

UNIVERSIDAD CATOLICA DE LA SANTISIMA CONCEPCION
FACULTAD DE INGENIERIA
INGENIERIA CIVIL EN BIOTECNOLOGIA ACUICOLA



**ESTUDIO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES USANDO COMO MODELO
DE EXPRESIÓN OVOCITOS DE *XENOPUS LAEVIS*
CLAUDIA NAVARRETE CÁCERES**

INFORME DE PROYECTO DE TITULO PARA OPTAR AL TITULO DE INGENIERO
CIVIL EN BIOTECNOLOGIA ACUICOLA

Profesor Guía : Lorena Mardones L.

Profesor
Informante : Pablo Venegas C.

Concepción, Junio 2017

Resumen

Dentro de las proteínas esenciales para la vida se encuentra la glucosa, la cual para ingresar en la célula necesita ser facilitada por transportadores de glucosa llamados GLUTs los cuales se han descrito 14. Dentro de estas proteínas, el GLUT1 se encuentra altamente distribuido en los organismos, por lo que se ha convertido en el transportador de glucosa más estudiado. Sin embargo el desarrollo de investigación sobre otros transportadores de glucosa, especialmente en especies acuícolas, hasta el momento es muy escaso. La presente investigación se realizó para estudiar la proteína, transportadora de glucosa, GLUT 1 transfectada en células hepáticas *HEK 293* y en ovocitos de *Xenopus laevis*. Para conseguir la transfección de la proteína se debió desarrollar un plásmido que fuera capaz de expresar la proteína dentro de las células, es así que se crea el plásmido T7dsRedGLUT1, caracterizado por tener el promotor T7, para su expresión en bacterias, resistencia al antibiótico Kanamicina, para su clonación en bacterias crecidas en medio de cultivo, gen de proteína fluorescente roja, para su mejor visualización en la célula, DNA de GLUT 1, para su expresión. Además se estudió la transfección en ovocitos de *Xenopus laevis* de la proteína GLUT 1 desde el plásmido AGA-GLUT1, este se caracteriza por tener el promotor T7, para su expresión en bacterias, resistencia al antibiótico ampicilina, para su clonación en bacterias crecidas en medio de cultivo, cadena poli adenina, da mayor estabilidad al RNA, DNA de GLUT 1. Los resultados obtenidos en la transfección en células *HEK 293* dieron positivos para el DNA del plásmido T7dsRedGLUT1 donde se aprecia el transportador de glucosa situado en la membrana de las células, y el control GFP que se aprecia en toda la célula. LA transfección en ovocitos de *Xenopus laevis*, para el caso del mRNA de GLUT 1 del plásmido T7dsRedGLUT1, no se obtuvo expresión significativa en las células, mientras que el mRNA de GLUT 1 del plásmido AGA-GLUT1 se logró cuantificar transporte de glucosa en las células. Concluyendo así que el desarrollo de las técnicas utilizadas para la expresión del GLUT 1 permiten estudios futuros de otras proteínas de interés, incluyendo proteínas de especies acuícolas cultivables.

Abstract

Within the essential proteins for life is the glucose, which to enter the cell needs to be facilitated by glucose transporters called GLUTs which have been described 14. Within these proteins, GLUT1 is highly distributed in organisms , So it has become the most studied glucose transporter. However the development of research on other glucose transporters, especially in aquaculture species, so far is very scarce. The present investigation was carried out to study the protein, glucose transporter, GLUT 1 transfected in liver cells *HEK 293* and in oocytes of *Xenopus laevis*. In order to achieve the transfection of the protein, a plasmid that was capable of expressing the protein inside the cells had to be developed, thus creating the plasmid T7dsRedGLUT1, characterized by having the T7 promoter, for expression in bacteria, antibiotic resistance Kanamycin , For cloning in bacteria grown in culture medium, red fluorescent protein gene, for better visualization in the cell, GLUT 1 DNA, for expression. In addition, we studied the transfection of GLUT 1 in *Xenopus laevis* oocytes from the AGA-GLUT1 plasmid, which is characterized by having the T7 promoter, for bacterial expression, antibiotic ampicillin resistance, for cloning in bacteria grown in medium Of culture, polyadenine chain, gives greater stability to the RNA, DNA of GLUT 1. The results obtained in the transfection in cells *HEK 293* gave positive for the DNA of the plasmid T7dsRedGLUT1 where the glucose transporter located in the membrane of the cells , And GFP control that is seen throughout the cell. Transfection in oocytes of *Xenopus laevis*, for the GLUT 1 mRNA of the T7dsRedGLUT1 plasmid, no significant expression was obtained in the cells, whereas the GLUT 1 mRNA of the AGA-GLUT1 plasmid was able to quantify glucose transport in the cells. In conclusion, the development of the techniques used for the expression of GLUT 1 allows future studies of other proteins of interest, including proteins of cultivable aquaculture species.

Dedicatoria y Agradecimientos

En primer lugar deseo agradecer a la profesora Lorena Mardones y al profesor Marcelo Villagrán por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo para poder realizar mi proyecto de título.

A los profesores Víctor Faúndez, Christian Díaz, Catterina Sobenes y Pablo Venegas por su apoyo, dedicación y oportunidades de desarrollo profesional entregadas durante estos años de estudio.

Dedico este trabajo a mi hijo porque su sonrisa es el mayor aliciente que podría tener para cada logro que obtenga en mi vida.

A mis padres y hermano por su apoyo, amor y dedicación. Gracias por enseñarme que con esfuerzo y pasión se puede lograr todo lo que uno desea en la vida.

A mi pareja por ser un pilar importante durante todos estos años, por ser mi guía, mejor amigo y compañero.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS	3
I. INTRODUCCIÓN	8
OBJETIVOS:	10
<i>Objetivo General:</i>	10
<i>Objetivos Específicos:</i>	10
II. ESTADO DEL ARTE	11
SISTEMAS DE EXPRESIÓN	11
TRANSFORMACIÓN Y TRANSFECCIÓN	13
TRANSPORTADORES DE GLUCOSA.....	15
MODELO DE EXPRESIÓN OVOCITO DE XENOPUS LAEVIS	17
APLICACIÓN EN ACUICULTURA	19
III. MARCO DE INVESTIGACIÓN	21
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	22
EQUIPOS:	22
CULTIVO DE CÉLULAS HEK 293:.....	22
MANTENCIÓN DE RANAS XENOPUS LAEVIS:.....	23
EXTRACCIÓN DE OVOCITOS DE X. LAEVIS:.....	23
PREPARACIÓN DEL PROMOTOR T7 PARA VECTOR pDsRED:.....	24
LIGACIÓN DE DNA CON PLÁSMIDO:.....	24
OBTENCIÓN DE BACTERIAS QUÍMICO COMPETENTES:.....	26
TRANSFORMACIÓN QUÍMICA DE BACTERIAS CON PLÁSMIDO DsRED-T7 Y CON PLÁSMIDO GLUT1-DsRED:..	26
PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDO DsRED-T7 POR LISIS ALCALINA:.....	27
PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDO DsRED-T7 CON MINIPREP KIT EZNA:.....	28
DIGESTIÓN DE PLÁSMIDO DsRED-T7 CON ENZIMA HIND III:.....	29
PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDO GLUT1-DsRED CON KIT MIDIPREP:.....	30
CUANTIFICACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE DNA:	31
ELECTROFORESIS DE DNA EN GEL DE AGAROSA:	31
PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA:	32
DIGESTIÓN DE PLÁSMIDO GLUT1-DsRED Y PLÁSMIDO DsRED-T7 CON ENZIMAS HIND III Y SAC II:.....	33
EXTRACCIÓN DE BANDAS DESDE GEL DE AGAROSA:.....	33
SUBCLONAMIENTO DE PLÁSMIDO DsRED-T7 CON GLUT1:.....	35
OBTENCIÓN DE mRNA DE pT7DsREDGLUT1:	36
TRANSCRIPCIÓN IN VITRO DE DNA DE PLÁSMIDO T7DsREDGLUT1:	36
PREPARACIÓN DE GEL DE POLIACRILAMIDA:.....	38
PLÁSMIDO pAGA-GLUT1:	39

TRANSFECCIÓN DE GLUT1 EN HEK 293:	40
VISUALIZACIÓN DE GLUT1 EN CÉLULAS HEK 293 TRANSFECTADAS:	41
MICROINYECCIÓN DE OVOCITOS:.....	41
ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GLUT1 EN OVOCITOS DE XENOPUS LAEVIS MEDIANTE ENSAYO DE TRANSPORTE DE D-GLUCOSA:	42
V. RESULTADOS.....	43
EFICIENCIA DE BACTERIAS QUÍMICO-COMPETENTES PARA EL PLÁSMIDO DsRED-T7:.....	43
EFICIENCIA DE BACTERIAS QUÍMICO-COMPETENTES PARA EL PLÁSMIDO GLUT1-DsRED:	43
PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDO DsRED-T7 POR LISIS ALCALINA:.....	44
PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDO DsRED-T7 CON MINIPREP KIT EZNA:.....	45
PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDO GLUT1-DsRED CON MIDIPREP KIT EZNA:	47
CUANTIFICACIÓN DE PLÁSMIDO DsRED-T7 PURIFICADO CON KIT MINIPREP:	48
CUANTIFICACIÓN DE PLÁSMIDO GLUT1-DsRED PURIFICADO CON KIT MIDIPREP:	49
OBTENCIÓN DE PLÁSMIDO DsRED-T7 ABIERTO Y DNA DE GLUT1:.....	50
SUBCLONAMIENTO ENTRE PLÁSMIDO DsRED-T7 ABIERTO Y DNA DE GLUT1:	51
CUANTIFICACIÓN DE PLÁSMIDO T7DsREDGLUT1:.....	52
LINEALIZACIÓN DEL DNA DEL PLÁSMIDO T7DsREDGLUT1 CON ENZIMA DE RESTRICCIÓN NOT I:	53
CUANTIFICACIÓN DE PLÁSMIDO T7DsREDGLUT1 PURIFICADO DESDE GEL DE AGAROSA:	54
OBTENCIÓN DE mRNA DE GLUT 1 DESDE PLÁSMIDO T7DsREDGLUT1:	55
OBTENCIÓN DE mRNA DE GLUT 1 DESDE PAGA-GLUT1:	56
VISUALIZACIÓN DE TRANSFECCIÓN EN CÉLULAS HEK 293:	57
ANÁLISIS DE EXPRESIÓN EN OVOCITOS DE XENOPUS LAEVIS CON PLÁSMIDO T7DsREDGLUT1:	60
ANÁLISIS DE EXPRESIÓN EN OVOCITOS DE XENOPUS LAEVIS CON PLÁSMIDO PAGA-GLUT1:	62
VI. DISCUSIÓN.....	66
VII. CONCLUSIONES – RECOMENDACIONES.....	75
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
IX. ANEXOS.....	80
ANEXO 1: DNA DE PLÁSMIDO DsRED.....	80
ANEXO 2: PREPARACIÓN MEDIO IVONE.....	80
ANEXO 3: DNA DE GLUT1.....	81
ANEXO 4: ESCALA PARES DE BASES ESTÁNDAR Λ HIND III	82
ANEXO 5: PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE DNA MEDIANTE FENOL/CLOROFORMO.....	82
ANEXO 6: SECUENCIA DE T7 DENTRO DE PLÁSMIDO DsRED-T7	83
ANEXO 7: SECUENCIA DE GLUT1-DSRED.....	83
ANEXO 8: 1 KB DNA LADDER	87

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Cantidad de plásmido DsRed abierto e inserto promotor T7 necesarias para realizar tres reacciones de ligación realizadas en distintas proporciones.	24
Tabla 2: Reacción de ligación utilizada para ligación entre plásmido DsRed y promotor T7.	25
Tabla 3: Reacción de corte del plásmido DsRed-T7 con la enzima HindIII.	29
Tabla 4: Ligación entre plásmido DsRed-T7 con GLUT1 con enzimas de corte HindIII y SacII.	33
Tabla 5: Cantidad de plásmido DsRed-T7 abierto e inserto DNA GLUT1 necesarias para realizar tres reacciones de ligación realizadas en distintas proporciones.	35
Tabla 6: Reacción de ligación utilizada para ligación entre plásmido dsRed-T7 abierto e inserto de DNA GLUT1.	35
Tabla 7: Digestión de plásmido DsRed-T7GLUT1 con enzima de corte Not I.	36
Tabla 8: Reacción de transcripción in vitro.	38
Tabla 9: Preparación de gel de poliacrilamida para mRNA.	38
Tabla 10: Reacciones entre medio de cultivo y DNA para transfección.	40
Tabla 11: Evaluación estadística de resultados de ensayo de transporte de D-glucosa a una concentración de 3,0 mM de ovocitos transfectados con plásmido mRNA de GLUT1 desde el plásmido T7dsRedGLUT1 y ovocitos inyectados con agua.	61
Tabla 12: Evaluación estadística de resultados de ensayo de transporte de D-glucosa a una concentración de 0,5 mM de ovocitos transfectados con mRNA de GLUT1 obtenido de plásmido pAGA-GLUT1 y ovocitos inyectados con agua.	63
Tabla 13: Evaluación estadística de resultados de ensayo de transporte de D-glucosa a una concentración de 0,5 mM de ovocitos transfectados con mRNA de GLUT1 obtenido de plásmido pAGA-GLUT1 y ovocitos inyectados con agua.	65

ÍNDICE DE FIGURAS:

Fig 1: Transporte de glucosa activo (SGLT) y transporte de glucosa facilitado (GLUT)...	16
Fig 2: Dendograma de alineamiento múltiple de las sub-familias de los GLUTs y su sitios de expresión.	17
Fig 3: Imagen de rana <i>Xenopus laevis</i>	18
Fig 4: Imagen de los estados de los ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	19
Fig 5: Esquema de plásmido pAGA-GLUT1.	39
Fig 6: Gel de agarosa de plásmidos purificados digeridos con enzima Hind III.	44
Fig 7: Gel de agarosa de plásmidos digeridos con enzima Hind III.	46
Fig 8: Esquema de plásmido dsRed-T7.	47
Fig 9: Gel de agarosa de plásmidos GLUT1-dsRed y dsRed-T7 digeridos con enzimas Hind III y Sac II.	50
Fig 10: Gel de agarosa de linealización de DNA de GLUT1 de plásmido T7dsRedGLUT1.	54
Fig 11: Visualización de gel de agarosa de mRNA de GLUT 1.	56
Fig 12: Gel de agarosa de mRNA de GLUT 1 de plásmido pAGA-GLUT1.	57
Fig 13: Transfección de GFP en células HEK 293.	58
Fig 14 Transfección de GLUT1 de plásmido en células HEK 293.	59
Fig 15: Ensayo de transporte de D-Glucosa a una concentración DOG de 3,0 mM.	60
Fig 16: Ensayo de transporte de D-Glucosa a una concentración DOG de 0,5 mM.	62
Fig 17: Ensayo de transporte de D-Glucosa a una concentración DOG de 3,0 mM.	64

I. INTRODUCCIÓN

Desde que se conoció la estructura y el funcionamiento de los genes se comenzó a buscar la forma de aislarlos, analizarlos, modificarlos y de transferirlos de un organismo a otro, dando origen al desarrollo de una nueva área de la biología conocida como ingeniería genética. La investigación en esta área ha permitido la producción de proteínas recombinantes, es decir, producir proteínas a partir de una especie o una línea celular distinta a la original (Crisci et al., 2012). Para obtener proteínas recombinantes, se debe aislar la región codificante del gen que la codifica, introducirlo en un vector, normalmente un plásmido bacteriano para facilitar su manejo y expansión, a partir de ahí es posible transferirlo a otras células que también pueden sintetizar la proteína (Crisci et al., 2012). Una vez introducido el material genético en la célula (RNA o DNA), ésta produce las proteínas recombinantes, lo que permite realizar análisis de funcionalidad, interacción, localización, comportamiento en distintos escenarios, inhibición por distintos compuestos, etc.

El estudio de proteínas recombinantes es muy utilizado en la investigación de la medicina, la agricultura y la acuicultura. En la acuicultura, se realizan principalmente estudios para generar estrategias que mejoren el sistema inmunológico de las especies cultivadas, aunque el estudio de funcionalidad de proteínas en especies marinas está siendo un área emergente en los últimos años (Melamed, et al., 2002). Debido a las nuevas exigencias del mercado, ha nacido la necesidad de diversificar las especies cultivables, disminuir los tiempos de producción, aumentar las tasas de reproducción, disminuir enfermedades, etc. En estos aspectos, los estudios de ingeniería genética en la acuicultura ha sido de gran relevancia con respecto a hormonas reguladoras de crecimiento y a la generación de vacunas de origen recombinante (Guerrero, et al., 2004). Las proteínas recombinantes generadas en especies acuícolas poseen potencial aplicación en la industria alimentaria, debido a que la glucosa es nutriente esencial para todas las especies, incluyendo especies de importancia acuícola.

Entre las proteínas de mayor interés para la ingeniería genética se encuentran los transportadores de glucosa, pues la glucosa es el monosacárido más importante de la naturaleza debido a que proporciona energía a las células de una amplia gama de organismos y resulta ser vital para la mantención del metabolismo energético celular. El transporte de la glucosa a través de la membrana celular se lleva a cabo por dos familias de proteínas de membrana: Transportadores de glucosa acoplados a sodio (**Sodium GLucose Transporter, SGLT**) y las proteínas facilitadoras del transporte de glucosa (**GLUcose Transporters, GLUT**) (Karp, 1998). La familia de proteínas GLUT's introduce la glucosa en la célula a favor del gradiente de concentración y está compuesta por 14 miembros, con diferente distribución tisular. GLUT 1 posee una alta afinidad por la glucosa, por lo que actúa en un amplio rango de concentraciones, considerándose como un transportador de glucosa basal. GLUT 2, GLUT 3, GLUT 8, GLUT 9, GLUT 10 y GLUT 11 se expresan principalmente en hígado adulto y tejido muscular, el GLUT 4, GLUT 5 y GLUT 12 se han detectado principalmente en el tejido adiposo. GLUT 7 y GLUT 14 se han encontrado en testículos y próstata. Finalmente el GLUT 6 y GLUT 13 se encuentran en algunas neuronas.

El transportador GLUT1 es el miembro mejor estudiado de esta familia, debido en gran medida a su abundancia en eritrocitos humanos y a su expresión ubicua en tejidos humanos. Fue clonado y secuenciado por primera vez desde la línea celular de hepatoma humano HepG2 el año 1985 (Ojeda, 2011). En el caso de los peces, sus estudios son escasos, se ha reportado presencia de GLUT1 en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) adulto en el corazón, músculo esquelético, hígado, bazo, sangre y tejido cerebral (Aldegunde, et al., 2000). En células embrionarias de trucha arcoíris y salmón del atlántico (*Salmo salar*) se encuentra en alta concentración durante la blastulación y gastrulación (Teerijoki, 2002). El estudio de la transfección de proteínas recombinantes nos permitirá no tan sólo reconocer su presencia en ciertas células de los peces sino que además desarrollar peces con mejores condiciones para su crecimiento. La metodología propuesta permite la visualización de la ubicación de la proteína dentro de la célula y su funcionalidad, produciendo un sistema de análisis detectar enfermedades asociadas a alteraciones en la producción proteica, selección de individuos, etc.

La investigación se desarrolló en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Católica de la Santísima Concepción campus San Andrés en la ciudad de Concepción, Chile. El desarrollo de esta técnica permitió iniciar la investigación realizada por la Doctora Lorena Mardones acerca del rol del GLUT8 en la lactancia materna. La alta concentración de lactosa en la leche humana facilita la absorción del calcio y el hierro y promueve la colonización intestinal, flora microbiana fermentativa que al mantener un ambiente ácido en el intestino, inhibe el crecimiento de bacterias, hongos y parásitos. El conocimiento del funcionamiento de los transportadores de glucosa en la producción de leche materna permitiría mejorar la calidad de leche producida por las madres para evitar enfermedades digestivas, sanguíneas e inmunológicas en los lactantes. Sin embargo, la técnica utilizada es utilizable en otras proteínas de interés, en el caso de la acuicultura, se puede realizar selección de individuos para mejorar el crecimiento, o reconocer problemas de inmunología de las especies de cultivo.

OBJETIVOS:

Objetivo General:

Expresar el transportador de glucosa GLUT1 en ovocitos de *Xenopus laevis* mediante microinyección

Objetivos Específicos:

- Desarrollar plásmido capaz de expresar la proteína GLUT1 fusionada a una proteína fluorescente en ovocitos y células de mamíferos *HEK 293*.
- Expresar eficientemente GLUT1 en células *HEK 293*.
- Expresar eficientemente GLUT1 en ovocitos de *Xenopus laevis*.

II. ESTADO DEL ARTE

La biotecnología se refiere a toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos (Convention on Biological Diversity, Article 2. Use of Terms, United Nations. 1992). Dentro de la biotecnología se encuentra la ingeniería genética, la cual se basa en la manipulación genética de organismos con un propósito predeterminado, aprovechable por el hombre. Se trata de aislar el gen que produce la proteína e introducirlo en otro ser vivo que sea más sencillo de manipular. Lo que se consigue es modificar las características hereditarias de un organismo de una forma dirigida por el hombre, alterando su material genético (Obeso, 2010). De esta forma, la biotecnología de proteínas está implicada en el aislamiento y producción de proteínas específicas a partir de diversas fuentes naturales como plantas, animales o microorganismos, para su subsiguiente empleo en diversas aplicaciones. La tecnología de DNA recombinante ha jugado un papel muy importante en el desarrollo de la biotecnología de proteínas ya que gracias a la manipulación de genes ha sido posible producir grandes cantidades de proteínas, muchas de las cuales se encuentran en concentraciones muy bajas en su ambiente natural. Se considera una proteína recombinante o proteína heteróloga aquella proteína cuya síntesis se realiza en un organismo distinto al organismo nativo (Walsh & Headson, 1995).

SISTEMAS DE EXPRESIÓN

Para la producción de proteínas recombinantes se hace uso de uno de los múltiples sistemas de expresión disponibles comercialmente o de aquellos desarrollados con fines de investigación, o bien se pueden diseñar y construir sistemas de expresión según necesidades específicas. Un sistema de expresión lo conforma un organismo huésped y un vector de expresión o fragmento de DNA que poseen los elementos génicos necesarios para realizar los procesos de transcripción y traducción en dicho organismo, además de permitir la incorporación de las moléculas de DNA recombinante (Díaz, 2011). Para la selección de un

sistema adecuado para la síntesis de una proteína recombinante se tienen que tener en consideración el origen biológico (procariota o eucariota) y las propiedades químicas y biológicas de la proteína de interés (secuencia nucleotídica, secuencia aminoacídica, peso molecular, pH, proteólisis, destino celular deseado, etc.), su aplicación posterior (biomédica, alimentos, uso en humanos, animales o plantas, industrial, ambiental) y el bio-proceso que se empleará para su producción (escala de producción). Dentro de los sistemas de expresión existen:

- **Bacterias:** Son los microorganismos más utilizados para la síntesis de proteínas recombinantes, principalmente la especie *Escherichia coli*. Pero al ser procariotas, no son tan idóneas para sintetizar proteínas de gran tamaño o procedentes de organismos superiores.
- **Levaduras:** Las levaduras presentan muchas de las ventajas en cuanto a crecimiento con respecto a las bacterias, pero además, son capaces de glicosilar y de plegar proteínas compleja
- **Células de insecto:** Las células de insecto son capaces de llevar a cabo modificaciones post-traduccionales mucho más complejas que las levaduras, abarcando no sólo glicosilaciones más perfectas, sino también fosforilaciones, procesamiento de péptidos señal, procesamientos proteolíticos correctos, acilaciones, carboximetilaciones, etc.
- **Células CHO:** Obviamente, si se necesita una modificación post-traducciona específica de mamífero, un entorno mamífero sería la mejor opción. Las células de Ovario de Hámster Chino (CHO) son el sistema preferido para la producción de anticuerpos monoclonales y otras proteínas recombinantes.
- **Animales transgénicos:** Los animales superiores producen secreciones susceptibles de ser utilizadas como vehículo para la expresión de proteínas heterólogas, como leche y orina.
- **Plantas transgénicas:** Las plantas, en comparación con los animales y los cultivos procedentes de animales, ofrecen una producción más segura y rápida, que requiere menos tiempo y es más ventajosa en términos de almacenamiento y distribución.

TRANSFORMACIÓN Y TRANSFECCIÓN

Para que el DNA recombinante persista en el tiempo y se amplifique *in vivo* es necesario introducirla en un hospedador apropiado y seleccionar aquellas células portadoras del DNA recombinante utilizado en el proceso (Dorado, 2008). En biología molecular, la transformación es la alteración genética de una bacteria resultante de la absorción directa, incorporación y expresión de material genético exógeno (DNA exógeno). El DNA exógeno se encuentra en el ambiente y se introduce a través de la membrana de la célula bacteriana. Existen diversos métodos para introducir material genético en una célula; proceso conocido como transformación (ya que dicha célula se “transforma” o altera genéticamente). El método clásico consiste en hacer orificios en las envolturas celulares, lo cual suele conseguirse mediante diferentes compuestos químicos y tratamientos físicos (como cambios de temperatura, rotura mecánica con micro-esferas metálicas, o aplicación de campos eléctricos).

Obtenida la clonación del DNA foráneo dentro de la bacteria, se procede a purificar el material genético para su incorporación al modelo de expresión de células eucariontes seleccionado, en este caso el procedimiento se llama transfección. Las técnicas de transfección celular, que se han desarrollado fundamentalmente para permitir la introducción de ácidos nucleicos en el interior de las células han permitido en gran medida ampliar los conocimientos acerca de la regulación génica y de la función de las proteínas. Actualmente, existe gran número de aproximaciones experimentales utilizadas para la generación de animales transgénicos o líneas celulares modificadas, entre las que se encuentran:

1- Métodos químicos

- a) **Método del fosfato cálcico:** Basado en la obtención de un precipitado entre el cloruro de calcio y el DNA en una solución salina de fosfatos.

- b) **Método del DEAE dextrano:** Basado en la obtención de complejos entre la resina DEAE y el DNA.
- c) **Método de lipofección:** Se basa en la formación de complejos entre lípidos catiónicos y DNA.

2- Métodos físicos

- a) **Biobalística:** Introducción de micro-partículas de tungsteno u oro recubierta del DNA con una pistola de helio.
- b) **Fusión de protoplastos:** El método consiste en obtener protoplastos de bacterias y se funde directamente con las células de mamíferos en cultivo.
- c) **Fotoporación laser-asistido:** Consiste en la utilización de un rayo láser firmemente enfocado (con un volumen focal localizado de $\sim 10^{-19} \text{ m}^3$), que perfora la membrana celular, permitiendo que las moléculas se incorporen a la célula.
- d) **Microinyección directa:** Es una técnica muy efectiva aunque laboriosa.

La microinyección es el método más utilizado para la producción de animales transgénicos (Díaz, 2013; Narbón, 2008) lo cual se entiende como un animal que logra producir un gen exógeno buscando mejorar una cualidad del animal de importancia económica. Sin embargo, el uso de la técnica de microinyección es también utilizada para el estudio de canales iónicos (Pérez, et al., 2003; Chavez, et al., 2003), para estudios de heredabilidad, de marcadores moleculares, de generación de proteínas recombinantes, etc. (Wahlstrom, et al., 2013). Para la realización óptima de la técnica es necesario seleccionar una estrategia adecuada según las características del material genético y la finalidad del estudio.

TRANSPORTADORES DE GLUCOSA

Dentro de la amplia gama de proteínas recombinantes estudiadas en los distintos sistemas de expresión, encontramos proteínas esenciales para el desarrollo de la vida. Para la producción del adenosintrifosfato (ATP), compuesto indispensable en muchas de las reacciones que se llevan a cabo en la célula, se necesitan varios sustratos energéticos, entre los cuales la glucosa es el de mayor importancia. Para poder llevar a cabo importantes funciones como la oxidación y el almacenaje, la glucosa debe entrar al interior de la célula para incorporarse a la vía metabólica que predomina según las condiciones hormonales y energéticas del momento. Una célula puede sobrevivir si evita que su medio interno se mezcle y establezca el equilibrio con el medio ambiente. Este semi-aislamiento es proporcionado por la membrana celular, de naturaleza lipídica y relativamente impermeable a moléculas polares como la glucosa. Es por esta característica que moléculas como los carbohidratos requieren algún elemento transportador que les permita cruzar el inconveniente que significa la membrana; así, la naturaleza, a través de millones de años de evolución biológica desarrolló moléculas proteicas que cruzan completamente la membrana y que son capaces de formar “poros” que comunican el exterior con el interior celular, permitiendo el flujo de moléculas como los aminoácidos, vitaminas y carbohidratos en un sentido u otro. En este orden de ideas, los transportadores para glucosa trabajan de manera coordinada con factores hormonales, receptores, y segundos mensajeros para mantener el flujo de este metabolito en condiciones normales (Bermúdez, et al., 2007). El transporte de la glucosa a través de la membrana celular, se lleva a cabo por dos familias de proteínas de membrana: Transportadores de glucosa acoplados a Sodio (SGLT) y las proteínas facilitadoras del transporte de glucosa (GLUT) (Fig. 1). En los últimos años ha habido un explosivo incremento en la información sobre estos transportadores, de hecho, hasta hace unos diez años solo se conocían 6 transportadores pero esta familia ha crecido rápidamente hasta llegar a 14 miembros para los GLUTs y 6 miembros para los SGLTs. El impacto de estos descubrimientos se hace notar cuando se analizan los procesos en los que se involucran estas proteínas: Control de la glicemia basal y post-prandial; mecanismos de absorción de la glucosa y fructosa en el intestino delgado; absorción de fructosa en los

espermatozoides; reabsorción de glucosa a nivel tubular renal y yeyuno; expresión de GLUTs en la mama en lactancia; incorporación de glucosa al músculo durante el ejercicio; mecanismo sensor en la secreción de insulina y respuestas adaptativa del metabolismo energético durante estados de estrés, etc. (Ganoza, et al., 2010).

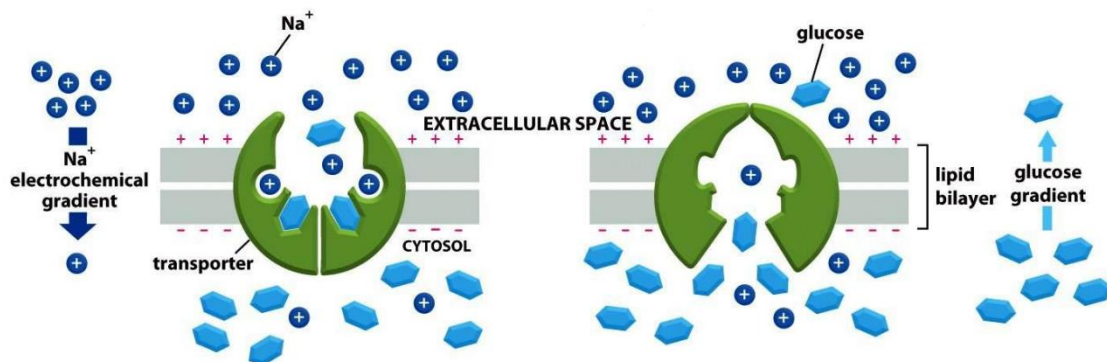


Fig 1: Transporte de glucosa activo (SGLT) y transporte de glucosa facilitado (GLUT).

Se determinan el tipo de transportadores de glucosa según la forma en que introducen la glucosa a la célula, de esta forma clasificamos como:

- 1- **Familia de los co-transportadores de Na⁺/Glucosa (SGLT):** Son transportadores que acoplan el ingreso de Na⁺ y glucosa o galactosa aprovechando el gradiente electromagnético a favor de la entrada del Na⁺ transportado a la hexosa en contra de un gradiente de concentración (Castrejón, et al., 2007).
- 2- **Transportadores de difusión facilitada para hexosas (GLUT):** Corresponden a las proteínas encargadas del transporte de los monosacáridos al interior de todas las células del organismo. Se han identificado 14 de ellas (GLUT1-GLUT14) divididas en tres subfamilias de acuerdo a las similitudes en su secuencia y sus características funcionales (Fig. 2), como especificidad del sustrato (glucosa, fructosa y/o galactosa), sus valores de K_m o su respuesta a los bloqueadores específicos citocalasina B y forskolina (Castrejón, et al., 2007).

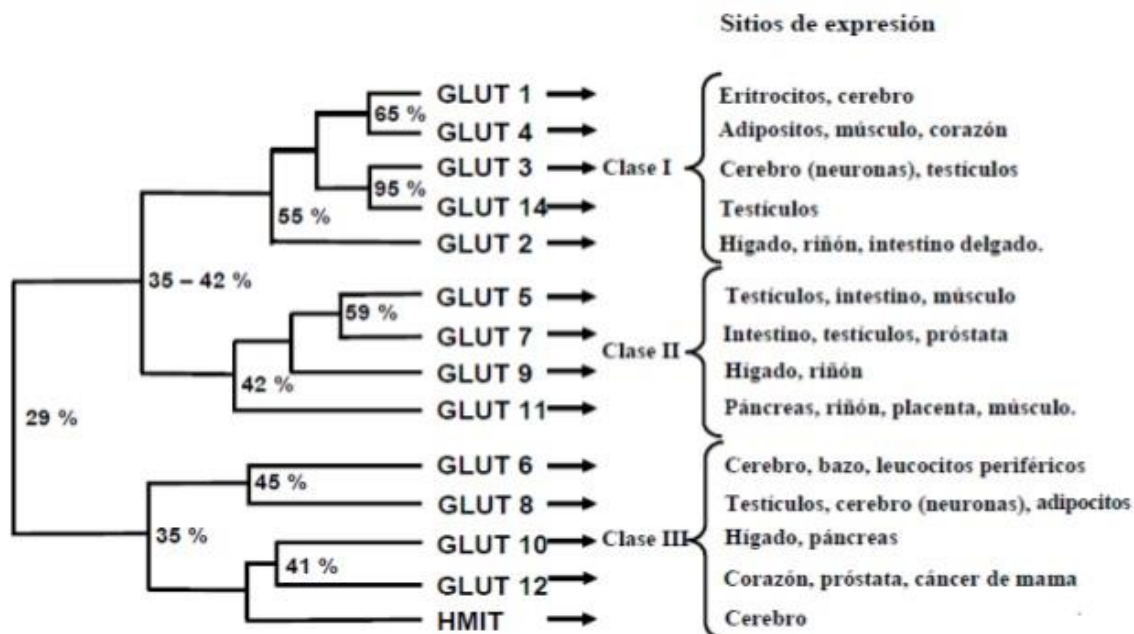


Fig 2: Dendograma de alineamiento múltiple de las sub-familias de los GLUTs y su sitios de expresión.

GLUT1 parece ser el transportador de glucosa más ampliamente distribuido en el ser humano, mamíferos y peces. Este se expresa en numerosos tejidos fetales y adultos como los eritrocitos, células endoteliales, células nerviosas, placenta, glóbulos blancos, células de la retina, riñón (mesangio), tejido adiposo, etc. Este GLUT posee una alta afinidad por la glucosa ($K_m = 1-2 \text{ mM}$) siendo capaz de transportarla al interior de las células prácticamente a cualquier concentración, convirtiéndolo en un transportador basal de glucosa que mantiene su concentración intracelular estable. Es de gran importancia en aquellas células que requieren un suministro constante de glucosa para la producción de energía, tal como sucede en el tejido nervioso y eritrocito (Bermúdez, et al., 2007).

MODELO DE EXPRESIÓN OVOCITO DE *XENOPUS LAEVIS*

El zoólogo y biólogo ambientalista Thomas H. Morgan (Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1933) fue uno de los primeros que utilizó *Xenopus* como modelo de expresión génica, pero fue el trabajo del endocrinólogo Lancelot Hogben que estableció a la

especie *Xenopus* como sistema de modelo de expresión. La *Xenopus laevis* o rana africana de uñas negras, acuática y anuro sudafricano del género *Xenopus* (Fig. 3). Habita el centro y sur de África y puede llegar a medir hasta 15 cm de longitud con un promedio de 12 cm. Esta rana se caracteriza por tener la cabeza y cuerpo aplanados pero sin lengua. En esta especie se puede identificar un dimorfismo sexual, siendo el macho ligeramente más grande que la hembra, mientras que en su madurez sexual es posible observar en la cara interior de las extremidades anteriores de los machos, una línea de color negro y en las hembras la presencia de unos labios cloacales más prominentes e incluso ligeramente enrojecidos.



Fig 3: Imagen de rana *Xenopus laevis*.

Su comportamiento es básicamente nocturno, de forma natural, el animal pasa buena parte del tiempo flotando a baja profundidad o en superficie. En cuanto a la temperatura, toleran un amplio rango, siendo el óptimo ente 20-24, no obstante, no es recomendable bajo los 3°C ni sobre los 40°C. Las condiciones de agua en general son de un pH ideal de 7-8, con un grado de dureza de 10-20 de agua dulce (Jones, 2012). Debido a su amplio uso como modelo de expresión en laboratorios de biología molecular, su cultivo es conocido y gracias a las características de la especie, su mantenimiento en cautiverio es simple y económico.

Los ovarios de *Xenopus* son grandes y pueden contener cientos de ovocitos de gran tamaño que son fáciles de obtener. A pesar de la diferencia de tamaño, los procesos de la ovogénesis y la maduración en los anuros se conservan en los mamíferos, por lo tanto, son

ampliamente utilizados por los investigadores que estudian el ciclo celular. Los ovocitos de *X. laevis* en estado VI son células grandes de más de 1 mm de diámetro (Fig. 4), los cuales contienen un gran núcleo (o la vesícula germinal), 100.000 veces más grande que un núcleo de célula somática. Esto ocupa aproximadamente el tercio del volumen del ovocito y se desarrollan rápidamente. La vesícula está rodeada por una envoltura nuclear con grandes poros que facilitan el transporte desde y hacia el citoplasma. El modelo de expresión que *Xenopus* puede ofrecer a la investigación es importante en términos de calidad y cantidad, por ejemplo, un ovario de rana corresponde a 1,000 ovarios de ratón (Gurdon, 2006).

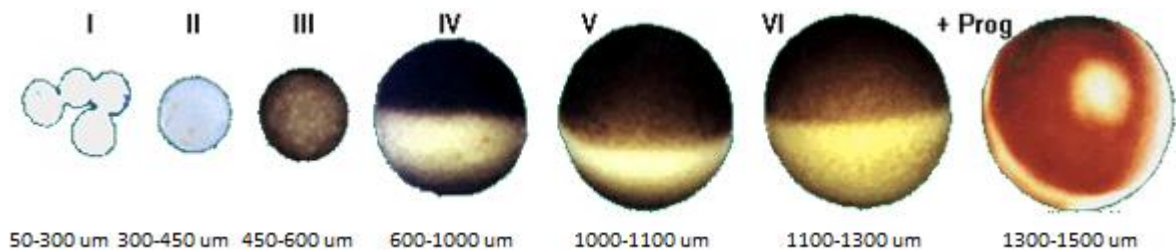


Fig 4: Imagen de los estados de los ovocitos de *Xenopus laevis*.

APLICACIÓN EN ACUICULTURA

El desarrollo de la biotecnología de las proteínas recombinantes en la acuicultura se ha enfocado en su aplicación para incrementar la eficiencia y productividad de la práctica acuícola (Melamed, 2002). Uno de los primeros estudios en este campo ha sido el desarrollo de hormonas, estimuladores del crecimiento de especies marinas y para disminuir el tiempo de maduración de diversas especies cultivables (Peterson, et al., 2004).

El estudio de proteínas recombinantes en los peces y moluscos de valor comercial es aún reducido a pesar de existir un gran potencial en su aplicación para los procesos de producción. Algunos estudios referentes a los transportadores de glucosa se han enfocado en conocer el funcionamiento de estos en el organismo, mejorar dietas proporcionadas y

mejorar la inmunidad de los peces. Las especies de peces carnívoros cultivados en centros han presentado altos niveles de diabetes causada por su alimentación, en este aspecto, se han realizado investigaciones acerca de funcionalidad de GLUT1 (Teerijoki et al., 2001), inhibición de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT2 (Reyes, 2011) mutación de GLUT1 (Ojeda, 2011), estudios de GLUT2 y GLUT4 en el intestino de dorada (Caballero, et al., 2015), efectos de la leptina relacionada con GLUT2 (Aguilar, 2012), etc. Con respecto al sistema inmunológico de los peces se ha investigado el desarrollo de probióticos y prebióticos para adicionar en sus dietas, por ejemplo, el estudio de inmunoestimulantes producidos con GLUT1, GLUT2, GLUT3 y GLUT4 (Vásquez, et al., 2012). Estudios recientes además se han enfocado en la investigación de los transportadores de glucosa responsables de estímulos cerebrales en los peces, así como, identificación del papel de la proteína GLUT2 en el desarrollo del pez cebra (Marín, et al., 2014), expresión de GLUT6 y GLUT8 en pez cebra (Fuentealba, 2012), presencia de GLUT8 en el espermatozoide maduro (Ubilla & Valdebenito, 2011), etc.

Al ser GLUT1 el transportador de glucosa más expresado dentro de los organismos sus posibilidades de estudio dentro de especies marinas es sumamente amplio. De igual manera los estudios relacionados con el resto de transportadores de glucosa representan nuevas alternativas para la industria acuícola. No obstante, el mejoramiento de las condiciones internas y externas del cultivo de especies acuícolas no sólo se puede analizar en el funcionamiento de los transportadores de glucosa, el estudio de otras proteínas recombinantes fundamentales para los peces aún es escaso, las que han presentado mayor desarrollo en el rubro son el estudio de las acuaporinas, proteínas transmembrana encargadas de transportar el agua a través de los compartimientos celulares (Mestre, 2011), y el estudio de la mioestatina, péptido regulador negativo del crecimiento del músculo (Delgado, 2013). El manejo de las técnicas para producir proteínas recombinantes es esencial para investigaciones futuras capaces de mejorar las condiciones de cultivo de especies acuícolas de importancia comercial.

III. MARCO DE INVESTIGACIÓN

La investigación realizada se enmarcó en el proyecto FONDECYT “Rol del transportador facultativo de glucosa GLUT8 en la glándula mamaria durante embarazo y lactancia” de la doctora Lorena Mardones con la participación del doctor Marcelo Villagrán. La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de biología molecular de la Facultad de Medicina, Universidad Católica de la Santísima Concepción, Campus San Andrés en la ciudad de Concepción, Chile.

Para lograr el estudio de la técnica de microinyección en ovocitos de rana *Xenopus laevis* se decidió realizar la expresión de la proteína transportadora de glucosa GLUT1 debido a que su expresión mediante la técnica de microinyección se ha realizado con éxito en ovocitos de *X. laevis* en otras investigaciones. Paralelamente, se realizó el estudio mediante transfección en línea celular de riñón humano *HEK 293* del transportador de glucosa GLUT1 para conocer su ubicación subcelular.

Para realizar esta investigación se necesitó una sala acondicionada para la mantención de ranas de la especie *Xenopus laevis*, éste se encontró ubicado en la Facultad de Medicina de la Universidad Católica de la Santísima Concepción campus San Andrés.

Con la finalidad de expresar el transportador de glucosa GLUT1, fue necesario desarrollar plásmidos que contuvieran el DNA de dicha proteína estudiada, además de que permitiera su experimentación en ovocitos de anfibio y en células de mamífero, considerando también tener una fluorescencia distinguible dentro del ovocito de *Xenopus laevis* y en células de riñón humano.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

EQUIPOS:

- 1- Incubadora Thermo Scientific Series 800 OWJ
- 2- Centrífuga Biofuge Pico Heraeus Instrument
- 3- Incubadora Thermo Heraeus Instruments Funtion Line
- 4- Bloque térmico Labnet International, inc Accublock Digital Dry Bath
- 5- Espectrofotómetro Spectronic Genesys 5
- 6- Cámara de electroforesis horizontal JYSPCT
- 7- Fuente de poder para electroforesis NanoPAc-300 Cleaver Scientific ltd.
- 8- Transiluminador UV Vilber Lourmat
- 9- Cámara de flujo Jinan Biobase Biothech co ltd. BSC 1300II A2X
- 10- Puller productora de microagujas Narishige modelo PC-10
- 11- Microinyector Nanoject II Drummond Scientific Company
- 12- Lupa Arquimed modelo XTL-2310
- 13- Microscopio invertido de fluorescencia Motic AE31

Para el desarrollo de los objetivos planteados es necesario mantener cultivos de células *HEK 293* y ovocitos de *Xenopus laevis*, y en el caso de los ovocitos, debido a que deben utilizarse hasta 48 horas previa extracción, se mantuvieron ranas de la especie *Xenopus laevis* en el laboratorio de bioquímica de la facultad de medicina de la Universidad Católica de la Santísima Concepción.

CULTIVO DE CÉLULAS HEK 293:

Se trabajó con líneas celulares de riñón humano *HEK 293* cultivado un inóculo en placas Petri de 12 cm de diámetro con medio de cultivo 10% penicilina streptomycin, 10% sentamina, 5% suero bovino fetal a un nivel de pH 7.0, estas se cultivan en una incubadora a una temperatura de 37°C y 5% de CO₂.

MANTENCIÓN DE RANAS XENOPUS LAEVIS:

Como medio de expresión se utilizaron ovocitos de rana de la especie *Xenopus laevis* las cuales fueron mantenidas en el laboratorio durante la experiencia. Se utilizaron cubetas de 40 litros de capacidad con un 60% del volumen utilizado con agua potable declorada y realizando un recambio cada 7 días manteniendo un pH de 8. La densidad utilizada fue de 2 ranas por cubeta la cual poseía un medio círculo de pvc para poder esconderse debido a su comportamiento en su ambiente natural, se alimentaban una vez al día con hígado de vacuno ad libitum. Con respecto a la temperatura ambiente, se mantuvo a 20°C con un fotoperiodo de 12:12.

EXTRACCIÓN DE OVOCITOS DE X. LAEVIS:

Para obtener los ovocitos de *Xenopus laevis* se mantuvo a las ranas hembras en el laboratorio de la Facultad de medicina de la UCSC. Se seleccionó una rana para realizarse una incisión en su abdomen a la cual se le administra anestesia (Benzocaína 0,05%) y se mantiene en frío sobre *gelpack*. Se cortó el ovario y se colocó en un medio OR2 (NaCl 100 mM, KCl 1,8 mM, MgCl₂ 1 mM, Hepes 5 mM, pH 7,5), una vez obtenidos los ovocitos digeridos durante 3 horas en colagenasa (1mg/mL) previamente, se seleccionó a lupa los ovocitos que se encontraran en fase VI, viables para ser inyectados.

El objetivo principal de la ingeniería genética es lograr la correcta expresión a altos niveles del gen clonado en el microorganismo huésped elegido. Sin embargo, la clonación de un gen en un no suele asegurar que nuestro gen de interés se vaya a expresar bien, sobre todo cuando procede de especies alejadas filogenéticamente. Por esta razón hay que proceder al diseño de vectores especializados y a menudo a modificaciones del gen de interés, con objeto de que este pueda transcribirse y traducirse bien en el microorganismo huésped. El promotor T7 se seleccionó para el vector pDsRed para determinar el inicio de la transcripción. Para esto se prepara la secuencia del promotor T7 para su ligación con el plásmido comercial DsRed.

PREPARACIÓN DEL PROMOTOR T7 PARA VECTOR pDsRed:

Se hicieron oligonucleotidos de la secuencia de T7 y de su complementario donde se colocaron colas sobresalientes para generar extremos cohesivos para Nhe I en 5' y Xho I en 3' para poder realizar la ligación de estos oligonucleotidos en el vector pDsRed abierto (*Anexo 1*).

T7 f: CTAGCGTAATACGACTCACTATAGGA

T7 r: GCATTATGCTGAGTGATATCCTCTAG

LIGACIÓN DE DNA CON PLÁSMIDO:

Se prepara el plásmido DsRed-T7 utilizando el plásmido DsRed abierto, comercial Clontech, este presenta el gen de la proteína fluorescente roja en el codón de término del plásmido, y como inserto se utilizó el promotor del fago T7. Para conocer las concentraciones necesarias para el desarrollo de la ligación entre el plásmido y el inserto se debe conocer el tamaño (pb) del plásmido y el inserto, la concentración de cada muestra y la relación de concentraciones a utilizar para la reacción. En la tabla 1 se presentan las concentraciones calculadas para las relaciones entre plásmido e inserto de 1:3, 1:9 y 1:27 gracias a una calculadora de ligación de la página web <http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/>.

Tabla 1: Cantidad de plásmido DsRed abierto e inserto promotor T7 necesarias para realizar tres reacciones de ligación realizadas en distintas proporciones.

	Conc. ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Tamaño (pb)	1:3 (ng)	1:9 (ng)	1:27 (ng)
Plásmido	0,8	4700	50,0	50,0	50,0
Inserto	0,5	1100	35,1	105,3	315,9

En la tabla 2 determinamos gracias a los datos presentados en la tabla 1 la cantidad necesaria de plásmido e inserto para cada relación escogida para realizar la reacción de ligación. Para realizar el plásmido DsRed-T7, no tan sólo necesitamos el plásmido y el inserto, se necesita la enzima DNA ligasa para unir el plásmido DsRed con el inserto T7.

Tabla 2: Reacción de ligación utilizada para ligación entre plásmido DsRed y promotor T7.

Compuesto	Cantidad 1:3	Cantidad 1:9	Cantidad 1:27
Plásmido	0,1 µl	0,1 µl	0,1 µl
Inserto	0,1 µl	0,2 µl	0,4 µl
T4 DNA ligasa	2,0 µl	2,0 µl	2,0 µl
Buffer T4 DNA ligasa	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl
H ₂ O	16,8 µl	16,7 µl	16,5 µl
Total	20,0 µl	20,0 µl	20,0 µl

Se dejó incubar 2 horas a 37°C para finalmente inactivarlo por calor durante 10 minutos a 65°C.

Una vez obtenido el plásmido DsRed-T7 es necesario clonarlo para conseguir una mayor cantidad, necesaria para los siguientes procedimientos, utilizamos la bacteria *Echerichia coli* para clonar el plásmido debido a su fácil y casi inocuo uso. Antes de realizar el crecimiento de las bacterias en medio de cultivo, estas bacterias necesitan ser transformadas a bacterias químico competentes, esto permite obtener bacterias capaces de incorporar DNA exógeno. Las bacterias químico competentes consiguen ser transformadas con el DNA del plásmido DsRed-T7 mediante un shock térmico. Finalmente se cultivan las bacterias en medio LB durante 36 horas. Este procedimiento es primordial para la obtención de una mayor cantidad del DNA por lo que calculamos la eficiencia de la transformación realizada para conocer la cantidad de bacterias necesarias para el desarrollo de los siguientes procedimientos.

OBTENCIÓN DE BACTERIAS QUÍMICO COMPETENTES:

Con la finalidad de conseguir la cantidad necesaria de plásmido para los experimentos siguientes fue necesario incorporarlo en bacterias. Para la preparación de las bacterias se utilizó un inóculo de 250 µl de bacterias *Escherichia coli*, utilizadas en un experimento realizado por el profesor Villagrán previamente (E22). Se realiza la preparación de bacterias competentes en medio Ivone:

- 1- Se inoculan 3 ml de bacterias en 250 ml de medio LB en un matraz de 1 L a 18°C de temperatura ambiente, se deja crecer toda la noche.
- 2- Se toma una muestra de 100 µl y se observan en espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm, al momento de obtener una absorbancia de 0,55, se coloca el matraz en hielo y se distribuye en tubos falcon por 20 minutos. Centrifugar en centrífuga a 4000 rpm a 4°C por 10 minutos.
- 3- Se resuspenden en 80 ml de medio Ivone helado (*anexo 2*) (40 ml en 2 tubos) y resuspender sólo por agitación. Centrifugar a 4000 rpm a 4°C por 10 minutos.
- 4- Se resuspende en 20 ml total de buffer Ivone y luego se agregan 1,5 ml de OSMO
- 5- Las bacterias competentes se alicuotan en tubos pre-helados en 100 µl por tubo y dejarlos a -30°C.

TRANSFORMACIÓN QUÍMICA DE BACTERIAS CON PLÁSMIDO DsRed-T7 Y CON PLÁSMIDO GLUTI-DsRed:

Las muestras de bacterias y de plásmidos se mezclan en un tubo eppendorf y se incuban en hielo por 30 minutos, luego se dio un shock térmico de 42°C por 60 segundos. Se enfriaron los tubos en hielo por 2 minutos, luego se añaden 450 µl de medio SOC (2 % de triptona, 0,5 % de extracto de levadura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de MgSO₄ y 20 mM de glucosa) a temperatura ambiente. Se incubó a 37°C durante 1 hora, se centrifuga por 5 minutos a 7.000 rpm. Se elimina el sobrenadante, finalmente se siembra en medio agar LB con antibiótico kanamicina y se incuba a 37°C toda la noche.

Finalmente, calculamos la eficiencia de las bacterias con la fórmula (1):

$$\text{Eficiencia} = \frac{\text{\#colonias}}{\text{ng DNA}} \times \frac{1000 \text{ ng}}{1 \mu\text{g}} \quad (1)$$

Obtenidas las colonias de bacterias necesarias para continuar con los procedimientos, obtenemos el DNA del plásmido DsRed-T7 desde las bacterias purificando, en este caso, con dos métodos distintos, en primera instancia purificamos el plásmido con lisis alcalina, y una segunda muestra se purificó con el kit Ezna de laboratorios Omega. Para comprobar el resultado de la purificación del plásmido se optó por realizar una digestión del pDsRed-T7 con la enzima de restricción Hind III que corta el DNA del plásmido en dos sitios, dentro del fragmento del promotor T7 y en el DNA del plásmido DsRed.

PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDO DsRed-T7 POR LISIS ALCALINA:

Conseguida la cantidad de plásmido deseada, fue necesaria la purificación de las muestras para eliminar las sales y restos de bacterias en el cultivo estacionario así obtener el plásmido DsRed-T7 puro.

Protocolo purificación por lisis alcalina:

- 1- Recolectar en tubo eppendorf (previamente marcado) 2,0 ml de un cultivo estacionario de bacterias crecidas en medio con antibiótico.
- 2- Centrifugar a temperatura ambiente durante 5 minutos a 1200 g
- 3- Eliminar el sobrenadante
- 4- Agregar al precipitado resultante 200 μ l de solución de resuspensión (P1), resuspender con cuidado hasta obtener una solución homogénea
- 5- Añadir al mismo tubo 400 μ l de buffer de lisis (P2). Agitar suavemente con la mano por inversión del tubo unas 15 veces

- 6- Agregar al mismo tubo, 200 μ l de solución de neutralización (P3). Agitar con la mano por inversión del tubo unas 10 veces. Incubar 5 minutos a 4°C
- 7- Centrifugar el tubo de lisado celular por 5 minutos a 1200 g. Esto permite formar un precipitado blanco de distintos agregados moleculares (proteínas, restos de membrana, etc.) y un sobrenadante que contiene el DNA plasmidial
- 8- Se retira con mucho cuidado el sobrenadante y se recolecta en un tubo limpio. Es fundamental evitar tomar parte del precipitado
- 9- Se añaden 600 μ l de isopropanol al tubo en el que hemos puesto la solución con el DNA plasmídico. Se mezcla con la mano por inversión del tubo unas 3 veces
- 10- Centrifugar el tubo por 10 minutos a 1200 g
- 11- Eliminar con mucho cuidado el sobrenadante
- 12- Se añade al mismo tubo, 400 μ l de etanol al 70%. Se mezcla suavemente con la mano por inversión del tubo
- 13- Centrifugar el tubo por 5 minutos a 1200 g. Retirar cuidadosamente el sobrenadante y dejar secar el tubo de DNA precipitado
- 14- Una vez que los tubos están secos, resuspender el plásmido con 20 μ l de agua grado molecular.

PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDO DsRed-T7 CON MINIPREP KIT EZNA:

Se utilizaron 12 muestras de cultivo estacionario de bacterias transformadas las cuales fueron purificadas a pequeña escala con la utilización del kit Ezna de laboratorios Omega bio-tek.

Protocolo miniprep kit Ezna:

- 1- Se agregan al pellet 500 μ l de solución I. Resuspender con pipeta
- 2- Se agregan 500 μ l de solución II a temperatura ambiente y agitar 20 veces. Incubar por 5 minutos
- 3- Se agregan 700 μ l de solución III y agitar a temperatura ambiente

- 4- Centrifugar por 30 segundos a máxima velocidad
- 5- Agregar 100 µl de eq buffer de a la columna. Centrifugar por 30 segundos a máxima velocidad
- 6- Pasar el sobrenadante y centrifugar por 30 segundos a máxima velocidad
- 7- Lavar con 500 µl de Hibind buffer
- 8- Lavar con 700 µl de wash buffer (adicionar etanol al buffer previo uso) 2 veces. Dejar secar por 15 minutos a temperatura ambiente
- 9- Resuspender en 40 µl de elusión buffer. Secar por 10 minutos a 37°C. Dejar columna en tubo nuevo y luego del secado centrifugar.

DIGESTIÓN DE PLÁSMIDO DsRed-T7 CON ENZIMA HIND III:

El plásmido DsRed-T7 presenta en su DNA la enzima Hind III, una presente en el plásmido DsRed y la otra dentro del fragmento del promotor T7. Por este motivo se utiliza la digestión del plásmido purificado con la enzima de corte Hind III para comprobar la presencia del plásmido DsRed-T7 en la muestra. Se realizó la digestión a una muestra de 2 µl del plásmido purificado en los tubos eppendorf con la siguiente reacción:

Tabla 3: Reacción de corte del plásmido DsRed-T7 con la enzima HindIII.

Compuesto	Cantidad
H ₂ O	15 µl
HindIII	1 µl
Buffer 10x	2 µl
DNA	2 µl
Total	20 µl

Se dejó incubando por 3 horas a 37°C.

Preparado el plásmido DsRed-T7, realizamos el mismo procedimiento de clonación y purificación para el DNA de GLUT 1 presente en el plásmido GLUT1-dsRed.

PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDO GLUT1-DsRed CON KIT MIDIPREP:

El DNA codificante de GLUT1 (*Anexo 3*) se obtuvo desde un plásmido facilitado por el Doctor Juan Carlos Vera de la Universidad de Concepción, este se clonó en bacterias competentes y luego se purificó.

Protocolo de purificación con Kit Midiprep de laboratorios Omega bio-tek:

- 1- Se resuspenden las bacterias en buffer de suspensión. Se agrega primero RNAsa al buffer previo uso. Luego se resuspende en 4 ml y luego 4 ml más (8 ml en total)
- 2- Se agregan 8 ml (siempre pasados) de buffer de lisis. El buffer de lisis se calentó previamente. Se mezcla por 25 agitaciones fuertes y se incuba por 3 minutos a temperatura ambiente. Inmediatamente se mezcla con 8 ml de buffer neutro, previamente enfriado, y el tubo se mezcla por agitación 20 veces. Se deja reposar en hielo por 5 minutos
- 3- Se pasa la mezcla por el filtro de papel puesto en embudo. El filtrador viene en el kit y se pre-humedece con buffer eq. Se equilibra la columna con 2,5 ml de buffer eq. En un tubo falcon se puede montar la columna con anillo para recibir el filtrado. Se pasa el lisado bacteriano por la columna y se elimina el residuo
- 4- Se lava la columna con 4 ml de buffer de lavado (2 veces). Se eluye en tubo falcon nuevo con 2,5 ml (2 veces) de buffer de elusión, previamente entibiado, usar baño de agua
- 5- Los 5 ml de elusión se alicuotan en eppendorf de 1,5 ml con 500 μ l c/u (10 tubos) y se precipitan con isopropanol 400 μ l c/u por 10 minutos a temperatura ambiente (previa agitación). Se centrifuga por 30 minutos a máxima velocidad
- 6- Lavar el plásmido con etanol al 70%. Centrifugar 10 minutos a máxima velocidad. Se deja secar el pellet (se extrae el exceso de etanol con pipeta) por a lo menos 10 minutos
- 7- Se resuspende cada tubo en 20 μ l de agua grado molecular y se resuspende por 30 minutos 30°C en termoplaca con agitación eventual.

CUANTIFICACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE DNA:

Para realizar una cuantificación de la concentración del DNA obtenido medimos mediante espectrofotómetro la absorción de luz a una longitud de onda de 260 nm y obtuvimos así la concentración de DNA utilizando la fórmula (2):

$$[\text{DNA}] = A_{260} \times \text{fd} \times 50; \text{fd} = [\text{in}] / [\text{fn}], \quad (2)$$

Donde:

[DNA]: Concentración de DNA

A_{260} : Absorción de luz a una longitud de onda de 260 nm

fd: factor de dilución

[in]: concentración inicial

[fn]: concentración final

ELECTROFORESIS DE DNA EN GEL DE AGAROSA:

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2%, TAE 5% donde se sembraron las muestras para la observación de las bandas producidas en el gel y medición de dichas bandas mediante una escala de pares de bases estándar λ HindIII (*Anexo 4*).

Preparación de cámara del gel:

Los extremos abiertos de la cámara se cubren con cinta de enmascarar 3M. Frotar la base y el costado de la cámara en contacto con la cinta para asegurar que toda la superficie esté pegada. Colocar el peine correspondiente para el tamaño de la muestra en la parte superior de la cámara para luego verter el gel en fase líquida en la cámara.

Preparación de gel de agarosa:

Se vertió en un matraz 80 ml de buffer TAE al 0,5% y 0,8 g de agarosa, luego se llevaron al microondas hasta diluir la agarosa, luego se agregaron 1,5 μ l de bromuro de etilio agitando suavemente para mezclar, una vez tibio se vertió en la cámara y se dejó gelificar. Una vez gelificado, se sacó con cuidado la cinta de los borde, se llenó la cubeta con buffer de corrida TAE al 5% y se colocó allí la cámara con el gel, recién entonces con cuidado se sacaron los peines.

Electroforesis:

Se utilizó una cámara de electroforesis horizontal. Colocar la tapa de la cubeta, controlando que los bornes negativos y positivos coinciden (rojo/rojo y negro/negro), conectar la cubeta a la fuente de poder con un voltaje de corrida de 110 voltios, en este caso debido al tamaño del equipo, se activa y se deja correr por al menos 1 hora. La visualización se realiza en un transiluminador con luz UV.

Preparación de muestras para electroforesis en gel de agarosa:

Se utilizó el kit para electroforesis en gel Kapa Biosystems que posee un buffer de carga 6X para mezclar con las muestras a visualizar.

Una vez obtenido y cuantificado el DNA del plásmido DsRed-T7 y el DNA del plásmido GLUT1-dsRed necesitamos abrir el plásmido DsRed-T7 para poder introducir el DNA del transportador de glucosa GLUT 1 obtenido desde el plásmido GLUT1-dsRed, esto se realiza con enzimas de restricción seleccionadas, realizando la digestión de ambos plásmidos, se realiza una electroforesis en gel de agarosa para extraer las bandas resultantes, purificarlas y así realizar la reacción de ligación entre el plásmido DsRed-T7 abierto y el DNA de GLUT1, consiguiendo así el plásmido T7dsRedGLUT1.

**DIGESTIÓN DE PLÁSMIDO GLUT1-DsRed Y PLÁSMIDO DsRed-T7 CON
ENZIMAS HIND III Y SAC II:**

Se realiza una digestión a ambos plásmidos con las enzimas de corte Hind III y Sac II, la reacción se produce con los compuestos necesarios para las enzimas de restricción seleccionadas, la información requerida fue obtenida desde la página web de New England BioLabs, produciendo así la siguiente reacción:

Tabla 4: Ligación entre plásmido DsRed-T7 con GLUT1 con enzimas de corte HindIII y SacII.

Compuesto	pDsRed-T7	pGLUT1-dsRed
DNA	15,0 µl	6,0 µl
Hind III	2,0 µl	2,0 µl
Sac II	2,0 µl	2,0 µl
Buffer 2.1	4,0 µl	4,0 µl
H ₂ O	17,0 µl	26,0 µl
Total	40,0 µl	40,0 µl

Se dejó incubando por 3 horas a 37°C.

EXTRACCIÓN DE BANDAS DESDE GEL DE AGAROSA:

Se corrieron las muestras mediante electroforesis en gel de agarosa 2%, TAE 5% para luego cortar las bandas obtenidas desde el gel con bisturí bajo luz uv. Luego se purificaron mediante el kit Nucleotap.

Protocolo de extracción de DNA mediante kit NucleoTap:

Se cortaron los fragmentos desde el gel de agarosa con un escarpelo limpio. Luego se determinó el peso de cada tubo con trozo de gel, por cada 100 mg de gel se adicionaron 300 μ l de NT1, en el caso de contener más de un 2% de gel de agarosa, se dobló el volumen de buffer NT1.

- 1- Vortexear el NucleoTap hasta conseguir una mezcla homogénea. Por cada μ g de DNA adicionar 4 μ l de la suspensión NucleoTap, pero no menos de 10 μ l (siempre usar mayor cantidad)
- 2- Incubar la muestra a 50°C hasta que el trozo de gel se disuelva (5-10 minutos). Vortexear la muestra brevemente cada 2-3 minutos hasta disolver completamente el trozo de gel. Centrifugar por 30 segundos a 10000 g y descartar el sobrenadante
- 3- Lavar la matriz de sílice (1^{er} lavado). Adicionar 500 μ l de buffer NT2 al pellet de la matriz de sílice y vortexear brevemente para resuspender el pellet. Centrifugar por 30 segundos a 10000 g y remover el sobrenadante por completo
- 4- (2^{do} lavado) Adicionar 500 μ l de buffer NT3 al pellet de la matriz de sílice y vortexear brevemente. Centrifugar por 30 segundos a 10000 g y remover el sobrenadante por completo
- 5- (3^{er} lavado) Adicionar 500 μ l de buffer NT3 al pellet de la matriz de sílice y vortexear brevemente. Centrifugar por 30 segundos a 10000 g y remover el sobrenadante. Centrifugar por 30 segundos a 10000 g nuevamente. Remover los residuos de buffer NT3 por completo
- 6- Secar el pellet de la matriz de sílice a 37°C por 10-15 minutos
- 7- Adicionar 25-50 μ l de buffer NE (utilizar lo menos posible) a la matriz de sílice. Incubar la mezcla a temperatura ambiente por 10 – 15 minutos. Vortexear la mezcla 2-3 veces durante la incubación
- 8- Centrifugar la muestra por 30 segundos a 10000 g y transfiera el sobrenadante que contiene el DNA a un tubo limpio. Repetir este paso 2 veces para obtener mayor rendimiento.

SUBCLONAMIENTO DE PLÁSMIDO DsRed-T7 CON GLUT1:

Se prepara el plásmido T7dsRedGLUT1 utilizando el plásmido DsRed-T7 abierto y como inserto se utilizó el DNA GLUT1. La reacción de ligación fue la siguiente:

Tabla 5: Cantidad de plásmido DsRed-T7 abierto e inserto DNA GLUT1 necesarias para realizar tres reacciones de ligación realizadas en distintas proporciones.

	Conc. ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Tamaño (pb)	1:3 (ng)	1:9 (ng)	1:27 (ng)
plásmido	0,188	4700	50,0	50,0	50,0
Inserto	0,345	1500	53,6	160,7	482,1

Tabla 6: Reacción de ligación utilizada para ligación entre plásmido dsRed-T7 abierto e inserto de DNA GLUT1.

Compuesto	Cantidad 1:3	Cantidad 1:9	Cantidad 1:27
Plasmido	3,8 μl	3,8 μl	3,8 μl
Inserto	0,2 μl	0,3 μl	1,4 μl
T4 DNA ligasa	2,0 μl	2,0 μl	2,0 μl
Buffer T4 DNA ligasa	1,0 μl	1,0 μl	1,0 μl
H ₂ O	13,0 μl	12,9 μl	11,8 μl
Total	20,0 μl	20,0 μl	20,0 μl

Se dejó incubar 2 horas a 37°C para finalmente inactivarlo por calor durante 10 minutos a 65°C.

Para realizar la transfección en ovocitos de *Xenopus laevis* se debe ingresar el RNA de la proteína de interés, es por ello que se realiza en primer lugar, la linealización del DNA del plásmido T7dsRedGLUT1, para luego, transcribir in vitro el DNA para obtener el RNA del plásmido.

OBTENCIÓN DE mRNA DE pT7DsRedGLUT1:

Obtenido el plásmido T7dsRedGLUT1, éste se digirió con la enzima de restricción Not I para linealizar el DNA del GLUT1 para luego poder realizar la transcripción in vitro del DNA:

Tabla 7: Digestión de plásmido DsRed-T7GLUT1 con enzima de corte Not I.

Compuesto	Cantidad
Plásmido	8,6 µl
Not I	1,5 µl
Buffer 3.1	2 µl
H ₂ O	7,9
Total	20 µl

Se dejó incubando por 3 horas a 37°C, luego se realizó una electroforesis en gel de agarosa 2%, TAE 5% de esta forma se obtuvo el plásmido linealizado. Obtenida la banda de gel de agarosa se cortó la banda obtenida con un bisturí para poder purificar el DNA del plásmido linealizado con el kit nucleoTap.

TRANSCRIPCIÓN IN VITRO DE DNA DE PLÁSMIDO T7DsRedGLUT1:

El DNA del plásmido T7dsRedGLUT1 linealizado se transcribió a mRNA realizando una transcripción in vitro con el kit mMMESSAGE mMACHINE T7 para su posterior transfección en ovocitos de *Xenopus laevis*.

Protocolo de transcripción in vitro con kit mMESSAGE mMACHINE T7:

Después de la linealización se termina la digestión de restricción añadiendo lo siguiente:

1 / 20° volumen 0,5 M de EDTA, 1 / 10° volumen de acetato de Na 3M o acetato de NH₄ 5M y 2 volúmenes de etanol. Se Mezcló bien y enfriar a -20 ° C durante al menos 15 min. A continuación, se sedimentó el ADN durante 15 min en una centrífuga a máxima velocidad. Se retiró el sobrenadante, se volvió a girar el tubo durante unos segundos, y se retiró el líquido residual con una pipeta de punta fina. Se resuspendió en dH₂O ó buffer TE a una concentración de 0,5 – 1,0 µg/µl. Para evitar contaminación de DNA, este se debe tratar con proteinasa K (100-200 µg / mL) y SDS al 0,5% durante 30 minutos a 50 ° C, seguirlo con extracción con fenol/cloroformo (utilizando un volumen igual) y precipitación con etanol (*Anexo 5*).

- Descongelar los reactivos congelados
- Colocar la Mezcla de Enzimas de Polimerasa de RNA en hielo
- Vortexear el buffer de reacción 10X y el NTP/CAP 2X hasta que estén completamente en solución. Una vez descongelado, guarde los ribonucleótidos (NTP / CAP 2X) en hielo, pero el buffer de reacción 10X a temperatura ambiente mientras se monta la reacción.
- Todos los reactivos deben centrifugar brevemente antes de abrirlos para evitar pérdidas y/o contaminación del material que puede estar presente alrededor del borde del tubo.
- Armar la reacción de transcripción a temperatura ambiente, la espermidina en el buffer de reacción 10X puede coprecipitar el ADN molde si la reacción se arma sobre hielo.
- Añadir el buffer de reacción 10X después del agua y los ribonucleótidos. Las siguientes cantidades son para una única reacción de 20 µL.

Tabla 8: Reacción de transcripción in vitro.

Compuesto	Cantidad
H ₂ O	4,0 µl
NTP/CAP 2X	10,0 µl
Buffer de reacción 10X	2,0 µl
Mix de enzimas	2,0 µl
DNA linealizado templado	1,0 µg
Total	20,0 µl

- Mezclar bien. Agite suavemente el tubo o pipetear la mezcla hacia arriba y hacia abajo suavemente, y luego centrifugar brevemente para recuperar la mezcla de reacción del fondo del tubo.
- Incubar a 37 ° C, 1 h Típicamente, se alcanza un rendimiento del 80% después de una incubación de 1 hora. Para un rendimiento máximo, recomendamos una incubación de 2 horas.

PREPARACIÓN DE GEL DE POLIACRILAMIDA:

Tabla 9: Preparación de gel de poliacrilamida para mRNA.

Compuesto	Cantidad
Urea	7,2 g
TBE 5x	3,0 ml
Acrilamida/bis 30%	2,0 ml
H ₂ O	2,8 ml
Total	15 ml

Se mezclaron los compuestos hasta obtener una solución transparente luego se adicionaron 120 µl de PSA 10% y 16 µl de TEMED.

Se realizó posteriormente, para el plásmido AGA-GLUT1, el proceso de linealización del DNA del plásmido con la enzima de restricción Xho I, y luego se realizó la transcripción in vitro del DNA del plásmido AGA-GLUT1 para obtener su RNA.

PLÁSMIDO pAGA-GLUT1:

El plásmido AGA-GLUT1 (Fig. 5) fue donado por el Laboratorio del Profesor Alejandro Reyes de la Universidad Austral de Chile, Instituto de Bioquímica.

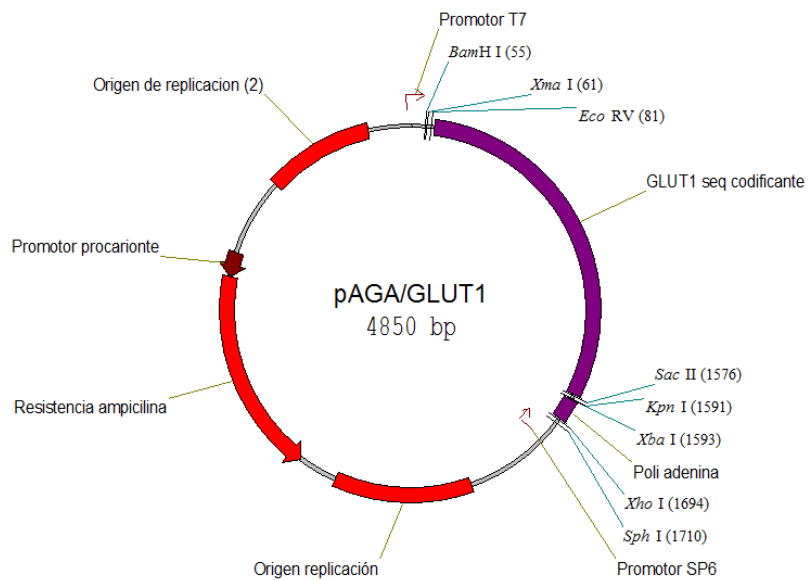


Fig 5: Esquema de plásmido pAGA-GLUT1.

Finalizado el proceso de formación del plásmido T7dsRedGLUT1 se decidió transfectar el DNA del plásmido en células *HEK 293*, puesto que este método nos permite visualizar la ubicación de la proteína, transportadora de glucosa, GLUT1 dentro de la célula. LA transfección en células *HEK 293* no necesita transfectar externamente el DNA.

TRANSFECCIÓN DE GLUT1 EN HEK 293:

Una vez realizado el gel, ya transformado el plásmido dsRed-T7 con GLUT1 se realizó lipofección en células *HEK 293*. Una vez realizada la monocapa de células adheridas al fondo de la placa Petri de 12 mm crecidas durante dos días, se lavó la placa con buffer PBS dos veces para eliminar el medio de cultivo, luego se añadió tripsina 100 μ l para lograr desprender las células desde la placa, esto se deja en reposo por 5 minutos. Se agregaron 5 ml de medio de cultivo con suero para detener la acción de tripsina, se centrifugó por 5 minutos a 3000 rpm. Obtenida la mezcla se introdujo en pocillos redondos de 1,5 cm de diámetro con vidrios (200.000 células). En los pocillos se adicionó 50 μ l de polilisina (SIGMA) para mejorar la adhesión de las células a los vidrios, esto se dejó actuar por 30 minutos. Paralelamente, se realizaron las reacciones:

Tubo 1: 24,5 μ l medio de cultivo sin suero + 0,5 μ l reactivo Satisfaction

Tubo 2: 24,5 μ l medio de cultivo sin suero + 0,5 μ l DNA [1 μ g]

Tabla 10: Reacciones entre medio de cultivo y DNA para transfección.

DNA	Concentración	Cantidad de DNA	Cantidad de medio
pT7dsRedGLUT1	0,5 μ g/ μ l	2,0 μ l	23,0 μ l
CONTROL GFP	1,0 μ g/ μ l	1,0 μ l	24,0 μ l

Se esperaron 5 minutos y luego se mezcló con pipeta 20 veces, y se agregó la reacción 1 a la reacción 2 por goteo, se esperó 20 minutos, y se agregó la mezcla a los pocillos que contenían medio sin suero. Luego de 24 horas se adicionó a los pocillos 400 μ l de medio de cultivo con suero. Finalmente, se produce la fijación de las células y después de 2 días se observan los vidrios en microscopio.

VISUALIZACIÓN DE GLUT1 EN CÉLULAS HEK 293 TRANSFECTADAS:

Realizada la transfección fue necesaria la fijación de las células para su observación a microscopio. Primero se sacó el medio para su lavado con PBS, luego se colocó solución PFA al 3.7% en hielo por 20 minutos para finalmente rehidratar con 10 mM de Tris-HCl pH 7 y se lavó tres veces con PBS. Ya fijadas las células, se montaron en un portaobjetos usando Vectashiel y se mantuvieron a 4°C en oscuridad hasta su observación bajo microscopio de epifluorescencia Nikon. En estas condiciones, la muestra puede ser utilizada para su observación durante varios días. Una vez visualizadas se fotografiaron en microscopio Confocal Olympus DSU provisto de software Cell R. Se fotografiaron un mínimo de 5 campos bajo aumento 40 y 100x para luego montar las fotos con el software ImageJ.

La transfección en ovocitos de *Xenopus laevis* se desarrolló para el RNA de GLUT 1 desde el plásmido T7dsRedGLUT1 y el RNA de GLUT 1 desde el plásmido AGA-GLUT1. Se decidió optar por analizar mediante el nivel de transporte de glucosa de los ovocitos transfectados la eficiencia obtenida en la transfección.

MICROINYECCIÓN DE OVOCITOS:

Se producen micro-agujas calentando la punta de los capilares de vidrio hasta obtener 10 micrómetros, a través de la observación en una lupa se introduce el mRNA en la membrana de un ovocito de *X. laevis* fase VI.

***ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GLUT1 EN OVOCITOS DE XENOPUS LAEVIS
MEDIANTE ENSAYO DE TRANSPORTE DE D-GLUCOSA:***

Se realizaron estudios de captación de 2-[1,2-³H]-desoxi-D-glucosa en ovocitos microinyectados con el mRNA del plasmido, con el siguiente protocolo:

Inicialmente, los ovocitos se dejaron incubando por 30 minutos en buffer de transporte (Hepes 15 mM pH 7,6; NaCl 135 mM; KCl 5 mM; MgCl₂ 0,8 mM; CaCl₂ 1,8 mM) a temperatura ambiente, luego los ovocitos se centrifugaron por 45 segundos a 3000 rpm, eliminando el sobrenadante. Los ensayos de transporte se realizaron utilizando el análogo de glucosa no metabolizable 2-desoxiglucosa (DOG) a la concentración de 0,5 y 3,0 mM, complementado con 1 μCi/ml de 2-[1,2-³H]-desoxi-D-glucosa (26,2 Ci/mmol, NEN-DuPont). El experimento de transporte fue finalizado mediante la adición de 0,5 ml de buffer de detención (Hepes 15 mM pH 7,6; NaCl 135 mM; KCl 5 mM; MgCl₂ 0,8 mM; CaCl₂ 1,8 mM, HgCl₂ 0,2 mM) a 4 °C, centrifugando por 45 segundos a 3000 rpm. Después de realizar tres lavados con el buffer de detención, las células fueron lisadas con 200 μl de tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM, SDS 0,2 %), las muestras ya lisadas fueron traspasadas a viales de centelleo de capacidad 7 ml y se les agregara 1ml de líquido de centelleo (Ecoscint, National Diagnostics). Finalmente, se procedió a medir la radiactividad incorporada en un contador de centelleo líquido LS 6500 Liquid Scintillation Counting System, Beckman Coulter.

V. RESULTADOS

EFICIENCIA DE BACTERIAS QUÍMICO-COMPETENTES PARA EL PLÁSMIDO

DsRed-T7:

La preparación de bacterias químico-competentes, una vez realizada con una concentración de 20 ng de plásmido, se prepara la inoculación de bacterias en una placa Petri con medio LB, luego de 5 días se contaron las colonias de bacterias obteniendo 1450 colonias visibles. Finalmente, se determinó utilizar la fórmula (1) para determinar la eficiencia de la transformación de las bacterias químico-competentes con el plásmido DsRed-T7.

$$Eficiencia = \frac{1450}{20 \text{ ng}} \times \frac{1000 \text{ ng}}{1 \mu\text{g}} \approx 10^5 \text{ comp/ng}$$

La eficiencia esperada es entre 10^5 a 10^{10} , esto nos permite determinar que las bacterias poseen el plásmido DsRed-T7 en una baja eficiencia, sin embargo se encuentra en gran cantidad por lo cual se decidió utilizar para su posterior purificación.

EFICIENCIA DE BACTERIAS QUÍMICO-COMPETENTES PARA EL PLÁSMIDO

GLUT1-DsRed:

La preparación de bacterias químico-competentes, una vez realizada con una concentración de 20 ng de plásmido, se prepara la inoculación en una placa Petri con medio LB, luego de 5 días se contaron las colonias de bacterias obteniendo 1806 colonias visibles. De igual forma que en el caso de la transformación con el plásmido DsRed-T7, se determinó utilizar la fórmula (1) para determinar la eficiencia de la transformación de las bacterias químico-competentes con el plásmido GLUT1-dsRed.

$$Eficiencia = \frac{1806}{20 \text{ ng}} \times \frac{1000 \text{ ng}}{1 \mu\text{g}} \approx 18^5 \text{ comp/ng}$$

La eficiencia esperada es entre 10^5 a 10^{10} , esto nos permite determinar que las bacterias poseen el plásmido GLUT1-dsRed presentando una alta eficiencia, por lo cual se encuentra en gran cantidad para utilizar en su posterior purificación.

PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDO DsRed-T7 POR LISIS ALCALINA:

La correcta purificación del plásmido DsRed-T7 desde las bacterias químico-competentes era determinante para nuestro objetivo, por lo cual fue necesario corroborar su efectividad mediante el corte del plásmido en un sitio específico. Por este motivo se determinó realizar una digestión del plásmido purificado con la enzima Hind III, debido a que ésta corta dentro del fragmento T7 y el plásmido dsRed. Una vez producida la digestión se procedió a preparar una electroforesis en gel de agarosa al 2% para visualizar las bandas obtenidas (Fig. 6). Se utilizaron 20 μ l de 3 muestras de plásmido DsRed-T7 purificado y 2 μ l de 3 muestras de plásmido DsRed-T7 purificado y digerido con la enzima Hind III, las cuales se corrieron en gel obteniendo el siguiente resultado:

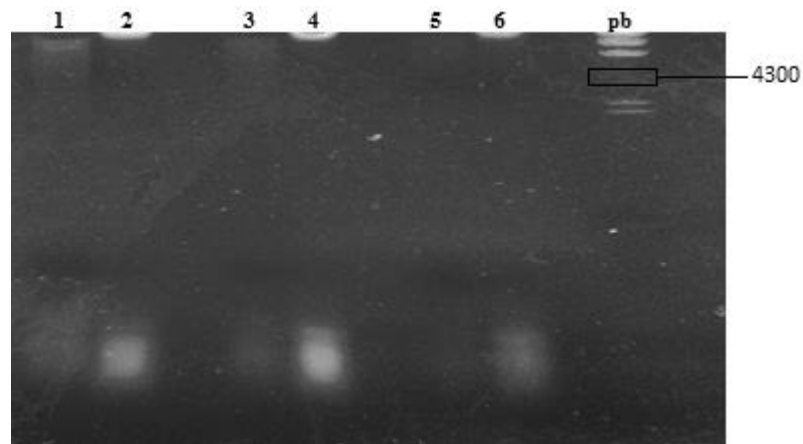


Fig 6: Gel de agarosa de plásmidos purificados digeridos con enzima Hind III. Bandas 1, 3 y 5 corresponden al plásmido purificado, bandas 2, 4 y 6 corresponden al plásmido digerido, pb estándar λ Hind III.

Se observan 6 bandas en el gel de agarosa de igual cantidad de pares de base, las cuales presentan un tamaño menor al esperado, puesto que, el plásmido purificado DsRed-T7 se determinó con un tamaño de 4,3 Kb aproximadamente. Los tamaños de las bandas fueron comparadas con la escala de pares de bases λ Hind III, lo que se observa es un fragmento muy menor por lo que se concluye que no se dirigió el plásmido en los sitios de corte esperados por un error de procedimiento al momento de realizar la purificación del plásmido DsRed-T7 desde las bacterias. Se llegó de esta manera a la decisión de realizar una nueva purificación del plásmido DsRed-T7 pero esta vez con el protocolo de kit Ezna miniprep.

PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDO DsRed-T7 CON MINIPREP KIT EZNA:

Para verificar la correcta purificación del plásmido DsRed-T7 con el kit Ezna se realizó de la misma forma que anteriormente con la purificación del plásmido por lisis alcalina, se optó por realizar una digestión del plásmido purificado, es decir, con la enzima de corte Hind III la cual corta en el fragmento T7 y en el plásmido DsRed. La purificación se desarrolló a 12 muestras de bacterias competentes transformadas con el plásmido DsRed-T7, luego se seleccionaron 6 muestras, las muestras del 1 al 6, para digerir con la enzima de corte Hind III. Una vez producida la digestión del plásmido purificado se procedió a realizar una electroforesis de gel de agarosa al 2% para visualizar las bandas producidas (Fig. 7). En esta oportunidad se sembraron 6 muestras, las muestras del 7 al 12, de 2 μ l de plásmido DsRed-T7 purificado y 6 muestras, las muestras del 1 al 6, de 20 μ l de plásmido purificado y digerido con la enzima Hind III, obteniéndose así el siguiente resultado:

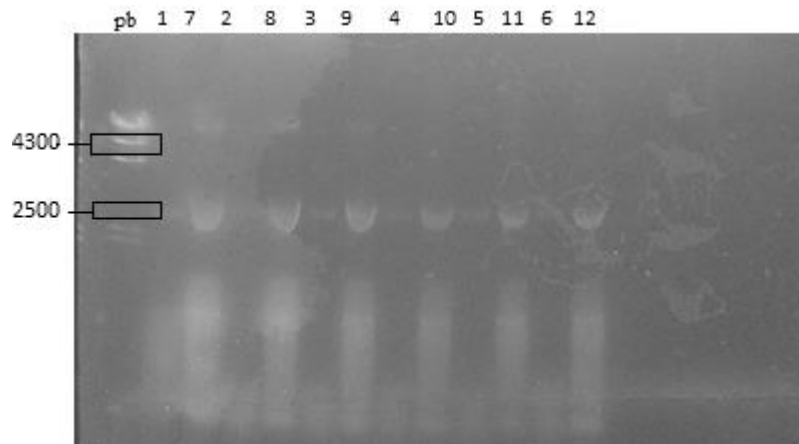


Fig 7: Gel de agarosa de plásmidos digeridos con enzima Hind III. Pb estándar λ Hind III, bandas 1, 2, 3, 4, 5 y 6 corresponden al plásmido purificado, bandas 7, 8, 9, 10, 11 y 12 corresponden a plásmido purificado y digerido con enzima Hind III.

Las muestras de los plásmidos purificados, ubicadas en los carriles correspondientes a las muestras 1, 2, 3, 4 5 y 6, se pueden apreciar bandas de tamaño aproximado al esperado, es decir, 4,8 kb según la escala utilizada (λ Hind III) determinando que las muestras corresponden a plásmido purificado.

No obstante las muestras no corroboran si la ligación del plásmido DsRed con el promotor T7 se efectuó correctamente, así para determinar la presencia del promotor T7 en el plásmido purificado observamos las bandas del gel de agarosa de las muestras 7, 8, 9, 10, 11 y 12 correspondientes al plásmido purificado y digerido con la enzima Hind III donde visualizamos bandas del tamaño esperado y cortados en dos sitios (Fig. 8). Hind III se encuentra presente en el plásmido DsRed y en el fragmento T7 por lo que obtenemos dos bandas, una de mayor tamaño equivalente al plásmido y una más degradada que deducimos es el fragmento cortado con la enzima. De esta forma se validó la purificación del plásmido DsRed-T7.

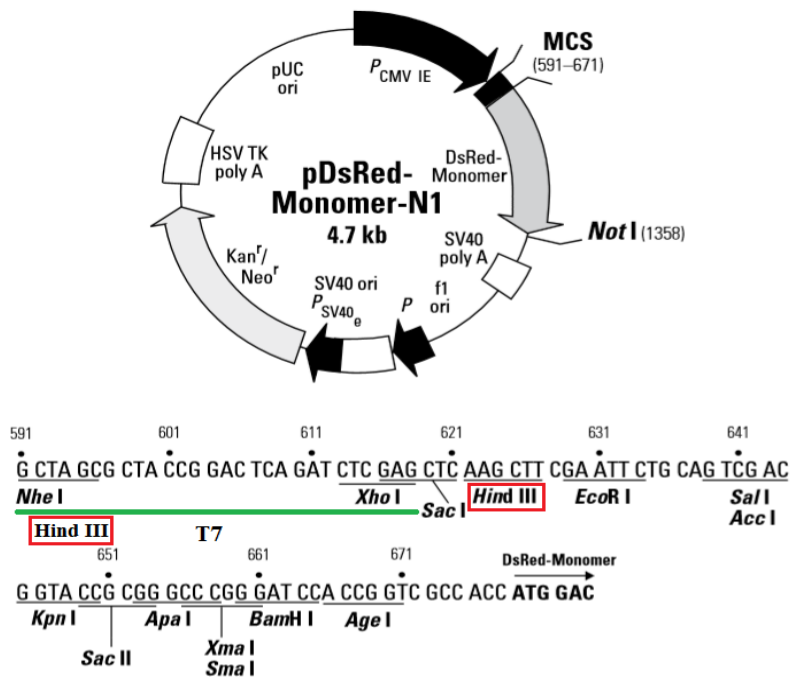


Fig 8: Esquema de plásmido dsRed-T7.

Sin embargo, debido a la importancia de este proceso, se decidió enviar las muestras de plásmido purificado a secuenciar en un laboratorio externo con los primers del promotor T7 (*anexo 6*), Teniendo como resultado el fragmento del promotor T7 existente dentro del plásmido DsRed formando así nuestro plásmido DsRed-T7 necesario para expresar el transportador de glucosa GLUT1.

PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDO GLUT1-DsRed CON MIDIPREP KIT EZNA:

Se realizó la purificación de las bacterias químico-competentes que contenían el plásmido GLUT1-dsRed a mediana escala con el protocolo del kit Ezna para obtener una mayor cantidad del plásmido. Una vez finalizada la purificación se envía a secuenciar la muestra para corroborar la correcta purificación del plásmido GLUT1-dsRed. Se verificó la secuencia de GLUT1 presente en el plásmido por secuenciación desde sus extremos 5' (usando primer complementario promotor CMV) y 3' (usando primer complementario a la

secuencia codificante de pDsRed). Mediante el programa CodonCode Aligner 7.0.1 se obtiene la secuencia nucleótida (*Anexo 7*) desde los electroferogramas enviados por el laboratorio asignado.

CUANTIFICACIÓN DE PLÁSMIDO DsRed-T7 PURIFICADO CON KIT MINIPREP:

El plásmido DsRed-T7 se transformó en bacterias químico-competentes en las cuales se seleccionó la relación molar 1:9 para luego purificar a pequeña escala con el kit Miniprep. Luego, realizamos una medición de longitud de onda de la muestra en el espectrofotómetro para calcular, gracias a fórmula (2), la concentración obtenida:

Fórmula de concentración:

$$[DNA] = A_{260} \times fd \times 50; fd = [in] / [fn]$$

Absorción de luz de muestra de plásmido DsRed-T7 purificado:

$$A_{260} = 0,188$$

Factor de conversión utilizado para realizar la cuantificación:

$$fd = \frac{100 \mu g/ml}{5 \mu g/ml} = 20 \mu g/ml$$

Cálculo de concentración del plásmido DsRed-T7 purificado:

$$[DNA] = 0,188 \times 50 \times 20 \mu g/ml = 188 \mu g/ml = 0,188 \mu g/\mu l$$

La concentración esperada es de 0,5 µg/µl aproximadamente, la concentración del plásmido DsRed-T7 nos permite determinar la cantidad necesaria de plásmido para realizar el subclonamiento con la proteína GLUT1.

**CUANTIFICACIÓN DE PLÁSMIDO GLUT1-DsRed PURIFICADO CON KIT
MIDIPREP:**

El plásmido GLUT1-dsRed se transformó en bacterias químico-competentes en relación molar 1:9 para luego purificar a mediana escala con el kit Midiprep. Luego, se realizó una medición de longitud de onda de la muestra en el espectrofotómetro para calcular, al igual que para el plásmido DsRed-T7, la concentración obtenida con la fórmula (2):

Fórmula de concentración:

$$[DNA] = A_{260} \times fd \times 50; fd = [in] / [fn]$$

Absorción de luz de muestra de plásmido GLUT1-dsRed purificado:

$$A_{260} = 0,345$$

Factor de conversión utilizado para realizar la cuantificación:

$$fd = \frac{100 \mu g/ml}{5 \mu g/ml} = 20 \mu g/ml$$

Cálculo de concentración del plásmido GLUT1-dsRed purificado:

$$[DNA] = 0,345 \times 50 \times 20 \mu g/ml = 345 \mu g/ml = 0,345 \mu g/\mu l$$

La concentración esperada es de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, la concentración del plásmido GLUT1-dsRed igualmente que en el caso del plásmido DsRed-T7 implica una mayor utilización de plásmido para un subclonamiento efectivo.

OBTENCIÓN DE PLÁSMIDO DsRed-T7 ABIERTO Y DNA DE GLUT1:

Teniendo cuantificado los plásmidos GLUT1-dsRed y DsRed-T7, realizamos una digestión de ambos plásmidos con las enzimas de restricción Hind III y Sac II utilizando 3 μg de cada plásmido. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% para visualizar las bandas obtenidas (Fig. 9). En los carriles 1, 2, 3 y 4 se sembraron 10 μl de GLUT1-dsRed digerido con ambas enzimas de restricción mientras que en los carriles marcados como 5, 6, 7 y 8 se sembraron 10 μl de DsRed-T7 igualmente digerido con ambas enzimas de restricción.

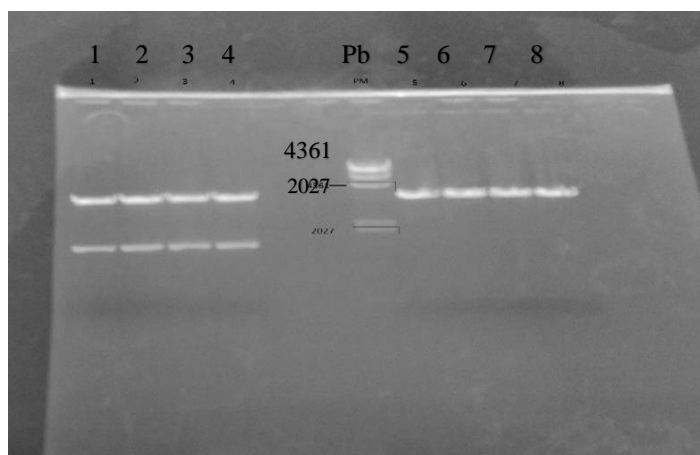


Fig 9: Gel de agarosa de plásmidos GLUT1-dsRed y dsRed-T7 digeridos con enzimas Hind III y Sac II. Bandas 1, 2, 3 y 4 corresponden a plásmido GLUT1-dsRed digeridos con Hind III y Sac II, pb estándar λ Hind III, bandas 5, 6, 7 y 8 corresponden a plásmido dsRed-T7 digeridos con Hind III y Sac II.

En las bandas del 1-4 vemos el corte realizado del plásmido GLUT1-dsRed obteniendo dos bandas visibles, una de un tamaño aproximado de 4,2 kb correspondiente al plásmido que contenía el DNA del GLUT1, mientras que la banda más pequeña de un tamaño estimado de 1500 pb perteneciente al DNA del transportador de glucosa GLUT1. Paralelamente podemos apreciar las bandas del 5-8 vemos el corte que se produjo al plásmido DsRed-T7 en donde se obtuvo una banda de tamaño estimado de 4 kb el cual pertenece al plásmido abierto para la posterior clonación con GLUT1. Una vez visualizado el gel se procede a cortar con bisturí bajo luz UV las bandas de ambos DNA y colocados en tubos eppendorf para luego purificar el DNA.

SUBCLONAMIENTO ENTRE PLÁSMIDO DsRed-T7 ABIERTO Y DNA DE GLUT1:

Una vez purificados el plásmido DsRed-T7 abierto y el DNA de GLUT1 desde las bandas de gel de agarosa se realizó la reacción de ligación para desarrollar el plásmido T7dsRedGLUT1, una vez finalizado el experimento se envió a secuenciar el plásmido para comprobar la efectividad del subclonamiento.

A continuación la secuencia obtenida y sobre ella se destacan:

En fucsia sitio NheI, en amarillo secuencia T7 en azul sitio XhoI, en rojo sitio Hind III y en verde está el ATG de GLUT1 y se continúa con la secuencia completa de GLUT1.

```
CTGTTAGTGGGAGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATCCGC
TAGCGTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCTCAAGCTTGCCACCATGGAGC
CCAGCAGCAAGAAGCTGACGGGTCGCCTCATGCTGGCTGTGGGAGGAGCAGTG
CTTGGCTCCCTGCAGTTTGGCTACAACACTGGAGTCATCAATGCCCCCAGAAG
GTGATCGAGGAGTTCTACAACCAGACATGGGTCCACCGCTATGGGGAGAGCAT
CCTGCCACCACGCTCACCACGCTCTGGTCCCTCTCAGTGGCCATCTTTTCTGTT
GGGGGCATGATTGGCTCCTTCTCTGTGGGCCTTTTCGTTAACCGCTTTGGCCGG
CGGAATTCAATGCTGATGATGAACCTGCTGGCCTTCGTGTCCGCCGTGCTCATG
```

GGCTTCTCGAAACTGGGCAAGTCCTTTGAGATGCTGATCCTGGGCCGCTTCATC
ATCGGTGTGTACTGCGGCCTGACCACAGGCTTCGTGCCCATGTATGTGGGTGAA
GTGTCACCCACAGCCTTTTCGTGGGGCCCTGGGCACCCTGCACCAGCTGGGCATC
GTCGTCGGCATCCTCATCGCCCAGGTGTTTCGGCCTGGACTCCATCATGGGCAAC
AAGGACCTGTGGCCCCTGCTGCTGAGCATCATCTTCATCCCGGCCCTGCTGCAG
TGCATCGTGCTGCCCTTCTGCCCCGAGAGTCCCCGCTTCCTGCTCATCAACCGC
AACGAGGAGAACCGGGCCAAGAGTGTGCTAAAGAAGCTGCGCGGGACAGCTG
ACGTGACCCATGACCTGCAGAGATGAAGGAAGAGAGTCGGCAGATGATGCGG
GAGAAGAAGGTCACCATCCTGGAGCTGTTCCGCTCCCCCGCCTACCGCCAGCC
CATCCTCATCGCTGTGGTGCTGCAGCTGTCCAGCAGCTGTCTGGCATCAACGC
TGTCTTCTATTACTCCCACGAGCATCTTCGAGAAGCGGGGTGCAGCAGCCTGTG
TATGCCACCATGGCTCAGTATCGTCACACGCTCACTGTCGTGTCGCTGTTTGTG
GTGGAGCGAGCAGCCCGGGCGGACCCTGCCACCCTTCAATAGGCTTT

CUANTIFICACIÓN DE PLÁSMIDO T7DsRedGLUT1:

Una vez realizado el subclonamiento entre los plásmidos DsRed-T7 abierto y el DNA de GLUT1 cuantificamos mediante espectrofotómetro la absorción de luz de la muestra para conocer la concentración del plásmido T7dsRedGLUT1 obtenida, realizamos los cálculos con la fórmula (2):

Fórmula de concentración:

$$[\text{DNA}] = A_{260} \times \text{fd} \times 50; \text{fd} = [\text{in}] / [\text{fn}]$$

Absorción de luz de muestra de plásmido T7dsRedGLUT1:

$$A_{260} = 0,512$$

Factor de conversión utilizado para realizar la cuantificación:

$$fd = \frac{100 \mu g/ml}{5 \mu g/ml} = 20 \mu g/ml$$

Cálculo de concentración del plásmido T7dsRedGLUT1:

$$[DNA] = 0,512 \times 50 \times 20 \mu g/ml = 512 \mu g/ml = 0,512 \mu g/\mu l$$

La concentración esperada fue de 0,5 $\mu g/\mu l$ por lo que la concentración obtenida es suficiente para considerar la extracción de DNA efectiva para su posterior linealización.

***LINEALIZACIÓN DEL DNA DEL PLÁSMIDO T7DsRedGLUT1 CON ENZIMA DE
RESTRICCIÓN NOT I:***

Para realizar la microinyección en ovocitos de *Xenopus laevis* es necesario realizar la transcripción del DNA del plásmido, así conseguir la expresión de la proteína. Para poder realizar la transcripción in vitro se necesitó linealizar el DNA de GLUT 1 del plásmido T7dsRedGLUT1 con la enzima de restricción Not I, para luego purificar el DNA desde el gel de agarosa.

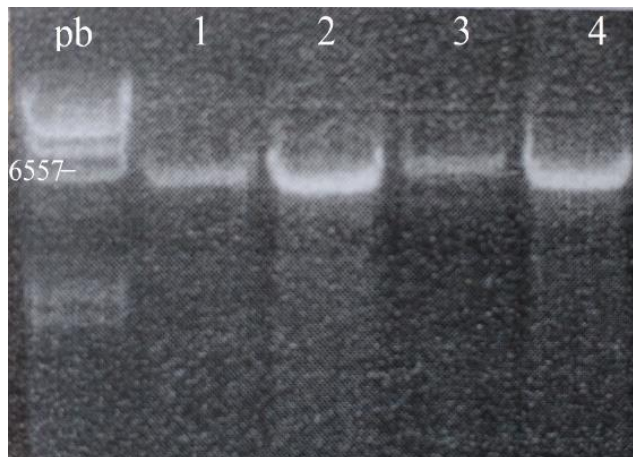


Fig 10: Gel de agarosa de linealización de DNA de GLUT1 de plásmido T7dsRedGLUT1. Pares de bases estándar λ Hind III, bandas 1 y 3 siembra de 3 μ l de plásmido cortado con Not I, bandas 2 y 4 siembra de 9 μ l de plásmido cortado con Not I.

Vemos como se encuentra una sola banda para las 4 muestras (Fig. 10), en el caso de haberse realizado de forma correcta el corte del plásmido, la enzima de restricción cortó en un solo sitio por eso solo se obtiene una banda. En el gel de agarosa se obtuvo el DNA del GLUT I mediante su linealización cortando el plásmido con la enzima de restricción Not I, se utilizaron dos concentraciones para obtener una mejor visualización de ellas. Desde el gel se cortaron las bandas con un bisturí para purificarlas y luego realizar la transcripción in vitro.

CUANTIFICACIÓN DE PLÁSMIDO T7DsRedGLUT1 PURIFICADO DESDE GEL DE AGAROSA:

Se realizó el corte del plásmido T7dsRedGLUT1 con la enzima de restricción Not I para conseguir linealizar el DNA del plásmido, comprobándose corriendo las muestras en un gel de agarosa. Luego, se cortaron las bandas obtenidas con bisturí para purificarlas con kit Nucleo Tap. Así, finalmente realizamos una medición de longitud de onda de la muestra en el espectrofotómetro para calcular, gracias a fórmula (2), la concentración obtenida:

Fórmula de concentración:

$$[DNA] = A_{260} \times fd \times 50; fd = [in] / [fn]$$

Absorción de luz de muestra de plásmido T7dsRedGLUT1 linealizado purificado:

$$A_{260} = 0,512$$

Factor de conversión utilizado para realizar la cuantificación:

$$fd = \frac{100 \mu g/ml}{5 \mu g/ml} = 20 \mu g/ml$$

Cálculo de concentración del plásmido DsRed-T7 purificado:

$$[DNA] = 0,512 \times 50 \times 20 \mu g/ml = 512 \mu g/ml = 0,512 \mu g/\mu l$$

La concentración esperada es de 0,5 $\mu g/\mu l$ aproximadamente, mientras, la concentración del plásmido T7dsRedGLUT1 linealizado nos permite determinar la cantidad necesaria para realizar la transcripción del DNA del plásmido. El resultado obtenido nos permite realizar la transcripción in vitro con la muestra purificada.

OBTENCIÓN DE mRNA DE GLUT 1 DESDE PLÁSMIDO T7DsRedGLUT1:

La transcripción del DNA del plásmido T7dsRedGLUT1 se realizó in vitro mediante el kit mMMESSAGE mMACHINE T7 el que se verificó mediante un gel de poliacrilamida al 4% y se realizó un gel de agarosa al 2% (Fig. 11) donde se obtiene una mejor visualización para demostrar su resultado.

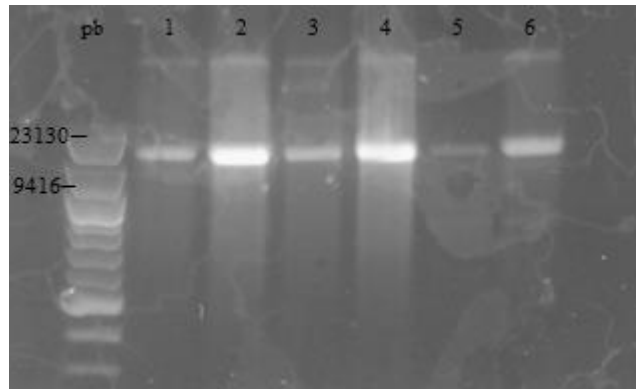


Fig 11: Visualización de gel de agarosa de mRNA de GLUT 1. Pb estándar λ Hind III, muestras del mRNA.

En el gel de agarosa se logró ver las bandas del mRNA de mejor forma que en el gel de poliacrilamida, sin embargo se obtuvo el mismo resultado en ambos. Una vez obtenidas las bandas están se purificaron desde el gel para su posterior inyección en ovocitos de *Xenopus laevis*

OBTENCIÓN DE mRNA DE GLUT 1 DESDE PAGA-GLUT1:

Una vez obtenido el plásmido pAGA-GLUT1 este se linealizó con la enzima de restricción Xho I, para realizar la transcripción in vitro del DNA del GLUT 1, para comprobar el resultado se realizó un gel de poliacrilamida al 4% para luego purificarlo y transfectarlo en ovocitos de *Xenopus laevis*.

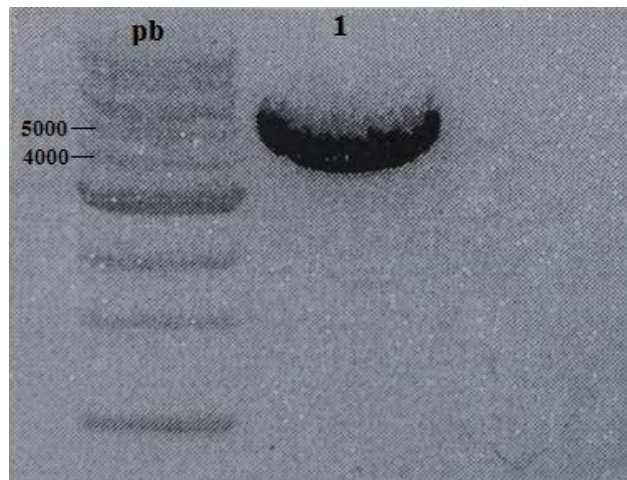


Fig 12: Gel de agarosa de mRNA de GLUT 1 de plásmido pAGA-GLUT1. 1 kb de DNA ladder, mRNA de GLUT 1 del plásmido pAGA-GLUT1.

En el gel de poliacrilamida se logró apreciar el mRNA de GLUT 1 del plásmido pAGA-GLUT1 (Fig. 12), en este caso no se realizó un gel de agarosa del DNA cortado con la enzima de restricción Xho I, sino que se realizó inmediatamente su transcripción in vitro para luego ver el resultado en el gel de agarosa del mRNA del GLUT 1 resultante, se utilizó un ladder de 1kb de DNA del laboratorio New England Biolabs (*Anexo 8*). La banda obtenida se cortó con un bisturí para su purificación para transfectar el mRNA en ovocitos de *Xenopus laevis*.

VISUALIZACIÓN DE TRANSFECCIÓN EN CÉLULAS HEK 293:

Para realizar un ensayo de manera complementaria de transfección de la proteína transportadora de glucosa GLUT 1 se optó por realizar la transfección en células hepáticas de humano *HEK 293*. La transfección se realizó con el método de lipofección con muestras de GLUT 1 como objetivo y proteína fluorescente verde GFP como control positivo (Fig. 13).

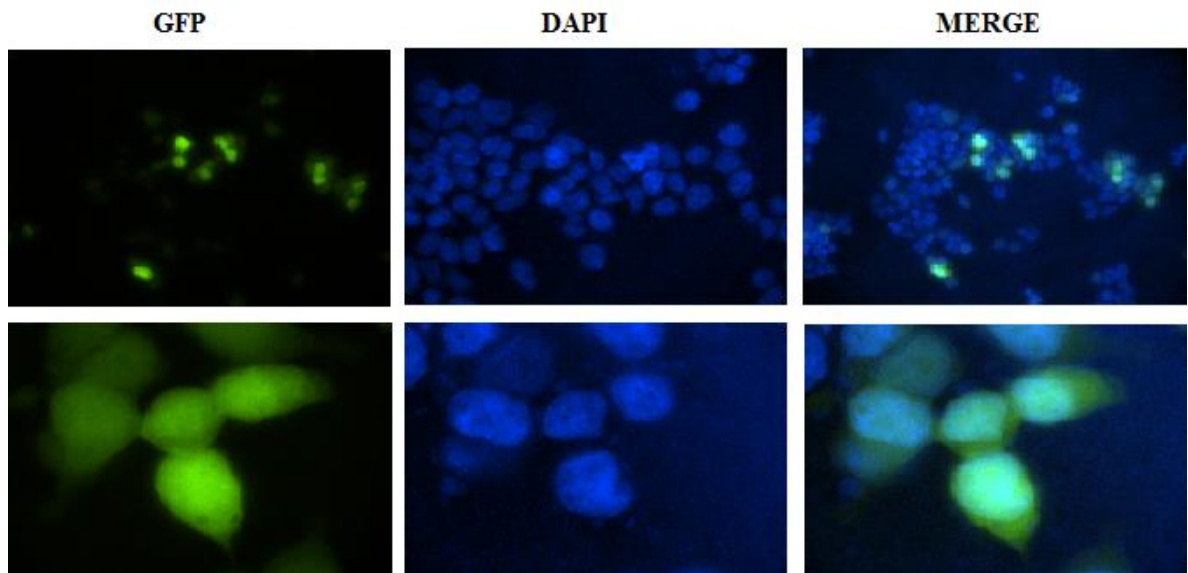


Fig 13: Transfección de GFP en células *HEK 293*. Imágenes GFP corresponden a GFP dentro de las células transfectadas, imágenes DAPI corresponden a células vistas al microscopio a campo claro, imágenes MERGE corresponden a ubicación de GFP dentro de células transfectadas.

En las imágenes podemos apreciar en primer lugar en las imágenes GFP vemos las células *HEK 293* al microscopio con epifluorescencia mostrando la cantidad de células transfectadas, en las imágenes DAPI se logra visualizar las células *HEK 293* a campo claro y en las imágenes MERGE se aprecia la combinación de las imágenes anteriores gracias al software ImageJ, así se logra apreciar la ubicación de GFP dentro de las células transfectadas. Las células al producir la proteína GFP esta se distribuye en toda la célula logrando de esta forma comprobar la correcta realización de la lipofección.

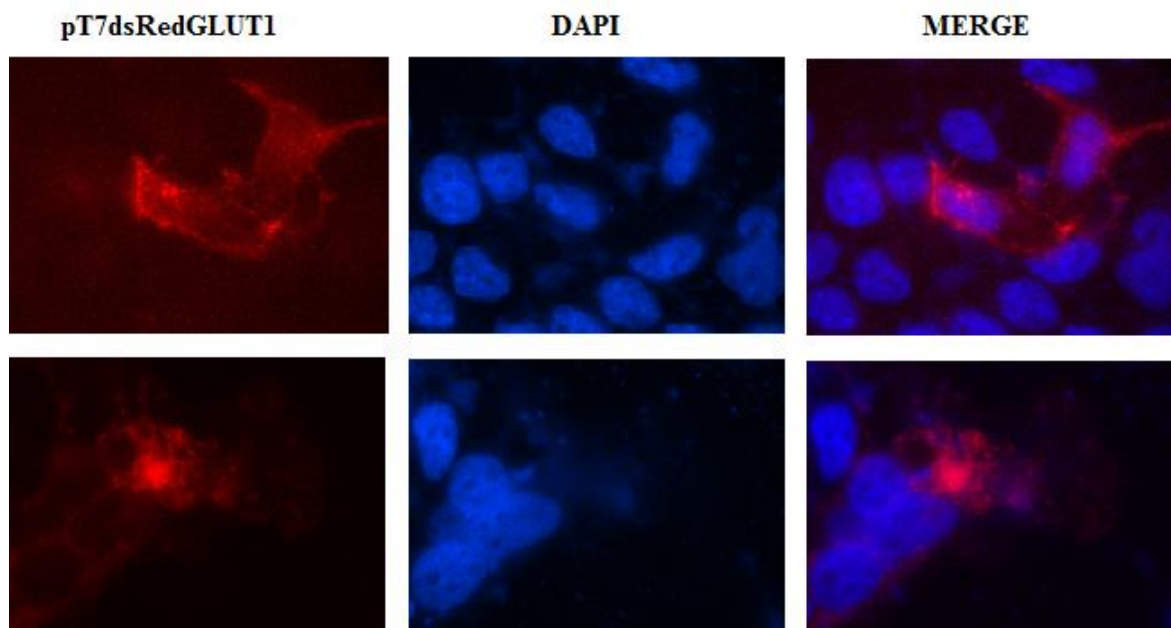


Fig 14 Transfección de GLUT1 de plásmido en células *HEK 293*. Imágenes pT7dsRedGLUT1 corresponden a células transfectadas vistas al microscopio con epifluorescencia, imágenes DAPI corresponden a células *HEK 293* vistas al microscopio a campo claro, imágenes MERGE corresponden a ubicación del plásmido dentro de células transfectadas.

Se realizó la transfección del plásmido T7dsRedGLUT1 que contenía el DNA de la proteína GLUT1 en células *HEK 293* donde se obtuvieron las imágenes presentadas (Fig. 14). En las imágenes pT7dsRedGLUT1 se aprecia la cantidad de células transfectadas con el transportador de glucosa GLUT1 al microscopio con epifluorescencia, la imagen DAPI muestran las células *HEK 293* a microscopio a campo claro, mientras que las imágenes MERGE se obtuvieron uniendo las imágenes anteriores gracias al software ImageJ de esta forma observamos donde GLUT1 se posiciona en la membrana de la célula transfectada.

El DNA de GFP se encuentra en toda la célula incluyendo el núcleo de la célula hepática mientras el DNA de GLUT 1 se observa en la membrana de la célula tal como se esperaba puesto que el transportador de glucosa desarrolla la función de permitir el ingreso de la glucosa en la membrana celular.

**ANÁLISIS DE EXPRESIÓN EN OVOCITOS DE XENOPUS LAEVIS CON
PLÁSMIDO T7DsRedGLUT1:**

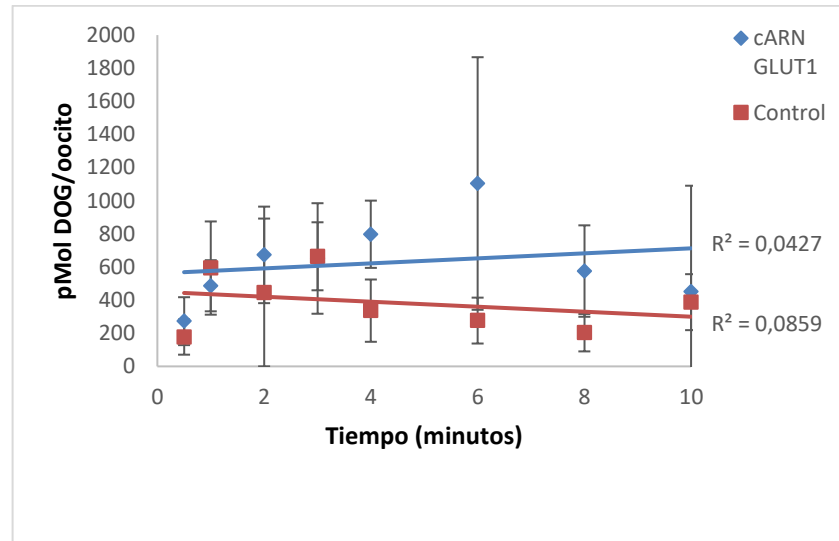


Fig 15: Ensayo de transporte de D-Glucosa a una concentración DOG de 3,0 mM. Se muestra en forma de diamante y color azul la incorporación de 2-desoxiglucosa a los ovocitos transfectados con mRNA obtenido de pT7dsRedGLUT1 a través del tiempo, mientras los cuadrados rojos representan la incorporación de 2-desoxiglucosa a los ovocitos transfectados con agua a través del tiempo como control, los datos están expresados como el valor promedio de muestras \pm una desviación estándar.

De acuerdo al gráfico (Fig. 15) observamos el transporte de 2-desoxiglucosa en los ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con el mRNA de GLUT1 en un tiempo de 10 minutos para una concentración de DOG de 3,0 mM. Se aprecia un peak de glucosa en los ovocitos inyectados con el plásmido a los 6 minutos disminuyendo el transporte gradualmente desde ese momento. Se calculó una pendiente de 12,7 para la recta producida por los ovocitos transfectados con mRNA obtenido del plásmido T7dsRedGLUT1, y una pendiente de -7,3 para la recta producida por los ovocitos inyectados con agua a modo de control.

Tabla 11: Evaluación estadística de resultados de ensayo de transporte de D-glucosa a una concentración de 3,0 mM de ovocitos transfectados con plásmido mRNA de GLUT1 desde el plásmido T7dsRedGLUT1 y ovocitos inyectados con agua.

Hipótesis nula	Significancia	Test seleccionado	Valor p
La distribución de captación de DOG es la misma para ovocitos transfectados y el control	0,05	Test no paramétrico U de Mann-Whitney para 2 muestras independientes	0,69

Variable independiente 1: ovocitos inyectados con agua.

Variable independiente 2: ovocitos transfectados con mRNA de GLUT1 desde plásmido T7dsRedGLUT1

Ho: Las medias $\alpha_1 = \alpha_2$; Igualdad de medias para las captaciones de (pmolDOG/cel*10⁸/min) en ambas variables independientes.

H1: Las medias $\alpha_1 \neq \alpha_2$

Al analizar las medias de la captación de D-glucosa de los ovocitos transfectados con el plásmido T7dsRedGLUT1 y de los ovocitos inyectados con agua como control (Tabla 11), podemos decir que estadísticamente que no se rechaza la hipótesis nula ($p > 0,05$), es decir, la captación de D-glucosa de los ovocitos transfectados con el plásmido no es significativamente distinta a la captación de D-glucosa de los ovocitos inyectados con agua.

**ANÁLISIS DE EXPRESIÓN EN OVOCITOS DE XENOPUS LAEVIS CON
PLÁSMIDO PAGA-GLUT1:**

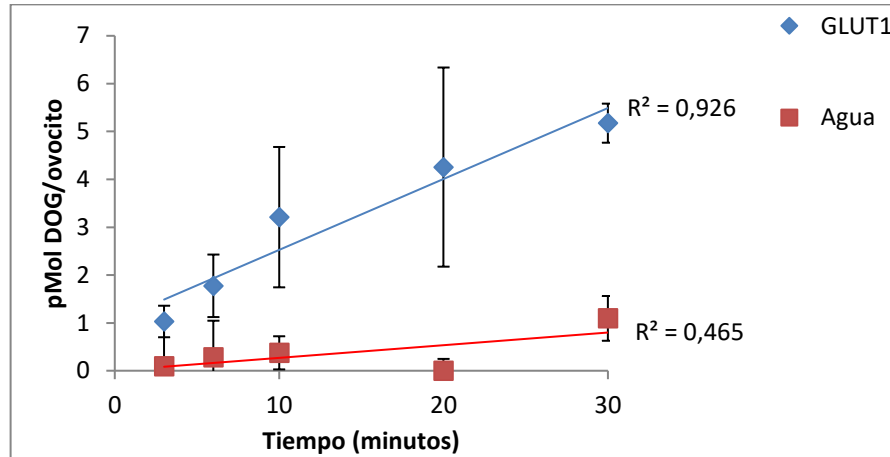


Fig 16: Ensayo de transporte de D-Glucosa a una concentración DOG de 0,5 mM. Se muestra en forma de diamante y color azul la incorporación de 2-desoxiglucosa a los ovocitos transfectados con mRNA obtenido de pAGA-GLUT1 a través del tiempo, mientras los cuadrados rojos representan la incorporación de 2-desoxiglucosa a los ovocitos transfectados con agua a través del tiempo como control, los datos están expresados como el valor promedio de muestras \pm una desviación estándar.

En este caso podemos apreciar en la figura 16 la captación de D-glucosa de los ovocitos transfectados con mRNA de GLUT1 obtenido del plásmido pAGA-GLUT1 y ovocitos inyectados con agua a modo de control por 30 minutos aproximadamente debido a la cantidad de DOG administrada. Como apreciamos los ovocitos transfectados con GLUT1 aumenta su captación de DOG a medida que pasa el tiempo de forma lineal alcanzando su peak a los 30 minutos. Se obtuvo una pendiente de 0,14 para los ovocitos transfectados con el plásmido pAGAGLUT1 mientras que para los ovocitos inyectados con agua se obtuvo una pendiente de 0,04.

Tabla 12: Evaluación estadística de resultados de ensayo de transporte de D-glucosa a una concentración de 0,5 mM de ovocitos transfectados con mRNA de GLUT1 obtenido de plásmido pAGA-GLUT1 y ovocitos inyectados con agua.

Hipótesis nula	Significancia	Test seleccionado	Valor p
La distribución de captación de DOG es la misma para ovocitos transfectados y el control	0,05	Test no paramétrico U de Mann-Whitney para 2 muestras independientes	0,016

Variable independiente 1: ovocitos inyectados con agua.

Variable independiente 2: ovocitos transfectados con mRNA de GLUT1 desde plásmido pAGA-GLUT1

Ho: Las medias $\alpha_1 = \alpha_2$; Igualdad de medias para las captaciones de (pmolDOG/cel*10⁸/min) en ambas variables independientes.

H1: Las medias $\alpha_1 \neq \alpha_2$

Se realizó un análisis estadístico para analizar las medias de los ovocitos transfectados y el control, para esto se seleccionó el test no paramétrico Mann-Whitney para dos muestras independientes en donde se obtuvo un valor de significancia (valor p) de 0,016 (Tabla 12) el cual es menor a la significancia asignada para la comprobación de la hipótesis nula (0,05), por lo tanto es correcto afirmar que la captación de D-glucosa de los ovocitos transfectados con el mRNA de GLUT1 obtenido desde el plásmido pAGA-GLUT1 es significativamente distinto a los ovocitos inyectados con agua, esto a una concentración de DOG de 0,5 mM.

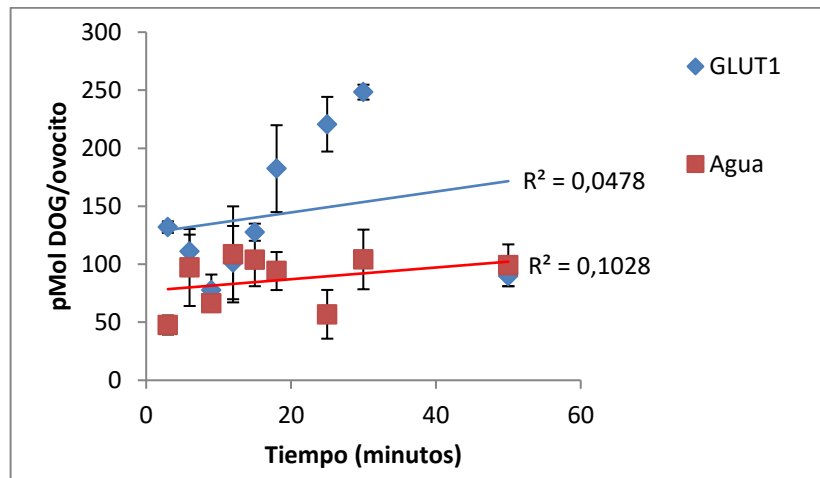


Fig 17: Ensayo de transporte de D-Glucosa a una concentración DOG de 3,0 mM. Se muestra en forma de diamante y color azul la incorporación de 2-desoxiglucosa a los ovocitos transfectados con mRNA obtenido de pAGA-GLUT1 a través del tiempo, mientras los cuadrados rojos representan la incorporación de 2-desoxiglucosa a los ovocitos transfectados con agua a través del tiempo como control, los datos están expresados como el valor promedio de muestras \pm una desviación estándar.

Al administrar mayor cantidad de DOG, en este caso 3,0 mM notamos en la figura 17 que aumenta la cantidad transportada por los ovocitos inyectados con GLUT1 a diferencia de los ovocitos inyectados con agua que no presentan mayor variación. En el caso de los ovocitos inyectados con el mRNA de GLUT1 obtenido del plásmido pAGA-GLUT1 obtuvimos una curva de crecimiento logístico, obteniendo un peak a los 30 minutos aproximadamente. El cálculo de la pendiente de los ovocitos transfectados dio como resultado 5,7 mientras que el de los ovocitos inyectados con agua fue de 0,8.

Tabla 13: Evaluación estadística de resultados de ensayo de transporte de D-glucosa a una concentración de 0,5 mM de ovocitos transfectados con mRNA de GLUT1 obtenido de plásmido pAGA-GLUT1 y ovocitos inyectados con agua.

Hipótesis nula	Significancia	Test seleccionado	Valor p
La distribución de captación de DOG es la misma para ovocitos transfectados y el control	0,05	Test no paramétrico U de Mann-Whitney para 2 muestras independientes	0,004

Variable independiente 1: ovocitos inyectados con agua.

Variable independiente 2: ovocitos transfectados con mRNA de GLUT1 desde plásmido pAGA-GLUT1.

Ho: Las medias $\alpha_1 = \alpha_2$; Igualdad de medias para las captaciones de (pmolDOG/cel*10⁸/min) en ambas variables independientes.

H1: Las medias $\alpha_1 \neq \alpha_2$

Se estudiaron las medias de la captación de D-glucosa a una concentración de DOG de 3,0 mM de los ovocitos transfectados con el mRNA de GLUT1 obtenido desde el plásmido pAGA-GLUT1 y de los ovocitos inyectados con agua utilizados como control. El análisis Mann-Whitney (Tabla 13) arroja como resultado una significancia de 0,004 (valor p), este valor es menor al nivel de significación determinado (0,05). Concluimos que la captación de D-glucosa en los ovocitos transfectados con GLUT1 del plásmido pAGA-GLUT1 es significativamente distinta a la captación de D-glucosa realizada por los ovocitos inyectados con agua.

VI. DISCUSIÓN

Las estrategias adoptadas en este estudio para la expresión de proteínas recombinantes se basaron en experiencias recopiladas de la bibliografía adaptándolas a las condiciones y posibilidades del laboratorio de biología molecular de la Universidad Católica de la Santísima Concepción.

Dentro de las células capaces de ser utilizadas como modelo de expresión de proteínas recombinantes se encuentran los ovocitos de *Xenopus laevis*, estos gametos inmaduros se han usado desde hace más de un siglo como sistema de expresión de proteínas recombinantes, DNA, RNA, etc. (Nutt, 2012). Por otro lado, también han sido usado para generar organismos transgénicos, debido a que posee embriogénesis externa, sus embriones son de gran tamaño embrionario, se aplica un método sencillo para inducir la ovulación, posee cortos tiempos generacionales y en cada ovulación se generan entre 1000 a 3000 huevos (Fuentealba, 2012). Los ovocitos son muy ricos en RNA y proteínas necesarias para las primeras etapas de desarrollo hasta la embriogénesis temprana, es decir, la etapa de renacuajo, ellos pueden contener hasta 4 μg de RNA ribosomal, por lo tanto, cada ovocito es capaz de sintetizar hasta 400 ng de proteínas por día, además, carecen de actividad transcripcional hasta la fase media tardía de blástula (Parisis, 2014). Se estima que el contenido de proteína es de aproximadamente 500 μg en cada ovocito y aproximadamente 10-50 mg/ml en el extracto. Junto a su capacidad para traducir eficientemente mRNA exógeno en proteínas, los ovocitos de *Xenopus* tienen otras ventajas experimentales: 1) es fácil de mantener en cautiverio por lo que es un animal de laboratorio de bajo costo, 2) los ovocitos se pueden cosechar fácilmente y, debido a su gran diámetro (1-1,2 mm), son fáciles de inyectar, 3) los ovocitos de rana son hechos para sobrevivir por largos períodos de tiempo fuera del cuerpo y necesitar nada más que agua fresca, 4) los ovocitos expresan un bajo número de transportadores de membrana y canales endógenos, ya que son prácticamente independiente de nutrientes exógenos, 5) las técnicas electrofisiológicas estándares son de fácil aplicación 6) pueden tolerar una inyección de hasta 50 nL. (Bianchi & Driscoll, 2006).

Otro modelo de expresión validado son las células embrionarias de riñón humano 293 conocidas como células *HEK 293*, las cuales se utilizan principalmente debido a su fácil cultivo y propagación en condiciones de laboratorio, y a la alta eficiencia de transfección que presentan. Se han usado tanto en investigación en biología celular, como en la industria de la biotecnología para producir virus y proteínas para la terapia génica, estudiar canales de sodio, sistemas de inducción de RNA de interferencia, para estudiar interacción de proteínas, etc. (Lin et al., 2014).

La estrategia adoptada para la expresión del transportador de glucosa GLUT 1 en ovocitos de *Xenopus laevis* y células *HEK 293* fue desarrollada debido a que ambos son sistemas de expresión validados para la transformación con proteínas recombinantes, el uso de células *HEK 293* se utiliza en investigación como un sistema homólogo a los ovocitos de *Xenopus laevis* (Ojeda, 2011). En el caso de esta investigación el uso de células *HEK 293* se utilizó como un método de validación de expresión de GLUT 1, puesto que la técnica de transfección en células hepática ha sido optimizada por el equipo de trabajo de la Doctora Lorena Mardones en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Católica de la Santísima Concepción.

Los ovocitos de *Xenopus laevis* han sido utilizados como modelo para el estudio de los transportadores de glucosa, siendo la expresión de GLUT 1 el primero en estudiarse y en optimizar el procedimiento (Jamieson et al., 2000). Para el uso de ovocitos de *Xenopus laevis* como modelo de expresión se recomienda el uso de la microinyección del mRNA debido a que el procedimiento se ha efectuado exitosamente desde la década de los años 90 con una alta efectividad. Por el contrario, el método de microinyección no se recomienda por el alto costo de su equipamiento, no obstante, el laboratorio de biología molecular cuenta con el equipo necesario para desarrollar la técnica de microinyección de DNA foráneo por lo cual se decidió optar por el uso de dicha técnica para el desarrollo de la investigación.

En cuanto a las células *HEK 293*, el método más recomendado es el de lipofección por su alta eficiencia y baja toxicidad. El primer estudio realizado para expresar GLUT 1 en células *HEK 293*, sus contras son los parámetros a optimizar como la relación entre lípido y DNA (relación de cargas), la cantidad de DNA empleado, el tiempo que se exponen las células al complejo y la presencia o ausencia de suero. Se realizó en 1992, por lo que se ha transformado en un modelo de expresión validado para el desarrollo de estas proteínas recombinantes (Lin et al., 2014). El uso de células *HEK 293* se utiliza en investigación de transportadores de glucosa como sistema de expresión homólogo a los ovocitos de *Xenopus laevis* (Ojeda, 2011).

La introducción de material genético externo en una célula se conoce como transfección cuando nos referimos a células de mamíferos y transformación cuando nos referimos a bacterias, hongos, plantas y algas. Existen diferentes estrategias para la introducción de DNA foráneo en células de cultivo, el empleo de uno u otro método depende en gran medida de tipo celular que se emplee, del objetivo del estudio, el tamaño y naturaleza del gen a introducir, la economía del laboratorio y la disponibilidad de equipamiento adecuado. Considerando estos factores, se utilizó como estrategia el método físico microinyección, para la expresión del material genético en ovocitos de *Xenopus laevis*, este método consiste en la inserción directa del RNA en la célula mediante microagujas, el cual es un proceso usado frecuentemente en ingeniería genética y transgénesis debido a ser muy eficaz a pesar de ser un procedimiento muy laborioso que requiere un equipamiento altamente específico.

Con respecto a la transfección del DNA en las células *HEK 293*, se decidió utilizar como estrategia el método químico lipofección, en donde el DNA va introducido en un liposoma catiónico que entra en la célula por endocitosis, esta metodología tiene una eficiencia entre 70 al 90% sin embargo se necesita optimizar la relación lípido-DNA para obtener el mejor rendimiento, considerando la mejor relación costo-beneficio, ya que el reactivo lipídico presenta un alto costo.

El desarrollo de un plásmido capaz de expresar el GLUT1 al interior de ovocitos de *Xenopus laevis* se basó en estudios de expresión en ovocitos tales como Swick, et al. (1992), Due, et al. (1995), Rumsey, et al. (1997), Teerijoki, et al. (2001) y Bianchi, et al., 2006. La transformación del plásmido GFP al plásmido T7dsRed se realizó de forma exitosa, sin embargo, las pruebas realizadas en ovocitos de *Xenopus laevis* no resultaron efectivas posiblemente por la transformación realizada en el codón de término del plásmido para introducir el gen proteína fluorescente roja dsRed lo que pudo producir problemas para su correcta expresión dentro del ovocito, por otra parte el RNA tiende a ser muy inestable por lo que se necesita utilizar un plásmido que le dé mayor estabilidad al mRNA con cadenas largas de poliA por ejemplo. El uso de la proteína fluorescente roja respondía a obtener un contraste visual dentro del ovocito como en los estudios realizados por Goodman, et al., 2002 y Bianchi, et al. 2006, ente otros. Por otra parte, al realizar la transfección en células *HEK 293* sí se logró satisfactoriamente expresar el GLUT 1. Para lograr la expresión de GLUT 1 en ovocitos de *Xenopus laevis*, se decidió utilizar el plásmido pAGA-GLUT1, el plásmido presenta el promotor T7 al igual que el plásmido T7dsRedGLUT1 pero no contiene en su DNA el gen de proteína fluorescente roja, además, el plásmido DsRed carece de una cola de poliadenilación al extremo 3' de GLUT 1, el plásmido AGA si permite sintetizar un cRNA de GLUT 1 con esa cola lo que podría dar mayor estabilidad al cRNA sintetizado a partir del plásmido AGA, así, al realizar la microinyección del plásmido se obtuvo resultados positivos logrando la expresión del GLUT1 dentro del ovocito de *Xenopus laevis*.

De igual manera, el proceso seleccionado para la expresión del transportador de glucosa GLUT1 implicó procesos de optimización de las técnicas elegidas para cada paso según las condiciones del laboratorio, requerimientos de pureza, tiempos empleados, entre otros. Purificar el plásmido presentó dificultades puesto las condiciones de trabajo en donde el uso de kits favorece un resultado más eficiente a diferencia del uso de lisis alcalina, y a pesar de que el costo de los kits desarrollados por laboratorios es mayor, en el caso de esta investigación no implicó un gasto excesivo debido a las cantidades purificadas. Seguidamente, podemos identificar como punto crítico del desarrollo del plásmido a

expresar, el proceso de subclonamiento, principalmente el proceso de purificación del DNA desde el gel de agarosa, el cual es primordial para cumplir con las cantidades necesarias para subclonar el plásmido con el DNA en las razones de proporciones seleccionadas. Por tanto, los resultados obtenidos necesitaron el desarrollo óptimo de cada proceso, en el caso de la expresión en células *HEK 293* la técnica de lipofección mostró como resultados visualizar en la célula la ubicación del transportador de glucosa una vez sintetizado, mientras que los ensayos desarrollados en la transfección en ovocitos de *Xenopus laevis* obtuvimos la velocidad y cantidad aproximada de GLUT 1 sintetizado.

Los resultados obtenidos en la expresión del transportador de glucosa en células *HEK 293* determinaron la ubicación de la proteína dentro de la célula, se encuentra en la parte más exterior de membrana siendo una proteína altamente hidrofóbica. La orientación de las 12 alfa-hélices de GLUT 1 dentro de la membrana plasmática y la posición relativa de cada una de ellas ha sido propuesta por Mueckler y cols (1985), la cual presenta un canal acuoso central formado por la yuxtaposición de 5 de las 12 alfa hélices: 3, 5, 7, 10 y 11, cada una de las cuales posee carácter antipático. Sin embargo, en un modelo alternativo derivado de estudios de mutagénesis de cisteína en las alfa-hélices 2, 5, 10 y 11 se ha demostrado que todas tienen residuos accesibles a moléculas de agua capaces de formar un canal capaz de transportar glucosa y agua. Estudios posteriores han demostrado que la hélice 7 es la más sensible a los estudios de mutagénesis de cisteína lo que sugiere que se encuentra más centralmente posicionada en la membrana a la hora de formar el poro de entrada de la glucosa (Bermúdez, 2007).

Los resultados presentados en la transfección del transportador de glucosa en ovocitos de *Xenopus laevis* desde el plásmido AGA-GLUT1 nos muestran una alta capacidad de transportar glucosa dentro de la célula. Esta proteína posee una alta afinidad por la glucosa ($K_m = 1-2 \text{ mM}$) por lo que es capaz de transportarla al interior de las células prácticamente a cualquier concentración, por lo que se considera como un transportador basal de glucosa que mantiene su concentración intracelular estable (Reyes, 2011).

Las estrategias de expresión de proteínas recombinantes desarrolladas en esta investigación representan una potente herramienta en el ámbito de la acuicultura debido a que no sólo permiten la creación de proteínas recombinantes capaz de expresarse en diferentes especies, sino que también, descubrir la funcionalidad de proteínas en especies marinas aún no estudiadas. Desde el desarrollo del primer pez transgénico en los años noventa, investigadores en laboratorios y empresas de acuicultura se han concentrado en especies que gracias a la ingeniería genética crezcan más y necesiten menos alimento. Distintas empresas biotecnológicas han conseguido variedades de salmón, trucha, tilapia, pez plano del Ártico y otras especies comerciales a las que la alteración de su código genético les ha conferido una mayor tasa y velocidad de crecimiento, más resistencia a enfermedades, menor susceptibilidad a condiciones ambientales adversas y unas necesidades alimenticias significativamente inferiores (Puglisi, 2010).

La transferencia génica es el método más utilizado en la actualidad para el desarrollo de peces con características nuevas, dentro de las cuales, especialmente en Chile, la resistencia a enfermedades es una de las más relevantes debido a las condiciones del agua en donde son cultivados los peces. La carga ambiental es la capacidad de un ecosistema de tolerar una alteración o contaminación, esta se encuentra sobrepasada por la industria salmonera en varias partes del mundo, es por ello que se ha presentado en los peces un mayor número de enfermedades asociadas a la contaminación de las aguas. Es por esto que el desarrollo de las vacunas de DNA han sido una respuesta eficiente contra cientos de virus patógenos, no obstante, los consumidores rechazan el excesivo uso de vacunas y antibióticos en los peces de cultivo, por esta razón se buscan otras alternativas para mejorar el sistema inmune de las especies de interés económico. Así la ingeniería genética ha permitido que se estudien otras alternativas que produzcan un menor impacto en el consumidor, en el mantenimiento de los peces y en los costos asociados a su cultivo. Dentro de los estudios realizados tenemos por ejemplo el uso de la enzima lizosima de la trucha para producir animales transgénicos debido a la potencia antibacteriana contra gram positivas del lizosima de trucha (Hew, et al., 1995). Estudios más recientes podemos observar en peces teleósteos, enfocados en el desarrollo de inmunoestimulantes, los cuales producen mejoras del estado sanitario de los

animales y un incremento de su resistencia ante patógenos (Vásquez, et al., 2012). Incluso, estudios realizados desde el año 2013 en Puerto Montt, Chile por la doctora Nicole Ehrenfeld en el Centro de Investigación Austral Biotech de la Universidad Santo Tomás de Santiago han mostrado un gran desempeño usando como inmunoestimulantes microalgas cultivadas sustentablemente. Estos estudios se han basado en experiencias realizadas en otras especies donde se han realizado estudios de respuesta inmune y expresión génica, un caso que podemos mencionar a Costa (2008) donde se realiza un estudio de la respuesta inmune del mejillón mediterráneo (*Mytilus galloprovincialis*), en primer lugar analizó la expresión de los genes implicados en la respuesta inmune, esto se expresó en diferentes modelos incluyendo *Xenopus laevis* y *Xenopus tropicalis*, luego analizó inmunoestimulantes dentro de ellos el polisacárido β -glucanos el cual es el compuesto más utilizado actualmente en la industria acuícola.

El desarrollo de especies marinas que puedan alcanzar su talla comercial en el menor tiempo posible es uno de los aspectos más importantes en el desarrollo de la acuicultura moderna debido a que esto disminuye significativamente los costos de producción. En este aspecto la inhibición de la proteína miostatina se ha convertido en uno de los estudios más realizado tanto en mamíferos, como en peces. La miostatina es una proteína que limita el crecimiento del tejido muscular, por lo tanto desde su descubrimiento en 1997, las investigaciones de esta proteína se han enfocado en dos métodos, la eliminación del gen e inhibición del gen. Uno de los casos más conocidos y controversial es la raza bovina Belgian Blue Beef que presenta doble musculatura una vez eliminado el gen de la miostatina. Se ha presentado un aumento del 20% en la musculatura del animal, este método se ha replicado en animales como ratones y en seres humanos, en el caso de Chile, la investigación de la eliminación del gen se produjo en el pez cebra (*Danio rerio*) en sus distintas etapas (Navarro, 2013). Por otra parte, la inhibición del gen presenta una oportunidad más segura de producir el aumento de la musculatura. Se han desarrollado distintas sustancias inhibitoras dentro de ellas se encuentra la folistatina, es una proteína que en el ser humano actúa como inhibidora de la miostatina, es así que se han desarrollado experimentos con trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) desarrollando peces con un 15 a

20% más de carne al introducirle folistatina en los huevos de trucha (Medeiros, et al., 2009). Dentro de los inhibidores estudiados encontramos experiencias dentro de la acuicultura tales como, glucosamina la cual es un amino-azúcar que actúa como precursor en la glicosilación de las proteínas, este aminoácido se encuentra principalmente en el exoesqueleto de artrópodos (Sharp, et al., 2014). Otro inhibidor que se encuentra en estudio son un grupo de algas pardas del grupo de las *Cystoseira* que presentan una inhibición de la miostatina en las especies que incorporan esa clase de algas en su dieta (Abdalla, et al., 2014).

No cabe duda que el estudio de proteínas recombinantes en especies marinas es una herramienta poderosa en el ámbito de la industria acuícola, es así que lo realizado en este estudio toma relevancia no tan sólo en el uso de la técnica desarrollada sino que también en el uso de proteínas transportadoras de glucosa puesto que estas representan nuevas oportunidades en la acuicultura. Si bien la investigación de los transportadores de glucosa en los peces es incipiente, estudios han demostrado la importancia de la glucosa en diferentes áreas productivas dentro de las cuales las más importantes en la acuicultura que podemos señalar son los parámetros de cultivo, es decir, la calidad del agua en donde se desarrollan los peces, otro punto importante en el cultivo es la alimentación de las especies y su correcta asimilación, además de esperar el correcto crecimiento de los peces para su posterior y óptima reproducción. Los niveles de glucosa son preponderantes en cada uno de estos casos, estudios demuestran que en condiciones de estrés los peces muestran un aumento significativo de glucosa en la sangre (Brauner, et al., 2000) (Pessot, et al., 2011), sin embargo los niveles de glucosa pueden aumentar al enfrentarse a estrés alimenticio (Barandica, 2010), por lo que se convierte en un parámetro importante de análisis para optimizar las condiciones generales de cultivo de una especie. En cuanto su alimentación, uno de los problemas en la acuicultura se encuentra en el caso de truchas que presentan “diabetes” esto debido a la alimentación alta en carbohidratos provocando hiperglucemia en los peces, anomalías hepáticas y retraso en el crecimiento cerca del 20% (Castelló, F, 1993) (Rojas, P, 2005), por lo tanto se puede inducir que la inhibición de ciertos transportadores de glucosa puede producir un aumento en el crecimiento de los peces. Es por ello que la

investigación de los transportadores de glucosa se vuelve cada vez más relevante, el pez cebra es uno de los modelos de expresión más utilizados, en especial en el desarrollo de la técnica de la desactivación de genes “knockout”, utilizando esta técnica se puede determinar la importancia del GLUT2 en el cerebro del pez cebra (*Danio rerio*) demostrando que la falta de esta proteína produce apoptosis en las células cerebrales, produciendo problemas para regular el apetito, en el gasto energético y en la homeostasis de la glucosa (Marín, et al., 2014). Finalmente, en la reproducción de los peces, se demostró que aumentan los niveles de glucosa para el desarrollo de las gónadas, formación de los huevos y el gasto energético inherente al mismo proceso de la puesta (Picón, et al., 2003), considerando la importancia de la cantidad de glucosa necesaria para la motilidad espermática se realizó una investigación sobre distintas concentraciones de glucosa sobre la activación de la motilidad, esto se efectuó en la especie *Prochilodus magdalenae* dando como resultado una concentración menor a 6% produce activación de la motilidad espermática, así una concentración mayor a 6% puede ser utilizada como solución no activadora de la motilidad espermática en futuros diluyentes para crioconservación de semen de esta especie (Martínez, et al., 2011), otro estudio presenta la importancia del GLUT8 en la motilidad de los espermatozoides, realizado en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Benavente, O, 2016). En el proceso de reproducción es necesario contar con un gran número de espermatozoides y que estos sean lo más eficaces posible puesto que la mortalidad en la etapa de huevo es la más alta de todo el proceso productivo. Debido a que el conocimiento de los transportadores de glucosa en especies marinas es aún escaso, es importante el desarrollo de la expresión de las proteínas transportadores de glucosa en un sistema de expresión validado como es el caso de esta investigación así poder conocer donde se localizan y cómo actúan para ofrecer instrumentos biotecnológicos capaces de mejorar las condiciones de la producción en la industria acuícola.

VII. CONCLUSIONES – RECOMENDACIONES

- En conclusión, podemos afirmar que se logró expresar la proteína transportadora de glucosa GLUT1 en ovocitos de *Xenopus laevis* con la técnica de microinyección.
- Con respecto al desarrollo del plásmido capaz de expresar la proteína GLUT1 fusionada a una proteína fluorescente en ovocitos de *Xenopus laevis* y en células de mamífero *HEK 293*, podemos mencionar que resultó la expresión eficientemente en células *HEK 293*, no así, en ovocitos de *Xenopus laevis*.
- En el caso de las células *HEK 293* el plásmido transformado con el gen de la proteína fluorescente roja se logró expresar eficientemente el GLUT1 desde el plásmido T7dsRedGLUT1 lo que permitió utilizar la técnica de transfección por lipofección como control positivo para el desarrollo de la transfección mediante microinyección en ovocitos de *Xenopus laevis*.
- Para expresar mRNA en ovocitos de *Xenopus laevis* se debe contar con un plásmido capaz de estabilizarlo correctamente. En este caso se utilizó el plásmido PAGA-GLUT1 para realizar la expresión exitosamente.
- El desarrollo de las técnicas de transfección, tanto por lipofección como por microinyección presentan una herramienta de gran importancia para futuras investigaciones en cualquier tipo de proteína de interés.
- La expresión en células *HEK 293* nos permitió visualizar en la célula la zona en donde se localiza la proteína estudiada al igual que la expresión en ovocitos de *Xenopus laevis* nos permitió desarrollar estudios de transporte en el caso de los GLUTs. De esta forma, se podrían realizar estudios de proteínas de las especies acuícolas de interés puesto que la información sobre ellas es escasa.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, A. 2012. Efecto del tratamiento con leptina sobre la actividad del sistema glucosensor y la expresión de neuropéptidos implicados en la regulación de la ingesta de alimento en trucha arcoíris (*Onchorhynchus mykiss*). Encuentro, 93: 78-100.
- Aldegunde, M., Andrés, M. & Soengas, J. 2000. Uptake of 3-O-methyl-D-[U-14] glucose into brain of rainbow trout: possible effects of melatonin. J. Comp. Physiol. 170, 237-243
- Barandica, L. 2010. Efecto de las dietas experimentales en la respuesta inmune de los peces. Tesis para optar al grado doctoral en bioquímica y biología molecular. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, España. 134pp.
- Bermúdez, V., Bermúdez, F., Arraíz, N., Leal, E., Linares, S., Mengual, E., Valdelamar, L., Rodríguez, M., Seyfi, H., Armell, A., Carrillo, M., Silva, C., Acosta, A., Añez, J., Andara, C., Angulo, V. & Martins, G. 2007. Biología molecular de los transportadores de glucosa: clasificación, estructura y distribución. Archivos Venezolanos de farmacología terapéutica. 26: 1-11.
- Bianchi, L. & Driscoll, M. 2006. Heterologous expression of *Caenorhabditis elegans* ion channels in *Xenopus* oocytes. WormBook, 10: 117-133.
- Caballero, A., Viegas, I., Slagado, M., Siles, A., Sáez, A., Metón, I., Baanante, I. & Fernández, F. 2015. Diets supplemented with glutamate or glutamine improve protein retention and modulate gene expression of key enzymes of hepatic metabolism in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. AQUACULTURE. 444: 79-87.
- Castelló, F. 1993. Acuicultura marina: fundamentos biológicos y tecnología de la producción. Edit. Universitat de Barcelona. Barcelona, 747 pp.
- Castrejón, V., Carbó, R. & Martínez, M. 2007. Mecanismos moleculares que intervienen en el transporte de la glucosa. REB. 26: 49-57.

- Chavez, H., Villalba, C., Lagos, L., Vargas, R., Martínez-Wittinghan, F., Clavijo, C. & Camacho, M. 2003. Expresión de canales de potasio voltaje dependientes en ovocitos de *Xenopus laevis* (amphibia). Act Bio Col, 8: 59-68.
- Crisci, E., Bárcena, J., Montoya, M. 2012. Virus-like particles: the new frontier of vaccine immunogens. Res Vet Sci. 93: 553-559.
- Delgado, M. 2013. Un valioso modelo animal para la investigación acuícola y biomédica. Mundo Acuícola, 36: 12-16.
- Díaz, L. 2013. Monografía de trabajo de grado, Biotecnología aplicada a la acuicultura: peces transgénicos. Universidad de Gotemburgo. Gotemburgo, Suecia. 29 pp.
- Díaz, V. 2011. Sistema de expresión de proteínas recombinantes (II), organismos productores. BIOTECH Spain. 1: 1-6.
- Dorado, G. 2008. Clonación del DNA amplificado mediante PCR. Universidad de Rabáles, España. 22 pp.
- Fuentealba, J. 2012. Participación de Ric-8A en la formación de la Cresta Neural durante el desarrollo embrionario de *Xenopus*. Tesis para optar al grado de magister en bioquímica y bioinformática. Universidad de Concepción. 63 pp. Concepción Chile.
- Ganoza, M., Serrano, A. & Ribotty, V. 2010. Biología Médica.
- Guerrero, M., Cab, E., Galán, L. & Viader, J. 2004. Biotecnología de proteínas recombinantes para la aplicación en acuicultura. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Hermosillo, Sonora, México.
- Gurdon, J. 2006. From nuclear transfer to nuclear reprogramming: the reversal of cell differentiation. Annu Rev Cell Dev Biol, 22: 1-22.
- Hemre, G., Torrisen, O., Krogdahl, A. & Lie, O. 2000. Glucose tolerance in Aatlantic salmon, *Salmon salar* L., dependence on adaption to dietary starch and water temperature. AQUACULT NUTR. 2: 69-75.
- Jamieson, D. & Roberts, A. 2000. Responses of young *Xenopus laevis* tadpoles to light dimming: possible roles for the pineal eye. J Exp Biol, 203: 1857-1867.

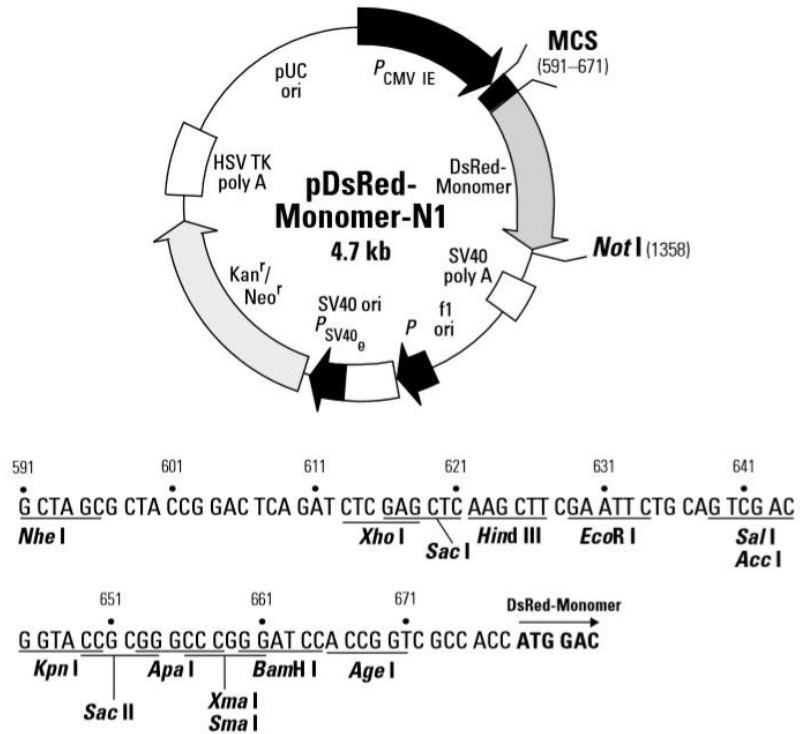
- Jones, A. 2012. Cuidados ranas de uñas, *Xenopus* e *Hymenochirus* - Ficha de mantenimiento. 12pp.
- Karp, G. (1998). Biología Celular y Molecular. Ed. Mc Graw Hill- Interamericana. México.
- Lin, Y., Boone, M., Meuris, L., Van Roy, N., Soete, A., Reumers, J., Moisse, M., Plaisance S., Drmanac, R., Chen, J., Spelman, F., Lambrechts, D., Van de Peer, Y., Tavernier, J. & Callewaert, N. 2014. Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nat Commun*, 5 (8): 4767
- Marín, R., Rovira, M., Crespo, D., Van der Vaart, M., Spink, H. & Planas, J. 2014. GLUT2-mediated glucose uptake and availability are required for embryonic brain development in zebrafish. *J CEREBR BLOOD F MET*, 10:1038.
- Melamed, J., Kernizan, S. & Walden P. 2002. Expression of B-cell translocation gene 2 protein in normal human tissues. *NCBI*, 34: 28-32.
- Mestre, F. 2011. La función de la acuaporina del ovocito en la hidratación de los huevos de los peces. *PANOACUÍCOLA*. 22: 2- 8.
- Narbón, P. 2008. Transferencia génica en animales. Trabajo Final Experto Universitario de Biotecnología Aplicada a los Alimentos UNED. 53pp.
- Nutt L. 2012. The *Xenopus* oocyte: a model for studying the metabolic regulation of cancer cell death. *Semin Cell Dev Biol.*, 23: 412-418.
- Obeso, L. 2010. Ingeniería Genética. Proyecto didáctico del departamento de Ciencias Naturales 2ºBach-V. México.
- Ojeda, P. 2011. Diseño y expresión de mutantes simples y dobles con posible importancia para la funcionalidad del transportador de glucosa GLUT1. Tesis de grado para optar al título de Químico Farmacéutico. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.
- Parisi, N. 2014. *Xenopus laevis* as a Model System. *National Institute for Agricultural Research*, 2: 151-167.
- Pérez, E., Salazar, D. & Martínez, A. 2003. Determinación de la expresión de canales de cloro de la familia *clc* en ovocitos de *Xenopus tropicalis*. *Memorias de*

programa de verano. Facultad de Ciencias Químicas Universidad Autónoma de Querétaro e Instituto de Neurobiología Universidad Nacional Autónoma de México Campus Juriquilla. 20 pp.

- Peterson, B., Small, C. & Bosworth, G. 2004. Effects of bovine growth hormone (Posilac®) on growth performance, body composition, and IGFbps in two strains of channel catfish. *AQUACULTURE*. 232: 651-663.
- Reyes, A. 2011. Diseño y expresión de mutantes simples y dobles con posible importancia para la funcionalidad del transportador de glucosa GLUT 1. Tesis de grado para optar al título de Químico Farmacéutico. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.
- Teerijoki, H. 2002. Fish glucose transporter: molecular cloning and functional characterization. *Kuopio Univ C Nat and Environ Sci*, 140: 1-75.
- Teerijoki, H., Krasnov, A., Gorodilov, Y., Krishna, S. & Mölsä, H. 2001. Rainbow trout glucose transporter (OnmyGLUT1): functional assessment in *Xenopus laevis* oocytes and expression in fish embryos. *J EXP BIOL*, 204: 2667-2673.
- Ubilla, A. & Valdebenito, I. 2011. Use of antioxidants on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) sperm diluent: effects on motility and fertilizing capability. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 39: 338-343.
- Vásquez, M., Rondón, I. & Eslava, P. 2012. Inmunoestimulantes en teleósteos: Probióticos, β -glucanos y LPS. *ORINOQUIA*, 16:46-62.
- Walsh, G. & Headon, D. 1995. Protein Biotechnology. *JH W&S*, 1: 13-15.
- Wahlstrom, T., Belikov, S. & Henriksson, M. 2013. Chromatin dynamics at the hTERT promoter during transcriptional activation and repression by c-Myc and Mnt in *Xenopus laevis* oocytes. *Experimental cells research*, 319: 3160-3169.

IX. ANEXOS

Anexo 1: DNA de Plásmido DsRed



Anexo 2: Preparación medio Ivone

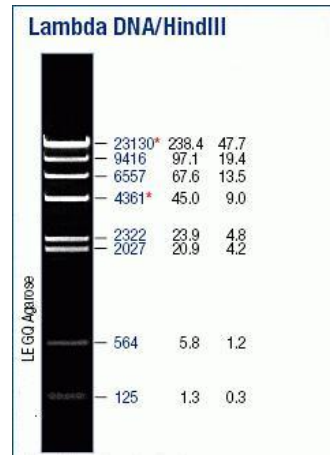
PM	Concentración	Preparación 300 ml	Indicación
MnCl ₂ x 6H ₂ O	55 mM	3,300 g	a pH 6,7
CaCl ₂ x 2H ₂ O	15 mM	0,660 g	a pH 6,7
KCl	250 mM	5,600 g	a pH 6,7
PIPES	10 mM	0,907 g	Disolver en KaOH
H ₂ O	-	300 ml	-

Se filtra por 0,25g y se deja enfriar a 4°C.

Anexo 3: DNA de GLUT1

tccaccattttgctagagaaggccgcggaggctcagagaggtgcgcacacttgccttgagtcacacagcgaatgccctccgcggtcccaacgcagagagaacgagccgatc
gcagcctgagcgaggcagtggttagggggggcccccggcccggccactcccctccccgcagagcgcgcccaggacagctgggccccaggccccgcc
gaggtcctgccacacacccctgacacaccggcgtcggcagccaatggccgggctctataaacgctacggtccgcgctctctggcaagaggcaagaggtgcaaacg
gagcgtgcccgtcgtatgctcggggtccccgagtgagcacgccaggagcaggagaccaaacgacgggggtcggagtcagagtcgagtgaggagtcccccggaccggag
cacgagcctgagcgggagagcggcgtcgcaccccgtcggcaccggctaccggcgccagccagaccagcgcagcgtgccaatggagccccagcagcaagaagc
tgacgggtcgcctcatgctggccgtgggagagcagtgcttggctccctgcagtttggctacaacactggagtcataatgccccagaagtgatcaggagttctacaacca
gacatgggtccaccgctatgggagagcatcctgccaccacgctcaccacgctctgtccctctcagtggccatctttctgtggggcatgattggctctctctgtggcctt
ttcgttaaccctttggccggcgaattcaatgctgatgatgaacctgctgcccctctgtccgccgtcctatgggcttctgaaactgggcaagctctttgagatgctgatcctgg
ggcgttcatcatcgggtgtactgcggcctgaccacaggttctgcccctgatgtgggtaagtgtcaccacagcccttctggggccctgggcacctgaccagctggg
catgctgctggcatcctcagccaggtgttcggcctggacccatcatgggcaacaaggacctgtggcccctgctgagcatcatcttaccggccctgctgagtgca
ctgtgctgccccttctccccgagatcccccttctctcatcaaccgcaacgaggagaacgggccaagagtgtctaaagaagctgcccgggacagctgacgtgacccat
gacctgcaggagatgaaggaagagatcggcagatgatcgggagaagaaggtcacctcctggagctgttccgctccccgctaccgccagccatcctcatcgtgtgt
gctgcagctgtcccagcagctgctggcatcaacgctgcttctattaccacgagcatctcagaaggcgggggtgcagcagcctgtgatccaccattggctccggtatcgt
caacacggcctcactgctgctgctgtttgtgtggagcgagcagccggcgaccctgcacctcataggcctcgtgcatggcggttggccatactatgacctcgcg
ctagcactgctggagcagctaccctggatgctctatctgagcatcgtggccatctttggcttggcctctttgaaagtgggtcctgccccatccatggttcatcgtggctgaact
ttcagccagggtccacgtccagctgccaltgccgttcaggcttctcaactggacctcaaatctattgtggcatgtgcttccagatgtggagcaactgtgtgctccctacgtctt
catcatcttactgtgctcctggttctgttctcatcttccactactcaaaagtctctgagactaaagccggacctcagatgagatcgttccgcttccggcaggggggagccagcc
aaagtgacaagacaccgagagctgtccatcccctgggggtgattcccaagtgtgagtcgccccagatcaccagcccggcctgctcccagcagcccaagatctctcag
gagcagcgagcagctggatgagactccaacctgacagatgtcagccgagccggcctggggtccttctccagccaaatgatgtcagaagaatattcaggacttaacgg
ctccagatfttaaaaaagcaagactgttctcaaatctattcagacaagcaacaggtttataatfttttattactgattttgtatttttatatcagcctgagctcctgtgccccatccc
aggcttaccctgaatggtccatgctcctgaggggtggagactaagccctctcgagacacttgccttctcaccagctaatctgtagggctggacctatgtcctaaggacacactaat
cgaactatgaactacaaagcttctatcccaggaggtggctatggccaccgttctgctgcccctgagctcctccactctaggggctcaggtccattagattggcccccttccatctct
cctaccaaccactcaaaftaatcttctttacctgagaccagttgggagcactggagtgagggagggagaggggaaaggccagctgggctcggggtctatgctcctttgcac
tgagggccacactattacatgagaagaggcctgtgggagcctgcaaaactcactgctcaagaagacatggagactcctgcccctgtgtatagatgcaagatatttatatattt
ttggttgaataaftaataacagacactaagttatagatatactggacaagccaactgtaaatacaccactcactcgttacttacctaacaagatataaatgctgtgttttagaac
atggtttgaaatgctgtgattgagggtaggaggttggatgggagtgagacagaagtaagtggggtgcaaccactgcaacggcttagacttcgactcaggatccagtcctta
cacgtacctctcatgctccttctcctcaaaaatctgtttgacccctgttaccagagaatatatacattctttatcttgacattcaaggcatttctatcacatatttgatagttggttca
aaaaactagttttgcccagccgtgatgctcaggtgaaatgcatattttgaaatgtaagttaataactgtacctttattggacagggctcaaaagaggttatgtgctgaagtcgcac
agtgaataagctaaaacacctgctttaaacaatggtaccatacaaccactactcattaactccaccacctctgcaccccctccacacacacaaaatgaaccagttctttgatg
ggcccaatgagctgtcaagctgcccctgttcttcttcaatttgaattgccccctctggttctctgtatactactgcttctcttaagacagctcatcctcctcctcaccctgaattc
cagagcacttcatctgctcctcatcacaagtcagtttctccactagctgaatttcatgagaagatgccgatttggctctgggtcctcagcactattcagtagctgtgatgc
acagcaggcactcagaaaactggaggaaataaaacaccaagaatattgtcaaaaaaaaaaaaaaaaa

Anexo 4: Escala pares de bases estándar λ Hind III



Anexo 5: Protocolo de extracción de DNA mediante fenol/cloroformo

- En un tubo eppendorf adicionar 500 μ l de buffer de lisa, de 20-200 μ g de muestra de DNA y 10 μ l de proteinasa K (200 ng/ μ l).
- Dejar los tubos a 37°C toda la noche.
- Añadir 600 μ l de fenol/cloroformo/isomil alcohol (25:24:1), mezclar por inmersión durante 30 a 60 segundos.
- Centrifugar a 8000 rpm por 5 minutos.
- Traspasar fase superior a un tubo eppendorf (aproximadamente 600 μ l).
- Añadir 600 μ l de cloroformo y mezclar por inmersión de 30 a 60 segundos.
- Centrifugar a 8000 rpm por 3 minutos.
- Transferir fase superior a un tubo eppendorf.
- Añadir 500 μ l de etanol (95%) frío y mezclar por inmersión suavemente.
- Dejar a -20°C por 2 horas o a 4°C toda la noche.
- Centrifugar 10000 rpm por 5 minutos.
- Secar por decantación el etanol, una vez seco, adicionar 200 μ l de buffer TE y resuspender.

Anexo 6: Secuencia de T7 dentro de plásmido dsRed-T7

A continuación se muestra un alineamiento de la secuencia del plásmido DsRed (Dsred) con la secuenciación obtenida (O1for). La secuencia sombreada en azul corresponde al promotor T7.

```
Dsred -----ggtgggaggtctatataagcagagctggttagtgaaccgcagatcc
O1for  CATTATCTTTTCTTAGGGGAGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTATGAACCGTCAGATCC
      *** *****

Dsred  gctagcgtaccgga----ctcagatctcgagctcaagcttcaattctgcagtcgacg
O1for  GCTAGC GTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCTCAAGCTTCAATTCTGCAGTCGACG
      ***** * ** ** *****

Dsred  gtaccgcgggcccgatccaccggtcgccaccatggacaacaccaggacgtcatcaag
O1for  GTACCGCGGGCCCCGGGATCCACCGGTCGCCACCATGGACAACACCGAGGACGTCATCAAG
      *****

Dsred  gattcatcgagttcaaggtgcgcatggaggctccgtgaacggccactacttcgagatc
O1for  GAGTTCATGCAGTTCAAGGTGCGCATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACTACTTCGAGATC
      *****

Dsred  gagggcgaggcgagggaagccctacgaggcaccagaccgcaagctgcaggtgacc
O1for  GAGGGCGAGGGCGAGGGCAAGCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGCAGGTGACC
      *****

Dsred  aaggcgccccctgccttcgctgggacatcctgccccagttcagtagcgtcc
O1for  AAGGGCGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCCAGTTCCAGTACGGCTCC
      *****

Dsred  aaggcctactgtaagcaccgccgacatcccgactacatgaagctgccttccccgag
O1for  AAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACATGAAGCTGTCCTTCCCCGAG
      *****

Dsred  ggcttcacctgggagcgtccatgaactcgaggacgcgcggtggtgaggtgcagcag
O1for  GGCTTCACCTGGGAGCGCTCCATGAACCTTCGAGGACGGCGGCGTGGTGGAGGTGCAGCAG
      *****
```

Anexo 7: Secuencia de GLUT1-dsRed

A continuación se muestra un alineamiento de los resultado de la secuenciación (**se1**) con la secuencia de GLUT1 obtenida de la base de datos NCBI (**databa**). Alineamiento realizado en programa Clustal W.

```

sel      CTTTTCAGGCCAATTAGTGGAGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTATGTAACCGTCAGATC 60
databa  -----

sel      CGCTAGCGCTACCGGACTCAGATCTCGA GCTCAAGCTT GCCACC ATGGAGCCCAGCA GCA 120
databa  -----ATGGAGCCCAGCAGCA 16
                HindIII  GLUT1 inicio
                *****

sel      AGAAGCTGACGGGTCGCCTCATGCTGGCTGTGGGAGGAGCAGTGCTTGGCTCCCTGCAGT 180
databa  AGAAGCTGACGGGTCGCCTCATGCTGGCCGTGGGAGGAGCAGTGCTTGGCTCCCTGCAGT 76
                *****

sel      TTGGCTACAACACTGGAGTCATCAATGCCCCCAGAAGGTGATCGAGGAGTTCTACAACC 240
databa  TTGGCTACAACACTGGAGTCATCAATGCCCCCAGAAGGTGATCGAGGAGTTCTACAACC 136
                *****

sel      AGACATGGGTCCACCGCTATGGGGAGAGCATCCTGCCACCACGCTCACCACGCTCTGGT 300
databa  AGACATGGGTCCACCGCTATGGGGAGAGCATCCTGCCACCACGCTCACCACGCTCTGGT 196
                *****

sel      CCCTCTCAGTGGCCATCTTTTCTGTTGGGGGCATGATTGGCTCCTTCTCTGTGGGCCTTT 360
databa  CCCTCTCAGTGGCCATCTTTTCTGTTGGGGGCATGATTGGCTCCTTCTCTGTGGGCCTTT 256
                *****

sel      TCGTTAACCGCTTTGGCCGGCGGAATTCAATGCTGATGATGAACCTGCTGGCCTTCGTGT 420
databa  TCGTTAACCGCTTTGGCCGGCGGAATTCAATGCTGATGATGAACCTGCTGGCCTTCGTGT 16
                *****

sel      CCGCCGTGCTCATGGGCTTCTCGAAACTGGGCAAGTCCTTTGAGATGCTGATCCTGGGCC 480
databa  CCGCCGTGCTCATGGGCTTCTCGAAACTGGGCAAGTCCTTTGAGATGCTGATCCTGGGCC 376
                *****

sel      GCTTCATCATCGGTGTGTACTGCGGCCTGACCACAGGCTTCGTGCCCATGTATGTGGGTG 540
databa  GCTTCATCATCGGTGTGTACTGCGGCCTGACCACAGGCTTCGTGCCCATGTATGTGGGTG 436
                *****

sel      AAGTGTACCCACAGCCTTTCGTGGGGCCCTGGGCACCCTGCACCAGCTGGGCATCGTCG 600
databa  AAGTGTACCCACAGCCTTTCGTGGGGCCCTGGGCACCCTGCACCAGCTGGGCATCGTCG 496
                *****

sel      TCGGCATCCTCATCGCCCAGGTGTTTCGGCCTGGACTCCATCATGGGCAACAAGGACCTGT 660
databa  TCGGCATCCTCATCGCCCAGGTGTTTCGGCCTGGACTCCATCATGGGCAACAAGGACCTGT 556
                *****

sel      GGCCCCTGCTGCTGAGCATCATCTTCATCCCGGCCCTGCTGCAGTGCATCGTGCTGCCCT 720
databa  GGCCCCTGCTGCTGAGCATCATCTTCATCCCGGCCCTGCTGCAGTGCATCGTGCTGCCCT 616
                *****

sel      TCTGCCCCGAGAGTCCCCGCTTCTGCTCATCAACCGCAACGAGGAGAACC GGGCCAAGA 780
databa  TCTGCCCCGAGAGTCCCCGCTTCTGCTCATCAACCGCAACGAGGAGAACC GGGCCAAGA 676
                *****

sel      GTGTGCTAAAGAAGCTGCGCGGGACAGCTGACGTGACCCATGACCTGCAGGAGATGAAGG 840
databa  GTGTGCTAAAGAAGCTGCGCGGGACAGCTGACGTGACCCATGACCTGCAGGAGATGAAGG 736
                *****

sel      AAGAGAGTCGGCAGATGATGCGGGGAGAAGAAGGTCACCATCCTGGAGCTGTTCCGCTCCC 900
databa  AAGAGAGTCGGCAGATGATGCGGGGAGAAGAAGGTCACCATCCTGGAGCTGTTCCGCTCCC 796
                *****

```

```

sel      CCGCCTACCGCCAGCCCATCCTCATCGCTGTGGTGTGCTGCAGCTGTCCCAGCAGCTGTCTG 960
databa  CCGCCTACCGCCAGCCCATCCTCATCGCTGTGGTGTGCTGCAGCTGTCCCAGCAGCTGTCTG 856
*****

sel      GCATCAACGCTGTCTTCTATTACTCCACGAGCATCTTCGAGAAGCGGGGGTGCAGCAGC 1020
databa  GCATCAACGCTGTCTTCTATTACTCCACGAGCATCTTCGAGAAGCGGGGGTGCAGCAG- 915
*****

sel      CCTGTGTATGCCACCATTGGCTCCGGTATCGTCA-CACG-TCTTCACTGTCGTGTCGCTG 1078
databa  CCTGTGTATGCCACCATTGGCTCCGGTATCGTCAACACGGCCTTCACTGTCGTGTCGCTG 975
*****

sel      -TTGTGTTG-AGCGGAGCAAGGCCGCG--ATCTGGCACTCATAGTCCTCGC---CTTGGT 1131
databa  TTTGTGGTGGAGCG-AGCAGGCCGGCGGACCCTGCACCTCATAGGCCCTCGCTGGCATGGC 1034
*****

sel      -----CTATGGCCGCGGGAATAGT----- 1150
databa  GGGTTGTGCCATACTCATGACCATCGCGCTAGCACTGCTGGAGCAGCTACCCTGGATGTC 1094
      *** . * * * * . **

sel      -----
databa  CTATCTGAGCATCGTGGCCATCTTTGGCTTTGTGGCCTTCTTTGAAGTGGGTCCTGGCCC 1154

```

Secuenciación pGLUT1-dsRed con primer dsRed (reverso)

A continuación se muestra un alineamiento de los resultados de la secuenciación (**1rev**) con la secuencia de GLUT1 obtenida de la base de datos NCBI (**seq**). Alineamiento realizado en programa Clustal W.

```

1rev      -----
seq      ACATGCTGTAGGCTTGCCTCGCCCTCGATCTCGAAGTAGTGGCCGTTACGGA 60

1rev      -----
seq      GCCCTCCATGCGCACCTTGAAGTGCATGAACTCCTTGATGACGTCCTCGGTGTTGTCCAT 120

1rev      -----TCAC-----ACTTGGGAATCAGCCCCAGGGGATGGAA 33
seq      GGTGGCGACCGGTGGATCCCGGGCCGCGCACTTGGGAATCAGCCCCAGGGGATGGAA 180
      ** * *****

1rev      CAGCTCCTCGGGTGTCTTGTCACTTTGGCTGGCTCCCCCTGCCGGAAGCCGGAAGCGAT 93
seq      CAGCTCCTCGGGTGTCTTATCACTTTGGCTGGCTCCCCCTGCCGGAAGCCGGAAGCGAT 240
      *****

1rev      CTCATCGAAGGTCCGGCCTTTAGTCTCAGGAACCTTTGAAGTAGGTGAAGATGAAGAACAG 153
seq      CTCATCGAAGGTCCGGCCTTTAGTCTCAGGAACCTTTGAAGTAGGTGAAGATGAAGAACAG 300
      *****

1rev      AACCAGGAGCACAGTGAAGATGATGAAGACGTAGGGACCACACAGTTGCTCCACATACTG 213
seq      AACCAGGAGCACAGTGAAGATGATGAAGACGTAGGGACCACACAGTTGCTCCACATACTG 360
      *****

1rev      GAAGCACATGCCACAATGAAATTTGAGGTCCAGTTGGAGAAGCCTGCAACGGCAATGGC 273

```

```

seq      GAAGCACATGCCACAATGAAATTTGAGGTCCAGTTGGAGAAGCCTGCAACGGCAATGGC 420
*****

lrev    AGCTGGACGTGGACCCTGGCTGAAGAGTTCAGCCACGATGAACCATGGGATGGGGCCAGG 333
seq     AGCTGGACGTGGACCCTGGCTGAAGAGTTCAGCCACGATGAACCATGGGATGGGGCCAGG 480
*****

lrev    ACCCACTTCAAAGAAGGCCACAAAGCCAAAGATGGCCACGATGCTCAGATAGGACATCCA 393
seq     ACCCACTTCAAAGAAGGCCACAAAGCCAAAGATGGCCACGATGCTCAGATAGGACATCCA 540
*****

lrev    GGGTAGCTGCTCCAGCAGTGCTAGCGCGATGGTCATGAGTATGGCACAACCCGCCATGCC 453
seq     GGGTAGCTGCTCCAGCAGTGCTAGCGCGATGGTCATGAGTATGGCACAACCCGCCATGCC 600
*****

lrev    AGCGAGGCCTATGAGGTGCAGGGTCCGCCGGCCTGCTCGCTCCACCACAAACAGCGACAC 513
seq     AGCGAGGCCTATGAGGTGCAGGGTCCGCCGGCCTGCTCGCTCCACCACAAACAGCGACAC 660
*****

lrev    GACAGTGAAGGCCGTGTTGACGATACCGGAGCCAATGGTGGCATAACACAGGCTGCTGCAC 573
seq     GACAGTGAAGGCCGTGTTGACGATACCGGAGCCAATGGTGGCATAACACAGGCTGCTGCAC 720
*****

lrev    CCCCgcctTCTCGAAGATGCTCGTGGAGTAATAGAAGACAGCGTTGATGCCAGACAGCTG 633
seq     CCCCgcctTCTCGAAGATGCTCGTGGAGTAATAGAAGACAGCGTTGATGCCAGACAGCTG 780
*****

lrev    CTGGGACAGCTGCAGCACCACAGCGATGAGGATGGGCTGGCGGTAGGCGGGGAGCGGAA 693
seq     CTGGGACAGCTGCAGCACCACAGCGATGAGGATGGGCTGGCGGTAGGCGGGGAGCGGAA 840
*****

lrev    CAGCTCCAGGATGGTGACCTTCTTCTCCCGCATCATCTGCCGACTCTTCTTCTTCTC 753
seq     CAGCTCCAGGATGGTGACCTTCTTCTCCCGCATCATCTGCCGACTCTTCTTCTTCTC 900
*****

lrev    CTGCAGGTCATGGGTCACGTCAGCTGTCCCGCGCAGCTT-CTTTAGCACACTCTTGGCCC 812
seq     CTGCAGGTCATGGGTCACGTCAGCTGTCCCGCGCAGCTTCTTTAGCACACTCTTGGGCC 960
*****

lrev    GG-TTCTCCTCG-TTGCGGTTGATGAGCAGGAAGCGGGGACTCTCGGGGCAGAAGGGCAG 870
seq     GGTTTCTCCTCGTTTGCGGTTGATGAGCAG-GAGCGGGGACTCTCGGGGCAGATGGGCAG 1019
*****

lrev    CACGATGCACTGCAGCAGGG-CCGGGAT--GAAGATG-ATGCTCAGCAGCAGGGGCCACA 926
seq     CACGATGCACTGCAGCAGGGTCCGGGAATGGAGGATGAATGCTCAGCAGCCAGGGTCACA 1079
*****

lrev    GGTcctTgTtGcccAtGatGgAgTccAgGccGaaCacCtGgGcGatGagGatGccGacGa 986
seq     GTTC--TGATGCCCATGATG-AGTCCAGTCGGACCACCTGGGCGA----- 1121
*****

lrev    CGATGCCAGCTGGTGCAGGGTGCCAGGGCCCCACGAAGGGCTGTGGGTGACACTTAC 1046
seq     -----ATGAAGGAATG----- 1132
*****

lrev    CCACATACATGGGCACGAAGCCTGTGGTCAGGCCGCAGTACACACCGATGATGAAGCGGC 1106
seq     -----

```

Anexo 8: 1 kb DNA ladder

1kb DNA ladder. New England Biolabs (N° catalogo: N3232)

