

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

EXPRESIÓN GÉNICA DE CORNICHON EN UN MODELO DE
DIABETES EN RATÓN Y SU POSIBLE RELACIÓN EN LA
ACTIVACIÓN DE CÉLULAS T.

TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A:
MICHELLE EUSEBIO LARES HERNÁNDEZ

DR. PAUL ROSAS SANTIAGO
DR. JORGE LUIS RUIZ SALAS

CUERNAVACA, MORELOS

OCTUBRE, 2022

AGRADECIMIENTOS

A mi padre Eusebio Lares Tovar

Por siempre creer en mí y darme ánimos para concretar cada uno de los proyectos que me propongo, por ser la figura paterna que necesitaba y estar para mí.

A mi madre Raquel Dolores Lares Hernández

Por motivarme y nunca dejar que me rindiera, inclusive en los días más pesados y difíciles, siempre me animo a que nunca perdiera el rumbo.

A Heriberto Ortiz Avila

Por formar parte de mi familia y apoyarme como si fuera su hijo para que pudiera terminar este proceso que fue la universidad.

A mi familia

Por apoyarme y brindarme su cariño siempre.

A mis asesores Paul Rosas Santiago, Jorge Ruiz Salas y Gilda Guerrero Flores

Por abrirme la oportunidad de realizar la tesis con ellos así como de brindarme las herramientas y el conocimiento para poder llevarla a término.

A mi compañera Mildred Ivette Lango Montiel

Por su apoyo y compañía en la realización de esta tesis.

A mis profesores Isaac Hernández Rodríguez y Carmen Rodríguez de Gante

Por orientarme y darme su consejo para la elección de mi carrera.

A mis amigos

Por juntos apoyarnos y darnos porras para poder llegar al final de la carrera.

A mis compañeros

Por recorrer este mismo camino conmigo.

Finalmente

Agradezco a todas las personas que contribuyeron a este logro.

ÍNDICE TEMÁTICO

	Página
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Tráfico vesicular.....	3
2.2 Retículo Endoplasmático.....	3
2.3 Sistema COPII.....	4
2.4 Reclutamiento de proteínas de carga para vesículas COPII.....	6
2.5 Familia de CNIH.....	7
2.6 Familia de CNIH en <i>Mus musculus</i>	8
2.7 Timo.....	10
2.8 Células T: generación, activación, diferenciación, maduración y acción.....	11
2.9 El metabolismo de la glucosa en la activación, función y diferenciación de células T.....	11
2.10 Glut1 en la activación de células T.....	13
2.11 Transporte de glucosa.....	14
2.12 Modelo de diabetes de ratón.....	16
3. ANTECEDENTES	18
3.1 Cornichon en Linfocitos T.....	18
3.2 Expresión de TGAM77 en tejidos humanos.....	19
3.3 Cornichon y transportadores de azúcares.....	19
3.4 Relación de Erv14 y los transportadores HXT3 y HXT5 en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
4. JUSTIFICACIÓN	22
5. HIPÓTESIS	23
6. OBJETIVOS	24
7. METODOLOGÍA	25
7.1 Metodología objetivo 1: Llevar a cabo un análisis filogenético de los homólogos de MmCNIH en metazoa.....	25
7.2 Metodología objetivo 2: Determinar la interacción proteína- proteína de MmCNIH1 y MmGLUT1 en levadura.....	25
7.2.1 Extracción de órganos linfoides (timo).....	25
7.2.2 Extracción de ARN.....	26
7.2.3 Síntesis de ADNc.....	27
7.2.4 Amplificación y clonación del gen GLUT1 y CNIH1.....	28
7.2.5 Transformación en <i>S. cerevisiae</i>	35
7.2.6 Identificación de interacciones proteína/proteína con el sistema de la ubiquitina dividida (mbSUS, mating-based Split Ubiquitin System).....	37
7.3 Metodología objetivo 3: Análisis de la expresión génica de CNIH1 y GLUT1 en el tejido del timo en un modelo de ratón diabético.....	40
7.4.1 Tratamiento estreptozotocina (STZ) en ratones.....	40
7.4.2 PCR de punto final de los homólogos de CNIH en el tejido del Timo.....	41
7.4.3 PCR en tiempo real de los homólogos de CNIH en el tejido del Timo.....	42
8. RESULTADOS	44

8.1 Realizar un análisis filogenético de los homólogos de MmCNIH en metazoa.....	44
8.1.1 Árbol filogenético de Cornichon en el reino Metazoa.....	44
8.2 Determinar la interacción proteína- proteína de MmCNIH1 y MmGLUT1 en levadura.....	45
8.2.1 Generación de las construcciones los genes MmCNIH1 y MmGLUT1	45
8.2.2 Extracción de ARN de Timo e Hígado.....	45
8.2.3 Amplificación y Clonación de MmGLUT1 y MmCNIH1	46
8.2.4 MmGLUT1 y MmCNIH1 mostraron poca fuerza de interacción.....	51
8.3 Analizar la expresión génica de CNIH1 y GLUT1 en el tejido del timo en un modelo de ratón diabético.....	54
8.3.1 Establecimiento de un modelo de ratón diabetico a través del uso de la estreptozotocina...54	
8.3.2 Amplificación de los cornichones en tejidos del timo con PCR punto final.....	56
8.3.3 El tratamiento con estreptozotocina disminuye la expresión de CNIH2.....	56
9. DISCUSIÓN.....	58
10. CONCLUSIÓN.....	61
11. PERSPECTIVAS.....	62
12. BIBLIOGRAFÍA.....	63
13. APÉNDICE.....	69

RESUMEN

El transporte vesicular es importante para la entrega de proteínas como los transportadores de glucosa de la familia GLUT, este transporte vesicular está formado por un complejo de proteínas llamado COPII que forma parte de la vía anterógrada por la cual las proteínas cargo son transportadas a las distintas partes de la célula. Una de las proteínas que conforman a COPII es Cornichon que es un receptor de proteínas cargo que interactúa con las proteínas a transportar. GLUT1 es el transportador por el cual los linfocitos T pueden integrar la glucosa al interior de la célula, para poder llevar a cabo su metabolismo y así madurar, diferenciarse y activarse. Los linfocitos T están muy ligados con la enfermedad de la diabetes debido a que su metabolismo depende en gran parte de la glucosa y poseen líneas de células encargadas al apoyo y reparación de las células Beta.

La interacción de estas dos proteínas como lo son GLUT y CNIH permite entonces la correcta localización de GLUT1 en la membrana plasmática desde donde realizará el transporte de glucosa de manera adecuada. En nuestro estudio pudimos observar que existe una débil interacción entre MmCNIH1 y MmGLUT1 mediante un análisis de ensayo mbSUS. Con ayuda de análisis filogenéticos se observó las relaciones filogenéticas que existen entre los homólogos de la proteína CNIH y mediante el establecimiento de un modelo murino diabético realizamos un análisis de PCR en tiempo real para ver bajo la condición de diabetes cómo se expresaban los genes de la familia cornichon, mostrando que CNIH2 tiene cambios en su expresión génica que dependen del nivel de glucosa en sangre.

Todas estas observaciones nos permiten establecer un estudio para evaluar la expresión de los diferentes miembros de la familia Cornichon y como estos están relacionados en el transporte de proteínas que pueden estar estrechamente relacionadas con procesos metabólicos, de enfermedad o respuesta inmunitaria.

1. INTRODUCCIÓN

El sistema inmune es el mecanismo que tiene el cuerpo para defenderse de los agentes infecciosos externos, esta línea de defensa consta de dos partes principales, el sistema inmune innato y el sistema inmune adaptativo. El sistema inmune innato (natural) se denomina así porque es congénito y representa la primera línea de defensa celular de nuestro cuerpo y está formado por monocitos (que se desarrollan en macrófagos), neutrófilos, eosinófilos, basófilos y células NK (linfocitos citolíticos naturales). Cuando el sistema inmune innato falla en la eliminación del patógeno, entra en acción el sistema inmune adaptativo, que se encuentra constituido principalmente de células linfoides como lo son los linfocitos T y B. Los linfocitos T tienen dos líneas celulares con diferente función, las cuáles son los linfocitos T CD8+ (citotóxicos) y los CD4+ (auxiliares), cada uno apoya a la respuesta inmune de diferente modo. Para poder realizar esta diferenciación, proliferación y función de las células es necesario glucosa, el cual sirve como macronutriente para la activación, diferenciación y proliferación de estas células, los linfocitos T presentan en su membrana transportadores de glucosa (Glut1) para poder captar glucosa desde del medio externo y llevar a cabo el proceso de glucólisis en el citosol. El tránsito que las proteínas GLUT1 realizan desde el Retículo Endoplásmico hacia el aparato de Golgi se le conoce como la ruta anterógrada y se ha reportado que este tráfico vesicular emplea el complejo proteico COPII, en el que participan proteínas como Cornichon (CNHI) que son receptores cargo de diferentes tipo de proteínas, como por ejemplo en el transporte de glucosa o factores de crecimiento. El objetivo de este proyecto es evaluar la posible interacción entre CNIH1 y el transportador de glucosa GLUT1 de ratón.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Tráfico Vesicular

El tráfico vesicular eucariota es responsable del suministro de una enorme variedad de proteínas a su ubicación celular adecuada y es esencial para la función celular y el desarrollo multicelular. Las proteínas secretoras nacientes se traducen y se pliegan en el Retículo endoplasmático y luego se empaquetan en vesículas COPII a través de su unión a receptores cargo que se unen a su cargo (proteína específica a transportar) para su transporte a los compartimentos ERGIC (Compartimento intermedio del Retículo endoplásmico-Golgi,) y Aparato de Golgi. (**Fig.1**) (Dancourt & Barlowe, 2010).

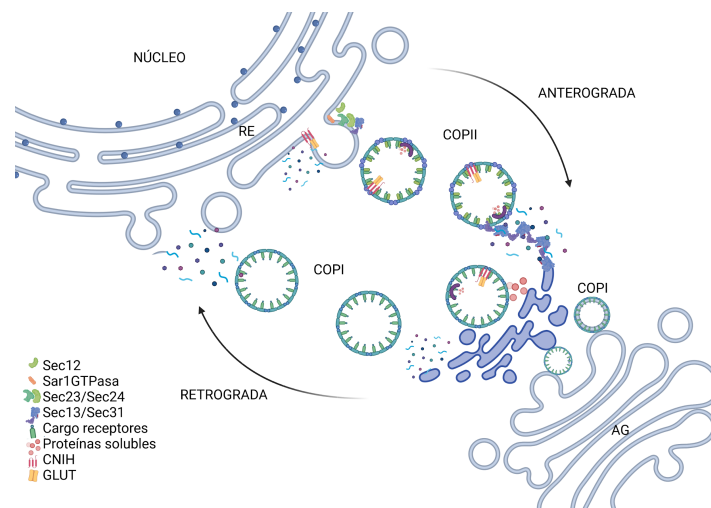


Figura 1: Tráfico Vesicular

El Retículo Endoplasmático es donde se originan las proteínas que requiere la célula, estas son transportadas rumbo a Aparato de Golgi (AG) por las vesículas COPII de manera anterógrada y antes de llegar al AG la vesícula COPII se desensambla parcialmente y fusionan con proteínas del citoplasma y forman un compartimento llamado ERGIC para finalmente llegar a AG.

2.2 Retículo endoplasmático

El Retículo Endoplásmico (RE) es el sitio de síntesis de proteínas secretadas y de membrana. Hay dos tipos de retículo endoplasmático: rugoso y liso. El Retículo Endoplasmático rugoso (RER), cuya superficie citoplasmática tiene moléculas receptoras para ribosomas y partículas de reconocimiento de señal (conocidas como riboforinas y proteínas de acoplamiento, respectivamente), está en continuidad con la membrana nuclear externa. La función del RER

consiste en la síntesis y la modificación de proteínas que tendrán que empaquetarse , así como en la síntesis de lípidos y proteínas de membrana. Las proteínas que necesitan ser transportadas al aparato de Golgi se exportan desde el RE a través de las vesículas tipo COPII y las proteínas que requieran para viajar de regreso al RE desde el Golgi se transportan en vesículas COPI (Aviram, *et. al*, 2016).

2.3 Sistema COPII

La exportación de cargos depende en gran medida del complejo proteico COPII que se ensambla en el Retículo Endoplasmático. Las vesículas COPII sirven como portadores celulares para reclutar proteínas cargo de la membrana del RE y parten hacia el aparato de Golgi, en ruta a sus destinos finales para procesos celulares adecuados (Li, *et al*, 2016). De manera resumida, los procesos de exportación mediados por COPII en el RE son iniciados por SEC12 que es una proteína transmembranal, que activa a la GTPasa para SAR1.(Brandizz, 2017).

La forma de ensamblaje de COPII inicia con Sar1 que es una pequeña GTPasa relacionada con Arf y es el actor central en la regulación de la formación de vesículas COPII en el RE. El reclutamiento específico y eficiente de Sar1 a la membrana del RE se logra mediante su afin GEF Sec12, que es una proteína de membrana integral residente en RE, Cuando se une a GTP, Sar1 sufre un cambio conformacional en sus regiones de interruptor I / II que expone una hélice alfa anfipática N-terminal (Bi, *et. al.*, 2002). Esta hélice se incrusta en la bicapa lipídica a través de interacciones de residuos hidrófobos con grupos fosfolípidos. En la membrana, Sar1-GTP puede reclutar Sec23 / 24 a través de una extensa interfaz de unión con Sec23 que representa ~ 20% del área de superficie de Sar1 (Bi, *et. al.*, 2002).

El reclutamiento de Sar1 a la membrana del RE es seguido por el complejo heterodimérico Sec23 / Sec24. Sec23 / 24 forma un complejo con una superficie cóncava opuesta a la membrana que puede impartir curvatura a la membrana subyacente o simplemente promover la unión compleja a membranas ya curvadas. Una interfaz de interacción extensa entre Sec23 y Sar1 probablemente impulsa el reclutamiento de Sec23 / 24, con una afinidad adicional probablemente contribuida por interacciones electrostáticas entre los residuos básicos que recubren la cara cóncava de Sec23 / 24 y los fosfolípidos ácidos en el RE((Bi, *et. al.*, 2002). La unión de Sec31 a Sec23 y Sar1 a

través de un bucle no estructurado extendido de Sec31 reorienta este residuo de arginina para mejorar aún más la actividad de GTPasa de 4 a 10 veces más que Sec23 / 24 solo (Antony, *et. al.*, 2001).

Después de la formación del complejo previo a la gemación, el complejo Sec13 / Sec31 se une, formando la capa exterior de la capa COPII (Matsuoka, *et. al.* 2001). La propensión, de Sec13 / 31 a autoensamblarse en una estructura esférica similar a una jaula sugiere un papel para la capa externa tanto en la recolección de los complejos de la capa interna subyacente para organizar la vesícula como en la conducción de la curvatura durante la polimerización (Stagg, *et. al.*, 2006).

Aunque los tres complejos de proteínas mencionadas anteriormente representan la maquinaria mínima para la funcionalidad de COPII, hay componentes adicionales que también participan en este proceso. Hay numerosos factores y accesorios responsables de modular el reclutamiento de la capa y el transporte de COPII (D'Arcangelo, *et. al.*, 2013), como por ejemplo Sec 16 que es una gran proteína de múltiples dominios que se asocia periféricamente con la membrana del RE y es esencial para la exportación del RE *in vivo* (Watson, *et. al.*, 2006). Se localiza en el Sitio de salida del RE (ERES) que son sitios de rápida renovación de vesículas COPII y es fundamental para el mantenimiento de estas estructuras (Hughes, *et. al.*, 2009). Sec16 interactúa físicamente con todas las proteínas de la cubierta de COPII, así como con las proteínas de la membrana del RE Sec12 y tiene una vida útil mayor en las membranas del RE que otros componentes de COPII. Sec16 puede impedir la actividad GTPasa de la cubierta COPII completa *in vitro*, lo que implica que esta proteína puede regular la formación de vesículas COPII controlando la actividad Sar1 (Yorimitsu & Sato, 2012).

Sec 12 ayuda en el reclutamiento de Sar1 a la membrana del RE a través del intercambio de GTP (nucleótidos de guanina), las investigaciones recientes han ampliado la comprensión de la actividad catalítica de Sec12 y su localización dentro del RE en varias especies, las cuales pueden regular eficazmente la biogénesis de vesículas COPII (McMahon, *et. al.*, 2012).

Receptores cargo adicionales: los receptores cargo canónicos funcionan simplemente para enlazar las moléculas de carga lumenales a la maquinaria de la cubierta de vesículas para asegurar una captura eficiente en las vesículas nacientes. Erv14 es una proteína cargo, que media en el tráfico de múltiples proteínas cargo solubles, (Belden & Barlow, 2001) y su ortólogo en metazoa, Cornichon (Hwang, *et. al*, 1999) .

2.4 Reclutamiento de proteínas cargo para vesículas COPII

Una proporción sustancial de todas las proteínas eucariotas atraviesa la vía secretora en ruta hacia sus destinos finales intra o extracelulares. Denominadas colectivamente como "proteínas cargo", esta clase de proteínas no solo se limita a las proteínas solubles secretadas, sino que también incluye todas las proteínas que se clasificaron a lo largo de la vía secretora y eventualmente residirán en el complejo de Golgi, los compartimentos lisosomal o endosomal, o la membrana plasmática. Las proteínas correctamente plegadas y ensambladas salen del RE en vesículas del complejo proteico de cubierta II (COPII) (Baines and Zhang, 2007).

Con base al conocimiento actual generado, las proteínas cargo que se reclutan selectivamente para las vesículas se pueden dividir en dos categorías amplias: las que se unen directamente a los componentes de la capa COPII y las que requieren adaptadores o receptores específicos para unirse a vesículas COPII. El primer grupo comprende proteínas que atraviesan la membrana del RE porque deben ser accesibles a las proteínas citosólicas de la cubierta de COPII. Las proteínas cargo transmembranales que se unen a COPII pueden, a su vez, servir como receptores cargos para la segunda clase de cargo, que incluye proteínas tanto solubles como transmembranales. Estudios realizados en el 2002 por Miller y colaboradores demostraron que Sec24 es el componente principal de COPII que interactúa con las proteínas cargo transmembranales a través de sus dominios citosólicos. También hay evidencias de que Sar1p participa en las primeras etapas de la selección de cargo transmembranales, y las interacciones entre las proteínas cargo y Sar1p podría restringir aún más la biogénesis de vesículas a las regiones de la membrana del RE en las que se concentran las proteínas cargo (Aridor, *et al.*, 2001).

Se cree que muchas proteínas secretoras dependen de los receptores cargo transmembrana para el transporte eficaz del retículo endoplásmico (RE) a Golgi. Los receptores cargo permiten clasificar al cargo que no puede unirse directamente Sec23 / 24, o también ejerce sobre el cargo un control de calidad o regulación para su salida del RE. (Herzig, *et al*, 2012). De manera interesante las vesículas COPII ajustan el tamaño del contenedor de transporte de acuerdo al tamaño de la carga a transportar (Stagg, *et.al.*, 2008).

El contenido de las vesículas COPII se desensambla parcialmente y fusiona con proteínas del citoplasma para formar el compartimento intermedio RE-Golgi (ERGIC), una estructura ubicada entre el RE y el Golgi que es exclusiva de las células eucariotas superiores. El ERGIC o complejo tubular vesicular (VTC) el cuál es responsable del transporte de la proteína cargo al complejo de Golgi a lo largo de microtúbulos. Tal ERGIC estacionario sería un sitio principal de clasificación anterógrada y retrógrada que está controlada por proteínas de la cubierta, GTPasas Rab y Arf, así como complejos de anclaje, SNARE y redes citoesqueléticas. El ERGIC también contribuye a la concentración, plegamiento y control de calidad de proteínas recién sintetizadas. (Appenzeller-Herzog & Hauri, 2006).

Para unirse ciertas proteínas a la vesícula COPII es necesario de receptores cargo canónicos para el transporte de la ruta anterógrada del tráfico vesicular, ejemplo de estas es la familia Cornichon que presenta varios ortólogos en diferentes organismos.

2.5 Familia Cornichon (CNIH)

Las proteínas denominadas como Cornichon (CNIH) se han considerado receptores de cargo, y son una familia conservada de proteínas entre eucariotas, posiblemente asociadas a la membrana (Hwang, *et. al*, 1999). CNI (el nombre que recibió en *Drosophila melanogaster*) es un ortólogo de CNIH y es la primer proteína caracterizada de esta familia de proteínas (Bökel, *et. al.*, 2005), se describió por primera vez en un mutante de *D. melanogaster* por Ashburner y colaboradores en 1990 (**Fig.2**).

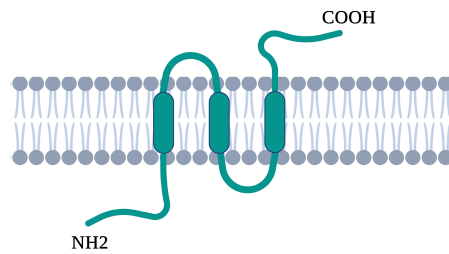


Figura 2: Modelo de la topología de la membrana con CNIH

CNIH presenta tres dominios transmembranales, su extremo N terminal hacia el citoplasma y su extremo C terminal hacia su medio extracelular.

Posteriormente Belden y Barlowe en 1996 la identificaron como una proteína hidrófoba integral de membrana de vesículas derivadas de RE recubiertas por COPII. Esta familia de proteínas también ha sido estudiada en levaduras, animales y plantas. Erv14, es el nombre que recibe CNIH en *S. cerevisiae*, es un receptor cargo de las vesículas del complejo COPII que participan en la vía secretora celular temprana (Li, 2017). En mamíferos esta proteína presenta 4 homologos.

2.6 Familia de CNIH en *Mus musculus*

Se han reportado cuatro homólogos de cornichon que se expresan de manera diferente en órganos del ratón a través del Atlas de expresión (<https://www.ebi.ac.uk/gxa/home>). En la **Tabla 1** elaborada durante el desarrollo de esta tesis se muestran los niveles de expresión de cada uno de los cornichones en los diferentes tejidos de *Mus musculus*, se observa que CNIH1 muestra un nivel medio de expresión en el timo.

Tabla 1. Cornichon y sus niveles de expresión en distintos órganos y tejidos de *Mus musculus* haciendo énfasis en el tejido a estudiar (<https://www.ebi.ac.uk/gxa/home>)

^e Cornichon	Alta	Media	Baja	Por debajo del límite de expresión
Cnih 1	Encéfalo, tejido adiposo marrón, hígado, corazón, bazo, riñón, musculatura, páncreas	Encéfalo, hígado, corazón, bazo, colon, tejido óseo, timo, intestino, pulmón, mucosa, testículos, piel, tráquea		-
Cnih 2	Encéfalo	Colón, médula espinal	Tejido óseo, glándulas endocrinas, hígado, corazón, bazo, timo, riñón, musculatura, pulmón, páncreas, gónada, ovarios, testículos, placenta, lengua, globo ocular, piel, estómago, árbol traqueobronquial	Bazo, órgano de la vejiga, glándula exocrina
Cnih 3	-	Encéfalo	Colon, intestino, glándula mamaria, pulmón, piel, médula espinal	Páncreas
Cnih 4	Hígado, corazón, riñón, páncreas, bazo, testículo, musculatura	Todos los órganos y tejidos registrados*		Cerebro

* Órgano de la vejiga, cerebro, colon, tejido conectivo, glándula endocrina, glándula exocrina, corazón, órgano inmunológico, intestino, riñón, hígado, pulmón, mucosa, musculatura, glándula oral, páncreas, órgano reproductivo, estructura reproductiva, órgano de sentido, elemento esquelético, piel, médula espinal, bazo, estómago, lengua, árbol traqueobronquial.

2.7 Timo

El timo es un órgano linfoide primario y el sitio inicial para el desarrollo de la función inmunológica de las células T, es morfológicamente similar en todas las especies. Es un órgano epitelial en el que sus células epiteliales proporcionan un marco que contiene células T, así como un número menor de otras células linfoides (Pearse, 2006). El timo es el primero de los órganos linfoides en formarse y crece considerablemente después del nacimiento en respuesta a la estimulación antigénica posnatal y la demanda de un gran número de células T maduras. Los factores genéticos también influyen en la edad de aparición, la tasa y la magnitud de la función inmunológica dependiente del timo. En ratas y ratones, el timo alcanza su tamaño máximo en la madurez sexual que es entre la quinta y séptima semana, luego involucre gradualmente (Pearse, 2006).

El timo de los mamíferos se encuentra en el mediastino pericárdico, anterior a los vasos principales del corazón y ventral a la base del corazón y el arco aórtico, con extensión variable de uno o ambos lóbulos hacia la región cervical en la rata (Haley, 2003).

El timo es un órgano linfoide primario, las células progenitoras derivadas de la médula ósea experimentan diferenciación / maduración, dentro del microambiente tímico, para formar el repertorio funcional de células T (Pearse, 2006).

Los linfocitos T y B forman parte del sistema inmune adaptativo. Se divide en Inmunidad humoral mediada por linfocitos B productores de anticuerpos e Inmunidad celular mediada por los linfocitos T que se diferencian en el timo y producen citoquinas. El linfocito T según sea CD4+ o CD8+ producen diferentes patrones de citoquinas y por tanto tienen diferentes funciones (Salazar-Torres y Ávila-Gamboa, 2014).

2.8 Células T: generación, activación, diferenciación, maduración y acción

Los protimocitos migran desde la médula ósea, ingresan al timo a través de la vasculatura en la unión corticomedular y pasan por 4 etapas de maduración, a medida que pasan de la zona subcapsular a través de la corteza hasta la médula y finalmente ingresan a la circulación como células T periféricas maduras. Durante la migración intratímica, las células T en desarrollo (timocitos) proliferan y se diferencian, lo que da como resultado cambios en el tamaño celular y la expresión de antígenos de diferenciación y receptores de interleucina. El cambio fenotípico va acompañado de un reordenamiento del gen del receptor de células T (TCR): necesario para la expresión de los receptores de células T de superficie y la generación de la competencia de las células T.

En la zona cortical se agrupan densamente la mayoría de los timocitos en fase de proliferación, mientras que en la médula se ubican los inmunocompetentes. (Yan *et al.*, 2017).

La activación de las células T se acompaña de cambios secuenciales en la expresión de varios genes durante varios días e implica múltiples vías de señalización (Crabtree, 1989). La estimulación de las células T se inicia mediante la interacción de los receptores de células T específicos de antígeno (TCR) con péptidos antigénicos unidos a MHC presentados en la superficie de las células presentadoras de antígeno (APC), pero la respuesta proliferativa completa de las células T requiere señales coestimuladoras adicionales que son proporcionados por la interacción de proteínas expresadas en la superficie de las células T y APC (June, 1991).

2.9 El metabolismo de la glucosa en la activación, función y diferenciación de células T.

Tras la maduración en el timo, las células T CD4 + vírgenes recirculan entre la sangre y los órganos linfoides secundarios. La quiescencia inmune de las células T vírgenes se acompaña de un metabolismo catabólico, caracterizado por la descomposición de glucosa, ácidos grasos y aminoácidos para generar metabolitos intermedios, que ingresan al ciclo del TCA mitocondrial (Wang *et al.*, 2011). La interconversión de metabolitos en el ciclo del TCA genera energía y equivalentes reductores, que posteriormente ingresan a la vía de fosforilación oxidativa aumentando efectivamente la producción de ATP. La inactividad de las células T vírgenes se

interrumpe cuando el receptor de células T (TCR) se acopla con un complejo antígeno específico / MHC de clase II que se muestra en la superficie de las células dendríticas, al mismo tiempo que el receptor CD28 reconoce las moléculas coestimuladoras. Estas dos señales desencadenan la activación de las células T, la secreción de IL-2, la proliferación celular denominada expansión clonal y su diferenciación en un fenotipo efector. Estos cambios en el estado de activación de los linfocitos T CD4 + no solo requieren energía, sino también una mayor demanda de precursores metabólicos para la biosíntesis de proteínas, ácidos nucleicos y lípidos para impulsar la expansión clonal y la posterior diferenciación en células efectoras. Por lo tanto, la activación eficiente de las células T requiere cambios profundos en el metabolismo celular (Bauer et al., 2004; Frauwirth *et al.* 2002). La generación de energía a través del ciclo del TCA y la fosforilación oxidativa se interrumpe y se cree que es reemplazada por la glucólisis, en la que la glucosa se convierte en lactato en el citosol, incluso cuando hay suficiente oxígeno disponible para realizar la fosforilación oxidativa (Fox *et al.*, 2005; Jones & Thompson, 2007).

Aunque es menos eficiente en términos de producción de energía, la glucólisis aeróbica genera intermediarios metabólicos que se utilizan en las vías anabólicas necesarias para mantener el crecimiento celular y producir células hijas. Sin embargo, más recientemente se ha desafiado el dogma de que las células T CD4 + simplemente cambian de un metabolismo oxidativo a glucolítico. Cao y sus colegas demostraron que la fosforilación oxidativa se induce fuertemente durante la activación de las células T CD4 + (Cao *et al.*, 2014). Al comparar las células T CD4 + y CD8 +, los investigadores demostraron que estas células utilizan estrategias metabólicas distintas para satisfacer sus demandas funcionales. Después de la activación, las células T CD8 + tenían un flujo glucolítico más alto que las células T CD4 +. Por otro lado, las células T CD4 + también indujeron la glucólisis tras la activación, pero tuvieron mayor contenido mitocondrial y metabolismo oxidativo que las células T CD8 +. Se subraya la importancia de la glucólisis y el metabolismo oxidativo en la activación de las células T (Cao *et al.*, 2014).

La glucosa se transporta a las células T a través del transportador de glucosa 1 de alta afinidad (Glut1) que es el principal transportador de glucosa en las células T (Wieman *et al.*, 2007; Wofford *et al.*, 2008; Palmer *et. al.*, 2015;).

2.10 Glut1 en la activación de células T

La proteína GLUT1 es codificada por el gen *Slc2a1* en ratón y en humano, y se localiza en los eritrocitos, la barrera hematoencefálica, el cerebro, la placenta, el riñón (Stanirowski, *et al.*, 2017) y linfocitos T (Macintyre *et. al.*, 2014). A través de un paso de limitación de velocidad catalizado por hexoquinasa, la glucosa queda atrapada dentro de las células donde se metaboliza a través de la glucólisis. Durante este proceso, cada molécula de glucosa se descompone en piruvato con una producción neta de dos moléculas de ATP. La mayoría de las células T no proliferativas y diferenciadas terminalmente, como las células T vírgenes y de memoria, oxidan completamente el piruvato a través de la ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) para generar NADH y FADH₂ que alimentan la fosforilación oxidativa produciendo 36 moléculas de ATP por molécula de glucosa. Cuando se activan las células T, el piruvato se transforma en lactato regenerador de NAD⁺ que posteriormente activa reacciones glucolíticas (Palmer *et. al.*, 2015).

La activación de las células T CD4 conduce a la proliferación y diferenciación en células efectoras (Teff) o reguladoras (Treg) que median o controlan la inmunidad. A pesar de la expresión de múltiples transportadores de glucosa, la deficiencia de Glut1 altera selectivamente el metabolismo y la función de los timocitos y Teff. La deficiencia de Glut1 impide el aumento de la captación de glucosa, la glucólisis, el crecimiento, la proliferación y la disminución de la supervivencia y diferenciación de Teff. (Herzig *et al.*, 2012).

2.11 Transporte de glucosa

El transporte de la glucosa a través de la membrana celular se lleva a cabo por dos familias de proteínas de membrana: los transportadores de glucosa acoplados a sodio (SGLT) y las proteínas facilitadoras del transporte de glucosa (GLUT). Los primeros se expresan principalmente en epitelios que se encargan de la absorción y de la reabsorción de nutrientes, esto es, el epitelio del intestino delgado y el epitelio tubular renal respectivamente. Los GLUT se expresan en todas las células del organismo y permiten mover la glucosa de un compartimiento a otro (Castrejón *et al*, 2007).

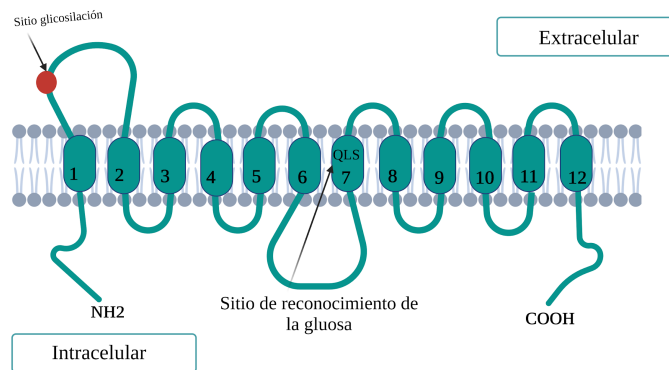


Figura 3: Estructura hipotética de los GLUT.

Se componen de 12 regiones transmembranales (RTM), conectadas por lazos hidrofílicos. Las terminaciones amino y carboxilo se encuentran en la parte citoplasmática

En la **Tabla 2** se observa a la familia de los transportadores GLUT, en la cual se han descrito 14 (Mueckler & Thoren, 2014). Los GLUT (**Fig. 3**) transportadores uniporte; transportan la glucosa a favor de su gradiente de concentración al interior de la célula (Machado-Olano *et. al.* 2019).

Transportador	Transporta	Km	Localización tisular
GLUT1 (SLC2A1)	Glucosa y galactosa	2 mM	eritrocitos, células endoteliales del cerebro, neuronas, riñón, linfocitos
GLUT2 (SLC2A2)	Glucosa	17 mM	células β pancreáticas, hígado, riñón, intestino delgado
GLUT3 (SLC2A3)	Glucosa y galactosa	2 mM	sistema nervioso central, placenta, hígado, riñón, corazón, linfocitos
GLUT4 (SLC2A4)	Glucosa	5 mM	tejidos sensibles a la insulina, linfocitos
GLUT5 (SLC2A5)	Fructosa	10 mM	intestino delgado, testículo, riñón
GLUT6 (SLC2A6)	Glucosa	5 mM	cerebro, bazo, leucocitos
GLUT7 (SLC2A7)	Glucosa y fructosa	0.3 mM y 0.06 mM	intestino delgado, colon, testículo, próstata
GLUT8 (SLC2A8)	Glucosa	2 mM	testículo y tejidos dependiente de insulina
GLUT9 (SLC2A9)	Fructosa	no descrita	riñón, hígado, intestino delgado, placenta, pulmones, leucocitos
GLUT10 (SLC2A10)	Glucosa	0.3 mM	hígado, páncreas
GLUT11 (SLC2A11)	Fructosa y glucosa	alta afinidad a fructosa y baja afinidad a glucosa	corazón, músculo esquelético, riñón, tejido adiposo, placenta, páncreas
GLUT12 (SLC2A12)	Glucosa	alta afinidad a glucosa	músculo esquelético, tejido adiposo, intestino delgado
GLUT13 (SLC2A13)	Mioinositol acoplado a H ⁺	100 μ M	cerebro
GLUT14 (SLC2A14)	Glucosa	Alta afinidad a glucosa	testículo

Tabla 2. Familia de transportadores GLUT, (Castrejón et al, 2007)

2.12 Modelo de diabetes de ratón

Para realizar un estudio de la expresión génica de CNIH mediante un análisis de PCR en tiempo real, para trabajar con una condición de glucosa alta en sangre, hay numerosos modelos biológicos en animales que reproducen varias de las manifestaciones clínicas de la diabetes mediante diversos métodos, entre los cuales se destaca la inducción química con estreptozotocina (STZ) en roedores. Este fármaco provoca la destrucción selectiva de las células β de los islotes pancreáticos, única fuente de insulina en el organismo.

La sensibilidad al fármaco puede variar según la cepa, el sexo, la edad, el estado nutricional y, por supuesto, la especie animal. El momento, la dosis y la vía de administración resultan determinantes para el tipo de diabetes que se desee inducir. En la rata adulta la inoculación de diferentes dosis de este agente causa una deficiencia casi total de insulina y, por lo tanto, niveles elevados de hiperglucemia que simulan la diabetes de tipo 1.

Entre los fármacos conocidos que inducen la diabetes experimentalmente este agente es el más utilizado por su mayor estabilidad y efectividad con respecto a otros. Es un antibiótico derivado de *Streptomyces achromogenes* que se emplea, además, como antineoplásico por su acción citotóxica altamente selectiva para las células β de los islotes pancreáticos (Bequer et al, 2016).

Dado que STZ es un donante de óxido nítrico (NO) y se descubrió que el NO provoca la destrucción de las células de los islotes pancreáticos, se propuso que esta molécula contribuye al daño del ADN inducido por STZ (Kröncke et al. 1995, Morgan et al. 1994). Sin embargo, STZ no es un donante espontáneo de óxido nítrico (Kröncke et al. 1995). Esta molécula se libera cuando STZ se metaboliza dentro de las células, pero la NO sintasa no es necesaria para este efecto (Kröncke et al. 1995). Sin embargo, los resultados de varios experimentos proporcionan la evidencia de que el NO no es la única molécula responsable del efecto citotóxico de STZ. Se encontró que STZ genera especies reactivas de oxígeno, que también contribuyen a la fragmentación del ADN y evocan otros cambios deletéreos en las células (Takasu et al. 1991b, Bedoya et al. 1996). La formación de aniones superóxido resulta tanto de la acción de STZ en las mitocondrias como de una mayor actividad de la xantina oxidasa. Se demostró que STZ inhibe el

ciclo de Krebs (Turk et al. 1993) y disminuye sustancialmente el consumo de oxígeno por parte de las mitocondrias (Nukatsuka *et al.* 1990b). Estos efectos limitan fuertemente la producción de ATP mitocondrial y provocan el agotamiento de este nucleótido en las células B (Nukatsuka *et al.* 1990b, Sofue *et al.* 1991). La desfosforilación de ATP aumentada, aumenta el suministro de sustrato para la xantina oxidasa (las células B poseen una alta actividad de esta enzima) y mejora la producción de ácido úrico, el producto final de ATP. Luego, la xantina oxidasa cataliza la reacción en la que se forma el anión superóxido (Nukatsuka *et al.* 1988). Como resultado de la generación del anión superóxido, se forman peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo (Nukatsuka *et al.* 1990a, Takasu *et al.* 1991b). Las especies de NO y oxígeno reactivo pueden actuar por separado o formar el peroxinitrato altamente tóxico (ONOO). Por lo tanto, los antioxidantes intracelulares o eliminadores de NO atenúan sustancialmente la toxicidad de STZ. El daño del ADN inducido por STZ activa la poli ADPribosilación (Sandler y Swenne 1983). Este proceso conduce al agotamiento del NAD + celular, una mayor reducción del contenido de ATP (Heller et al. 1994) y la posterior inhibición de la síntesis y secreción de insulina (Nukatsuka *et al.* 1990).

3. ANTECEDENTES

3.1 Cornichon en Linfocitos T

Para identificar genes inducidos durante la fase temprana de activación de células T en respuesta a aloantígenos Utku y colaboradores en 1999, realizaron un análisis de la expresión de ARNm utilizando una línea de células T humanas aloestimuladas, identificando después de la tercer aloestimulación, un fragmento de ADNc de 207 pb, que se incrementó significativamente 24 h después de la estimulación. Este ADNc se denominó molécula 77 asociada al crecimiento de células T (TGAM77), correspondiente a un mensajero completo de 1396 pb, que codifica una proteína de 134 aminoácidos que comparte un 63% de homología con la proteína cornichon (cni) de *Drosophila melanogaster*. Para examinar la regulación positiva de TGAM77 con más detalle, se utilizó la Retrotranscriptasa (RT), usando RNA a diferentes tiempos utilizando oligos específicos de TGAM77 (**Fig. 4**). La regulación positiva de TGAM77 se observó a las 3 h después de la estimulación de los linfocitos, lo que indica que la expresión de TGAM77 es un evento temprano en la estimulación de células T.

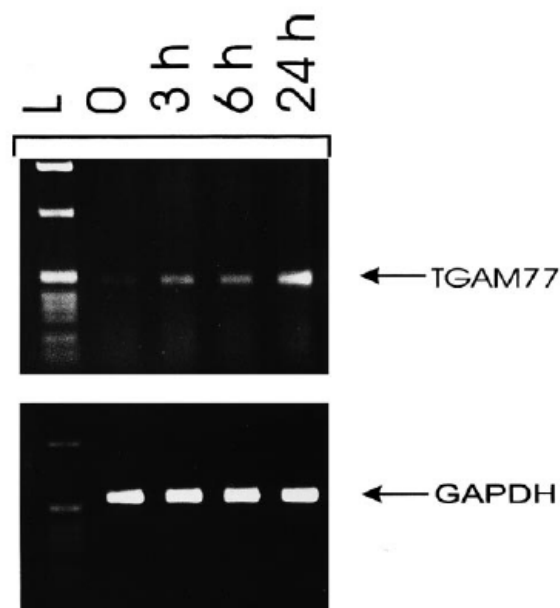


Figura 4: Análisis de expresión por RT-PCR semicuantitativo de linfocitos estimulados.
En el estudio estimularon linfocitos humanos con rIL-2 y se aisló el ARN (0), y después de 3, 6 y 24 h, se sintetizó

el ADNc y se amplificó por PCR con oligos de TGAM77. La expresión de glicerol aldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) sirvió como indicador para la carga de cada pocillo con cantidades iguales de ADNc

3.2 Expresión de TGAM77 en tejidos humanos

La expresión de TGAM77 se observó en varios tejidos humanos (**Fig. 5**). La expresión de TGAM77 variaba dependiendo del tejido, mostrando una mayor expresión en el bazo, apéndice, cerebro, médula ósea y linfocitos de sangre periférica, y una expresión más baja como nódulo linfático, hígado fetal y timo (Utku *et al.*, 1999).

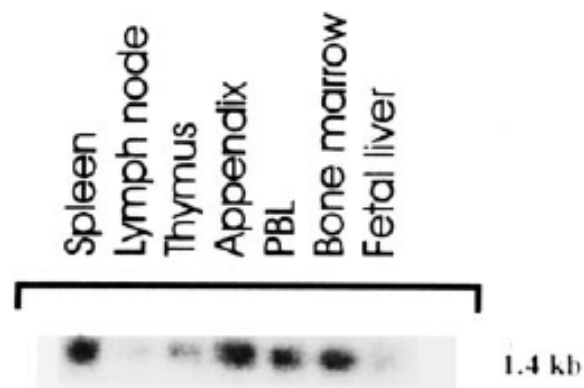


Figura 5: Análisis de expresión de TGAM77 en diferentes tejidos humanos, mediante Western-blot.
Distribución de la expresión de TGAM77 en tejidos humanos.

3.3 Cornichon y transportadores de azúcares

En un estudio realizado por Herzig y colaboradores en 2012, utilizando el enfoque PAIRS (Análisis de Emparejamiento de Receptores Cargo), que utiliza metodologías robóticas para manipular genéticamente a *Saccharomyces cerevisiae* utilizando a la proteína verde fluorescente GFP como etiqueta de proteínas cargo. PAIRS se basa en la idea de que cuando falta un receptor cargo, la proteína que transporta no sale, acumulándose en el RE y esto se puede visualizar mediante el uso de cargo etiquetado con fluorescencia. Herzig y colaboradores observaron que una gran cantidad de proteínas de la membrana plasmática requieren a Erv14 para una salida eficiente del RE. Posteriormente el receptor cargo Erv14 también se localizó en vesículas COPII (Herzig *et al.*, 2012) y entre las proteínas que forman parte de sus cargos se encuentran los transportadores de hexosas Hxt3 y Hxt5 (**Fig. 6**).

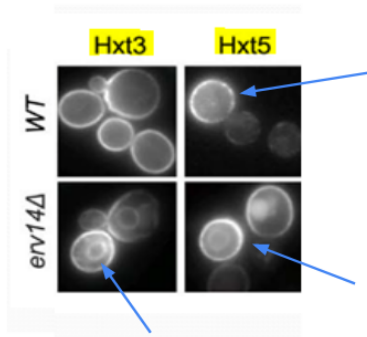


Figura 6: Transportadores de azúcares dependientes de ERV14

La eliminación de *Erv14* provocó una retención generalizada en RE de los transportadores de hexosas. Lo que señalan las flechas azules son la fluorescencia donde se expresan los transportadores de hexosas, mostrando que algunos quedaron dentro Reticulo endoplasmático.

3.4 Relación de *Erv14* y los transportadores HXT3 y HXT5 en *Saccharomyces cerevisiae*

En un estudio realizado por Martínez-Morales en 2021 (datos no publicados), realizaron un ensayo de gota con la cepa EBY.VW.4000, donde los resultados mostraron que las cepas co-transformadas con *Hxt3*, *Hxt5* y *Erv14* crecieron mejor en presencia de glucosa, en comparación a la que únicamente fue transformada con *Hxt3* y *Hxt5* (**Fig. 7**)

Cuando la cepa EBY (+) es transformada con los plásmidos que tienen a los transportadores, observaron que la levadura tiene un mayor crecimiento en casi todos los azúcares a excepción de la glucosa. En la (**Fig. 7**) se observa que las cepas transformadas con el plásmido vacío tanto en EBY silvestre como en EBY*erv14Δ* no son capaces de crecer en un medio con glucosa. Sin embargo cuando la cepa EBY (+) se transformó con los plásmidos pHXT5-GFP y pHXT3-GFP (**Fig. 7**) por separado se observó que las levaduras restablecieron su crecimiento en un medio con glucosa mostrando que ambos transportadores son capaces de absorber glucosa. Sin embargo, cuando HXT5 y HXT3 se expresaron en la cepa EBY*erv14Δ* (-) y se crecieron en medios con glucosa se observó una reducción en el crecimiento. Esto nos indicó que la captura de glucosa al interior de la célula se ve limitada por la ausencia del gen ERV14 (Martínez-Morales, datos no publicados).

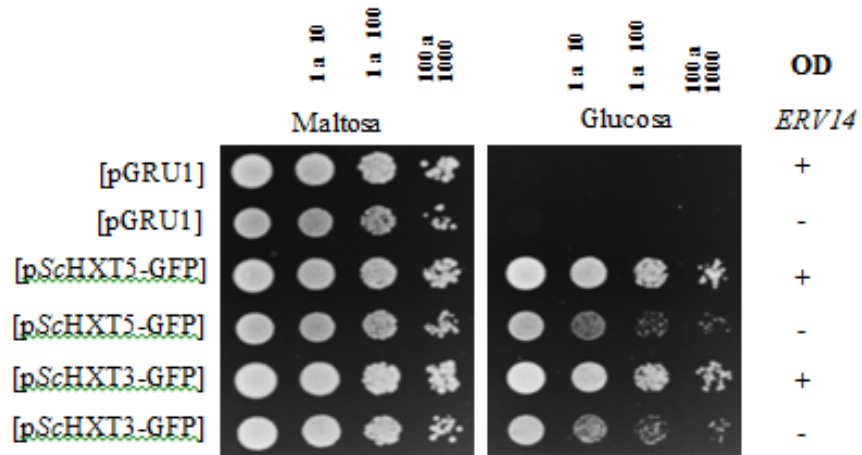


Figura 7: Transportadores de glucosa dependientes de Erv14

Crecimiento de cepas de levadura con diferentes plásmidos con el gen *Erv14* (indicado con +) y sin el gen *Erv14* (indicado con -), utilizando un plásmido vacío (pGRU) como control, y un plásmido con el transportador Hxt5 (pScHXT5-GFP) y otro con el transportador Hxt3 (pScHXT3-GFP).

4. JUSTIFICACIÓN

El tráfico vesicular en las células eucariotas, es importante para la entrega correcta en tiempo y forma de proteínas como los transportadores de glucosa de la familia GLUT. En este proceso del tráfico vesicular participan una gran variedad de proteínas que permiten su adecuada función, siendo la proteína Cornichon importante para la selección y empaquetamiento de proteínas cargo, tales como los GLUTs dentro de las vesículas tipo COPII. En las células T el procesamiento de la glucosa es importante para llevar a cabo su activación, maduración y proliferación, por lo que un adecuado tránsito de los transportadores de glucosa de la familia GLUT desde el retículo endoplásmico hacia la membrana plasmática es crucial para una correcta función de las células T. Además la sobreexpresión de cornichon en los linfocitos T de humano durante su activación nos sugiere la importancia de este receptor cargo durante este cambio celular de reposo a activado, por lo que su estudio y la relación con los transportadores de glucosa tipo GLUT nos permitirán entender mejor esta dinámica del transporte vesicular en este tipo celular. Con base a la relación de la enfermedad autoinmune Diabetes Mellitus tipo 1 y los linfocitos T, nuestro estudio puede ayudar a la comprensión de la enfermedad.

5. HIPÓTESIS

El receptor cargo *MmCNIH1* interactúa con el transportador *MmGLUT1* y esta se regula por los niveles de glucosa extracelular en el tejido del timo.

6. OBJETIVO GENERAL.

Determinar la posible relación entre *MmCNIH1* y el transportador de glucosa *MmGLUT1* en un modelo de ratón diabético en el tejido del timo.

OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Llevar a cabo un análisis filogenético de los homólogos de *MmCNIH* en metazoa
2. Determinar la interacción proteína- proteína de *MmCNIH1* y *MmGLUT1* en levadura
3. Analizar la expresión génica de *MmCNIH1* y *MmGLUT1* en el tejido del timo en un modelo de ratón diabético

7. METODOLOGÍA

7.1 Metodología objetivo 1: Llevar a cabo un análisis filogenético de los homólogos de MmCNIH en metazoa

- Se realizó la selección de especies para la construcción de un árbol filogenético de la familia de proteínas CNIH en los metazoarios representativos de cada filo.
- Se consultó en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) las secuencias de aminoácidos de los cuatro homólogos de CNIHs en el ratón y a través del BLAST de la página, se realizó un análisis del nivel de confianza (E-value) con un nivel de 1×10^{-15} con dos órdenes de magnitud hacia arriba o hacia abajo entre las secuencias de las especies para seleccionar las que se incluirían en el árbol.
- Una vez seleccionadas las secuencias, se realizó un alineamiento en la página <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/> y se obtuvo un archivo FASTA con las secuencias alineadas.
- Para elaborar el árbol filogenético, el archivo FASTA se cargó el archivo a la página <http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/> y se obtuvo el archivo con la extensión iqtree para poder utilizar el programa FigTree V1.4.4.

7.2 Metodología objetivo 2: Determinar la interacción proteína- proteína de *MmCNIH1* y *MmGLUT1* en levadura

Para obtener las construcciones de los genes *MmCNIH1* y *MmGLUT1* que van a ser utilizadas para el ensayo de interacción, se realizó la extracción de tejidos:

7.2.1 Extracción de órganos linfoides (timo)

Se realizó la extracción del tejido del timo para poder extraer de él ARN.

1.- Se trabajó con ratones del grupo 0 los cuáles no tienen tratamiento de Estreptozotocina ni Buffer de sodio, este grupo tiene 21 semanas de vida.

2.- Posteriormente se sacrificó al ratón por dislocación cervical: Colocando los dedos pulgar e índice detrás de las orejas, cruzando la nuca, tirar del rabo hacia atrás con la otra mano mientras se presiona hacia abajo en la nuca.

2. Se utilizó papel secante para colocarlo.

3. Se utilizó alcohol para esterilizar la zona de la línea media.

4. Se cortó por la línea media con tijeras.

5. Se retiró la piel con los dedos.

7. Se abrió el tórax mediante una incisión, con tijeras, desde el xifoides hasta el cuello.

8. Se cortaron las costillas con tijeras

9. Se extrajo el timo con las pinzas y se colocó en un tubo eppendorf con 500 μ L de trizol para su conservación.

7.2.2 Extracción de ARN

Posteriormente se procedió a la extracción de ARN

1. El tejido se congeló en hielo seco en 500 μ L de Trizol (Invitrogen).

2. Se pulverizó el tejido con el mortero (previamente enfriado con hielo seco), colocando nitrógeno líquido para obtener una mezcla homogénea.

3. Se transfirió el polvo a un tubo de Eppendorf de 1.5 ml y se agregó 1 mL de Trizol y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente.

4. Se añadió 200 μ L de cloroformo y se agitó fuertemente por inversión por 10-15 s

5. Se centrifugó a 12,000 g por 15 minutos a 4°C.

6. Se transfirió la fase superior a un nuevo tubo cuidando de no tomar la interfase

7. Se añadieron 500 μ L de isopropanol y se mezcló suavemente por inmersión durante 15 s. Se dejó toda la noche a -20°C

8. Se centrifugó a 12,000 g, a 4°C durante 30 min (se forma un pellet).

9. Se eliminó el sobrenadante y se añadió 1 mL de etanol al 75% y se usó el vortex por 5-10 s.
10. Se centrifugó a 6,000 g a 4°C por 15 min.
11. Se removió el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente.
12. Se resuspendió el ARN en 10 – 30 μ L agua miliQ esteril dependiendo del tamaño del pellet.
13. Se cuantificó el ARN en el nanofotómetro (Implen).
14. Para verificar la integridad del ARN se mezcló el volumen que contenía 1 μ g de ARN y se agregaron 3 volúmenes de buffer de urea (10 M Urea, 2% azul de bromofenol, se mezcló y se calentó a 65°C por 1 minuto y se enfrió un minuto en hielo. La mezcla se resolvió en un gel de agarosa al 1.5% (**Apéndice B**) con TAE durante 30 minutos a 100 V.
15. Para corroborar que las muestras no contenían ADN genómico, se realizó un PCR con el ARN utilizando un par de oligonucleótidos para el gen *Th* que logren distinguir el tamaño de las secuencias de ARNm de ADN genómico.

7.2.3 Síntesis de ADNc

Con el ARN se realizó la síntesis de ADNc para su uso en la clonación de genes y en el PCR en tiempo real

- Se mezcló 1 μ L oligo dT (100 μ M), ARN 1 μ g y se llevó a un volumen de 10 μ L con Agua miliQ. Se calentó a 65° C durante 5 min.
- Posterior se realizó un Mix con los siguientes componentes:

Componente	Cantidad
Buffer SSIV 5X	4 μ L
dNTPs 10 mM	1 μ L
Inhibidor RNasa	0.5 μ L
Retrotranscriptasa (100 U/ μ l)	0.5 μ L
DTT (100 mM)	1 μ L
H ₂ O	3 μ L

Tabla 3. Componentes de síntesis de ADNc

- Se agregó este mix a los 10 μ L de del oligo dT y el ARN y se colocaron en las siguientes condiciones: 10 minutos a 42°C y 60 min a 50°C.

7.2.4 Amplificación y clonación de los genes *MmGLUT1* y *MmCNIH1*.

Se utilizó el sistema Gateway para la clonación de los genes en plásmidos. De manera general, el sistema emplea la recombinación del sitio reversible entre attB, attP, attL y attB permitiendo una clonación direccional dentro de un plásmido (**Fig. 8**).

Sistema GATEWAY

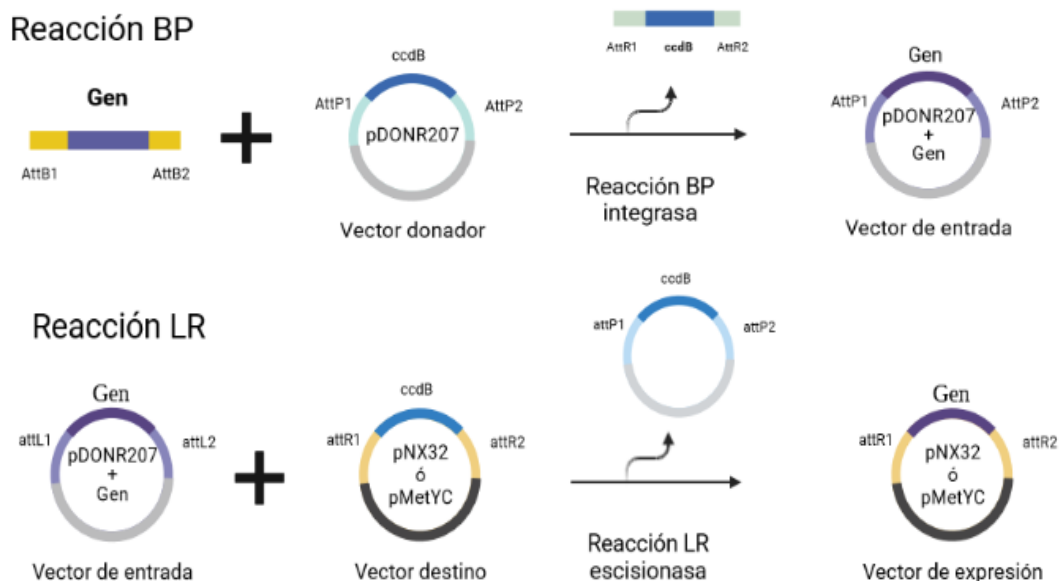


Figura 8: Esquema de clonación mediante el sistema Gateway

La amplificación del marco de lectura abierto de los genes de *MmGLUT1* y *MmCNIH1* se realizó mediante la técnica de PCR usando especificaciones de la enzima Phusion (**Tabla 4**) y con oligos específicos para cada gen (**Tabla 5**). Se realizó un gradiente de temperatura para determinar la temperatura óptima de alineamiento para amplificar los genes.

Componente	Cantidad
Buffer 5X Phusion HF	2 μ L
dNTPs 10 mM	1 μ L
Oligo Forward (10 μ M)	1 μ L
Oligo Reverse (10 μ M)	1 μ L

ADNc	1 μ L
DMSO	1.5 μ L
Taq Polimerasa(Phusion polymerase)	0.5 μ L
H ₂ O	Llevar a 50 μ L

Tabla 4. Componentes de la mezcla de reacción para la primer PCR

La reacción se realizó en un Termociclador (Biorad) bajo las siguientes condiciones:

x35 Ciclos					
Condiciones	Desnaturalización	Alineamiento	Tm	Elongación	Extensión Final
Temperatura	98°C	98° C	Gradiente (54-60 °C)	72° C	72°C
Tiempo	2 minutos	20 segundos	20 segundos		5 minutos
<i>MmCNIH1</i>				15 segundos	
<i>MmGLUT1</i>				45 segundos	

Gen	Secuencia Forward	Secuencia Reverse
<i>MmCNIH1</i> (435 pb)	<u>GTACAAAAAAGCAGGCTTCATGG</u> CGTTCACCTTTCGCG	<u>GTACAAGAAAGCTGGGTCCTA</u> AGAGCTCACCAGAACATAG
<i>MmGLUT1</i> (1479 pb)	<u>GTACAAAAAAGCAGGCTTCATGG</u> ATCCCAGCAGCAAGAAG	<u>GTACAAGAAAGCTGGGTCCAC</u> TTGGGAGTCCGCCCCCA

Tabla 5. Tabla de oligos para la primera reacción de PCR. Las secuencias subrayadas pertenecen a los sitios recombinación.

Posteriormente se realizó la segunda PCR para amplificar los sitios attb1 y attb2 con los oligos específicos, que nos servirán para la clonación de genes mediante el sistema Gateway.

Componente	Cantidad
Buffer 5X Phusion HF	2 μ L
dNTPs 10 mM	1 μ L
Oligo attb1 Forward 10 mM	1 μ L
Oligo attb2 Reverse 10 mM	1 μ L
ADNc	1 μ L
Taq Polimerasa(Phusion polymerase)	0.5 μ L
H ₂ O	Llevar a 50 μ L

Tabla 6. Componentes de la mezcla de reacción para la segunda PCR

La reacción se realizó en un Termociclador (Bio-Rad) bajo las siguientes condiciones:

x35 Ciclos					
Condiciones	Desnaturalización	Alineamiento	TM	Elongación	Extensión Final
Temperatura	98°C	98° C	56°C	72° C	72°C
Tiempo <i>MmCNIH1</i> <i>MmGLUT1</i>	2 minutos	20 segundos	20 segundos	15 segundos 45 segundos	5 minutos

Se resolvieron las muestras en un gel de agarosa al 1% y se cortaron los productos de PCR obtenidos del gel.

El producto de PCR de cada gen se purificó utilizando el kit Promega siguiendo las instrucciones del proveedor (**Apéndice C**) y se clonó de forma independiente dentro del vector pDONR 207 (**Fig. 9**) utilizando los componentes requeridos (**Tabla 7**) y se incubó a temperatura ambiente de 16 a 18 h.

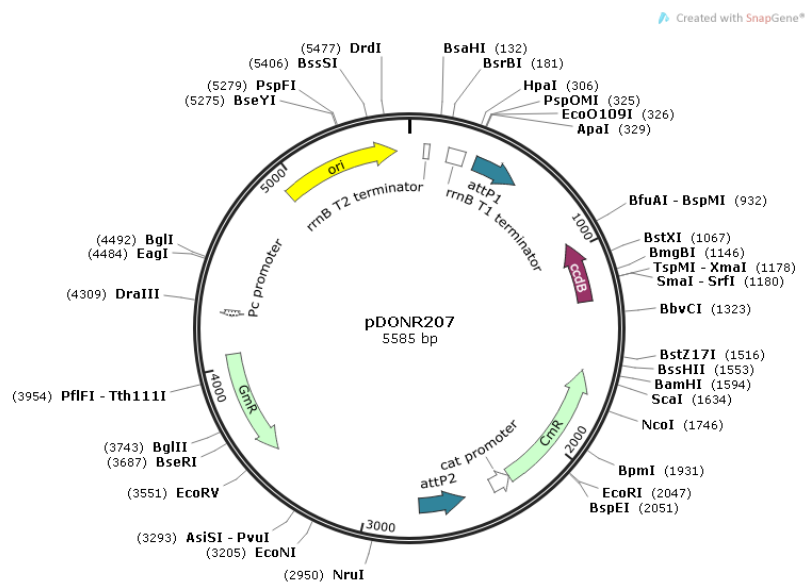


Figura 9: Mapa genético del Vector de entrada pDONR207

Componente	Cantidad
Producto de PCR purificado (<i>MmCNIH1</i> y <i>MmGLUT1</i>)	1 μ L - 2 μ L [\sim 150 ng]
Enzima BP clonasa (Invitrogen)	0.5 μ L
Vector pDONR 207	1 μ L [\sim 150 ng]
H ₂ O	Aforar a 4 μ L

Tabla 7. Tabla de componentes de reacción BP Clonasa

Posteriormente se realizó una transformación en la cepa DH5alfa de *E. coli* de acuerdo a las siguientes especificaciones:

Transformación por choque térmico en *Escherichia coli*

- Se agregó 4 µl de la construcción a la alícuota de 50 µl de células competentes (Preparadas con el protocolo de células quimiocompetentes, **Apéndice 4**).
- Se incubó durante 15 - 20 minutos en hielo (Construcción + células competentes)
- Se colocó durante 1 minuto la muestra a 42°C
- Se dejó en hielo durante 5 minutos
- Se añadieron 250 µl de medio LB (líquido) (cinco volúmenes de la alícuota de células competentes)
- Se crecieron las células durante 1 h a 37°C en agitación constante
- Se plaqueó de 100-200 µl (depende de la clonación) en medio LB sólido con el antibiótico (dependiendo del marcador de selección del vector).
- Se crecieron a 37°C durante 16 - 18 hrs

Las colonias que crecieron en los medios de selección usando gentamicina (50 µg/mL) se seleccionaron, y se inocularon en medio LB líquido con gentamicina, posteriormente se realizó una extracción de ADN plasmídico mediante el protocolo de lisis alcalina (**Apéndice E**), posteriormente se realizó un análisis de restricción usando la enzima PvuII (Invitrogen) con las especificaciones de la enzima (**Tabla 9**), y se incubó durante 1 h a 37°C, posteriormente se cargó en un gel de electroforesis para observar el patrón de digestión de las bandas y se conservaron aquellos que mostraron el patrón de restricción esperado.

Posteriormente se mandó a secuenciar a la unidad de secuenciación de la UNAM para verificar la presencia de los genes, los plásmidos que presentaban los genes se transfirieron dentro del vector pMetYC_GW (Cub) y pXN32 (Nub) (**Fig. 10**), mediante una reacción de recombinación usando los componentes de la Reacción LR Clonasa (**Tabla 8**), y se incubó a temperatura ambiente de 16 a 18 h.

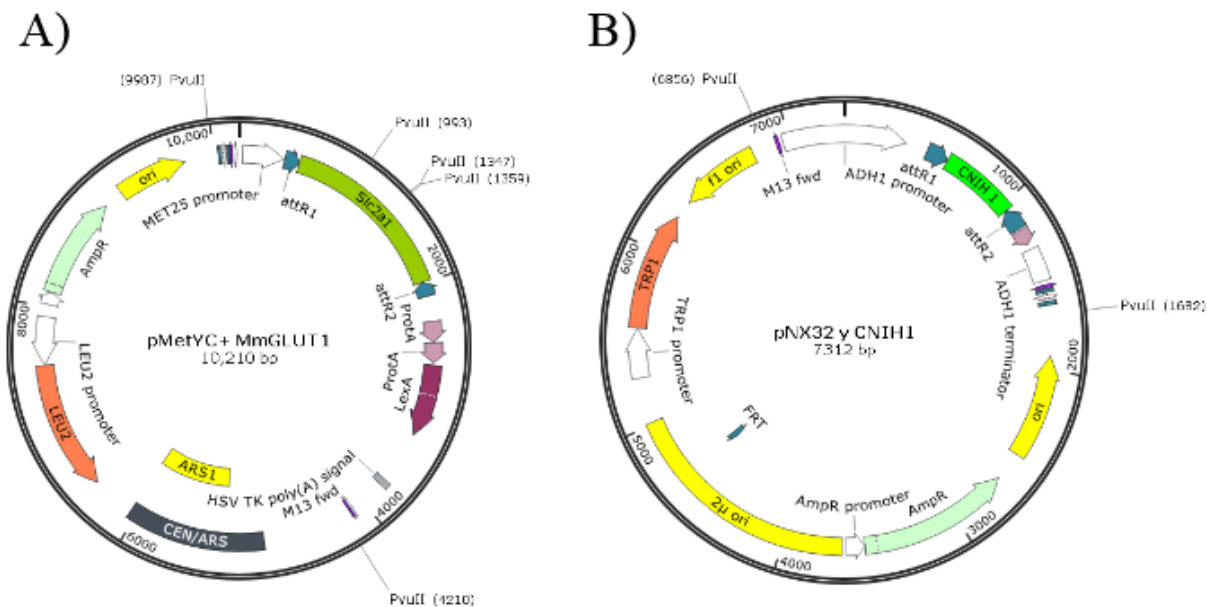


Figura 10: Mapa genético de los vectores de expresión
 A) pMetYC y B) pNX32

Componente	Cantidad
Construcción (vector + gen) (<i>MmCNIH1</i> y <i>MmGLUT1</i>)	1 μ L [~150 ng]
Enzima LR clonasa (Invitrogen)	1 μ L
Vector pMetYC_GW y pXN32	1 μ L [~ 150 ng]
H ₂ O	Aforar a 4 μ L

Tabla 8. Tabla de componentes de Reacción LR Clonasa

De las colonias que crecieron en los medios de selección usando Carbenicilina (100 μ g/mL), se realizó una extracción de ADN plasmídico para hacer un análisis de restricción usando la enzima PvuII (Invitrogen) con las especificaciones de la enzima (Tabla 9), y se incubó durante 1 h a 37°C, posteriormente se cargó en un gel de electroforesis para observar el patrón de digestión de las clonas, se conservaron las clonas positivas al patrón de restricción.

Componente	Cantidad
Construcción (vector + gen) (<i>MmCNIH1</i> y <i>MmGLUT1</i>)	~1000 ng
Buffer (Anza 10x)	2 μ L
Enzima PvuII (Invitrogen)	1 μ L
H ₂ O	Aforar a 20 μ L

Tabla 9. Tabla de componentes de restricción con enzima PvuII

7.2.5 Transformación en *S. cerevisiae*

Para expresar los genes de interés en *S. cerevisiae*, se transformaron los plásmido pMetYC_GW y pXN32 con los genes *MmGLUT1* y *MmCNIH1*, respectivamente mediante la transformación de las cepas de levadura THY.AP4 [*MATa ura3, leu2, lexA::LacZ::trp1 lexA::HIS3 lexA::ADE2*] y THY.AP5 [*MAT α URA3, leu2, trp1, his3 loxP::ADE2*], con los plásmidos respectivos. Las levaduras se transformarán con sus respectivos vectores mediante el método de Acetato de Litio (LiAc).

Preparación de células competentes de *S. cerevisiae*

1. Se estriaron las cepas de *S. cerevisiae* THY.AP4 y THY.AP5 en una caja con medio YPDA e incubaron a 30 °C por 48 horas. La caja puede almacenarse a 4°C hasta por 8 meses.
2. Se picaron las colonias de la cepas THY.AP4 y THY.AP5 y se pasaron a tubos de 16 x 150 mm con 3 mL de medio YPD. Se incubaron entre 12 y 16 h a 30 °C y 300 rpm.
3. Se inocularon 10 mL de medio YPDA 2x contenidos en un matraz de 125 mL y se incubó a 30 °C y 300 rpm durante 4 h con 100 μ L del cultivo proveniente del tubo.
4. En condiciones asépticas se cosechó el cultivo en un tubo cónico de 50 mL estéril. Se centrifugó a 8 000 rpm a temperatura ambiente durante 10 min.

5. Se resuspendieron las células en 10 mL de agua mQ estéril (a temperatura ambiente) y se pasaron a un microtubo de 1.5 mL estéril.
6. Se centrifugó a 8 000 rpm a temperatura ambiente durante 10 min.
7. Se resuspendieron las células en 1 mL de agua mQ estéril (a temperatura ambiente) y se pasaron a un microtubo de 1.5 mL estéril.
8. Se centrifugó por 1.5 min a temperatura ambiente y 7000 rpm. Se desechó el sobrenadante.
9. Se lavaron las células con 1 mL de acetato de litio (LiAc) 0.1 M.
10. Se resuspendieron las células en 100 μ L de LiAc y se almacenaron a 4 °C

Preparación de la mezcla de transformación

1. En un tubo cónico de 50 mL y condiciones asépticas se preparó la siguiente mezcla para cada reacción:

Componente	Cantidad
PEG 50%	220 μ L
LiAc 1 M	36 μ L
TE 10X	36 μ L
DMSO	50 μ L
ADN acarreador 2 mg/mL	15 - 40 μ L
Construcción (vector + gen) (<i>MmCNIH1</i> y <i>MmGLUT1</i>)	15 - 40 μ L
Volumen final	375 - 400 μ L

Se agregaron 40 ng de cada uno de los productos de la LR

El ADN acarreador es de doble cadena de testículos de salmón. Se desnaturalizó hirviéndolo por 10 min y pasándolo inmediatamente a hielo.

Esta solución se homogenizó mediante agitación en vortex.

Transformación mediante choque térmico

1. A la mezcla de transformación con las construcciones que van a clonarse se les agregó 100 μ L de las células que se habían almacenado a 4 °C.
2. Se homogeneizó la solución que contiene la mezcla de transformación y las células por inversión.
3. Se incubó a 42 °C durante una hora y media. Fue necesario homogeneizar la solución aproximadamente cada media hora, ya que las células se precipitan y esto afecta la eficiencia de transformación.
4. Después de hora y media de choque térmico se centrifugaron los tubos a temperatura ambiente, a 5 000 rpm durante 2 min. Se desechó el sobrenadante y los residuos de kits.
5. Se resuspendió la pastilla en 1 mL de YPD 2X y se incubó durante 2 h a 30 °C y 300 rpm.
6. Se sembró 200 μ L de las células en una caja con 10 mL de medio YNB con 20 g/L de glucosa, adenina, leucina, histidina y triptofano.
7. Se esparcieron con perlas de vidrio estériles y se incubaron a 30 °C.

10 μ L de células fueron sembradas en medio sólido N (THY.AP5) o C (THY.AP4).

Después de 3 días de crecimiento, las células fueron transferidas a medios líquidos N o C. Después de 3 días de crecimiento en medios líquidos, se tomaron alícuotas de estas células para hacer gliceroles y se almacenaron las células a -80°C para su posterior análisis.

7.2.6 Identificación de interacciones proteína/proteína con el sistema de la ubiquitina dividida (mbSUS, mating-based Split Ubiquitin System)

Con el objetivo de saber si el transportador *Mm*GLUT1 puede interactuar con *Mm*CNHI1, se decidió usar el sistema de la ubiquitina dividida en levadura, mbSUS, que permite reconocer la interacción entre dos proteínas de membrana o una proteína de membrana y una citosólica.

El uso de esta técnica es similar al sistema de dos híbridos, sin embargo, mbSUS fue desarrollado para detectar específicamente interacción entre proteínas de membrana o entre una proteína de membrana con una citosólica. El mbSUS se basa en el secuestro de un factor de transcripción en la membrana y su liberación debido a la acción de una proteasa como resultado de la interacción

de las dos mitades de la ubiquitina. Cuando el dominio N-terminal de la ubiquitina (Nub) se co-expresa con su parte C-terminal (Cub) se reconstituye la funcionalidad de la ubiquitina. Una mutante, NubG (la cual posee la mutación Ile13Gly) muestra una afinidad reducida (si se compara con el Nub silvestre) hacia el Cub, lo cual evita que se reconstituya la funcionalidad de la ubiquitina a menos que las proteínas a las cuales están fusionadas tanto el NubG como el Cub estén lo suficientemente próximas para reconstituir a la ubiquitina. El factor transcripcional artificial PLV (Protease A-LexA-VP16), está fusionado al C-terminal del Cub. Cuando dos proteínas interactúan, tanto el NubG como el Cub reconstituyen a la ubiquitina funcional, y una proteasa endógena específica para ubiquitina libera el factor de transcripción de la membrana hacia el citosol. Este factor de transcripción se difunde hacia el núcleo en donde activa la transcripción de los genes reporteros His3, Ade2 y LacZ. En este sistema es importante determinar si las fusiones al Cub pueden resultar en falsos negativos o falsos positivos. De tal manera que cuando las construcciones fusionadas al Cub se expresan de manera correcta y eficiente es de esperarse que se induzca la actividad de los genes reporteros cuando se co-expresa con el NubWT el cual posee una fuerte afinidad por el Cub. Para identificar los falsos positivos las construcciones fusionadas al Cub se co-expresan con el NubG soluble el cual no muestra afinidad hacia el Cub, de tal manera que si se llegasen a activar los genes reporteros, este fenómeno sería en la ausencia de una interacción verdadera, revelando un resultado falso positivo.

Medios de crecimiento para la levadura

Para el crecimiento de las levaduras se utilizaron los medios YPD (Extracto de levadura 10 g/L, Peptona 20 g/L, Glucosa 20 g/l y Agar 20 g/L) y SC (Sintetico completo; YNB 1.7 g/L, Sulfato de amonio 5 g/L, Glucosa 30 g/L y agar 20 g/L) y una mezcla de aminoácidos (arginina, isoleucina, lisina, fenilalanina, tirosina, valina, serina y treonina) esenciales para el crecimiento de la levaduras menos histidina, triptófano, uracilo, leucina, adenina y metionina.

Dependiendo de la selección, el medio SC se suplementó con 20 mg/L de hemisulfato de adenina, 20 mg/L de histidina-HCl, 500 µM de metionina, 20 mg/L de triptófano, 20 mg/L de

uracilo y/o 240 mg/L de leucina. Las especificaciones de los medios se muestran en el **Apéndice F**.

Las células que tienen el vector pMetYC_GW se crecieron en medios SC suplementados con triptófano, histidina, adenina y uracilo (medio Cub) y las células con el vector pNX32_GW se crecieron en medio SC suplementado con leucina, histidina y adenina (medio Nub).

Las células diploides crecieron en medios SC suplementados con adenina e histidina (medio DS), mientras que los medios para probar las interacciones fueron hechos con SC suplementado con 0 μ M metionina (medio IS-0) o 500 μ M metionina (IS-500).

Las fusiones dentro del vector Cub están bajo el control del promotor MET25 que es reprimido por metionina. De tal manera que un incremento en la metionina en los medios de selección disminuye los niveles de expresión y con ello se incrementa la astringencia del ensayo.

Ensayo de mbSUS experimental.

Se prepararon 100 ml de los medios requeridos para el ensayo mbSUS (**Apéndice F**). De las células de levadura transformadas se seleccionaron las cepas a través de un medio sólido Cub y Nub y se dejaron crecer 3 días a 30°C, posteriormente se crecieron las colonias en medio líquido Cub y Nub. Al día siguiente se plaqueo a través de una placa de 96 pozos, se llenaron los pozos con 200 μ L de los medios líquidos Cub y Nub. Posteriormente con el Replicador de placas se tomó una gota de los pozos y se plaqueó en cajas petri con medio Cub y Nub sólido y se dejaron crecer a 30 °C durante 3 días. Posteriormente de las cajas con células crecidas se agarraron muestras y se colocaron en pocillos de la caja de 96 pozos con 200 μ L de agua libre de nucleasas y se combinaron las muestras de los Cub con los Nub, se tomó una gota de los pocillos con el Replicador de placas y se colocó en el medio YPD que es el medio de apareamiento y se dejó crecer durante 1 día a 30°C. Se repitió el paso anterior tomando muestra de una de las colonias y la caja de 96 pozos, se colocaron las células en un medio Diploide que fue nuestro medio control. Se dejaron crecer 3 días a 30°C. Posteriormente se colocaron las células a los medios de interacción Met 500 y Met 0.

Ensayo de LACZ

Se prepara 100 ml de buffer Z.

Componente	Cantidad
Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O	10.68 g/L
NaH ₂ PO ₄ X H ₂ O	5.5 g/L
KCL	0.75 g/L
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0.246 g/L
Mantener un pH de 7.0	

Tabla 10. Componentes de Buffer Z

- Se agregó a un matraz 50 ml de Buffer Z y 0.25 g de agarosa, se calentó en pulsos de 30 s y de 10 s hasta que quedó homogéneo.
- Mientras se enfriaba un poco el Buffer Z, se pesaron 40 mg de Xgal en tubo eppendorf de 1.5 ml con 1 ml de N-N dimetil y se revolvió con pipeta.
- Se agregó 1 ml de SDS al 10% y 1 ml de Xgal al matraz del Buffer Z
- Se mezcló hasta quedar homogéneo y se colocó en una caja con medio Diploide del ensayo mbSUS.
- Finalmente para realizar la fotografía fue mediante un mapa de calor para visualizar la fuerza de interacción de las proteínas.

7.3 Metodología objetivo 3: Análisis de la expresión génica de *MmCNIH1* y *MmGLUT1* en el tejido del timo en un modelo de ratón diabético

7.3.1 Tratamiento estreptozotocina (STZ) en ratones

Con el objetivo de evaluar la expresión génica de *MmCNIH1* y *MmGLUT1* se decidió utilizar el modelo de ratón diabético, que utiliza a la droga Estreptozotocina lo que provoca la destrucción selectiva de la células Beta pancreáticas, haciendo que el ratón contraiga diabetes mellitus tipo 2.

- Se tomó peso, peso de alimento y glucosa de los ratones sometidos al tratamiento.
- Posteriormente se inyectó STZ (Sigma-Aldrich Cat, S0130) por vía intraperitoneal en ratones machos C57BLJ / 6 de 8 semanas de edad a 50 mg / kg durante cinco días consecutivos siguiendo el modelo de dosis baja de diabetes inducida por STZ (**Apéndice A**).
- A un subconjunto de ratones machos de 8 semanas se les inyectó un buffer de citrato enfriado con hielo (pH 4.5) como muestras control.
- Después de la última inyección de STZ, las condiciones de salud se controlaron diariamente y los niveles de glucosa en sangre, peso y peso de alimento se midieron a los 7, 14 y 21 días después de la última inyección.
- Posteriormente se procedió a sacrificar al ratón mediante la dislocación cervical.
- Se realizó la extracción de tejidos, ARN y síntesis de ADNc de acuerdo a los protocolos antes mencionados.

7.3.2 PCR de punto final de los homólogos de CNIH en el tejido del Timo

Se realizó un PCR de los CNIHs con el objetivo de observar la expresión en el tejido del timo.

Se utilizaron los componentes de la Taq Polimerasa Jena (**Tabla 3**), se utilizó el Rplp0 como gen constitutivo, el ensayo se realizó utilizando los oligos mostrados en la **Tabla 11** y la mezcla de reacción para cada gen se muestra en la **Tabla 12**.

Gen	Secuencia Forward	Secuencia Reverse
CNIH1 (153 pb)	CGCGTTCTTCTGTGTCATGT	TCTGCATTCATGATGGTCGT
CNIH2 (157) pb)	GCGGACTGACTTCAAGAACC	TGCTGCACACAGAAACATCA
CNIH3 (201 pb)	AATCGCCTTTGACGAGCTAA	ACATTGAGTCCCAGGGTGAG
CNIH4 (170 pb)	ATGGAGGCGGTGGTGTTCCT	CAAGCATCAGCACAGTGACA
RPLP0 (160 pb)	CACTGGTCTAGGACCCGAGAA	AGGGGGAGATGTTTCAGCATGT

Tabla 11. Tabla de oligos para PCR en tiempo real

Componente	Cantidad
Buffer 10X con Mg	5 µL
dNTPs 10 mM	1 µL
Oligo Forward 10 mM	1 µL
Oligo Reverse 10 mM	1 µL
ADNc	1 µL
Taq Polimerasa(Jena Bioscience)	0.2 µL
H ₂ O	Llevar a 50 µL

Tabla 12. Componentes de la mezcla de reacción para PCR

La reacción se realizó en un Termociclador (Bio rad) bajo las siguientes condiciones:

Antes de los 35 ciclos se Desnaturaliza primeramente el ADN durante 2 minutos a 95°C

x35 Ciclos				
Condiciones	Desnaturalización	Alineamiento	Elongación	Elogación final
Temperatura	95°C	60° C	72° C	72°C
Tiempo	20 segundos	20 segundos	30 segundos	5 minutos

7.3.3 PCR en tiempo real de los homólogos de CNIH en el tejido del Timo.

La extracción de ARN total del tejido del timo se llevó a cabo con la técnicas de extracción de órganos linfoides y extracción de ARN mencionadas anteriormente (**Sección 7.2.1** y **Sección 7.2.2**) de los grupos de ratones tratados con la droga STZ, y el grupo control con el Buffer de citrato de sodio. Posteriormente el ARN total libre de ADN genómico se usó para realizar la transcripción reversa y así generar ADN complementario (ADNc) usando oligo dT (JenaBiosciences) mediante la técnica de síntesis de ADNc (**Sección 7.2.3**). El ADNc se usó como templado para llevar a cabo las reacciones de PCR en tiempo real cuantitativo. La amplificación

de ADNc se realizó a través de un master mix (**Tabla 13**) en un termociclador Step-One (Applied Biosystems). Los oligos utilizados son los mencionados en la **Tabla 11**.

Componente	Cantidad
SYBR Green (JenaBioscience) 0.5 μ M	10 μ L
ADNc	1 μ L
Oligo Forward 10 μ M	0.6 μ L
Oligo Reverse 10 μ M	0.6 μ L
H ₂ O	Llevar a 20 μ L

Tabla 13. Componentes de la mezcla de reacción para PCR en tiempo real

El programa de amplificación fue una desnaturalización inicial de 95°C durante 2 minutos posteriormente los 40 ciclos bajo estas condiciones:

x40 Ciclos				
Condiciones	Desnaturalización	Alineamiento	Elongación	Elogación final
Temperatura	95°C	60° C	72° C	72°C
Tiempo	15 segundos	20 segundos	30 segundos	5 minutos

El gen RPLP0 (subunidad P0 del tallo lateral de la proteína ribosómica) se usó como un gen de expresión endógena o control estándar para normalizar la expresión de los datos al gen de estudio.

8. RESULTADOS

8.1 Realizar un análisis filogenético de los homólogos de *MmCNIH* en metazoa

8.1.1 Árbol filogenético de Cornichon en el reino Metazoa

Con la finalidad de analizar la filogenia de Cornichon en el reino de los metazoarios, se recopilaron las secuencias de las especies más representativas dentro del reino metazoa, así como ortólogos de la proteína CNIH dentro de los reinos Fungi y Protozoo. La lista de especies se muestra en el **Apéndice G**. Se utilizaron como grupos basales a hongos y amebas, debido a la presencia de ERV14 una proteína ortóloga a Cornichon en hongos y en amebas como proteína putativa, para poder enraizar el árbol filogenético (**Fig. 11**). Debido a que no se recuperaban de manera correcta grupos ordenados, se agregaron un total de 61 especies. Las amebas son representadas de un color blanco y los hongos con color morado. Algunos grupos de organismos no están bien representados debido a que no se encontraron secuencias de cornichones en ellos, siendo más afectado el de Urodela, del cual solo se encontró una especie.

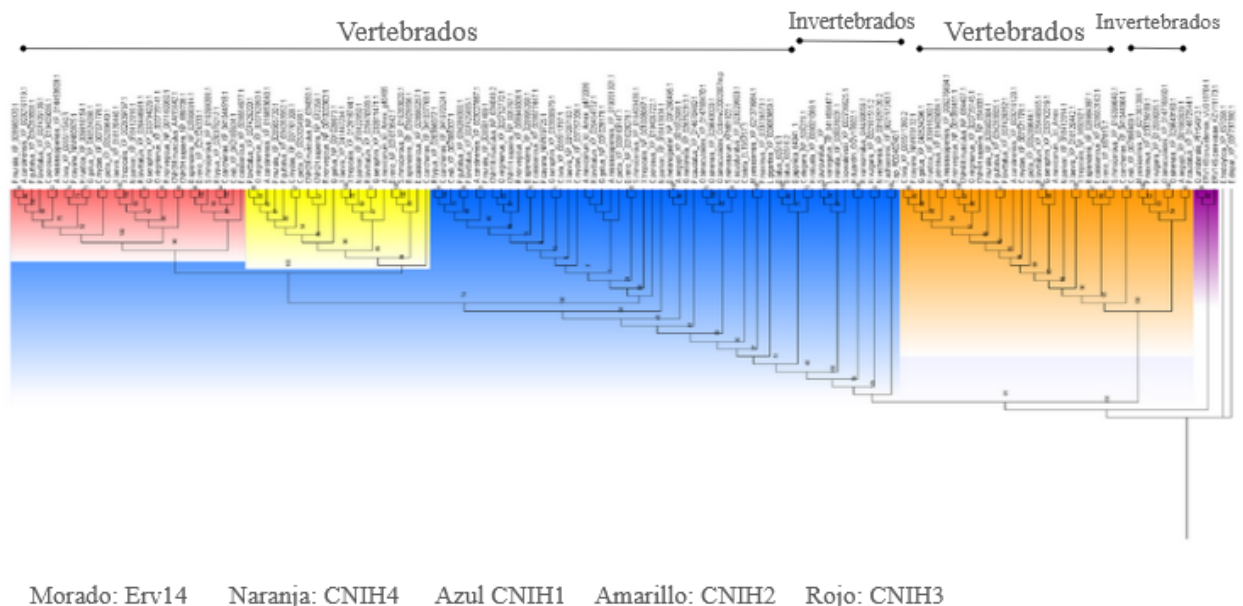


Figura 11: Árbol filogenético de CNIH en el dominio Metazoa

Se observa en el árbol que CNIH4 y CNIH1 comparten una ancestría en común de la cual divergen, ambos Cornichones están presentes tanto en grupos de vertebrados como invertebrados por lo cuál podemos decir que son los más ancestrales. Del CNIH1 divergen los CNIH2 y CNIH3, estos solo están presentes en grupos vertebrados.

8.2 Determinar la interacción proteína- proteína de MmCNIH1 y MmGLUT1 en levadura

8.2.1 Generación de las construcciones los genes *MmCNIH1* y *MmGLUT1*

Para realizar la clonación de los genes se utilizaron ratones sin ningún tipo de tratamiento, en la tercera semana se sacrificaron para la extracción del órgano (**Fig. 12**).

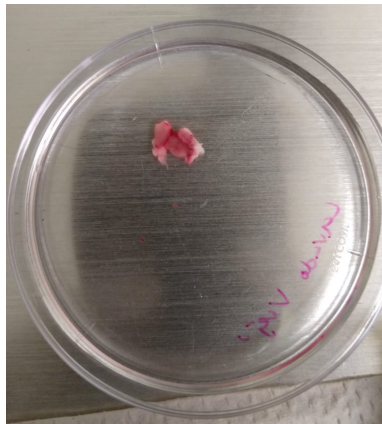


Figura 12: Extracción de tejidos
Se puede visualizar la extracción del timo.

8.2.2 Extracción de ARN de Timo e Hígado

Se obtuvieron muestras de tejido del timo e hígado de ratones no tratados. De los cuáles se extrajo ARN mediante el protocolo de extracción de ARN (**Sección 7.2.3**). Se visualizaron las dos bandas del ARN ribosomal, aproximadamente en la proporción deseada de 2:1 (28s vs18s) tanto de hígado como de timo (**Fig 13**).

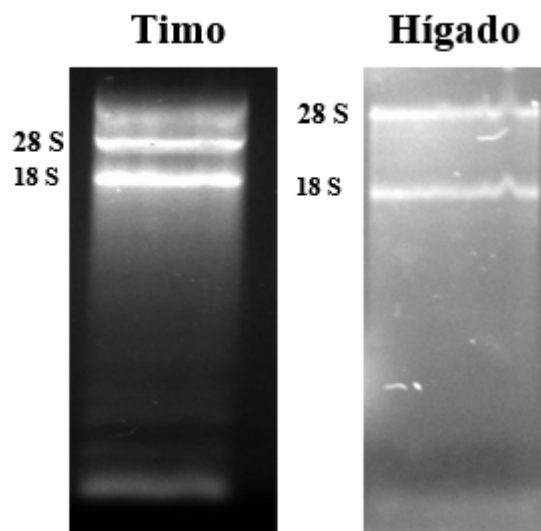


Figura 13: Extracción de ARN de Hígado y Timo

En un gel de agarosa al 1.5% se pueden visualizar en el Timo una primera banda que corresponde a ADN genómico, la segunda y tercer banda corresponden al ARN ribosomal 28s y 18s. En el Hígado podemos observar dos bandas correspondientes al ARN ribosomal 28 s y 18 s.

8.2.3 Amplificación y Clonación de *MmCNIH1* y *MmGLUT1*

A partir del ARN extraído se sintetizó ADNc de Hígado y Timo como se describe en la sección de materiales y métodos (7.2.3). Posteriormente utilizando el ADNc como templado se realizó una reacción de PCR para la amplificación de los genes de *MmCNIH1* y *MmGLUT1* descrito en la sección 7.2.5, utilizando los oligonucleótidos mostrados en la **tabla 5**. Mediante un gradiente de temperatura se determinó que la T_m fuera de 56°C para el gen *MmCNIH1* y un tiempo de elongación de 15 segundos; y las condiciones de amplificación para el gen *MmGLUT1* fue determinado de igual manera por un gradiente de temperatura y su T_m fue de 60°C y un tiempo de elongación de 45 segundos, el gen *MmCNIH1* fue amplificado del hígado debido a que presentaba un mayor nivel de expresión (**Tabla 1**). En la **Figura 14** se observan productos de PCR de los genes *MmCNIH1* y *MmGLUT1*, con un tamaño de 1479 y 435 pb, respectivamente.

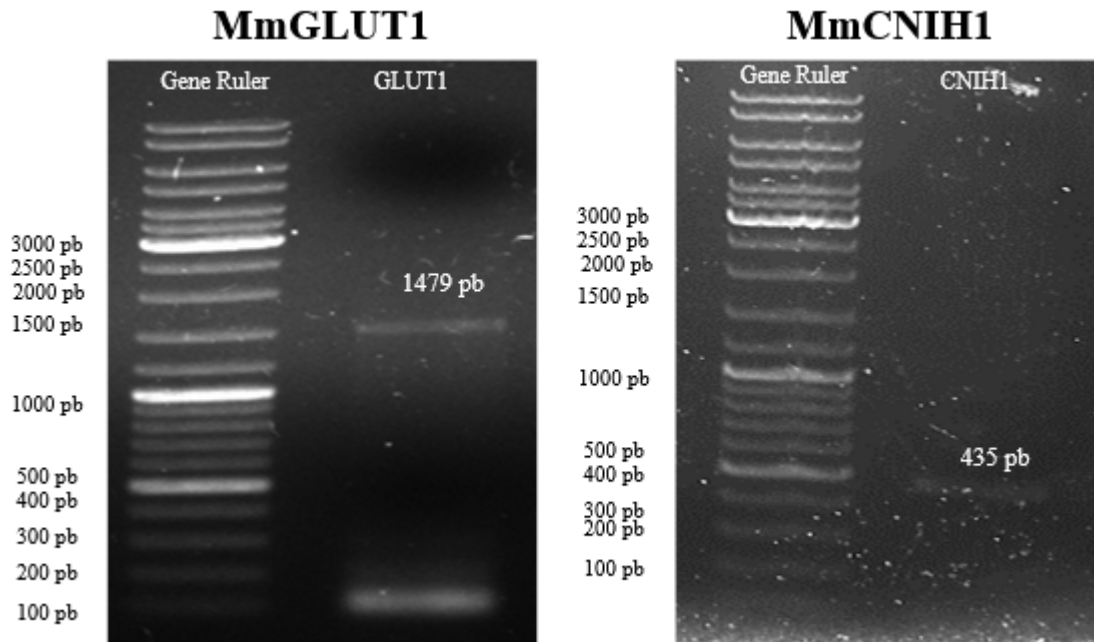
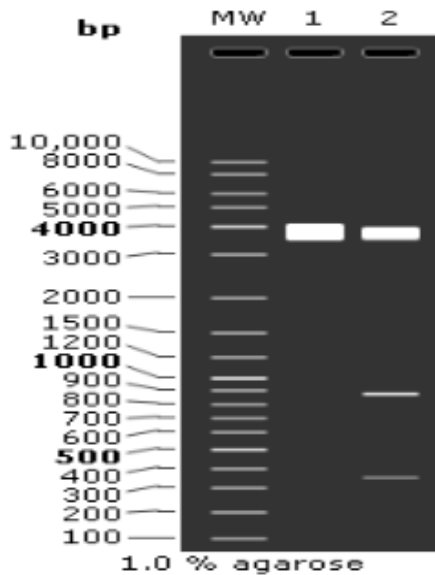


Figura 14 Amplificación de genes

Donde se muestra la amplificación de los genes de *MmGLUT1* y *MmCNIH1* del tejido del hígado.

Los productos de PCR purificados se re-amplificaron usando los oligos attb1 y attb2 descrito en la sección 7.2.5 . Posteriormente se utilizó el protocolo de clonación Gateway descrito en la sección de 7.2.5. Una vez clonados los genes en el vector de entrada (pDONR 207) se procedió a realizar un análisis de restricción *in silico* utilizando la enzima PvuII mediante el programa SnapGene, el cual permitió observar los patrones de restricción de las bandas de los pesos moleculares que corresponden a los genes en el vector de entrada, los patrones que construyó el programa fueron los siguientes: un fragmento de 4,071 pb que corresponde al gen *MmCNIH1* en el vector pDONR207 y tres fragmentos de 3878 pb, 871 pb y 354 pb que corresponden al gen *MmGLUT1* en el vector pDONR207 (**Fig. 15A**).

A)



B)

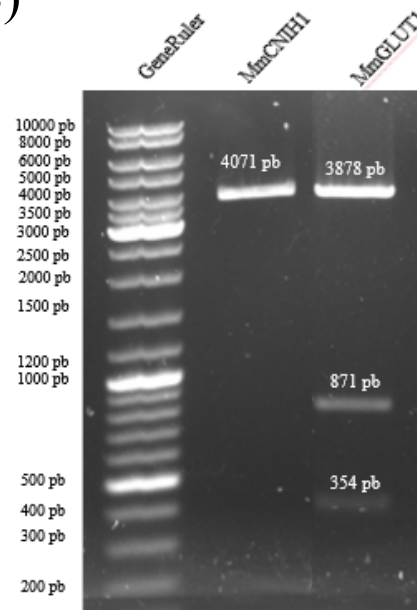


Figura 15: A) Análisis in silico de los sitios de corte de PvuII en la construcción de la BP y B) Restricción con Enzima PvuII construcciones hechas con pDONR207

En la imagen se muestra un análisis in silico con el programa SnapGene. El carril MW corresponde al Marcador de peso molecular. El carril 1 es la construcción de pDONR207 con *MmCNIH1*. El carril 2 es la construcción de pDONR207 con *MmGLUT1*. B) En la imagen se muestra el patrón de digestión de los genes.

Posteriormente con un análisis de restricción experimental utilizando la enzima PvuII, en la **Figura 15B** se observa el patrón de digestión de un fragmento de 4,071 pb que corresponde al gen *MmCNIH1* y los tres fragmentos de 3878 pb, 871 pb y 354 pb que corresponden al gen *MmGLUT1*, con lo cuál concluimos que los genes fueron clonados de manera correcta en el vector debido a que el patrón de digestión experimental corresponde con el *in silico*.

Se enviaron a secuenciar las construcciones con los genes clonados a la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología-UNAM. La unidad de secuenciación nos proporciona la secuencia de los genes a través de un electroferograma con el cual se realiza el alineamiento con la secuencia del gen (**Fig. 16; Fig. 17; Fig. 18**), utilizando el servidor EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>)

```

CNIH1
pDONR+ CNIH1 -----
GACTTATTTGACTGATAGTGACCTGTTCTGTTGCAACAAATGATGAGCAATGCTTTTTT

CNIH1
pDONR+ CNIH1 -----ATGGCGTTCACITTCGGCGCTTCTGC
ATAATGCCAACTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCATGGCGTTCACITTCGGCGCTTCTGC
*****

CNIH1
pDONR+ CNIH1 TATATGCTGGCGTGTCTGCTCACCGCCGCTCATCTTCTTCGCAITCGGCACATCATA
TATATGCTGGCGTGTCTGCTCACCGCCGCTCATCTTCTTCGCAITCGGCACATCATA
*****

CNIH1
pDONR+ CNIH1 GCATTTGATGAGCTGAAGCCGACTACAGAACCCTATAGACCAGTGAATACCCTGAAC
GCATTTGATGAGCTGAAGCCGACTACAGAACCCTATAGACCAGTGAATACCCTGAAC
*****

CNIH1
pDONR+ CNIH1 CCTCTTGCTTCCAGAGTACCTCATCCAGCGTTCCTCTGTGTCAITGTTCTCTGTGG
CCTCTTGCTTCCAGAGTACCTCATCCAGCGTTCCTCTGTGTCAITGTTCTCTGTGG
*****

CNIH1
pDONR+ CNIH1 GCAGAGTGGCTGACCTGGCCCTCAATATGCCCTTTTGGCAIACCATATTTGGAGGTAT
GCAGAGTGGCTGACCTGGCCCTCAATATGCCCTTTTGGCAIACCATATTTGGAGGTAT
*****

CNIH1
pDONR+ CNIH1 ATGAGTAGACCAAGTATGAGCGCCCTGGCCCTATGACCCGACGACCAATCAATGCA
ATGAGTAGACCAAGTATGAGCGCCCTGGCCCTATGACCCGACGACCAATCAATGCA
*****

CNIH1
pDONR+ CNIH1 GACATTTAGCCTACTGTGAGGAGGAGTGGTGCARACTGCTTTTTACCTTCTAGCG
GACATTTAGCCTACTGTGAGGAGGAGTGGTGCARACTGCTTTTTACCTTCTAGCG
*****

CNIH1
pDONR+ CNIH1 TTTTTTACTACCTATACGGCATGATCTATGTTCTGTTGAGCTCTTAG-----
TTTTTTTACTACCTATACGGCATGATCTATGTTCTGTTGAGCTCTTAGACCCAGCTTTC
*****

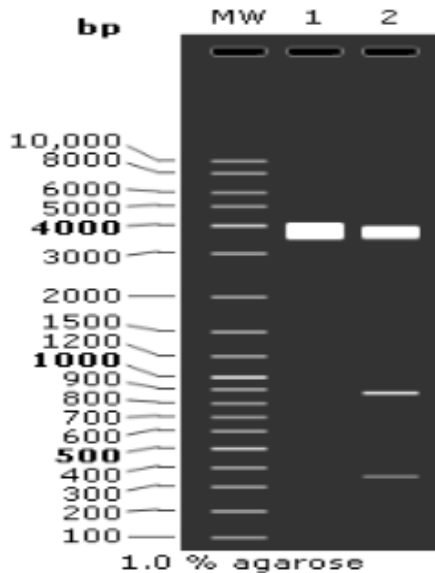
```

Figura 16: Alineamiento de *MmCNIH1* con electroferograma

MmGLUT1 pDONR207+MmGLUT1Fwd	-----ATGGATCCCAGCAGCAAGAGGTGAC TATAATGCCAACTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCATGGATCCCAGCAGCAAGAGGTGAC *****	MmGLUT1 pDONR207+MmGLUT1Fwd	GAGCCCCCGCTTCTGCTCATCAATGTAACGAGGAGAACCGGGCCAAAGTGTGCTGAA GAGCCCCCGCTTCTGCTCATCAATGTAACGAGGAGAACCGGGCCAAAGTGTGCTGAA *****
MmGLUT1 pDONR207+MmGLUT1Fwd	GGSCCGCTCATGTTGCTGTGGAGGAGCAGTGTCTCGATCAGTGCAGTTCGSCATATA GGSCCGCTCATGTTGCTGTGGAGGAGCAGTGTCTCGATCAGTGCAGTTCGSCATATA *****	MmGLUT1 pDONR207+MmGLUT1Fwd	GAGCTTCGAGGAGCAGCCGATGTGACCCGAGACCTCGAGGATGAAGAAGAGGGTGG GAGCTTCGAGGAGCAGCCGATGTGACCCGAGACCTCGAGGATGAAGAAGAGGGTGG *****
MmGLUT1 pDONR207+MmGLUT1Fwd	CAGTGGTGTATCAACGCCCCCAAGGTTATGAGGAGTCTACAAATCAAAATGAGAA CAGTGGTGTATCAACGCCCCCAAGGTTATGAGGAGTCTACAAATCAAAATGAGAA *****	MmGLUT1 pDONR207+MmGLUT1Fwd	GCAGATGATCGGGAGAGAAAGTCCACCACTTGGAGCTGTTCCGCTCACCAGCTACCG GCAGATGATCGGGAGAGAAAGTCCACCACTTGGAGCTGTTCCGCTCACCAGCTACCG *****
MmGLUT1 pDONR207+MmGLUT1Fwd	CCACCGCTACGAGAGCCATCCATCCACCACTCAACACGCTTTGGTCTCTCTCCGT CCACCGCTACGAGAGCCATCCATCCACCACTCAACACGCTTTGGTCTCTCTCCGT *****	MmGLUT1 pDONR207+MmGLUT1Fwd	CCAGCCCATCTCATCGCTGTGGTGTGACAGCTGCCAGCAGCTGTGGGTATCAATGC CCAGCCCATCTCATCGCTGTGGTGTGACAGCTGCCAGCAGCTGTGGGTATCAATGC *****
MmGLUT1 pDONR207+MmGLUT1Fwd	GGCCATCTCTCTGTCGGGGGCAATGTTCTCTCTGTGCGCCCTTTGTTAATCG GGCCATCTCTCTGTCGGGGGCAATGTTCTCTCTGTGCGCCCTTTGTTAATCG *****	MmGLUT1 pDONR207+MmGLUT1Fwd	TGTTTCTACTACTCAACGAGCATCTCGAGAAGGAGGTGTGACGACCTGTGTACGC TGTTTCTACTACTCAACGAGCATCTCGAGAAGGAGGTGTGACGACCTGTGTACGC *****
MmGLUT1 pDONR207+MmGLUT1Fwd	CTTTGGCAGGCGAAGTCCATGCTGATGATGAACTGTTGGCCCTTTGGCTGCTGTGCT CTTTGGCAGGCGAAGTCCATGCTGATGATGAACTGTTGGCCCTTTGGCTGCTGTGCT *****	MmGLUT1 pDONR207+MmGLUT1Fwd	CACATCGGCTCCGATGCTCAACAGGCGCTTCACTGTGGTGTGCTGTTGTTGAGA CACATCGGCTCCGATGCTCAACAGGCGCTTCACTGTGGTGTGCTGTTGTTGAGA *****
MmGLUT1 pDONR207+MmGLUT1Fwd	TATGGGCTTCTCCAAGTGGCAAGTCTTTGAGATGCTGATCCTGGGCGCTTCATCAI TATGGGCTTCTCCAAGTGGCAAGTCTTTGAGATGCTGATCCTGGGCGCTTCATCAI *****	MmGLUT1 pDONR207+MmGLUT1Fwd	GCAGCTGACGAGGAGCCCTGACCTCATGGCTGGCTGGCATGGAGGCTGTGCTGT GCAGCTGACGAGGAGCCCTGACCTCATGGCTGGCTGGCATGGAGGCTGTGCTGT *****
MmGLUT1 pDONR207+MmGLUT1Fwd	CGGTGTGACTGCGGCTGACTACTGGCTTTGGCCCATGATGAGGAGAGGTTGACCC CGGTGTGACTGCGGCTGACTACTGGCTTTGGCCCATGATGAGGAGAGGTTGACCC *****	MmGLUT1 pDONR207+MmGLUT1Fwd	GCTCATGACCATGCGCTGGCTTGTGGAACGCTGCTTGGATGTCATCTAGAGCAI GCTCATGACCATGCGCTGGCTTGTGGAACGCTGCTTGGATGTCATCTAGAGCAI *****
MmGLUT1 pDONR207+MmGLUT1Fwd	TACAGCTCTACGAGGAGCCATAGGCACACTGACAGCTGGGAATCGTGTGGCATCCT TACAGCTCTACGAGGAGCCATAGGCACACTGACAGCTGGGAATCGTGTGGCATCCT *****	MmGLUT1 pDONR207+MmGLUT1Fwd	CGTGGCACTTTGGCTTTGGCTTCTTTGAAGTAGCCCTGTCTTCAATCCATGGTT CGTGGCACTTTGGCTTTGGCTTCTTTGAAGTAGCCCTGTCTTCAATCCATGGTT *****
MmGLUT1 pDONR207+MmGLUT1Fwd	TATTGCCAGGTGTTGGCTTAGACTCCATCATGGGCAATGCAGACTTGTGGCTCTGCT TATTGCCAGGTGTTGGCTTAGACTCCATCATGGGCAATGCAGACTTGTGGCTCTGCT *****	MmGLUT1 pDONR207+MmGLUT1Fwd	CATTGTGGCGAGCTGTTGACGAGGAGGCGCCGCTCTGCTGCTATTGCTGTGGCTGCTT CATTGTGGCGAGCTGTTGACGAGGAGGCGCCGCTCTGCTGCTATTGCTGTGGCTGCTT *****

Figura 17: Alineamiento de secuencia Forward de *MmGLUT1* con electroferograma

A)



B)

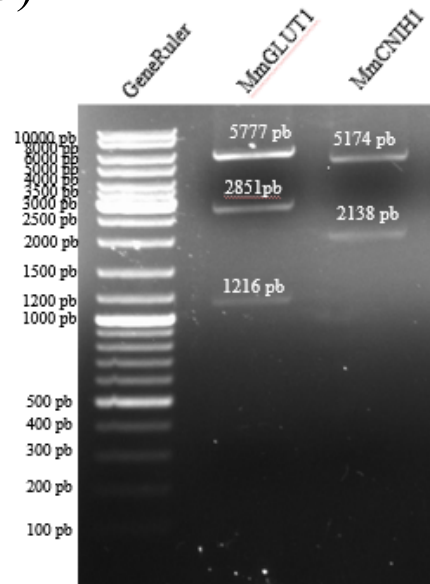


Figura 19: A) Análisis in silico de los sitios de corte de PvuII en la construcción de la LR y B) Restricción con Enzima PvuII construcciones hechas con pMetYC y pNX32

A) En la imagen se muestra un análisis in silico con el programa SnapGene. El carril MW corresponde al Marcador de peso molecular. El carril 1 es la construcción de pDONR 207 con *MmCNIH1*. El carril 2 es la construcción de pDONR 207 con *MmGLUT1*. B) En la imagen se presenta el patrón de digestión de los genes

Posteriormente utilizando la enzima PvuII, en la **figura 19B** se observa el patrón de digestión de dos fragmentos de 5174 pb y 2138 pb del gen *MmCNIH1* y los tres fragmentos de 5777 pb, 2851 pb y 1216 pb del gen *MmGLUT1* que corresponden al patrón teórico del SnapGene. Posteriormente se realizó la transformación en *S. cerevisiae* para llevar a cabo el ensayo mbSUS.

8.3.4 *MmGLUT1* y *MmCNIH1* mostraron poca fuerza de interacción.

En la **figura 20** se observó los dos ensayos de interacción realizados en *S. cerevisiae*. En la **figura 20A** se determinó la interacción entre *MmGLUT1* y *MmCNIH1*. La **figura 20B** es un control de experimento de dos proteínas que previamente se comprobó su interacción (Rosas-Santiago *et al.*, 2017). En nuestro ensayo de interacción se tiene el medio control

Diploide (DP). En este medio todas las levaduras mostraron un crecimiento debido a que los medios contienen los aminoácidos Adenina e Histidina.

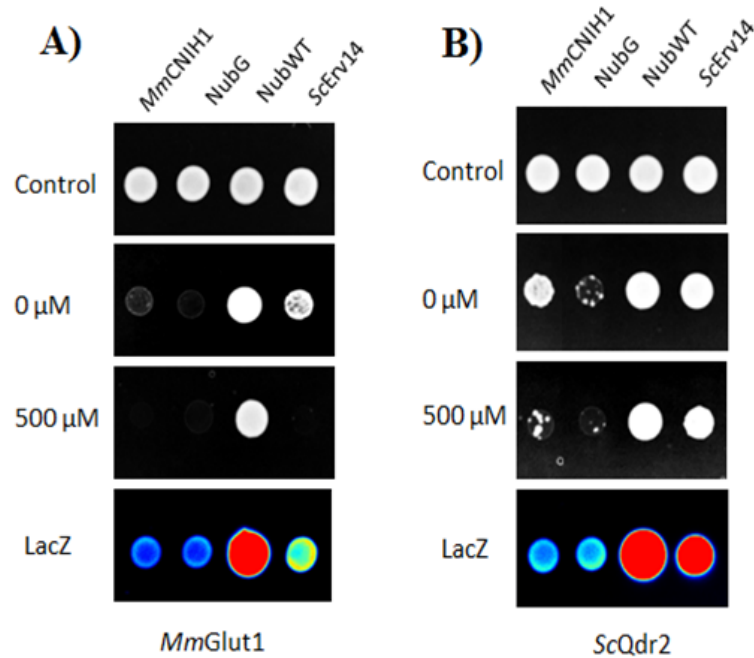


Figura 20: Ensayo mbSUS

Se realizaron dos ensayos mbSUS, en la figura A observamos la interacción del Cornichon 1 con el transportador de glucosa tipo *MmGLUT1*; en la figura B tenemos un experimento control, donde observamos la interacción de la proteína QDR2 de *Saccharomyces cerevisiae* ya ha sido probada con ERV14.

Posteriormente tenemos nuestros medios de interacción MET0 y MET500 los cuáles no tienen Adenina e Histidina, van a crecer solo aquellas levaduras que posean una interacción entre las proteínas, ya que el carboxilo terminal de la ubiquitina está unido al carboxilo terminal de la proteína *MmGLUT1* y a su vez tiene unido los factores de transcripción LexA y VP16; el amino terminal de la ubiquitina está unido al amino terminal de *MmCNIH1*, por lo que si las proteínas muestran una interacción cercana entre ambas, la ubiquitina se unirá provocando que una proteasa que liberara la ubiquitina la cual se desintegrará por el proteosoma liberando los factores de transcripción, uniéndose al promotor LexA, lo que permitirá la transcripción de los genes Ade2 e His3, permitiendo así sintetizar a la levadura por sí sola los aminoácidos Adenina e Histidina para que la levadura crezca en el medio. En el ensayo de interacción proteína-proteína en el medio MET0 se observó un ligero crecimiento entre las proteínas *MmGLUT1* y *MmCNIH1*, lo que representa una interacción débil entre ambas. La interacción con el control de falsos positivos (NUBG) no mostró un crecimiento tal como se esperaba, debido a que el amino

terminal de la ubiquitina está mutada, disminuyendo la afinidad por unirse con el carboxilo terminal y provocando que la ubiquitina no se reconstituya, por lo que los factores de transcripción no serán liberados. Con el control de falsos negativos (NUBWT) siempre se observará un crecimiento debido a que el extremo del amino terminal no está mutado, por lo que se unirá espontáneamente al carboxilo terminal de la ubiquitina liberando así los factores de transcripción, por lo que la levadura podrá crecer. En este ensayo también se determinó la interacción de *MmGLUT1* con *ScERV14* y se observó que en estas hay una interacción medianamente fuerte entre ambas. En el medio Met 500 que contiene el metionina solo se observa el crecimiento de NUBWT por ser el control de falsos negativos, en cambio con las otras proteínas no se muestra un crecimiento debido a que el vector pMetYC tiene una región promotora que es sensible a la presencia de metionina, la cual actúa como un represor de la transcripción de GLUT1 por lo que disminuirían las células que transcriban este gen haciendo que haya una disminución tanto de transcrito como de la proteína *MmGLUT1* por lo que este medio nos permite medir la fuerza de interacción de las proteínas, si esta interacción no es lo suficientemente fuerte no se verá un crecimiento en el medio, en la interacción de *MmGLUT1* y *MmCNIH1* no se observó un crecimiento al igual que la interacción de *MmGLUT1* y *ScERV14* debido a la represión de la transcripción. En los medios de falso positivo (NUBG) y falso negativo (NUBWT) se puede observar que funcionan de manera correcta debido a que lo visualizado en el medio de MET0 es lo esperado. El ensayo de LACZ nos permite observar el cambio de la coloración de las células de levadura a un color azul si hay una interacción fuerte de las proteínas debido a que en este ensayo depende de la codificación de la enzima β -galactosidasa y a su actividad sobre el X-Gal, este ensayo es más astringente por lo que solo si la interacción es muy fuerte se va producir la suficiente β -galactosidasa para cambiar la coloración del compuesto X-Gal, además con el mapa de calor las levaduras que presenten el cambio de coloración a azul se verán rojas y las que no presenten el cambio de coloración serán azules. En el ensayo se puede observar que la interacción de *MmGLUT1* y *MmCNIH1* no es tan fuerte para que se produzca suficiente β -galactosidasa y esta convierta todo el sustrato. Mientras que la interacción de *MmGLUT1* y *ScERV14* se ve de un nivel medio.

En el segundo ensayo, el cual se usó como control experimental se utilizó otra proteína de transporte llamada QDR2 de *S. cerevisiae*, la cual ya había sido probada su interacción con ERV14 para tener un control con el cuál comparar y saber que el experimento se realiza de manera correcta. (**Fig. 20**). En él podemos observar la interacción de ScQDR2 con *MmCNIH1* y *ScERV14*. *ScQDR2* y *MmCNIH1* presentan una interacción debil en conjunto de todos los medios por lo anterior mencionado. Mientras que *ScQDR2* y *ScERV14* tienen una interacción bastante fuerte.

Debido a los resultados obtenidos, podemos concluir que existe una débil interacción de *MmCNIH1* con *MmGLUT1* y que posiblemente *ScERV14* tiene una interacción con proteínas de transporte de azúcares.

8.3 Analizar la expresión génica de *MmCNIH1* y *MmGLUT1* en el tejido del timo en un modelo de ratón diabético

8.3.1 Establecimiento de un modelo de ratón diabético a través del uso de la estreptozotocina

Para estudiar la expresión génica de Cornichon en el tejido del Timo se estableció un modelo de ratón diabético. Se obtuvieron 2 grupos de ratones. En el grupo experimental que fue tratado con STZ tenemos una N=8 y en nuestro control que fue tratado con el buffer de citrato de sodio una N=5. Se realizó un ayuno en los ratones de 4 horas, antes de las inyecciones de Estreptozotocina (STZ) que provoca la destrucción selectiva de células β -pancreáticas provocando así una disminución de la producción de insulina y aumentando los niveles de glucosa en sangre. Las inyecciones fueron realizadas durante 5 días consecutivos. Posterior a esto se midió su glucosa, el peso de los ratones y el peso de su alimentación una vez a la semana durante 3 semanas. En la segunda semana se pudo observar que los ratones contrajeron la enfermedad de diabetes debido a la cantidad de orina que secretaban y por la medición de su glucosa. En las gráficas de consumo, peso y glucosa se puede observar el comportamiento de los valores de los ratones (**Fig. 21**).

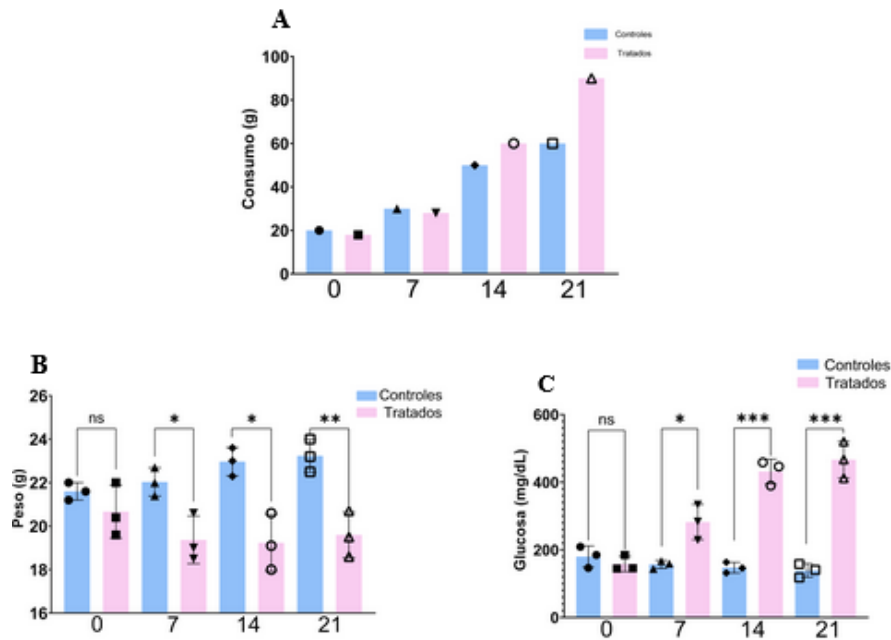


Figura 21: Tablas de consumo de alimento, peso y glucosa en ratones tratados

A) Tabla de consumo de alimento: los ratones se alimentaron de manera igual en todo lo que duró el experimento, sin embargo los ratones tratados consumieron más alimento a partir de 14 días que fueron tratados con el medicamento. B) Tabla de peso: el peso de los ratones tratados con STZ fue menor a los ratones que del grupo control. C) Tabla de glucosa: los ratones tratados con STZ después de 7 días su glucosa aumentó bastante, comparado con el grupo control. Ns= no significativo. * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$ y *** = $P < 0.001$

Podemos observar que el consumo de alimento de los dos grupos se conservó igual hasta el día 21 donde se mostró un consumo mayor por parte del grupo de ratones tratados a los controles. El peso de los ratones tratados comenzó a disminuir a partir de los 7 días y esta pérdida de peso se mantuvo hasta los 21 días. Los valores de glucosa tuvieron un cambio significativo en los ratones tratados a partir del día 7 donde la glucosa en sangre aumentó y a los 14 días este nivel de significancia aumentó y se mantuvo hasta los 21 días comparado al grupo control.

8.3.2 Amplificación de los cornichones en tejidos del timo con PCR punto final

Se realizó la amplificación de cada uno de los cornichones en el tejido del timo, mediante la utilización de los oligos para PCR en tiempo real (Tabla 11) de los Cornichones y RPLP0 para poder ver la presencia o ausencia de los genes (Fig. 22), se puede observar la presencia de *MmCNIH4* que amplifica 170 pb que eran las esperadas para estos oligos, de igual manera la presencia de RPLP0 que es nuestro gen constitutivo se observa que se amplifica en 160 pb. Las bandas observadas por debajo de las 100 pb son restos de oligos que están oligomerizados.

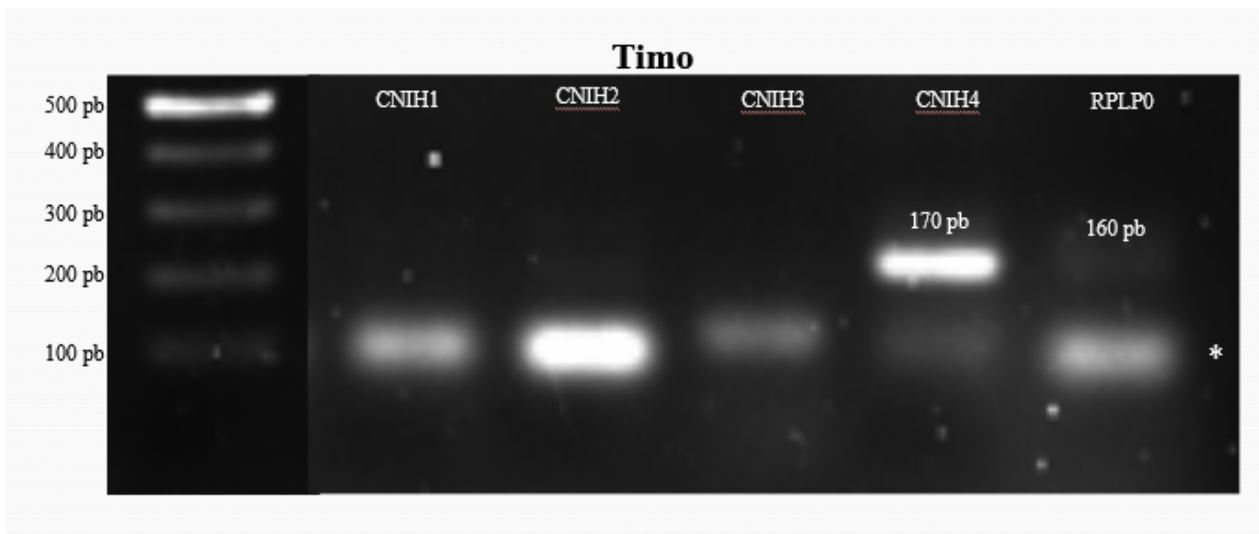


Figura 22: PCR punto final de los Cornichones

Expresión de los CNIHs y el gen constitutivo RPLP0 en el tejido del timo. * La línea de bandas marcadas con * son restos de oligos dimerizados

8.3.3 El tratamiento con estreptozotocina disminuye la expresión de CNIH2

Se busca identificar si la expresión génica en el tejido del timo se modula por la presencia de un alto contenido de glucosa en sangre. Para realizarlo, se planteó hacer estudios de la regulación de la expresión génica a través de ensayos de la cuantificación del mensajero por medio de PCR en tiempo real, se utilizó el modelo de ratón diabético para evaluar el posible cambio de la expresión de los homólogos de *MmCNIH* en el timo, utilizando ratones de 11 semanas debido que el tratamiento de STZ provoca muerte prematura en ratones más pequeños de edad.

Timo

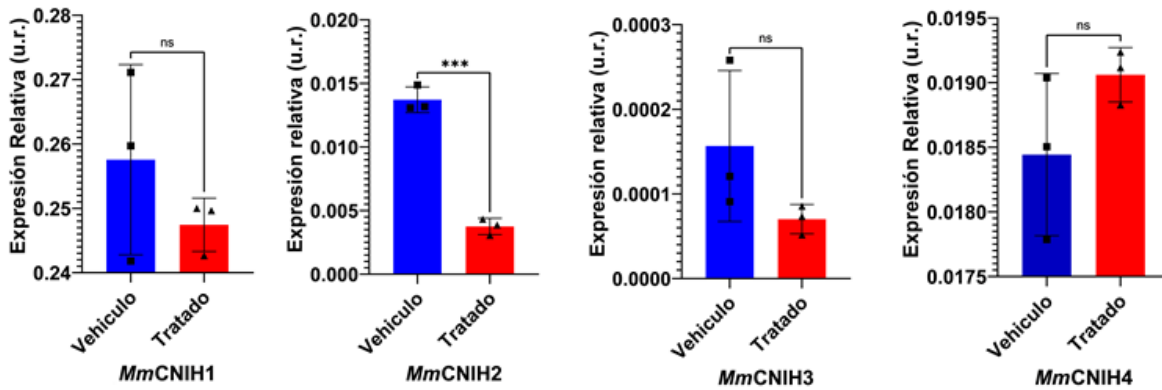


Figura 23: PCR en tiempo real del modelo de ratón diabético del gen CNIH en el tejido del Timo

Esta figura nos muestra la gráfica obtenida de los experimentos realizados de PCR en tiempo real, para saber la expresión del gen *MmCNIH* de los ratones tratados con STZ y del grupo vehículo, las gráficas muestran los niveles de expresión de los cuatro cornichones de ratón en condición de diabetes y del grupo vehículo que fue tratado solo con citrato de sodio, se utilizó a RPLP0 como nuestro gen endógeno. Los valores son los promedios \pm ES de 1 réplica técnica. Una prueba t-test de muestras no pareadas se usó para determinar la diferencia significativa entre las muestras con un valor de ns= no significativo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

Como gen endógeno se usó a RPLP0 (subunidad P0 del tallo lateral de la proteína ribosómica) para observar un posible cambio en la expresión génica de *MmCNIH* en los ratones que presentan una condición de diabetes con respecto a los que no. La metodología empleada para ver este cambio de la expresión génica fue el método $\Delta\Delta Ct$ (Livak & Schmittgen, 2001). Los resultados de la expresión génica de *MmCNIH* en el tejido del timo de ratones diabéticos mostraron que la expresión de *MmCNIH2* se reprime significativamente con respecto a los ratones sanos (**Fig. 23**). Mientras que para *MmCNIH1*, *MmCNIH3* y *MmCNIH4* no se observó un cambio significativo en cuanto a los niveles de transcritos. La mayor expresión relativa observada en el timo fue del *MmCNIH1*, seguido de *MmCNIH2* y *MmCNIH4*, mientras que la expresión más baja observada fue la del *MmCNIH3* bajo una condición de diabetes.

Por lo que se concluye que la regulación de la expresión de *MmCNIH1*, *MmCNIH3* y *MmCNIH4* en el timo no está sujeta a cambios por un aumento de glucosa, sin embargo la expresión de *MmCNIH2* se reprime en condiciones de diabetes por lo que podemos inferir que su expresión en el timo está regulada por el nivel de glucosa en ratón.

9. DISCUSIÓN

La proteína Cornichon fue identificada inicialmente como un componente esencial de las vesículas de transporte COPII, localizándose en RE y AG. Posteriormente se observó que el cornichon es necesario para el transporte de un gran número de proteínas transmembranales. Cornichon se identificó por primera vez en *D. melanogaster* donde recibió nombre de Dni (Bökel, et. al., 2005) y el ortólogo Erv14 en *S. cerevisiae* se describió inicialmente como receptor cargo de la proteína de membrana plasmática Axl2p (Pérez-Linero A.M., 2016); estudios posteriores han revelado que este receptor cargo es necesario para la exportación del RE de numerosas proteínas transmembranales cuyo destino es la ruta secretora o la membrana plasmática, tales como son los transportadores de la familia HXT los cuales son transportadores de hexosas en levadura (Castillon *et al.*, 2009; Pagant et al., 2015). Los transportadores de la familia HXT son muy posiblemente necesarios para que las células de levadura puedan crecer adecuadamente, ya que al salir de manera eficiente del RE gracias a la presencia de ERV14 pueden anclarse en la membrana plasmática donde pueden lograr translocar a la glucosa del medio extracelular hacia el interior de la célula (Martínez-Morales, 2021, datos no publicados). En 2005 Bokel y colaboradores realizaron un árbol filogenético de CNI que es el nombre que recibe CNIH en la mosca e incluyeron a ScERV14, sin embargo el árbol no aborda a más especies. En nuestro análisis filogenético se mostró una mayor inferencia filogenéticas debido al número de especies utilizadas y observamos que de ERV14 divergen CNIH1 y CNIH4, y de esto se infiere que son los más ancestrales entre los 4 homólogos presentes en el ratón y a partir del CNIH1 divergen CNIH2 y CNIH3, posiblemente debido a la evolución tisular de los organismos (Hardison, 2012). Durante la construcción del árbol filogenético el problema principal para recuperar clados monofiléticos, fue encontrar secuencias de organismos, principalmente del orden caudata, que pertenecen a la clase amphibia. De igual manera observamos que en CNIH1 los grupos no se recuperaron de forma correcta, se emparejaban de forma desordenada, muy posiblemente debido a que la presión de selección de esta proteína es tal que a pesar de que los organismos se encuentren en entornos tan diferentes, se mantiene. Todos estos homólogos se presume comparten la misma función entre ellos y Erv14, qué es ser un receptor de proteínas cargo y ayuda a que éstos se empaqueten en la vesículas COPII que forman parte en la vía

secretora temprana. Debido a lo mostrado en el ensayo de interacción, la proteína ScErv14 muestra interacción con el transportador de glucosa *Mm*GLUT1, y en los estudios realizados por Herzig y colaboradores en 2012 y de la tesis realizada en 2021 por Martínez-Morales respaldan que los transportadores de hexosas son cargos de los cornichones, además en este mismo ensayo pudimos comprobar que CNIH1 si tiene una interacción débil con *Mm*GLUT1. Se puede observar que CNIH1 y CNIH4 son los más cercanos filogenéticamente a ERV14 (**Fig.11**) esto sugiere la interacción con proteínas de transporte de glucosa. En este proyecto se estudió a la glándula del timo en ratón, ya que es un órgano insulino dependiente y necesita glucosa para que en él puedan diferenciarse y madurar los linfocitos T; en el mapa de expresión de ratón pudimos observar que hay una expresión de CNIH1 y CNIH2, y se decidió trabajar con el CNIH1 debido a los estudios realizados por Uktu en 1999 los que se muestran presencia de CNIH1 en los linfocitos T cuando estos son estimulados con un aloantígeno, los cuales requieren de la entrada de glucosa a través del transportador de glucosa GLUT1 (Macintyre *et. al.*, 2014). Por lo que se decidió evaluar la posible interacción entre ambas proteínas realizando un ensayo mbSUS. Se observó una interacción débil entre estas proteínas (**Fig. 20**), lo cual indica que posiblemente *Mm*CNIH1 no es el receptor cargo principal de GLUT1, sin embargo para poder descartar esta idea, sería recomendable realizar un ensayo de interacción entre la proteína *Mm*GLUT1 y *Mm*CNIH4. *Mm*CNIH4 a pesar de no presentar un nivel de expresión en el Timo de acuerdo al Atlas de expresión del ratón (<https://www.ebi.ac.uk/gxa/home>), se observó a través de un PCR en tiempo real (**Fig. 23**) la expresión relativa de los genes cornichon, *Mm*CNIH1 es el que mayor se expresó en el timo, seguido del *Mm*CNIH2 y *Mm*CNIH4, mientras que el *Mm*CNIH3 no mostró una expresión, comparando los datos con el Atlas de expresión del ratón, la expresión del *Mm*CNIH4 no se muestra en el atlas, a diferencia de nuestro experimento. En el Atlas de expresión de ratón se muestra una presencia media de *Mm*CNIH1 y una expresión baja de *Mm*CNIH2 en el timo, mientras que *Mm*CNIH3 y *Mm*CNIH4, sin embargo en el resultado del PCR en tiempo real observamos una expresión relativa de *Mm*CNIH1, *Mm*CNIH2 y *Mm*CNIH4 en el timo. Se estableció un modelo de ratón diabético mediante la droga STZ para poder analizar la expresión génica de los homólogos de CNIH bajo una condición de diabetes donde hay un aumento de la glucosa por la destrucción selectiva de las células β -pancreáticas, se estudiaron dos

grupos diferentes de ratones, un grupo control y un grupo tratado con STZ, el único cornichon que mostró una variación significativa en su expresión fue el CNIH2 (**Fig. 23**) donde el grupo tratado reprime su expresión significativamente en comparación con el grupo control, posiblemente debido a que esta proteína es dependiente de la insulina, por lo cual es afectada por una disminución de la insulina en el organismo. La expresión de *MmCNHI1* no es observada en el PCR punto final (**Fig. 22**), sin embargo en el PCR en tiempo real se registró una expresión relativa del transcrito (**Fig. 23**) debido a que las técnicas son diferentes, mientras que el PCR punto final nos permite observar una presencia o ausencia cualitativa del transcrito, el PCR en tiempo real nos permite cuantificar el nivel de expresión obtenido en cualquier momento de la amplificación mediante la señal de fluorescencia, además los kits utilizados para la síntesis de ADNc fueron diferentes, mientras que el kit para el PCR en tiempo real fue SuperSCRIPT IV que tiene una mayor nivel de sensibilidad y para el PCR punto final fue SCRIPT Jena que tiene una menor sensibilidad.

10. CONCLUSIÓN

La familia cornichon es una familia de proteínas de receptores cargo conservadas entre eucariotas, que permiten el empaquetamiento de proteínas para su transporte en el tráfico vesicular. El árbol filogenético nos permitió conocer las inferencias filogenéticas de los cornichones, así como conocer las relaciones que hay entre los organismos y cómo esta proteína se diversificó en ellos.

Se determinó que *MmCNIH1* y *MmGLUT1* tienen una interacción débil por medio del ensayo mbSUS.

Mediante el análisis de PCR en tiempo real del modelo de ratón diabético se determinó que la expresión del gen CNIH1 no está regulada por una alta concentración de glucosa en sangre. Sin embargo, el gen CNIH2 mostró una represión significativa en presencia de glucosa alta.

11. PERSPECTIVAS

Se necesitan realizar más estudios de expresión e interacción sobre el papel de CNIH en diferentes procesos de los organismos como lo son la respuesta inmunitaria, metabolismo o en procesos de enfermedad como son la diabetes. Es posible realizar un estudio para conocer dentro de los Linfocitos T el tipo de cargos que puede tener CNIH, y así poder profundizar del tipo de proteínas con las que puede tener interacción CNIH en metazoarios.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Antony B., Madden D., Hamamoto S., Orci L & Schekman R.. (2001). Dynamics of the COPII coat with GTP and stable analogues. *Nat. Cell Biol.* 3 531–537.
2. Aridor M., Fish N., Bannykh S., Weissman J., Roberts T. H., Lippincott-Schwartz J. & Balch W. E. (2001) The Sar1 GTPase coordinates biosynthetic cargoselection with endoplasmic reticulum export site assembly. *J. Cell Biol.* VOL 152. P. 213–229. doi: 10.1083/jcb.152.1.213
3. Appenzeller-Herzog C H. P. (2006). The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): in search of its identity and function. *J Cell Sci* 1 119 (11): 2173–2183. doi: <https://doi.org/10.1242/jcs.03019>.
4. Ashburner M., Thompson P., Roote J., Lasko P. F., Grau Y., el Messal M., Roth S., & Simpson P. (1990). The genetics of a small autosomal region of *Drosophila melanogaster* containing the structural gene for alcohol dehydrogenase. VII. Characterization of the region around the snail and cactus loci. *Genetics*, 126(3), 679–694.
5. Aviram N., Ast T., Costa E. A., Arakel E. C., Chuartzman S. G., Jan C. H., Haßdenteufel S., Dudek J., Jung M., Schorr S., Zimmermann R., Schwappach B., Weissman J. S. & Schuldiner M. (2016). The SND proteins constitute an alternative targeting route to the endoplasmic reticulum. *Letter. Nature* VOL 540. doi:10.1038/nature20169
6. Baines A. C. & Zhang B. (2007). Receptor-mediated protein transport in the early secretory pathway. Review. *Biochemical Sciences* VOL 32. No. 8
7. Bauer D. E., Harris M. H., Plas D. R., Lum J. J., Hammerman P. S., Rathmell J. C., Riley J. L. & Thompson C. B. (2004). Cytokine stimulation of aerobic glycolysis in hematopoietic cells exceeds proliferative demand. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(11), 1303–1305. <https://doi.org/10.1096/fj.03-1001fje>
8. Bequer, L., Gómez, T., Molina, J. L., Artiles, D., Bermúdez, R. & Clapés, S. (2016). Acción de la estreptozotocina en un modelo experimental de inducción neonatal de la diabetes. *Biomedica.* VOL 36. doi:<http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2686>
9. Bedoya F.J, Solano F. & Lucas M. (1996). N-monomethyl-arginine and nicotinamide prevent streptozotocin-induced double strand dna break formation in pancreatic rat islets. *experientia* 52: 344-347
10. Belden W. J. & Barlowe C. (1996). Erv25p, a component of COPII-coated vesicles, forms a complex with Emp24p that is required for efficient endoplasmic reticulum to Golgi

transport. *The Journal of biological chemistry*, 271(43), 26939–26946.
<https://doi.org/10.1074/jbc.271.43.26939>

11. Belden W.J. & Barlowe C. (2001). Role of Erv29p in collecting soluble secretory proteins into ER-derived transport vesicles, *Science* 294. 1528–1531.

12. Bi X., Corpina R.A. & Goldberg J. (2002) Structure of the Sec23/24-Sar1 pre-budding complex of the COPII vesicle coat. *Nature*: VOL 419. P.271–277.

13. Bökel C., Dass S., Wilsch-Bräuninger M. & Roth S. (2005). Drosophila Cornichon acts as cargo receptor for ER export of the TGF-like growth factor Gurken. *Development* 133. P: 459-470 doi:10.1242/dev.02219

14. Brandizzi F. (2017). Transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi in plants: Where are we now?. Elsevier. doi:10.1016/j.semcd.2017.06.024.

15. Brandizzi F. & Barlowe C. (2013). Organization of the ER–Golgi interface for membrane traffic control. *NATURE REVIEWS*.VOL 14 P. 382-392.

16. Cao Y., Rathmell J. C., & Macintyre A. N. (2014). Metabolic reprogramming towards aerobic glycolysis correlates with greater proliferative ability and resistance to metabolic inhibition in CD8 versus CD4 T cells. *PloS one*, 9(8), e104104.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104104>

17. Castillon G. A., Watanabe R., Taylor M., Schwabe T. M. & Riezman H. (2009). Concentration of GPI anchored proteins upon ER exit in yeast. *Traffic* 10: 186-200.

18. Castrejón V., Carbó R. & Martínez M. (2007). Mecanismos moleculares que intervienen en el transporte de la glucosa. *REB* 26. P. 49-57

19. Crabtree G.R. (1989).Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation.*Science*, 243. P. 355-361

20. D'Arcangelo J.G., Stahmer K.R., & Miller, E.A. (2013). Vesicle-mediated export from the ER: COPII coat function and regulation. *Biochimica et biophysica acta*, 1833(11), 2464–2472.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.02.003>

21. Dancourt J. & Barlowe C. (2010). Protein sorting receptors in the early secretory pathway. *Annual review of biochemistry*, 79, 777–802.
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061608-091319>

22. Fox C., Hammerman P. & Thompson C. (2005). Fuel feeds function: energy metabolism and the T-cell response. *Nat Rev Immunol* **5**, 844–852. <https://doi.org/10.1038/nri1710>
23. Frauwirth K. A., Riley J. L., Harris M. H., Parry R. V., Rathmell J. C., Plas D. R., Elstrom R. L., June, C. H. & Thompson, C. B. (2002). The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism. *Immunity*, *16*(6), 769–777. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(02\)00323-0](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(02)00323-0)
24. Haley, P. J. (2003). Species differences in the structure and function of the immune system. *Toxicology* *188*, 49–71.
25. Hardison, R. C. (2012). Evolution of hemoglobin and its genes. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, *2*(12), a011627. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011627>
26. Heller B., Burkle A., Radons J., Fengler E., Jalowy A., Muller M., Burkart V. & Kolb H. (1994). Analysis of oxygen radical toxicity in pancreatic islets at the single cell level. *biol chem hoppe-seyler* *375*: 597-602, 1994
27. Herzig Y., Sharpe H.J. , Elbaz Y., Munro S. & Schuldiner M. (2012). A Systematic Approach to Pair Secretory Cargo Receptors with Their Cargo Suggests a Mechanism for Cargo Selection by Erv14. *PLoS Biol* VOL 10. doi:10.1371/journal.pbio.1001329
28. Hughes H., Budnik A., Schmidt K., Palmer K.J., Mantell J., Noakes C., Johnson A., Carter D.A., Verkade P., Watson P. & Stephens D.J. (2009). Organisation of human ER-exit sites: requirements for the localisation of Sec16 to transitional ER. *J Cell Sci.* *122*:2924–2934.
29. Hwang S.Y., Oh B., Zhang Z., Miller W., Solter D. & Knowles B.B. (1999). The mouse cornichon gene family. *Dev Genes Evol* VOL 209. P. 120-125
30. Jones R. G., & Thompson C. B. (2007). Revving the engine: signal transduction fuels T cell activation. *Immunity*, *27*(2), 173–178. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.07.008>
31. June C.H. (1991). Signal transduction in T cells. *Current Opinion in Immunology*, VOL 3. P 287-293. DOI: [https://doi.org/10.1016/0952-7915\(91\)90026-W](https://doi.org/10.1016/0952-7915(91)90026-W).
32. Krönkle .D., Fehsel K., Sommer A. & Rodriguez M.L. (1995). Kolb-bachofen v: nitric oxide generation during cellular metabolization of the diabetogenic n-methyl-n-nitroso-urea streptozotocin contributes to islet cell dna damage. *biol chem hoppe-seyler* *376*: 179-185
33. Li J., Fuchs S., Zhang J., Wellford S., Schuldiner M. & Wang X. (2016). An unrecognized function for COPII components in recruiting the viral replication protein BMV 1a to the perinuclear ER. *Journal of Cell Science*.VOL 129. P. 3597-3608 doi:10.1242/jcs.190082

34. Li J. (2017). Cornichon Proteins: Unexpected Roles in Plant Pathogen Infection, ER Morphology Maintenance and Pollen Development. Doctoral thesis.
35. Livak K. J., & Schmittgen T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* (San Diego, Calif.), 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
36. Pérez-Linero A.M. (2016). Papel de los receptores de carga en la organización funcional de la ruta secretora temprana (Doctoral dissertation, Universidad de Sevilla).
37. Machado-Olano K.T., Cárdenas-Rodríguez A.E. & Navarro-López E. (2019). Transportadores de glucosa: características genéticas, moleculares y fisiopatológicas (Revisión). *Acta Médica del Centro VOL 14. No 4 . P. 585 y 589*
38. Macintyre A.N., Gerriets V.A., Nichols A.G., Michalek R.D., Rudolph M.C., Deoliveira D., Anderson S.M., Abel E. D., Chen B.J., Hale L.P. & Rathmell J.C. (2014). The glucose transporter Glut1 is selectively essential for CD4 T cell activation and effector function. *Cell Metabolism VOL 20. P. 61-72. doi: 10.1016/j.cmet.2014.05.004.*
39. Martínez-Morales L. C. (Datos no publicados). ERV14 regula la captura de glucosa a través de su asociación con los transportadores de hexosas HXT3 Y HXT5. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Instituto de Biotecnología de la UNAM.
40. Matsuoka K., Schekman R., Orci L. & Heuser J.E. (2001) Surface structure of the COPII-coated vesicle, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 13705–13709.
41. McMahon C., Studer S. M., Clendinen C., Dann G. P., Jeffrey P. D., & Hughson F. M. (2012). The structure of Sec12 implicates potassium ion coordination in Sar1 activation. *The Journal of biological chemistry*, 287(52), 43599–43606. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.420141>
42. Miller E., Antony B., Hamamoto S. & Schekman R.. (2002) Cargo selection into COPII vesicles is driven by the Sec24p subunit. *EMBO J. VOL 21. P. 6105–6113*
43. Morgan N.G., Cable H.C., Newcombe N.R. & Williams G.T. (1994). Treatment of cultured pancreatic b-cells with streptozotocin induces cell death by apoptosis. *biosci rep* 14: 243-250
44. Mueckler M. & Thorens B. (2013). The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Molecular aspects of medicine*, 34(2-3), 121–138. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.001>

45. Nukatsuka M., Yoshimura Y., Nishida M. & Kawada J. (1990). Allopurinol protects pancreatic beta cells from the cytotoxic effect of streptozotocin: in vitro study. *J Pharmacobiodyn* 13: 259-262
46. Palmer C.S., Ostrowski M., Balderson B., Christian N. & Crowe S.M. (2015). Glucose Metabolism Regulates T Cell Activation, Differentiation, and Functions. *Frontiers in Immunology*. VOL 6. Doi: 10.3389/fimmu.2015.00001
47. Pearse G. (2006). Normal structure, function and histology of the thymus. *Toxicologic pathology*, 34(5), 504–514. <https://doi.org/10.1080/01926230600865549>
48. Salazar-Torres L. & Ávila-Gamboa D.(2014).Perinatal Immunology (REVIEW). *FEMINA* VOL 42. No. 4. P. 185-186
49. Pagant S., Wu A., Edwards S., Diehl F., & Miller E. A. (2015). Sec24 is a coincidence detector that simultaneously binds two signals to drive ER export. *Current biology*: CB 25: 403-412.
50. Stagg S. M., LaPointe P., Razvi A., Gürkan C., Potter C.S., Carragher B. & Balch W.E. (2008). Structural basis for cargo regulation of COPII coat assembly. *Cell*, 134(3), 474–484. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.024>
51. Stagg S. M., Gürkan C., Fowler D. M., LaPointe P., Foss T. R., Potter C. S., Carragher B. & Balch W. E. (2006) Structure of the Sec13/31 COPII coat cage, *Nature* 439 234–238.
52. Stanirowski P.J., Szukiewicz D., Pyzlak M., Abdalla N., Sawicki W. & Cendrowski K. (2017). Impact of pre-gestational and gestational diabetes mellitus on the expression of glucose transporters GLUT-1, GLUT-4 and GLUT-9 in human term placenta. *Endocrine*, 55(3), 799–808. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12020-016-1202-4>
53. Takasu N, Komiya I., Asawa T., Nagasawa Y. & Yamada T. (1991). Streptozotocin- and alloxan-induced h₂O₂ generation and dna fragmentation in pancreatic islets. h₂O₂ as mediator for dna fragmentation. *diabetes* 40: 1141-1145
54. Utku N., Bulwin G., Beinke S., Heinemann T., Beato F., Randall J., Schnieders B., Sandhoff K., Volk H., Milford E. & Gullans, S. (1999). The human homolog of Drosophila cornichon protein is differentially expressed in alloactivated T-cells. *Molecular Cell Research*, VOL. 1449. P. 203-210. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0167-4889\(99\)00026-9](https://doi.org/10.1016/S0167-4889(99)00026-9)
55. Wang R., Dillon C. P., Shi L. Z., Milasta S., Carter R., Finkelstein D., McCormick L. L., Fitzgerald P., Chi H., Munger J. & Green D. R. (2011). The transcription factor Myc controls

metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation. *Immunity*, 35(6), 871–882. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.09.021>

56. Watson P., Townley A.K., Koka P., Palmer K.J. & Stephens D.J. (2006). Sec16 defines endoplasmic reticulum exit sites and is required for secretory cargo export in mammalian cells. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 7:1678–1687. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

57. Wieman H. L., Wofford J. A. & Rathmell J. C. (2007). Cytokine stimulation promotes glucose uptake via phosphatidylinositol-3 kinase/Akt regulation of Glut1 activity and trafficking. *Molecular biology of the cell*, 18(4), 1437–1446. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-07-0593>

58. Wofford J. A., Wieman H. L., Jacobs S. R., Zhao Y. & Rathmell J. C. (2008). IL-7 promotes Glut1 trafficking and glucose uptake via STAT5-mediated activation of Akt to support T-cell survival. *Blood*, 111(4), 2101–2111. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-06-096297>

59. Yan F., Mo X., Liu J., Ye S., Zeng X. & Chen D. (2017). Thymic role in T cell regulation and molecular mechanisms underlying cytokine modulation and stress signaling (Review). *Molecular Medicine Reports* VOL 16. P. 7175-7184. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7525>

60. Yorimitsu T. & Sato K. (2012). Insights into structural and regulatory roles of Sec16 in COPII vesicle formation at ER exit sites. *Molecular biology of the cell*, 23(15), 2930–2942. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-05-0356>

13. APÉNDICE

Preparación de reactivos para proceso de inyección con STZ:

Tampón de citrato de sodio

Reactivos y materiales:

Reactivo / Material	cantidad requerida	Vendedor	Número de inventario
Citrato de Na (grado enzimático)	1,47 g por 50 ml	Fisher Scientific	# BP 327-1
Agua desionizada (ddH ₂ O)	50 ml		
medidor de pH			

Procedimiento:

- Disolver 1,47 g de citrato de sodio en 50 ml de ddH₂O
- Pruebe el pH con un medidor de pH, ajuste el tampón a 4,5 pH con una solución de citrato de sodio monohidrato si es necesario.
- El tampón debe renovarse con cada grupo de inyecciones.
- Coloque la cantidad adecuada de tampón en un tubo cónico estéril.

Estreptozotocina (STZ)

Reactivos y materiales:

Reactivo / Material	cantidad requerida	Vendedor	Número de inventario
Estreptozotocina		Sigma	N.º S-0130
Tubo Eppendorf			
Papel de aluminio			

Procedimiento:

- Concentración: 7,5 mg / ml
- STZ debe almacenarse a -20 C para evitar la desecación.

- Pese la cantidad adecuada de STZ para que su concentración final en el tampón de citrato de sodio sea de 7,5 mg / ml y colóquela en un tubo Eppendorf; cubrir con papel de aluminio (sensible a la luz).

Solución de citrato de sodio STZ

Reactivos y materiales:

Reactivo / Material	cantidad requerida	Vendedor	Número de inventario
Tampón de citrato de sodio desde arriba			
STZ pesado desde arriba			
Jeringa / aguja de calibre 23 de 3 ml			
Vial estéril vacío			

Procedimiento:

- Concentración: 7,5 mg / ml Posología: 50 mg / kg ratón
- No mezcle STZ en tampón hasta que esté listo para las inyecciones; el fármaco se degenera en 15-20 minutos en solución.
- Vierta el contenido del tubo Eppendorf (STZ) en el (tampón) cónico.
- Mezclar bien
- aspire la solución con una jeringa / aguja de calibre 23 de 3 ml (puede ser necesario repetir esto varias veces dependiendo de la cantidad de solución)
- Inyectar el contenido en el vial estéril vacío.
- El vial contiene una solución para inyectar a los ratones.

A. Preparación del gel de agarosa

El porcentaje del gel de agarosa depende del tamaño de la banda que se desea observar. Para bandas de tamaño pequeño (menos de 500 pb) se van a realizar geles de porcentaje entre 2 y 3%. La agarosa se diluye en TAE 1X calentándolo para que se solubiliza. La cantidad de agarosa que se requiere depende del porcentaje del gel sobre el volumen total (Gel de 1%: 0.2 g de agarosa/20 mL de buffer).

Preparación de TAE 50x Para 1 L:

Se mezclará 242 g de Tris-base, 18.61 g de EDTA disódico, 57.1 mL de ácido acético glacial y se llevará a 1 L con agua destilada.

B. Protocolo para purificación de gel

Purificación de gel o producto

A. Disolver gel

- 1.- Después de la electroforesis, se corta la banda de ADN del gel y se coloca en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se pesa.
- 2.- Se añade 10 μ l de la solución de unión a la membrana por cada 10 mg del peso de la banda cortada. Se vortexea e incuba entre 50 - 65 °C hasta que el gel esté completamente disuelto

B. Proceso de amplificación de PCR (Productos)

- 1.- Añadir un volumen igual de solución de unión a la membrana a la amplificación de PCR.

Unión de ADN

- 1.- Insertar la columna SV al tubo de colecta
- 2.- Transferir la mezcla del gel disuelto o el preparado de PCR al ensamblado de la minicolumna. Se incuba a temperatura ambiente por 5 minutos.
- 3.- Se centrifuga a 16000 x g por 1 minuto, se descarta el fluido sobrante y se reinserta la minicolumna al tubo de colecta.

Lavado

4.- Se añade 700 µl de la solución de limpiador de membrana (con etanol añadido), se centrifuga a 16000 x g por 1 minuto.

5.- Se repite el paso 4 con 500 µl de la solución de limpiador de membrana y se centrifuga a 16000 x g por 5 minutos

6.- Se vacía el tubo de colecta y se vuelve a centrifugar la columna ensamblada por 1 minuto a 16000 x g.

Eulición

7.- Con cuidado se transfiere la minicolumna a un eppendorf limpio de 1.5 ml

8.- Se añade 40 µl de agua libre de nucleasas a la minicolumna. Se incuba a temperatura ambiente por 5 minutos. Se centrifuga a 16000 x g por 1 minuto

9. Se descarta la minicolumna y se guarda el ADN a 4°C o a - 20°C

C. Protocolo para células quimiocompetentes

Preparación de medios

Medio CCMB

Reactivo	200 ml
10 mM KAc	196 mg
80 mM CaCl ₂	2.36 g
20 mM MnCl ₂ 4 H ₂ O	800 mg
10 mM MgCl ₂ 6 H ₂ O	400 mg
Glycerol	20 ml

Ajustar pH a 6.4 con 0.1 N HCl (añadir 3.5 ml)

Se esteriliza por filtración

Medio SOB

Reactivo	1 L	500 ml
Bactrotriptona	20 g	10 g
Extracto de levadura	5 g	2.5 g
NaCl	584 mg	292 mg
KCl	186 mg	93 mg

Añadir 5 ml 2 M MgCl₂ y se esteriliza por filtración

Medio SB

Reactivo	100 ml	50 ml
Bactrotriptona	3.5 g	1.75 g
Extracto de levadura	2 g	1 g
NaCl	0.5 g	0.25 g

Esterilizar en Autoclave

Procedimiento:

- 1.- (1 día) Se estiró una colonia de las células top 10 (cepa Dh5 alfa de *E.coli*) a una placa de LB por la tarde y se incubó a 37°C
- 2.- (2 día) La siguiente mañana, se inoculó una colonia durante la mañana en 5 ml de medio SB y se incubó a 37°C
- 3.- (2 día) Esa misma tarde, se inoculó en 500 ml de medio SOB a una OD=0.002 (cerca de las 6 de la tarde) a 25°C
- 4.- (3 día) Se crecieron a una OD=0.3 (cerca de las 8:30 am a 9:00 están listas) nunca se deja que se pase sobre 0.3

- 5.- Se vertió el cultivo de TOP 10 en botes de centrifugación, botes de 250 ml (previamente enfriados en el congelador), y se centrifugó a 3000 g (4200 rpm) por 10 minutos a 4°C
- 6.- Se vertió el sobrenadante (se descartó)
- 7.- Se resuspendió el pellet en 30 ml de medio CMB80 girando suavemente en hielo
- 8.- Se añadió en 50 ml de medio CCMB80
- 9.- Se colocó en hielo por 20 min
- 10.- Se centrifugó a 3000 g (4200 rpm) por 10 minutos a 4°C
- 11.- Se descartó todo el sobrenadante
- 12.- Se resuspendió el pellet en 4 ml (2 ml de cada una) de medio CCMB80 en frío girando suavemente el boté en hielo
- 13.- Realizaron alícuotas (50 µl) en tubos eppendorff de 1.5 ml y se guardan en el congelador -80°C

D. Aislamiento de ADN plasmídico por lisis alcalina (miniprep)

- Para llevar a cabo el aislamiento de ADN plasmídico por lisis alcalina, inicialmente se obtuvo un cultivo en medio líquido conteniendo el antibiótico apropiado.
- Se inoculó un tubo Falcón de 15 ml conteniendo 5 ml de medio LB, con una sola colonia bacteriana y se dejó incubándose a 37 °C con agitación constante durante 12 h.
- Posterior a esto se transfirió 1.5 ml a un tubo Eppendorf.
- Después de este tiempo, el cultivo se centrifugó a 12,000 rpm durante 30 segundos.
- Se retiró el sobrenadante por aspiración dejando la pastilla de bacterias lo más seco posible.
- Las células se resuspendieron en 200 µl de la solución I (25 mM Tris-HCL pH 8.0, 50 mM de EDTA).
- Se les agregó 200 µl de la solución II (0.2 M NaOH, 1% SDS) y se mezcló de 5 a 6 veces suavemente por inversión, evitando permanecer en este paso por más de 3 a 5 min.
- Inmediatamente después, se agregaron 200 µl de solución III (5 M KOAC pH 4.8, ácido acético 11.5 % v/v) fría, se invertirá suavemente hasta observar un precipitado blanco y se incubó en hielo durante 5 min.

- Después de este tiempo, las células lisadas se centrifugaron a 13,000 rpm por 10 min; y se recupera el sobrenadante, y se colocó en un tubo nuevo.
- Se agregó 1 μ L de RNasa y se incubó a 37° durante 10 minutos.
- Se agregaron 600 μ L de fenol:cloroformo:alcohol isoamilico (25:24:1) y se mezcló muy bien en un vortex.
- Se centrifugó por 5 min a 13,000 rpm a temperatura ambiente.
- Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se le añadieron 600 μ l de cloroformo:alcohol isoamilico (24:1), se mezcló bien en vortex y se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min a temperatura ambiente.
- Se transfirió la fase superior a un tubo nuevo y se añadió 1 ml (o dos volúmenes) de etanol al 100% frio, se mezcló bien y se incubó en hielo durante 2 a 5 min.
- Después se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante, y la pastilla se lavó con 500 μ l de etanol al 70% dejándose secar durante 5 min.
- Finalmente la pastilla se resuspendió en 30 μ l de agua milliQ.

E. Preparación de medios de cultivo para levadura:

Medio Cub

Reactivo	1 Litro	100 ml
Drop out	0.545 g	0.054 g
Yeast without amino acid nitrate base	1.7 g	0.17 g
Sulfato de amonio	5 g	0.5 g
Glucosa	30 g	3 g
Agar	20 g	2 g
Adenina	10 ml	1 ml
Triptófano	2 ml	400 μ l
Uracilo	10 ml	1 ml

Medio Nub

Reactivo	1 Litro	100 ml
Drop out	0.545 g	0.054 g
Yeast without amino acid nitrate base	1.7 g	0.17 g
Sulfato de amonio	5 g	0.5 g
Glucosa	30 g	3 g
Agar	20 g	2 g
Adenina	10 ml	1 ml
Histidina	2 ml	400 μ l
Leucina	24 ml	4.8 ml

Medio de apareamiento – YPD

Reactivo	1 Litro	100 ml
Extracto de levadura	10 g	1 g
Peptona	20 g	2 g
Glucosa	20 g	2 g
Agar	20 g	2 g
Adenina	30 ml	3 ml

Medio Diploide

Reactivo	1 Litro	100 ml
Drop out	0.545 g	0.054 g
Yeast without amino acid nitrate base	1.7 g	0.17 g
Sulfato de amonio	5 g	0.5 g
Glucosa	30 g	3 g
Agar	20 g	2 g
Adenina	10 ml	1 ml
Histidina	2 ml	400 μ l

Medio de interacción – Metionina

Reactivo	1 Litro	100 ml
Drop out	0.545 g	0.054 g
Yeast without amino acid nitrate base	1.7 g	0.17 g
Sulfato de amonio	5 g	0.5 g
Glucosa	30 g	3 g
Agar	20 g	2 g
Metionina	7.5 ml	750 μ l

F. Tabla de especies utilizadas para el Árbol Filogenético

Especie	Filum	Clase
<i>Aedes aegypti</i>	Arthropoda	Insecta
<i>Alligator mississippiensis</i>	Chordata	Sauropsida
<i>Ambystoma mexicanum</i>	Chordata	Amphibia
<i>Anolis carolinensis</i>	Chordata	Reptilia
<i>Betta splendens</i>	Chordata	Actinopterygii
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	Ascomycota	Saccharomycetes
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Nematoda	Secernentea
<i>Callorhinchus milii</i>	Chordata	Chondrichthyes
<i>Capitella teleta</i>	Annelida	Polychaeta
<i>Carcharodon carcharias</i>	Chordata	Chondrichthyes
<i>Centruroides sculpturatus</i>	Arthropoda	Arachnida
<i>Chelonia mydas</i>	Chordata	Sauropsida
<i>Chrysemys picta</i>	Chordata	Reptilia
<i>Columba livia</i>	Chordata	Aves
<i>Crocodylus porosus</i>	Chordata	Sauropsida
<i>Danio rerio</i>	Chordata	Actinopterygii
<i>Dibothriocephalus latus</i>	Platyhelminthes	Cestoda
<i>Drosophila melanogaster</i>	Arthropoda	Insecta

<i>Dugesia Japonica</i>	Platyhelminthes	
<i>Entamoeba dispar</i>	Amoebozoa	Archamoebae
<i>Entamoeba histolytica</i>	Amoebozoa	Archamoebae
<i>Erpetoichthys calabaricus</i>	Chordata	Actinopterygii
<i>Galleria mellonella</i>	Arthropoda	Insecta
<i>Gallus gallus</i>	Chordata	Aves
<i>Geotrypetes seraphini</i>	Chordata	Amphibia
<i>Helobdella robusta</i>	Annelida	Clitellata
<i>Hirundo rustica</i>	Chordata	Aves
<i>Homo sapiens</i>	Chordata	Mammalia
<i>Hydra vulgaris</i>	Cnidaria	Hydrozoa
<i>Hypsibius dujardini</i>	Tardigrada	Eutardigrada
<i>Lottia gigantea</i>	Mollusca	Gastropoda
<i>Lytechinus variegatus</i>	Echinodermata	Echinoidea
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	Mollusca	Bivalvia
<i>Mus musculus</i>	Chordata	Mammalia
<i>Nanorana parkeri</i>	Chordata	Amphibia
<i>Nematostella vectensis</i>	Cnidaria	Anthozoa
<i>Octopus bimaculoides</i>	Mollusca	Cephalopoda
<i>Octopus sinensis</i>	Mollusca	Cephalopoda
<i>Odocoileus virginianus</i>	Chordata	Mammalia
<i>Ophiocordyceps unilateralis</i>	Ascomycota	Sordariomycetes
<i>Pantherophis guttatus</i>	Chordata	Sauropsida

<i>Patiria miniata</i>	Echinodermata	Asteroidea
<i>Pecten maximus</i>	Mollusca	Bivalvia
<i>Piaya cayana</i>	Chordata	Aves
<i>Podarcis muralis</i>	Chordata	Sauropsida
<i>Priapulus caudatus</i>	Priapulida	Priapulimorpha
<i>Python bivittatus</i>	Chordata	Sauropsida
<i>Ramazzottius varieornatus</i>	Tardigrada	Eutardigrada
<i>Rattus norvegicus</i>	Chordata	Mammalia
<i>Rhinatrema bivittatum</i>	Chordata	Amphibia
<i>Rhincodon typus</i>	Chordata	Chondrichthyes
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ascomycota	Saccharomycetes
<i>Saccoglossus kowalevskii</i>	Hemichordata	Enteropneusta
<i>Sinocyclocheilus rhinoceros</i>	Chordata	Actinopterygii
<i>Stegodyphus mimosarum</i>	Arthropoda	Arachnida
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	Echinodermata	Echinoidea
<i>Trichoplax adhaerens</i>	Placozoa	Trichoplacoidea
<i>Trichoplax sp</i>	Placozoa	Trichoplacoidea
<i>Xenopus laevis</i>	Chordata	Amphibia
<i>Xenopus tropicalis</i>	Chordata	Amphibia

G. Glosario

ARF1: Factor 1 de ribosilación de ADP.

Auxotrofia: Indica la imposibilidad para un organismo de sintetizar un compuesto orgánico

Células dendríticas: Las células dendríticas (CDs) son leucocitos que juegan un importante papel tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa, siendo las células presentadoras de antígeno más potentes que existen y con la capacidad única de activar linfocitos T colaboradores que no han tenido contacto antigénico previo.

Células endoteliales: Una célula endotelial es un tipo de célula aplanada que recubre el interior de los vasos sanguíneos y sobre todo de los capilares, formando parte de su pared.

Células epiteliales: Las células epiteliales ayudan a proteger los órganos; algunas producen moco u otras secreciones. Las células epiteliales son las células que recubren las superficies interna y externa del cuerpo, formando masas o capas celulares (epitelio).

Células hematopoyéticas: A partir de esta célula multipotencial llamada célula madre hematopoyética o progenitora se originan todas las células sanguíneas: eritrocitos, leucocitos (que incluyen los distintos linfocitos) y plaquetas.

Células mesenquimales: Las células madre mesenquimales (CMM) pueden dar lugar a varios tipos de células de los tejidos esqueléticos, como el cartílago, el hueso y la grasa.

Células Teff: Células efectoras

Células Treg: Células reguladoras

Citocinas: Las citocinas son un grupo de proteínas y glicoproteínas producidas por diversos tipos celulares que actúan fundamentalmente como reguladores de las respuestas inmunitarias e inflamatorias.

COPI: Es un complejo multiproteico que al ensamblarse forma una cubierta que recubre y da forma a vesículas transportadoras de proteínas y lípidos desde la cara Cis del Aparato de Golgi de retorno al Retículo Endoplasmático Rugoso (ER), donde fueron originariamente sintetizadas y entre compartimentos del propio Golgi. Este tipo de transporte es denominado transporte retrógrado. El nombre de COPI se refiere al complejo proteico de revestimiento específico que inicia el proceso de formación de vesículas en la membrana cis-Golgi.

COPII: COPII (Coat complex protein II) es un coatómero, un complejo de proteínas de cubierta vesicular, responsable del transporte vesicular desde el retículo endoplasmático rugoso (RER)

hasta el aparato de Golgi (AG). El complejo multiproteico COPII consiste en los subcomplejos proteicos que llevan a cabo la formación de una vesícula de secreción de material reticular.

ERES: Sitio de salida del retículo endoplasmático.

Fusógeno: Se denomina “fusógeno” a aquellas proteínas necesarias para que se produzca la fusión de membranas que intervienen directamente en este proceso.

GAP: Las uniones gap (GJs) son canales o poros en la membrana lipídica que permiten el paso bidireccional de iones y pequeñas moléculas, como el ATP, el cAMP, el IP3, el glutamato u otras moléculas de tamaño menos a 1 kD como microARN (miARNs), de una célula a otra adyacente.

GPCR: Receptores acoplados a proteínas G.

GRK (Quinasas de receptores acoplados a proteínas G): Las GRKs son quinasas que específicamente reconocen y fosforilan GPCRs cuando están activados, lo que provoca la unión de proteínas citosólicas denominadas arrestinas, que bloquean la capacidad de los GPCR de interactuar con proteínas G, conduciendo a una rápida desensibilización

Hematopoyésis: La hematopoyesis es la producción de células sanguíneas (*hema*, “sangre”; *poiesis*, “formación”).

Inmunocompetente: Que es capaz de producir una respuesta inmunitaria normal.

MHC: La identificación de células que son capaces de reconocer el complejo de histocompatibilidad principal (MHC) en la presentación de antígenos a las células T.

ORF: Marco abierto de lectura es una porción de una molécula de ADN que cuando se traduce a los aminoácidos, no contiene codones de terminación. El código genético lee secuencias de ADN en grupos de tres pares de bases, esto significa que, en una molécula de ADN de doble hebra, hay 6 posibles sentidos en los que pueden abrirse marcos de lectura --tres en dirección hacia adelante y tres en reverso. Un marco abierto de lectura larga es probable que sea parte de un gen.

Promielocitos: Son los que darán origen a los diferentes mielocitos y, éstos, a su vez, madurarán en metamielocitos. Durante este proceso llamado hematopoyésis, se irán definiendo según el tipo de célula en el que se vayan a transformar: basófilos, eosinófilos, neutrófilos o monocitos.

Proteína cargo: Cualquier proteína que se transporta dentro de las vesículas del tráfico vesicular (es decir, desde el retículo endoplásmico hasta el aparato de Golgi y la membrana plasmática).

Receptor cargo: Los receptores cargo atraviesan una membrana (ya sea la membrana plasmática o la membrana de una vesícula), uniéndose simultáneamente a las proteínas cargo y a los

adaptadores de la capa, para reclutar de manera eficiente proteínas solubles a las vesículas nacientes.

Ribosilación: La ribosilación de ADP es la adición de uno o más restos de ADP-ribosa a una proteína. Es una modificación postraduccional reversible que está involucrada en muchos procesos celulares, incluida la señalización celular, la reparación del ADN , la regulación de genes y la apoptosis.

TEC: Células Epiteliales tímicas.

TCR: Receptor de células T.

TMD: Dominio transmembrana o dominio de membrana integral IMD

H. Abreviaturas

AG: Aparato de Golgi

APC: Célula presentadora de antígeno

Cargo: Proteína cargo

COPII: Complejo proteico 2

CNHI: Cornichon

ERGIC: Compartimento intermedio del Retículo endoplásmico-Golgi

ERES: Sitio de salida del retículo endoplasmático

NK: Linfocitos citolíticos naturales

MHC: Complejo de histocompatibilidad mayor

GAPDH: Glicerol aldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GLUT1: Sistema facilitador del transporte de glucosa 1

PAIRS: Análisis de Emparejamiento de Receptores Cargo

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RE: Retículo endoplásmico

RER: Retículo endoplasmático rugoso

SGLT: Transportadores de glucosa acoplados a sodio

SNARE: Receptores de proteínas de fijación soluble

STZ: Estreptozocina

TCA: Ácido tricarboxílico

TCR: Receptor de linfocitos T

VTC: Complejo tubular vesicular

Cuernavaca, Morelos a 18 de octubre de 2022

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES
P R E S E N T E.

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta el Pasante de Biólogo: **MICHELLE EUSEBIO LARES HERNÁNDEZ**, con el título del trabajo: **EXPRESIÓN GÉNICA DE CORNICHON EN UN MODELO DE DIABETES EN RATÓN Y SU POSIBLE RELACIÓN EN LA ACTIVACIÓN DE CÉLULAS T.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación por Tesis Profesional por Etapas como lo marca el artículo 26° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

A T E N T A M E N T E
Por una humanidad culta

JURADO REVISOR

FIRMA

PRESIDENTE: BIOL. NAYELI SÁNCHEZ GUEVARA

SECRETARIO: DR. EDGAR DANTÁN GONZÁLEZ

VOCAL: DR. PAUL ROSAS SANTIAGO

SUPLENTE: DR. CUAUHTÉMOC JUAN HUMBERTO LANZ MENDOZA

SUPLENTE: DR. RAMÓN SUÁREZ RODRÍGUEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

CUAUHTEMOC JUAN HUMBERTO LANZ MENDOZA | Fecha:2022-10-18 17:27:14 | Firmante

edERrjghnpuG6dn9PnW0pRME17nEz5dZ/rkPxmM4HulRQ/P6i1KggaozyXpi5j6LOiKo1+5+9KJuq2FCyjuLkIL54t2YlZaLKhqZ0gImdx/MMU9LO1w2pVKyD4nlz/G3Mv3Qeulf80EgWx2xQiQRut+8MX7LsBfDSpmMkUAMQvFdqZOxJXQr3dkzgVp6UHIOVfPbENqnMS/6/B8JzGbFCUWg1qmnbsFWUtMaZ2qCrW5gS54IVVLjF4SbvMofcDrvySV2r6UUynnkO7BsdFhLy8LNM54zFgMrkVq4VBzdmzvx8f33GCsnADYc3qLeApBhkl67PkPMNig18eofXy5g==

PAUL ROSAS SANTIAGO | Fecha:2022-10-18 18:34:30 | Firmante

ilYiQZqktU6YT+ucsJ3Yga/EkIQ60i1p3MpYF05hzSf3wBt6igvwjCMga4Ireivimbn5j1Bx0Yk9r4B84Dp+1XOuq0vShj2eRHb/yggldFDBZDFkiUkCTTEatz3M+7/BsmATf6M5esQCICM/7KvrEKtn1AaMtPsYRyn3IS06CxWRReMa4GLsEkUXNTTbyxd4AySiGFWZmaKN33QepKAtwxBNCaLdqP1D3/Ti5y1khdPLk9tYIEBSbnFhk5WueoSCy1yTYOJkSaxDlk641izagH27Jsnl6Cl6yfc7/kAyCo5OO2WYAL1Dns0De7Q0NAID+NhgQsQDMZeltKYoeGQ==

NAYELI SANCHEZ GUEVARA | Fecha:2022-10-19 10:12:32 | Firmante

pt+o3GLAfp0wepPFDeLahz3eFpFMhA/H1B+0SF3LA+JMHfZBpRiomG79abygeGdUjOBG6/UUaFJhpgTIRqLRK1n+WHHoXoTF38eJQJuh6UwysqJU9g5+nDOS/d7aSURAmLGRAXM5PMeAWL9lCs8cJmaaZm0Cn8Yw0ng5jBlj8x3OX6gviOVDz1qOK73boONUCd1Ar/Mj5Y2nwN+cihuBdlyUPwB5Bb4tlYtpn3g75spscNWb/sBAImSgd4R3d5Me17EeOKnrbTfbM7SODP5xbT4q0Le+bWfgNliqYmduRyEh36R78TrmmE7XTAkBKZC9ibs/EtilgJGMVLB/11zg==

RAMON SUAREZ RODRIGUEZ | Fecha:2022-10-21 15:24:55 | Firmante

I1WEnaAhA/TlvmuZHfMWCQRgDjGOOziqH1USDmxWEIjfe1ZGTIPXhrE5siPXARKIT7qtKNEmsGecFSa81BJzFol4ZxDhHP3Y68qaanXBIQR72ViQC+XtpiQpUD9dIP6mghdGHi+QnSYZEVIAGkVqr3ReNkuk4ldrYQ97GS0p4R7Sy9x9YiYHBMImO6IRJ+JKtW/EWEpQ4L+UTvdkGfkkMFRfqcA5JhcuseXYlqkOHOk/7a3quoLplQpv2lXOKJVBBHu/FqMILXpgZZIPG90UgYEgjlYLwafbvZ00PFuZiNteVVKefMumHmGeTQYClYTwTv6YcukRfeEBwp+ix7A==

EDGAR DANTAN GONZALEZ | Fecha:2022-10-25 07:24:03 | Firmante

IROcX2YxWzXv5U5NlsQWz+ebZTFr+W2w/qJd7ooqchEZu3+OWKb4K1Vogz7Dv7Rg+1HQasIDlyaSNXv9MoWqLkl2cVIXjJQ/5vDPpbOPG6VYtibQP6AQHBPnUWaz78gWj5kJuCKKJIEyAbfsmXxl5vFlgaH/L5ORACN/LDsnzkt4ZPTSz6CuY107/SD9JZZh7FGJ47GdeSc6qq5s3t/pYdkX+DzG89sZ3clByp2snd2tun9qxD16fmbtu+8Y8YKjyfGJ1xs4F1GmUjZurV55BeKwCof0FxyNimbxO4NBjzwH2Cyb/Cv771VW/mMCDW4MW1DRXzGy95i7qM6NaCzQZg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



D4IKgYbqf

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Rc5EpCbJjBjEvkboGa58rJSem4L5UGVA>

