



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**POSIBLE REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA  
DE CORNICHON EN UN MODELO DE DIABETES EN  
RATÓN Y SU RELACIÓN CON EL TRÁNSITO DE  
TRANSPORTADORES DE GLUCOSA A LA  
MEMBRANA PLASMÁTICA**

**TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
B I O L O G O  
P R E S E N T A:  
MILDRED IVETTE LANGO MONTIEL**

**CODIRECTORES**

**DR. PAUL ROSAS SANTIAGO**

**DRA. GILDA GUERRERO FLORES**

**CUERNAVACA, MORELOS**

**DICIEMBRE, 2021**

## Agradecimientos

En primera instancia quiero agradecer a mi director, el Dr. Paul Rosas Santiago, quién desde el primer año de mi carrera me abrió las puertas del laboratorio en Instituto de Biotecnología de la UNAM para aprender las técnicas básicas del laboratorio y brindarme posteriormente todos los recursos necesarios para poder llevar a cabo este proyecto.

De la misma manera, agradezco a mi directora, la Dra. Gilda Guerrero Flores del Laboratorio Nacional de Recursos Genómicos (LaNReGen) quién, me enseñó a trabajar con el modelo de ratón en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM en la Ciudad de México y algunas técnicas de biología molecular, así como a el Dr. Omar Collazo del LaNReGen, quien me brindó apoyo técnico al momento de manipular a los ratones para obtener los tejidos de interés y me facilitó los recursos necesarios para poder trasladarme al laboratorio en la Ciudad de México y desarrollar este proyecto con todas sus implicaciones. También les agradezco la oportunidad que me dieron de pertenecer a su grupo de estudiantes y aprender más sobre el ratón como modelo biológico.

Y en general al LaNReGen del IIBO, al Laboratorio de Biología Molecular de Plantas del Dr. Omar Patonja del IBT, por facilitar las instalaciones e insumos para la realización de esta tesis y al CONACYT por su apoyo con el proyecto A1-S8007 otorgado al Dr. Paul Rosas.

Tanto a mi director como a mi directora, les agradezco infinitamente por su paciencia, por siempre estar en la mejor disposición para enseñarme y por todo el conocimiento que compartieron conmigo durante todo este tiempo, porque gracias a eso pude concluir satisfactoriamente mi licenciatura en ciencias biológicas.

Me gustaría agradecer al Dr. Jorge Ruíz Salas, quién muy amablemente y con la mejor disposición, me aportó mucho conocimiento en la parte teórica práctica de otras técnicas de biología molecular y en el manejo de programas como SnapGene en el IBT.

También agradezco al Mto. Arihel Hernández Muñoz, quien me apoyo en toda la parte sistemática de este proyecto, desde cómo utilizar los programas y bases de datos, hasta como hacer la interpretación de los resultados.

Y desde luego también agradezco a mis sinodales, la Dra. Elizabeth Nava, la Dra. Nayeli Monterrosas, la biol. Patricia Escobar y el Dr. Edgar Dantan, por las aportaciones, comentarios y sugerencias que me hicieron a lo largo del desarrollo de los seminarios y el escrito.

Agradezco también a todos mis amigos que conocí en el trayecto de la carrera, sin duda alguna cada uno de ellos contribuyó a su manera con su amistad a mi persona, y claramente sin ellos la carrera no hubiera sido tan divertida y especial como lo fue. Muchas gracias amigos y compañeros: Chevo, Bere, Robert, Bryan, Barajas, Víc, Jacke, Andrea, Ian, Gali y Freddy.

Y por último, pero no menos importante agradezco a mi familia por su comprensión, su paciencia y su apoyo incondicional que siempre tuvieron conmigo, por que sin ellos no me hubiese sido posible ni siquiera iniciar la carrera, en especial agradezco a mis padres Carlos y Perla, a mi abuela Ruth y a mi tía Licha, por siempre estar al pendiente de mis necesidades tanto como hija, como estudiante, a mi hermano por siempre escucharme y abrazarme, a mi tío Roberto y Enrique por que a pesar de no estar cerca, nunca me dejaron de apoyar.

## ÍNDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>INTRODUCCIÓN</b>  | <b>6</b>  |
| <b>ANTECEDENTES</b>  | <b>7</b>  |
| <u>Tráfico vesicular</u>   | 7         |
| Historia   | 8         |
| Ruta anterógrada y retrógrada  | 8         |
| Ensamblaje de COPII  | 8         |
| Receptores cargo, proteínas y su ensamblaje con COPII                            | 10        |
| <u>Cornichon</u>   | 11        |
| Historia   | 11        |
| Cornichon y sus ortólogos  | 12        |
| Cornichon y su ortólogo <i>AtCNIHs</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i>            | 12        |
| Cornichon y sus ortólogos <i>MmCNIH2</i> , <i>MmCNIH3</i> en <i>Mus musculus</i> | 12        |
| Cornichon y su ortólogo <i>OsCNIH1</i> en <i>Oryza sativa</i>                    | 12        |
| Cornichon y sus ortólogos <i>TGAM77</i> en humanos                               | 12        |
| Cornichon y su ortólogo <i>ScErv14</i> en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>        | 12        |
| <u>Transportadores de glucosa</u>  | 13        |
| Transportadores de hexosas en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>                    | 13        |
| Transportadores de glucosa en mamíferos  | 16        |
| <u>Expresión génica de Cornichon en <i>Mus musculus</i></u>                      | 18        |
| <u>Histología del páncreas</u>   | 19        |
| <u>Síntesis y secreción de la insulina</u>                                       | 19        |
| Regulación del transporte de glucosa por la insulina                             | 21        |
| <u>Diabetes mellitus</u>   | 21        |
| <u>Modelo diabético murino</u>   | 22        |
| Modelo inducido con estreptozotocina (STZ)                                       | 23        |
| <u>Mecanismo de acción de la estreptozotocina</u>                                | 23        |
| <b>JUSTIFICACIÓN</b>   | <b>25</b> |
| <b>HIPÓTESIS</b>   | <b>25</b> |
| <b>OBJETIVO GENERAL</b>  | <b>25</b> |
| <b>OBJETIVOS PARTICULARES</b>  | <b>26</b> |
| <b>METODOLOGÍA</b>   | <b>27</b> |
| <u>Análisis in silico de la filogenia de Cnihs</u>                               | 27        |
| <u>Modelo diabético murino</u>   | 27        |
| <u>Obtención de los islotes pancreáticos e hígado</u>                            | 28        |
| <u>Extracción de ARN</u>   | 31        |
| <u>Síntesis de ADNc</u>  | 32        |
| <u>PCR y electroforesis</u>  | 34        |

|  |    |
|--|----|
| <u>RT-qPCR</u>   | 34 |
| <u>Amplificación y clonación de <i>Glut2</i>, <i>Cnih1</i> y <i>Cnih4</i></u>  | 36 |
| <u>Transformación en <i>E. coli</i> mediante choque térmico</u>  | 38 |
| <u>Extracción de ADN plasmídico mediante lisis alcalina (Birnboim y Dolly, 1979)</u>   | 39 |
| <u>Análisis de restricción</u>   | 40 |
| <u>Preparación de la mezcla de transformación de levaduras con Acetato de Litio (LiAc)</u>   | 40 |
| <u>Identificación de interacciones proteína/proteína con el sistema de la ubiquitina dividida (mbSUS, mating-bases Split Ubiquitin System)</u> | 42 |
| <u>Medios de crecimiento para levaduras</u>  | 44 |
| <b>RESULTADOS</b>  | 46 |
| <u>Filogenia de Cornichon en los metazoarios</u>   | 46 |
| <u>Alineamiento de los Cornichones de <i>M. musculus</i>, <i>H. sapiens</i> y <i>S. cerevisiae</i></u>   | 48 |
| <u>Extracción de ARN y transcritos amplificados</u>  | 49 |
| <u>Construcciones de <i>Cnih1</i>, <i>Cnih4</i> y <i>Glut2</i> con los vectores de entrada</u>   | 50 |
| <u>Construcciones de <i>Cnih1</i>, <i>Cnih4</i> y <i>Glut2</i> con los vectores de expresión</u>   | 50 |
| <u>Interacción de <i>Cnih1</i> y <i>Cnih4</i> con <i>Glut2</i></u>   | 53 |
| <u>Establecimiento de un modelo diabetico murino</u>   | 56 |
| <u>Detección de los transcritos de <i>MmCNIH1</i> al 4 y de <i>MmRplp0</i></u>   | 60 |
| <u>Regulación de la expresión génica de <i>MmCNIH1</i> al 4 y de <i>MmRplp0</i> en un modelo murino diabetizado</u>                            | 62 |
| <b>DISCUSIÓN</b>   | 66 |
| <b>CONCLUSIÓN</b>  | 69 |
| <b>PERSPECTIVAS</b>  | 71 |
| <b>CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES</b>   | 72 |
| <b>ANEXOS</b>  | 74 |
| <b>REFERENCIAS</b>   | 80 |

## INTRODUCCIÓN

El tráfico vesicular es el responsable del buen suministro de una gran variedad de proteínas, desde que salen del retículo endoplásmico (RE), hasta que llegan a su destino celular final, en el cual llevarán a cabo su función para el correcto mantenimiento y desarrollo celular. A lo largo de los años, se han realizado investigaciones que han arrojado diversas evidencias que indican que las proteínas que serán secretadas contienen elementos de clasificación que son descifrados por la maquinaria de transporte intracelular en múltiples etapas, para encaminar a las proteínas a su ubicación final (Dancourt J., *et al.* 2010). El RE es el sitio donde da inicio la vía secretora, este es responsable del plegamiento, maduración y tráfico de todo lo que se secreta y une a la membrana, incluyendo las proteínas residentes en esta vía (Herzig, Y., *et al.*, 2012).

Las proteínas que viajan en la ruta anterógrada, que va desde el RE hasta el aparato de Golgi (AG), se transportan en vesículas denominadas COPII (*Coat complex protein II*), que se conforman por diversas proteínas estructurales como Sar1, Sec23-Sec24, Sec31-Sec13, además de las proteínas a transportar (cargos) y los receptores cargo, encargados de seleccionar y empaquetar a los cargos dentro de las vesículas COPII .

Una de estas proteínas que es de particular interés es el receptor cargo Cornichon (Cnih), ya que la mayoría de sus cargos son proteínas de membrana, como los transportadores iónicos en la planta del arroz o los transportadores de hexosas en *S. cerevisiae* (Rosas P., *et al.*, 2015; Herzing., *et al.*, 2012).

Se ha reportado que, aproximadamente, el 10% de los genes de una célula están relacionados con las proteínas de transporte de iones, solutos o compuestos a través de las membranas celulares (Machado O., *et al.*, 2019) lo que nos da una idea de la importancia de estudiar la ruta anterógrada y los receptores cargo que seleccionan a las proteínas para ser transportadas y entregadas a los distintos organelos.

## ANTECEDENTES

### Tráfico vesicular

#### Historia

Palade y sus colaboradores describieron la vía exocítica y sus compartimentos en la década de 1960, utilizando un análisis de seguimiento de pulsos radioactivos combinado con microscopía electrónica. La vía endocítica y sus compartimentos fueron descritos a principios de la década de 1970 por Brown y Goldstein, mientras estudiaban mutaciones humanas que resultaban en aterosclerosis debido a defectos en el reciclaje de los receptores de lipoproteínas de baja densidad.

La idea de que todos los pasos de cualquier vía biológica pueden identificarse mediante mutaciones se aprovechó aún más a principios de la década de 1980, utilizando a las levaduras para describir todos los pasos de la vía exocítica y definir los genes que participan en esta ruta. Aproximadamente al mismo tiempo, la reconstitución de los pasos de transporte de proteínas en extractos celulares combinados con técnicas de purificación de proteínas permitió un enfoque complementario para identificar los componentes de la maquinaria de transporte (Tokarev, *et al*, 2013).

El progreso en el campo del tráfico intracelular durante las últimas dos décadas fue posible gracias a nuevos avances tecnológicos, por ejemplo, la combinación de las estrategias genéticas y bioquímicas permitió identificar algunos componentes y reguladores de la maquinaria del tráfico vesicular. Más tarde los estudios de genómica y proteómica permitieron el reconocimiento de más componentes. Posteriormente, la combinación de la fluorescencia y la microscopía electrónica con genética molecular dio como resultado el desarrollo de etiquetas fluorescentes como la GFP (*Green fluorescent protein*) que hizo posible localizar estos componentes de la maquinaria en sus compartimentos celulares (Tokarev, *et al*, 2013).

Técnicas más recientes como la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) y la complementación por fluorescencia bimolecular (BiFC, *bi-molecular fluorescence complementation*), ya permiten la identificación de interacciones proteicas *in situ*. En conjunto, los estudios que utilizan estas técnicas pueden proporcionar una imagen detallada de

las máquinas moleculares que participan en el tráfico intracelular en tiempo real (Tokarev, *et al*, 2013).

### **Ruta anterógrada y retrógrada**

La vía secretora en las células eucariotas es responsable de la biogénesis y la distribución intracelular adecuada de una amplia gama de proteínas, carbohidratos y lípidos (Brandizzi, 2013).

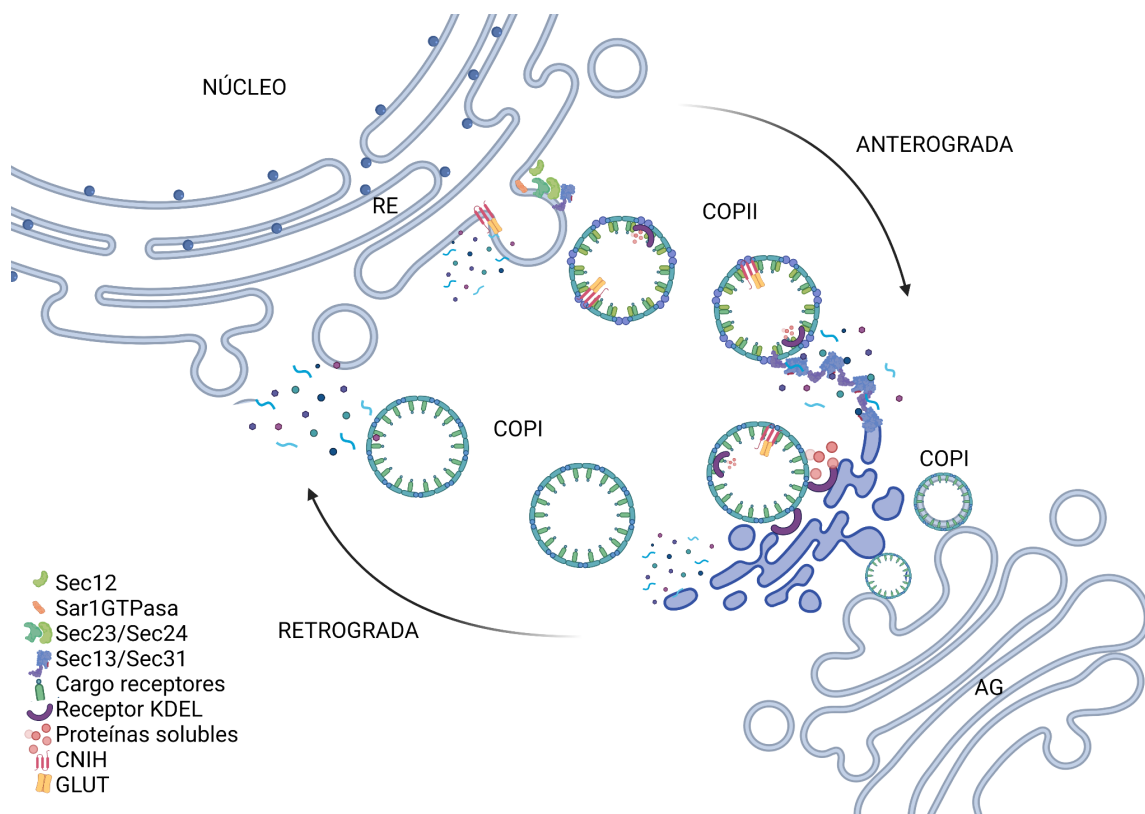
El tráfico en la vía secretora es muy dinámico y sensible a demandas específicas de las funciones celulares, además de ser bidireccional, ya que va desde el RE hacia el AG (ruta anterógrada) y viceversa (ruta retrógrada). En ambos casos, se forma una vesícula en el orgánulo donante y luego se fusiona con el orgánulo objetivo. La vesícula que participa en la vía anterógrada es COPII, y la que interviene en la ruta retrógrada es COPI (Fig.1) (Brandizzi F., 2013).

### **Ensamblaje de COPII**

Las vesículas COPII se forman en sitios específicos del RE, estos sitios se caracterizan por estar libres de ribosomas y se conocen como ERES, (*Endoplasmic Reticulum Exit Sites*). Las proteínas que deben ser exportadas del RE son seleccionadas y concentradas en los ERES de forma dependiente de la actividad del complejo COPII, que está integrado por cuatro subunidades principales: Sec12, que es un factor de intercambio de nucleótidos de guanina que permite que Sar1GTP se ancle a la membrana del RE y a su vez que reclute a dos complejos de proteínas; Sec23 que interactúa directamente con Sar1GTP y Sec24, que funciona como el principal adaptador de enlace para los receptores cargos y otras proteínas que posteriormente se anclan a la COPII. Por su parte, Sec23 también interactúa con otros dos complejos proteicos, Sec13 – Sec31 que serán los responsables de la estabilización y polimerización de los subcomplejos de la capa externa y de proporcionar las principales fuerzas de flexión de la membrana del ERES para permitir la generación de una vesícula COPII (Fig. 1). No obstante, el proceso de ensamblaje vesicular no se puede llevar a cabo únicamente a partir de estas proteínas, también deben intervenir proteínas como las Snare, Tango1 y Colágeno VII, entre otras (Spang A., 2009)



En mamíferos tras el ensamblaje, el contenido de las vesículas COPII se envía a un compartimento intermedio entre el RE y AG, donde las vesículas recubiertas con COPII liberadas desde las membranas del RE pierden parcialmente su cubierta y se fusionan entre sí para formar este compartimento intermedio denominado túbulo vesicular transportador VTCs (*Vesicular Tubular Clusters*) o ERGIC (*Endoplasmic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment*), que es dirigido por los microtúbulos componentes del citoesqueleto hacia el lado cis del AG, con el que se fusionará. En el ERGIC, se ha propuesto que la carga de COPII se somete a otra ronda de clasificación y control de calidad, donde se define si las proteínas son enviadas por la vía retrógrada a través de vesículas COPI y son degradadas o bien sí continúan por la ruta anterógrada en vesículas COPI que en conjunto con algunos receptores como los KDEL se encargarán de seleccionar únicamente a las proteínas bien plegadas y continuar con su ruta hacia el AG (Baines AC., *et al.*, 2007) (Fig. 1).



**Figura 1. Tráfico vesicular.** Ruta anterógrada y retrógrada mediadas por COPII y COPI, respectivamente. Creado con biorender.

## Receptores cargo, proteínas y su ensamblaje con COPII

Se ha descrito que una tercera parte de todas las proteínas en las células eucariotas atraviesan la vía secretora en ruta hacia sus destinos finales intra o extracelulares, colectivamente a estas se les ha denominado "proteínas cargo", esta clase de proteínas no sólo se limita a las proteínas solubles y proteínas secretadas, también incluye a todas las proteínas que se han clasificado a lo largo de la vía secretora y que, eventualmente residirán en el complejo de Golgi, en los compartimentos lisosómico o endosómico, o en la membrana plasmática (Baines., *et al.*, 2007). También se ha reportado que estas proteínas plegadas y ensambladas que salen del RE en vesículas de COPII pueden tener una influencia directa en el tráfico de las vesículas que las transportan (Venditti *et al.*, 2014).

Con base en el conocimiento actual, las proteínas cargo que se reclutan selectivamente para el ensamblaje de las vesículas se pueden dividir en dos categorías amplias: las primeras son aquellas que se unen directamente a los componentes de COPII y las segundas son aquellas que requieren adaptadores o receptores cargo específicos para enlazarse a las vesículas COPII.

El primer grupo se limita a proteínas que atraviesan la membrana del RE porque deben ser accesibles a las proteínas citosólicas que conforman a COPII, estas proteínas transmembranales que se unen a COPII pueden, a su vez, funcionar como receptores para la segunda clase de proteínas cargo, que incluye proteínas tanto solubles como transmembranales. Estos receptores cargo reconocen señales específicas de clasificación codificadas por su cargo, cabe destacar que todos estos mecanismos aún no se han descrito en su totalidad debido a la gran diversidad de proteínas que participan en el tráfico vesicular, lo que sí se sabe con certeza es que si todo este sistema del tráfico vesicular llegara a fallar debido a la ausencia de algún receptor cargo o alguna proteína cargo, pueden generarse múltiples enfermedades como la diabetes mellitus, enfermedades fetales, hígado graso, cáncer, neurodegeneración, entre otras, todo esto relacionado con el mal plegamiento de las proteínas (Baines., *et al.* 2007).

En la tabla 1 se describen los cargos de múltiples familias de receptores cargo en diferentes organismos modelo, entre ellas se describe a Cornichon en *D.melanogaster*, y a su ortólogo Erv14 en *S.cerevisiae*, las cuales son de interés particular para este proyecto, ya que esta familia se ha estudiado también en

plantas y mamíferos y ha demostrado ser de gran importancia para el desarrollo y crecimiento en los organismos estudiados, esto se describe mejor en el siguiente apartado de Cornichon.

**Tabla 1. Receptores cargo. Tomada de Baines., et al., 2007.**

| <b>Receptor</b>            | <b>Cargo</b>                      | <b>Species</b>                               |
|----------------------------|-----------------------------------|--|
| Erv29p                     | gpαf and CPY                      | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>              |
| Erv26p                     | p-ALP                             | <i>S. cerevisiae</i>                         |
| Erv14p                     | Axl2p and Sma2p                   | <i>S. cerevisiae</i>                         |
| Cornichon <sup>c</sup>     | Gurken                            | <i>Drosophila melanogaster</i>               |
| Emp24p–Erv25p              | Gas1p and Suc2p                   | <i>S. cerevisiae</i>                         |
| Emp46p–Emp47p <sup>c</sup> | Glycoproteins of unknown identity | <i>S. cerevisiae</i>                         |
| Erv41p–Erv46p <sup>c</sup> | None identified                   | <i>S. cerevisiae</i> and <i>Mus musculus</i> |
| LMAN1–MCFD2 <sup>d</sup>   | FV and FVIII; catC and catZ       | <i>M. musculus</i> and <i>Homo sapiens</i>   |
| BAP31 <sup>c</sup>         | MHC class I                       | <i>M. musculus</i> and <i>H. sapiens</i>     |

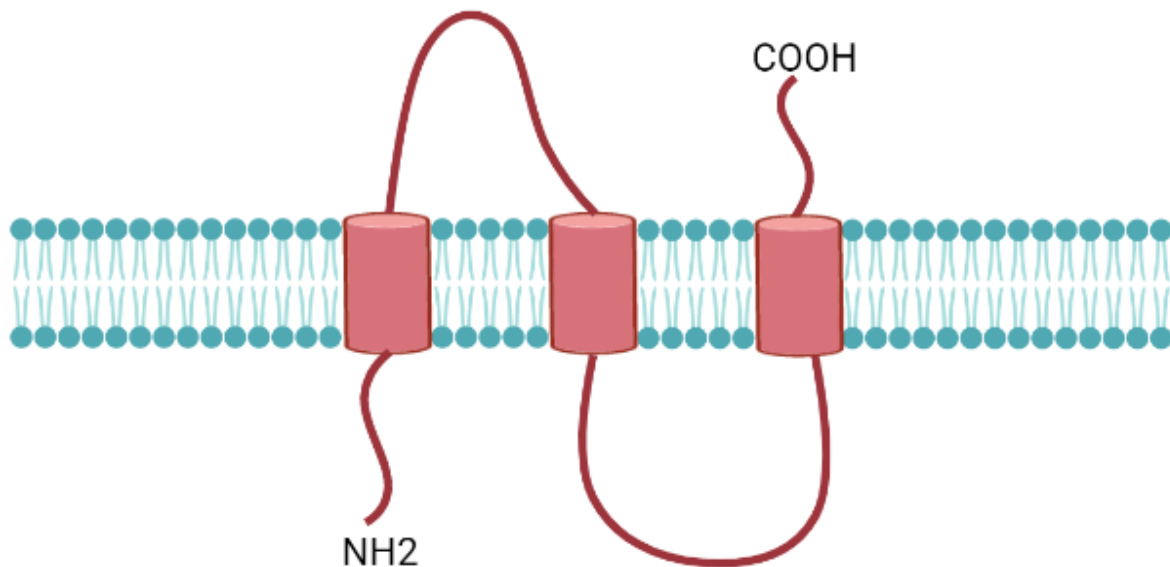
## **Cornichon**

### **Historia**

Los primeros estudios en los que se observó que Cornichon jugaba un papel importante como receptor cargo fueron descritos en *Drosophila melanogaster* por Ashburner M. y colaboradores, ellos describieron a Cornichon (Cni) como el tercer miembro de un grupo de genes receptores de proteínas, aparentemente necesarios para promover el desarrollo tanto del corion como de estructuras embrionarias dorsales (Ashburner., et al., 1990). Más tarde, en 1995, Roth y sus colegas describieron la función de estos receptores cargo, los cuales fueron identificados nuevamente en *D. melanogaster*, donde observaron que Cni era requerido en la línea germinal para la señalización dorsal-ventral de EGF (*Epidermal Growth Factor*). Posteriormente, en 2006, se define de manera más clara el papel de Cni en *Drosophila*, al observar que moscas mutantes en *Cni* mostraban un desarrollo embrionario aberrante, debido a que también demostraron que Cni es receptor cargo de Grk, miembro de la familia de los TGF (*Transforming Growth Factor*), de gran importancia para un buen desarrollo embrionario, por lo que concluyeron que Cni es fundamental para el transporte de Grk desde el RE hasta a la superficie del ovocito (Bökel., et al., 2006).

Finalmente, en el 2015, se describe que los miembros de la familia Cni son proteínas conservadas con tres dominios transmembranales, a las cuales se les

acuña un papel importante en la exportación eficiente de numerosas proteínas y material celular en la ruta anterógrada de distintos organismos (Fig. 2. Pagant *et al.*, 2015).



**Figura 2. Estructura de Cornichon.** Cornichon consta de un dominio N-terminal en el citoplasma, 3 dominios transmembranales y un C-terminal en el RE. Creado en biorender.

### Cornichon y sus ortólogos

#### **Cornichon y su ortólogo AtCNIHs en *Arabidopsis thaliana***

En la planta modelo *Arabidopsis thaliana* se estudió que los canales de calcio GLRs (*Glutamate receptor channels*) dependen de Cornichon, mostrando que algunos AtCNIHs son necesarios para el correcto tráfico, distribución, localización y función de los canales de calcio AtGLRs en el tubo polínico de *Arabidopsis* (Wudick *et al.*, 2018).

#### **Cornichon y sus ortólogos Cnih2, Cnih en *Mus musculus***

En *Mus musculus*, se han reportado 4 homólogos de Cnih, Cnih1, Cnih2, Cnih3 y Cnih4, y de manera particular se ha investigado que el ensamblaje con los homólogos 2 y 3 de Cornichon afecta a los AMPAR (Receptores de glutamato del subtipo AMPA) de dos maneras: aumentan la expresión superficial de AMPAR, y ralentizan la compuerta del canal cinético de desactivación y desensibilización. Estos resultados demuestran que los Cornichones son subunidades auxiliares

intrínsecas de los AMPAR nativos y proporcionan determinantes moleculares de la neurotransmisión glutamatérgica en el sistema nervioso central (Schwenk J., 2009).

### **Cornichon y su ortólogo OsCNIH1 en *Oryza sativa***

Los análisis de la proteína OsCNIH1 de la planta del arroz confirmaron una interacción física y funcional con la proteína OsHKT1;3, la cual funciona como un transportador altamente selectivo de iones de sodio en la membrana del aparato de Golgi (Rosas-Santiago et al., 2015).

### **Cornichon y su ortólogos TGAM77 en humanos**

El ARNm de TGAM77 se expresa en diferentes tejidos con varios niveles de expresión, este podría funcionar en la concentración de eventos de señalización en la activación de células T (Utku, N., et al., 1999).

### **Cornichon y su ortólogo Erv14 en *Saccharomyce cerevisiae***

Se ha estudiado que Erv14 juega un rol importante en el crecimiento de las levaduras, ya que si se muta a Erv14 en *S. cerevisiae*, las levaduras exhiben un fenotipo aberrante con notables defectos en su crecimiento- También se ha observado que Axl2, se encuentra deslocalizada, determinando que Erv14 desempeña un papel fundamental en el establecimiento del crecimiento polarizado y del brote axial de la levadura (Powers y Barlowe, 2002).

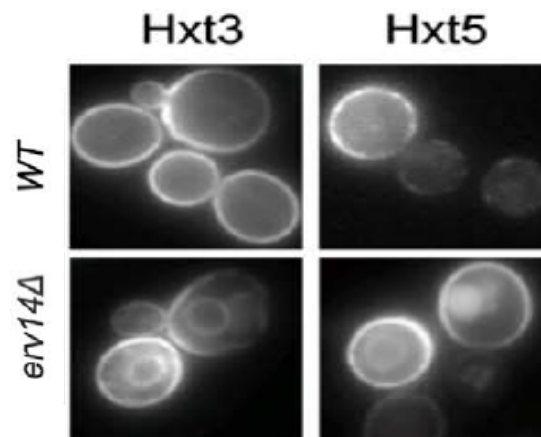
Asimismo, Erv14 también ha sido propuesto como un receptor de proteínas cargo específico para el transporte y tránsito efectivo de proteínas transmembranales. Se ha demostrado que el 32% de las proteínas de membrana en levaduras dependen de Erv14 para ubicarse adecuadamente en la membrana plasmática y, con ello, llevar a cabo una captura adecuada de estos carbohidratos (Powers y Barlowe, 1998; Herzig, et al, 2012; Rosas-Santiago et al., 2016).

## **Transportadores de glucosa**

### **Regulación del transporte de los transportadores de hexosas en *Saccharomyces cerevisiae***

Entre las proteínas transmembranales de gran relevancia que Erv14 tiene como cargo están algunos transportadores de hexosas. Herzig y col. observaron la

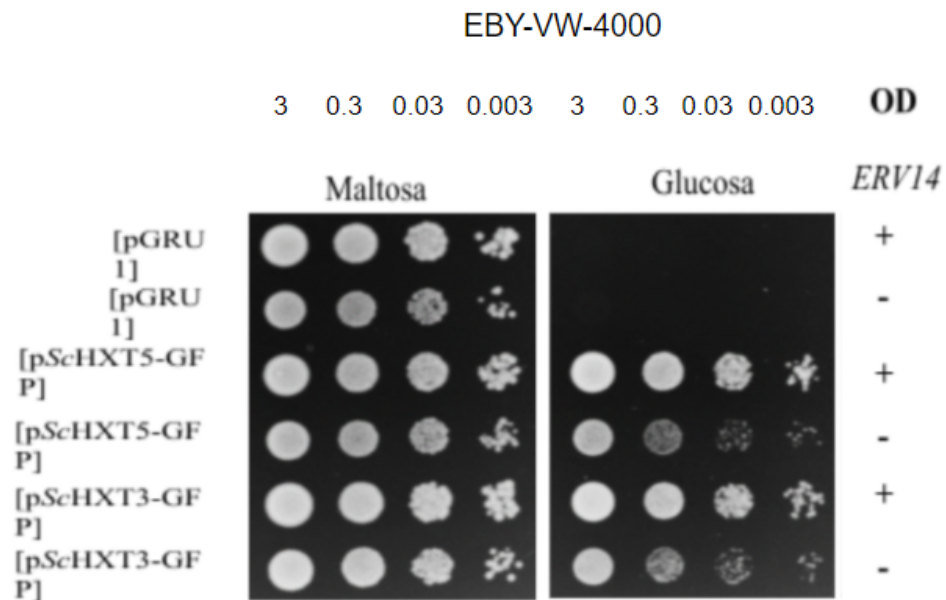
localización de los transportadores de hexosas Hxt5 y Hxt3 asociados a GFP en levaduras mutantes en *Erv14*, en una célula silvestre tanto Hxt5 como Hxt3 se encuentran localizados en la membrana plasmática de la levadura, pero cuando se muta a *Erv14* estos transportadores se encuentran retenidos en el retículo perinuclear y entre la membrana cortical y la membrana plasmática, esto quiere decir que *Erv14* regula el tráfico y transporte de Hxt5 y Hxt3 (Fig.3).



**Figura 3. El transporte de Hxt3 y Hxt5 hacia la membrana depende de *Erv14*.** Se observa en la cepa silvestre (WT) que estos transportadores de hexosas se encuentran localizados en la membrana, Cuando se muta a *Erv14* (*erv14Δ*), algunos Hxt se quedan en el RE de *S. cerevisiae*. Tomada de Herzig, *et al*, 2012.

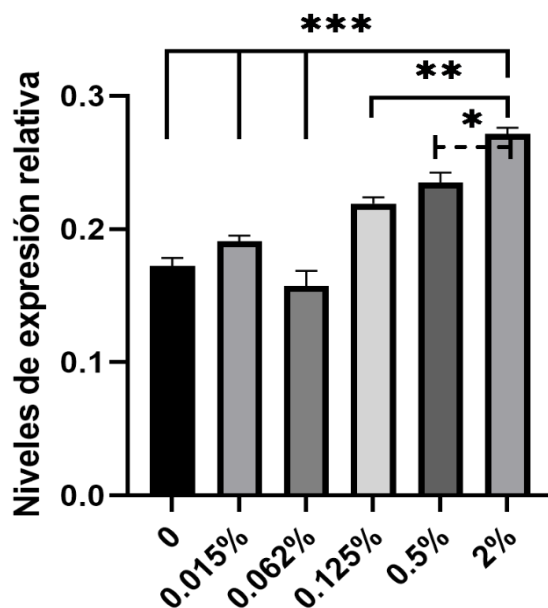
Con base a esto en el laboratorio se realizaron ensayos de gota, para observar el crecimiento de las levaduras en diferentes azúcares como maltosa y glucosa, en presencia o ausencia de *Erv14*, con el plásmido GRU vacío como control y el mismo plásmido con Hxt3 y Hxt5. Como se observa en la figura 4, con maltosa las levaduras crecen de manera abundante cuando tienen el plásmido vacío sin importar la ausencia o presencia de *Erv14*, ya que la maltosa puede introducirse a la célula a través de transportadores que no dependen de *Erv14*, en cambio, cuando se crecen las levaduras con el plásmido vacío en glucosa no se observa crecimiento ya que no hay transportadores para glucosa en pGRU. Sin embargo, cuando el plásmido se clona con Hxt3 y Hxt5 respectivamente, se observa que, en ausencia de *Erv14*, las levaduras crecen menos que cuando está presente, esto es muy notorio cuando el crecimiento es en glucosa, lo cual confirma lo antes mencionado por Herzig, que el tráfico y transporte de estos transportadores sí depende de *Erv14*. Otros estudios previos en nuestro grupo de trabajo mostraron que los niveles de ARNm de *Erv14* en *S. cerevisiae* aumentan conforme se incrementan las concentraciones de glucosa extracelular, lo que sugiere que *ScErv14* es regulado

transcripcionalmente por la concentración de glucosa, lo cual incidirá en el tránsito de los transportadores de hexosas que, finalmente, desembocará en un incremento en la captura de glucosa (Datos no publicados, tesis de Martínez-Morales, L) (Fig. 5).



**Figura 4. Htx3 y Htx5 dependen de Erv14 para mediar el transporte de glucosa en *S. cerevisiae*.** Crecimiento *S. cerevisiae* en maltosa y glucosa a diferentes concentraciones celulares, con ausencia o presencia de Erv14, en un plásmido vacío (pGRU) y en plásmidos con Hxt5 (pScHxt5) y Hxt3 (pScHxt3), respectivamente. Tomado de Martínez-Morales, datos no publicados.

A partir de estos experimentos surgió la pregunta de investigación de que si esta misma dependencia de los transportadores de hexosas a Cornichon se presenta en los mamíferos, por lo que la propuesta de este proyecto se enfoca en estudiar a los transportadores de glucosa (Glut) y a los ortólogos de Erv14 en un modelo diabético murino, ya que creemos que el mecanismo observado en la levadura, podría ser similar en el ratón, es decir, que los niveles de expresión génica de *Cornichon* estén regulados por la concentración de glucosa en sangre y que el transporte a la membrana plasmática de los Glut esté mediado por Cornichon para modular la demanda de captura de glucosa en las células.



**Figura 5. La expresión de Erv14 es regulada por la concentración de glucosa.** Los niveles de expresión relativa de Erv14 disminuyen conforme lo hace la concentración de glucosa, a partir de 0.062% se observó una disminución significativamente mayor en el transcrito de *Erv14*. Tomado de Martínez-Morales, datos no publicados.

### Transportadores de glucosa en mamíferos

Los transportadores de glucosa son proteínas transmembranales que usan gradientes electroquímicos para mover moléculas entre ambos lados de la membrana y que trabajan de manera coordinada con factores hormonales, receptores y segundos mensajeros para mantener el flujo de este metabolito en condiciones normales.

En el ratón se clasifican en tres grandes familias: los cotransportadores de sodio/glucosa (SGL, *Sodium-Glucose Linked Transporter*), los transportadores de difusión facilitada (Glut, *Glucose Transporters* o SCL2 *Solute Carrier Family 2*) y los transportadores SWEET (*Sugars Will Eventually Be Exported Transporter*) (Machado., *et al.*, 2019). Los Glut son transportadores que permiten la entrada de la glucosa a las células a favor de su gradiente de concentración, hasta la fecha se han descrito 14 Glut (Tabla 2), los cuales presentan características estructurales comunes: 12 dominios alfa hélice transmembranales, cuyos grupos amino y carboxilo terminales están localizados intracitoplasmáticamente y un dominio extracelular altamente glicosilado en el tercer o quinto bucle o asa dependiendo del Glut (de Jesús., *et al.*, 2016).



Entre estas 14 isoformas de Glut se encuentran Glut2 y Glut4 los cuales están altamente relacionados entre sí y son de suma importancia para la regulación del metabolismo de la glucosa, debido a que se encuentran en órganos metabólicamente activos como el páncreas y el hígado (Castrejón., et al 2007).

**Tabla 2. Isoformas de GLUT.** Tomado de Castrejón., et al 2007.

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

### Expresión génica de Cornichon en *Mus musculus*

En una recopilación de datos de hibridaciones *in situ* en embriones de ratón desplegada en la página de *expression atlas*, se destaca que *Cnih1* y *Cnih4* se encuentran con un nivel de expresión alto tanto en hígado como en páncreas, mientras que *Cnih2* se encuentra con niveles bajos en el páncreas y por debajo del límite en hígado y páncreas y *Cnih3* se expresa con un nivel por debajo del límite en páncreas, por lo que para este trabajo decidimos trabajar únicamente con *Cnih1* y *Cnih4* que son los que tienen mayor nivel expresión en tejidos metabólicamente importantes para el modelo dietético de ratón que vamos a utilizar. Los registros generales que encontramos los resumimos en la Tabla 3.

**Tabla 3. *Cornichon* y sus niveles de expresión en distintos órganos y tejidos de *Mus musculus*.** Tomado de *Expression Atlas*

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

## **Histología del páncreas**

Histológicamente el páncreas está compuesto por una parte exocrina y por otra endocrina. Los acinos pancreáticos son los que van a generar las enzimas que serán útiles en la digestión, las cuales se drenan en el conducto pancreático hasta llegar al duodeno, estos acinos componen al páncreas exocrino y los islotes pancreáticos, descubiertos en 1869 por Paul Langerhans, componen al páncreas endocrino.

La importancia de los islotes radica en que representan el centro de control de la homeostasis de la glucosa en el organismo y, para conseguirlo, deben estar ricamente vascularizados e innervados, de manera tal que puedan responder a los estímulos metabólicos, endocrinos o nerviosos que constantemente se producen en el organismo (George Palop, M., 2006).

Los islotes varían considerablemente de tamaño, desde unas pocas docenas de células hasta miles de ellas. En los roedores, las células del páncreas endocrino son generadas en dos etapas durante el desarrollo embrionario (Bastidas-Ponce A., et al., 2019). En la primera etapa se produce principalmente glucagón a partir de las células  $\alpha$  que ocupan la periferia del islote y, posteriormente, en la segunda etapa se forman las células  $\beta$  que sintetizan insulina y que ocupan una gran parte del centro del islote. Las células  $\delta$  que sintetizan somatostatina, las células PP que producen polipéptido pancreático y las células  $\epsilon$  sintetizadoras de grelina, son los otros tipos celulares que están distribuidos entre las células  $\beta$  y  $\alpha$  en los islotes. La proporción de células  $\beta$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$  y PP en un islote adulto es de 68:20:10:2 respectivamente. Las hormonas como la insulina, que se producen en los islotes pancreáticos, son liberadas directamente a los capilares sanguíneos y a través de la vena porta, son transportadas hasta el hígado y al resto del organismo (George Palop, M., 2006).

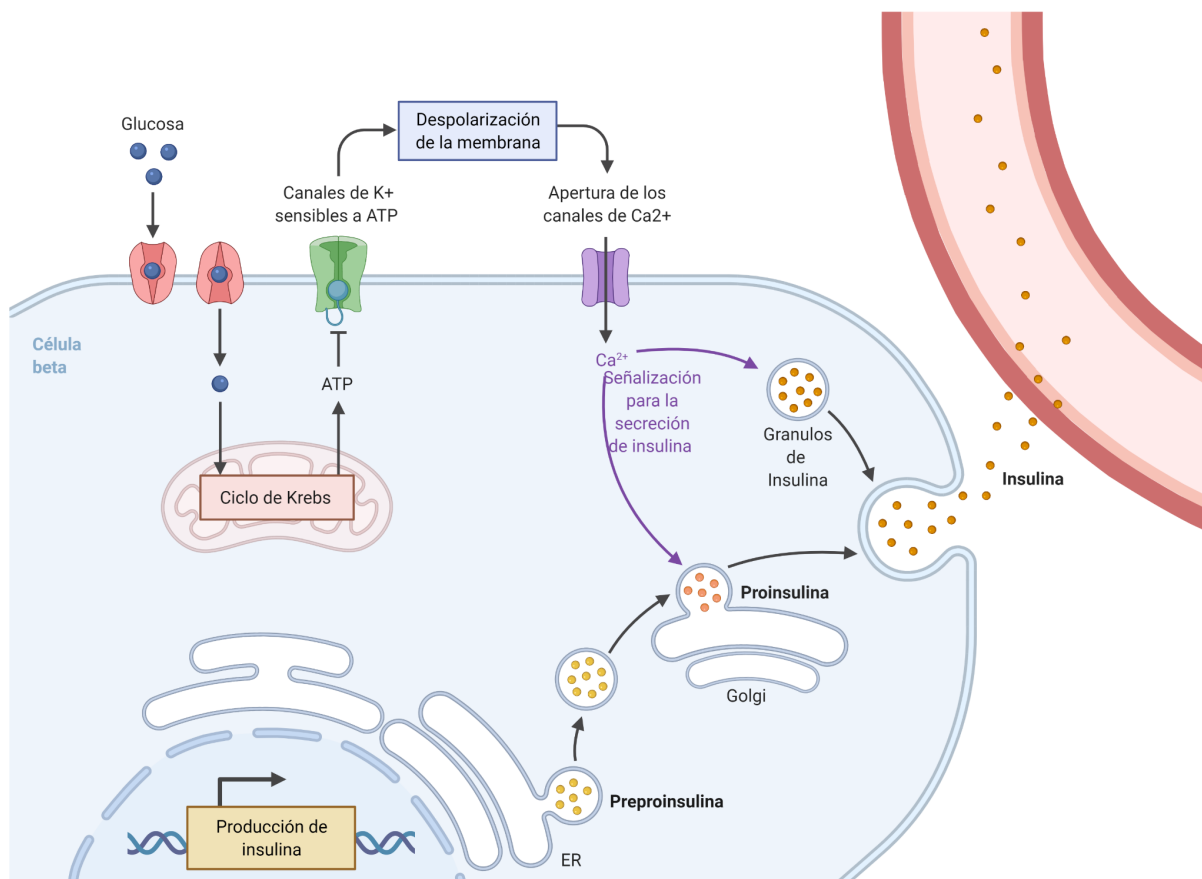
### **Síntesis y secreción de la insulina**

La insulina, como otras proteínas exportables, es sintetizada por ribosomas asociados al RE rugoso. Los 25 primeros aminoácidos de la preproinsulina constituyen el péptido señal que permite la entrada de la proteína dentro del RE, asegurando la descarga de la preproinsulina al espacio cisternal. Posteriormente, se

produce una separación proteolítica del péptido señal, con lo que la preproinsulina se convierte en proinsulina que, rápidamente, se pliega y se forman los puentes disulfuro. La proinsulina está formada por una única cadena polipeptídica de 86 aminoácidos, contiene las cadenas A y B de la insulina con la misma conformación, pero se encuentran unidas por un péptido de conexión de 35 aminoácidos, llamado péptido C, que une el extremo carboxiterminal de la cadena B con el extremo aminoterminal de la cadena A (George Palop, M., 2006).

Una vez plegada, la proinsulina se transporta al AG donde es empaquetada en vesículas. La conversión de proinsulina a insulina implica la acción secuencial de proteasas específicas, la PC1 (también conocida como PC3) y la PC2, que se encuentran presentes en los gránulos de almacenaje. Estas endopeptidasas rompen la molécula en lugares específicos provocando la separación del péptido de conexión. Al liberarse del péptido C, la insulina, dado que se convierte en una molécula menos soluble, forma cristales en presencia de Zn, lo que permite el almacenamiento de la hormona de forma más concentrada (Landström, A. H. S., *et al.*, 1998).

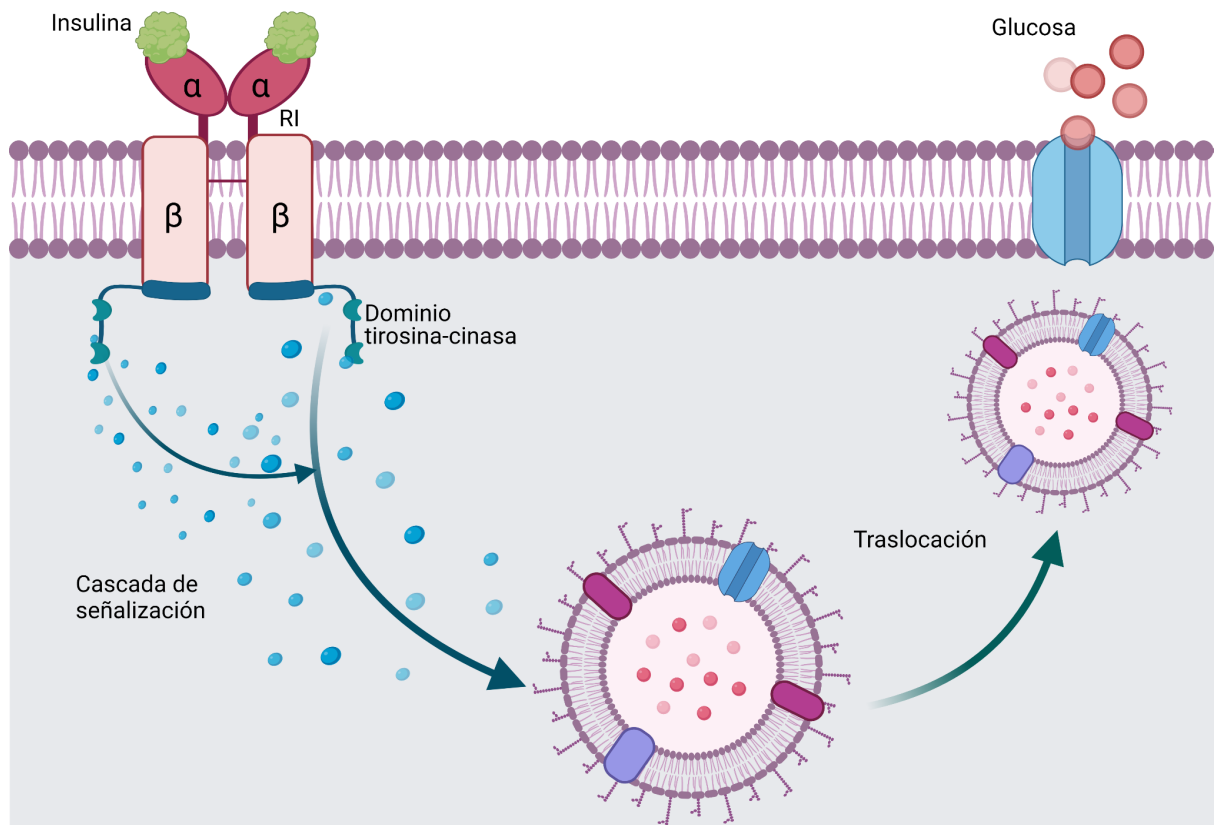
Una vez sintetizada y almacenada en vesículas, la insulina se secreta principalmente en respuesta a la entrada de glucosa a las células  $\beta$  pancreáticas, a través de los transportadores Glut2 con menor afinidad y Glut4 con mayor afinidad (como se describe en la Tabla 2). Después la glucosa, para estimular la secreción de insulina en las células  $\beta$ , debe ser metabolizada a través de la glucólisis y el ciclo de Krebs. El incremento en los niveles de ATP intracelular lleva al cierre de canales de potasio dependientes de ATP (KATP), la consiguiente despolarización de membrana abre los canales de calcio dependientes de voltaje, esto conlleva la entrada y el incremento de la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular, lo que da como resultado la exocitosis de la insulina de los gránulos de secreción (Fig. 6) (Docherty & Clark., 1994) a los capilares sanguíneos y, a través de la vena porta, son transportadas hasta el hígado y al resto del organismo para cumplir con su principal función que es reducir la concentración de glucosa en la sangre, promoviendo su transporte al interior de las células (George Palop, M., 2006).



**Figura 6. Secreción de insulina.** Una vez que la glucosa es metabolizada en el interior de la célula, genera ATP y esto a su vez promueve el incremento de calcio intracelular y en consecuencia la señalización para la secreción de la insulina. Creada con biorender.

### Regulación del transporte de glucosa por la insulina

Una vez que la insulina llega al hígado, es reconocida por las 2 subunidades alfa del receptor insulina (IR, *Insulin Receptor*), lo cual generará un cambio conformacional en la estructura beta del IR y activa la función quinasa de las subunidades  $\beta$  dando como resultado una autofosforilación en los residuos de tirosina. Estas subunidades fosforiladas serán reconocidas principalmente por las proteínas IRS (sustrato de IR) que darán paso a las vías de señalización que dependen de un orquestado número de interacciones proteicas y que, a su vez, promoverán la translocación del transportador Glut4 desde los compartimentos intracelulares a la membrana plasmática (Fig. 7) (Reyes, J., & Plancarte, A., 2008). Sin embargo, cuando la insulina no es suficiente debido a enfermedades como la diabetes mellitus, esta regulación del transporte de glucosa se ve afectada y trae consigo consecuencias de salud no favorables como hiperglucemia, lipodistrofia, deshidratación, etc. (Aronoff, S. L., *et al.*, 2004), promoviendo un incremento excesivo no controlado de la glucosa en la sangre.



**Figura 7. Regulación del transporte de glucosa por la insulina en órganos insulino-dependientes.** La insulina se une al RI, se autofosforila y activa a los dominios de tirosina-cinasa y genera múltiples vías de señalización que promueven la translocación de las vesículas que contienen a los Gluts. Creado en biorender.

### **Diabetes mellitus**

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad relevante desde el punto de vista individual, familiar y comunitario, ya que produce diversos grados de incapacidad e induce cambios en la dinámica social del individuo, debido a las incomodidades de un tratamiento y control de por vida. Desde el punto de vista epidemiológico su frecuencia, prevalencia y mortalidad señalan con claridad que se trata de un problema de salud pública de primera magnitud en la República Mexicana (Rodríguez y Menez, 1994).

La DM es una enfermedad que daña directamente a las células  $\beta$  en los islotes pancreáticos, ya que puede ocasionar una disminución o deterioro progresivo en la producción de estas células (DM tipo 1) o bien, una disminución en la eficacia de los mecanismos de señalización (DM tipo 2) (Olvera-Granados, C., 2008).

### **Modelo diabético murino**

Los ratones son ampliamente conocidos como un excelente modelo de estudio para una amplia variedad de rasgos y enfermedades, incluidos los involucrados en el metabolismo, el desarrollo, los trastornos neurológicos, la inmunidad, la diabetes mellitus, etc. ya que este modelo biológico es muy manejable debido a su tamaño y comportamiento, es fácil de criar y tienen un ciclo vital rápido en comparación con otros mamíferos (Phifer-Rixey, M., & Nachman, M. W. 2015).

### **Modelo inducido con estreptozotocina (STZ)**

Una forma de inducir DM en ratones es utilizando STZ, que es un antibiótico natural producido por *Streptomyces achromogenes*, una bacteria gram-negativa. Es un análogo estructural de la N-acetilglucosamina, que afecta el transporte de la glucosa, la actividad glucoquinasa y roturas de doble cadena en el ADN, en las células  $\beta$  del páncreas (Islam & Loots, 2009).

Suele inyectarse intraperitonealmente con dosis de 35-65 mg/kg de peso corporal en ratas y de 100-200 mg/kg de peso corporal en ratones (Rees & Alcolado, 2005). La sensibilidad a la STZ varía según la especie animal, la cepa, el sexo, la edad y el estado nutricional, el modo y ruta de su administración resultan determinantes para su efecto. Una única dosis importante de estreptozotocina puede inducir diabetes en los roedores, sin embargo, generalmente se aplica en forma de múltiples dosis pequeñas (p. ej. 50 mg/kg en 5 días consecutivos) (Arias-Díaz J., *et al.*, 2007).

### **Mecanismo de acción de la estreptozotocina**

La STZ es un análogo de nitrosourea en el que el residuo de N-metil-N-nitrosourea, está enlazado al carbono-2 de una hexosa, esta es la razón por la que la estreptozotocina se acumula selectivamente en las células  $\beta$  pancreáticas a través del transportador de glucosa Glut2 de baja afinidad en la membrana plasmática. La importancia de Glut2 en este proceso también se demuestra debido a que se ha observado que la estreptozotocina también daña otros órganos que expresan este transportador, en particular al riñón y al hígado.

Una vez dentro de la célula, la STZ es metabolizada y el residuo de nitrosourea tiene dos mecanismos de acción de acuerdo a la dosis, en el primero con dosis bajas, los residuos se convierten en nitratos que inducen una glucólisis anaeróbica, por lo tanto no habrá un incremento en la producción de ATP, en respuesta a los niveles bajos de ATP la célula tiene como vía alterna a la xantina oxidasa para

mantener los niveles energéticos en homeostasis, sin embargo, esta genera muchos radicales libres, entre ellos oxígeno molecular, peróxido de hidrógeno, hidroxilos y óxido nítrico que van a dañar al ADN, generando poli ribosilación-ADP en la unión de las guaninas, y a su vez apoptosis. El otro mecanismo de acción es cuando se inyectan dosis muy elevadas de STZ en periodos cortos, en este caso ocasiona directamente una alquilación del ADN provocando la poli ribosilación-ADP, reduciendo los niveles energéticos y provocando necrosis en la célula (Lenzen, S., 2008; Szkudelski, T., 2001).



## **JUSTIFICACIÓN**

La célula requiere capturar glucosa desde el espacio extracelular hacia su interior para mantener sus funciones básicas para ello requiere de los transportadores de hexosas los cuales, después de su síntesis, requieren de la maquinaria de transporte vesicular para salir del retículo endoplasmático y ser transportados a la membrana plasmática donde cumplirán con su función. Entre las proteínas de la maquinaria de transporte vesicular encargadas de seleccionar a los transportadores de hexosas para seguir la vía está el receptor cargo Erv14, que en *S. cerevisiae* se ha comprobado que regula el transporte de al menos dos transportadores de hexosas.

Las células de mamíferos utilizan la glucosa como principal fuente de energía, y su internalización a la célula también requiere de transportadores de glucosa como los Gluts, los cuales aún no se sabe si en mamíferos, estos requieren de un receptor cargo, como Cornichon para regular su transporte, por lo que el estudio de estos dos tipos de proteínas, resultan de gran interés debido a las implicaciones que estos podrían tener en la regulación de la glucosa, en enfermedades como la DM, a nivel molecular y celular, y la trascendencia que podría tener en el futuro, en relación a encontrar otros blancos terapéuticos en el tratamiento de enfermedades metabólicas.

## **HIPÓTESIS**

Tanto Cnih1 como Cnih4 interactúan con el transportador de glucosa, Glut2, en el tráfico vesicular y, a su vez, se expresan en conformidad a la demanda de glucosa en sangre.

## **OBJETIVO GENERAL**

Observar la posible regulación de la expresión génica de *Cornichon*, en un modelo de diabetes en ratón y su potencial relación con los transportadores de glucosa.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1.- Analizar la filogenia de *Cnihs* en las especies más representativas de los metazoos.

2.-Determinar si *Glut2* interactúa con *Cnih1* y *Cnih4*.

3.-Evaluar la expresión génica de *Cnihs* en los islotes de Langerhans e hígado en un modelo murino de diabetes.

## **METODOLOGÍA**

### **Análisis in silico de la filogenia de Cnihs**

Para realizar el árbol filogenético de *Cornichon* en los metazoarios, se tomó en cuenta el artículo de Laumer, C., *et al*, 2019, en el cual se realizó un análisis de las especies más representativas de los metazoarios en la actualidad clasificándolas filogenéticamente, con base en esto hicimos una búsqueda de las secuencias de aminoácidos de las especies más representativas de acuerdo a los árboles descritos en el artículo antes mencionado. Posteriormente, se utilizó *blastp* para comparar las secuencias de los Cnihs en *Mus musculus* con la lista de las especies que se seleccionaron previamente, una vez obtenidas todas las secuencias bajo el criterio de un E-value mínimo de  $1e-15$ , se alinearon en la página de *muscle alignment* y el resultado se guardó en formato FASTA para poder procesarlo en el software IQ-tree y obtener una inferencia filogenética por máxima verosimilitud (Lam-Tung, *et al*, 2015), y analizar la reconstrucción filogenética de acuerdo a los valores de *ultrafast bootstrap (1000 réplicas)* (Diep T., *et al*, 2017) obtenidos, los cuales corresponden a las repeticiones estadísticas de la comparación entre las secuencias en el procesamiento del árbol en el programa, finalmente, para visualizar mejor la topología del árbol y los valores correspondientes de bootstraps para cada clado utilizamos el programa de *Fig tree*. Posteriormente, se realizó un alineamiento en *muscle alignment* de la secuencia de los cuatro Cnihs en *M. musculus* comparándolos con sus ortólogos en *H. sapiens* y *S. cerevisiae* y los analizamos en MEGA.

### **Modelo diabético murino**

Se utilizaron ratones machos de 8 semanas de edad de la cepa de ratón C57BL/6, criados y alojados en la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, de acuerdo al capítulo cuarto y quinto del reglamento interno del bioterio, con una temperatura de  $22^{\circ}\text{C} \pm 2$ , con un ciclo de luz/oscuridad de 12/12h y con alimento *ad libitum*.

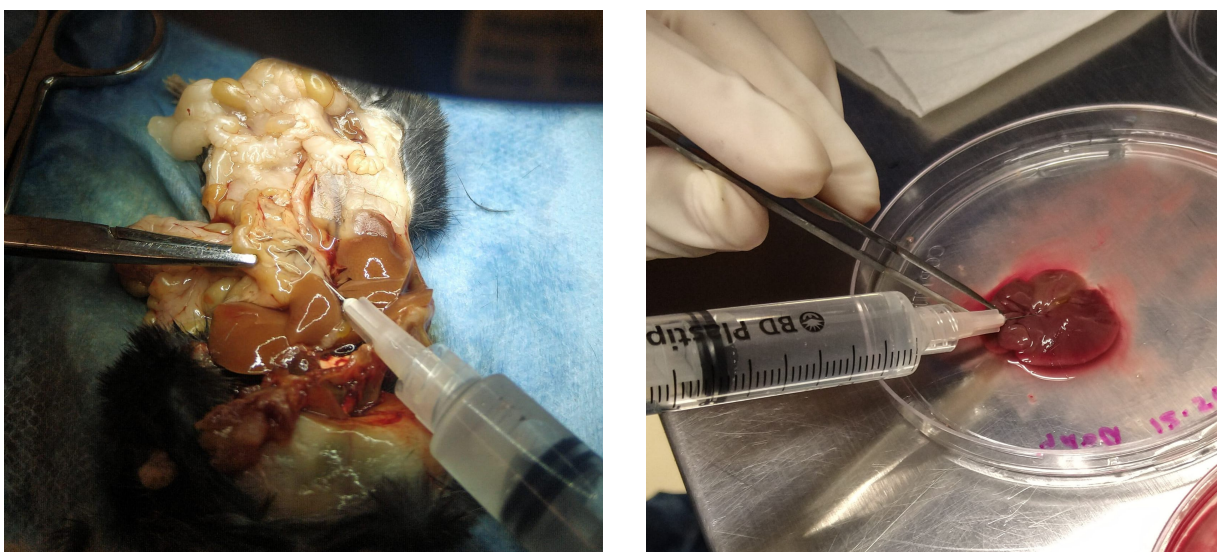
Se formaron 2 grupos de ratones: para el grupo experimental ocupamos 10 ratones, los cuales fueron inyectados intraperitonealmente (IP) con estreptozotocina disuelta en buffer de citrato a un pH 4.5, a una concentración de 50 mg/kg, durante 5 días

consecutivos con 4h de ayuno previo. Por otro lado, se inyectó IP al grupo control, que constó de 6 ratones, con buffer de citrato, los mismos días y en las mismas condiciones que los del grupo experimental. Después de la última inyección, las condiciones de salud de los animales fueron monitoreadas una vez por semana, durante 3 semanas, se les midió el peso con una balanza digital, al igual que el alimento consumido y los niveles de glucosa con 4h de ayuno previo para confirmar su hiperglucemia con tiras reactivas a partir de muestras de sangre extraídas de la vena (caudal) de la cola de los ratones, utilizando un glucómetro digital.

### **Obtención de los islotes pancreáticos e hígado**

Una vez hiperglucémicos, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical como lo marca la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

Se realizó una incisión abdominal con tijeras de disección hasta exponer el páncreas y el hígado, y se identificó el conducto pancreático central y el duodeno para sellarlos con una pinza. A través del conducto biliar común se perfundió en su totalidad el páncreas con solución de colagenasa P (1 mg/ml. Fig. 8), después se disectó y se transfirió a un tubo falcón con 3 ml de solución de colagenasa P. Por su parte, el hígado se perfundió con DPBS hasta quedar de un color blanquecino, posteriormente se cortó en partes pequeñas de 40 mg aproximadamente y cada parte se almacenó a -80°C en tubos eppendorf.



**Figura 8. Perfusión de páncreas e hígado.** El páncreas se perfundió con colagenasa P por el conducto biliar (panel izquierdo) y perfusión de hígado con DPBS (panel derecho).

Para comenzar la digestión del páncreas se incubó en baño maría a 37°C durante 13 min, agitando el contenido a la mitad del tiempo para que se disgregara mejor. Para detener la digestión, el tubo se colocó en hielo y se le añadieron 15 ml de solución G [ solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) + 1% albúmina de suero bovino (BSA)].

Posteriormente el tubo se centrifugó a 1620 rpm por 3 min a 4°C, al término, se lavó una vez con 10 ml de solución G y se resuspendió en 5.5 ml del medio de gradiente (3.75 mM HEPES, 62.5% v/v de solución G, y 25% v/v de Medio de gradiente Optiprep).

Una vez resuspendido, se agregaron lentamente a los 2.5 ml del medio de gradiente restante y, finalmente, 6 ml de solución G, suavemente, en la parte superior para formar la tercera fase y se dejó 10 min en incubación a temperatura ambiente (TA). A continuación, el gradiente se centrifugó a 1700 rpm durante 20 min, a TA, con aceleración 3 y freno 0. Al término de la centrifugación, los islotes se encuentran en la interfase entre la fase media y la superior, formando un anillo que se ve a simple vista (Fig. 9).

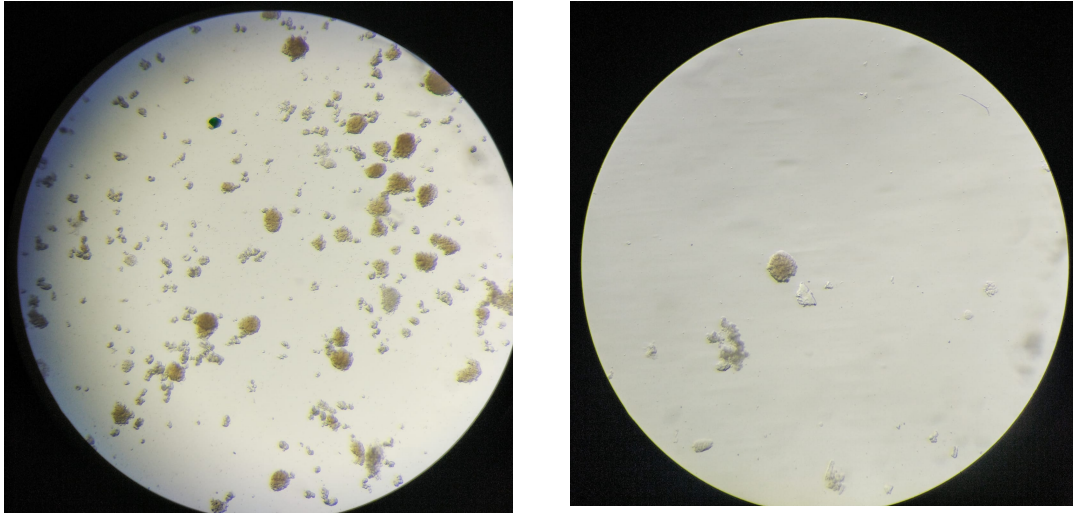


**Figura 9. Aislamiento de islotes.** Anillo de islotes formado en la interfase entre la fase superior y la inferior del medio de gradiente y señalado con una flecha roja.

Esta interfase se capturó con una pipeta y se colocó en un filtro de 70  $\mu\text{m}$  con solución G (la pipeta y el filtro deben estar previamente humedecidos con solución G) y se lavó dos veces en 10 ml de solución G.

Para cosechar los islotes el filtro se giró y se lavó para depositar los islotes en una

caja de Petri para, finalmente, recolectarlos con un micropipeta bajo el microscopio estereoscópico (Fig. 10). Al término de la colecta se centrifugó el tubo a 1000 rpm para quitar el sobrenadante, se añadieron 0.5ml de trizol y se guardaron a  $-80^{\circ}$ , para su uso posterior.



**Figura 10. Islotes recuperados.** Fotografías de los islotes recuperados que se observaron bajo un microscopio estereoscópico, en la imagen del panel izquierdo se observan los islotes abundantes de un ratón del grupo vehículo, y en la imagen del panel derecho los islotes recuperados de un ratón tratado con STZ.

#### Soluciones

HBBS para 1 L

|                                      |         |
|--------------------------------------|---------|
| NaCl                                 | 8 g     |
| KCl                                  | 400 mg  |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 147 mg  |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 200 mg  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>     | 42.6 mg |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 60 mg   |
| D-glucosa                            | 1 g     |
| NaHCO <sub>3</sub>                   | 350 mg  |

DPBS para 500 ml

|                                      |        |
|--------------------------------------|--------|
| NaCl                                 | 4 g    |
| KCl                                  | 100 mg |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 65 mg  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 100 mg |
| MgHPO <sub>4</sub>                   | 50 mg  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>     | 565 mg |

### **Extracción de ARN**

Una vez que se obtuvieron los islotes pancreáticos y el hígado se utilizó trizol para extraer ARN, según las indicaciones del proveedor.

Se tomaron alrededor de 80-100 islotes por cada n y se disgregaron con 0.5 ml de Trizol. Por su parte, el hígado fue macerado con nitrógeno líquido en un mortero enfriado previamente y se le añadió 1 ml de trizol.

Posteriormente, se incubaron las muestras homogeneizadas durante 5 min a temperatura ambiente para permitir la disociación completa de los complejos de nucleoproteínas, se adicionaron 0.2 ml de cloroformo por cada mililitro de Trizol y se agitó vigorosamente durante 15 segundos.

Luego se centrifugó la muestra a 12,000 g durante 15 min a 4°C. A continuación, se transfirió la fase acuosa a un tubo eppendorf nuevo y se agregaron 0.5 ml de isopropanol, se mezcló por inversión durante 15 seg y se incubó la muestra durante toda la noche a -20°C.

Al otro día se centrifugó a una velocidad de 12,000 g durante 30 min a 4°C, y el ARN se precipitó y formó un pellet en el fondo del tubo.

Se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet con 1 ml de etanol al 75%. Mezclamos la muestra en el vórtex y centrifugamos a una velocidad de 6,000 g durante 5 min, a 4°C, retiramos el sobrenadante y se repetimos todo el proceso nuevamente para obtener un ARN más puro.

Finalmente dejamos secar el pellet de ARN obtenido por un periodo corto a temperatura ambiente y resuspendimos el ARN en 20-100 µl de agua DEPEC (de acuerdo al tamaño del pellet).

Posteriormente cuantificamos el ARN en el nanómetro y para verificar la integridad del ARN mezclamos 1 µg de ARN con agregamos 3 volúmenes de buffer de urea 10 M y lo corrimos en un gel de agarosa al 1% teñido con Hydragreen. Las muestras restantes las guardamos a -80°C para su uso posterior.

### **Síntesis de ADNc**

Para eliminar el ADN genómico que pudiera estar contaminando el ARN se hizo una reacción de 10 ul para cada muestra:

| Componente          | Volumen        |
|---------------------|----------------|
| 10x ezDNase™ Buffer | 1 ul           |
| ezDNase™ Enzima     | 1 ul           |
| ARN                 | 1 ug           |
| H2O                 | Aforar a 10 ul |

Se mezcló gentilmente y se colocó a 37°C durante 2 min, posteriormente se colocó en hielo para enfriar la reacción durante 1 min y luego se centrifugó al máximo durante 30 s y se dejó en hielo.

Para la síntesis de ADNc se utilizó la enzima Superscript del kit #73693 de Jena Bioscience, esta enzima se ocupó únicamente para sintetizar el ADN que se usó para probar los oligos y realizar las amplificaciones de los genes posteriormente.

Para cada muestra se utilizaron los siguientes componentes:

|                                  |                |
|----------------------------------|----------------|
| RNA                              | 1 ug           |
| Oligos dT (100 uM)               | 1 ul           |
| H <sub>2</sub> O libre de RNAsas | Aforar a 10 ul |

Esto se mezcló con la micropipeta y se calentó a 65°C durante 5 min y después se colocó en hielo durante 5 min, posteriormente se le agregó la siguiente mezcla:

|               |      |
|---------------|------|
| Buffer 5x     | 4 ul |
| dNTPs (10 mM) | 1 ul |



|                  |        |
|------------------|--------|
| DTT (100 mM)     | 1 ul   |
| RNAsa            | 0.5 ul |
| Transcriptasa    | 0.5 ul |
| H <sub>2</sub> O | 3 ul   |

Esto se mezcló con la micropipeta y se incubó a 42°C por 10 min y luego a 50°C por 60 min.

Para el RT-qPCR se utilizó la enzima SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System de *Invitrogen*.

Mezcla para alinear los primers con el ARN

|                  |                |
|------------------|----------------|
| Oligo dT 50 mM   | 1ul            |
| dNTP mix 10 mM   | 1ul            |
| ARN              | 500 ng         |
| H <sub>2</sub> O | Aforar a 10 ul |

Se mezcló, se centrifugó durante 30s, luego se calentó a 65°C por 5 min, y posteriormente se enfrió en hielo por al menos 1 min.

Mezcla de reacción para RT

|   |      |
|---|------|
| 5× SSIV Buffer                                    | 4 ul |
| DTT 100 mM  | 1 ul |
| Inibidor ribonucleasa                             | 1 ul |
| Transcriptasa o H <sub>2</sub> O para el control. | 1 ul |

Se mezcló y se centrifugó durante 30 s, posteriormente se mezcló la reacción con la mezcla de alineamiento dando un volumen final de 20 ul, luego se incubó durante 10 min a 50°C, y para inactivar la reacción se incubó por 10 min a 80°C. Finalmente se le agregó un 1 ul de RNAsa y se incubó a 37°C durante 20 min.

## **PCR y electroforesis**

Para comprobar que nuestro ADNc se haya sintetizado correctamente con la Superscript de *Jena Bioscience* y que no tenga ADN genómico, se realizaron PCR punto final con la Taq. polimerasa de *Jena Bioscience*, utilizando un gen constitutivo (*Rplp0*) como referencia y los oligos diseñados por el Dr. Jorge Luis Ruiz Salas para cada gen, bajo las siguientes condiciones en un termociclador:

95°C durante 2 min para desnaturalizar el ADN.

35 ciclos de:

95°C durante 20 s para desnaturalizar el ADN en cada ciclo

60°C durante 20 s para alinear los oligos con nuestro ADN molde

72°C durante 30 s para elongar el ADN y comenzar a generar múltiples copias en cada ciclo.

72°C durante 5 min de elongación final.

Una vez amplificados nuestros genes, se realizó una electroforesis con un gel de agarosa al 1% y se corrió en buffer TAE al 0.5%, esta técnica nos permite separar las moléculas por tamaño y peso molecular, de acuerdo a su carga eléctrica, permitiéndonos a su vez la obtención de nuestros genes de interés en forma de bandas en un gel de agarosa para su posterior purificación y en este caso clonación.

## **RT-qPCR**

A diferencia de la PCR convencional, la RT-qPCR o PCR cuantitativa, es mucho más específica ya que nos permite cuantificar de manera precisa, la expresión de los genes de interés.

En este caso se decidió evaluar la expresión génica de los cuatro *Cnihs* de ratón en islotes pancreáticos y en el hígado.

En esta técnica, el termociclador que se utiliza hace incidir sobre cada muestra un haz de luz de una longitud de onda determinada y después detecta la luz emitida por el fluoróforo excitado, que en este caso es el SYBR green, el cual se une únicamente a segmentos de doble cadena de ADN. Así, cuando se comienza la

elongación y extensión en cada ciclo, el fluoróforo se une al nuevo ADN de doble cadena sintetizado, lo cual se traduce en una gráfica de crecimiento logarítmico.

Una vez finalizada la PCR se hizo electroforesis para verificar que solo haya amplificado un producto y que este sea del tamaño esperado.

**Tabla 4.** Secuencias de oligonucleótidos utilizados para el RT-qPCR y los tamaños correspondientes de cada gen.

| Gen           | 5'-3'                  |
|---------------|------------------------|
| qRTRplp0_F    | CACTGGTCTAGGACCCGAGAA  |
| qRTRplp0_R    | AGGGGGAGATGTTTCAGCATGT |
| qRT_MmCNIH1_F | CGCGTTCTTCTGTGTCATGT   |
| qRT_MmCNIH1_R | TCTGCATTCATGATGGTCGT   |
| qRT_mMCHIN2-F | GCGGACTGACTTCAAGAACC   |
| qRT_MmCNIH2_R | TGCTGCACACAGAAACATCA   |
| qRT_mMCHIN3-F | AATCGCCTTTGACGAGCTAA   |
| qRT_MmCNIH3_R | ACATTGAGTCCCAGGGTGAG   |
| qRT_mMCHIN4-F | CTTCTCGCTCCTCGACTGTT   |
| qRT_MmCNIH4_R | CAAGCATCAGCACAGTGACA   |

|          |        |
|----------|--------|
| qRTRplp0 | 160 pb |
| MmCNIH1  | 153 pb |
| MmCNIH2  | 157 pb |
| MmCNIH3  | 201 pb |
| MmCNIH4  | 170 pb |

La RT-qPCR se realizó con el ADNc que se hizo a partir de los ARN extraídos y mencionados anteriormente y se utilizó un master mix SYBR Green en un termociclador Step-One (*Applied Biosystems*). La reacción se hizo con un volumen total de 12.5 µl, en el cual se mezcló el ADNc, los oligos, el master mix del SYBR Green y el agua milli-Q. Después programamos la amplificación en el termociclador, la cual consta de una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min y 40 ciclos rápidos que se divide en 3 etapas:

1. Desnaturalización a 95°C por 15 s
2. Hibridación a 60°C durante 15 s
3. Extensión y lectura de la fluorescencia a 72°C durante 15 s.

### **Amplificación y clonación de *Glut2*, *Cnih1* y *Cnih4***

Para observar la posible relación entre *Cnih1* y *Cnih4* con *Glut2*, mediante el ensayo de mbSUS que se describirá más adelante, es necesario realizar una extracción de ARN, luego la síntesis de ADNc para amplificar a nuestros genes por medio de una PCR tal y como se describió en la sección de síntesis de ADNc, utilizando los siguientes oligos:

**Tabla 5. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes de interés.** Las secuencias subrayadas indican los sitios de recombinación attB1 y attB2.

| Gen         | 5'-3'   |
|-------------|---|
| MmCNIH1_Fwd | <u>GTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCGTTCACC</u><br>TTCGCAGCAT    |
| MmCNIH1_Rev | <u>GTACAAGAAAGCTGGGTCTTAGAAGCTCAC</u><br>CAACGTATAAACCA |
| MmCNIH4-Fwd | CACCATGGAGGCGGTGG                                       |
| MmCNIH4-Rev | GTCATTTATCAAAGCTAGAATCA                                 |
| Slc2a2_Fwd  | <u>GTACAAAAAAGCAGGCTTCATGTCAGAAGAC</u><br>AAGATCACCGG   |
| Slc2a2_Rev  | <u>GTACAAGAAAGCTGGGTCCACACTCTCTGA</u><br>AGACGCCAGGA    |

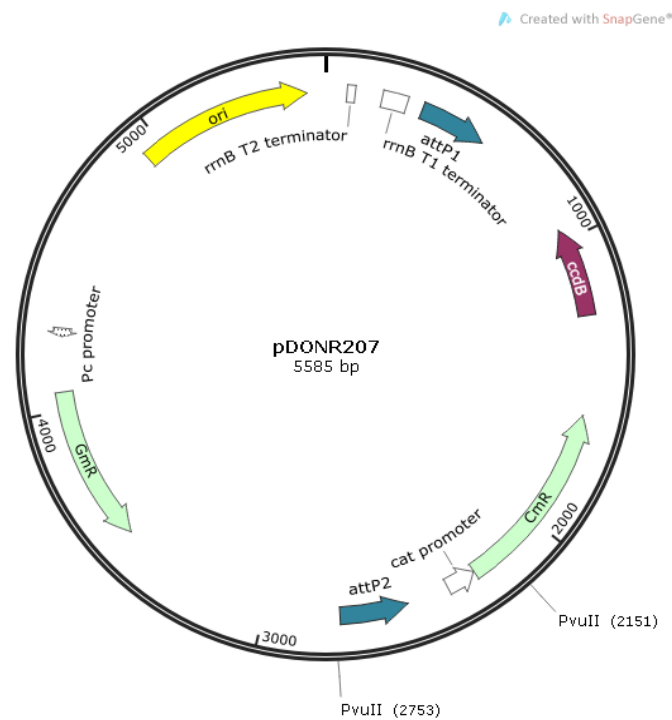
**Tabla 6. Tamaños y Tm correspondientes a cada gen.**

| Gen             | Tamaño  | Tm   |
|-----------------|---------|------|
| <i>MmCNIH1</i>  | 435 pb  | 60°C |
| <i>MmCNIH4</i>  | 423 pb  | 60°C |
| <i>MmSlc2a2</i> | 1572 pb | 59°C |

Para clonar a *Cnih1* y *Glut2* dentro de los diferentes sistemas se decidió hacerlo con la tecnología Gateway de *Invitrogen*, ya que consiste en una recombinación sitio-específica, basada en el mecanismo de integración y escisión del fago lambda.

De manera específica el sistema emplea la recombinación del sitio reversible entre attB, attP, attL y attR, reacciones que ocurren durante la integración del fago λ en el genoma de *E. coli*, permitiendo una clonación direccional dentro de un plásmido, usando una reacción simple, la cual es particularmente ventajosa en la construcción de fusiones traduccionales.

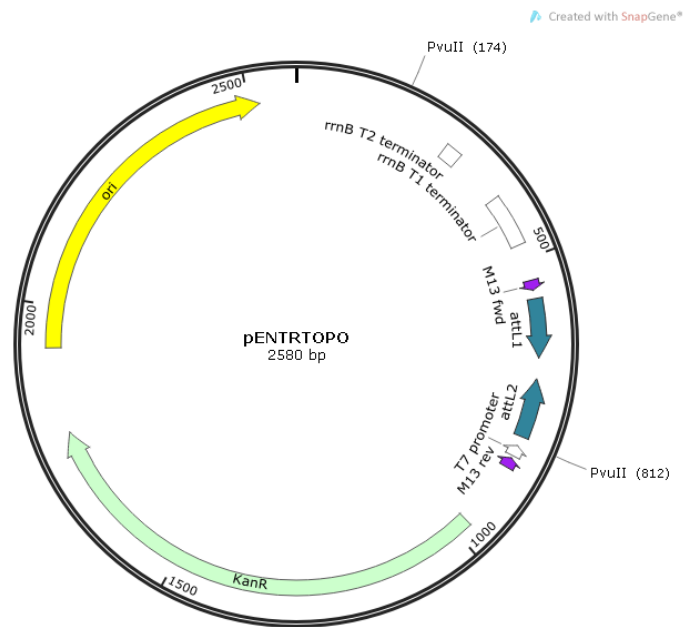
Lo primero que hicimos fue amplificar los genes de interés en una primera PCR para obtener el amplicón de cada uno de los genes se utilizaron las secuencias descritas en la tabla 6 , una vez amplificados, posteriormente los amplicones se purificaron con el kit Promega y se realizó una segunda PCR para añadir los sitios attB1 y attB2 restantes. La clonación se llevó a cabo en el vector de entrada pDONR207 (Fig. 11) mediante una reacción de BP clonasa (*Invitrogen*).



**Figura 11. Vector de entrada pDONR207 para *Cnih1* y *Glut2*.** Vector de entrada con un tamaño de 5585 pb, con los sitios de recombinación homóloga attP1 y attP2 y con los sitios de corte de PvuII. Creado en snapgene.

El *Cnih4* se clonó con TOPO™ *cloning technology* de *Invitrogen*. Algo clave de esta tecnología es que los vectores TOPO™ son linealizados con la topoisomerasa I que se une de manera covalente al extremo fosfato 3', permitiendo que los vectores se ligan fácilmente al ADN. La topoisomerasa I del virus *Vaccine* funciona como enzima de restricción y como ligasa, ya que corta y une al ADN durante la

replicación y, gracias a la formación de esos enlaces covalentes con los fosfatos, el ADN se puede clonar de manera eficiente (Fig. 12).



**Figura 12. Vector de entrada pENTRTOPO para el *Cnih4*.** Vector de entrada de 2180 pb, con los sitios de recombinación homóloga attL1 y attL2, y con el sitio de corte correspondiente a PvuII. Creado en snapgene.

Los productos que obtuvimos de la secuenciación se clonaron en los vectores de destino correspondientes, pNX32 para los *Cnihs* y pMETYC para *Glut2* (Figura 13), mediante una reacción de LR clonasa siguiendo las recomendaciones del proveedor (*Invitrogen*). Posteriormente, para recuperar las construcciones plasmídicas, realizamos una transformación en *E. coli*, extraímos el ADN plasmídico, después hicimos un análisis de restricción con la enzima PvuII y, finalmente, una transformación en levaduras para poder realizar nuestro ensayo de interacción proteína-proteína (mBSUS).

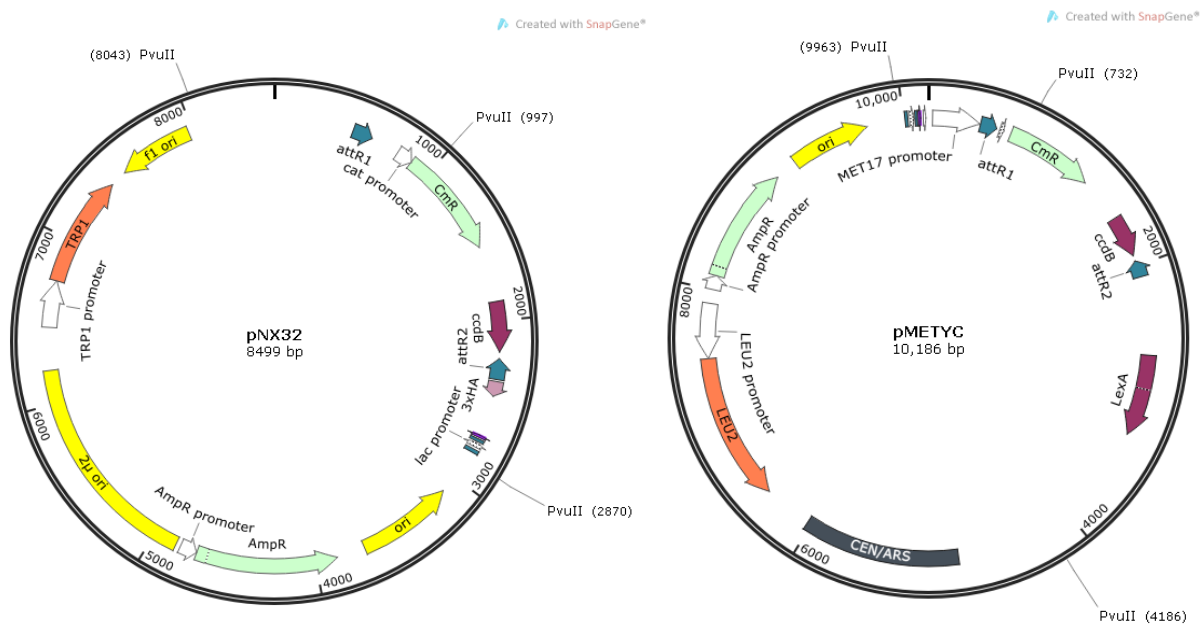
### **Transformación en *E. coli* mediante choque térmico**

Se agregó 4  $\mu$ l de nuestra reacción BP o LR a las células competentes hechas previamente y se dejó en hielo durante 15 min, luego se calentó durante 1 min a 42°C e inmediatamente después se colocó en hielo por 5 min.

A continuación se le agregó 250 ul de medio LB líquido y se incubó durante 1 h a 37°C.

Finalmente, se plaqueó en cajas petri con medio LB sólido con el antibiótico adecuado, previamente hechas, y se dejaron crecer a 37°C de 12 h a 16 h.

Nota: después de dejar crecer las bacterias, picamos colonias e inoculamos en 3 ml, aproximadamente, de medio LB líquido y las dejamos incubando a 37°C durante toda noche en tubos de ensayo para poder extraer, posteriormente, el plásmido.



**Figura 13. Vectores de destino.** En el panel izquierdo pNX32 para los genes *Cnih1* y *Cnih4* con un tamaño de 8499 pb, los sitios de recombinación homóloga *attR1* y *attR2* y con los corte correspondientes de *PvuII* y en el panel derecho pMETYC para *Glut2* con un tamaño de 10186 pb, los sitios de recombinación *attR1* y *attR2* y con los cortes correspondientes de *PvuII*. Creados en *snappgene*.

**Extracción de ADN plasmídico mediante lisis alcalina (Birnboim y Dolly, 1979)**

Agregamos aproximadamente 1 ml del cultivo de bacterias que se preparó el día anterior a un tubo eppendorf, centrifugamos a máxima velocidad y descartamos el sobrenadante.

Luego lo resuspendimos en 200 ul de solución I y homogeneizamos por inversión, a continuación se añadieron 200 ul de solución II y mezclamos por inversión suavemente y lo dejamos a TA de 3 a 5 min para que se limpie y, subsecuentemente, añadimos 200 ul de solución III y agitamos hasta que quedó

turbio y lo dejamos incubar en hielo durante 5 min.

Posteriormente, centrifugamos durante 10 min a velocidad máxima (14000 rpm) y transferimos el sobrenadante a un nuevo tubo, agregamos 1 ul de ARNasa y lo dejamos incubar durante 10 min a 37°C, después le añadimos 600 ul de cloroformo alcohol isoamílico, vortexeamos y centrifugamos durante 5 min al máximo y transferimos el sobrenadante a un nuevo tubo y le añadimos 1 ml de etanol al 100%, mezclamos con la pipeta y lo colocamos en hielo durante 5 min, luego lo centrifugamos al máximo por 15 min a 4°C y removimos el sobrenadante y lavamos el pellet con 500 ul de etanol al 70% y lo dejamos secar a TA durante 5 min y resuspendimos el pellet en 30 ul de agua destilada esteril y almacenamos las muestras a -80°C para su uso posterior.

### **Análisis de restricción**

Se realizó una digestión enzimática con los siguientes componentes para obtener un volumen final de 50 ul:

|                  |         |
|------------------|---------|
| Buffer 10x       | 5 ul    |
| ADN plasmídico   | 5 ul    |
| Enzima           | 0.5 ul  |
| H <sub>2</sub> O | 39.5 ul |

Se mezcló todo suavemente con una pipeta y se colocó durante 1 hr a 37°C.

### **Preparación de células competentes de *S. cerevisiae***

Para poder realizar la transformación en levaduras es necesario preparar células competentes de *S. cerevisiae* para realizar la parte final de la clonación y poder hacer el ensayo de interacción proteína-proteína (mbSUS) .

Lo primero que hicimos fue estriar la cepa de *S. cerevisiae* W3031A en una caja con medio YPD e incubamos a 30°C por 48 h, luego picamos una colonia de la cepa W3031A y la pasamos a un tubo de ensayo con 3 ml de medio YPD e incubamos entre 12 y 16 h a 30°C y 300 rpm.



Después inoculamos 10 ml de medio YPDA 2x contenidos en un matraz de 125 ml e incubamos a 30°C y 300 rpm durante 4 h con 100 µL del cultivo proveniente del tubo. Este volumen de medio y de inóculo nos alcanzó para una sola transformación.

En condiciones asépticas cosechamos el cultivo en un tubo falcon de 50 mL estéril y centrifugamos a 8000 rpm a temperatura ambiente durante 10 min.

Resuspendimos las células en 10 mL de agua mQ estéril (a temperatura ambiente) y las pasamos a un tubo eppendorf de 1.5 mL estéril y centrifugamos a 8 000 rpm a temperatura ambiente durante 10 min.

Resuspendimos las células en 1 mL de agua mQ estéril (a temperatura ambiente) y las pasamos a un tubo eppendorf de 1.5 mL estéril.

Centrifugamos por 1.5 min a temperatura ambiente y 7000 rpm y posteriormente desechamos el sobrenadante, (este paso se repitió dos veces más)

Posteriormente lavamos las células con 1 mL de acetato de litio (LiAc) 0.1 M. Y finalmente resuspendimos las células en 100 µL de LiAc y las almacenamos a 4 °C hasta que se terminó de preparar la mezcla de transformación.

### **Preparación de la mezcla de transformación con Acetato de Litio (LiAc)**

En un tubo falcon de 50 mL y condiciones asépticas preparamos la siguiente mezcla:

|                        |            |
|------------------------|------------|
| PEG 50%                | 220 ul     |
| LiAc 1M                | 36 ul      |
| TAE 10X                | 36 ul      |
| DMSO                   | 18 ul      |
| ADN acarreador 2 mg/ml | 50 ul      |
| ADN plasmídico         | 15-40 ul   |
| Volumen final          | 375-400 ul |

NOTA: se agregaron 40 ng de cada uno del ADN plasmídico.

Esta solución se homogeneizó con vortex.

Este volumen se usó para una sola reacción.

## **Transformación de levaduras mediante choque térmico**

Para expresar los genes de interés dentro de las levaduras, como se mencionaba anteriormente, introducimos a *Glut2* en el plásmido pMETYC\_GW y a los *Cnihs* en pXN22;32\_GW mediante la transformación de las cepas de levadura THY.AP4 [MAT $\alpha$  ura3, leu2, lexA::LacZ::trp1 lexA::HIS3 lexA::ADE2] y THY.AP5 [MAT $\alpha$  URA3, leu2, trp1, his3 loxP::ADE2], respectivamente. Las levaduras fueron transformadas con sus respectivos vectores mediante el método de Acetato de Litio (LiAc) descrito anteriormente.

Para llevar a cabo la transformación primero se precalentó el termoblock a 42 °C y luego a la mezcla de transformación que ya tiene los genes que van a clonarse se agregaron a 100  $\mu$ L de las células competentes que se habían almacenado a 4 °C. Homogeneizamos la solución que contiene la mezcla de transformación y las células por inversión y posteriormente los incubamos a 42 °C durante una hora y media. Después de hora y media de choque térmico centrifugamos los tubos a temperatura ambiente, a 5000 rpm durante 2 min y desechamos el sobrenadante.

Resuspendimos la pastilla en 1 mL de YPD 2X e incubamos durante 2 h a 30°C y 300 rpm.

Finalmente sembramos 200  $\mu$ L de las células en una caja con 10 mL de medio YNB con 20 g/L de glucosa, adenina, uracilo e histidina y esparcimos con perlas de vidrio estériles e incubamos a 30°C de 2 a 6 días.

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

Con la finalidad de determinar si existe una interacción entre el *Glut2* y *Cnih1*, *Cnih4* respectivamente, se utilizó el sistema de la ubiquitina dividida en levadura, mbSUS, el cual, es adecuado para la determinación de interacciones entre proteínas de longitud completa, ya sean proteínas de membrana o entre una proteína de membrana con una citosólica.

En este sistema *Cnih* está unido a el N-terminal (Nub) y el *Glut* está unido al C-terminal (Cub) de la ubiquitina que tiene secuestrado al factor de transcripción *LexA-Vp16*, que será liberado por un proteosoma únicamente cuando las proteínas interactúan, de esta manera *LexA-Vp16* se difunde al núcleo en donde activará la

transcripción de los genes reporteros LacZ, His3 y Ade3, permitiendo a su vez el crecimiento de las levaduras diploides.

Una mutante, NubG (la cual posee la mutación Ile13Gly) muestra una afinidad reducida (si se compara con el NubWT) 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.

En este sistema es importante determinar si las fusiones al Cub pueden resultar en falsos negativos (NubWT) o falsos positivos (NubG), es decir, 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, dando como resultado un falso negativo. Por su parte en los falsos positivos, es necesario que las construcciones fusionadas al Cub se co-expresen con el NubG soluble el cual no muestra una alta afinidad hacia el Cub, de tal manera que si se llegasen a activar los genes reporteros, este fenómeno sería la ausencia de una interacción verdadera, revelando un resultado falso positivo.

Después de sembrar nuestras levaduras transformadas, seleccionamos una colonia y la sembramos en medios líquidos Cub y Nub durante 3 días, posteriormente pasamos esas colonias a medios sólidos Cub y Nub al tercer día del sembrado se aparearon las levaduras sembradas en cada medio Nub y Cub en un medio rico como el YPD al siguiente día las sembramos en un medio diploide suplementado con solo adenina e histidina durante 3 días, para finalmente realizar el ensayo de interacción proteína proteína dejando crecer las levaduras durante 2 o 3 días en medios de interacción Met0 y Met500.

### **Ensayo de LacZ**

Para poder realizar el ensayo de interacción en un medio con X-Gal, se hizo un ensayo de LacZ en donde primero hicimos 50ml de buffer z, al cual se le agregaron 0.25g de agarosa y se calentó en el microondas durante unos segundos, luego lo dejamos enfriar y posteriormente se le añadió 40mg de X-Gal, disuelto con 1ml de N-n dimetil y subsecuentemente 1ml de SDS al 10%, se homogeneizó y finalmente se vació cuidadosamente en la caja con medio DP.

### **Medios de crecimiento para levaduras**

Los medios para el crecimiento de las levaduras fueron YPD SC (Synthetic Complete) y una mezcla de aminoácidos esenciales para el crecimiento de las levaduras (arginina, isoleucina, lisina, fenilalanina, tirosina, valina, serina y treonina). Dependiendo de la selección, el medio SC fue suplementado con 20 mg/L de adenina, 20 mg/L de histidina-HCl, 500  $\mu$ M de metionina, 20 mg/L de triptófano, 20mg/L de uracilo y/o 240 mg/L de leucina.

Las células que contuvieron el vector pMETYC\_GW fueron crecidas en medios SC suplementados con triptófano, histidina, adenina y uracilo (medio Cub) y las células que contuvieron el vector pXN22\_GW pNX32\_GW fueron crecidas en medio SC suplementado con leucina, histidina y adenina (medio Nub).

Las células diploides fueron crecidas 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  $\mu$ M metionina (medio IS-0) o 500  $\mu$ M metionina (IS-500).

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

#### Medio YPD SC para 1 L

|                      |      |
|----------------------|------|
| Extracto de levadura | 10 g |
| Peptona              | 20 g |
| Glucosa              | 20 g |
| Agar                 | 20 g |

#### Medio diploide para 1 L

|                     |         |
|---------------------|---------|
| Drop out            | 0.545 g |
| Yeast Nitrogen Base | 1.7 g   |
| Sulfato de amonio   | 5 g     |
| Glucosa             | 30 g    |

|           |       |
|-----------|-------|
| Agar      | 20 g  |
| Adenina   | 10 ml |
| Histidina | 2 ml  |

Medio Cub para 1 L

|                     |         |
|---------------------|---------|
| Drop out            | 0.545 g |
| Yeast Nitrogen Base | 1.7 g   |
| Sulfato de amonio   | 5 g     |
| Glucosa             | 30 g    |
| Agar                | 20 g    |
| Adenina             | 10 ml   |
| Histidina           | 2 ml    |
| Triptófano          | 2 ml    |
| Uracilo             | 10 ml   |

Medio Nub para 1 L

|                     |         |
|---------------------|---------|
| Drop out            | 0.545 g |
| Yeast Nitrogen Base | 1.7 g   |
| Sulfato de amonio   | 5 g     |
| Glucosa             | 30 g    |
| Agar                | 20 g    |
| Adenina             | 10 ml   |
| Histidina           | 2 ml    |
| Leucina             | 24 ml   |

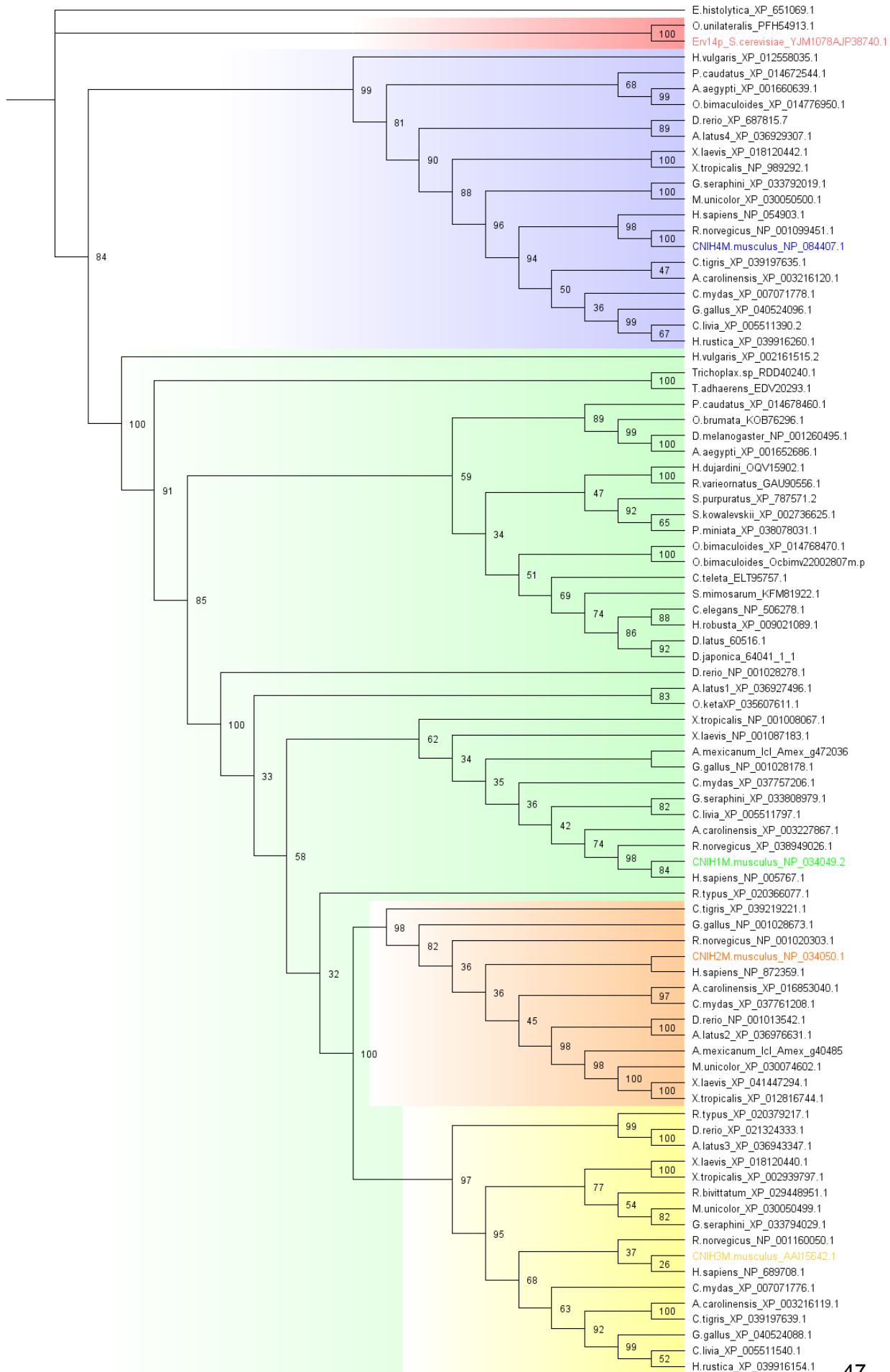
## **RESULTADOS**

### **Filogenia de Cornichon en metazoarios**

Se obtuvieron topologías similares entre los cuatro clados en los que se agrupa a cada Cornichon, se observó que los 4 Cnihs de *Mus musculus* están agrupados con los Cnihs en *Homo sapiens*, con un valor de bootstraps de 100 para el *MmCnih4* con el *HsCnih4* y de valores <100 para los demás Cornichones. Los valores de los bootstraps nos indican el número de veces que aparecen las secuencias del alineamiento en los mismos nodos en las múltiples réplicas del árbol filogenético que se generan en la matriz de IQ-tree, es decir, que para cada nodo del árbol inicial, se observa en cuántos árboles de las réplicas aparece, esto nos permite saber qué tan confiables con los datos que obtenemos, se considera que un nodo comienza a ser fiable si su valor de bootstrap es superior a 50 (Singh-Xie, 2008).

Tanto el grupo de Cnih4 como el grupo de Cnih1 son clados bastante diversos y ampliamente distribuidos en la filogenia de los metazoos, esto se ve reflejado en la existencia de homólogos de Cnih4 en filos como Placozoa (*Trichoplax sp.*), Cnidaria (*Hydra vulgaris*); invertebrados protostomados como Arthropoda o Nematoda; invertebrados deuterostomados como Echinodermata, hasta especies pertenecientes al filo Chordata. Aunado a esto, también tiene como grupo hermano a dos tipos de opistocontos, como son *Entamoeba histolytica* y *Saccharomyces cerevisiae* (Laumer, C., et al, 2019); en cambio, Cnih2 y Cnih3 únicamente se encontraron en vertebrados.

El hecho de que exista tanta diversidad y abundancia en los clados de Cnih1 y Cnih4 y que, además, Cnih4 tenga en su grupo hermano a *S. cerevisiae* nos indica que estos dos Cnihs son los más ancestrales y que divergieron de una proteína Cnih-like, posiblemente muy similar a Erv14. Lo anterior nos hace hipotetizar que los Cnihs de ratón pueden tener cargos muy parecidos a los que tiene Erv14. Por su parte, el hecho de que Cnih2 y Cnih3 existan únicamente en vertebrados y que, lo más probable, hayan divergido a partir de Cnih1, nos hace pensar que estos son receptores menos ubicuos y más específicos a la hora de seleccionar sus cargos (Fig. 14).



**Figura 14. Árbol filogenético de Cornichón en las especies más representativas de los metazoarios.** En el clado número uno (rojo) tenemos a un grupo hermano de opistocontos de Cnih4, en el clado 2 (azul) se muestra a Cnih4, en el clado 3 (verde) se encuentra a Cnih1 divergió posiblemente al igual que Cnih4 de Cnih-like, en el clado 4 (naranja) y en el clado 5 (amarillo) se encuentra a Cnih2 y Cnih3.

**Alineamiento de los Cornichones de *M. musculus*, *H. sapiens* y *S. cerevisiae***

Se realizó el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los 4 Cnihs en *M.musculus*, sus 4 ortólogos en *H.sapiens* y su ortólogo Erv14 en *S.cerevisiae* y se observó que los sitios de la N-terminal se encuentran conservados casi en todos los Cnihs y sus ortólogos, excepto en los ortólogos de Cnih4 (Fig. 15), lo cual confirma lo observado anteriormente en árbol filogenético (Fig. 14), que Cnih4 es el que tiene una relación más ancestral con respecto de los otros 3 Cnihs. Por otro lado, tanto Cnih2 como Cnih3, comparten una inserción conservada con sus ortólogos en humanos en la región transmembranal, que ni Cnih1 ni Cnih4 tienen, lo cual nos da la certeza de que Cnih2 y Cnih3 sí divergieron a partir del Cnih1 como se observa en el árbol (Fig. 14).



**Figura 15. Alineamiento de los 4 Cnihs en *M. musculus* y sus ortólogos en *H. sapiens* y *S. cerevisiae*.** El N-terminal se encuentra delimitado por el rectángulo rojo, los dominios transmembranales delimitados por los rectángulos azules y el C-terminal por el rectángulo verde.

También se observó que Erv14 conserva residuos de serina (S) en el C-terminal con Cnih1 y Cnih3 (Fig. 15), lo cual es importante tomar en cuenta ya que en esta región

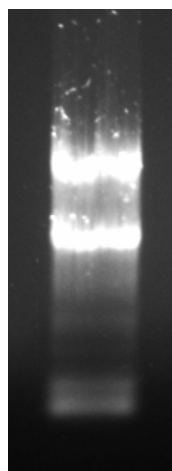


una serina-cinasa podría catalizar la fosforilación del grupo hidroxilo de esta serina; además, se ha reportado que la unión de Cnih3 con los receptores AMPA requiere de dos motivos ácidos ubicados en el asa extracelular y en el dominio transmembranal 2 (Shanks., *et al*, 2014).

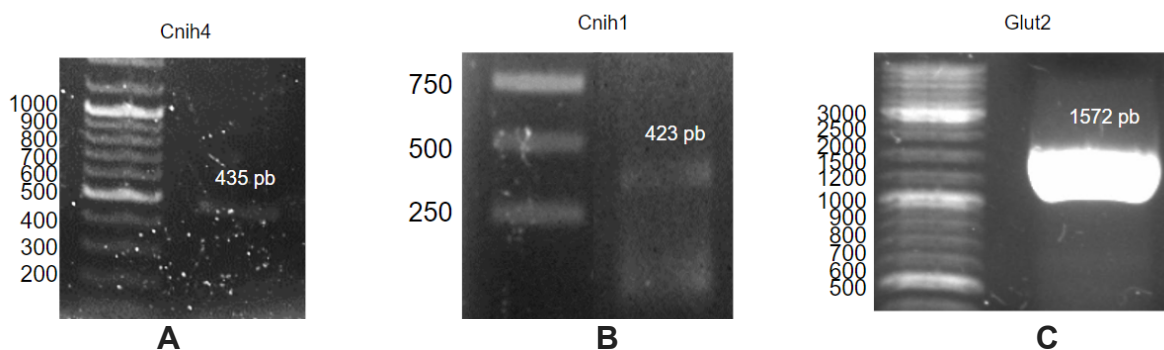
Asimismo, se observa que en el C-terminal Erv14 tiene al final un aspartato (D) al igual que los ortólogos de Cnih4 y, como ya se ha reportado en estudios previos, este aminoácido es fundamental para la selección de cargos en *S. cerevisiae* (Rosas-Santiago., *et al*, 2017) , así que es posible que en mamíferos también juegue un rol importante a la hora de seleccionar sus cargos.

### **Extracción de ARN y transcritos amplificados**

Con la finalidad de clonar las secuencias codificantes de los genes de *Cnih1*, *Cnih4* y del transportador *Glut2* se obtuvo ARN del hígado de un ratón macho de 8 semanas de edad. En la figura 16 se muestra el ARN extraído del hígado, donde se puede apreciar que el ARN está íntegro ya que se observan las dos bandas del ARN ribosomal, aproximadamente en la proporción deseada de 2:1 (28S vs 18S). Una vez corroborada la integridad, continuamos con la síntesis de ADNc y la amplificación de *Cnih4* con un tamaño de 435 pb, *Cnih1* con un tamaño de 423 pb y *Glut2* con un tamaño de 1572 pb, mediante una PCR de punto final y visualizándolo con una electroforesis con un gel de agarosa como se muestra en la figura 17 y posteriormente se llevó a cabo el protocolo de clonación (ver en metodología).



**Figura 16. Extracción de ARN de hígado íntegro.** En la primera banda se observa ARN ribosomal de 28S, en la segunda banda ARN ribosomal de 18S.



**Figura 17. Transcritos de las regiones codificantes amplificados para la clonación.** (A) Transcrito de *Cnih4* con un tamaño de 435 pb. (B) Transcrito de *Cnih1* con un tamaño de 423 pb. (C) Transcrito de *Glut2* con un tamaño de 1572 pb.

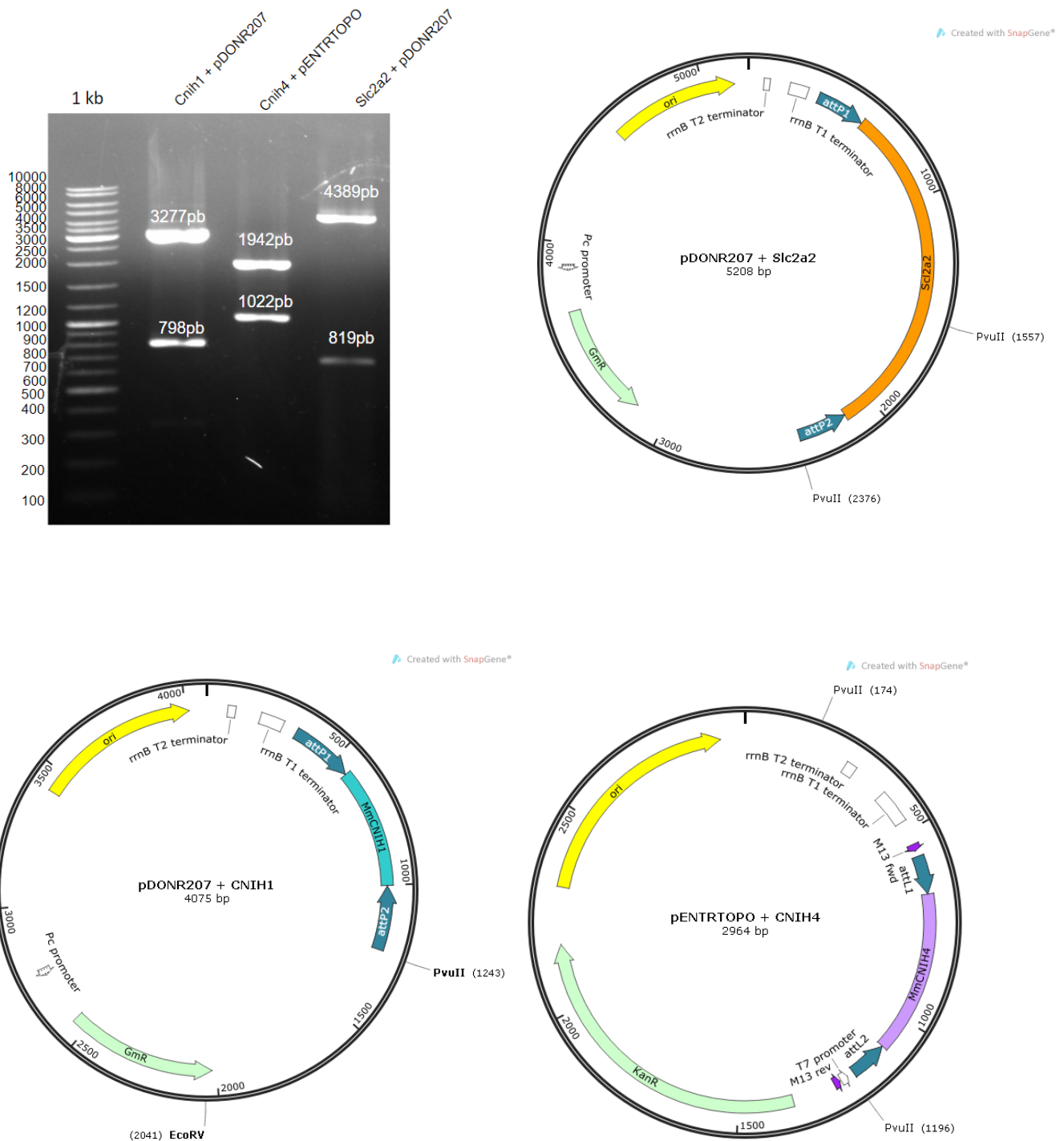
### **Construcciones de *Cnih1*, *Cnih4* y *Glut2* con los vectores de entrada**

Una vez hecho el ADNc y obtenidos los transcritos de los genes de interés, se clonó a *Cnih4* con la tecnología TOPO de invitrogen (ver en metodología), en el vector pENTRTOPO (Fig.18) y se mandó a secuenciar a la unidad de secuenciación del IBT. Posteriormente, se flanqueo a *Cnih1* y *Glut2* con los sitios de recombinación homóloga attb1 y attb2 mediante una PCR, para poder clonarlos con tecnología Gateway de invitrogen, en el vector de entrada pDONR207 (ver metodología), después se hizo un análisis de restricción con la enzima PvuII para las 3 construcciones como se muestra en la figura 18, sin embargo debido a que el gen de *Cnih1* era similar al tamaño de la región que se cortó inicialmente, también se utilizó la enzima EcoRV y una vez que se tuvieron las construcciones listas, se mandaron a secuenciar. Con la finalidad de verificar que nuestros genes realmente estuvieran clonados en sus respectivos vectores y que no tuvieran mutaciones se hizo un alineamiento en *muscle alignment* de las secuencias forward (fwd) de *Cnih1*, reverse (rev) de *Cnih4* y fwd y rev de *Glut2* (ORF), alineandolas con las secuencias obtenidas de los electroferogramas (ver en anexos la Fig. 1).

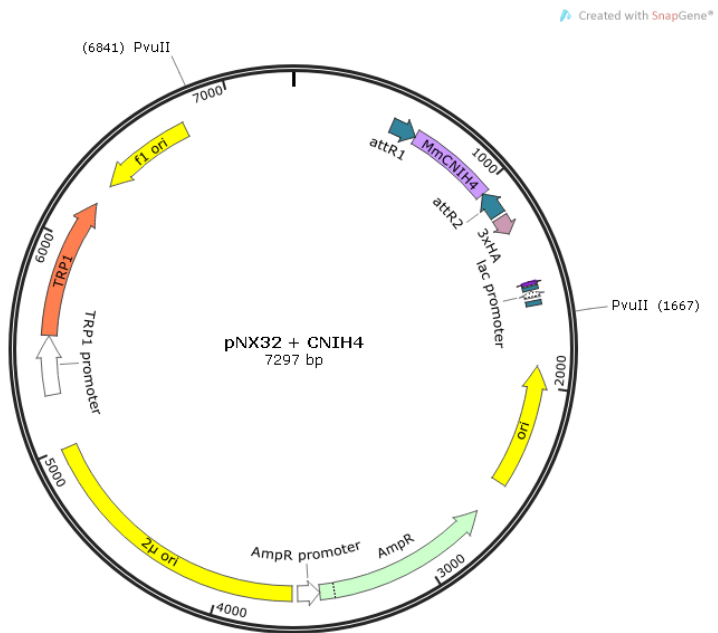
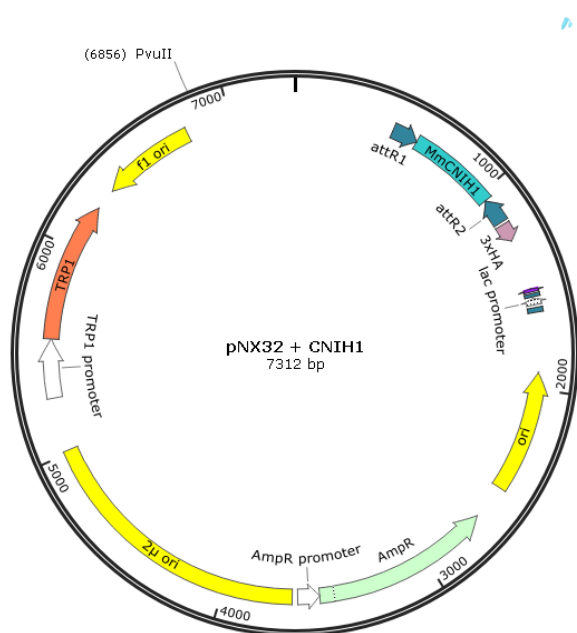
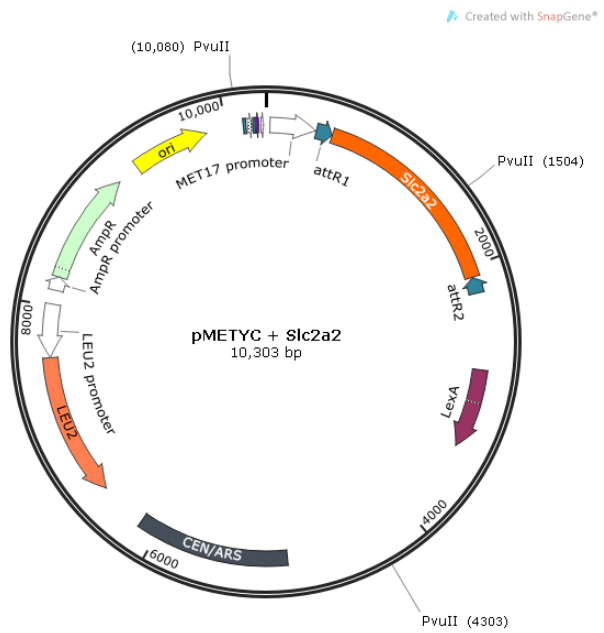
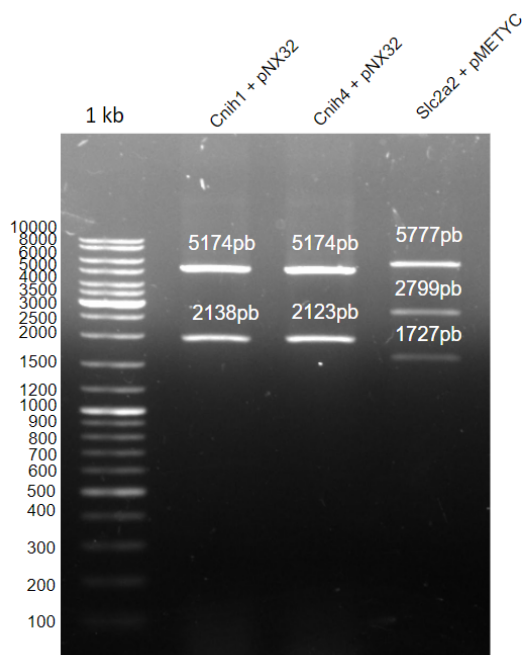
### **Construcciones de *Cnih1*, *Cnih4* y *Glut2* con los vectores de expresión**

Ya teniendo nuestros vectores de entrada con los genes de interés, se hizo una reacción LR (ver en metodología), para clonarlos en los vectores de destino correspondientes, pNX32 para cada *Cnih* y pMETYC para el *Glut2* (Fig. 19), en este caso ya no se mandó a secuenciar, sólo se transformó en *E. coli*, se extrajo el

plásmido, se hizo el análisis de restricción (Figura 19) y se transformó en levaduras para realizar en el ensayo del mbSUS.



**Figura 18. Construcciones en los vectores de entrada. *CniH1* en pDONR207 cortado con PvuII y EcoRV. *CniH4* en pENTRTOPO cortado con PvuII. *Glut2* en pDONR207 cortado con PvuII.**

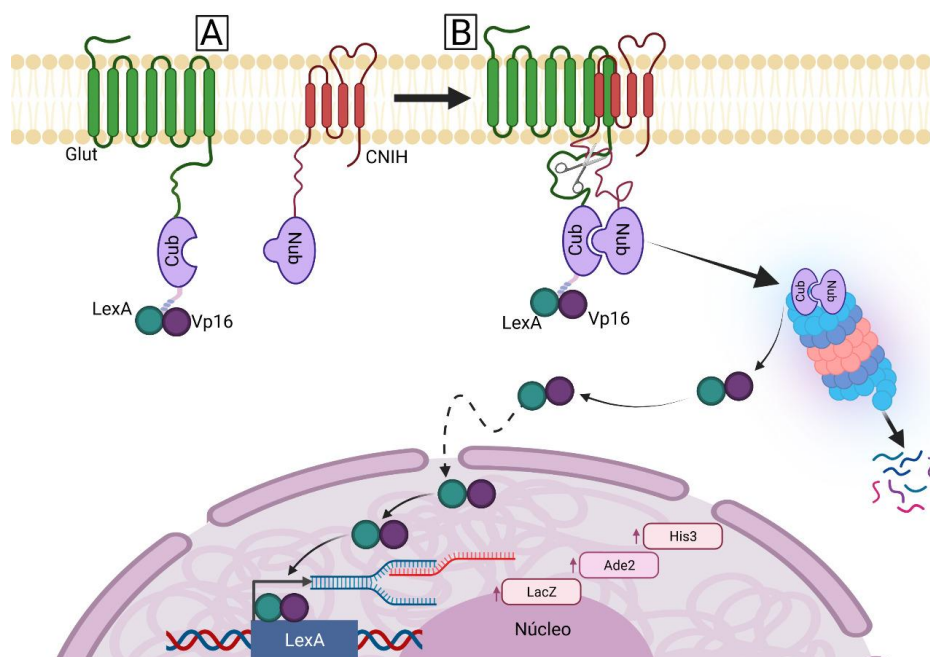


**Figura 19. Construcciones en los vectores de destino. *Cnih1* en pNX32 cortado con PvuII. *Cnih4* en pNX32. *Glut2* en pMETYC cortado con PvuII.**

## Interacción de Cnih1 y Cnih4 con Glut2

Uno de los objetivos que nos planteamos en este proyecto fue determinar si existe interacción entre los receptores cargo Cornichon y los transportadores de glucosa de *M.musculus*. Para lograr este objetivo decidimos emplear el sistema de la ubiquitina dividida en levaduras. Para este ensayo se tomó como control a la proteína Qdr2 de *S.cerevisiae* que es un transportador de cobre ya que, anteriormente, se demostró su interacción con Erv14 usando este sistema del mbSUS (Rosas-Santiago., *et al*, 2017).

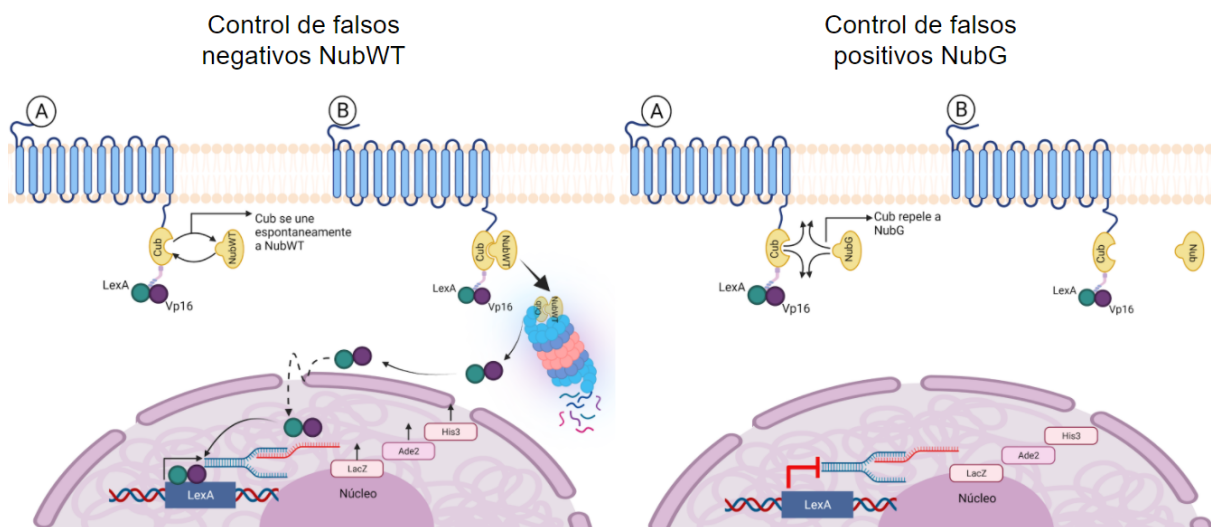
Inicialmente, como se describe en los materiales y métodos, las levaduras se aparearon para seleccionar las células diploides que expresan tanto al transportador Glut2 como a Cnih y que, por tanto, logran crecer en un medio de selección a células diploides.



**Figura 20. Sistema de la ubiquitina dividida.** A. Estado basal de la ubiquitina dividida, sin interacción entre las proteínas. B. Cuando las proteínas interactúan, la ubiquitina se une y un proteosoma libera al factor de transcripción LexA-Vp16 permitiendo que llegue al núcleo y promueva la síntesis de LacZ, Ade2 y His3. Creada en biorender.

Para probar si el transportador Glut2 interactúa con los Cnihs 1 y 4 se emplearon medios que no contienen adenina ni histidina (medio Met 0  $\mu$ M), ya que las levaduras solo crecerán si hay una interacción entre las proteínas de interés, debido

a que el Cnih está unido a el N-terminal (Nub) y el Glut está unido al C-terminal (Cub) de la ubiquitina, que tiene secuestrado al factor de transcripción LexA-Vp16, que será liberado por el proteosoma únicamente cuando las proteínas (Cnih1, 4 y Glut2) interactúan; de esta manera, LexA-Vp16 llegará al núcleo y promoverá la síntesis de LacZ, His3 y Ade2, permitiendo a su vez el crecimiento de las levaduras (Fig. 20) como se menciona anteriormente en la metodología.



**Figura 21. Control de falsos negativos y falsos positivos.** En el control de falsos negativos (panel izquierdo), NubWT se une espontáneamente al Cub, mientras que en el control de falsos positivos (panel derecho), NubG no se une al Cub, por lo tanto no hay liberación de LexA-Vp16 ni crecimiento.

Con la finalidad de evaluar que el sistema esté funcionando correctamente se utilizaron dos controles, un control de falsos negativos (NubWT) el cual espontáneamente se une al Cub de la ubiquitina, por lo tanto, en este siempre vamos a observar un crecimiento sin importar el medio en el que se encuentre, y también ocupamos un control de falsos positivos (NubG), este tiene una mutación que no permite que se una con el Cub, por lo tanto no debería haber un crecimiento debido a que no hay una liberación del factor de transcripción LexA-Vp16 (Fig.21), sin embargo, en ocasiones puede darse un crecimiento leve debido a la cercanía entre las proteínas.

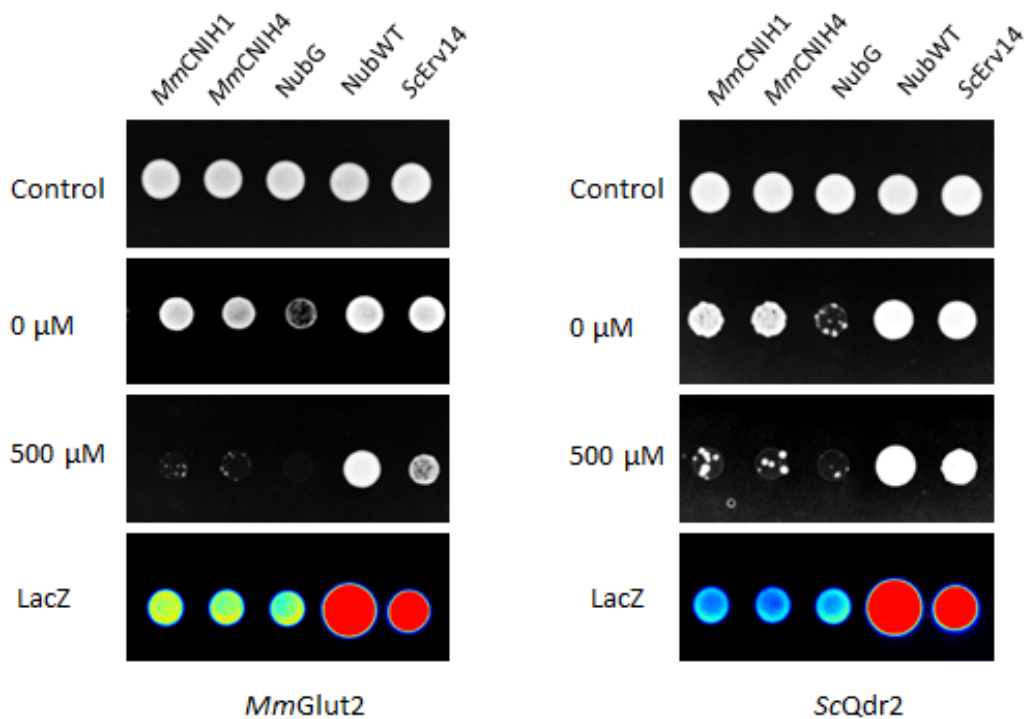
En la figura 22 observamos que las levaduras que expresan a *Glut2/Cnih1*, *Glut2/Cnih4*, *Glut2/NubWT*, *Glut2/ScErv14* crecen bien en el medio diploide que se usó como control tanto para el ensayo con *Glut2* como para el ensayo con el gen de referencia *ScQdr2*, por otra parte en los medios de interacción (0  $\mu$ M Metionina) con *Glut2* sí hubo crecimiento, mientras que en el ensayo con 500  $\mu$ M Metionina no hubo un crecimiento tan abundante con los *Cnihs*, pero con *NubWT* y con *ScErv14* sí hubo un crecimiento debido a la afinidad de estas proteínas por *Glut2*, por otro lado debido a que la expresión del transportador *Glut2* está bajo el control del promotor *Met*, el cual es sensible a metionina, la adición de 500  $\mu$ M de metionina disminuye la abundancia de *Glut2* revelando la afinidad de este transportador con *Cnih1* o *Cnih4*. El crecimiento de las levaduras es casi imperceptible en el medio con metionina (500  $\mu$ M), lo que nos indica que la fuerza de interacción entre *Glut2* y los *Cnihs* no es comparable a la de *NubWT* (Figura 22). Sin embargo, esto no quiere decir que no exista una interacción ya que en el medio sin metionina existe un crecimiento de las levaduras. Se probó, de igual forma, si *Glut2* interactúa con *Erv14* y, como se puede notar en la figura 20, sí lo hace aunque la fuerza con la que interactúa es mayor ya que en el medio con 500  $\mu$ M de metionina se observa crecimiento.

Para observar de otra manera las interacciones anteriormente mencionadas, se realizó el ensayo de *LacZ*, donde la enzima  $\beta$ -Galactosidasa codificada por *LacZ* va a escindir el enlace glicosídico del carbohidrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil  $\beta$ -D-galactósido (*X-Gal*) con el cual está adicionado el medio en el que se crecen las levaduras diploides, dando como resultado, a simple vista, una coloración azul. Las fotografías se tomaron con una cámara de calor para observar con mayor claridad la coloración azul por lo que en la imagen se observan colores cálidos como el rojo cuando hay una mayor coloración azul, amarillo cuando es de intensidad media y azul cuando es débil (Figura 22).

Como era de esperarse, en nuestro control de falsos negativos se aprecia una interacción muy abundante, es por eso que se ve de color rojo intenso. De manera interesante, *ScErv14* también tuvo una interacción bastante abundante con el *MmGlut2*, lo cual nos hace pensar que posiblemente los *Glut2* compartan alguna región conservada con los *Htx* que esté relacionada con la unión a *Erv14*, esta idea se desarrollará con más claridad en la discusión. Por otro lado, podemos observar

colores amarillos que indican abundancias similares en la interacción del Glut2 con Cnih1 y con Cnih4 y, también, se observa un amarillo muy tenue con el control de falsos positivos (NubG) (Fig. 22).

En contraste con este ensayo, en el resultado con nuestro control ScQdr2, se observa de color azul el crecimiento con Cnih1, Cnih4 y con NubG, lo cual nos sugiere que la abundancia de ScQdr2 y/o su interacción con los Cnihs no es suficiente para que se sintetice LacZ y degrade a X-Gal sin embargo, con NubWT y Erv14 se logro observar un color rojo intenso, lo que indica que la abundancia de ScQdr2 y su interacción con esas proteínas es bastante fuerte, como era de esperarse (Fig. 22).



**Figura 22. Interacción de Glut2 con Cnih1 y Cnih4.** En ambos paneles observamos los ensayos de gota con los resultados del mbSUS. En el panel izquierdo, se encuentra el ensayo con Glut2, las levaduras crecieron tanto en el medio control como en el de 0 μM metionina y hay coloración en el ensayo de LacZ, lo cual indica la interacción de Glut2 con Cnih1 y Cnih4. Por otro lado en el panel izquierdo se observan resultados similares, pero con la proteína de referencia ScQdr2.

### Establecimiento de un modelo diabetico murino

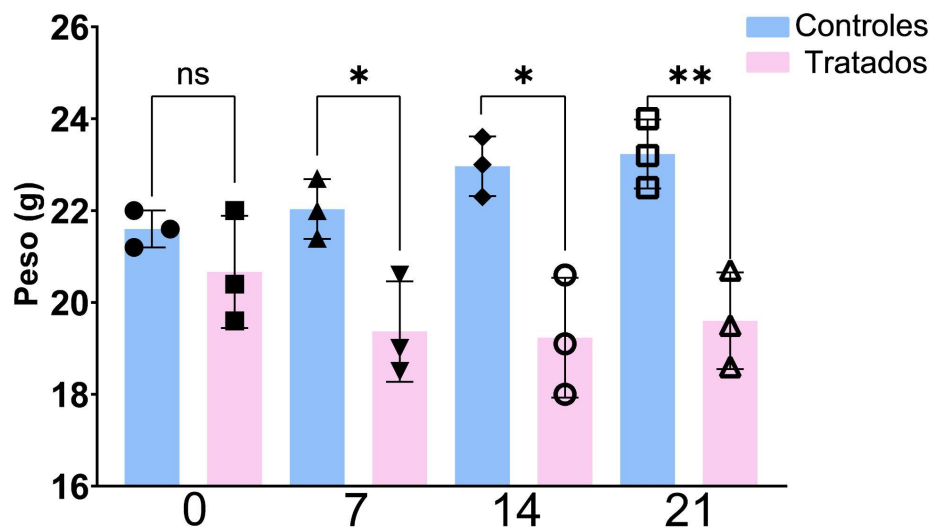
Con la finalidad de establecer un modelo diabetico murino se formaron 2 grupos de ratones machos de 8 semanas de la cepa C57/BL6, el grupo vehículo (n=2; n=2;



n=2) que fue inyectado únicamente con buffer de citrato a un pH de 4.5 para mantener a ambos grupos bajo una misma condición de pH y el grupo experimental que fue inyectado con STZ disuelta en buffer de citrato (n=5; n=2; n=3).

Para hacer un uso consciente de los animales de nuestro experimento y también para estudios posteriores, se obtuvieron los siguientes tejidos; hipocampo, corteza cerebral, timo, hígado, islotes, testículo, músculo tibial anterior y músculo tibial posterior del muslo de la pierna.

Para el monitoreo y evaluación de la salud de los ratones se les midió la glucosa 1 vez a la semana con 4 h de ayuno previo, al igual que el peso y el alimento durante 3 semanas consecutivas. En el día 7 (después de la semana de inyección), los ratones del grupo tratado se observaron de menor tamaño y el peso disminuyó, manteniéndose bajo hasta el día del sacrificio (día 21), a diferencia de los ratones controles cuyo peso incrementó gradualmente hasta el día 21.(Fig. 23).

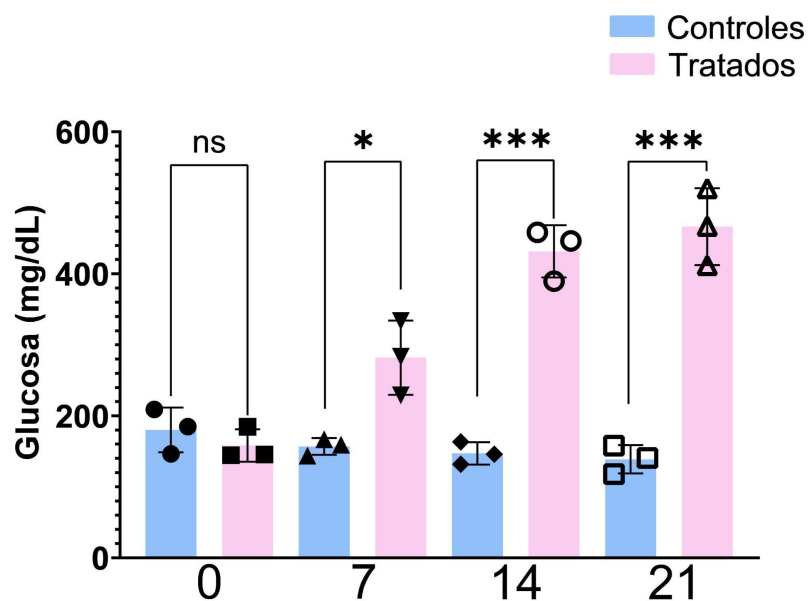


**Figura 23. Peso promedio de los ratones vehículo y los tratados con STZ.** En los ratones tratados hubo una disminución del peso significativa en el día 7, con respecto a los controles/vehículo, que a diferencia de los tratados su peso incrementó gradualmente hasta el día 21. Media +/- SD (desviación estándar), datos analizados por *t* de student, valores significativos \* $<0.05$ ; \*\* $<0.005$ .

Los niveles de glucosa comenzaron a incrementar en el grupo tratado, mientras que la de los vehículos se mantuvo constante en un rango normal (140-160 mg/dl) (Fig.

24). En el día 10 se observó que los tratados comenzaban a secretar más orina que los vehículos, esto se tomó en cuenta para determinar que el tratamiento estaba funcionando adecuadamente.

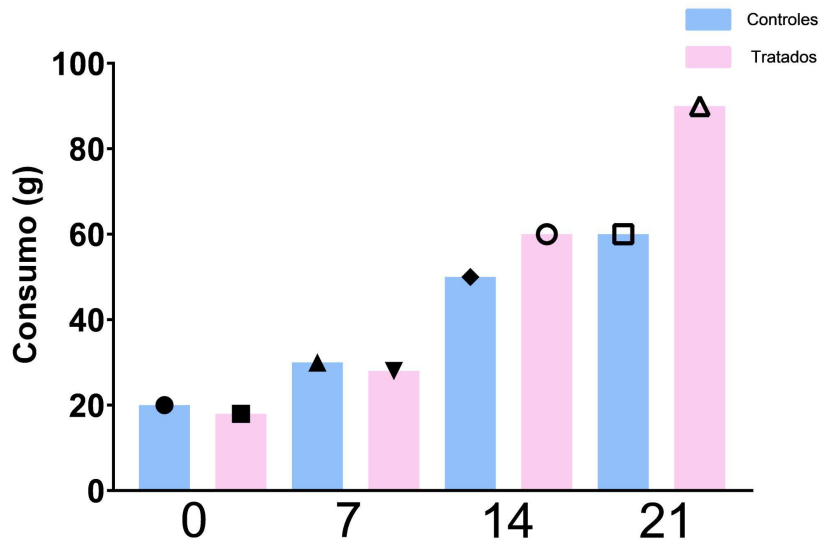
De los 10 ratones que teníamos tratados con STZ, tuvimos 2 bajas, el primer ratón murió durante las inyecciones y al segundo se le dio eutanasia en la última semana del tratamiento, ya que no logró ganar peso después del tratamiento (era el más pequeño de todos en cuanto a peso y talla) y sus niveles de glucosa sobrepasaban los 550 mg/dl. En contraste, con los vehículos solo tuvimos una baja en la semana de inyección.



**Figura 24. Niveles de glucosa en sangre de los ratones vehículo y los tratados con STZ.** Los ratones tratados con STZ incrementaron sus niveles de glucosa en sangre de manera significativa a partir del día 7, en los días 14 y 21, fue aún más significativo el incremento que en el día 7, a diferencia de los controles/vehículos que permanecen casi lineales. Media +/- SD (desviación estándar); datos analizados por *t* de student, valores significativos \* $<0.5$ ; \*\* $<0.005$ ; \*\*\* $<0.0003$ ).

En la figura 25, se observa que los ratones tratados incrementaron su consumo de alimento gradual y constantemente al igual que los vehículos, lo cual quiere decir que la pérdida de peso de los ratones tratados no se adjudica a que los ratones dejaron de consumir alimento sino a los efectos de la STZ, que está destruyendo las células beta del páncreas, por lo tanto la síntesis y secreción de insulina se ve desregulada, al igual que la entrada de la glucosa proveniente de los alimentos a las

células, y esto con el paso de los días hace que los ratones aumenten su consumo de alimento y agua, provocando micción frecuente en los ratones y pérdida de calorías, esto trae consigo una reducción de peso significativa que se observa en la figura 23.



**Figura 25. Consumo de alimentos por semana en ratones controles y tratados con STZ.** Ambos grupos de ratones aumentaron su consumo de alimento gradualmente, sin embargo en los del grupo tratado el aumento es mucho más notorio en el día 21 con respecto a los vehículos.

En conjunto, el hecho de que en los tratados los niveles de glucosa se mantuvieron en constante incremento las 2 semanas posteriores al tratamiento, que disminuyeran su peso gradualmente y que tuvieran micción frecuente, nos corroboraron que el tratamiento funcionó como esperábamos.

Hasta el momento tanto del grupo vehículo como del grupo tratado se han extraído ARN de islotes y hígado. Debido a la complejidad que conlleva la obtención de islotes pancreáticos, por n en los vehículo se obtuvieron de 80 a 120 islotes y en tratados por n se recuperaron de 50 a 75 islotes debido al mismo tratamiento, lo cual considerábamos poco para obtener el ARN necesario para realizar la RT-qPCR, a pesar de esto, sí logramos sintetizar ADNc de al menos una muestra biológica y realizar la qPCR con 3 réplicas técnicas. Sin embargo, decidimos hacer un segundo experimento bajo las mismas condiciones, con ratones machos de la misma edad y misma cepa, con la finalidad de obtener más islotes y repetir el experimento en un futuro, de igual manera que en el primer experimento se hizo la extracción de

hipocampo, corteza, timo, hígado, islotes, testículo, músculo tibial anterior y músculo tibial posterior.

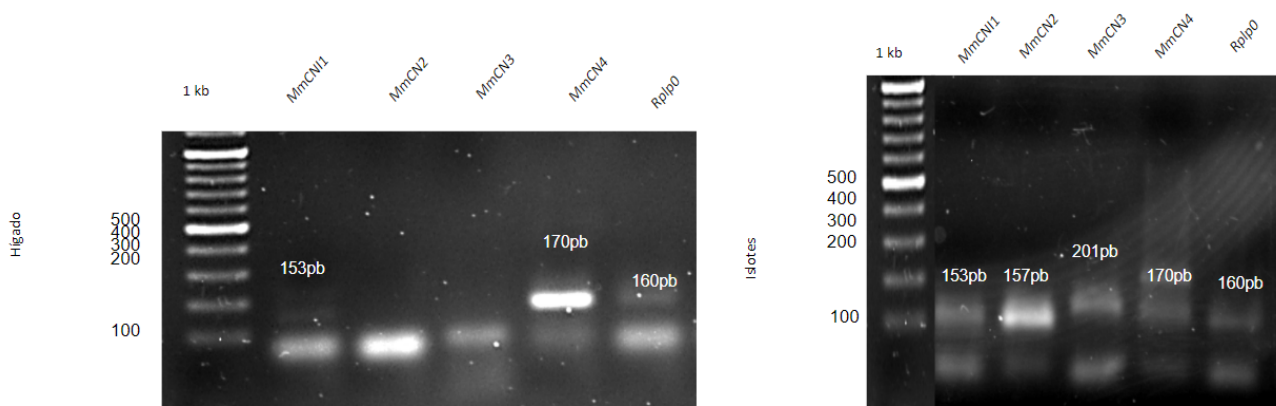
En este segundo experimento se obtuvieron para el grupo experimental 4 n=2 y para el grupo vehículo 3 n=2, dando un total de 14 individuos como se muestra en las siguientes tablas, de igual manera se les midió el peso, la glucosa y el consumo de alimento 1 vez a la semana durante 3 semanas hasta el día del sacrificio (Tabla 6).

**Tabla 6. Monitoreo de peso y glucosa del segundo grupo experimental.** en el grupo vehículo inyectado con el buffer de citrato (primera tabla) y en el grupo tratado con STZ (segunda tabla) de la semana del día 0 hasta la semana del día 21.

| Vehículo    | Días |         |      |         |      |         |      |         |
|-------------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|
|             | 0    |         | 7    |         | 14   |         | 21   |         |
| n           | Peso | Glucosa | Peso | Glucosa | Peso | Glucosa | Peso | Glucosa |
| n (9 y 10)  | 21.5 | 142     | 21.9 | 135.5   | 22.5 | 130     | 21.9 | 135     |
| n (11 y 12) | 21.8 | 136     | 23.2 | 155.5   | 23.7 | 148     | 23.8 | 151     |
| n (13 y 14) | 23.4 | 162.5   | 24.6 | 152.5   | 25.2 | 151.5   | 22.2 | 152     |
| Tratados    | Días |         |      |         |      |         |      |         |
|             | 0    |         | 7    |         | 14   |         | 21   |         |
| n           | Peso | Glucosa | Peso | Glucosa | Peso | Glucosa | Peso | Glucosa |
| n (1 y 2)   | 22.7 | 185     | 24.6 | 320.5   | 24.8 | 345     | 24.1 | 366.5   |
| n (3 y 4)   | 21.9 | 206.5   | 21.9 | 379     | 23.4 | 419.5   | 21.1 | 456     |
| n (5 y 6)   | 24.2 | 194.5   | 25.3 | 372     | 25.6 | 463.5   | 24.9 | 494     |
| n (7 y 8)   | 22.7 | 292     | 23.1 | 388     | 23.3 | 473     | 21.5 | 520     |

### **Detección de los transcritos de *MmCNIH1* al 4 y de *MmRplp0***

Con el ARN extraído de hígado e islotes de ratones de 8 semanas pero que no formaron parte del grupo experimental, se hicieron las PCR punto final (Fig. 26) para probar que los pares de oligonucleótidos específicos para cada gen funcionan y son específicos, y para optimizar las condiciones de alineamiento; además, para comparar nuestros resultados con los que aparecen en *Expression atlas*.



**Figura 26. Transcritos de *Cnihs* amplificados por medio de una PCR punto final.** En el hígado (panel izquierdo) amplificó únicamente, *Cnih1* con un tamaño de 153 pb, *Cnih4* de 170 pb y el gen constitutivo *Rplp0* de 160 pb. En islotes (panel derecho) amplificaron los 4 *Cornichones* y el gen constitutivo con sus tamaños correspondientes. En ambos gels las bandas  $\leq 100$  corresponden a un exceso de oligos en la reacción.

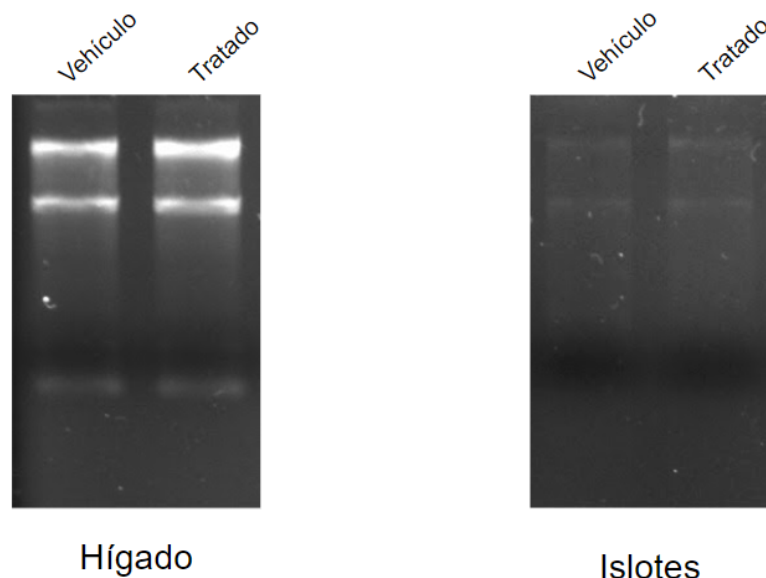
Los datos obtenidos de *Expression atlas* (Tabla 3) nos dicen que *Cnih1* y *Cnih4* se expresan en un “nivel alto” en hígado e islotes, mientras que *Cnih2* se expresa en un “nivel bajo” y *Cnih3* con un “nivel por debajo del límite” y únicamente en islotes. Cabe aclarar que estos registros de “niveles” son bastante ambiguos ya que no se tiene una referencia clara en cuanto a lo que significa que tenga un “nivel alto o bajo”. Comparándolos con los resultados de nuestra PCR podríamos decir que en el hígado (Fig. 26, panel izquierdo) sí se expresa *Cnih1*, pero la banda que observamos en el gel (153 pb) no es tan intensa como la de *Cnih4* (170 pb), lo que sugiere que *Cnih4* se expresa mucho más en hígado que *Cnih1*. Por otro lado, el dato tomado de *Expression atlas* sobre que *Cnih2* se expresa en hígado no se repitió en nuestras manos, ya que en nuestras condiciones no amplificó. Por su parte, observamos a los transcritos en islotes, donde todos los *Cnihs* amplificaron en sus respectivos tamaños y, al parecer, la banda de *Cnih2* (157 pb) es un poco más intensa que las demás lo que sugiere que hay mayor abundancia de este transcrito, lo cual tampoco concuerda muy bien con *Expression atlas*, ya que se reporta que hay mayor expresión de *Cnih1* y *Cnih4* que de *Cnih2* y *Cnih3*. Estas discrepancias pueden deberse a que los resultados de la base de datos hayan sido obtenidos de ratones de otra etapa de desarrollo (i. e. embriones vs adultos) y también a la eficiencia diferente de los oligonucleótidos usados para amplificar cada gen.

A pesar de lo anterior, tomando en cuenta que el gen constitutivo amplificó de manera adecuada y que todos los *Cnihs* amplificaron en al menos un tejido y solo se observó una banda en el gel, realizamos los tiempos reales.

### **Regulación de la expresión génica de los *Cnihs* y de *Rplp0* en un modelo murino diabetizado**

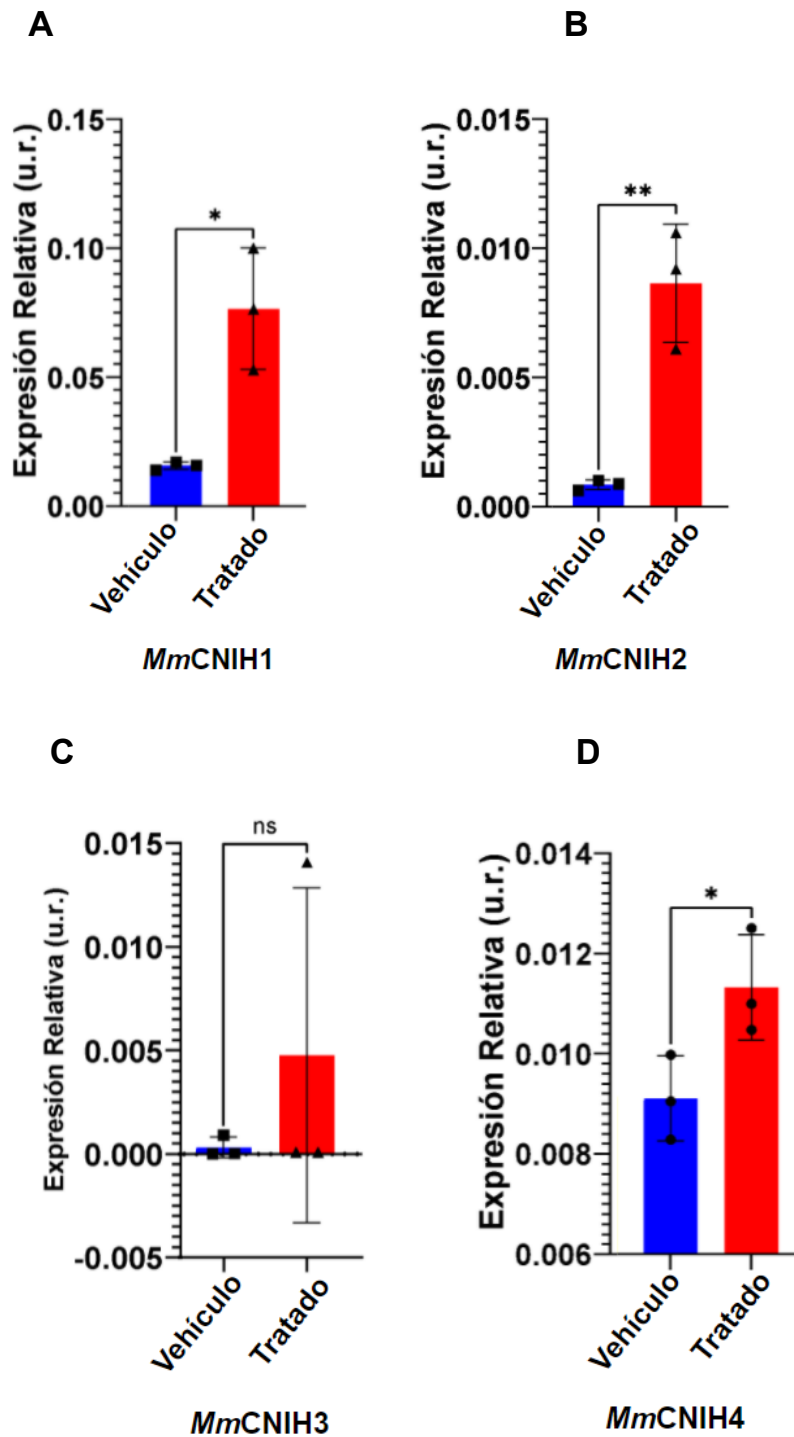
Una vez que se amplificaron los transcritos en las PCR punto final y se probaron los oligos de nuestros genes de interés para los tiempos reales, hicimos la extracción de ARN de islotes e hígado de una muestra biológica tanto para el grupo vehículo como para los tratados del establecimiento del modelo murino diabetizado. Evaluamos la integridad del ARN, en el cual se observan las dos bandas del ARN ribosomal, aproximadamente en la proporción deseada de 2:1 (28S vs 18S) tanto de hígado como de islotes (Fig. 27).

Una vez obtenidos los ARN se realizó la síntesis de ADNc para, posteriormente realizar los qPCR para determinar si la regulación de la expresión génica relativa de los transcritos está relacionada a la cantidad de glucosa tanto en tejidos insulino-independientes (islotes), como en tejidos insulino-dependientes (hígado), y el impacto que esto podría tener en el modelo diabetico establecido.



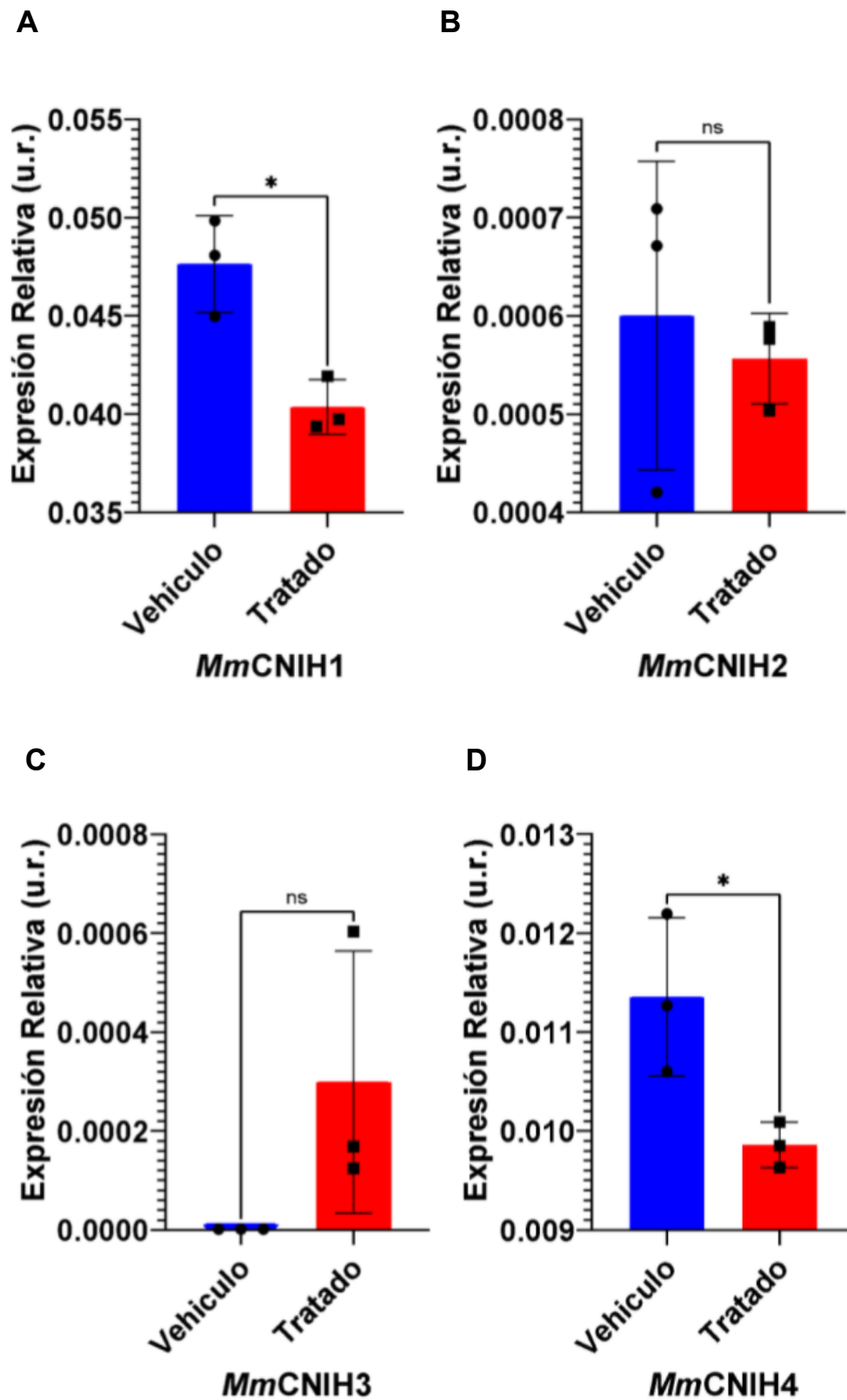
**Figura 27. Integridad del ARN aislado de hígado e islotes.** En el panel izquierdo se muestran 3 bandas de ARN de hígado tanto en los vehículos como en los tratados, la primera banda corresponde a ARN ribosomal de 28S, la segunda a ARN ribosomal de 18S y la última banda posiblemente a microARN. En el panel derecho se observan únicamente

las dos primeras bandas de ARN ribosomal en islotes, la primera de 28S y la segunda de 18S, tanto para los vehículos como para los tratados.



**Figura 28. Expresión relativa de los *Cnihs* en islotes de ratones diabéticos.** En la gráfica A se muestra la expresión relativa de *Cnih1* significativamente mayor en el grupo tratado con respecto al grupo vehículo/control. En la gráfica B se muestra la expresión relativa de *Cnih2* significativamente mayor en el grupo tratado con respecto al grupo de vehículo/control. En la gráfica C se muestra la expresión génica de *Cnih3* sin significancia

entre los grupos. En la gráfica D se muestra la expresión de *Cnih4* significativamente mayor en grupo de los tratados en contraste con los del grupo vehículo/control.





**Figura 29. Expresión relativa de los *Cnihs* en hígado de ratones diabéticos.** En la gráfica A la expresión relativa de *Cnih1* es significativamente mayor en el grupo vehículo con respecto al grupo tratado. En la gráfica B en la expresión relativa de *Cnih2* no hay significancia entre los dos grupos. En la gráfica C se muestra la expresión génica de *Cnih3* sin significancia entre los dos grupos. En la gráfica D se muestra la expresión de *Cnih4* significativamente mayor en grupo vehículo en contraste con los del grupo tratado.

Para la normalización de la expresión de los *Cnihs*, se utilizó el gen constitutivo *Rplp0* utilizando el método de  $\Delta\Delta Ct^2$ . Los resultados de la expresión génica de los *Cnihs* en islotes mostraron, de manera general, que al menos en este tejido insulino-independiente la expresión de los 4 *Cnihs* incrementa cuando los niveles de glucosa aumentan como es el caso de los ratones tratados con STZ (Fig. 28). Sin embargo, los niveles de expresión de *Cnih2* y *Cnih4* son un orden de magnitud menor lo cual coincide, relativamente, con nuestros resultados de la PCR punto final (Fig. 28). En la expresión de *Cnih3* no hay diferencia significativa entre los grupos debido a que, de acuerdo con la base de datos de *Expression atlas*, este es el que menos se expresa en los islotes, por lo tanto es un resultado esperado.

Por otro lado, en los resultados de la expresión génica de los *Cnihs* en el hígado (tejido insulino-dependiente), encontramos que los niveles de expresión relativa tanto de *Cnih1* como de *Cnih4* son significativamente menores en el grupo tratado con respecto al del grupo vehículo, mientras que las diferencias en los niveles de expresión génica relativa del *Cnih2* y *Cnih3*, no son significativas en este tejido (Fig. 29) debido a que los niveles de expresión de estos transcritos son bajos en este tejido.

## **DISCUSIÓN**

La familia de proteínas Cornichon se ha estudiado desde hace poco más de 2 décadas, y se ha descrito como una familia conservada a lo largo de la evolución ya que está presente desde los organismos más simples como las amebas y las levaduras, hasta en organismos muy complejos como los cordados (Fig.14). Durante el desarrollo del árbol filogenético que realizamos con las especies más representativas de los metazoarios en las que se encuentran los 4 tipos de Cnihs existentes, nos enfrentamos, de primera instancia, con la presencia de una politomía al momento de visualizar y analizar el árbol en *Fig Tree*, fue por eso que se optó por meter 2 *outgroups* el primero con *E. histolytica* y el segundo con *S. cerevisiae* y *O. unilateralis*, los cuales, como ya vimos en resultados, quedaron como grupos hermanos de Cnih4. Lo anterior resolvió la politomía, pero no los problemas de agrupación que tuvimos en algunas especies, estos se resolvieron haciendo el conteo total de las especies y buscando especies del mismo filo para que se agruparan de manera correcta; sin embargo, hubo 2 clados que no logramos agrupar como esperábamos, el de Cnih1 de *Ambystoma mexicanum* agrupado con el de *Gallus gallus* y sin valor de bootstrap, y el del Cnih2 en *M. musculus* y *H. sapiens*. Este problema se tuvo desde el primer árbol que se realizó con 12 especies y, posteriormente, se fueron agregando más especies hasta llegar al árbol final con 37 especies (Fig- 14). A pesar de haber metido el doble de especies más este problema fue persistente por lo que decidimos dejarlo así, pero con la intención de resolverlo en el futuro.

El hecho de que Cnih2 en *M. musculus* y *H. sapiens* no tuviera un valor de bootstrap y que ScErv14 estuviera como grupo hermano de Cnih4, nos condujo a realizar un alineamiento de las secuencias de los 4 Cnihs en ratón comparándolas con las secuencias de sus ortólogos en *H. sapiens* y en *S. cerevisiae*. En el alineamiento se encontró que Cnih2 en *M. musculus* y *H. sapiens* son exactamente iguales, esto en realidad no resuelve el problema en cuanto a el valor de los bootstrap, pero sí nos indica que el clado puede estar bien agrupado, no obstante, al observar la región muy conservada del C-terminal entre los Cnihs 1, 2 y 3, y el motivo ácido de serina que se encuentra presente en estos Cnihs y en Erv14, al igual que el motivo acídico (aspartato) que se encuentra presente en Erv14 y Cnih4, surgió una pregunta acerca del rol que juegan en la selección y unión de cargos esos motivos ácidos

conservados en esta región del C-terminal en mamíferos. En la literatura está reportado que en ratones dos motivos ácidos, uno en el asa extracelular y otro en el dominio transmembranal 2 del Cnih3, son esenciales para la unión y modulación de la activación de los receptores de glutamato tipo AMPAR (Shanks., *et al*, 2014); asimismo, Erv14 en plantas y en levaduras, tiene un motivo ácido del C-terminal necesario para el correcto tráfico, selección y unión de múltiples cargos como Nha1 (que es un antiportador de iones), Pdr12 y Qdr2 (un fármaco antiportador de protones) (Rosas-Santiago., *et al*, 2017; Papouskova., *et al* 2021)

Siguiendo la línea de que los cargos de Cornichon pueden ser muy diversos, pero que, debido a este motivo ácido del C-terminal y otros que no hemos detectado, pudieran ser los mismos entre las especies, al menos entre las más cercanas, y considerando los resultados obtenidos en nuestro grupo por Martínez-Morales en el 2021 y Herzing en el 2012, de que Erv14 es necesario para el correcto tráfico de los transportadores de hexosas en *S. cerevisiae* y que la expresión génica de Erv14 está regulada por los niveles de extracelulares de glucosa, a través del ensayo de interacción proteína-proteína (mbSUS) determinamos que sí existe interacción entre los Cornichones 1 y 4 con Glut2 de ratón (Fig. 22), y que la expresión génica de *Cnihs* también está regulada por los niveles de glucosa en la célula (Fig. 28-29).

Hasta ahora se ha comprobado que los cargos se unen a los *Cnihs* a través de un motivo ácido en el C-terminal conservado entre esta familia (Rosas-Santiago., *et al*, 2017), con lo que surge la pregunta de si los transportadores de hexosas de levaduras y los transportadores de glucosa en mamíferos también comparten una región conservada de unión específica al motivo ácido del C-terminal de los Cornichones, lo cual explicaría la interacción que observamos en el ensayo de mbSus entre Glut2 y Erv14. Para ahondar en esto sería interesante analizar el alineamiento de las secuencias de estos transportadores.

Como ya se ha explicado en los apartados anteriores, las células, al no tener una entrada de glucosa adecuada como en el caso de la DM, comienzan a obtener energía de otras fuentes como aminoácidos, lactato, ácidos grasos, entre otros, lo cual implica un desgaste mayor a nivel celular, esta podría ser una posible causa de que, al momento de la obtención de los tejidos, se observó, de manera general, que los tejidos pertenecientes a los ratones tratados tenían un tamaño menor en comparación con los tejidos del grupo vehículo, lo que es un indicativo más de que

el tratamiento funcionó de manera adecuada y que además los resultados obtenidos en los tiempos reales son bastante interesantes, ya que en el caso de los islotes se observó que la expresión génica de *Cnih1*, 2 y 4 es significativamente mayor en los ratones tratados comparado con los vehículo, esto nos deja entrever que posiblemente en aquellos tejidos que no dependen de la insulina (como los islotes) para la captura de glucosa, la regulación de la expresión génica de *Cnih* está siendo, probablemente, regulada por la demanda de la glucosa en estas células, ya que al haber niveles elevados de glucosa en sangre, la célula requiere de más transportadores de glucosa como los Gluts, y para que estos Gluts lleguen hasta la membrana plasmática requieren de los receptores cargo como *Cnih*, por lo tanto mientras mayor sea la demanda de captura de glucosa, mayor será la expresión génica de *Cnih* en este tejido, tal y como lo observamos en nuestros resultados (Fig.28-29) y de manera homóloga como se observó en los resultados descritos por Martínez-Morales entre *Erv14* y los transportadores *Hxt3/Hxt5* en levaduras (Fig.5).

En cambio en los tejidos insulino-dependientes como el hígado, se observó todo lo contrario en el grupo de los tratados, ya que en este caso, como la captura de glucosa depende de la insulina y en este modelo de diabetes se destruyen las células beta del páncreas, no hay una producción adecuada de la insulina y por lo tanto no hay una captura adecuada de la glucosa, por consiguiente los niveles de glucosa dentro de la célula se ven reducidos y a su vez también se reduce los niveles de expresión de *Cnih1*, 2 y 4, ya que no está presente el estímulo de la glucosa intracelular, por el contrario en el grupo vehículo la expresión génica de *Cnih* es significativamente mayor ya que el estímulo de glucosa intracelular se encuentra en condiciones normales, estos resultados (Fig.28-29) en conjunto, sugieren una vez más que la expresión génica de nuestro receptor cargo *Cnih*, sí está en conformidad a la demanda de la captura de glucosa tal.

Por otro lado la discrepancia que teníamos con referente a los datos obtenidos en las PCR punto final y lo descrito en la base de datos de *Expression atlas* (Tabla 3), se logró resolver con los tiempos reales (Fig.28-29), ya que los resultados de los tiempos reales concuerdan con los datos de *Expression atlas*, en ambos tejidos, por lo tanto es posible que la razón por la cual había resultados un poco diferentes en cuanto a la abundancia de los transcritos amplificados en las PCR punto final (Fig.26), hayan sido errores técnicos.

## CONCLUSIÓN

Es interesante ver cómo a través de la evolución en los metazoarios, carbohidratos como la glucosa siguen siendo la principal fuente de energía para el buen mantenimiento de las células, y, para que esto funcione de manera adecuada, existen mecanismos celulares como el tráfico vesicular que permiten el transporte de proteínas esenciales para el metabolismo y la captura de la glucosa como los Gluts y que estos transportadores requieren de receptores cargo como Cnih para su correcto tráfico por la vía anterógrada. Por otro lado, también sabemos que la insulina juega un papel sumamente importante para homeostasis de la glucosa en tejidos insulino-dependientes y en enfermedades como la DM, la falta de insulina reduce los niveles de glucosa intracelular y, en consecuencia, inhibe procesos dependientes de glucosa que son esenciales para el funcionamiento de la célula como la generación de ATP, la síntesis de lípidos, la síntesis de colesterol y la activación de ciertos genes, consecuentemente, esto reduce la expresión génica y el tráfico vesicular, lo cual no solamente daña a la célula, sino también las funciones del propio tejido y esto genera múltiples daños en el organismo.

De ahí la importancia de estudiar no solamente lo que produce la diabetes, si no más bien, todo lo que implica a nivel celular y molecular esta enfermedad, para poder entender un poco mejor cómo tratarla en un futuro.

En este trabajo comenzamos por tomar en cuenta la relación filogenética entre la familia de los receptores cargo Cnih en distintas especies de metazoarios, ya que esto es base fundamental para entender y generar hipótesis sobre la importancia que tiene que esta familia de proteínas se encuentre tan conservada en los animales y, a su vez, esto nos lleva a pensar en la relación con sus diferentes cargos como los Gluts que están implicados también en mecanismos conservados como lo es el metabolismo y la captura de glucosa en las células, lo cual nos lleva al segundo objetivo del proyecto que es estudiar la relación que hay entre Cnih1/Cnih4 con Glut2 mediante un ensayo de interacción proteína-proteína y las conclusiones a las que llegamos al realizar el árbol filogenético de los *Cnihs*, el alineamiento y el ensayo de interacción fueron que Cnih1/Cnih4 son los más basales y están presentes en clados muy diversos, que tienen motivos ácidos que posiblemente están relacionados con la selección y unión de sus cargos y que sí

hay una interacción entre los Cnih1/Cnih4 con Glut2, lo cual resulta muy interesante, ya que es la primera vez que se reporta esta interacción. Esto nos genera interrogantes como, si Glut2 es hasta cierto punto dependiente de Cnih1/Cnih4, qué pasaría si se muta a Cnih1/Cnih4 en hígado y cuáles serían las implicaciones que podría tener o no esta interacción en el estudio de enfermedades relacionadas con el metabolismo de la glucosa. En realidad nos deja con muchas perspectivas de lo que en un futuro se puede investigar en relación a esta interacción.

Y finalmente, mediante la técnica de RT-qPCR determinamos que la expresión génica de *Cnih* tanto en tejidos insulino-independientes (islotos) como insulino-dependientes (hígado), está en conformidad a la demanda de la captura de la glucosa al interior de la célula en un modelo murino diabetizado, tal y como lo habíamos planteado en nuestra hipótesis. Estos resultados a largo plazo podrían tener grandes implicaciones en enfermedades metabólicas como la DM, ya que se podría estudiar cuales son los posibles factores de transcripción que permiten que *Cnih* se exprese y, a partir de esto, generar nuevos fármacos que estimulen la expresión de *Cnih* y en consecuencia esto permita que pueda haber un mejor y tráfico y transporte de los Gluts a la membrana plasmática sin la necesidad de un estímulo de insulina en los tejidos insulino-dependientes.

Todo este trabajo nos permite concluir de manera expectante que Cnih es una familia de receptores cargo que no solamente juega un papel muy importante en homeostasis de la captura de la glucosa en las células de mamíferos al tener como cargos a los Gluts, sino que además, su expresión génica, muy probablemente, está siendo regulada por algún factor implícito en el metabolismo de la glucosa y que ha estado conservado a lo largo de la evolución.

## **PERSPECTIVAS**

Como ya se mencionaba en los resultados, debido a la complejidad y falta de experiencia para la obtención de los islotes se hizo un segundo experimento, tanto para los grupos vehículo como para el grupo tratado y se obtuvieron los mismo tejidos que en el primero, la expectativa es que el procesamiento de los tejidos de ambos experimentos se realicen en un futuro próximo y continuar con un análisis más a profundidad sobre la relevancia que podrían tener estos receptores cargo en los diferentes tejidos (islotes, hígado, timo, testículo, corteza, hipocampo, músculo tibial anterior y músculo tibial posterior), para esto se podrían hacer mutantes en ratones de Cnih 1 y 4 y observar la localización de Glut2 mediante microscopía confocal en tejidos específicos y para corroborar la interacción entre proteína proteína, se podrían llevar a cabo técnicas como, la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), la complementación por fluorescencia bimolecular (BiFC) o técnicas de inmunoprecipitación.

## **CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES 2021**

| Actividades                  | Enero      |   |   |   | Febrero |   |   |   | Marzo     |   |   |   | Abril     |   |   |   |
|------------------------------|------------|---|---|---|---------|---|---|---|-----------|---|---|---|-----------|---|---|---|
|                              | 1          | 2 | 3 | 4 | 1       | 2 | 3 | 4 | 1         | 2 | 3 | 4 | 1         | 2 | 3 | 4 |
| Literatura                   |            |   |   |   |         |   |   |   |           |   |   |   |           |   |   |   |
| Redacción del escrito        |            |   |   |   |         |   |   |   |           |   |   |   |           |   |   |   |
| Elaboración de presentación  |            |   |   |   |         |   |   |   |           |   |   |   |           |   |   |   |
| Ensayo de seminario II       |            |   |   |   |         |   |   |   |           |   |   |   |           |   |   |   |
| Análisis <i>In silico</i>    |            |   |   |   |         |   |   |   |           |   |   |   |           |   |   |   |
| Experimentos                 |            |   |   |   |         |   |   |   |           |   |   |   |           |   |   |   |
| Presentación de seminario I  |            |   |   |   |         |   |   |   |           |   |   |   |           |   |   |   |
| Actividades                  | Mayo       |   |   |   | Junio   |   |   |   | Julio     |   |   |   | Agosto    |   |   |   |
|                              | 1          | 2 | 3 | 4 | 1       | 2 | 3 | 4 | 1         | 2 | 3 | 4 | 1         | 2 | 3 | 4 |
| Literatura                   |            |   |   |   |         |   |   |   |           |   |   |   |           |   |   |   |
| Redacción del escrito        |            |   |   |   |         |   |   |   |           |   |   |   |           |   |   |   |
| Elaboración de presentación  |            |   |   |   |         |   |   |   |           |   |   |   |           |   |   |   |
| Ensayo de seminario II       |            |   |   |   |         |   |   |   |           |   |   |   |           |   |   |   |
| Análisis <i>In silico</i>    |            |   |   |   |         |   |   |   |           |   |   |   |           |   |   |   |
| Experimentos                 |            |   |   |   |         |   |   |   |           |   |   |   |           |   |   |   |
| Presentación de seminario II |            |   |   |   |         |   |   |   |           |   |   |   |           |   |   |   |
| Actividades                  | Septiembre |   |   |   | Octubre |   |   |   | Noviembre |   |   |   | Diciembre |   |   |   |
|                              | 1          | 2 | 3 | 4 | 1       | 2 | 3 | 4 | 1         | 2 | 3 | 4 | 1         | 2 | 3 | 4 |
| Literatura                   |            |   |   |   |         |   |   |   |           |   |   |   |           |   |   |   |
| Redacción del escrito        |            |   |   |   |         |   |   |   |           |   |   |   |           |   |   |   |
| Elaboración de presentación  |            |   |   |   |         |   |   |   |           |   |   |   |           |   |   |   |
| Ensayo de seminario II       |            |   |   |   |         |   |   |   |           |   |   |   |           |   |   |   |
| Análisis <i>In silico</i>    |            |   |   |   |         |   |   |   |           |   |   |   |           |   |   |   |
| Experimentos                 |            |   |   |   |         |   |   |   |           |   |   |   |           |   |   |   |
| Presentación de seminario II |            |   |   |   |         |   |   |   |           |   |   |   |           |   |   |   |



|                              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|------------------------------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| Literatura                   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Redacción del escrito        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Elaboración de presentación  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Ensayo de seminario II       |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Análisis <i>In silico</i>    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Experimentos                 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Presentación de seminario II |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

## **Anexos**

### **Preparación de células competentes de *E. coli***

Día 1

Estriamos colonias de la cepa DH5alfa de *E.coli* en una caja petri con medio LB y la dejamos incubando toda la noche a 37°C.

Día 2

Por la mañana se inoculó una sola colonia en 5 ml de SB a 37°C.

Por la tarde noche se inoculó en 500 ml del medio cultivo SOB a una densidad óptica (DO) inicial de 0.0002 y se dejó incubando a 30°C toda la noche en matraces grandes

Día 3

Se dejaron crecer las bacterias hasta el siguiente día y se paró el cultivo cuando se obtuvo una DO de 0.3.

Luego se vertieron los cultivos de los matraces en botes estériles de 250 ml para centrifugarlos a 4200 rpm por 10 min a 4°C y, a continuación, se descartó el sobrenadante y se resuspendió suavemente el pellet en 30 ml de CCMB80 sobre hielo, posteriormente se le añadió 50 ml de CCMB80 y se dejó en hielo 20 min.

Después se centrifugó a 4200 rpm por 10 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 2 ml de CCMB80 en cada bote de 250ml. Finalmente, se prepararon alícuotas en tubos eppendorf de 1.5 ml y se guardaron a -80°C.

Soluciones

CCMB80 para 200 ml

|   |         |
|---|---------|
| KAc 10 mM                                 | 196 mg  |
| CaCl 2H <sub>2</sub> O 80 mM              | 2.36 mg |
| MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O 20 mM | 800 mg  |
| MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O 10 mM | 400 mg  |
| Glicerol                                  | 20 ml   |

Aforamos a 200 ml con agua MilliQ, ajustamos el pH a 6.4 con HCl y esterilizamos por filtración en campana.

SOB 500 ml

|               |        |
|---------------|--------|
| Bactotriptona | 10 g   |
| Yeast extract | 2.5 g  |
| NaCl          | 292 g  |
| KCl           | 0.93 g |

Aforamos a 500 ml con agua MiliQ y esterilizamos en la autoclave,posteriormente se le añadió 5 ml de MgCl<sub>2</sub> 2M previamente esterilizado por filtración en la campana.

SB 100 ml

|               |       |
|---------------|-------|
| Bactotriptona | 3.5 g |
| Yeast extract | 2 g   |
| NaCl          | 0.5 g |

Se esterilizó en la campana.

```

Cnih1_Fwd      GACTTATTTTGACTGATAGTGACCTGTTGCTTGCAACAAATTGATGAGCAATGCTTTTTT
Cnih1          -----

Cnih1_Fwd      ATAATGCCAACTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCGTTCACTTTTCGCGGCCTTCTGC
Cnih1          -----ATGGCGTTCACTTTTCGCGGCCTTCTGC
                      *****

Cnih1_Fwd      TATATGCTGGCGCTGCTGCTCACCGCCGCGCTCATCTTCTTCGCCATCTGGCACATCATA
Cnih1          TATATGCTGGCGCTGCTGCTCACCGCCGCGCTCATCTTCTTCGCCATCTGGCACATCATA
                      *****

Cnih1_Fwd      GCATTTGATGAGCTGAAGACCGACTACAAGAACCCATAGACCAGTGAATACCCTGAAC
Cnih1          GCATTTGATGAGCTGAAGACCGACTACAAGAACCCATAGACCAGTGAATACCCTGAAC
                      *****

Cnih1_Fwd      CCTCTTGTCCTTCCAGAGTACCTCATCCACGCGTTCTTCTGTGTCATGTTTCTCTGTGCG
Cnih1          CCTCTTGTCCTTCCAGAGTACCTCATCCACGCGTTCTTCTGTGTCATGTTTCTCTGTGCG
                      *****

Cnih1_Fwd      GCAGAGTGGCTGACCCTGGGCCCAATATGCCCTTTTGGCATAACCATATTTGGAGGTAT
Cnih1          GCAGAGTGGCTGACCCTGGGCCCAATATGCCCTTTTGGCATAACCATATTTGGAGGTAT
                      *****

Cnih1_Fwd      ATGAGTAGACCAGTGATGAGCGGCCCTGGCCTCTATGACCCGACGACCATCATGAATGCA
Cnih1          ATGAGTAGACCAGTGATGAGCGGCCCTGGCCTCTATGACCCGACGACCATCATGAATGCA
                      *****

Cnih1_Fwd      GACATTCTAGCCTACTGTCAGAAGGAAGGATGGTGCAAACCTCGCTTTTTACCTTCTAGCG
Cnih1          GACATTCTAGCCTACTGTCAGAAGGAAGGATGGTGCAAACCTCGCTTTTTACCTTCTAGCG
                      *****

Cnih1_Fwd      TTTTTTACTACCTATACGGCATGATCTATGTTCTGGTGAGCTCTTAGGACCCAGCTTTC
Cnih1          TTTTTTACTACCTATACGGCATGATCTATGTTCTGGTGAGCTCTTAG-----
                      *****

Cnih1_Fwd      TTGTACAAAGTTGGCATTATAAGAAAGCATTGCTTATCAATTTGTTGCAACGAACAGGTC
Cnih1          -----

```

**Figura 1. A)** Alineamiento del oligo forward M13\_F que está en el pDONR207 y de esta manera secuenciar el gen *Cnih1*.

```

Cnih4_Rev      ATCAGCTGGATGGCAAATAATGATTTTATTTGACTGATAGTGACCTGTTGTTGCAACA
Cnih4          -----

Cnih4_Rev      AATTGATAAGCAATGCTTTCTTATAATGCCAACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCGGCGCG
Cnih4          -----

Cnih4_Rev      CCCACCCCTTACCATGGAGGCGGTGGTGTTCCTCTTCTCGCTCCTCGACTGTTGCGCGCT
Cnih4          -----ATGGAGGCGGTGGTGTTCCTCTTCTCGCTCCTCGACTGTTGCGCGCT
                      *****

Cnih4_Rev      CATCTTCCTCTCCGTCTACTTCATCATTACATTGTCTGATTTAGAATGTGATTACATTAA
Cnih4          CATCTTCCTCTCCGTCTACTTCATCATTACATTGTCTGATTTAGAATGTGATTACATTAA
                      *****

Cnih4_Rev      CGCCAGATCATGTTGCTCAAATTAAACAAGTGGGTGATCCCGGAGTTGGTCGGCCACAC
Cnih4          CGCCAGATCATGTTGCTCAAATTAAACAAGTGGGTGATCCCGGAGTTGGTCGGCCACAC
                      *****

Cnih4_Rev      CATTGTCACTGTGCTGATGCTTGTCTCCCTGCACTGGTTCATCTTCCTTCTCAACTACC
Cnih4          CATTGTCACTGTGCTGATGCTTGTCTCCCTGCACTGGTTCATCTTCCTTCTCAACTACC
                      *****

Cnih4_Rev      TGTCGCCACGTGGAATATATATAGGTTTATTATGGTGCCAAGTGGCAACATGGGAGTATT
Cnih4          TGTCGCCACGTGGAATATATATAGGTTTATTATGGTGCCAAGTGGCAACATGGGAGTATT
                      *****

Cnih4_Rev      TGATCCAACAGAAATACACAACCGGGGACAGTTAAAGTCACACATGAAAGAAGCCATGAT
Cnih4          TGATCCAACAGAAATACACAACCGGGGACAGTTAAAGTCACACATGAAAGAAGCCATGAT
                      *****

Cnih4_Rev      CAAGCTTGGTTTCTACCTGCTCTGTTTCTTCATGTATCTCTATAGTATGATTCTAGCTTT
Cnih4          CAAGCTTGGTTTCTACCTGCTCTGTTTCTTCATGTATCTCTATAGTATGATTCTAGCTTT
                      *****

Cnih4_Rev      GATAAATGACAAGGGGGCGCCGCGGAGCCTGCTTTTTGTACAAAGTTGGCATTATAAA
Cnih4          GATAAATGACTGA-----
                      *****

Cnih4_Rev      AAAGCATTGCTCATCAATTTGTTGCAACGAACAGGTCACTATCAGTCAAATAAAATCAT
Cnih4          -----

```

**Figura 1. B)** Alineamiento del oligo reverso M13\_R que está en el pENTRTOPO y de esta manera secuenciar el gen *Cnih4*.

Slc2a2\_Fwd TTATAATGCCAACTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCATGTGTCAGAAGACAAGATCACCCGGAA  
Slc2a2 -----ATGTGTCAGAAGACAAGATCACCCGGAA  
\*\*\*\*\*

Slc2a2\_Fwd CCTTGGCTTTCACTGTCTTCACTGCTGTACTGAGTTCCTTCCAGTTCGGCTATGACATCG  
Slc2a2 CCTTGGCTTTCACTGTCTTCACTGCTGTACTGAGTTCCTTCCAGTTCGGCTATGACATCG  
\*\*\*\*\*

Slc2a2\_Fwd GTGTGATCAATGCACCTCAAGAGGTAATAATATCCCATTATCGACATGTTTTGGGTGTTG  
Slc2a2 GTGTGATCAATGCACCTCAAGAGGTAATAATATCCCATTATCGACATGTTTTGGGTGTTG  
\*\*\*\*\*

Slc2a2\_Fwd CACTGGATGACCGAAAGCTGCCATTAACATGACGTCAATGGCACAGACACCCCACTTA  
Slc2a2 CACTGGATGACCGAAAGCTGCCATTAACATGACGTCAATGGCACAGACACCCCACTTA  
\*\*\*\*\*

Slc2a2\_Fwd CAGTCACACCAGCATACACAACACCAGCTCCCTGGGATGAAGAGGAGACTGAAGGATCTG  
Slc2a2 CAGTCACACCAGCATACACAACACCAGCTCCCTGGGATGAAGAGGAGACTGAAGGATCTG  
\*\*\*\*\*

Slc2a2\_Fwd CTCACATAGTCACTATGCTCTGGTCTCTGTCTGTGTCCAGCTTTCAGTGGGCGGAATGG  
Slc2a2 CTCACATAGTCACTATGCTCTGGTCTCTGTCTGTGTCCAGCTTTCAGTGGGCGGAATGG  
\*\*\*\*\*

Slc2a2\_Fwd TCGCCTCATTCTTTGGTGGGTGGCTCGGGGACAAACTTGAAGGATCAAAGCAATGTTGG  
Slc2a2 TCGCCTCATTCTTTGGTGGGTGGCTCGGGGACAAACTTGAAGGATCAAAGCAATGTTGG  
\*\*\*\*\*

Slc2a2\_Fwd CTGCAACAGCCTCTCATTGACTGGAGCCCTCTTGATGGGATGTTCCAAATTTGGACCGG  
Slc2a2 CTGCAACAGCCTCTCATTGACTGGAGCCCTCTTGATGGGATGTTCCAAATTTGGACCGG  
\*\*\*\*\*

Slc2a2\_Fwd CACACGCCCTCATCATTGCTGGACGAAGTGTATCAGGACTGTATTGGGGCTAATTTAG  
Slc2a2 CACACGCCCTCATCATTGCTGGACGAAGTGTATCAGGACTGTATTGGGGCTAATTTAG  
\*\*\*\*\*

Slc2a2\_Fwd GACTGGTTCCAATGTACATTGGAGAGATCGCTCCAACCACACTCAGGGGTGCCCTGGGTA  
Slc2a2 GACTGGTTCCAATGTACATTGGAGAGATCGCTCCAACCACACTCAGGGGTGCCCTGGGTA  
\*\*\*\*\*

Slc2a2\_Fwd CTCTTCACCAACTGGCCCTTGTCACAGGCATTCTTATTAGTCAGATTGCTGGCCTCAGCT  
Slc2a2 CTCTTCACCAACTGGCCCTTGTCACAGGCATTCTTATTAGTCAGATTGCTGGCCTCAGCT  
\*\*\*\*\*

Slc2a2\_Fwd TTATTCTGGGCAATCAGGATCATTGGCACATCCTACTTGGCCTATCTGCTGTGCCAGCTC  
Slc2a2 TTATTCTGGGCAATCAGGATCATTGGCACATCCTACTTGGCCTATCTGCTGTGCCAGCTC  
\*\*\*\*\*

Slc2a2\_Fwd TTCTGCAGTGTCTGCTACTGCTCTTCTGTCCAGAAAGCCCCAGATACCTTTATATAAAGT  
Slc2a2 TTCTGCAGTGTCTGCTACTGCTCTTCTGTCCAGAAAGCCCCAGATACCTTTATATAAAGT  
\*\*\*\*\*

Slc2a2\_Fwd TGAAGAGGAAGTCAGG - -CAAGAAAAGCTTGAAGAGACTAAGAGGAACTGAGGATGTCA  
Slc2a2 TGAAGAGGAAGTCAGGGCAAGAAAAGCTTGAAGAGACTAAGAGGAACTGAGGATGTCA  
\*\*\*\*\*

Slc2a2\_Fwd CC -AAGATATTAATGAGATGAAGAA - -GAAAAGGAGAGGCATCGACTGAGCAGA - -GTCT  
Slc2a2 CC AAGATATTAATGAGATGAAGAA AAGAAAAGGAAAGGCATCGACTGAGCAGA AAGGTCT  
\* \* \* \* \*

Slc2a2\_Fwd CCGTGAT - CAGCTC - TCACGGATG - CAAT - -ACGACAGCCCATCCTCGTGGCGCTGATGC  
Slc2a2 CCGTGATCCAGCTCTTACGGATGCCAATTACCAGAGCCCATCCTCGTGGCGCTGATGC  
\*\*\*\*\*

Slc2a2\_Fwd TGCACATG - -CCAGCAGGTCTCAGGAATC - ATGGA - - -WTTACTATTCAA - CAGCATTT  
Slc2a2 TGCACATGGCCAGCAGTTCTCAGGAATCAATGGGATATTTACTATTCAACCAGCATTT  
\*\*\*\*\*

Slc2a2\_Fwd TCAGAACAGCTG-----  
Slc2a2 TTCAGACAGCTGGCATCAGCCAGCCTGTGTATGCAACCATTGGTGTGGGGCCATCAACA  
\* \*\*\*\*\*

```

Slc2a2_Rev -----
Slc2a2 CAGCCCATCCTCGTGGCGCTGATGCTGCACATGGCCCAGCAGTTCTCAGGAATCAATGGG

Slc2a2_Rev -----GIGTATGCA
Slc2a2 ATATTTTACTATTCAACCAGCATTCTTTCAGACAGCTGGCATCAGCCAGCCTGTGTATGCA
*****

Slc2a2_Rev ACCATTGGTGTGGGGCCATCAACATGATCTTCACGGCTGTCTCTGTGCTGCTTGTGGAG
Slc2a2 ACCATTGGTGTGGGGCCATCAACATGATCTTCACGGCTGTCTCTGTGCTGCTTGTGGAG
*****

Slc2a2_Rev AAGGCAGGGCGGGCGGACCCTGTTCTAACCAGGATGATTGGCATGTTTTCTGCACCATC
Slc2a2 AAGGCAGGGCGGGCGGACCCTGTTCTAACCAGGATGATTGGCATGTTTTCTGCACCATC
*****

Slc2a2_Rev TTCATGTCGGTGGGACTTGTGCTGCTGGATAAAATTCGCCTGGATGAGTTACGTGAGCATG
Slc2a2 TTCATGTCGGTGGGACTTGTGCTGCTGGATAAAATTCGCCTGGATGAGTTACGTGAGCATG
*****

Slc2a2_Rev ACTGCCATCTTCCTCTTTGTCAGTTTCTTTGAGATTGGGCCAGGTCCAATCCCTTGGTTC
Slc2a2 ACTGCCATCTTCCTCTTTGTCAGTTTCTTTGAGATTGGGCCAGGTCCAATCCCTTGGTTC
*****

Slc2a2_Rev ATGGTTGCTGAATTTTTAGCCAAGGACCCCGTCTACGGCTCTGGCACTGGCTGCCTTC
Slc2a2 ATGGTTGCTGAATTTTTAGCCAAGGACCCCGTCTACGGCTCTGGCACTGGCTGCCTTC
*****

Slc2a2_Rev AGCAACTGGGTCTGCAATTTTGTCAATCGCCCTCTGCTTCCAGTACATTGCGGACTTCCTT
Slc2a2 AGCAACTGGGTCTGCAATTTTGTCAATCGCCCTCTGCTTCCAGTACATTGCGGACTTCCTT
*****

Slc2a2_Rev GGGCCTTACGTGTTCTTCTCTTCGCTGGGGTGGTCTGGTCTTACCCTGTTTACATTC
Slc2a2 GGGCCTTACGTGTTCTTCTCTTCGCTGGGGTGGTCTGGTCTTACCCTGTTTACATTC
*****

Slc2a2_Rev TTTAAAGTTCAGAAACCAAGGAAAGTCTTTTGAGGAAATCGCTGCAGAATCCGGAAG
Slc2a2 TTTAAAGTTCAGAAACCAAGGAAAGTCTTTTGAGGAAATCGCTGCAGAATCCGGAAG
*****

Slc2a2_Rev AAGAGTGGTTCGGCCCCACCACGCAAAGCTGCTGTACAAATGGAATTCCTGGCGTCTTCA
Slc2a2 AAGAGTGGTTCGGCCCCACCACGCAAAGCTGCTGTACAAATGGAATTCCTGGCGTCTTCA
*****

Slc2a2_Rev GAGAGTGTG---
Slc2a2 GAGAGTGTGGA
*****

```

**Figura 1. C)** Alineamiento de los oligos forward M13\_F y reverse M13\_R que están en el pDONR207 y de esta manera secuenciar el gen *Glut2*.

## **REFERENCIAS**

Arias-Díaz, J., & Balibrea, J. (2007). Modelos animales de intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2. *Nutrición Hospitalaria*, 22(2), 160-168.

Aronoff, S. L., Berkowitz, K., Shreiner, B., & Want, L. (2004). Glucose metabolism and regulation: beyond insulin and glucagon. *Diabetes spectrum*, 17(3), 183-190.

Ashburner, M., Thompson, P., Roote, J., Lasko, P. F., Grau, Y., El Messal, M., & 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.

Baines AC, Zhang B. (2007) Receptor-mediated protein transport in the early secretory pathway. *Trends Biochem Sci*;32(8):381-388

Bastidas-Ponce, A., Tritschler, S., Dony, L., Scheibner, K., Tarquis-Medina, M., Salinno, C., ... & Lickert, H. (2019). Comprehensive single cell mRNA profiling reveals a detailed roadmap for pancreatic endocrinogenesis. *Development*, 146(12).

Bimboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research*, 7(6), 1513-1523.

Bökel C, Dass S, Wilsch-Bräuninger M, Roth S. (2006) *Drosophila* Cornichon acts as cargo receptor for ER export of the TGF $\alpha$ -like growth factor Gurken. *Development* ;133(3):459-470. doi:10.1242/dev.02219

Brandizzi F, Barlowe C. (2013) Organization of the ER-Golgi interface for membrane traffic control. *Nat Rev Mol Cell Biol.*;14(6):382-392.



Castrejón, V., Carbó, R., & Martínez, M. (2007). Mecanismos moleculares que intervienen en el transporte de la glucosa. *Revista de Educación Bioquímica*, 26(2), 49-57.

Dancourt J. & Barlowe C. (2010) Protein sorting receptors in the early secretory pathway. *Annu Rev Biochem*;79:777-802.

de Jesús Sandoval-Muñiz, R., Vargas-Guerrero, B., Flores-Alvarado, L. J., & Gurrola-Díaz, C. M. (2016). Glucotransportadores (GLUT): Aspectos clínicos, moleculares y genéticos. *Gaceta médica de México*, 152(4), 547-557.

Diep Thi Hoang, Olga Chernomor, Arndt von Haeseler, Bui Quang Minh, and Le Sy Vinh (2017) UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation. *Mol Biol Evol*, in press. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx281>

Docherty, K., & Clark, A. R. (1994). Nutrient regulation of insulin gene expression. *The FASEB journal*, 8(1), 20-27.

Flores, C., Márquez, Y., López-Ortega, A., Mendoza, C., Colmenarez, V., & Salas, Y. (2006). Caracterización de la Diabetes Mellitus experimental inducida con estreptozotocina en ratones nmri. *Gaceta de Ciencias Veterinarias*, 12(1), 13-78.

George Palop, M. (2006). *Estudio de la regeneración del páncreas endocrino en animales transgénicos una nueva aproximación de terapia génica para diabetes tipo 1*. Universitat Autònoma de Barcelona.

Herzig, Y., Sharpe, H.J., Elbaz, Y., Munro, S., and Schuldiner, M. (2012). A systematic approach to pair secretory cargo receptors with their cargo suggests a mechanism for cargo selection by Erv14. *PLoS Biol.* 10, e1001329.

Islam, M.S., Loots, D.T. (2009). Experimental rodent models of type 2 diabetes: a review. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 31: 249–261.

Lam-Tung Nguyen, Heiko A. Schmidt, Arndt von Haeseler, and Bui Quang Minh. (2015). IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies. *Mol Biol Evol*, 32:268-274.

<https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>

Landström, A. H. S., Westman, J., & Borg, L. H. (1988). Lysosomes and pancreatic islet function: time course of insulin biosynthesis, insulin secretion, and lysosomal transformation after rapid changes in glucose concentration. *Diabetes*, 37(3), 309-316.

Lenzen, S. (2008). The mechanisms of alloxan-and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 51(2), 216-226.

Machado Olano, K. T., Cárdenas Rodríguez, A. E., & Navarro López, E. (2019). Transportadores de glucosa: características genéticas, moleculares y fisiopatológicas. *Acta Médica del Centro*, 13(4), 584-600.

Olvera-Granados, C. P., Leo-Amador, G. E., & Hernández-Montiel, H. L. (2008). Páncreas y células beta: mecanismos de diferenciación, morfogénesis y especificación celular endocrina. ¿Regeneración?. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 65(4), 306-324.

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. *Curr Biol*. 25(4): 403 – 412.

Papouskova, K., Moravcova, M., Masrati, G., Ben-Tal, N., Sychrova, H., & Zimmermannova, O. (2021). The C5 conserved region of hydrophilic C-terminal part of *Saccharomyces cerevisiae* Nha1 antiporter determines its requirement of Erv14 COPII cargo receptor for plasma-membrane targeting. *Molecular Microbiology*, 115(1), 41-57.

Pérez-Mendoza, M., De Ita-Pérez, D., & Díaz-Muñoz, M. (2012). Gluconeogénesis: una visión contemporánea de una vía metabólica antigua. *Revista de Educación Bioquímica*, 31(1), 10-20.

Phifer-Rixey, M., & Nachman, M. W. (2015). The Natural History of Model Organisms: Insights into mammalian biology from the wild house mouse *Mus musculus*. *Elife*, 4, e05959.

Powers J., Barlowe, C. (1998). Transport of Axl2p depends on Erv14p, an ER-Vesicle protein related to the *Drosophila* cornichon gene product. *J Cell Biol.* 142(5): 1209 – 1222. 56

Powers J., Barlowe, C. (2002). Erv14p directs a transmembrane secretory protein into COPII-coated transport vesicles. *Mol Biol Cell.* 13(3): 880 – 891.

Rees, D.A., Alcolado, J.C. Animal models of diabetes mellitus. *Diabet Med* 22:359–370. (2005).

Reyes, J. A. O., & Plancarte, A. A. (2008). Bases moleculares de las acciones de la insulina. *Revista de educación bioquímica*, 27(1), 9-18.

Rodriguez, H. G. R., y Méndez, J. D. (1994). Diabetes mellitus experimental. *Ciencia Veterinaria, México*, 6, 347-377.

Rosas-Santiago P, Zimmermannova O, Vera-Estrella R, Sychrová H, Pantoja O. (2016) Erv14 cargo receptor participates in yeast salt tolerance via its interaction with the plasma-membrane Nha1 cation/proton antiporter. *Biochim Biophys;1858(1):67-74*

Rosas-Santiago, P., Lagunas-Gomez, D., Yáñez-Domínguez, C., Vera-Estrella, R., Zimmermannová, O., Sychrová, H., & Pantoja, O. (2017). Plant and yeast cornichon possess a conserved acidic motif required for correct targeting of plasma membrane cargos. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1864(10), 1809-1818.

Roth, S., Neuman-Silberberg, F. S., Barcelo, G., & Schüpbach, T. (1995) Cornichon and the EGF receptor signaling process are necessary for both anterior-posterior and dorsal-ventral pattern formation in *Drosophila*. *Cell*, 81(6), 967-978.

Schwenk J, Harmel N, Zolles G, et al. (2009) Functional proteomics identify cornichon proteins as auxiliary subunits of AMPA receptors. *Science*;323(5919):1313-1319. doi:10.1126/science.1167852

Shanks, N. F., Cais, O., Maruo, T., Savas, J. N., Zaika, E. I., Azumaya, C. M., ... & Nakagawa, T. (2014). Molecular dissection of the interaction between the AMPA receptor and cornichon homolog-3. *Journal of Neuroscience*, 34(36), 12104-12120.

Singer M., Berg P., 1982. Genes and genomes. A changing perspective  
Shanks, N. F., Cais, O., Maruo, T., Savas, J. N., Zaika, E. I., Azumaya, C. M., ... & Nakagawa, T. (2014). Molecular dissection of the interaction between the AMPA receptor and cornichon homolog-3. *Journal of Neuroscience*, 34(36), 12104-12120.

Singh, K., & Xie, M. (2008). Bootstrap: a statistical method. *Unpublished manuscript, Rutgers University, USA. Retrieved from [http://www. stat. rutgers. edu/home/mxie/RCPapers/bootstrap. pdf](http://www.stat.rutgers.edu/home/mxie/RCPapers/bootstrap.pdf)*, 1-14.

Spang A. (2009) On vesicle formation and tethering in the ER–Golgi shuttle; *Current Opinion in Cell Biology*, Volume 21, Issue 4, Pages 531-536

Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological research*, 50(6), 537-546.

Tokarev AA, Alfonso A, Segev N. (2013) Overview of Intracellular Compartments and Trafficking Pathways. In: *Madame Curie Bioscience Database [Internet]*. Austin (TX): Landes Bioscience

Utku, N., Bulwin, G. C., Beinke, S., Heinemann, T., Beato, F., Randall, J., ... & Gullans, S. R. (1999) The human homolog of *Drosophila* cornichon protein is differentially expressed in alloactivated T-cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1449(3), 203-210.

Venditti R., Wilson C., and De Matteis Ma. (2014). Exiting the ER: what we know and what we don't, *TIGEM Trends in Cell Biology*, Vol. 24, No. 1.

Wudick, M. M., Portes, M. T., Michard, E., Rosas-Santiago, P., Lizzio, M. A., Oliveira, C. N., Campos, C., Santa Cruz Damineli, D., Carvalho, J. C., Lima, P. T., Pantoja, O., Feijó, J. A. (2018). CORNICHON sorting and regulation of GLR channels underlie pollen tube Ca<sup>2+</sup> homeostasis. *Science*. 360(6388): 533 – 536.

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: **MILDRED IVETTE LANGO MONTIEL**, con el título del trabajo: **POSIBLE REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE CORNICHON EN UN MODELO DE DIABETES EN RATÓN Y SU RELACIÓN CON EL TRÁNSITO DE TRANSPORTADORES DE GLUCOSA A LA MEMBRANA PLASMÁTICA.**

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. PATRICIA ESCOBAR CASTAÑEDA

\_\_\_\_\_

SECRETARIO: DRA. ELIZABETH NAVA GARCIA

\_\_\_\_\_

VOCAL: DR. PAUL ROSAS SANTIAGO

\_\_\_\_\_

SUPLENTE: DRA. NAYELI MONTERROSAS BRISSON

\_\_\_\_\_

SUPLENTE: DR. EDGAR DANTÁN GONZÁLEZ

\_\_\_\_\_

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

**NAYELI MONTERROSAS BRISSON** | Fecha:2022-10-19 09:45:04 | Firmante

qqrwNmUhxSavgo5xfXbNtwVrWlzYgXmWMB65pRjgApYae3M0gHqWWxKTGtH331Q/3KQkYgH0uZY6fugv1xXm/n3YsGHtbChnptRd5ob3RNIgPZPAWAgk3aEi3ZRRWn+7RetlxbgkLokHqCmrZ0oaDIFPcfMhuLeNr1X2+DNiIXZuGuANMvnYERW0axaDf9IAWmaGtTLVAT2cfYx7rzHLwTzUJr+SBwnTBn9qsVJMptks/rkPdMF5GOToyill5AEIbRBxpjQDXqgrnaDmpmrdqY8R72deDRFoCKeMKNj/4WbCm6JBfrBJduGxTQFh6YSnaK8d0mykWZT/+MBZqg==

**PAUL ROSAS SANTIAGO** | Fecha:2022-10-19 09:59:04 | Firmante

h6aH1IVtm1BebTODAzmeYvoNP2XMFNcphmL9RyfB44YM3A8Ef1ggquo8ZRdh4IKc3CZi8sFiIzTfH1qPRXISXN45adz6fEk0QDKHGji6nCHI9aHIMk7p1LJFdSfAoxGk/rwQ46VRK52NwvWhy55amjY+cb8gsYLSFPqCjwF3ok+pX2exniAIJyBzOI3TMw4DyznE8GKWex9rYtLTRpcS06pgNZPmU2VDrdlCvQ0TJY0b/g9IPOzgu90MPVVKvAZOPo+Fj9ToYeO+uozuxDso+Pz8S0q9/en9RrZeMfm64Gut2BEDFzCpsyCM2KIlb33rZV2GbGzpr4JwRjphjhmw==

**ELIZABETH NAVA GARCIA** | Fecha:2022-10-19 10:05:26 | Firmante

blhWxh4/zxbuunkuNj18ggQZ2szZ8j3pPP8Er3Wi69EBL2ROBfD6cFztldxf7+Mbqc2ogsyWVG+lzuHKbvAKNSRVCxZEe/bLthnzPYsBrr95F9oDOJCwPMYKIZGEMGaHLf1xeCT12APzzH/4PANrsvp1AXHzHVawIMDn+0EVf+1DYB/D5wNBySorhUTuTSG2gLOdevRpRNltw92R3D4IsiEuGXb4qV0Xso4vvdQXct9Pu4xrdrybOWWwxAiFPMTwoZi6zxH5ITZdOcu/ly+aTXtMatSBhg63HeewVILuF8pXX+vZ3pDpj0Wuu5dvK18PuLbU1jcHViolQgUR4A==

**EDGAR DANTAN GONZALEZ** | Fecha:2022-10-25 07:24:00 | Firmante

ZRk8qQWbk8LA6NLaMdmWexNbST2gviY2HJ+ur/YJap7p1Ljf0y55pO5r57O/2gAZ6RhwWf2/x9FwAmoC6N5LHi6GzxUbqchqf2gg47Z6RGJ9cEZGlvfpxT61tQkXMRx3AK2CCN0BWSrW3cs1x4nYOI3YbbAN1iP6eZ2RViyuumWP/PelRLCMZsLw7bqluMqGOHEoFADEVmkKv4aXbwV9J2q/ZbMugkd7W76CqYkCq8R2PXl6kRAzGqcFMIW+cgu2clLayCSnJL43+QVx8B4NwNphVR/rBOt8At+iANr+vcXO52ckjRuKz49SNLqHyoyY6Wie9kabV+fCqnKQmLA==

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



6T4DnsZ2

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/6yJcxpAZQtNn2XAcREGURcpBPoaMbcE>