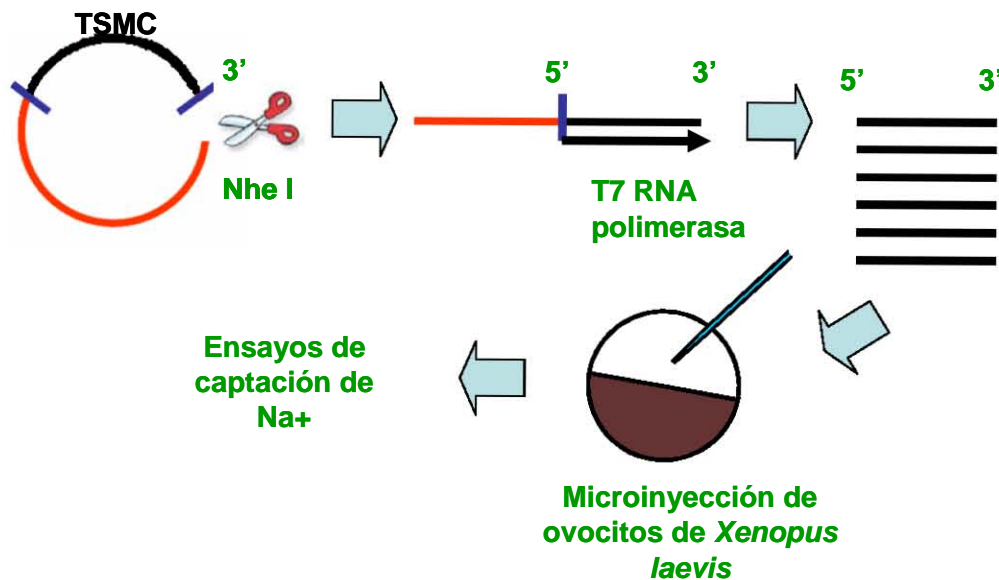


Fig.11 Representación esquemática de las técnicas utilizadas en la metodología para la obtención del RNAc y su microinyección en ovocitos de *Xenopus laevis*.

Ensayos de expresión funcional

La valoración de la función de los cotransportadores TSMCz electrogénico y electroneutro, así como del TSMCh electrogénico, se realizó mediante la medición de la captación del isótopo radioactivo ²²Na⁺ con los ovocitos inyectados con el RNAc de cada clona bajo el siguiente protocolo.

Los ovocitos (n=15 a 20 por grupo/por ensayo) se incubaron en ND96 en presencia de ouabaína (1 mM) y amiloride (100 mM) y bumetanida (1 mM) durante un periodo de 30 min en agitación. Todos los grupos se incubaron posteriormente a 30 °C durante una hora

en una solución de ND96 con las drogas mencionadas anteriormente (ouabaína, amiloride y bumetanida) pero con $2.0\mu\text{ Ci/ml}$ de $^{22}\text{Na}^+$. Adicionalmente, a los grupos experimentales se les agregaron monocarboxilatos (1-2 mM) (butirato, propionato, lactato, piruvato). Los grupos control (ovocitos inyectados con agua) siguieron el mismo protocolo de incubación.

Al finalizar el periodo de captación, los ovocitos fueron lavados con ND96 frío y colocados en tubos para un contador de radiaciones beta. Los ovocitos fueron lisados con SDS al 10% y se les agregó 1ml de líquido de centelleo. La captación de $^{22}\text{Na}^+$ se determinó en un contador de radiaciones beta (Beckman) (apéndice J).

Caracterización farmacológica

La valoración del efecto de los fármacos, ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno y valproato sobre la función de los cotransportadores TSMCz electrogénico, TSMCz electroneutro, TSMCh electrogénico, se realizó mediante la medición de la captación del isótopo radioactivo $^{22}\text{Na}^+$ en presencia de diferentes monocarboxilatos con los ovocitos inyectados con el cRNA de cada clona. En los grupos experimentales además de la adición de monocarboxilatos se agregaron los fármacos antes mencionados a diferentes concentraciones para el estudio cinético. Los grupos control se expusieron a las mismas condiciones que los grupos experimentales.

Efecto de la activación de la PKA y la PKC

El análisis del estudio del efecto de la activación de la PKA sobre la función de los transportadores TSMC se llevó a cabo por medio de la utilización de activadores de la PKA tales como el análogo permeable del AMPc, el dibutilil AMPc a una concentración de 1 mM y del inhibidor de fosfodiesterasas isometil-butiril-metilxantina, IBMx [1 mM], así como del inhibidor H89 N-[2-((p-2bromocinamil) etil)-5-isoquinolinesulfonamida).

Para el análisis del efecto de la activación de la PKC, se utilizaron dos ésteres de forbol, el acetato de forbol-12-miristato, TPA, que es un activador permeable de ésta cinasa, y el 13-didecanoato de forbol, 4α PDD, que tiene una estructura similar pero que no tiene la capacidad de activar a la PKC. Se utilizaron inhibidores específicos de ésta cinasa como el bisindolilmaleimida, BIS, así como de substratos río debajo de la PKC como el UO126

[1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis (2-aminofeniltio) butadieno] que puede inhibir a MEK (Calbiochem, MERK).

Durante el ensayo de expresión funcional, los activadores e inhibidores en ambos estudios fueron agregados en la solución de precaptación en ausencia de los monocarboxilatos, y durante la captación en presencia de éstos.

Gráficas y análisis estadístico

Los resultados obtenidos de los experimentos de expresión funcional están representados en gráficas de barras, cada una de las cuales corresponde al valor promedio obtenido para cada grupo de ovocitos inyectados con la clona correspondiente. En todos los experimentos los ovocitos inyectados con el RNAc de los TSMC en presencia de monocarboxilatos presentaron un incremento significativo de la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en relación con el grupo de ovocitos control inyectado con agua y en relación a los grupos en los que no se adicionaron monocarboxilatos.

En el eje de las ordenadas (Y) se muestra la media \pm el error estándar de la captación de $^{22}\text{Na}^+$ expresada como pmol/ovocito/h.

Las pruebas estadísticas usadas para analizar los resultados obtenidos fueron análisis de varianza de una vía (ANOVA), con múltiple comparación usando las pruebas de corrección de Bonferroni.

RESULTADOS

Caracterización de los sustratos

Con el objeto de mostrar que el estudio de la función de ambos TSMCz, el electroneuro y el electrogénico, puede ser analizado a través de la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con RNAc de ambas clonas, y que este puede ser un buen método para comparar la función de ambos, realizamos ensayos funcionales con los monocarboxilatos propionato, butirato, piruvato y lactato.

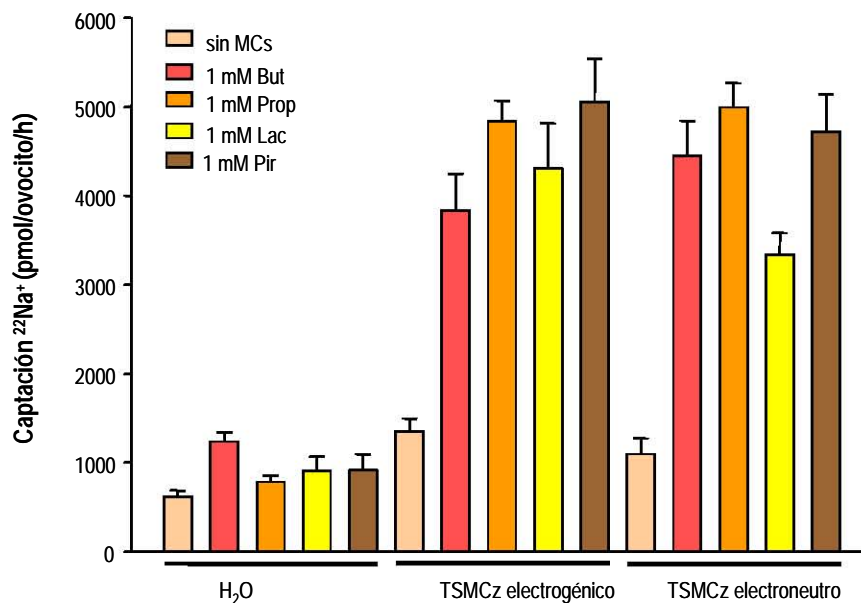


Fig. 12 Gráficas que ilustran la caracterización de los sustratos por ensayos de captación de $^{22}\text{Na}^+$ en presencia de 1 mM de diferentes monocarboxilatos (MCs). Ovocitos inyectados con H₂O o cRNA de TSMCz electrogénico o electroneuro. Sin monocarboxilatos (beige), 1 mM de butirato (rojo), 1 mM de propionato (naranja), 1 mM de lactato (amarilla), 1 mM de piruvato (café).

	H ₂ O		TSMCz electrogénico		TSMCz electroneuro	
butirato	n=14	1234±106	n=13	3835±407	n=13	4443±396
propionato	n=16	781±73	n=12	4838±231	n=9	4993±272
lactato	n=14	901±168	n=14	4305±506	n=14	3339±239
piruvato	n=14	913±178	n=14	4719±416	n=14	4719±416

Tabla 1. Promedio de la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en presencia de 1 mM de diferentes monocarboxilatos (pmol/ovocito/hora).

Como se observa en la fig. 12, tanto los ovocitos inyectados con 25 ng de RNAc del TSMCz eletrogénico como los inyectados con la misma cantidad de RNAc del TSMCz electroneutro aumentan la concentración de $^{22}\text{Na}^+$ en presencia de 1 mM de monocarboxilatos. La captación de $^{22}\text{Na}^+$ es significativamente distinta en los ovocitos inyectados con cRNA del TSMCz eletrogénico y TSMCz electroneutro en presencia de 1mM de butirato, propionato, lactato, piruvato a los inyectados con H_2O (Tabla 1)

Para determinar el tiempo óptimo de captación de $^{22}\text{Na}^+$ se realizó una curva de tiempo en presencia de 2 mM de propionato. Como se puede observar en la fig. 13 en una hora, la actividad de ambos transportadores se encuentra en fase lineal, por lo que la captación de $^{22}\text{Na}^+$ se realizó a este tiempo en los siguientes experimentos.

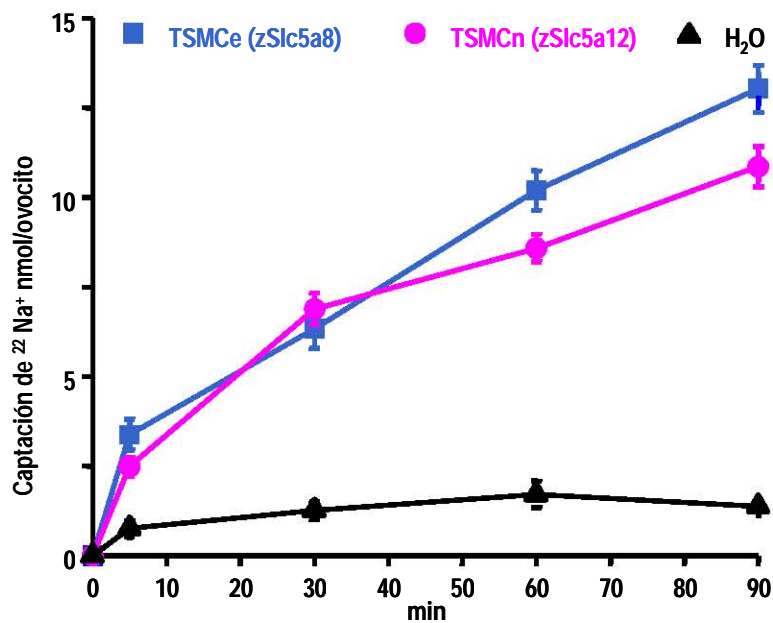


Fig. 13 Curva de tiempo de captación de $^{22}\text{Na}^+$ en presencia de 2 mM de propionato. Ovocitos inyectados con H_2O (negro) o cRNA del TSMC eletrogénico (azul) o TSMC electroneutro (rosa). n=20 ovocitos/grupo.

Con el objeto de estudiar las diferencias en afinidad de ambos TSMCz para los monocarboxilatos, usando la captación de $^{22}\text{Na}^+$, realizamos una cinética de piruvato para para los monocarboxilatos, usando la captación de $^{22}\text{Na}^+$, realizamos una cinética de piruvato para ambos transportadores y corroboramos que el TSMCz electroneutro

presenta una menor afinidad ($K_m=2.031 \pm 0.3552$) que el TSMCz electrogénico ($K_m=0.340 \pm 0.06279$) (fig.14).

Una vez que establecimos que el estudio de la función de ambos TSMC puede ser analizado a través de la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con cRNA de ambas clonas, se inició el estudio del efecto de algunos analgésicos no esteroideos (AINES) como el ibuprofeno, naproxeno y ketofroneno así como del anticonvulsivante valproato. Además iniciamos el estudio del efecto de la activación de la PKC, PKA.

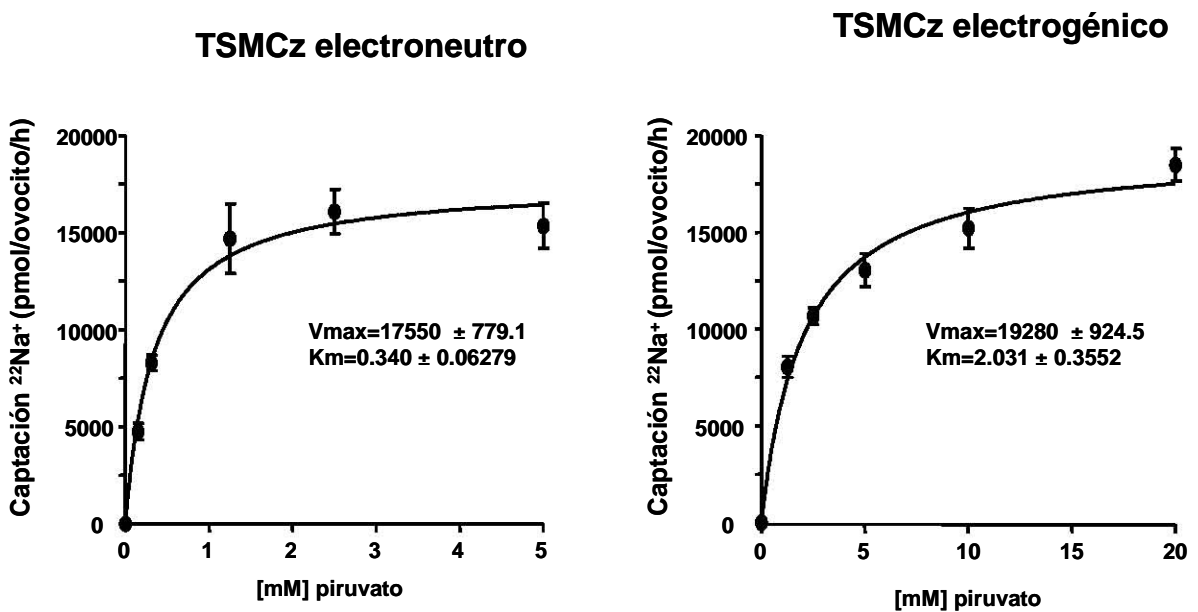


Fig. 14 Cinética de piruvato. Captación de $^{22}\text{Na}^+$ en presencia de 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM y 5 mM de piruvato en ovocitos inyectados con cRNA de TSMz electrogénico o TSMz electroneuro. n=20 ovocitos/grupo.

Caracterización farmacológica

En este trabajo valoramos el efecto de los AINES, (naproxeno, ibuprofeno y ketoprofeno) y del anticonvulsivante valproato (fig.15) sobre la función de TSMCz electrogénico y electroneuro, así como del TSMCh electrogénico por medio de ensayos funcionales de captación de $^{22}\text{Na}^+$.

Como se observa en las figs. 16 y 17 el naproxeno, el ibuprofeno ketoprofeno y el valproato, todos a una concentración de 3mM, son inhibidores de la función de TSMCz electrogénico TSMCh electrogénico y TSMCz electroneuro.

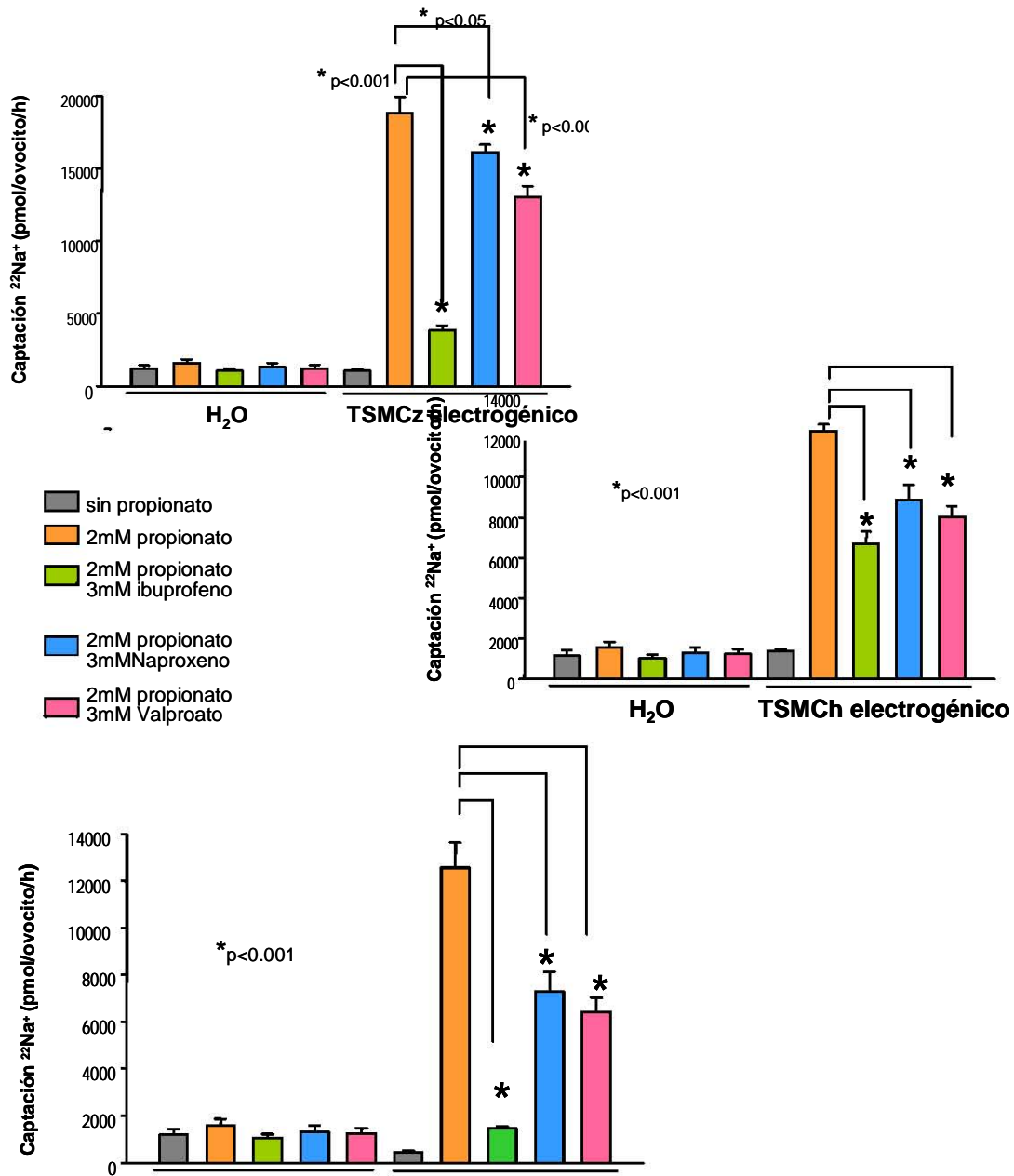


Fig. 16. Efecto de los AINES (naproxeno e ibuprofeno) y del valproato sobre la función de los TSMC. Captación de $^{22}\text{Na}^+$ en presencia de 2mM de propionato con o sin naproxeno 3mM, ibuprofeno 3mM o valproato 3mM (MCs). Ovocitos investados con H₂O o cRNA de TSMCz. TSMCh electrogenicos. o TSMCz electroneutral.

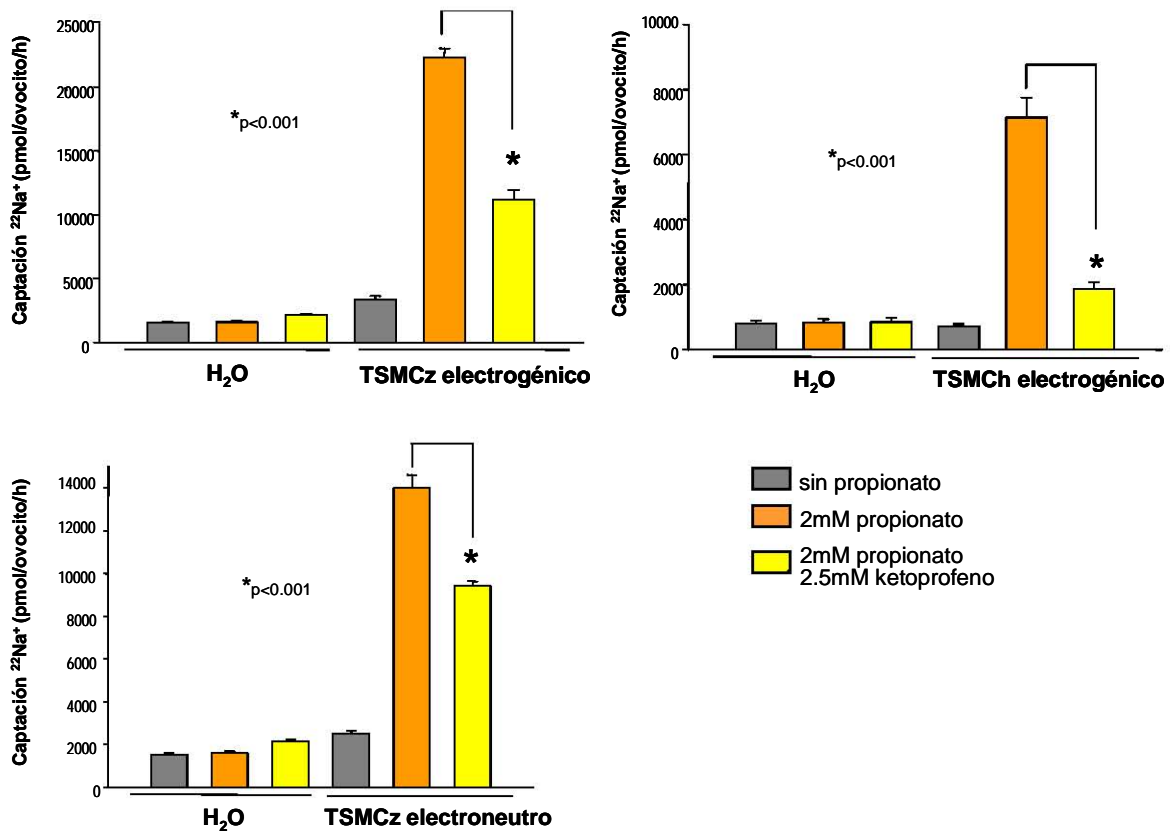


Fig.17 Gráfica que ilustra el efecto del AINE ketoprofeno sobre la función de los TSMC. Captación de $^{22}\text{Na}^+$ en presencia de 1mM de propionato con o sin ketoprofeno 2.5 mM. Ovocitos inyectados con H_2O o cRNA de los TSMCz y TSMCh.

		TSMCh electrogónico		TSMCz electrogónico		TSMCz electroneuro	
ibuprofeno	-	n=13	12287±320	n=15	18788±1137	n=13	12570±1089
	+	n=14	6686±611	n=14	3804±401	n=13	1449±94
naproxeno	-	n=13	12287±320	n=15	18788±1137	n=13	12570±1089
	+	n=13	8874±737	n=16	16104±517	n=14	7277±848
valproato	-	n=13	12287±320	n=15	18788±1137	n=13	12570±1089
	+	n=13	8043±538	n=14	13031±737	n=13	6404±848
ketoprofeno	-	n=18	6354±610	n=19	22366±667	n=19	14008±606
	+	n=20	1077±196	n=18	11219±740	n=18	9423±224

Tabla 2. Promedio de la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en presencia de 3mM de diferentes inhibidores (pmol/ovocito/hora).

El ibuprofeno reduce a más del 50% la actividad de todos los TSMC. Mientras que el ketoprofeno reduce al 50% a ambos TSMC electrogénicos, no así al electroneuro (fig. 17). La inhibición tanto por naproxeno, como por valproato resultó estadísticamente significativa en un análisis por ANOVA (Tabla 2).

Para determinar si el efecto de los inhibidores era dosis dependiente se realizaron curvas dosis respuesta. En la fig.18 se observa la curva dosis respuesta a ibuprofeno utilizando concentraciones de 1 mM-3 mM. Para cada clona se determinó la K_i siendo aproximadamente de 0.2 mM para TSMCz electroneuro, 0.6 mM para el TSMCz electrogénico y 0.8 mM para el TSMCh electrogénico. Adicionalmente se realizó una curva dosis respuesta al ketoprofeno utilizando concentraciones de 0 a 5 mM. La K_i aproximada para los TSMC fue de 0.6 mM para TSMCh electrogénico, 1.2 mM para TSMCz electroneuro y para la TSMCz electrogénico 5 mM (fig. 20).

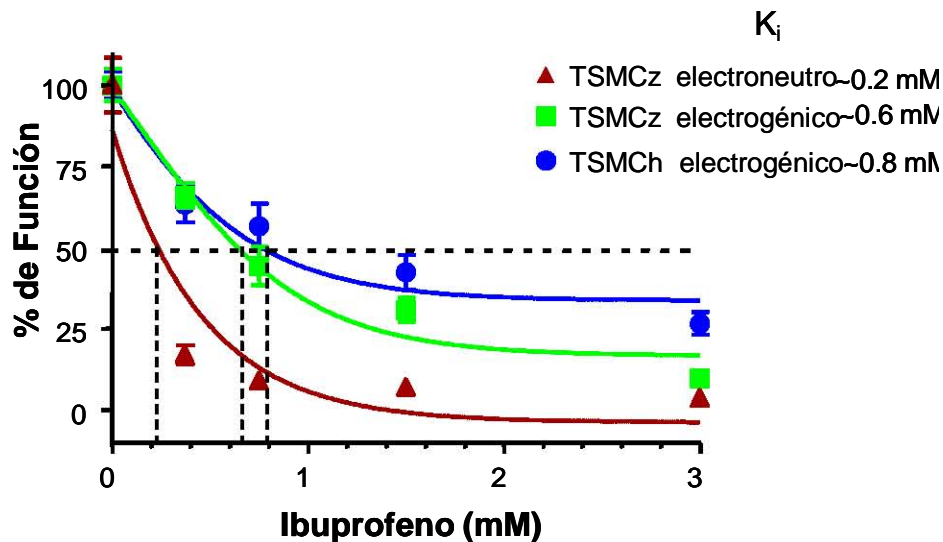


Fig. 18 Gráfico que muestra el efecto dosis respuesta de captación de $^{22}\text{Na}^+$ en presencia de 2 mM de propionato y 3 mM de ibuprofeno. Ovocitos inyectados con cRNA de TSMh (azul), TSMz electrogénico (verde) y TSMz electroneuro (rojo). n=20 ovocitos/grupo.

De la misma manera se realizó una curva dosis respuesta al valproato, en ésta no fue posible determinar la K_i para los TSMC debido a que las concentraciones que utilizamos (1-5 mM) no reducen completamente la actividad del transportador (fig.20).

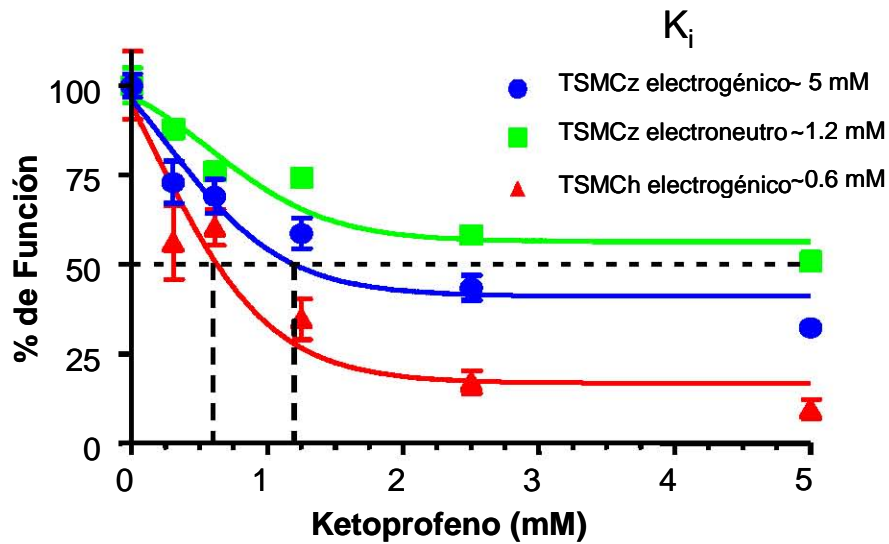


Fig. 19. Gráfico que muestra el efecto dosis respuesta de captación de $^{22}\text{Na}^+$ en presencia de 2 mM de propionato y 2.5 mM de ketoprofeno. Ovocitos inyectados con cRNA de TSMh electrogénico (rojo), TSMz electrogénico (azul) y TSMz electroneutro (verde). n=20 ovocitos/grupo

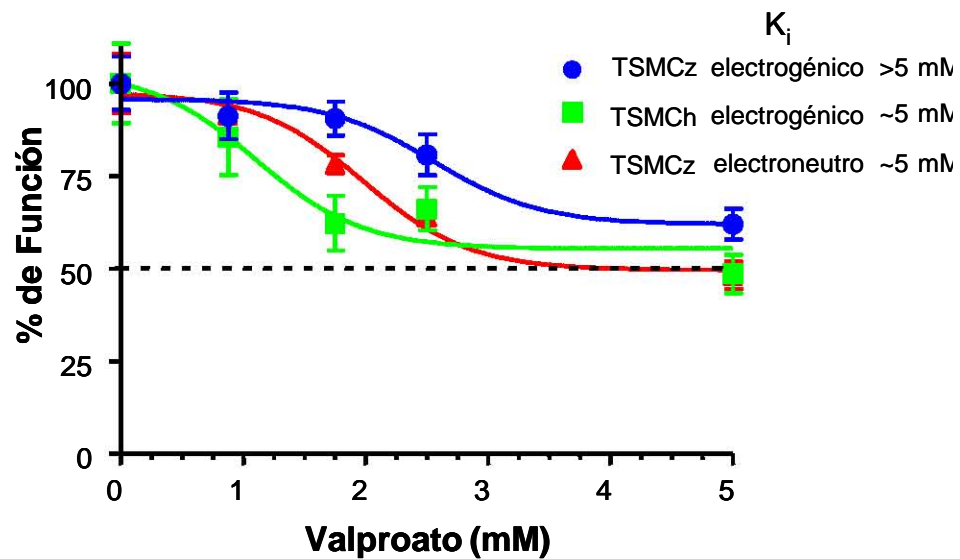


Fig. 20 Curva dosis respuesta de captación de $^{22}\text{Na}^+$ en presencia de 2 mM de propionato y 3 mM de valproato. Ovocitos inyectados con cRNA de TSMCh (azul), TSMCz electrogénico (verde) y TSMCz electroneutro (rojo). n=20 ovocitos/grupo.

Análisis de secuencia de los posibles sitios de fosforilación por PKA y PKC

TSMCz electrogénico y electroneutro así como el TSMCh electrogénico, tienen, aminoácidos potenciales a ser fosforilados por PKA, PKC y cinasas de residuos de tirosina en la zona carboxiterminal, por lo que posiblemente la fosforilación o

desfosforilación de ellos jueguen un papel importante en la función de dichos transportadores ²².

Se realizaron análisis detallados de secuencia para determinar los posibles sitios de fosforilación en estos transportadores. En estos análisis se identificaron inicialmente todos los sitios posibles de fosforilación en estos transportadores, un segundo estudio analizó los sitios específicos probables para la PKA y la PKC y se determinó de igual manera las regiones transmembrana y las regiones intracelulares. Los residuos de serina y de treonina que proponemos como posibles sitios de fosforilación para estas cinasas, son aquellas que corresponden a sitios de fosforilación predichos por ambos análisis y que se encuentran en las asas intracelulares de los TSMC.

TSMz electrogénico / Slc5a8 (*Danio reiro*)

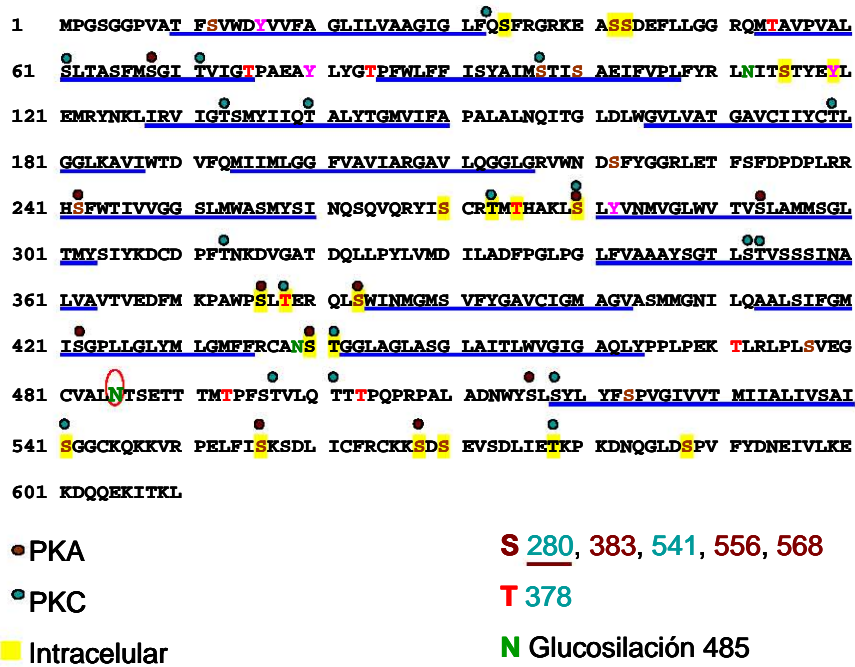


Fig 21. Secuencia de aminoácidos del TSMCz electrogénico. Subrayado en azul, regiones transmembrana, en amarillo regiones intracelulares. Circulo rojo, residuos fosforilables por PKA, circulo azul, residuos potenciales fosforilables por PKC. N, sitios de glucosilación. S, serinas, T, treoninas.

Para evaluar el efecto de la activación de proteínas cinasas tales como PKA, PKC se analizó la función de los TSMCz utilizando activadores e inhibidores de ambas vías en ensayos de expresión funcional.

Como se puede observar en la fig.21 en el TSMCz eletrogénico las serinas 280 y 541 son blanco de fosforilación para la PKC, mientras que los residuos de serina 383, 556 y 568 son blancos potenciales de PKA. Adicionalmente se identificó un sitio de glucosilación en el residuo 485.

El análisis de secuencia para el TSMCh eletrogénico reveló tres residuos de treonina que pueden ser fosforilados por PKC (T 41, 543*, 557*) y 5 residuos de serina S (269, 279*, 542*, 576, 60). El TSMCh eletrogénico tiene adicionalmente tres serinas blanco para PKA (114, 375*, 377*) y la serina 279 que también es blanco de PKC (fig. 22).

TSMh eletrogénico / Slc5a8 (*Homo sapiens*)

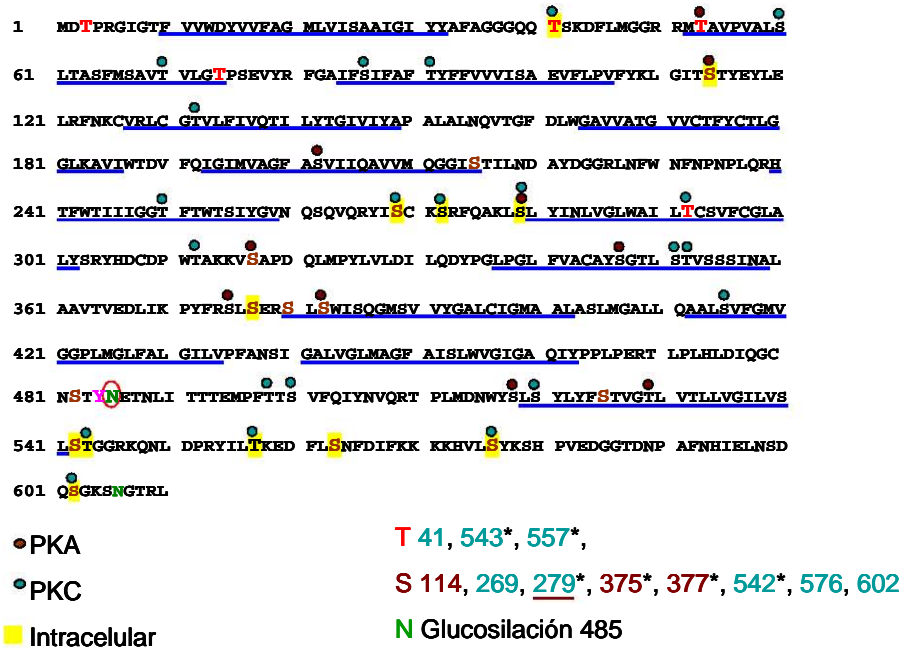


Fig 22. Secuencia de aminoácidos del TSMCh eletrogénico. Subrayado en azul, regiones transmembrana, en amarillo regiones intracelulares. Circulo rojo, residuos fosforilables por PKA, circulo azul, residuos fosforilables por PKC. N, sitios de glucosilación. S, serinas, T, treoninas. * Posibles sitios de fosforilación que no fueron predichos por uno de los dos análisis (el general o el específico).

La fig. 23 muestra el análisis de secuencia para el TSMCz electroneutro. Los residuos de treoninas que son potenciales blancos de fosforilación por PKC son T 349*, 359*, 587*, mientras que las serinas corresponden a los residuos 348*, 374*, 379, 547, el residuo 243 aparece como posible sitio de fosforilación tanto en el análisis de fosforilación en general, como en el análisis específico para PKC, sin embargo, se encuentra en una región transmembrana. Los residuos que pueden ser fosforilados por la PKA corresponden a las T 50* y 597.

TSMz electroneutro / Slc5a12 (*Danio reio*)

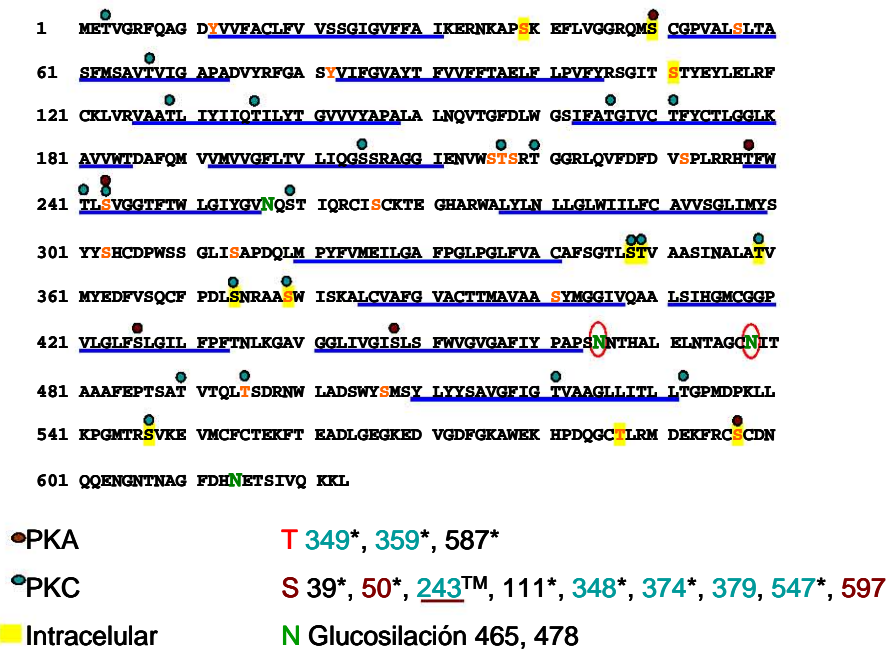


Fig 23. Secuencia de aminoácidos del TSMCz electroneutro. Subrayado en azul, regiones transmembrana, en amarillo regiones intracelulares. Circulo rojo, residuos fosforilables por PKA, circulo azul, residuos fosforilables por PKC. N, sitios de glucosilación. S, serinas, T, treoninas. * Posibles sitios de fosforilación que no fueron predichos por uno de los dos análisis (el general o el específico)

Efecto de la activación de la PKC

Es bien sabido que los ésteres de forbol pueden activar la PKC. Uno de los esteres de forbol más utilizados para activar la PKC en ensayos de expresión funcional en ovocitos de *Xenopus laevis* es el TPA⁹⁷ (ver apéndice I).

Para estudiar si la activación de la PKC tiene un efecto sobre la función de los TSMC, realizamos ensayos de captación de $^{22}\text{Na}^+$ en presencia de 10^{-7}mM de TPA.

Como se puede observar en la fig. 24 el TPA reduce significativamente ($p \leq 0.001$) la función tanto de los TSMC de pez cebra como el de humano (Tabla 3). La reducción de la función por TPA es dosis dependiente (fig.25).

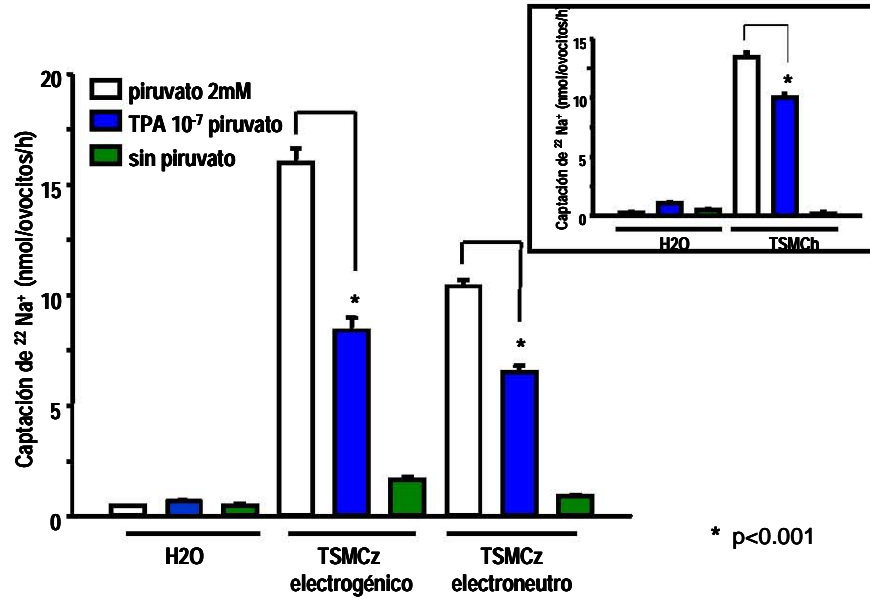


Fig. 24 Gráficas que ilustran el efecto de la activación de la PKC por TPA sobre la actividad de los TSMC. Captación de $^{22}\text{Na}^+$ en presencia de 2mM de piruvato en presencia de 10^{-7}mM de TPA. Ovocitos inyectados con H2O o cRNA de TSMCz electrogénico, TSMCz electroneuro o TSMCh.

		TSMCh electrogénico	TSMCz electrogénico	TSMCz electroneuro
TPA	-	n=15 13385 ± 579	n=76 16001 ± 637	n=61 10411 ± 289
	+	n=13 11256 ± 520	n=69 8406 ± 584	n=73 6517 ± 312

Tabla 3. Promedio de la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en presencia de TPA (pmol/ovocito/hora).

Un ester de forbol que no es capaz de activar la PKC es el $4\alpha\text{PDD}$. Éste es utilizado a la par que el TPA como un control negativo. Por otra parte existen compuestos que pueden inhibir la función de la PKC tales como el BIS, y algunos otros que inhiben substratos río abajo, tal es el caso del U0126 que inhibe a MECK⁹⁷.

Dado que la acción del TPA es reversible, evaluamos el efecto de inhibidores tales como BIS y U0126 sobre la inhibición que ejerce el TPA sobre la función de los TSMC y utilizamos el ester de forbol $4\alpha\text{PDD}$ como un control negativo.

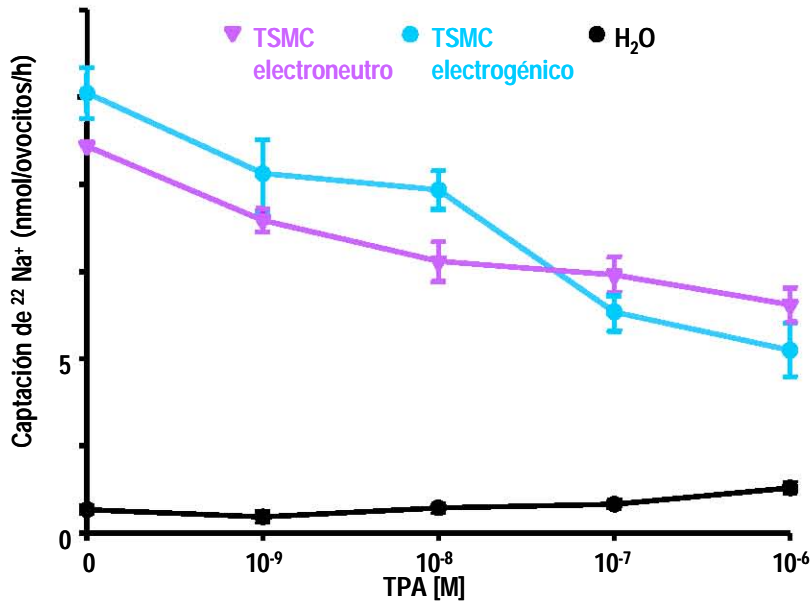


Fig. 25 Gráfica del efecto dosis respuesta de captación de $^{22}\text{Na}^+$ en presencia de 2 mM de propionato y TPA (0-10-6M). Ovocitos inyectados con cRNA de TSMCz electrogénico (azul) y TSMCz electroneutro (morado). n=20 ovocitos/grupo.

		TSMCz electrogénico		TSMCz electroneutro	
TPA	-	n=16	22637 ± 452	n=11	10685 ± 287
	+	n=18	15261 ± 762	n=8	8360 ± 335
BIS		n=16	15840 ± 1478	n=8	12292 ± 610
U0126		n=17	16579 ± 970	-	-

Tabla 4. Promedio de la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en presencia de TPA y/o inhibidores de la vía de la PKC, BIS o UO126 (pmol/ovocito/hora).

El efecto inhibitorio del TPA sobre la función del TSMCz electroneutro es revertido por inhibidores de PKC (BIS) (fig.26). Sin embargo, como se puede observar en la fig. 27, el efecto del TPA sobre la función del TSMCz electrogénico (TSMCz electrogénico) no es revertido por inhibidores de PKC (BIS) o MECK (U0126) (Tabla4).

Por otro lado, en la figura 27 se observa que el efecto inhibitorio del TPA sobre el TSMC electrogénico se debe a su propiedad de activar la vía de la PKC ya que la captación de $^{22}\text{Na}^+$ no es significativamente distinta en los ovocitos con propionato al que fue agregado 4αPDD, sin embargo no observamos el mismo efecto con el TSM electroneutro.

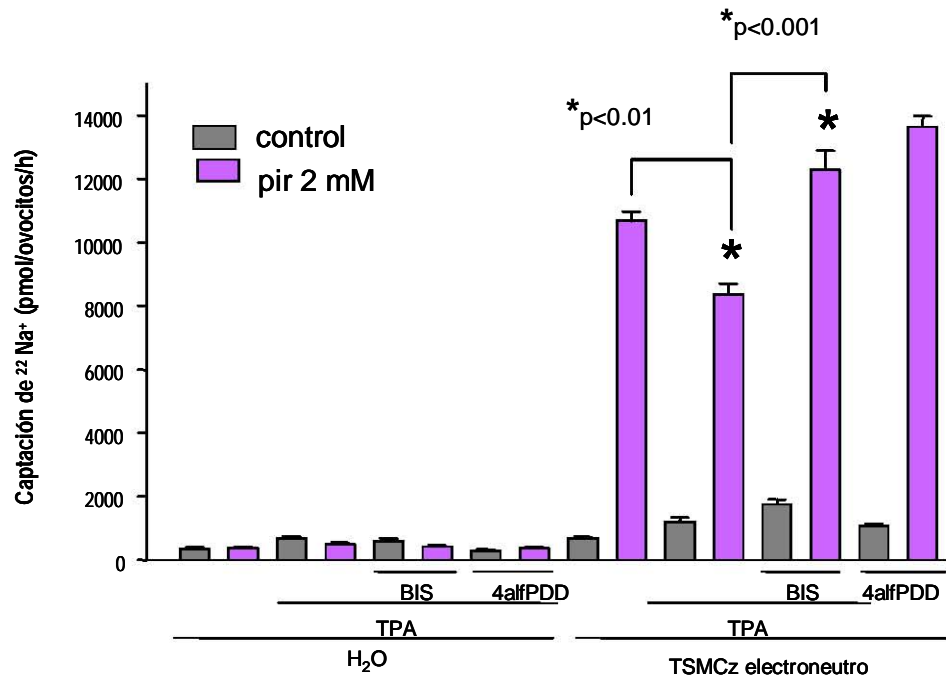


Fig. 26 Gráfica que ilustra el efecto del inhibidor BIS sobre la disminución de la función inducida por TPA. Captación de $^{22}\text{Na}^+$ en presencia de 2mM de piruvato en presencia de 10^{-7} mM de TPA, BIS y $4\alpha\text{PDD}$. Ovocitos inyectados con H_2O o cRNA de TSMCz electroneuro.

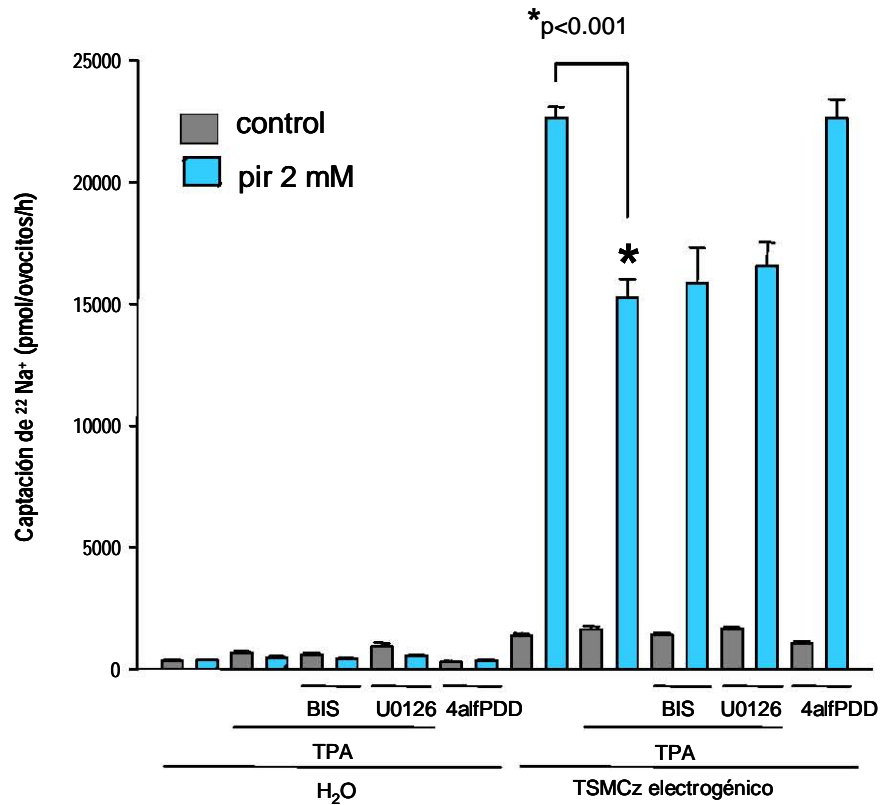


Fig. 27 Gráfica que ilustra el efecto del inhibidor BIS y UO126 sobre la disminución de la función inducida por TPA. Captación de $^{22}\text{Na}^+$ en presencia de 2 mM de piruvato en presencia de 10^{-7} mM de TPA, BIS y $4\alpha\text{PDD}$. Ovocitos inyectados con H_2O o cRNA del TSMCz electrogénico.

Efecto de la activación de PKA

La activación de la PKA requiere de la unión del AMPc a las subunidades reguladoras de ésta para ocasionar un cambio conformacional que libere y active a las dos subunidades catalíticas. Una vez activada las subunidades catalíticas pueden fosforilar residuos de serinas y/o treoninas de sustratos en el citosol y en el núcleo ⁹⁸ (ver apéndice J).

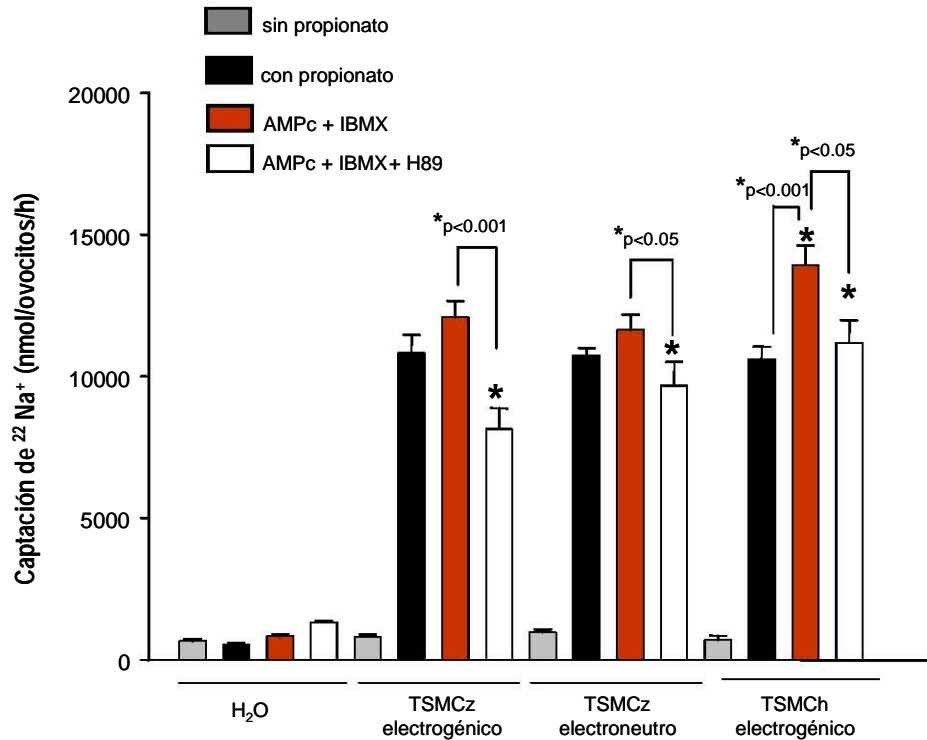


Fig.28 Efecto de la activación de la PKA por AMPc sobre la actividad de los TSMC. Captación de ²²Na⁺ en presencia de 2mM de propionato en presencia de AMPc y/o H89. Ovocitos inyectados con H₂O o RNAc de TSMCz electrogénico, TSMCz electroneutro y TSMCh electrogénico.

		TSMCh electrogénico	TSMCz electrogénico	TSMCz electroneutro
AMPc+IBMX	-	n=49 10603±446	n=50 10823±638	n=36 10744±257
	+	n=46 13932±687	n=53 12081±575	n=37 11635±551
AMPc+IBMX+H89		n=32 11178±804	n=32 8137±738	n=20 9675±835

Tabla 5. Promedio de la captación de ²²Na⁺ en presencia de TPA y/o inhibidores de la vía de la PKC, BIS o UO126 (pmol/ovocito/hora).

El IBMX es un compuesto permeable que inhibe de manera no específica a las fosfodiesterasas de AMPc y GMPc, mientras que el H-89 es un potente inhibidor selectivo permeable, ampliamente utilizado para la PKA ⁹⁷.

Para estudiar el efecto de la activación de la PKA realizamos ensayos de captación de ²²Na⁺ en presencia de un análogo permeable de AMPc, el dibutilil AMPc (1 mM) y del inhibidor de fosfodiesterasas isometil-butiril-metilxantina, (1 mM) IBMx para potenciar su efecto. Posteriormente se trato de revertir el posible efecto del AMPc con el inhibidor H89.

En presencia del análogo de AMPc, hay un aumento en la actividad del TSMCh eletrogénico estadísticamente significativo; éste efecto es reversible con la adición del inhibidor H89. Por otro lado, la función de los TSMCz no se ve afectada en presencia de AMPc aunque se observa una ligera tendencia. La reducción de la función en presencia de H89 es estadísticamente significativa con respecto a los grupos de actividad basal y al que se le agregó AMP (fig. 29 y tabla 5).

DISCUSIÓN

Los TSMC están involucrados en una gran gama de funciones biológicas importantes. En el colón, estos transportadores participan en la absorción de monocarboxilatos como son los ácidos grasos de cadena corta ^{22,33}, en el riñón ambos TSMCs son responsables de la absorción de monocarboxilatos como el lactato y nicotinato, así como probablemente de la generación del gradiente para la reabsorción de uratos ^{22,33,47,53,57}, mientras que en la glándula tiroides es probable que estén involucrados en el transporte de iodo de los tirocitos al lumen. Sin embargo además de la importancia metabólica que representa la reabsorción de estos componentes energéticos, el TSMC electrogénico ha sido denominado como un posible gen supresor de tumores que se encuentra silenciado en cáncer de colon ⁴¹, cáncer gástrico ³⁰ tiroides ²⁸ y gliomas ⁴².

Además de las clonas de TSMC de humano y ratón, recientemente se clonaron y localizaron los TSMC del pez cebra ⁹⁹ con el propósito de obtener un modelo útil para el estudio de la función de éstos transportadores y su papel en procesos de proliferación celular y cáncer.

A la fecha no se ha reportado ningún estudio acerca de la regulación de la función de éstos transportadores. Aunque se han identificado que algunos fármacos como AINES y el anticonvulsivante valproato ^{20,96} pueden inhibir la función del TSMCh, poco se sabe acerca del efecto de otros compuestos de estructura similar ni de los mecanismos de fosforilación que puedan estar involucrados en su regulación.

El presente trabajo aborda el estudio de la función y posible regulación de los TSMCz y del TSMCh mediante ensayos de expresión funcional en ovocitos de *Xenopus laevis*. Dado que uno de los TSMC es de carácter electrogénico y otro de carácter electroneutro, la captación del isótopo radiactivo ²²Na⁺ en ovocitos inyectados con RNAc de cada clona es un buen modelo para estudiar la función de ambos transportadores. A diferencia de la técnica de pinzamiento de voltaje (*voltage clamp*), donde resultaría difícil establecer una comparación entre ambos transportadores dado a la ausencia de corriente iónica por parte

del TSMC electroneutro, la captación de $^{22}\text{Na}^+$ permite evaluar a ambos en un mismo experimento.

Nuestros datos mostraron que los ovocitos inyectados con 25 ng de RNAC del TSMCz electrogénico, como los inyectados con RNAC del TSMCz electroneutro, aumentaron la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en presencia de 1mM de propionato, butirato, piruvato y lactato a diferencia de los ovocitos inyectados con H_2O , confirmando los estudios anteriores en las clonas de humano y ratón validando así nuestro modelo (fig 12).

Por otro lado, en este estudio observamos que el TSMCz electroneutro tiene una menor afinidad por el piruvato ($K_m=2.031 \pm 0.3552$) en comparación con el TSMCz electrogénico ($K_m=0.340 \pm 0.06279$) (fig. 14) lo que concuerda con el trabajo previo realizado con la técnica de electrón ion selectivo de sodio ²² en cual se observó una diferencia parecida entre ambos TSMC con respecto a la afinidad por el lactato y el nicotinato.

Desde los años ochenta, Boron y colaboradores ^{3,4,6,8} sugerían la existencia de dos tipos de transporte de Na^+/MC , uno de carácter electroneutro y otro de carácter electrogénico y otros estudios de cinética del transporte renal acoplado a sodio ^{13,14,100} sugerían la presencia de dos sistemas de cotransporte Na^+/MC de diferente afinidad.

Por otra parte, el hecho de que el TSMCz electrogénico y el TSMCz electroneutro presenten diferencias en la afinidad por los sustratos, correlaciona con el análisis de hibridación in situ en el pez cebra en el que se observó la colocación de ambos transportadores a lo largo del pronefro. El TSMCz electroneutro se encuentra en la parte proximal de éste denominado túbulo pronefrótico, mientras que el TSMCz electrogénico se localiza en una región más distal, el ducto pronefrótico ²².

Ambas observaciones, las diferencias por afinidad a los sustratos y las diferencias en la localización en la nefrona, son explicadas por los mecanismos de reabsorción de los monocarboxilatos en el riñón.

La concentración de lactato que llega al ultrafiltrado glomerular varía de 1mM a 15 mM dependiendo de la actividad física del organismo. La reabsorción de éste ocurre en mayor parte en el túbulo proximal (95%), por lo que la concentración de monocarboxilatos presente en el fluido tubular va disminuyendo a lo largo de la nefrona ²². Dado que la afinidad por los monocarboxilatos del cotransportador electroneutro es menor, es de esperarse que localice en la región temprana del túbulo proximal donde la concentración del lactato es mayor. De la misma manera, es de esperarse que el transportador electrogénico, de alta afinidad, se localice en la región distal donde la concentración del lactato es menor (fig.11).

Los transportadores juegan un papel crucial en la biodisponibilidad, el efecto terapéutico, y la farmacocinética de una gran variedad de medicamentos. La interacción entre éstos puede intervenir en la eficacia terapéutica, la vida media del fármaco, la distribución tisular así como en los efectos secundarios ¹⁰¹.

Estudios de Coady et al. ²⁰, así como de Itagaki et al. ⁹⁶, demostraron que el TSMCh electrogénico puede inhibirse por ibuprofeno, un antiinflamatorio no esteroideo altamente utilizado que tiene un grupo carboxilo probablemente responsable de su habilidad para interactuar con el transportador (fig. 16).

Por otro lado, los monocarboxilatos como el lactato, el piruvato y los cuerpos cetónicos tienen un papel muy importante en el metabolismo energético del cerebro. La acumulación excesiva de éstos puede ser tóxica para éste órgano ¹, y Plata y colaboradores ²² reportaron la presencia de ambos TSMCz en ojo y cerebro.

Adicionalmente, Coady y colaboradores ²⁰ demostraron que el TSMCh electrogénico puede ser inhibido por valproato de sodio, un anticonvulsivante utilizado en la clínica, que tiene que la propiedad de potenciar el efecto del neurotransmisor GABA y que posee al igual que los AINES un grupo carboxilo (fig. 16).

Ya que el pez cebra es un modelo útil para estudiar procesos de proliferación celular, y que se conoce la localización tisular de los TSMC en éste ²², el estudio de inhibidores, tales como los AINES y el valproato, sobre la función de los transportadores de Na⁺/monocarboxilatos, resulta crucial ya que podría revelar en un futuro datos interesantes acerca de la relación entre éstos fármacos y los procesos fisiológicos en los que están involucrados estas proteínas.

En este trabajo observamos que los AINES naproxeno, ibuprofeno, y el ketoprofeno así como el anticonvulsivo valproato, todos a una concentración de 3mM, son inhibidores de la función del TSMCz eletrogénico, TSMCz electroneutro y del TSMCh (fig. 16, 17).

Mientras que el ibuprofeno es capaz de reducir a más del 50% la actividad de todos los TSMC, y el ketoprofeno a los electrogénicos (TSMCh y TSMCz); el naproxeno y el valproato presentan una menor inhibición de la función de los transportadores.

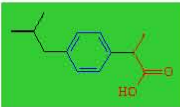
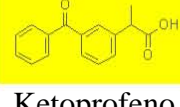
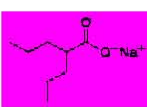

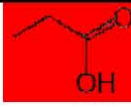
	 Ibuprofeno	 Ketoprofeno	 Valproato	 Naproxeno	
 Propionato	** p<0.001 K_i~0.6mM	** p<0.001 K_i~1.2mM	* p<0.001 K_i~5mM	* p<0.05	TSMCz electrogénico
	* p<0.001 K_i~0.8mM	*** p<0.001 K_i~0.6mM	*** p<0.001 K_i~5mM	** p<0.001	TSMCh electrogénico
	*** p<0.001 K_i~0.2mM	* p<0.001 K_i~5mM	** p<0.001 K_i~5mM	*** p<0.001	TSMCz electroneutro

Tabla 6. Tabla que ilustra las diferencias de inhibición de los TSM por los AINES y el valproato. Los asteriscos (*) representan la potencia de inhibición del fármaco con respecto a los demás trasportadores. Los valores de significancia estadística son con respecto a los grupos controles de cada transportador (en ausencia del inhibidor), y la constante de inhibición (K_i) se muestra para Iso fármacos para los que se realizo una curva dosis respuesta.

Como se puede observar en la tabla 6 todos los inhibidores utilizados se caracterizan por tener en su estructura un único grupo carboxilo, sin embargo, mientras que los AINES presentan uno o más anillos carbonados, el valproato presenta ramificaciones laterales. Aunque hasta el momento no podría determinarse con precisión el efecto de la estructura de estos compuestos sobre la actividad de los TSM, es probable que el hecho de que el valproato no pueda reducir a más del 50% a altas concentraciones (5mM) (fig 20), se deba a un impedimento estérico que presentan en menor medida los AINES.

Tanto los ácidos grasos de cadena corta, como los cuerpos cetónicos, el piruvato y el lactato, substratos de los TSMC, presentan estructuras simples de cadenas cortas carbonadas. Es probable que la estructura de los AINES, que también presentan un grupo carboxilo, impida en cierto modo el transporte de éstos por un bloqueo en el sitio de unión a los MCs dado que son estructuras más complejas que no logran pasar a través de los TSMCs, reduciendo significativamente la traslocación de MCs más sencillos, como lo son los ácidos grasos de cadena corta, piruvato o lactato, así como del ión sodio.

Aunque no se realizó un experimento con $^{22}\text{Na}^+$ donde se muestre que el efecto de los AINES puede revertirse al lavar y retirar el inhibidor, existen datos previos por experimentos con el TSMC electrogénico con la técnica de pinzamiento voltaje (voltaje clamp) de dos electrodos, que la inhibición ejercida por éstos sobre los TSM es de carácter reversible.

En cuanto al tipo de inhibición ejercida suponemos que ésta podría ser mixta dado que este tipo de inhibición es característica para proteínas que tienen más de un sustrato y por lo tanto más de un sitio de unión. De hecho, en un experimento preliminar donde mantuvimos constante la concentración de ibuprofeno y variamos la concentración de propionato (no se muestra), observamos un cambio tanto en la k_m como la V_{max} del transportador sugiriendo así un tipo de inhibición mixta.

Sin embargo, es necesario realizar este tipo de ensayos con cada uno de los inhibidores, variando tanto las concentraciones del monocarboxilato como las de Na⁺, puesto que se desconoce también el orden en el que los sustratos se unen a los TSMC para ser transportados.

Es bien conocido que el estado de fosforilación de los transportadores puede afectar la función de los mismos. TSMCz eletrogénico, TSMCz eletroneutro, así como TSMCh eletrogénico tienen, aminoácidos potenciales a ser fosforilados por PKA, PKC y tirosincinasas en la zona carboxiterminal. En el TSMCz eletrogénico los residuos de serina 280 y 541 son blanco de fosforilación para la PKC, mientras que los residuos de serina 383, 556 y 568 son de PKA. En TSMCh eletrogénico existen tres residuos de treonina que pueden ser fosforilados por PKC (T 41, 543*, 557*) y 5 residuos de serina S (269, 279*, 542*, 576, 602), adicionalmente tiene tres residuos de serina blanco para PKA (114, 375*, 377*) y un residuo de serina 279 que también es blanco de PKC. En cuanto al TSMCz eletroneutro, los residuos de treonina blanco de fosforilación por PKC son T 349*, 359*, 587*, mientras que los residuos de serina corresponden a 348*, 374*, 379, 547. Los residuos que pueden ser fosforilados por la PKA corresponden a las T 50* y 597.

En este trabajo demostramos que el TPA, un éster de forbol que activa a la PKC, reduce significativamente la función de ambos TSMCz ($p \leq 0.001$). Ésta inhibición es dosis dependiente. Por otro lado el efecto inhibitorio del TPA sobre la función del TSMCz eletroneutro es revertido por inhibidores de PKC (BIS), lo que sugiere que se deba a la activación de la proteína cinasa C (PKC). Sin embargo no es así en TSMCz eletrogénico, puesto que la reducción de la función en presencia de TPA no es revertida por inhibidores de PKC (BIS) o MECK (U0126).

Por otro lado, al realizar un ensayo preliminar para estudiar el efecto de la activación de la PKA por medio de la adición de un análogo de AMPc, se observó un aumento estadísticamente significativo en la actividad del TSMCh electrogénico, pero no de los

TSMCz. La adición del inhibidor H89 puede revertir el efecto sobre TSMCh electrogénico, y disminuir la función de los TSMCz.

A diferencia de lo observado con la activación de la PKC, los resultados obtenidos en los experimentos de la activación de PKA no son muy claros. Sugerimos que la función del TSMCh electrogénico podría estar regulada por la actividad de la PKA, y probablemente también la de los TSMCz. El hecho de que no exista una activación en la función de los TSMCz al activar la PKA, pero si una inhibición podría deberse a que la adición de AMPc no cambia el estado basal de fosforilación por PKA de estas proteínas, pero el H89 si es capaz de disminuirla. Sin embargo deben de hacerse más ensayos al respecto.

Así los resultados de éste trabajo demuestran la existencia de diferencias cinéticas, farmacológicas y de regulación entre los TSMC, lo cual posiblemente tenga implicaciones fisiológicas importantes.

Como se mencionó anteriormente se ha propuesto que el posible efecto protector del TSMCh electrogénico en el cáncer de colón se deba al transporte del butirato⁵², un SCFA que ha sido reportado como inhibidor de las desacetilasas de histonas⁸⁶. Y por otro lado es bien conocido el efecto benéfico de los AINES en el cáncer de colon por su habilidad de bloquear las ciclooxigenasas¹⁰². Sin embargo, si los AINES inhiben la función de los TSMC, como se observó en éste y otros estudios, probablemente la utilización crónica de los AINES que poseen un grupo carboxilo en su estructura podría interferir con la función protectora ejercida por el transportador al disminuir el transporte de butirato. Sería interesante realizar un estudio en el que se observara si existe una diferencia en la utilización de diversos tipos de AINES, con o sin capacidad de interferir con los TSMC, en la evolución del cáncer de colon.

Por otro lado, los TSMCs son capaces de reabsorber nicotinato^{91,92}, una droga utilizada en las dislipidemias, que es de hecho una vitamina (ver TSMC y su relación con el nicotinato y las dislipidemias). La inhibición ejercida por los AINES, que en su estructura tienen un carboxilato, sobre los TSMC, podría comprometer en pacientes que co-utilizan

este antiinflamatorio de manera crónica, con el nicotinato, el efecto terapéutico y la biodisponibilidad de éste último. Por otro lado, la utilización crónica de los AINES podría disminuir la reabsorción del nicotinato y ocasionar deficiencias de ésta vitamina.

REFERENCIAS

1. Boron and Boulpaep (2003) *Medical Physiology*, Saunders.
2. Craig F.N (1946) Renal tubular reabsorption, metabolic utilization and isomeric fractionation of lactic acid in the dog. *American Journal of Physiology* 146-159.
3. Boron W.F. & Boulpaep E.L. (1983) Intracellular pH regulation in the renal proximal tubule of the salamander. Basolateral. *J.Gen.Physiol* **81**, 53-94.
4. Boron W.F. & Boulpaep E.L. (1983) Intracellular pH regulation in the renal proximal tubule of the salamander. Na-H exchange. *J.Gen.Physiol* **81**, 29-52.
5. Boron W.F., Siebens A.W., & Nakhoul N.L. (1988) Role of monocarboxylate transport in the regulation of intracellular pH of renal proximal tubule cells. *Ciba Found.Symp.* **139**, 91-105.
6. Siebens A.W. & Boron W.F. (1987) Effect of electroneutral luminal and basolateral lactate transport on intracellular pH in salamander proximal tubules. *J.Gen.Physiol* **90**, 799-831.
7. Siebens A.W. & Boron W.F. (1989) Depolarization-induced alkalization in proximal tubules. II. Effects of lactate and SITS. *Am.J.Physiol* **256**, F354-F365.
8. Siebens A.W. & Boron W.F. (1989) Depolarization-induced alkalization in proximal tubules. I. Characteristics and dependence on Na⁺. *Am.J.Physiol* **256**, F342-F353.
9. Barbarat B. & Podevin R.A. (1988) Stoichiometry of the renal sodium-L-lactate cotransporter. *J.Biol.Chem.* **263**, 12190-12193.
10. Hildmann B., Storelli C., Haase W., Barac-Nieto M., & Murer H. (1980) Sodium ion/L-lactate co-transport in rabbit small-intestinal brush-border-membrane vesicles. *Biochem.J.* **186**, 169-176.
11. Barac-Nieto M., Murer H., & Kinne R. (1980) Lactate-sodium cotransport in rat renal brush border membranes. *Am.J.Physiol* **239**, F496-F506.
12. Kragh-Hansen U., Jorgensen K.E., & Sheikh M.I. (1982) The use of potential-sensitive cyanine dye for studying ion-dependent electrogenic renal transport of organic solutes. Spectrophotometric measurements. *Biochem.J.* **208**, 359-368.
13. Mengual R., Schlageter M.H., & Sudaka P. (1990) Kinetic asymmetry of renal Na⁺-L-lactate cotransport. Characteristic parameters and evidence for a ping pong mechanism of the trans-stimulating exchange by pyruvate. *J.Biol.Chem.* **265**, 292-299.
14. Manganel M., Roch-Ramel F., & Murer H. (1985) Sodium-pyrazinoate cotransport in rabbit renal brush border membrane vesicles. *Am.J.Physiol* **249**, F400-F408.

15. Carlson L.A. (2004) Niaspan, the prolonged release preparation of nicotinic acid (niacin), the broad-spectrum lipid drug. *Int.J.Clin.Pract.* **58**, 706-713.
16. Carlson L.A. (2005) Nicotinic acid: the broad-spectrum lipid drug. A 50th anniversary review. *J.Intern.Med.* **258**, 94-114.
17. Shepherd J., Betteridge J., & Van Gaal L. (2005) Nicotinic acid in the management of dyslipidaemia associated with diabetes and metabolic syndrome: a position paper developed by a European Consensus Panel. *Curr.Med.Res.Opin.* **21**, 665-682.
18. Halestrap A.P. & Meredith D. (2004) The SLC16 gene family-from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch.* **447**, 619-628.
19. Juel C. & Halestrap A.P. (1999) Lactate transport in skeletal muscle - role and regulation of the monocarboxylate transporter. *J.Physiol* **517** (Pt 3), 633-642.
20. Coady M.J., Chang M.H., Charron F.M., Plata C., Wallendorff B., Sah J.F., Markowitz S.D., Romero M.F., & Lapointe J.Y. (2004) The human tumour suppressor gene SLC5A8 expresses a Na⁺-monocarboxylate cotransporter. *J.Physiol* **557**, 719-731.
21. Miyauchi S., Gopal E., Fei Y.J., & Ganapathy V. (2004) Functional identification of SLC5A8, a tumor suppressor down-regulated in colon cancer, as a Na⁽⁺⁾-coupled transporter for short-chain fatty acids. *J.Biol.Chem.* **279**, 13293-13296.
22. Plata C., Sussman C.R., Sindic A., Liang J.O., Mount D.B., Josephs Z.M., Chang M.H., & Romero M.F. (2007) Zebrafish Slc5a12 encodes an electroneutral sodium monocarboxylate transporter (SMCTn): A comparison to the electrogenic SMCT (SMCTe/Slc5a8). *J.Biol.Chem.*
23. Turk E. & Wright E.M. (1997) Membrane topology motifs in the SGLT cotransporter family. *J.Membr.Biol.* **159**, 1-20.
24. Wright E.M. & Turk E. (2004) The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflugers Arch.* **447**, 510-518.
25. De I., V, Dohan O., Levy O., & Carrasco N. (2000) Molecular analysis of the sodium/iodide symporter: impact on thyroid and extrathyroid pathophysiology. *Physiol Rev.* **80**, 1083-1105.
26. Turk, E., Zabel E, Mundlos S, Dyer J, and Wright, E. M. Glucose/galactose malabsorption caused by a defect in the Na⁺/glucose cotransporter. *Nature* [350], 354-356. 1991.
27. Hong C., Maunakea A., Jun P., Bollen A.W., Hodgson J.G., Goldenberg D.D., Weiss W.A., & Costello J.F. (2005) Shared epigenetic mechanisms in human and mouse gliomas inactivate expression of the growth suppressor SLC5A8. *Cancer Res.* **65**, 3617-3623.

28. Lacroix L., Pourcher T., Magnon C., Bellon N., Talbot M., Intaraphairot T., Caillou B., Schlumberger M., & Bidart J.M. (2004) Expression of the apical iodide transporter in human thyroid tissues: a comparison study with other iodide transporters. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **89**, 1423-1428.
29. Li H., Myeroff L., Smiraglia D., Romero M.F., Pretlow T.P., Kasturi L., Lutterbaugh J., Rerko R.M., Casey G., Issa J.P., Willis J., Willson J.K.V., Plass C., & Markowitz S.D. (2003) SLC5A8, a sodium transporter, is a tumor suppressor gene silenced by methylation in human colon aberrant crypt foci and cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 8412-8417.
30. Ueno M., Toyota M., Akino K., Suzuki H., Kusano M., Satoh A., Mita H., Sasaki Y., Nojima M., Yanagihara K., Hinoda Y., Tokino T., & Imai K. (2004) Aberrant methylation and histone deacetylation associated with silencing of SLC5A8 in gastric cancer. *Tumour.Biol.* **25**, 134-140.
31. Handler J.S. & Kwon H.M. (2001) Transcriptional regulation by changes in tonicity. *Kidney Int.* **60**, 408-411.
32. Wright E.M., Hirsch J.R., Loo D.D., & Zampighi G.A. (1997) Regulation of Na⁺/glucose cotransporters. *J.Exp.Biol.* **200**, 287-293.
33. Ganapathy V., Gopal E., Miyauchi S., & Prasad P.D. (2005) Biological functions of SLC5A8, a candidate tumour suppressor. *Biochem.Soc.Trans.* **33**, 237-240.
34. Rodriguez A.M., Perron B., Lacroix L., Caillou B., Leblanc G., Schlumberger M., Bidart J.M., & Pourcher T. (2002) Identification and characterization of a putative human iodide transporter located at the apical membrane of thyrocytes. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **87**, 3500-3503.
35. Dai G., Levy O., & Carrasco N. (1996) Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature* **379**, 458-460.
36. Perron B., Rodriguez A.M., Leblanc G., & Pourcher T. (2001) Cloning of the mouse sodium iodide symporter and its expression in the mammary gland and other tissues. *J.Endocrinol.* **170**, 185-196.
37. Smanik P.A., Liu Q., Furminger T.L., Ryu K., Xing S., Mazzaferri E.L., & Jhiang S.M. (1996) Cloning of the human sodium iodide symporter. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **226**, 339-345.
38. Eskandari S., Loo D.D., Dai G., Levy O., Wright E.M., & Carrasco N. (1997) Thyroid Na⁺/I⁻ symporter. Mechanism, stoichiometry, and specificity. *J.Biol.Chem.* **272**, 27230-27238.
39. Royaux I.E., Suzuki K., Mori A., Katoh R., Everett L.A., Kohn L.D., & Green E.D. (2000) Pendrin, the protein encoded by the Pendred syndrome gene (PDS), is an apical porter of iodide in the thyroid and is regulated by thyroglobulin in FRTL-5 cells. *Endocrinology* **141**, 839-845.

40. Scott D.A., Wang R., Kreman T.M., Sheffield V.C., & Karniski L.P. (1999) The Pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein. *Nat.Genet.* **21**, 440-443.
41. Li H., Myeroff L., Smiraglia D., Romero M.F., Pretlow T.P., Kasturi L., Lutterbaugh J., Rerko R.M., Casey G., Issa J.P., Willis J., Willson J.K., Plass C., & Markowitz S.D. (2003) SLC5A8, a sodium transporter, is a tumor suppressor gene silenced by methylation in human colon aberrant crypt foci and cancers. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**, 8412-8417.
42. Hong C.B., Maunakea A., Jun P., Bollen A.W., Hodgson J.G., Goldenberg D.D., Weiss W.A., & Costello J.F. (2005) Shared epigenetic mechanisms in human and mouse gliomas inactivate expression of the growth suppressor SLC5A8. *Cancer Research* **65**, 3617-3623.
43. Chu S. & Montrose M.H. (1995) An Na(+)-independent short-chain fatty acid transporter contributes to intracellular pH regulation in murine colonocytes. *J.Gen.Physiol* **105**, 589-615.
44. Flagg T.P., Yoo D., Sciortino C.M., Tate M., Romero M.F., & Welling P.A. (2002) Molecular mechanism of a COOH-terminal gating determinant in the ROMK channel revealed by a Bartter's disease mutation. *J.Physiol* **544**, 351-362.
45. Romero M.F., Fong P., Berger U.V., Hediger M.A., & Boron W.F. (1998) Cloning and functional expression of rNBC, an electrogenic Na(+)-HCO₃-cotransporter from rat kidney. *Am.J.Physiol* **274**, F425-F432.
46. Stewart A.K., Kerr N., Chernova M.N., Alper S.L., & Vaughan-Jones R.D. (2004) Acute pH-dependent regulation of AE2-mediated anion exchange involves discrete local surfaces of the NH₂-terminal cytoplasmic domain. *J.Biol.Chem.* **279**, 52664-52676.
47. Gopal E., Fei Y.J., Sugawara M., Miyauchi S., Zhuang L., Martin P., Smith S.B., Prasad P.D., & Ganapathy V. (2004) Expression of slc5a8 in kidney and its role in Na(+)-coupled transport of lactate. *J.Biol.Chem.* **279**, 44522-44532.
48. Gopal E., Fei Y.J., Miyauchi S., Zhuang L., Prasad P.D., & Ganapathy V. (2005) Sodium-coupled and electrogenic transport of B-complex vitamin nicotinic acid by slc5a8, a member of the Na/glucose co-transporter gene family. *Biochem.J.* **388**, 309-316.
49. Iwanaga T., Takebe K., Kato I., Karaki S., & Kuwahara A. (2006) Cellular expression of monocarboxylate transporters (MCT) in the digestive tract of the mouse, rat, and humans, with special reference to slc5a8. *Biomed.Res.* **27**, 243-254.
50. Takebe K., Nio J., Morimatsu M., Karaki S.I., Kuwahara A., Kato I., & Iwanaga T. (2005) Histochemical demonstration of a Na⁺-coupled transporter for short-chain fatty acids (Slc5a8) in the intestine and kidney of the mouse. *Biomedical Research-Tokyo* **26**, 213-221.

51. Paroder V., Spencer S.R., Paroder M., Arango D., Schwartz S., Mariadason J.M., Augenlicht L.H., Eskandari S., & Carrasco N. (2006) Na⁺/monocarboxylate transport (SMCT) protein expression correlates with survival in colon cancer: Molecular characterization of SMCT. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 7270-7275.
52. Gupta N., Martin P.M., Prasad P.D., & Ganapathy V. (2006) SLC5A8 (SMCT1)-mediated transport of butyrate forms the basis for the tumor suppressive function of the transporter. *Life Sciences* **78**, 2419-2425.
53. Anzai N., Kanai Y., & Endou H. (2007) New insights into renal transport of urate. *Curr.Opin.Rheumatol.* **19**, 151-157.
54. Porra V., Ferraro-Peyret C., Durand C., Selmi-Ruby S., Giroud H., Berger-Dutrieux N., Decaussin M., Peix J.L., Bournaud C., Orgiazzi J., Borson-Chazot F., Dante R., & Rousset B. (2005) Silencing of the tumor suppressor gene SLC5A8 is associated with BRAF mutations in classical papillary thyroid carcinomas. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **90**, 3028-3035.
55. Xing M. (2007) Gene methylation in thyroid tumorigenesis. *Endocrinology* **148**, 948-953.
56. Srinivas S.R., Gopal E., Zhuang L., Itagaki S., Martin P.M., Fei Y.J., Ganapathy V., & Prasad P.D. (2005) Cloning and functional identification of slc5a12 as a sodium-coupled low-affinity transporter for monocarboxylates (SMCT2). *Biochem.J.* **392**, 655-664.
57. Thangaraju M., Ananth S., Martin P.M., Roon P., Smith S.B., Sterneck E., Prasad P.D., & Ganapathy V. (2006) c/ebpdelta Null mouse as a model for the double knock-out of slc5a8 and slc5a12 in kidney. *J.Biol.Chem.* **281**, 26769-26773.
58. Diamond H.S. & Paolino J.S. (1973) Evidence for a postsecretory reabsorptive site for uric acid in man. *J.Clin.Invest* **52**, 1491-1499.
59. Steele T.H. (1973) Urate secretion in man: the pyrazinamide suppression test. *Ann.Intern.Med.* **79**, 734-737.
60. Steele T.H. & Boner G. (1973) Origins of the uricosuric response. *J.Clin.Invest* **52**, 1368-1375.
61. Davis B.B., Field J.B., Rodnan G.P., & Kedes L.H. (1965) Localization And Pyrazinamide Inhibition Of Distal Transtubular Movement Of Uric Acid-2-C14 With A Modified Stop-Flow Technique. *J.Clin.Invest* **44**, 716-721.
62. Gutman A.B., Yu T.F., & Berger L. (1959) Tubular secretion of urate in man. *J.Clin.Invest* **38**, 1778-1781.
63. Lemieux G., Vinay P., Gougoux A., & Michaud G. (1973) Nature of the uricosuric action of benziadarone. *Am.J.Physiol* **224**, 1440-1449.

64. Roch-Ramel F. & Guisan B. (1999) Renal Transport of Urate in Humans. *News Physiol Sci.* **14**, 80-84.
65. Guggino S.E. & Aronson P.S. (1985) Paradoxical effects of pyrazinoate and nicotinate on urate transport in dog renal microvillus membranes. *J.Clin.Invest* **76**, 543-547.
66. Roch-Ramel F., Guisan B., & Schild L. (1996) Indirect coupling of urate and p-aminohippurate transport to sodium in human brush-border membrane vesicles. *Am.J.Physiol* **270**, F61-F68.
67. Boumendil-Podevin E.F. & Podevin R.A. (1981) Nicotinic acid transport by brush border membrane vesicles from rabbit kidney. *Am.J.Physiol* **240**, F185-F191.
68. Garcia M.L., Benavides J., & Valdivieso F. (1980) Ketone body transport in renal brush border membrane vesicles. *Biochim.Biophys.Acta* **600**, 922-930.
69. Mount D.B., Kwon C.Y., & Zandi-Nejad K. (2006) Renal urate transport. *Rheum.Dis.Clin.North Am.* **32**, 313-31, vi.
70. Goldfinger S., Klinenberg E Jr, & Seegmiller J.E. (1965) Renal Retention Of Uric Acid Induced By Infusion Of Beta-Hydroxybutyrate And Acetoacetate. *N.Engl.J.Med.* **272**, 351-355.
71. Padova J. & Bendersky G. (1962) Hyperuricemia in diabetic ketoacidosis. *N.Engl.J.Med.* **267**, 530-534.
72. Lieber C.S., Jones D.P., Losowsky M.S., & Davidson C.S. (1962) Interrelation of uric acid and ethanol metabolism in man. *J.Clin.Invest* **41**, 1863-1870.
73. Gershon S.L. & Fox I.H. (1974) Pharmacologic effects of nicotinic acid on human purine metabolism. *J.Lab Clin.Med.* **84**, 179-186.
74. Akalin E., Chandrakantan A., Keane J., & Hamburger R.J. (2001) Normouricemia in the syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion. *Am.J.Kidney Dis.* **37**, E8.
75. Shapiro M. & Hyde L. (1957) Hyperuricemia due to pyrazinamide. *Am.J.Med.* **23**, 596-599.
76. Dong S.M., Lee E.J., Jeon E.S., Park C.K., & Kim K.M. (2005) Progressive methylation during the serrated neoplasia pathway of the colorectum. *Mod.Pathol.* **18**, 170-178.
77. Goldstein N.S. (2006) Serrated pathway and APC (Conventional)-type colorectal polyps - Molecular-morphologic correlations, genetic pathways, and implications for classification. *American Journal of Clinical Pathology* **125**, 146-153.
78. Wong J.M.W., de Souza R., Kendall C.W.C., Emam A., & Jenkins D.J.A. (2006) Colonic health: Fermentation and short chain fatty acids. *Journal of Clinical Gastroenterology* **40**, 235-243.

79. Andoh A., Tsujikawa T., & Fujiyama Y. (2003) Role of dietary fiber and short-chain fatty acids in the colon. *Current Pharmaceutical Design* **9**, 347-358.
80. Cook S.I. & Sellin J.H. (1998) Review article: short chain fatty acids in health and disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* **12**, 499-507.
81. Nkondjock A., Shatenstein B., Maisonneuve P., & Ghadirian P. (2003) Specific fatty acids and human colorectal cancer: an overview. *Cancer Detection and Prevention* **27**, 55-66.
82. Whiteley L.O., Purdon M.P., Ridder G.M., & Bertram T.A. (1996) The interactions of diet and colonic microflora in regulating colonic mucosal growth. *Toxicologic Pathology* **24**, 305-314.
83. Young G.P. & Le Leu R.K. (2004) Resistant starch and colorectal neoplasia. *Journal of Aoac International* **87**, 775-786.
84. Lupton J.R. (2004) Microbial degradation products influence colon cancer risk: the butyrate controversy. *J.Nutr.* **134**, 479-482.
85. Sengupta S., Muir J.G., & Gibson P.R. (2006) Does butyrate protect from colorectal cancer? *J.Gastroenterol.Hepatol.* **21**, 209-218.
86. Grunstein M. (1997) Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* **389**, 349-352.
87. Hong C., Maunakea A., Jun P., Bollen A.W., Weiss W.A., & Costello J.F. (2004) Epigenetic mechanisms suppress the expression of SLC5A8, a tumor growth suppressor in human and mouse gliomas. *Neuro-Oncology* **6**, 337.
88. Brown A.J., Goldsworthy S.M., Barnes A.A., Eilert M.M., Tcheang L., Daniels D., Muir A.I., Wigglesworth M.J., Kinghorn I., Fraser N.J., Pike N.B., Strum J.C., Steplewski K.M., Murdock P.R., Holder J.C., Marshall F.H., Szekeres P.G., Wilson S., Ignar D.M., Foord S.M., Wise A., & Dowell S.J. (2003) The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J.Biol.Chem.* **278**, 11312-11319.
89. Le Poul E., Loison C., Struyf S., Springael J.Y., Lannoy V., Decobecq M.E., Brezillon S., Dupriez V., Vassart G., Van Damme J., Parmentier M., & Detheux M. (2003) Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *J.Biol.Chem.* **278**, 25481-25489.
90. Xiong Y., Miyamoto N., Shibata K., Valasek M.A., Motoike T., Kedzierski R.M., & Yanagisawa M. (2004) Short-chain fatty acids stimulate leptin production in adipocytes through the G protein-coupled receptor GPR41. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**, 1045-1050.
91. Carlson L.A. (2004) Niaspan, the prolonged release preparation of nicotinic acid (niacin), the broad-spectrum lipid drug. *Int.J.Clin.Pract.* **58**, 706-713.

92. Carlson L.A. (2005) Nicotinic acid: the broad-spectrum lipid drug. A 50th anniversary review. *J.Intern.Med.* **258**, 94-114.
93. Tunaru S., Lattig J., Kero J., Krause G., & Offermanns S. (2005) Characterization of determinants of ligand binding to the nicotinic acid receptor GPR109A (HM74A/PUMA-G). *Mol.Pharmacol* **68**, 1271-1280.
94. Wise A., Jupe S.C., & Rees S. (2004) The identification of ligands at orphan G-protein coupled receptors. *Annu.Rev Pharmacol Toxicol.* **44**, 43-66.
95. Taggart A.K., Kero J., Gan X., Cai T.Q., Cheng K., Ippolito M., Ren N., Kaplan R., Wu K., Wu T.J., Jin L., Liaw C., Chen R., Richman J., Connolly D., Offermanns S., Wright S.D., & Waters M.G. (2005) (D)-beta-Hydroxybutyrate inhibits adipocyte lipolysis via the nicotinic acid receptor PUMA-G. *J.Biol.Chem.* **280**, 26649-26652.
96. Itagaki S., Gopal E., Zhuang L.N., Fei Y.J., Miyauchi S., Prasad P.D., & Ganapathy V. (2006) Interaction of ibuprofen and other structurally related NSAIDs with the sodium-coupled monocarboxylate transporter SMCT1 (SLC5A8). *Pharmaceutical Research* **23**, 1209-1216.
97. Inhibitor SourceBook. Calbiochem. 2nd. 2007.
98. Taylor S.S., Kim C., Vigil D., Haste N.M., Yang J., Wu J., & Anand G.S. (2005) Dynamics of signaling by PKA. *Biochim.Biophys.Acta* **1754**, 25-37.
99. Plata-Ramos C., Sussman C.R., Josephs Z.M., Chang M.H., Liang J.O., & Romero M.F. (2006) Localization and functional characterization of two Na⁺/monocarboxylate transporters in zebrafish (zSMCT): electrogenic (zSMCTe/Slc5a8) and electroneutral (zSMTn/Slc5a12). *Faseb Journal* **20**, A1234.
100. Mengual R., Claude-Schlageter M.H., Poiree J.C., Yagello M., & Sudaka P. (1989) Characterization of sodium and pyruvate interactions of the two carrier systems specific of mono- and di- or tricarboxylic acids by renal brush-border membrane vesicles. *J.Membr.Biol.* **108**, 197-205.
101. Mizuno N, Niwa T, Yotsumoto Y, & Sugiyama Y (2003) Impact of drug transporter studies on drug discovery and development. *Pharmacol.Rev* 425-461.
102. Sinicrope F.A. (2006) Targeting cyclooxygenase-2 for prevention and therapy of colorectal cancer. *Mol.Carcinog.* **45**, 447-454.
103. Basu A. (1993) The potential of protein kinase C as a target for anticancer treatment. *Pharmacol.Ther.* **59**, 257-280.
104. Black J.D. (2000) Protein kinase C-mediated regulation of the cell cycle. *Front Biosci.* **5**, D406-D423.
105. Oka M. & Kikkawa U. (2005) Protein kinase C in melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* **24**, 287-300.

106. Skalhegg B.S., Funderud A., Henanger H.H., Hafte T.T., Larsen A.C., Kvissel A.K., Eikvar S., & Orstavik S. (2005) Protein kinase A (PKA)--a potential target for therapeutic intervention of dysfunctional immune cells. *Curr. Drug Targets*. **6**, 655-664.
107. Tasken K. & Aandahl E.M. (2004) Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev*. **84**, 137-167.

APÉNDICES

A) Transformación de células

Todo el procedimiento debe ser en frío y con puntas de pipeta resistentes a aerosol (PCR) para prevenir la entrada de otros plásmidos no deseados.

PREPARACIÓN

Enfriar tubos de 15ml (Falcon 352059) en hielo

Enfriar puntas de pipeta para PCR en el congelador para tomar las células

Descongelar en hielo las células competentes *Escherichia coli* tipo XL-Gold (Stratagene), mezclar con la punta de la pipeta antes de usarlas.

DNA de las clonas a 50ng/ml

Cajas de Petri (100x200mm) con agar LB y agar LB-ampicilina (100 µg/ml)

Baño maría a 42°C

Medio LB a temperatura ambiente (100µl por tubo)

Baño seco maría a 37°C

Horno a 37°C

Varillas para plaquear

Controles: plásmido sin DNA en agar con ampicilina y agua en agar con y sin ampicilina

PROCEDIMIENTO

1. Mezclar el templete y las células: poner en un tubo frío 25-100 µl de células con una punta fría y 1 µl de DNA (50ng/ml)
2. Mezclar suavemente
3. Incubar en hielo durante 30 min
4. Calentar a 42°C durante 45 segundos
5. Incubar en hielo durante 2 minutos
6. Agregar 100 µl de medio LB estéril a temperatura ambiente
7. Mezclar suavemente
8. Incubar durante 1 hora a 37°C y 225rpm
9. Sembra las células en el agar
10. Incubar toda la noche a 37°C.

B) Obtención de DNAC plasmídico (miniprep)

1. Crecer una colonia en 2ml de medio LB-ampicilina (100 µg/ml)
2. Incubar a 37°C y 225rpm durante toda la noche
3. Centrifugar 1.5ml del cultivo bacteriano durante 30segundos, a 14000 rpm y 4°C.
Guardar el resto del cultivo a 4°C.
4. Desechar el sobrenadante
5. Resuspender en 100 µl de solución I fría
6. Agitar en vortex
7. Agregar 200 µl de solución II preparada antes de usar
8. Mezclar por inversión (cinco veces) y mantener en hielo
9. Agregar 150µl de solución III fría
10. Mezclar por inversión
11. Incubar en hielo 3-5 min
12. Centrifugar 5min a 14,000rpm y 4°C
13. Añadir 1V de fenol-cloroformo-isoamil alcohol 25:24:1
14. Agitar en vortex
15. Centrifugar 2 min a 14,000 rpm y 4°C
16. Transferir la fase acuosa superior a un nuevo tubo
17. Precipitar el CDNA con 2V de etanol a temperatura ambiente
18. Agitar en vortex
19. Incubar 2 minutos a temperatura ambiente
20. Centrifugar 5 minutos a 14,000 rpm y 4°C
21. Desechar el sobrenadante e invertir el tubo en una sanita para eliminar el resto de sobrenadante
22. Añadir 1ml de etanol al 70%
23. Mezclar por inversión
24. Centrifugar 2 minutos a 14,000rpm y 4 °C
25. Desechar el sobrenadante
26. Incubar el tubo abierto a temperatura ambiente 5-10min para evaporar el resto del etanol
27. Resuspender en 50µl de agua biología molecular
28. Almacenar a -20 °C

Solución I

50mM glucosa
25mM Tris-HCl (pH 8)
10mM EDTA (pH 8)
Esterilizar en autoclave
Almacenar a 4 °C

Solución II

0.2 N NaOH (diluida en el momento de stock 10N)
1% (w/v) SDS
Preparar en el momento
Usar a temperatura ambiente

Solución III

5M acetato de potasio 60ml
Ácido acético glacial 11.5ml
H₂O 28.5 ml
Almacenar a 4 °C

C) Gel de agarosa para DNA

Gel

Por cada 10ml de gel:

0.1g agarosa

10ml de TAE 1X*

1. Mezclar la agarosa con el TAE 1X en un matraz.
2. Disolver calentándolo (horno de microondas) 1 minuto
3. Dejar enfriar a ~50°C y vaciar en la caja
4. Dejarlo secar 20 minutos

Buffer de carga

Para 2ml:

1ml de glicerol (50%)

40µg 0.5M EDTA pH 8.0 (10mM)

5mg Azul de bromofenol (0.25%)

5mg Xilene lyanol FF (0.25%)

Esterilizar por filtración

1. Para correr el DNA, mezclarlo con el buffer de carga a razón de 1:4µl.
2. Vaciar las muestras en el gel sumergido en TAE 1X.
3. Correr el gel a 75V durante una hora.
4. Teñir el gel en un recipiente con 100ml de agua y 7 µl de bromuro de etidio (10 µg/ml) durante 10-15 minutos.
5. Para desteñir lavar en agua durante 5 minutos.

TAE 50X (1 litro)*

242gr TRIS base

56ml ácido acético glacial

100ml 0.5 M EDTA pH 8.0

Esterilizar por filtración

D) Digestión de DNAC

1. Digerir en DNAC ($3\mu\text{g}$) con la enzima de restricción apropiada (volumen final $50\ \mu\text{l}$):
 - $3\ \mu\text{l}$ de enzima Xba I
 - $5\ \mu\text{l}$ de buffer
 - $3\ \mu\text{l}$ de DNAC
 - $39\ \mu\text{l}$ de agua biología molecular
2. Incubar dos horas a 37°C
3. Llevar a un volumen final de $100\ \mu\text{l}$ ($50\ \mu\text{l}$) con agua biología molecular
4. Extraer con 1 V de fenol-cloroformo-isoamil alcohol 25:24:1 ($100\ \mu\text{l}$)
5. Agitar en vortex
6. Centrifugar durante 4 minutos a 4°C a 14,000 rpm
7. Pasar la fase acuosa a otro tubo ependorf ($-95\ \mu\text{l}$)
8. Precipitar con $45\ \mu\text{l}$ de acetato de amonio y $450\ \mu\text{l}$ de etanol al 100%
9. Guardar a -20°C 1 hora
10. Centrifugar durante 30 minutos a 4°C a 14,000 rpm
11. Desechar el sobrenadante
12. Lavar el pellet con $1000\ \mu\text{l}$ de etanol al 70%
13. Mezclar por inversión
14. Centrifugar durante 15 minutos a 4°C a 14,000 rpm
15. Quitar el exceso de etanol y secar bien en el speed vac (3-5 minutos)
16. Resuspender el $8\ \mu\text{l}$ con agua biología molecular
17. Tomar $1\ \mu\text{l}$ para correr un gel de agarosa

E) Preparación de RNAc (Ambión)

• En un tubo estéril agregar :

Amortiguador de reacción 10X		2µl
Mezcla de RNTPs 2X		10µl
1µg de DNA linearizado	5µl	
Mezcla de la enzima (TT) 10X		2µl
GTP		1µl
Volumen final		<hr/> 20 µl

1. Mezclar suavemente con la pipeta o con el dedo y spin
2. Incubar 2h a 37°C
3. Agregar 1 µl de DNAsa 1 libre de RNAsa
4. Incubar 15 min a 37 C
5. Agregar 115 µl de H₂O biología molecular y 15 µl de la solución de acetato de amonio
6. Extraer en un volumen de fenol-cloroformo (150 µl)
7. Vortexear y centrifugar 10min a 4°C velocidad máxima
8. Transferir la fase acuosa a nuevos tubos (145 µl)
9. Precipitar con un volumen de isopropanol (145 µl)
10. Mantener a -20°C toda la noche (por lo menos 30 min)
11. Centrifugar 30 min a 4 °C velocidad máxima
12. Eliminar sobrenadante
13. Lavar con 1ml de etanol al 70%
14. Mezclar por inversión
15. Centrifugar 10 min a 4°C
16. Secar en speed vac por ±1min
17. Resuspender en 20µl de tris 1mM o H₂O BM
18. Guardarlo a -80

F) Gel de agarosa al 1% formaldehído para RNA

Gel

Por cada 10 ml de gel:

- 0.1 gr agarosa
- 0.2 8.5 ml agua destilada
- 0.3 1 ml MOPS 10x*
- 0.4 0.5 ml formaldehído

1. Mezclar la agarosa con el agua destilada en un matraz
2. Disolver calentándolo (horno de microondas 1 minuto)
3. Añadir el MOPS 10x.
4. Dejar enfriar a 50⁰C y añadir el formaldehído
5. Mezclar y vaciar en la caja
6. Dejarlo secar 20 minutos

Buffer de Carga

Por cada muestra de RNA:

- 5 μ l formamida
- 1 μ l MOPS 10x
- 2 μ l formaldehído
- 1 μ l gel loading (Sigma)
- 0.16 bromuro de etidio (10 mg/ml)

1. Mezclar 8.1 μ l de buffer de carga con 1 μ l de RNA
2. Calentar a 65⁰C por 10 minutos
3. Vaciar las muestras en el gel sumergido en MOPS 1x
4. Correr el gel a 75V durante una hora
5. Para desteñir el gel se enjuaga en agua durante 10 minutos

***MOPS 10x** (1 litro)

- 41.86g MOPS
- 6.8g acetato de sodio
- 20ml EDTA 0.5M
- pH 7.0 con NaOH 10 N
- Esterilizar por filtración

G) Extracción y preparación de ovocitos de *Xenopus laevis*

1. Anestesiarse una rana por inmersión en tricafina al 0.17% (ácido etil éster 3-amino-benzoico) durante 30 minutos.
2. Hacer una pequeña incisión en la parte inferior del abdomen
3. Exponer el ovario y cortar suficientes lóbulos para obtener los ovocitos necesarios. Saturar la herida incluyendo peritoneo interno con seda de 5.0.
4. Colocar los lóbulos en una caja de petri con ND96 (ringer de rana) y cortarlos en pequeños racimos.
5. Incubar los ovocitos en ND96 sin calcio durante 30 minutos y en ND96 sin calcio con colagenasa tipo B (2mg/ml Boehringer) durante 90 minutos.
6. Lavarlos tres o cuatro veces en ND96
7. Incubar durante la noche a 16°C en ND96
8. Pelar la capa folicular de cada ovocito individual utilizando pinzas finas bajo el microscopio
9. Inyectar ovocitos con el RNAc correspondiente
10. Incubar a 16°C en ND96 con 2.5mM de piruvato de sodio y 5mg/100ml de gentamicina.

ND96	ND96 sin Ca²⁺
96 mM NaCl 2.0 mM KCl 1.8 mM CaCl ₂ 1.0mM MgCl ₂ 5.0mM HEPES/Tris pH 7.4 Esterilizar por filtración	96 mM NaCl 2.0 mM KCl 1.0 mM MgCl ₂ 5.0mM HEPES/Tris pH 7.4 Esterilizar por filtración

H) Captación de $^{22}\text{Na}^+$ en ovocitos de *Xenopus laevis*

Precaptación

1. Incubar durante 30 minutos en solución de precaptación

Captación

1. Incubar durante 60 minutos a 32°C en solución de captación
2. Lavar los ovocitos cinco veces en la solución de captación sin $^{22}\text{Na}^+$ a 4°C
3. Transferir cada ovocito a un tubo de centelleo con $300\ \mu\text{l}$ de 10% SDS
4. Después de que el ovocito esté lisado, añadir 1.0ml de líquido de centelleo y contar las emisiones de cada tubo en el contar de centelleo
5. Para conocer la actividad específica en cada grupo contar las emisiones de $10\ \mu\text{l}$ de la solución de captación en la que estuvieron los ovocitos, por triplicado.

Ouabaina

Concentración final 1mM (10^{-3}M)

Peso molecular 728

Stock 100mM (10^{-1}M) $44\text{mg}/600\ \mu\text{l}$ de DMSO

$10\ \mu\text{l}$ de solución stock en 1ml de solución de precaptación o captación

Bumetanida

Concentración final $100\ \mu\text{M}$ (10^{-4}M)

Peso molecular 364.4

Stock 10mM (10^{-2}M) $3.64\text{mg}/1000\ \mu\text{l}$ de DMSO

$10\ \mu\text{l}$ de solución stock en 1 ml de solución de precaptación o captación

Amiloride

Concentración final 1mM (10^{-4}M)

Peso molecular 266

Stock 100mM (10^{-1}M) $44\text{mg}/600\ \mu\text{l}$ de DMSO

$1\ \mu\text{l}$ de solución stock en 1ml de solución de precaptación o captación

Dibutiril-AMP_c

Concentración final 1mM (10^{-3}M)

Peso molecular 509.4

Stock 100mM (10^{-1}M) $10\text{mg}/200\ \mu\text{l}$ de DMSO

$10\ \mu\text{l}$ de solución stock en 1ml de solución de precaptación o captación

IBMX

Concentración final $100\ \mu\text{M}$ (10^{-4}M)

Peso molecular 519.3

Stock 100mM (10^{-1}M) $2.2\text{mg}/100\ \mu\text{l}$ de DMSO

$1\ \mu\text{l}$ de solución stock en 1 ml de solución de precaptación o captación

H89

Concentración final 1mM (10^{-3}M)

Peso molecular 728

Stock 1M $1\text{mg}/1\ \text{ml}$ de DMSO

$5\ \mu\text{l}$ de solución stock en 1ml de solución de precaptación o captación

Solución de Precaptación

$96\ \text{mM}$ NaCl

$2.0\ \text{mM}$ KCl

$1.8\ \text{mM}$ CaCl_2

1.0mM MgCl_2

5.0mM HEPES/Tris

pH 7.4

Esterilizar por filtración

Solución de Captación

$96\ \text{mM}$ NaCl

$2.0\ \text{mM}$ KCl

$1.8\ \text{mM}$ CaCl_2

1.0mM MgCl_2

5.0mM HEPES/Tris

pH 7.4

Esterilizar por filtración

I) Mecanismos de regulación de proteínas de membrana, PKC

La proteína cinasa C (PKC), es una enzima de expresión ubicua involucrada en las vías de señalización asociada a proliferación, diferenciación, y apoptosis.

Se han descrito al menos 11 isoenzimas de PKC que difieren en su estructura, sus propiedades bioquímicas, su distribución tisular, su localización subcelular y la especificidad de sus sustratos. Estas isoenzimas se clasifican como convencionales (α , β I, β II, γ), nuevas (δ , ϵ , η , θ , μ), y atípicas (λ , ζ). Las isoenzimas convencionales son dependientes de Ca^{2+} mientras que las isoenzimas nuevas y las atípicas no requieren Ca^{2+} para su activación. A excepción de λ y ζ , todas las demás isoenzimas se activan por diacilglicerol (DAG).

En cuanto a su distribución tisular, las isoformas α , δ y ζ se encuentran en la mayoría de las células, la γ se encuentra solamente en células neuronales, la β , ϵ , y λ se encuentran en varios tejidos, mientras que las isoformas η y τ se encuentran de manera predominante en las células epiteliales y células inmunes.

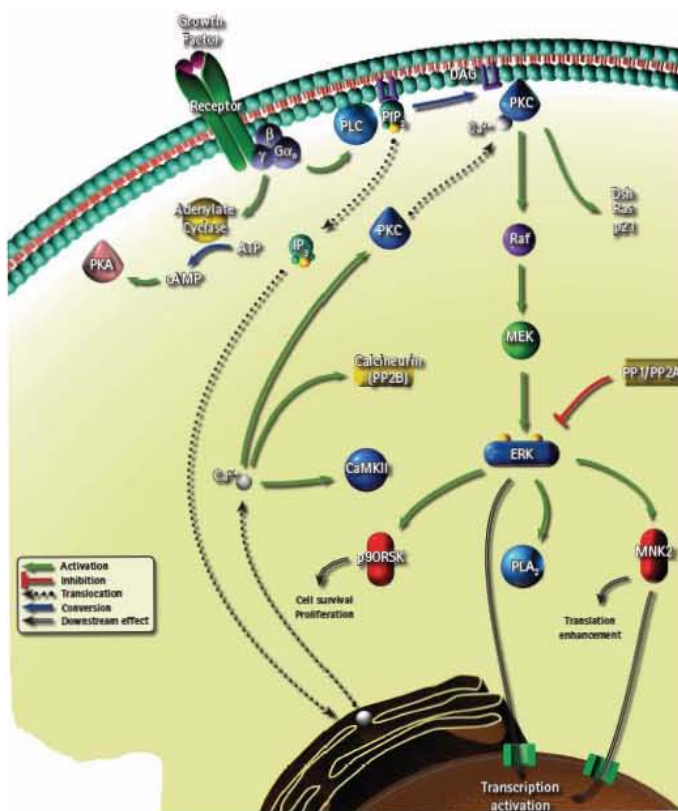


Fig.29 Figura que muestra el esquema de la vía de señalización de la PKC.

Cuando la PKC se encuentra en su estado inactivo reside en el citosol. En este estado la secuencia del dominio regulador de PKC interactúa con el dominio catalítico y previene el acceso del sustrato al sitio catalítico. La unión de una hormona u otra molécula efectora a los receptores de membrana resulta en la activación de la fosfolipasa C (PLC) o la fosfolipasa A2 (PLA₂) vía una proteína G. La PLC activada hidroliza a su vez al fosfatidilinositol -4, 5-

bifosfato (PIP2) produciendo DAG e inositol- 1,4,5-trifosfato. (IP3). IP3 a su vez ocasiona la liberación de Ca^{2+} endógeno que se une a la PKC citosólica y expone su sitio de unión a los fosfolípidos. Así, la unión de Ca^{2+} transloca a la PKC a la membrana donde interactúa DAG y se transforma en una enzima completamente activa (fig. 29).

Diversos estudios han demostrado que las isoenzimas de PKC pueden regular negativamente o positivamente las transiciones celulares críticas del ciclo celular, incluyendo la entrada y salida de los puntos de regulación de G1 G . Por otro lado, niveles altos de PKC así como la activación diferencial de varios tipos de isoenzimas de PKC se han reportado en cáncer de seno, adenomatosis pituitaria, cáncer de tiroides, células leucémicas, y cáncer pulmonar. La inhibición de PKC ha sido reportada en la mayoría de los adenocarcinomas de colon y en estados tempranos de carcinogénesis intestinal. Por estas razones los inhibidores de la PKC se han convertido en herramientas importantes en el tratamiento del cáncer.¹⁰³⁻¹⁰⁵

Activadores de la PKC

Los esteroides de forbol son activadores de la PKC. El esteroide de forbol más utilizado es el TPA. El 4aPDD, es otro éster de forbol que no es capaz de activar la PKC y que representa un control negativo útil cuando se está estudiando el efecto de otros esteroides de forbol activadores tales como el TPA.⁹⁷

Inhibidores de la PKC

El Bis-indolyl maleinimida (BIS) es un inhibidor selectivo permeable de la PKC ($K_i = 10 \text{ nM}$) que es estructuralmente similar a la estaurosporina. Éste actúa como un inhibidor competitivo para el sitio de unión de la PKC al ATP. Tiene una alta selectividad para las isoenzimas α , β II, γ , y ϵ .⁹⁷

El U0126 (1,4-Diamino-2,3-diciano-1,4-bis(2-aminophenylthio)butadiene) es un potente inhibidor específico para MEK1 ($\text{IC}_{50} = 72 \text{ nM}$) y MEK2 ($\text{IC}_{50} = 58 \text{ nM}$). La inhibición es no competitiva con respecto al ATP y ERK y tiene muy poco efecto en otras cinasas tales como Abl, Cdk2, Cdk4, ERK, JNK, MEKK, MKK-3, MKK-4/SEK, MKK-6, PKC, y Raf. El U0126 también actúa como un inmunosupresor debido a que bloquea la síntesis de IL-2 así como la proliferación de células T.⁹⁷

J) Mecanismos de regulación de Proteínas de membrana, PKA

La vía de señalización por la proteína cinasa dependiente de cAMP (PKA) es una de las vías con mayor versatilidad en células eucariotas. Diversas señales extracelulares convergen en esta vía a través de receptores acoplados a proteínas G (GPCR). La activación de la señalización de AMPc requiere de la unión de un ligando extracelular a un receptor acoplado a proteínas G (GPCR) el cual a través de las proteínas G regulan una o varias isoformas de la adenilato ciclasa llevando a la generación de AMPc.

La PKA está compuesta de dos subunidades reguladoras y dos subunidades catalíticas. En la holoenzima, las subunidades regulatorias están unidas al sitio activo de las subunidades catalíticas inactivándolas. La unión del AMPc a las subunidades reguladoras ocasiona un cambio conformacional que libera y activa a las dos subunidades catalíticas. Así las subunidades catalíticas pueden fosforilar residuos de serinas y/o treoninas de substratos en el citosol y en el núcleo. Cuando los niveles de AMPc disminuyen, las subunidades

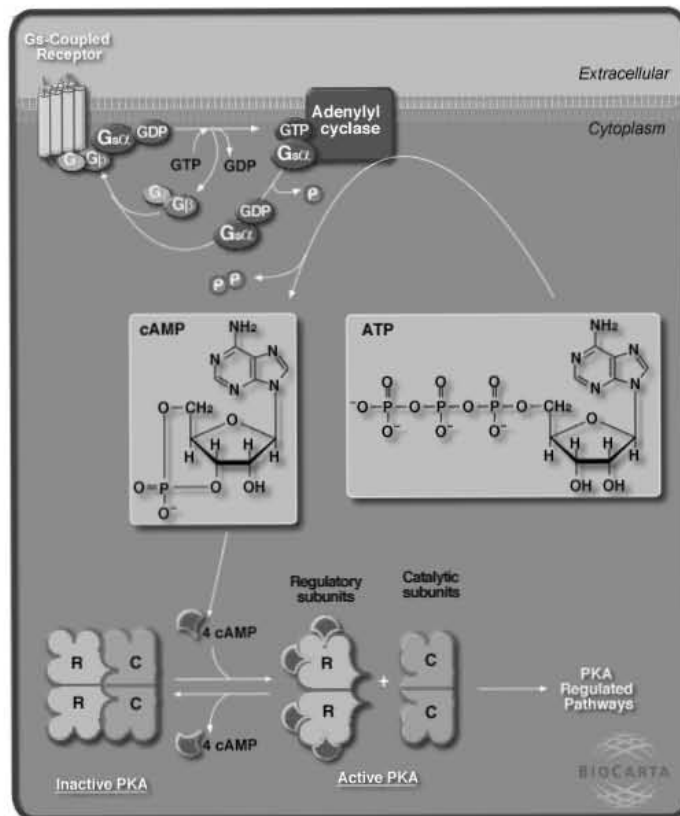


Fig.30 Esquema de la vía de señalización de la PKA.

regulatorias recuperan su afinidad por las subunidades catalíticas y forman de nuevo la holoenzima inactiva. Si los niveles de AMPc se mantienen elevados algunos tipos celulares cambian su actividad y pueden diferenciarse, proliferar o comenzar un proceso de apoptosis^{98,106,107}(fig. 30).

Activadores de PKA

El 3-isobutil 1-metil xantina (IBMX) es un compuesto permeable que inhibe de manera no específica a las fosfodiesterasas de AMPc y cGMP. (IC₅₀ = 2-50 μM). Éste puede actuar también

como un antagonista del receptor de adenosina y se ha reportado que puede inhibir la expresión de TNF- α expresión en células precursoras de adipositos.⁹⁷

Inhibidores de PKA

El H-89 (N-[2-(p-Bromocinnamylamino)ethyl]isoquinolinesulfonamide·2HCl) es un potente inhibidor selectivo permeable, ampliamente utilizado para la PKA ($K_i = 48 \text{ nM}$)⁹⁷.

ABREVIACIONES

AINES	Fármacos antiinflamatorios no esteroideos.
AIT.	Transportador apical de Na ⁺ /yodo. Nombre inicial del Slc5a8 por <i>Apical iodide transporter</i> .
BIS.	Bisindolilmaleimida, inhibidor de la PKC.
CHT.	Transportador de Na ⁺ /colina perteneciente a la familia Slc5, por <i>Sodium choline Transporter</i> .
GRP10A9	
PUMAG.	Receptor de nicotinato por <i>G-protein-coupled receptor target for niacin</i> .
H89.	N-[2-((p-2bromocinamil) etil)-5-isoquinolinesulfonamida); inhibidor de la PKA.
IMBX.	Isometil-butiril-metilxantina; . inhibidor de fosfodiesterasas utilizado en conjunto con un análogo del AMPc para activar la vía de la PKA.
MCs	Monocarboxilatos.
MCT	Transportador de Monocarboxilatos acoplados a protones de la familia Slc16, en sus siglas en inglés por <i>Monocarboxilate Transporter</i> .
NIS.	Transportador de Na ⁺ /yodo perteneciente a la familia Slc5, por <i>Sodium iodide symporter</i> .
PZA.	Pirazinamida. Fármaco anti-uricosúrico (disminuye la excreción urinaria de uratos).
SCFAs	Ácidos grasos de cadena corta por sus siglas en inglés <i>Short Chain Fatty Acids</i> .
SGLT(1-8).	Transportador de Na ⁺ /glucosa perteneciente a la familia Slc5 por <i>Sodium glucose Transporter</i> .
SMIT.	Transportador de Na ⁺ /mioinositol perteneciente a la familia Slc5, por <i>Sodium Mioinositol Transporter</i> .
SMVT.	Transportador de Na ⁺ /multivítamico perteneciente a la familia Slc5, por <i>Sodium Multivitaminic Transporter</i> .

- TPA.** Acetato de forbol-12-miristato; éster de forbol permeable que activa la PKC.
- TSMC** (abreviación utilizada para facilitar la lectura en esta tesis). Transportador de Sodio Monocarboxilatos ; en la literatura reportado como **SMCT** en sus siglas en inglés por *Sodium Monocarboxilate Transporter*.
- TSMCh** Transportador de Sodio Monocarboxilatos del humano.
- TSMCh/TSMCz electrogénico** Transportador Sodio Monocarboxilatos codificado por el gen SLC5a8 de humano o el pez cebra respectivamente.
- TSMCh/TSMCz electroneutro** Transportador Sodio Monocarboxilatos codificado por el gen SLC5a12 del humano o el pez cebra respectivamente.
- TSMCz** Transportador de Sodio Monocarboxilatos del pez cebra; en la literatura **zSMCT** por *Zebrafish Sodium Monocarboxilate Transporter*.
- U0126.** [4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis (2-aminofeniltio) butadieno]; inhibidor de MEK.
- URAT.** Intercambiador de uratos por *Urate Transporter*.
- 4 α PDD.** 13-didecanoato de forbol; éster de forbol que no puede activar la PKC, utilizado como control.