



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**CARACTERIZACIÓN DEL *LOCUS* DE CADENA PESADA DE
INMUNOGLOBULINA (IGH) EN EL MURCIÉLAGO *Desmodus rotundus***

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A:
SIDNEY YARED MARTÍNEZ SÁNCHEZ

DIRECTOR

DR. JESUS MARTÍNEZ BARNETCHE

CUERNAVACA, MORELOS

MAYO, 2023



Ilustración de *Desmodus rotundus* por Juan Carlos Martinez

*A la pequeña Sid, que siempre soñó
con hacer ciencia.*

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, quiero agradecer al Dr. Jesús Martínez Barnetche por haberme guiado durante mi proceso de tesis, su enseñanza, paciencia y consejos fueron pieza clave para mi desarrollo profesional. De igual forma, también quiero agradecer a la Dra. Tina por su enseñanza y apoyo, su participación en el proyecto fue sin duda esencial para que pudiera llevarse a cabo.

Gracias a mi comité sinodal: Dr. Antonio Guerrero, la Dra. Rayo Sánchez y el Dr. Humberto Lanz por sus aportaciones, comentarios al proyecto y la revisión de este manuscrito.

A mis amigas fieles de la carrera, Selena y Valeria, gracias por las horas de estudio y risas, por los viajes a campo y por siempre ayudarme en los momentos más difíciles, gracias por el apoyo y por hacer más ligera la carrera.

Gracias a mi familia por siempre apoyarme e impulsarme a ser mejor persona y cumplir mis metas y sueños, gracias por siempre estar para mí. A pepito, tía Adry, María, Mimí y Chanwis. A Xnet, mi hermana de aventuras y travesuras. A Monchichi, por mi pequeña herencia para el conocimiento, espero verte de nuevo algún día, mi amiga.

A mi mami Mar, que lo es todo, gracias infinitas por estar y ser. Esto es para ti.

A pepinillo por estar al 100% desde el día 1, gracias por contenerme cuando siento que no puedo, gracias por la pequeña familia a lado de Lía, Wanda, Pelú y Butch, los amo.

RESUMEN

Las inmunoglobulinas (Ig) o anticuerpos son proteínas heterodiméricas que cumplen con una doble función en el organismo: reconociendo antígenos como un receptor de la superficie celular y activar mecanismos moleculares que inducen su neutralización. Su estructura proteica se conforma de dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L).

A través del reordenamiento de genes que codifican para la inmunoglobulina se puede producir un amplio repertorio de anticuerpos con la capacidad de reconocer una gran cantidad de patógenos. Estos genes se encuentran separados en segmentos génicos denominados variable (V), de diversidad (D), de unión (J) y la región constante (C).

Los murciélagos tienen una importancia significativa en el ámbito de la salud humana debido a su papel como reservorios de una amplia gama de virus zoonóticos. Si bien los murciélagos en sí mismos no muestran ningún signo de enfermedad, la escasez de conocimientos sobre su respuesta inmunitaria adaptativa supone un obstáculo para comprender sus mecanismos funcionales.

En este trabajo se identificó, anotó y describió el locus de cadena pesada de las inmunoglobulinas (IGH) en el murciélago *Desmodus rotundus*. Se identificaron un total de 59 genes IGHV: 20 funcionales y 39 no funcionales. Todos los genes funcionales contenían genes representativos de los 3 clanes de genes VH de mamíferos, además de presentar secuencias de las señales de recombinación (RSS). Se identificaron 6 genes IGHD e IGHJ funcionales con sus RSS's correspondientes. Para la región constante, se encontraron 4 genes correspondientes a los isotipos de C μ , C γ , C ϵ y C α . Nuestros hallazgos sugieren que el locus IGH en *D. rotundus* tiene una organización canónica de mamíferos.

ÍNDICE

ÍNDICE	1
ÍNDICE DE FIGURAS	3
ÍNDICE DE TABLAS	4
ABREVIATURAS Y SIGLAS	5
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. Orden Chiroptera	7
1.2. Sistema inmune en vertebrados	8
1.2.1. Inmunidad innata	8
1.2.2. Inmunidad adaptativa	9
1.3. Inmunoglobulinas	10
1.3.1. Genes IGH	11
1.3.2. Generación de diversidad de anticuerpos	13
1.4. Inmunología en murciélagos	16
2. ANTECEDENTES	18
2.1. Secuenciación genómica en Chiropteros	18
2.2. Desmodus rotundus	23
3. JUSTIFICACIÓN	25
4. HIPÓTESIS	25
5. OBJETIVOS	25
5.1. Objetivo general	25
5.2. Objetivos particulares	25
6. METODOLOGIA	26
6.1. Identificación de scaffolds del locus IGH	26
6.2. Mapeo de transcriptoma	26
6.3. Anotación manual del locus IGH	26
6.4. Secuencias señal de recombinación	27
6.5. Árbol filogenético de genes VH funcionales	27
6.6. Regiones de Switch	27
7. RESULTADOS	29
7.1. Identificación del locus IGH	29
7.2. Anotación y descripción de los genes IGHV, IGHD e IGHJ	30
7.3. Anotación y descripción de los genes IGHC	33
7.3.1. Regiones de Switch	35

7.4. Comparación del Locus IGH de <i>Desmodus rotundus</i> con la anotación de otras especies de murciélagos.	36
8. DISCUSIÓN	38
9. CONCLUSIONES	40
ANEXOS	41
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	<i>Sistema inmune innato y adaptativo.</i>	10
Figura 2.	<i>Modelo bidimensional de una inmunoglobulina.....</i>	11
Figura 3.	<i>Locus IGH de humano: genes y RSS.</i>	12
Figura 4.	<i>Mecanismo molecular de la recombinación V(D)J.</i>	14
Figura 5.	<i>Mecanismo de recombinación por cambio de clase.</i>	15
Figura 6.	<i>Respuesta inmune en murciélagos.....</i>	17
Figura 7.	<i>Esquema de las fases del megaproyecto Bat 1K</i>	20
Figura 8.	<i>Organización genética del locus IGH de R. aegyptiacus.</i>	21
Figura 9.	<i>Caracterización del locus IGH de cuatro especies de murciélagos.....</i>	22
Figura 10.	<i>Desmodus rotundus.....</i>	24
Figura 11.	<i>Diseño de la metodología</i>	28
Figura 12.	<i>Organización de los Scaffolds del locus IGH de D. rotundus.....</i>	29
Figura 13.	<i>Análisis estructural de las secuencias señal de recombinación de genes IGHV de D. rotundus.</i>	30
Figura 14.	<i>Árbol filogenético de genes IGHV.....</i>	31
Figura 15.	<i>Traducción de la secuencia de los genes IGHD de D. rotundus.....</i>	32
Figura 16.	<i>Analisis estructural de las secuencias señal de recombinación de genes IGHD de D. rotundus.</i>	32
Figura 17.	<i>Análisis estructural de los genes IGHJ de D. rotundus.</i>	33
Figura 18.	<i>Organización la region constante del locus IGH de D. rotundus.....</i>	33
Figura 19.	<i>Estructura del gen IGHM de la region constante del locus IGH de D. rotundus</i>	33
Figura 20.	<i>Estructura del gen IGHG de la region constaste del locus IGH en D. rotundus</i>	34
Figura 21.	<i>Estructura del gen IGHE de la región constante del locus IGH en D. rotundus</i>	34
Figura 22.	<i>Estructura del gen IGHA de la region constante del locus IGH de D. rotundus</i>	34
Figura 23.	<i>Densidad de los motivos “Hotspots” de la region constante en D. rotundus..</i>	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	<i>Organización del locus IGH de D. rotundus.....</i>	29
Tabla 2.	<i>Comparación de la anotación de la región VH de D. rotundus con otras especies de murciélagos.....</i>	37
Tabla 3.	<i>Comparación de la anotación de la región CH de D. rotundus con otras especies de murciélagos.....</i>	37

ABREVIATURAS Y SIGLAS

aa	Aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADN _{pol}	ADNpolimerasa
AGCT	Adenina, Guanina, Citosina, Timina
AID	Desaminasa Inducida por Activación
APC	Célula presentadora de antígeno
BAC	Cromosomas artificiales bacterianos
BCR	Receptor de células B
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
C _H	Región constante de cadena pesada
C _L	Región constante de cadena ligera
CRS	Recombinación por cambio de clase
Contig	Segmentos de ADN superpuestos, juntos conforman una región consenso de ADN
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IGH	Locus de cadena pesada de inmunoglobulina
IGHA	Gen de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina alpha
IGHM	Gen de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina mu
IGHD	Gen de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina delta
IGHE	Gen de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina epsilon
IGHG	Gen de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina gamma
IGHJ	Gen de la región de unión de cadena pesada
IGHV	Gen de la region variable de cadena pesada
IGL	Inmunoglobulina de cadena ligera
IL	Interleucina
ISG	Genes estimulados por interferón

MERS	Síndrome respiratorio del oriente medio
MHC-I	Complejo principal de histocompatibilidad, clase I
NCBI	Centro Nacional para la Información Bioinformática
Pb	Pares de bases
PRR	Receptor de reconocimiento de patrones
RAG	Gen activador de la recombinación
RSS	Secuencias señal de recombinación
SARS	Síndrome respiratorio agudo grave
Scaffold	Porción de secuencia genómica reconstruida, esta compuesta por contigs
SHM	Hipermutación somática, del inglés: Somatic HyperMutation
SIA	Sistema inmune adaptativo
SII	Sistema inmune innato
TCR	Receptor de células T
TLR	Receptor de tipo Toll

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Orden *Chiroptera*

Los mamíferos (Mammalia) son vertebrados que conforman un grupo taxonómico con el que comparten características fundamentales (glándulas mamarias, cuerpo cubierto de pelo, diferentes tipos de dientes, entre otros) y que han sido pieza clave en su éxito evolutivo, colocándolo como el grupo más diverso por su forma y su función en el ecosistema (Guerrero *et al.*, 2020). A nivel global se reportan un total de 6,569 especies de mamíferos. Para México se reportan 550 especies que incluyen a 201 géneros, 46 familias y 13 órdenes; siendo *Rodentia* y *Chiroptera* los órdenes con mayor riqueza de especies (Ceballos y Arrollo-Cabral, 2012).

Dentro del orden *Chiroptera* se encuentran los murciélagos, los que se caracterizan por ser los únicos mamíferos con la capacidad de vuelo, además de poseer la ecolocalización que les permite orientarse en la oscuridad a través del sonido. Presentan una excepcional longevidad, hibernación y gran diversidad en tamaño de cuerpo y morfología (Teeling, 2018; Banerjee, 2020). Como resultado de estas extraordinarias adaptaciones pueden ocupar diversos nichos ecológicos. Se distribuyen a lo largo de todos los continentes con excepción de la Antártida y se calcula que existen aproximadamente un total de 1329 especies en el mundo, ocupando el segundo lugar con mayor número de especies entre los mamíferos.

Los murciélagos exhiben una amplia gama de hábitos alimenticios que abarcan los insectívoros, frugívoros, nectarívoros y del tipo hematófago. Sus contribuciones ecológicas son multifacéticas e incluyen la dispersión de semillas, la polinización y el control de insectos (Fenton y Simmons, 2014; Banerjee, 2020).

Existe evidencia de que los murciélagos son reservorios de una gran amplia gama de virus zoonóticos que pueden transmitirse entre especies, principalmente a través las interacciones ecológicas, el vuelo, ya que los murciélagos poseen la capacidad de viajar largas distancias ocupando un amplio hábitat y a través de la actividad humana. Se han identificado que los murciélagos son la fuente de numerosas infecciones virales, incluidas, entre otras, el virus de la rabia, virus de influenza A, hantavirus, virus de Marburgo, SARS y MERS (Wynne, 2013; Wong *et*

al., 2019). Por lo tanto, el estudio del sistema inmune en los quirópteros es de particular interés para la salud humana.

1.2. Sistema inmune en vertebrados

El sistema inmune se constituye por proteínas, células y órganos, tiene como objetivo principal la protección del organismo frente a agentes infecciosos y microorganismos, así como la inmunovigilancia contra enfermedades autoinmunes y alergias. Su funcionamiento se basa en el reconocimiento de agentes extraños, que son neutralizados y posteriormente eliminados del organismo (Toche, 2012). Por sus mecanismos de reconocimiento y respuestas efectoras, el sistema inmune se divide en innato y adaptativo (Figura 1).

1.2.1. Inmunidad innata

El sistema inmune innato (SII) es la primera línea de defensa. Actúa de manera rápida e inespecífica. Comprende mecanismos moleculares y elementos celulares integrados que son evolutivamente más primitivos (Punt *et al.*, 2014). El SII incluye barreras físicas y químicas, células inmunitarias innatas como macrófagos, neutrófilos, células asesinas naturales o NK (Natural Killer) y células dendríticas, además de proteínas séricas denominadas complemento (Toche, 2012), entre otras.

El inicio de la respuesta inmune innata requiere que las células fagocíticas sean capaces de reconocer a través de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), los patrones moleculares que son expresados sobre la superficie de los patógenos (PAMP). Entre los PRR, se encuentran los receptores tipo Toll (TLR); los que al activarse permite que los neutrófilos sean capaces de producir citocinas y quimiocinas que contribuyen a la inflamación de tejidos (Harvery Lodish *et al.*, 2016) a través de la secreción con actividad antiviral como interferones de tipo I ($\text{INF}\alpha$ e $\text{INF}\beta$) y de citocinas pro inflamatorias como la interleucina -6 (IL-6) (Sun *et al.*, 2020) y el $\text{TNF}\alpha$. Los interferones de tipo I juegan un papel importante en la respuesta a infecciones virales, actúan mediando la resistencia de la replicación vírica en células, además, aumentan la expresión de células del

complejo principal de histocompatibilidad I (MHC I) y presentación del antígeno, activan células dendríticas, macrófagos y linfocitos citolíticos para que eliminen células infectadas por el virus (Murphy *et al.*, 2009).

1.2.2. Inmunidad adaptativa

El sistema inmune adaptativo (SIA) se caracteriza por tener una respuesta específica, diversa, especializada y generar memoria; está presente en todos los vertebrados y se basa principalmente en el reconocimiento del antígeno a través de la unión con los receptores de linfocitos B (BCR) y T (TCR); esta respuesta inmune se divide en inmunidad celular e inmunidad humoral (Toche, 2012).

La **inmunidad celular** es mediada por los linfocitos T que son el principal mecanismo de defensa; estas células se dividen en linfocitos T CD4+ que secretan citocinas y linfocitos T CD8+ que eliminan células infectadas y tumorales. Cuando el patógeno ingresa al organismo es captado por una célula presentadora de antígeno (APC) que lo transporta al tejido linfoide secundario (bazo, ganglios linfáticos, etc.) en donde se transformará en un péptido que se expresará en la membrana de la APC, con la finalidad que los TCR reconozcan al antígeno y este sea eliminado a través de la producción de linfocitos T CD4+, que ayudan a los macrófagos a fagocitar a las células infectadas. Los TCRs, se especializan principalmente en reconocer virus que se han replicado al interior de las células hospedadas (Lodish *et al.*, 2016; Murphy *et al.*, 2009).

Por otra parte, en la **inmunidad humoral** participan las inmunoglobulinas o anticuerpos expresados por linfocitos B como receptores de células B (BCR) o secretados, los cuales están especializados para reconocer agentes patógenos extracelulares como bacterias (Murphy *et al.*, 2009) y contribuir a su eliminación.

Cuando los linfocitos B reconocen al antígeno a través del BCR, se activa la célula B para producir anticuerpos y neutralizar al patógeno a través de mecanismos efectores como la opsonización. A su vez esta misma célula B se convierte en APC para presentar al antígeno a los linfocitos T (Harvery Lodish *et al.*, 2016).

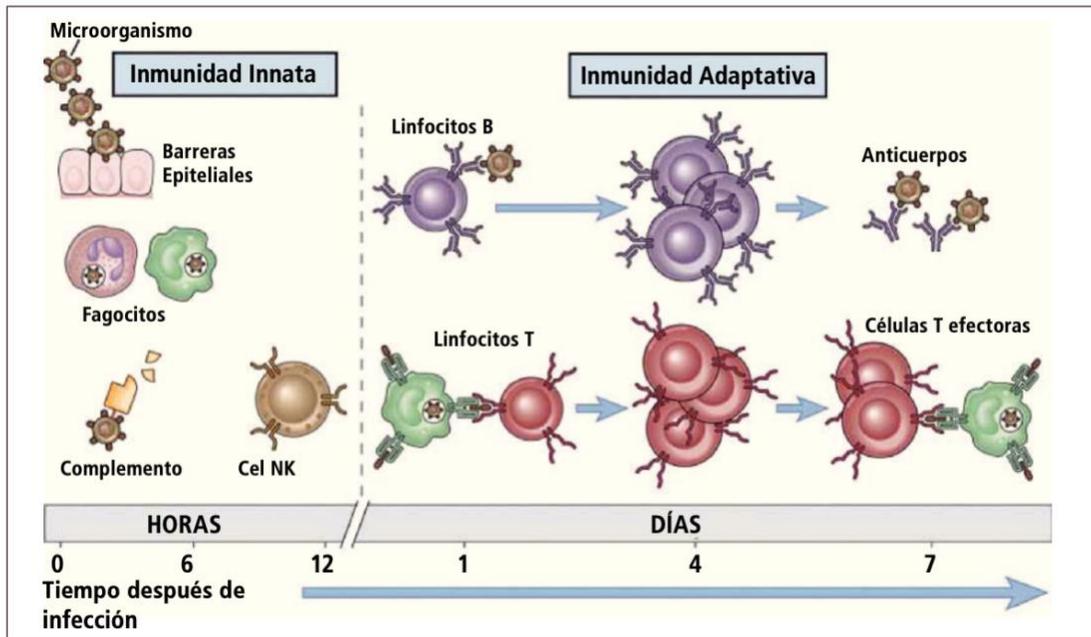


Figura 1. Sistema inmune innato y adaptativo. Tomado de Abbs et al., 2012.

1.3. Inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas (Ig) o anticuerpos son proteínas heterodiméricas que cumplen una doble función en el organismo: 1) reconocen antígenos como BCR y 2) activando mecanismos moleculares que inducen la neutralización de estos mismos en el organismo (Marie-Paule Lefranc *et al.*, 2001). Las Ig pertenecen a la súper familia de las Inmunoglobulinas (IgFS) y en mamíferos hay diferentes clases de inmunoglobulinas: IgM, IgA, IgD, IgE, e IgG (Akula, 2014).

Su estructura se compone principalmente por dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) (Figura 2). La cadena ligera se constituye por una cadena ligera Kappa (κ) o una cadena ligera Lambda (λ). La región Fab (del inglés: Antigen Binding Fragment) que está asociada directamente con el reconocimiento y la unión al antígeno; se conforma por una cadena L y la mitad de una cadena H.

Cada cadena contiene un dominio variable en el N-terminal (V_H y V_L) y uno o varios dominios constantes en el terminal-C (C_H y C_L); los dominios V presentan bucles hipervariables entre las láminas β que se les denominan regiones determinantes de complementariedad (CDRs) (Rendon-Anaya *et al.*, 2008). Cada linfocito B tiene una inmunoglobulina de superficie (BCR) única en virtud de que la

región V tiene una secuencia de aminoácidos única. La región Fc (fracción cristalizante) interactúa con moléculas efectoras del sistema de complemento y los receptores Fc (Lefranc, 2001; Schroeder, 2010).

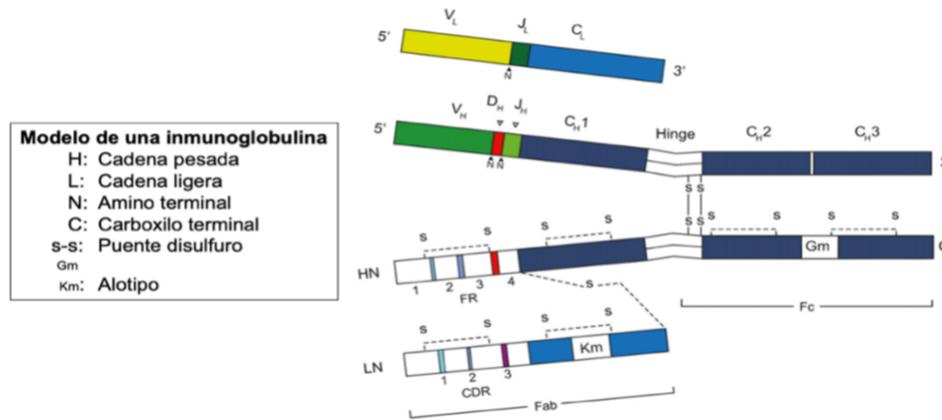


Figura 2. **Modelo bidimensional de una inmunoglobulina.** Tomado y editado de Schroeder, 2010.

1.3.1. Genes IGH

Los genes que codifican para las Igs se caracterizan por estar separados en segmentos génicos, el locus IGH en humanos se localiza en el cromosoma 14, en la banda 14q32.33 y mide aproximadamente 1250kb. La región C está codificada en un solo segmento de ADN que está compuesto de varios exones que codifican para las distintas clases de Ig; C μ , C δ , C γ , C ϵ y C α ; además, en esta región se encuentran en secuencias en tándems repetidos que se denominan “Hotspots”. Motivos conservados requeridos para ser reconocidos por la maquinaria de la recombinación por cambio de clase (Casali, 2012). La región V del locus de cadena pesada, está codificada por múltiples segmentos de variabilidad (V), múltiples de diversidad (D) y múltiples de unión (J). Estos segmentos génicos están flanqueados por las secuencias de señal de recombinación (por sus siglas en inglés, RSS), compuestas por un heptámero y un nonámero que son altamente conservadas en mamíferos, separadas por una secuencia espaciadora de 12 o 23 pb. Los segmentos génicos se encuentran en las regiones 5' de los genes IGHJ, en las regiones 3' de los genes IGHV, en caso de los genes IGHD se encuentran en los flancos (Lefranc *et al.*, 2001) (Figura 3).

De acuerdo con la descripción realizada por el IMGT (ImMunoGenetics information system), los genes V, D, J se estructuran de la siguiente manera:

- **Genes de variabilidad (V)**

Los genes IGHV, tienen un tamaño aproximado de 300pb que codifican para el 85% del dominio V de inmunoglobulina. Contiene RSSs en su flanco 3', que corresponde al heptámero CACAGTG y al nonámero ACAAAAACC, las que están separadas por una secuencia de 23pb.

Además, los genes VH en vertebrados se agrupan en familias basándose en un criterio del >75% de identidad nucleotídica. Así mismo, estas familias a su vez se agrupan en clanes; en mamíferos se clasifican en clan I, II y III. Especies como roedores y primates tienen familias de genes VH representativos de los 3 clanes (Baker, 2010).

- **Genes de diversidad (D)**

Los genes IGHD se localizan entre los genes IGHV e IGHJ y se presentan en ambos flancos RSSs.

- **Genes de unión (J)**

Los genes IGHJ están río arriba de los genes IGHC. Las RSSs correspondientes al nonámero es GGTTTTTGT y la del heptámero es CAATGTG.

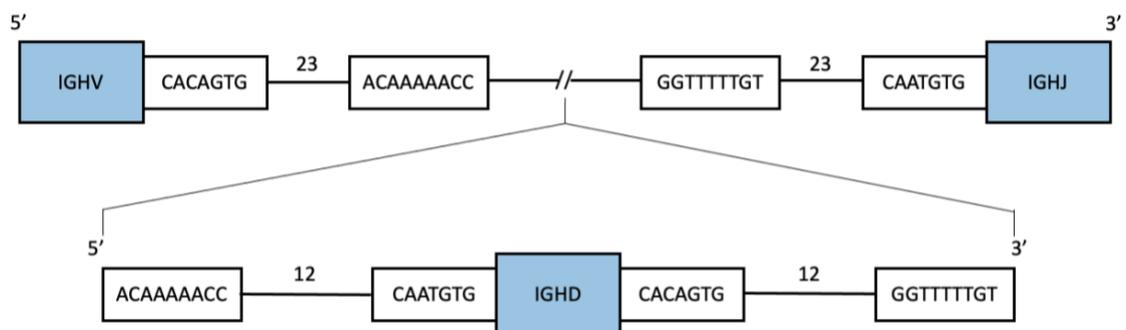


Figura 3. **Locus IGH de humano: genes y RSS.** Tomado de: LeFranc y LeFranc, 2001. Editada por autor.

1.3.2. Generación de diversidad de anticuerpos

A través del reordenamiento de los genes que codifican para receptores de linfocitos T y B (TCR, BCR) se puede generar un amplio repertorio de diversidad de anticuerpos capaces de reconocer un sinnúmero de antígenos; este proceso es denominado **recombinación V(D)J** (Litman *et al.*, 2010) y ocurre durante el desarrollo temprano de linfocitos B y T, siendo el mecanismo primario de diversificación de las Ig.

La recombinación V(D)J es dependiente del reconocimiento de las secuencias de señal de recombinación (RSS's) que flanquean cada uno de los segmentos génicos. Cabe destacar que es necesario que la "regla 12/23" se cumpla para que las RSS's sean compatibles (Figura 4, C). Posterior al reconocimiento de las RSS's, se forma un complejo entre las RAG 1/2 y la proteína del grupo de alta movilidad B1 (HMGB1) que actúan como endonucleasa induciendo cortes en la doble cadena del ADN entre cada RSS y segmento génico a recombinar (Hernandez-Munain, 2013). La RAG 1 contiene en su mayoría el sitio activo que cataliza la escisión del ADN, mientras que la RAG 2 actúa como cofactor indispensable del corte de doble cadena (Figura 4, B). Los cortes producidos son procesados y ligados por la vía de reparación de recombinación no homóloga (por sus siglas en inglés, NHEJ), la unión entre segmentos V-D, D-J o V-J se denominan "uniones codificantes", mientras que las uniones entre RSSs se denominan "uniones no codificantes" (Figura 4, A) (Schatz, 2011).

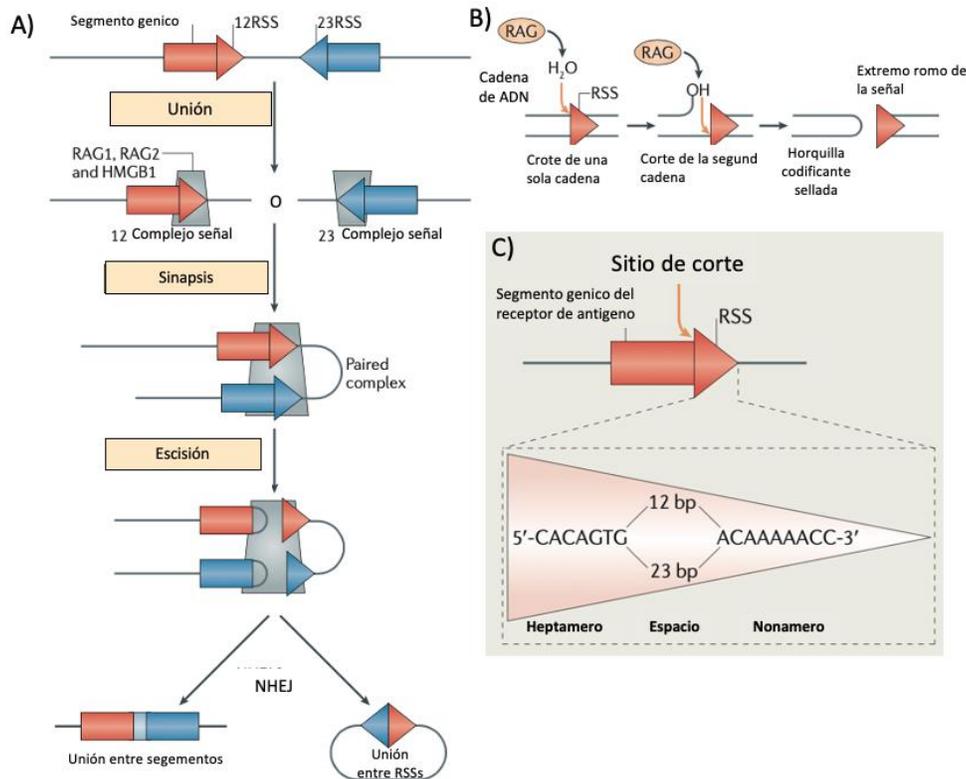


Figura 4. **Mecanismo molecular de la recombinación V(D)J.** Tomado de Litman et al., 2010.

Aquellos linfocitos B que logran re-arreglos productivos de genes de ambas cadenas (H+L) sobreviven y migran a los órganos linfoides secundarios donde terminan su maduración a linfocito B virgen. Ante un reto antigénico de naturaleza proteica, los segmentos variables pueden pasar una diversificación secundaria que permite la mejora de la especificidad de anticuerpos mediante mutaciones en los nucleótidos en los segmentos variables re-arreglados. Este mecanismo se conoce como **hipermutación somática** (SHM). La Desaminasa Inducida por Activación (AID) regula este proceso a través de la desaminación de citosinas a uracilos que al ser replicados por las ADNpol se producen sustituciones tipo C-G a T-A (Hetzl, 2019).

Estas mutaciones se limitan al dominio de hipermutación, región situada río abajo del promotor, la frecuencia mutagénica aumenta a lo largo del exón líder (L) y alcanza el máximo en el exón V(D)J reordenado (Jacobs, 2001).

Por otra parte, los linfocitos B vírgenes solo expresan IgM e IgD y durante la respuesta inmune se producen clases y/o subclases de Ig que se seleccionan dependiendo de la naturaleza del antígeno y la manera en que ataca.

La **recombinación por cambio de clase** (CSR) es un proceso por el cual una Ig cambia de isotipo a través de la sustitución del grupo de exones C_H expresados sin modificar la porción variable (Casali, 2012).

Este proceso comienza con la transcripción de la línea germinal I-S-C, con un promotor situado en la región intermedia (IH) del locus IGH, la cual continua por el exón IH, la región del interruptor (S) y finalmente por el grupo de exones C_H ; posteriormente la AID, desamina las citidinas en las regiones S provocando una ruptura en la doble cadena del ADN, y esta manera se da lugar a la unión S-S, que implica la delección del ADN intermedio por medio de la formación de un círculo llamado "Switch" acercando la región C_H con la región V(D)J (Figura 5) (Casali, 2012; Chi, 2020).

La CSR se lleva a cabo en linfocitos B maduros de centros germinales de ganglios linfáticos, bazo y en el tracto gastrointestinal. Sin este proceso solo se producirían las clases IgM e IgD representando una limitante en la eficacia de la respuesta inmune humoral (Yu y Lieber, 2019).

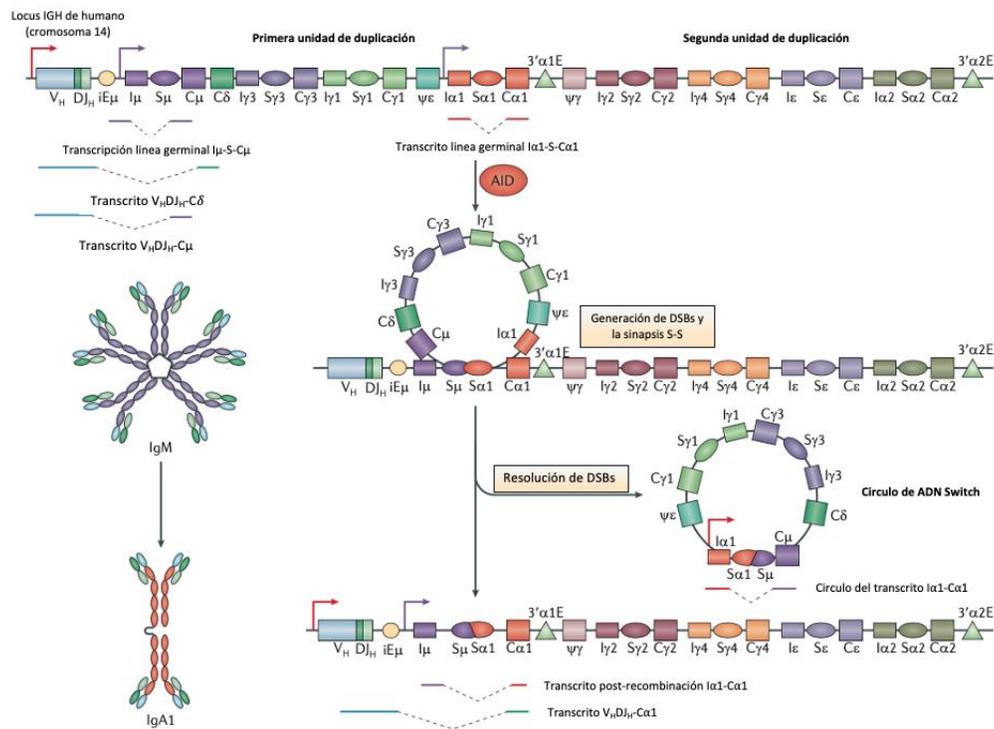


Figura 5. **Mecanismo de recombinación por cambio de clase.** Tomado de Casali et al., 2012.

1.4. Inmunología en murciélagos

Los murciélagos poseen una gran diversidad de especies, por lo tanto, la información sobre inmunidad en estos organismos no puede ser igual para todas las especies; sin embargo, se conservan ciertas adaptaciones como la longevidad, resistencia al cáncer y el hecho de ser reservorio de virus sin presentar síntomas de enfermedad (Sia, *et al.*, 2022). Esta última adaptación, de acuerdo con diversos autores, sugiere que está estrechamente relacionada con la evolución del vuelo.

Durante el vuelo, la temperatura corporal y las tasas metabólicas de los murciélagos aumentan, lo que conduce a la producción de niveles más altos de radicales libres de oxígeno, que pueden causar daño en el ADN. Para poder mitigar los efectos del vuelo sin que represente un gasto energético mayor, los murciélagos probablemente evolucionaron los mecanismos para suprimir la activación de la respuesta inflamatoria, la cual es también altamente demandante en términos metabólicos (Subudhi, 2019; Banerjee, 2020).

Por otra parte, se cree que la tolerancia a los virus en murciélagos, es una estrategia para controlar la infección que ha sido resultado de la coevolución huésped – patógeno, originando así mecanismos inmunológicos para evadir los virus (Hayman, 2019); p. ej. la presencia de mutaciones seleccionadas positivamente dentro de receptores celulares, lo que hace que las células de murciélago sean menos susceptibles a infectarse. Esta tolerancia a la infección puede producir una respuesta inmune fuerte o ausencia de la misma; una respuesta fuerte tiende a provocar la muerte del huésped o la eliminación del virus y su recuperación (Skimuntt, 2020).

Tras la infección por un virus, las células de los murciélagos montan eventos de señalización que induce la expresión de citocinas. Los interferones de tipo I (IFN) activan la expresión de genes estimulados por interferón (ISG) que inhiben la replicación del virus. En células de murciélago, la respuesta a la infección viral se activa induciendo una respuesta fuerte de IFN tipo I, sin activar una respuesta pro inflamatoria, limitando los efectos patológicos de la infección viral (Banerjee, 2020) (Figura 6).

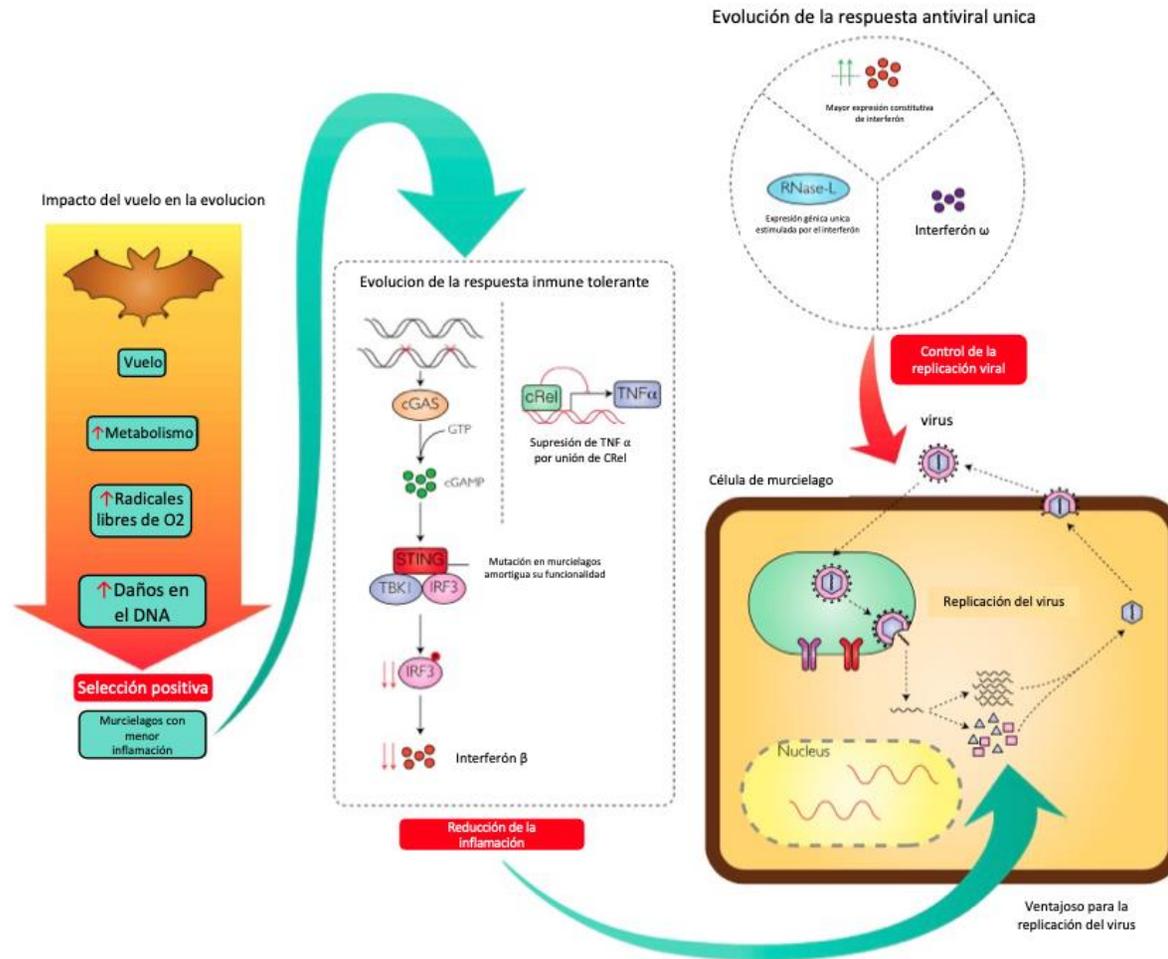


Figura 6. **Respuesta inmune en murciélagos.** Tomado de Subdhi et al., 2019

2. ANTECEDENTES

2.1. Secuenciación genómica en quirópteros

La utilización de herramientas biotecnológicas ha avanzado considerablemente, junto con la introducción de nuevas tecnologías de secuenciación masiva. Estos avances han dado lugar a la producción de genomas de alta calidad, lo que ha resultado en un aumento en análisis comparativos. Estos análisis permiten predecir genes funcionales y no funcionales, además del descubrimiento de nuevos genes y demás elementos en el genoma, así como su comparación con el genoma de otras especies. Mediante la identificación de similitudes y diferencias presentes entre las proteínas, ARN y regiones reguladoras de distintos organismos se puede comprender las bases moleculares y la evolución de las adaptaciones que poseen los quirópteros, como p. ej., el vuelo, la ecolocalización y su extraordinaria inmunidad (Ávila R. E. *et al.*, 2012).

En enero del 2010, Baker y colaboradores publican la primera caracterización del repertorio de anticuerpos expresado en *Pteropus alecto* y la compararon con el repertorio de anticuerpos VH codificados en línea germinal de *Pteropus vampyrus*. Se identificaron en *P. alecto* 23 secuencias VH en que incluían 5 segmentos JH, estas secuencias compartían entre sí un 50-96% de identidad e incluían representantes de cinco familias de genes VH (VH1, VH2, VH3, VH4 y VH5); también se identificaron cuatro isotipos de Ig codificados en línea germinal: IgM, IgG, IgE e IgA. Por otra parte, en *P. vampyrus* se identificaron 74 secuencias VH: 11 son pseudogenes. Se analizaron 51 secuencias VH que presentaron péptido señal, RSS viables y ORF (del inglés, Open Reading Frame). Los resultados arrojaron un 49-99% de identidad entre sí, además de ser representantes de cinco familias de genes VH.

Más tarde, en agosto del mismo año, Butler *et al.*, realizan un análisis comparativo y la construcción de un árbol filogenético a partir de secuencias recuperadas de genes IGHC en cuatro especies de murciélagos: *Myotis lucifugus*, *Eptesicus fuscus*, *Carollia perspicillata* y *Cynopterus sphinx*. Se identificó la expresión de cuatro isotipos de Ig correspondientes a IgM, IgG, IgE e IgA para las cuatro especies de murciélagos. Además, se identificó la expresión de IgD solo en

M. lucifugus y *E. fuscus*, ambas especies insectívoras y representantes del suborden *Yangochiroptera*.

A partir de los trabajos del estudio de anticuerpos en distintas especies de murciélagos, surge la hipótesis en donde se propone que la capacidad de los quirópteros de poder albergar virus zoonóticos sin presentar signos de enfermedad, es gracias a que tiene múltiples segmentos de genes V(D)J de cadena pesada codificados en línea germinal y a la diversidad combinatoria que puede producir un amplio repertorio de anticuerpos (Schountz *et al.*, 2017).

Recientemente el estudio de murciélagos y sus genomas ha tenido una amplia repercusión en múltiples campos de la ciencia, como el bienestar humano, el funcionamiento de los ecosistemas y la conservación de biodiversidad, por lo que es necesario mejorar la calidad de los ensamblajes genómicos.

El proyecto Bat 1K, es un consorcio que tiene como objetivo principal secuenciar y anotar los genomas a nivel cromosómico de todas las especies de murciélagos reportadas, con la finalidad de obtener información como nuevos genes o mecanismos genéticos que están detrás de las adaptaciones que poseen (Bat 1K, 2017). Este megaproyecto pretende consolidarse en tres fases (Figura 7); la primera fase se centra en un representante de las 21 familias de quirópteros, la fase dos se extenderá para cubrir los representantes de los 220 géneros y finalmente la fase tres tiene como objetivo incluir el resto de las especies, es decir, ~1, 288 especies aproximadamente. Actualmente, Bat 1K se encuentra en la fase 1 del proyecto y cuenta con 6 genomas de referencia de calidad, entre los que se encuentran las especies *Rhinolophus ferrumequinum*, *Rousettus aegyptiacus*, *Phyllostomus discolor*, *Myotis myotis*, *Pipistrellus kuhlii* y *Molossus molossus* (Jebb, 2020).

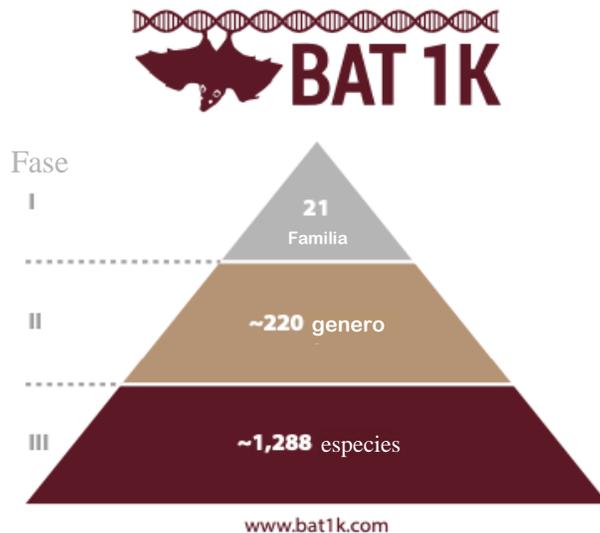


Figura 7. Esquema de las fases del megaproyecto Bat 1K. Tomado de www.bat1k.com.

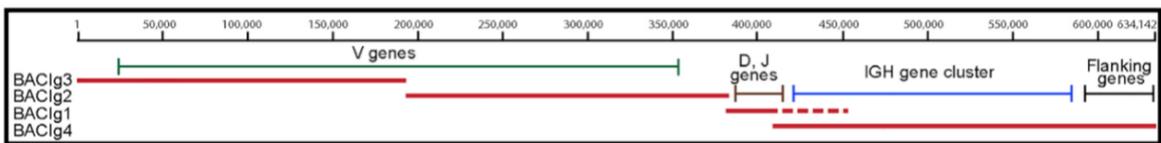
Dentro de las especies con genoma de calidad, destaca el del murciélago egipcio de la fruta, *Rousettus aegyptiacus*. Esta especie resulta ser un buen modelo de estudio debido a que es reservorio del virus de Marburgo, el cual provoca fiebre hemorrágica de alta letalidad cuando infecta especies de primates. El ensamblaje y la anotación del genoma de *R. aegyptiacus* permitió identificar la expansión de familias de genes relacionados con la inmunidad, similares en humano; la función de estos genes sugiere que existe una tolerancia al virus de Marburgo en *R. aegyptiacus* (Pavlovich *et al.*, 2018). Posteriormente para comprender la respuesta inmune adaptativa e innata de este murciélago, Larson *et al.*, en 2021, realizaron la caracterización del locus IGH (ReagypIGH3.0). Mediante el uso de 4 cromosomas artificiales bacterianos (BACs); se ensambló y anotó el locus IGH completo (Figura 8).

En total se identificaron 66 genes IGHV en 17 “contigs”, de los cuales, 11 genes IGHV se predijeron como no funcionales: 10 pseudogenes y 1 truncado. El tamaño de los segmentos IGHV eran similares al tamaño de los de humano, además de contener río abajo las señales de recombinación (RSS, por sus siglas en inglés). Se anotaron 8 genes IGHD con RSSs en sus flancos y 9 genes IGHJ con RSSs funcionales. El tamaño era más pequeño del que son los genes IGHJ de humanos. La expresión de los genes IGHV, IGHD e IGHJ se corroboró a través de la

determinación de patrones de expresión extraídos de datos transcriptómicos publicados con anterioridad.

La anotación de los genes IGHC se realizó mediante la comparación de secuencias IGHC anotadas por Pavlovich *et al.*, en 2018. Se identificaron 5 genes IGHE, de los cuales 3 son pseudogenes, 4 genes IGHG, y solo un gen IGHM e IGHA. De la misma manera que los genes V(D)J; se utilizaron datos transcriptómicos para verificar la expresión de genes IGHC.

A) Construcción de los BACs



B) ReagylIGH3.0

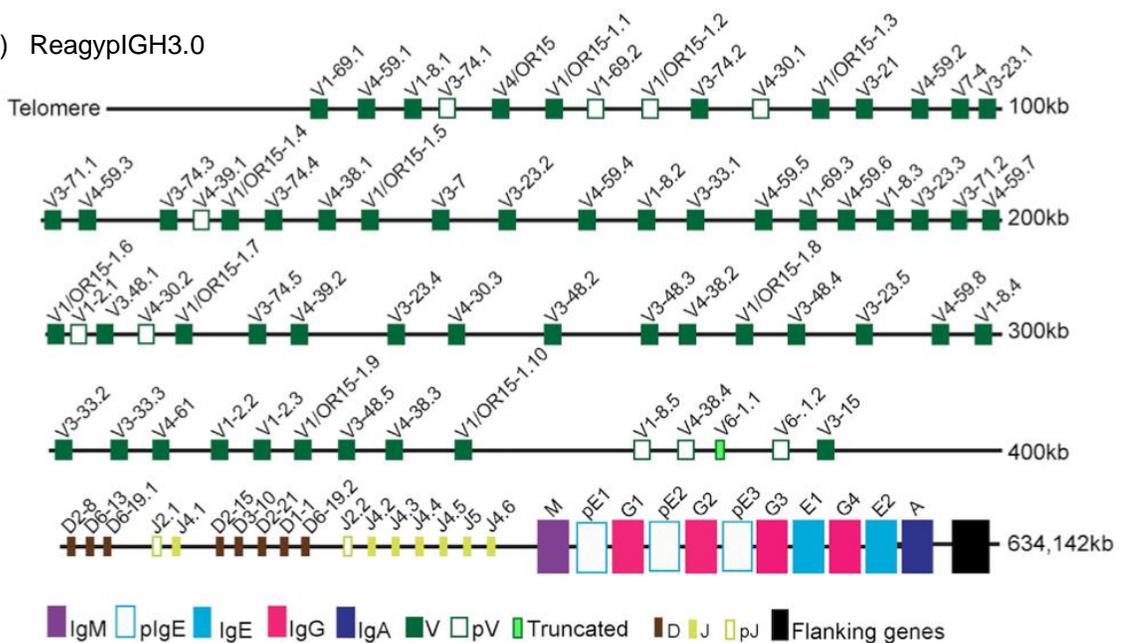


Figura 8. **Organización genética del locus IGH de *R. aegyptiacus*.** A) Organización de los BACs utilizados en el ensamblaje. B) Genes J (amarillo), genes D (café), genes V (verde). IgM (morado), IgE (azul), IgG (rosa), IgA (azul). Tomado de Larson *et al.*, 2021.

Finalmente, Sirupurapu *et al.*, en mayo del 2022, realizaron la caracterización del locus IGH en 20 especies de mamíferos, de las cuales 4 corresponden a murciélagos, entre los que se encuentra *Rhinolophus ferrumequinum*, *Molossus*

molossus, *Pipistrellus kuhlii* y *Phyllostomus discolor*. La identificación de los locus se logró mediante la comparación de genomas de especies de referencia como el humano, el ratón, la vaca y las 20 especies de mamíferos. Para *Rhinolophus ferrumequinum* se identificaron un total de 75 genes IGHV de los cuales 63 son funcionales y 12 no funcionales. Se identificaron 4 y 2 genes IGHD e IGHJ respectivamente. En *Molossus molossus* se identificaron 14 genes IGHV, 10 funcionales y 4 no funcionales; 8 genes IGHD y 3 genes IGHJ. Se identificaron 29 genes IGHV en *Pipistrellus khulii*, 9 funcionales y 20 no funcionales; para IGHD e IGHJ solo se identificaron 1 y 5 genes. Por último, en *Phyllostomus discolor* se identificaron un total de 84 genes IGHV: 32 funcionales y 52 no funcionales, sin embargo, a diferencia de las anteriores especies no se identificaron genes IGHD e IGHJ (Figura 9).

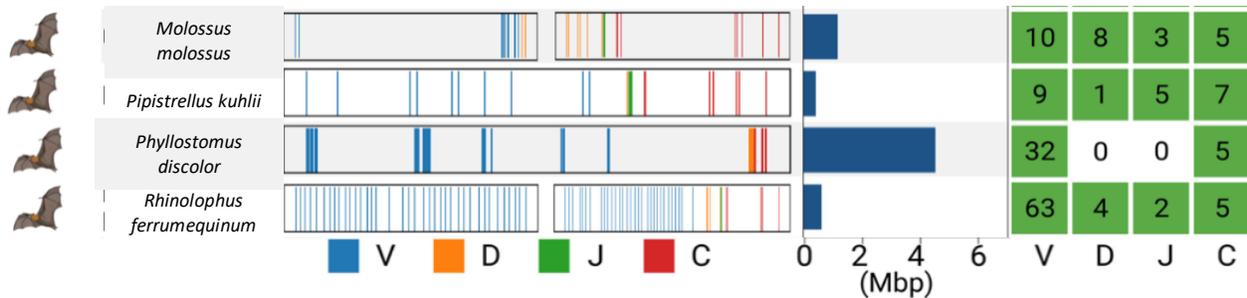


Figura 9. **Caracterización del locus IGH de cuatro especies de murciélagos.** Tomada y modificada de Sirupurapu et al., 2022

2.2. *Desmodus rotundus*

Desmodus rotundus (Geoffroy, 1810) comúnmente conocido como vampiro común (Figura 10), se caracteriza por tener un tamaño corporal mediano, ojos grandes, orejas pequeñas y puntiagudas, además de que carece de cola (Osorio-Rodríguez y Saldaña-Vázquez, 2019).

Es un murciélago hematófago, es decir, se alimenta principalmente de sangre de aves y mamíferos domésticos. Gracias a esto presenta adaptaciones morfológicas tales como el labio inferior en forma de “V”, hoja nasal rudimentaria e incisivos grandes en forma de navaja que le ayudan a crear heridas profundas con la finalidad de producir hemorragias abundantes. Otra adaptación que presenta *D. rotundus* es la capacidad de secretar anticoagulante en la saliva que se canaliza mediante un surco en la superficie dorsal de la lengua (Johnson *et al.*, 2014). Se considera como una especie de importancia zoonótica debido a sus hábitos alimenticios: al tener contacto directo con otros mamíferos (hospederos), se convierte en un vector potencial de propagación de enfermedades zoonóticas (Minaya, 2021).

Desmodus rotundus se encuentra ampliamente distribuido en el norte de México, Centroamérica y parte de Sudamérica. De acuerdo con la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) *D. rotundus* está clasificado como preocupación menor y cuenta con una población estable (Barquez *et al.*, 2015).

El ensamble del genoma de *D. rotundus*, que se encuentra de manera pública en la base de datos de NCBI ([GCA_002940915.2_ASM294091v2](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_002940915.2_ASM294091v2)) y tiene un tamaño de 2063 Mb distribuidos en 29, 801 scaffolds y cuenta con una N50 de 80,250.



Figura 10. *Desmodus rotundus* (vampiro común), (Geoffroy, 1810). Tomada de: www.inaturalist.org

Desmodus rotundus se caracteriza por ser reservorio del virus de la rabia. En un trabajo realizado por Almeida y colaboradores en 2005; reportan que este murciélago hematófago en comparación con otros mamíferos que han sido incubados con el virus de la rabia presenta mayor resistencia a la enfermedad, además de ser capaces de producir anticuerpos que bien podrían ser protectores en humanos.

3. JUSTIFICACIÓN

La falta de información referente a la respuesta inmune adaptativa de los murciélagos representa una limitante para comprender los mecanismos genéticos que están detrás de las extraordinarias adaptaciones que poseen estos organismos; como su capacidad de ser especies reservorios de virus y la supresión de la respuesta inmune, resultado de la co-evolución con patógenos y el vuelo. A través del ensamble del locus IGH de *Desmodus rotundus*, se puede obtener información nueva que puede ser relevante para comprender mejor las bases moleculares de la evolución de la respuesta inmune adaptativa de esta especie y en relación a otros quirópteros.

4. HIPÓTESIS

Dada la evolución y la mecánica de la recombinación V(D)J, el locus IGH en *D. rotundus* conservará una estructura similar a la de los demás mamíferos.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Caracterizar el locus de cadena pesada de inmunoglobulina (IGH) en el murciélago *Desmodus rotundus*.

5.2. Objetivos particulares

- Anotar y describir los genes IGHV, IGHD e IGHJ: número de segmentos y RSSs.
- Anotar y describir los genes IGHC y regiones de Switch.
- Comparar la anotación del locus IGH de *D. rotundus* con la anotación de otras especies de murciélagos.

6. METODOLOGIA

6.1. Identificación de scaffolds del locus IGH

El ensamble del genoma de *Desmodus rotundus* se obtuvo de la base de datos de la NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/456198>). Para identificar los scaffolds correspondientes al locus IGH de *D. rotundus*, se utilizaron como referencia secuencias de IGHV, IGHJ e IGHC de *R. aegyptiacus*. Este proceso se realizó a través de un TBLASTX (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (nucleótido-nucleótido); la salida tuvo un formato tabular, con e-value de 0.00001. Posteriormente, la salida se convirtió a una salida con formato GFF3 (*.gff3) en R.

Una vez identificados los scaffolds correspondientes al locus IGH de *D. rotundus*, las secuencias se extrajeron con la herramienta Samtools (<http://www.htslib.org/doc/samtools-faidx.html>) con opción de faidx, y se obtuvo un archivo con salida tipo FASTA (.fna). Con la herramienta Exonerate (<https://www.ebi.ac.uk/about/vertebrate-genomics/software/exonerate-manual>), se realizó un mapeo únicamente a los scaffolds del locus IGH obtenidas del TBLASTX, se utilizó la opción: -m est2genome y se especifico la salida (.gff3) con la opción – showtargetgff yes, para modelar la estructura del gen.

6.2. Mapeo de transcriptoma

Los datos de transcriptoma (RNA seq) se obtuvieron del Sequence Read Archive (SRA) del NCBI. Se utilizó una muestra de bazo (SRS7887209) de *D. rotundus* del Bioproyec PRJNA685633.

Posteriormente, estos archivos se mapearon en los scaffolds IGH con la herramienta STAR (https://hbctraining.github.io/Intro-to-rnaseq-hpc-O2/lessons/03_alignment.html).

6.3. Anotación manual del locus IGH

La anotación manual se realizó a través de IGV (Integrative Genome Viewer). Se cargaron los archivos resultantes del TBLASTX, EXONERATE en formato *.gff y STAR (.bam). La anotación de los genes se realizó con base en la expresión del archivo (.bam) y los alineamientos de BLAST y EXONERATE; además de tomar en cuenta las características de los segmentos V(D)J.

6.4. Secuencias señal de recombinación

El análisis estructural de las secuencias de las RSSs se realizó mediante el programa de visualización JALVIEW, se cargó un documento *.txt con las secuencias RSSs de los segmentos funcionales, estas se alinearon y, se les aplicó color con la opción “Nucleótido” para resaltar zonas de similitud que podrían indicar relaciones funcionales y para terminar se colocó el logo de porcentaje de identidad.

6.5. Árbol filogenético de genes VH funcionales

La construcción del árbol filogenético de los genes VH se realizó mediante la herramienta JALVIEW. Primero se alinearon genes VH funcionales de *D. rotundus* con genes representantes de los tres clanes VH de *Homo sapiens* y *Mus musculus* con la opción “MuscleWS”. Posteriormente, se seleccionó “calcular árbol o ACP...” con distancia media utilizando “BLOSUM62”.

6.6. Regiones de Switch

Para identificar las regiones de switch, se cargó el archivo (*.fasta) correspondiente a las secuencias de la región IGHC de *D. rotundus* en el sitio web de RSAT (rsat.sb-roscoff.fr/dna-pattern), en la opción “Pattern matching” > “string” > “dna-pattern”. Se utilizaron los parámetros: Query pattern(s): RGYW, WGCW y AGCT; Search strands: both strands; Origin: start; Sustitions: 0. La información resultante se exportó en una hoja de Excel; se calculó la frecuencia de ocurrencia de cada motivo consenso en una ventana de 1000 pb, con la siguiente fórmula:

$$\{=\text{FRECUENCIA (COORDENADAS DE INICIO), (VENTANAS DE 1000PB)}\}$$

Posteriormente a través del cálculo del promedio y la desviación estándar de la frecuencia; se calculó el ZSCORE con la siguiente fórmula:

$$=(\text{FRECUENCIA-PROMEDIO}) / \text{D. ESTANDAR}$$

Por último, se graficó en el eje de la X las ventanas de cada 1000pb y en el eje de la Y los resultados del ZSCO

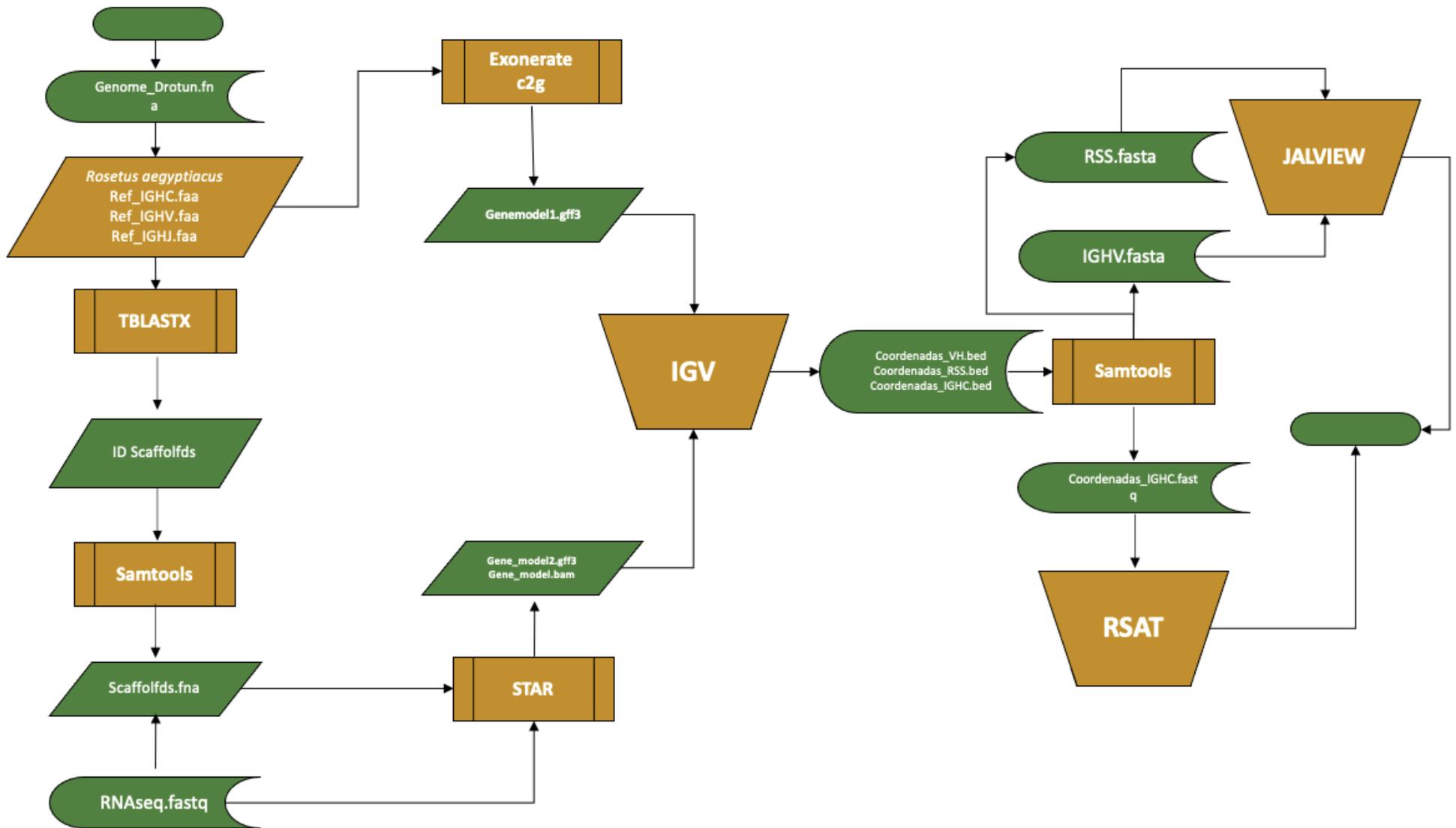


Figura 11. Diseño de la metodología

7. RESULTADOS

7.1. Identificación del locus IGH

A través de mapeos con TBLASTX usando secuencias IGHV, IGHJ e IGHC de *R. aegyptiacus* como referencia, se encontraron “hits” significativos (e-value > 1×10^{-5}) en cuatro “scaffolds” y dos “contigs” de un total de 29,801 scaffolds y 84, 109 contigs (Tabla 1) (Figura 12).

Tabla 1. Organización del locus IGH de *D. rotundus*

ID	Tipo	Longitud (kb)	C	J	D	V
KZ672283.1	Scaffold	155	0	0	0	17
KZ672322.1	Scaffold	53	0	0	0	8
KZ672349.1	Scaffold	24	0	0	0	5
KZ672556.1	Scaffold	453	4	6	6	27
PEHR01088273.1	Contig	420 pb	0	0	0	1
PEHR01013416.1	Contig	655 pb	0	0	0	1

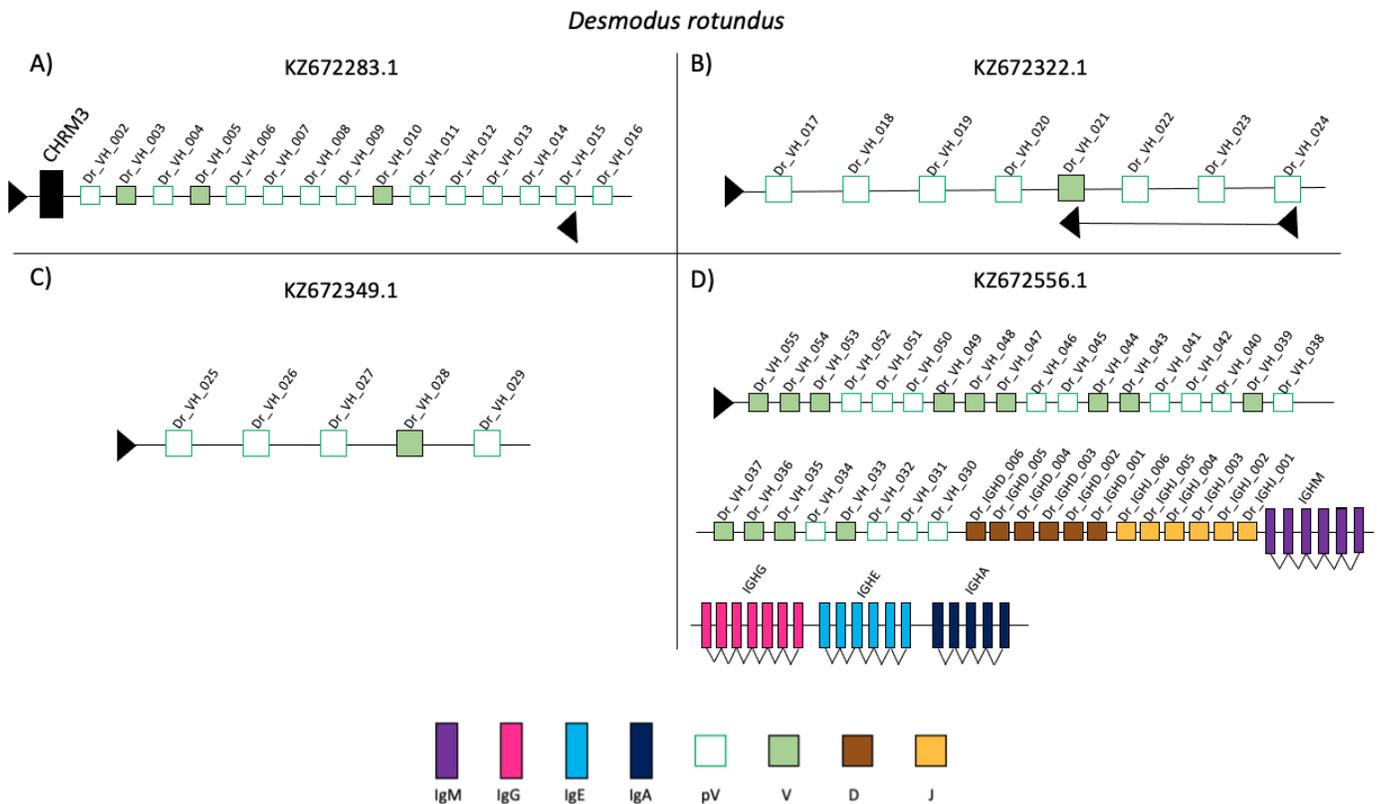


Figura 12. Organización de los Scaffolds del locus IGH de *D. rotundus*.

7.2. Anotación y descripción de los genes IGHV, IGHD e IGHJ

Se identificaron un total de 59 genes IGHV en 4 scaffolds y 2 contigs; de los cuales 20 son funcionales y 39 no funcionales. La mayoría de los genes IGHV se encontraron en el scaffold KZ672556.1 (Tabla 1).

Los genes IGHV funcionales presentan en la región 3' el heptámero y el nonámero correspondientes a las RSS's, separados por un espaciador de 23 pb (Figura 13). Los genes VH funcionales que se encontraron en el repertorio de *D. rotundus* son representativos de los tres clanes VH de tetrápodos, sin embargo, la mayoría de los genes IGHV en *D. rotundus* corresponden al clan III (n=10), 3 al clan II y solo 5 genes al clan I (Figura 14).

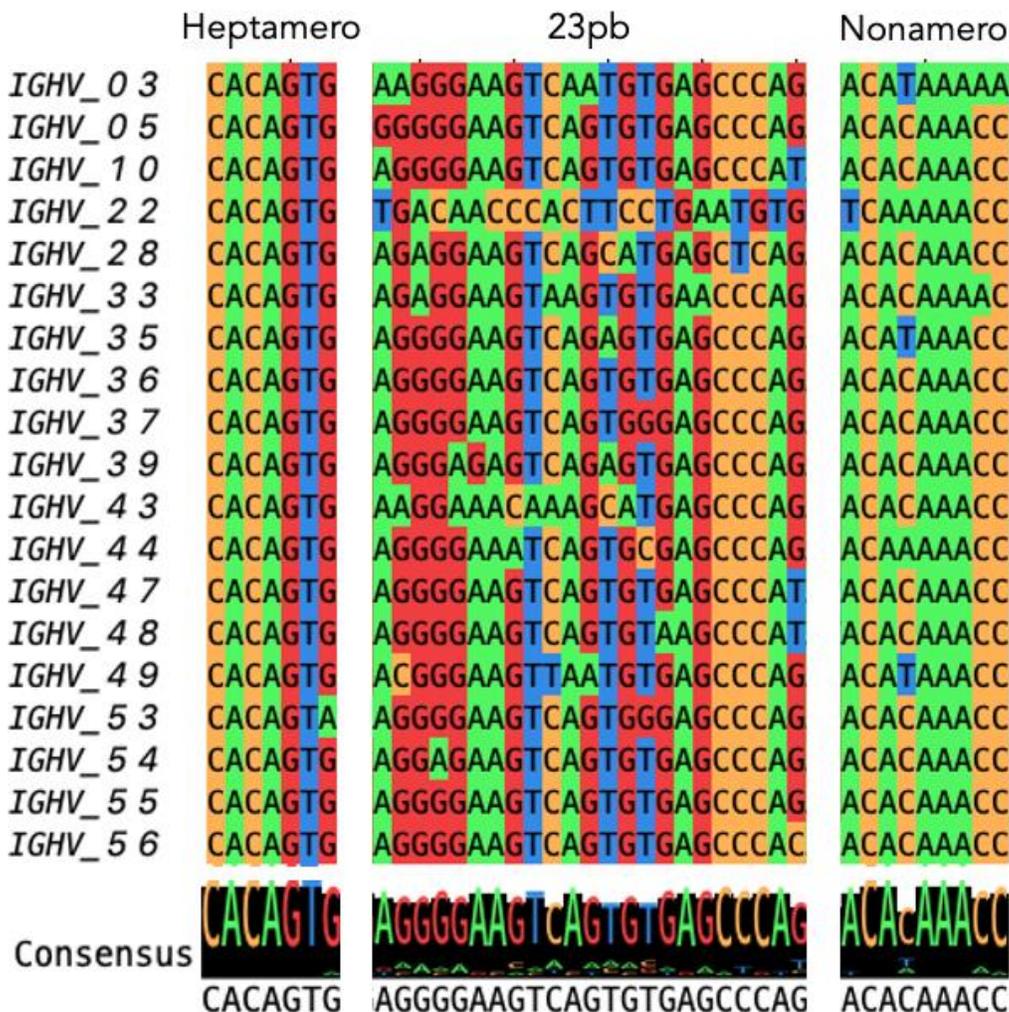


Figura 13. Análisis estructural de las secuencias señal de recombinación de genes IGHV de *D. rotundus*.

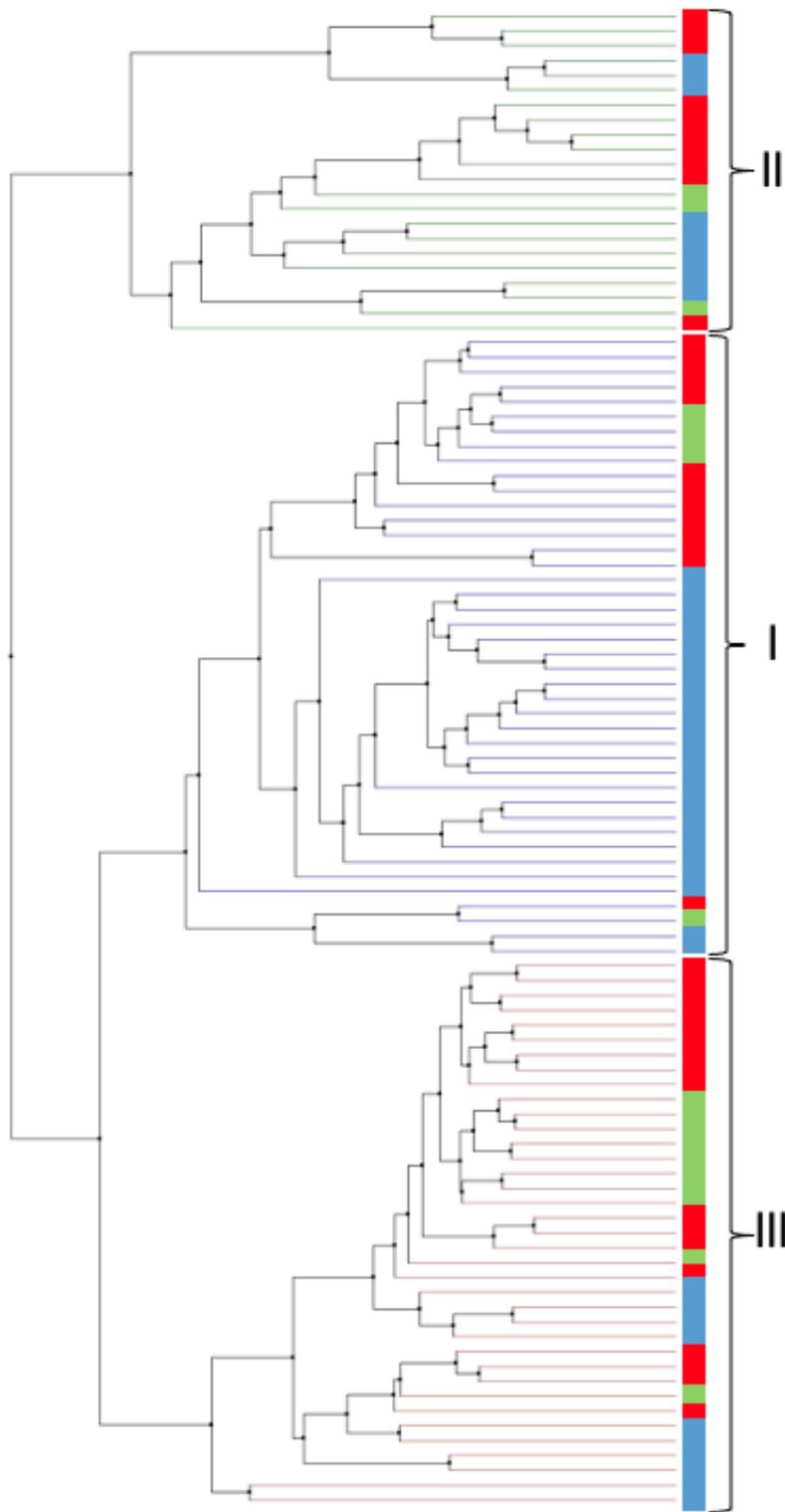


Figura 14. **Árbol filogenético de genes IGHV de *Homo sapiens* (rojo), *Mus musculus* (azul) y *Desmodus rotundus* (verde).**

Se identificaron un total de 6 genes IGHD funcionales (Figura 15), cada gen con RSS's en los flancos y una secuencia espaciadora de 12 pb (Figura 16). Las RSS's correspondientes al heptámero se encuentran más conservadas que las RSSs no número.

<p>IGHD_001</p> <p>5' GTACCTGGGTC 3'</p> <p>1 VPGT</p> <p>2 YLG</p> <p>3 TWV</p> <p>-1 DPGA</p> <p>-2 TQV</p> <p>-3 PRY</p>	<p>IGHD_002</p> <p>5' GTACAGTAGCAACTGGTAC 3'</p> <p>1 VQ-QLV</p> <p>2 YSSNWY</p> <p>3 TVATGA</p> <p>-1 VPVATV</p> <p>-2 YQLLLY</p> <p>-3 TSCYCA</p>	<p>IGHD_003</p> <p>5' GGATACTGGGGTAACTAC 3'</p> <p>1 GYWGNY</p> <p>2 DTGVTA</p> <p>3 ILG-L</p> <p>-1 VVTPVS</p> <p>-2 -LPQYC</p> <p>-3 SYPSI</p>
<p>IGHD_004</p> <p>5' GTACAGTAGCAACTGGTAC 3'</p> <p>1 VQ*QLV</p> <p>2 YSSNWY</p> <p>3 TVATGA</p> <p>-1 VPVATV</p> <p>-2 YQLLLY</p> <p>-3 TSCYCA</p>	<p>IGHD_005</p> <p>5' GGATACTGGGGTAGCTAC 3'</p> <p>1 GYWGSY</p> <p>2 DTGVAA</p> <p>3 ILG*L</p> <p>-1 VATPVS</p> <p>-2 *LPQYC</p> <p>-3 SYPSI</p>	<p>IGHD_006</p> <p>5' TGCATGAGGTTTTTGCCTCAAGGATCCTCC 3'</p> <p>1 GYWGNY</p> <p>2 DTGVT</p> <p>3 ILG-L</p> <p>-1 VVTPVS</p> <p>-2 -LPQY</p> <p>-3 SYPSI</p>

Figura 15. Traducción de la secuencia de los genes IGHD de *D. rotundus*. En amarillo, la secuencia nucleotídica del gen.

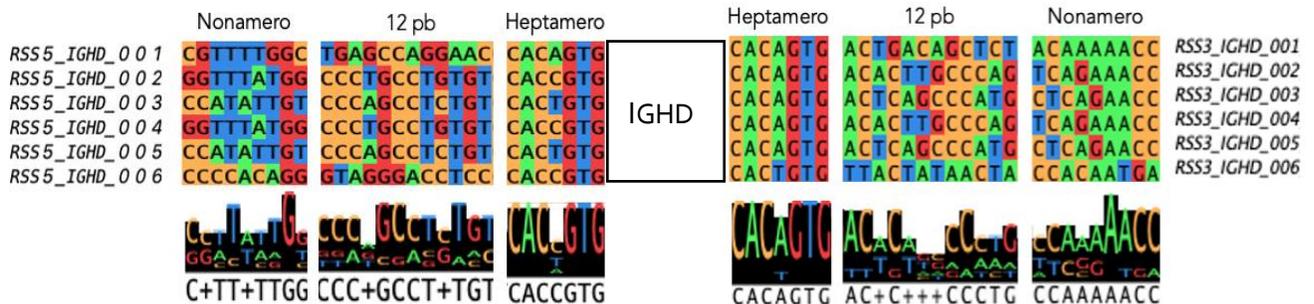


Figura 16. Análisis estructural de las secuencias señal de recombinación de genes IGHD de *D. rotundus*.

Para los genes IGHJ, se identificaron en total 6 genes que presentan el heptámero y nonamero correspondientes a las RSSs en el flanco 5' (Figura 17, A).

Además, todos los genes IGHJ contienen el motivo de aa WGXXG altamente conservado, por lo tanto, se consideran funcionales (Figura 17, B).

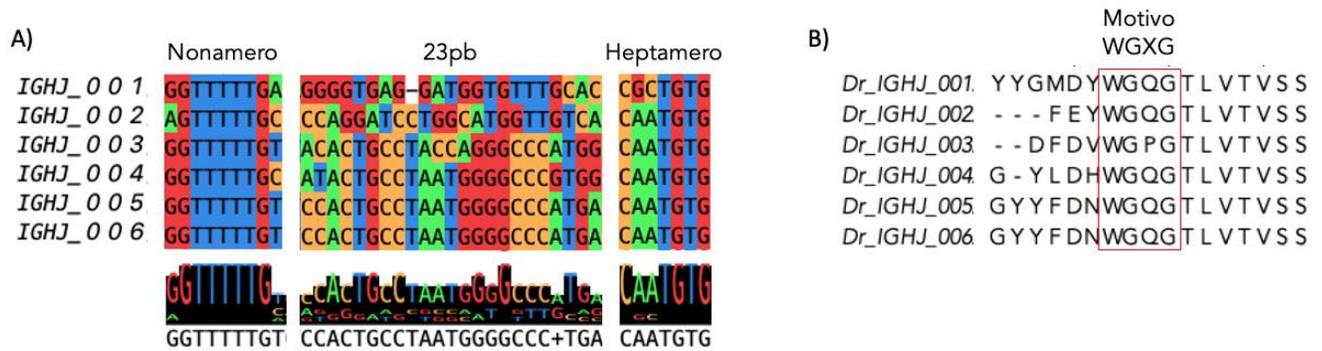


Figura 17. **Análisis estructural de los genes IGHJ de *D. rotundus*.** A) Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de las RSSs de los genes IGHJ. B) Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los genes IGHJ, en el recuadro rojo se muestra el motivo canónico de los segmentos IGHJ: WGXX en mamíferos.

7.3. Anotación y descripción de los genes IGHC

En la región constante de *D. rotundus* se anotaron genes que corresponden a cuatro isotipos de inmunoglobulina: C μ , C γ , C ϵ y C α (Figura 12 y 18).

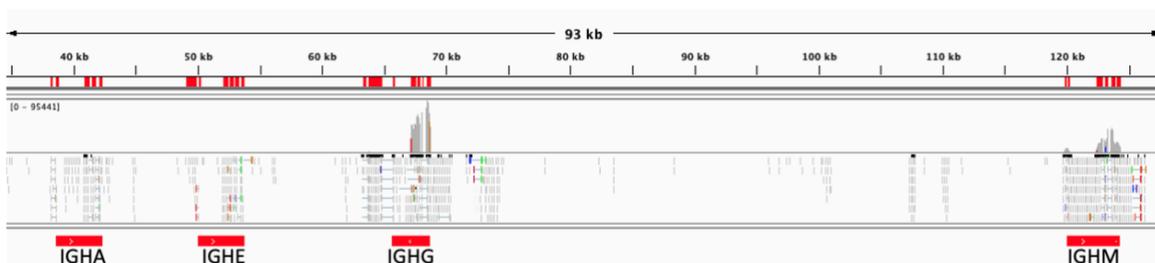


Figura 18. **Organización la region constante del locus IGH de *D. rotundus*.**

El gen IGHM está constituido por 6 exones. Los primeros 4 codifican para los dominios de inmunoglobulina CH1-CH4. El exón 5 corresponde a la región transmembranal (M1) y el exón 6 a la región intracitoplasmática del BCR (Figura 19).

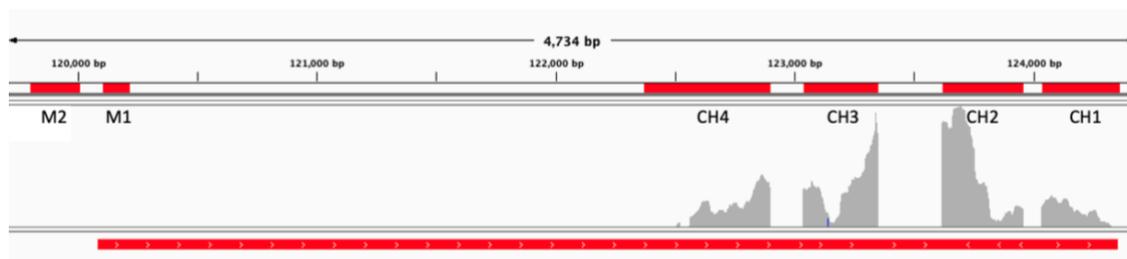


Figura 19. **Estructura del gen IGHM de la region constante del locus IGH de *D. rotundus***

El gen IGHG está formado por 7 exones; el primero codifica para el dominio Ig CH1, el segundo corresponde a una región bisagra (H), el exón 3 y 4 corresponden a los dominios Ig CH2 y CH3 respectivamente. El exón 5 corresponde a la región transmembranal (M1) y los últimos dos exones corresponden a la región intracitoplasmática (M2) (Figura 20).

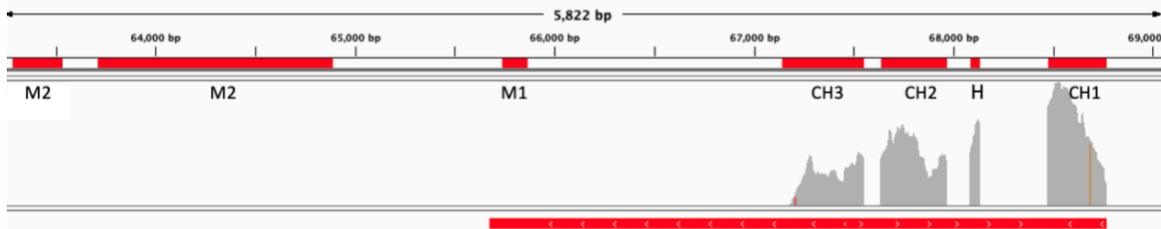


Figura 20. Estructura del gen IGHG de la región constante del locus IGH en *D. rotundus*

El gen IGHE presenta una estructura compuesta de 6 exones, los primeros 4 corresponden a los dominios de Ig CH1-CH4; los exones 5 y 6 corresponden a la región transmembranal (M1) del BCR y a la región intracitoplasmática del BCR (Figura 21).

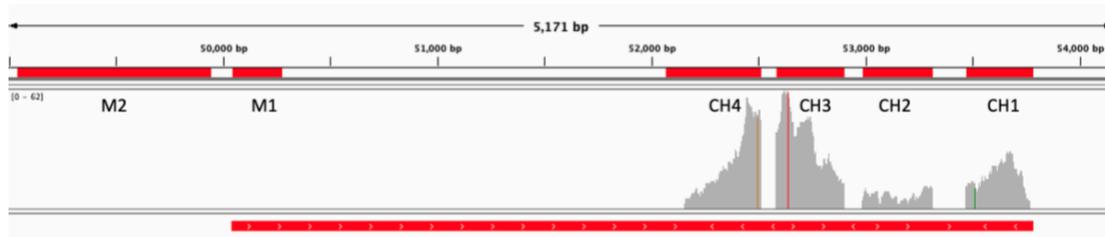


Figura 21. Estructura del gen IGHE de la región constante del locus IGH en *D. rotundus*

IGHA presenta 5 exones correspondientes a dominios de Ig, los 3 primeros exones codifican para los dominios Ig CH1-CH3. Los últimos dos exones codifican para la región transmembranal (Figura 22).

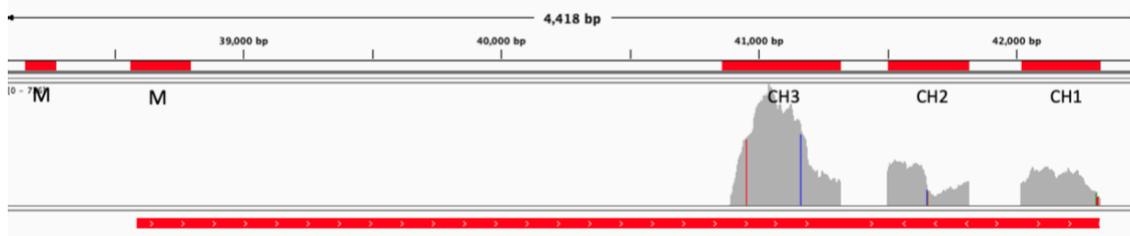


Figura 22. Estructura del gen IGHA de la región constante del locus IGH de *D. rotundus*

Consistentemente con lo reportado para otros murciélagos, no se encontró expresión de $C\delta$, ni duplicaciones de subtipos de $C\gamma$ o $C\epsilon$ como en el caso de *R. aegyptiacus*.

7.3.1. Regiones de Switch

Mediante el cálculo de la frecuencia de ocurrencia de motivos blanco de la AID en *D. rotundus* (Figura 23), pudimos identificar que cada uno de los genes IGHC tiene su región S correspondiente. Interesantemente, ciertas regiones S como la de épsilon presentó una baja frecuencia del motivo WGCW mientras que la frecuencia de RGYW en gamma fue comparativamente menor, lo cual implica diferencias en la composición de motivos blanco de AID, de acuerdo a la región S.

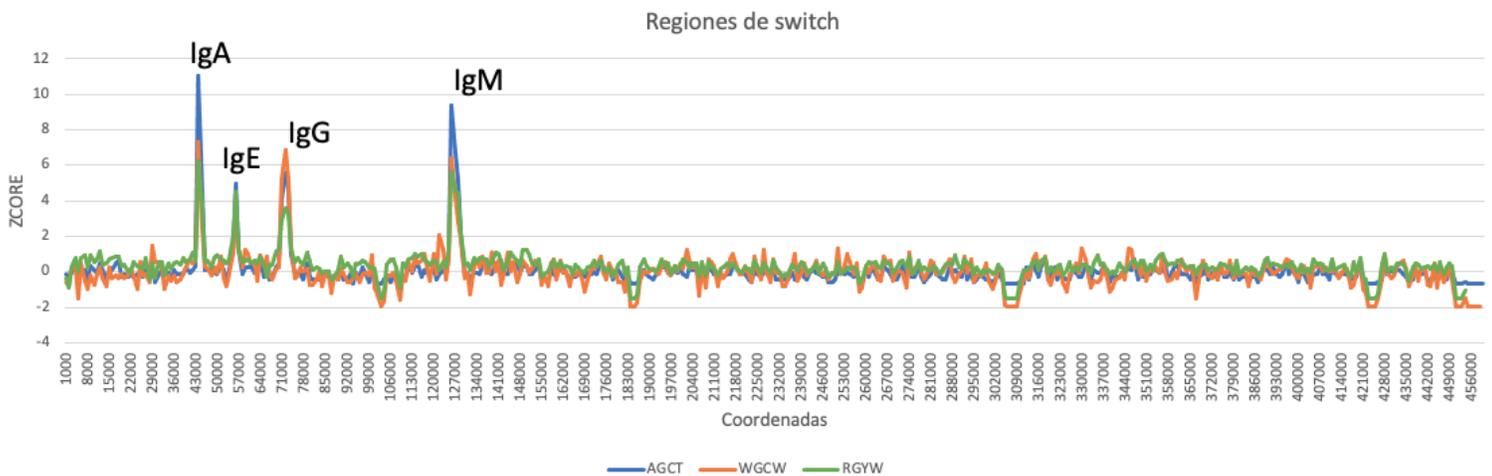


Figura 23. **Densidad de los motivos “Hotspots” de la region constante en *D. rotundus*.** En color azul esta representado el motivo AGCT. El motivo WGCW esta en color naranja y el motivo RGYW se encuentra representado en color verde.

7.4. Comparación del Locus IGH de *Desmodus rotundus* con la anotación de otras especies de murciélagos.

Al igual que *D. rotundus* (Phyllostomidae), *Pipistrellus kuhlii* (Vespertilionidae) y *Phyllostomus discolor* (Phyllostomidae) presentan mayor número de pseudogenes que de genes funcionales. Por el contrario, *R. aegyptiacus* (Pteroptidae), *Rhinolophus ferrumequinum* (Rhinolophidae) y *Molossus molossus* (Molossidae) presentan un mayor número de genes funcionales que pseudogenes.

Molossus molossus, *P. kuhlii* y *R. ferrumequinum* también presentan un cluster de genes IGHD e IGHJ así como *D. rotundus*. *Phyllostomus discolor* no reporta genes IGHD e IGHJ y *R. aegyptiacus* presenta una duplicación del cluster IGHD e IGHJ respectivamente (Tabla 2).

Desmodus rotundus, *R. aegyptiacus* (Pteropodidae), *Cynopterus sphinx* (Pteropodidae), *Carollia perspicillata* (Phyllostomidae) y *Pteropus vampyrus* (Pteroptidae) reportan la expresión de cuatro isotipos de Ig: IgM, IgG, IgE e IgA. *Myotis lucifugus* y *Eptesicus fuscus* ambas especies pertenecientes a la familia Vespertilionidae, expresan el isotipo IgD.

Al igual que *R. aegyptiacus*, *M. lucifugus*, *E. fuscus* y *C. sphinx* presentan duplicaciones de IgG. *D. rotundus*, *C.* y *P. vampyrus* solo presentan una copia de IgG. Todas las especies de murciélagos presentan una sola copia de IgM e IgA y solamente *R. aegyptiacus* presenta 5 duplicaciones de IgE (Tabla 3).

Tabla 2. Comparación de la anotación de la region VH de *D. rotundus* con otras especies de murciélagos

Especie	Suborden	Familia	Hábito alimenticio	Contigs	IGHV			IGHD	IGHJ
					Total	funcionales	No funcionales		
<i>Desmodus rotundus</i>	Yangochiroptera	Phyllostomidae	Hematofago	6	59	20	39	6	6
<i>Molossus molossus</i>	Yangochiroptera	Molossidae	Insectívoro	7	14	10	4	8	3
<i>Pipistrellus kuhlii</i>	Yangochiroptera	Vespertilionidae	Insectívoro	5	29	9	20	1	5
<i>Phyllostomus discolor</i>	Yangochiroptera	Phyllostomidae	Nectarívoro	16	84	32	52	0	0
<i>Rousettus aegyptiacus</i>	Yinpterochiroptera	Pteropodidae	Frugívoro	17	66	55	11	8	9
<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	Yinpterochiroptera	Rhinolophidae	Insectívoro	6	75	63	12	4	2

Tabla 3. Comparación de la anotación de la region CH de *D. rotundus* con otras especies de murciélagos

Especie	Suborden	Familia	Hábito alimenticio	IGHC				
				IgM	IgG	IgE	IgA	IgD
<i>Desmodus rotundus</i>	Yangochiroptera	Phyllostomidae	Hematofago	1	1	1	1	0
<i>Myotis lucifugus</i>	Yangochiroptera	Vespertilionidae	Insectívoro	1	5	1	1	1
<i>Eptesicus fuscus</i>	Yangochiroptera	Vespertilionidae	Insectívoro	1	2	1	1	1
<i>Carollia perspicillata</i>	Yangochiroptera	Phyllostomidae	Frugívoro	1	1	1	1	0
<i>Rousettus aegyptiacus</i>	Yinpterochiroptera	Pteropodidae	Frugívoro	1	4	5	1	0
<i>Cynopterus sphinx</i>	Yinpterochiroptera	Pteropodidae	Frugívoro	1	3	1	1	0
<i>Pteropus vampyrus</i>	Yinpterochiroptera	Pteropodidae	Frugívoro	1	1	1	1	0

8. DISCUSIÓN

Al igual que otros vertebrados, *D. rotundus* cuenta con un Locus IGH. Su organización está conservada en comparación con la estructura de otros locus IGH de murciélagos (Baker *et al.*, 2010; Butler *et al.*, 2010; Larson *et al.*, 2020 y Sirupurapu *et al.*, 2022), y cuenta con un amplio repertorio de genes VH, DH, JH y CH. Además, presenta RSS's canónicas de tetrápodos, y regiones S por cada isotipo de Ig codificado en línea germinal ($C\mu$, $C\gamma$, $C\epsilon$ y $C\alpha$).

El repertorio de genes IGHV de *R. aegyptiacus* muestra un número mayor de genes funcionales que de pseudogenes, al igual que otras especies de murciélagos como *Rhinolophus ferrumequinum* (75 genes IGHV: 63 funcionales y 12 pseudogenes) y *Molossus molossus* (14 genes IGHV: 10 funcionales y 4 pseudogenes) (Sirupurapu, 2022). Los resultados obtenidos de *D. rotundus* en cuanto a número de genes IGHV en comparación con *R. aegyptiacus* (Larson *et al.*, 2020) muestran diferencias; pues *D. rotundus* tiene menos genes funcionales y más pseudogenes IGHV que *R. aegyptiacus*.

Se ha propuesto que la presencia de una gran reserva de genes IGHV proporciona mayor diversidad al repertorio de anticuerpos en murciélagos (Baker *et al.*, 2010). Sin embargo, se han reportado repertorios de genes V en otras especies de murciélagos, donde hay mayor presencia de pseudogenes que genes funcionales IGHV tal y como se observa en *D. rotundus*; siendo el caso de *Pipistrellus kuhlii*, que cuenta con 29 genes IGHV, de los cuales 9 son funcionales y 20 pseudogenes, y *Phyllostomus discolor* con 84 genes IGHV: 32 funcionales y 52 pseudogenes (Sirupurapu, 2022). Ambas especies, al igual que *D. rotundus* pertenecen al suborden *Yangochiroptera*. Por lo tanto, esto podría sugerir que el repertorio de genes IGHV entre especies de murciélagos está formado de acuerdo con la co-evolución entre hospederos y patógenos. El estudio de la estructura del locus IGH en más especies *Yangochiroptera* y *Yinpterochiroptera* ayudará a confirmar esta observación.

Especies como los primates y roedores cuentan con un repertorio VH de alta diversidad gracias a que poseen familias de genes representativos de los tres clanes de mamíferos (Butler, 1997). En especies de murciélagos hay datos que muestran que cuentan con representantes de los tres clanes de genes VH (Butler, 2010; Larson et al., 2020). Dados los datos de *D. rotundus*, se puede asegurar que presenta un repertorio diverso de genes VH, canónico de tetrápodos. Llama la atención que la mayoría de los genes IGHV funcionales pertenecen al clan III, que en humano y ratón tienen la capacidad de reconocer al superantígeno SpA de *Staphylococcus aureus* (Silverman y Goodyear, 2006).

Genes IGHD e IGHJ han sido identificados en otras especies de murciélagos, además de *D. rotundus* y *R. aegyptiacus* (Larson et al., 2020); tales como *Rhinolophus ferrumequinum* (*Yinpterochiroptera*), que cuenta con 4 y 2 genes anotados respectivamente; *Molossus molossus*, con 8 genes IGHD y 3 genes IGHJ anotados y *Pipistrellus kuhlii* con 1 gen IGHD y 5 genes IGHJ, ambas especies representativas del suborden *Yangochiroptera* (Sirupurapu et al., 2022). A diferencia de *R. aegyptiacus* que cuenta con dos clusters IGHD-IGHJ, las demás especies descritas incluyendo *D. rotundus* solo tienen un cluster IGHD-IGHJ, lo cual sugiere que la duplicación del cluster IGHD-IGHJ en *R. aegyptiacus* es más una excepción que una regla. Retomando los dos puntos anteriores, los datos sugieren que *D. rotundus* cuenta con segmentos V(D)J canónicos de quirópteros, tanto como de mamíferos.

Desmodus rotundus expresa cuatro isotipos de Ig: IgM, IgG, IgE e IgA, al igual que otras especies de quirópteros como *Myotis lucifugus*, *Eptesicus fuscus*, *Cynopterus sphinx* y *Carollia perspicillata*; especies reportadas por Butler et al., (2010). No se encontró en *D. rotundus* el isotipo IgD. Esto es consistente con la ausencia de IgD en *R. aegyptiacus*, *Rhinolophus ferremiquium*, *Pipistrellus khulli*, *Molossus molossus*, *Phyllostomus discolor*, *Cynopterus sphinx* y *Carollia perspicillata*. Sin embargo *Myotis lucifugus* y *Eptesicus fuscus*; especies

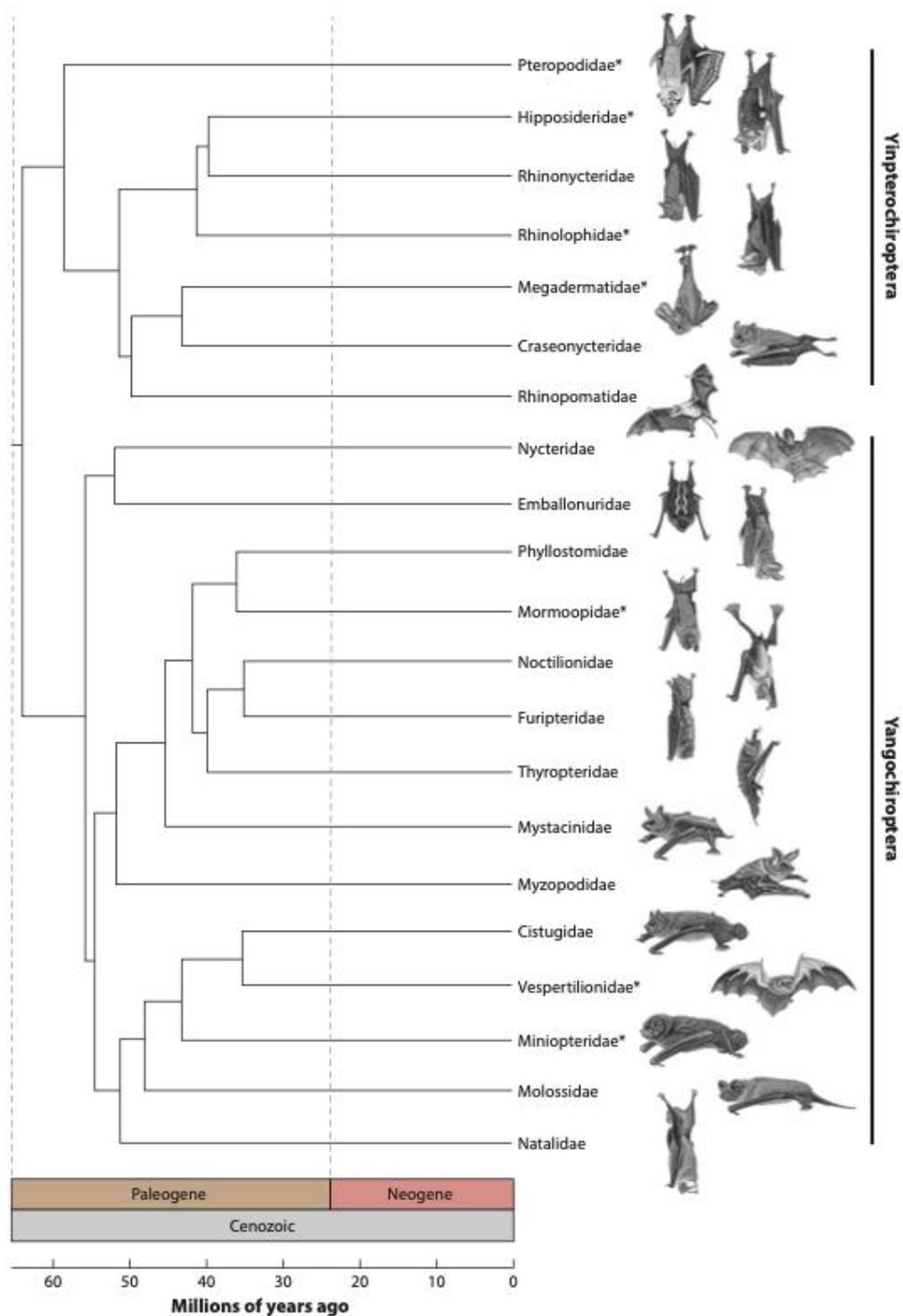
insectívoras, presentan IgD. Por lo tanto, la región constante IGH de *D. rotundus* parece ser canónica de región constante de murciélagos.

Por último, la predicción de genes IGH automatizada se basa en la identificación de RSS's conservadas que flanquean los genes IGH, y suele ser mucho más rápida en comparación con la predicción y anotación semi-manual. Sin embargo, la anotación de genes IGH automática representa un problema difícil de resolver debido a que las RSS's tienden a tener cambios en su secuencia, lo que puede resultar en falsos positivos y/o puede que pase por alto genes (Sirupurapu et al., 2022). En la anotación semi-manual se requiere de genes IGH de referencia para basar la identificación a través de la similitud de genes. Este método suele tener menor tasa de falsos positivos en comparación con la identificación automatizada, aunque puede pasar por alto genes IGH divergentes.

9. CONCLUSIONES

En conclusión, los hallazgos obtenidos en el estudio del locus IGH de *D. rotundus* revelan un patrón de organización canónica típico de quirópteros. Además, la organización de la región variable de la cadena pesada de *D. rotundus* muestra similitudes con otros tetrápodos. Los genes VH exhiben secuencias de reconocimiento de señales conservadas de tetrápodos y mantienen representantes de los tres clanes característicos de estos animales. En cuanto al locus de la región constante de la cadena pesada, su organización en *D. rotundus* es similar a la reportada en otras especies de murciélagos, y a diferencia de *R. aegyptiacus*, no se encontró evidencia de duplicaciones del cluster D y J, ni de pseudogenes de IGHC. Estos resultados respaldan la noción de una estructura genómica conservada en el sistema inmunológico de los quirópteros y proporcionan información valiosa sobre la evolución de los genes relacionados con la inmunidad en esta especie.

ANEXOS



Anexo 1. **Consenso molecular sobre las relaciones familiares de los murciélagos y los tiempos de divergencia.** Los asteriscos indican las familias de murciélagos con genomas disponibles en la NCBI. Tomado de Teeling *et al.*, 2017.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akula S., Mahammadamin S. y Hellman L. (2014). Fc Receptors for Immunoglobulins and Their Appearance During Vertebrate Evolution. PLOS One. Doi: 10.1371/journal.pone.0096903.
- Almeida M.F., Martorelli L.F., Aires C.C., Sallum P.C., Durigun E.L. y Massad E. (2005). Experimental Rabies in Hematophagous Bats *Desmodus rotundus*. Cambridge University Press. Doi: 10.1017/50950268804003656.
- Banerjee A., Baker ML., Kulcsar K., Misra V., Plowright R. y Mossoman K. (2020). Novel Insights Into Immune System of Bats. Front. Immunol. Doi: 10.3389/fimmu.2020.00026.
- Bat1K. (26 de Julio del 2022). <https://bat1k.com/>.
- Baker L. M., Tachedjian M y Wang L. F. (2010). Immunoglobulin Heavy Chain Diversity In Pteropid Bats: Evidence For a Diverse and Highly Specific Antigen Binding Repertoire. Immunogenetics. Doi: 10.1007/s0025-010-0425-4.
- Barquez R., Perez S., Miller B. y Diaz M. (2015). *Desmodus rotundus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2015. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-4.RLTS.TG510A21979045.en>.
- Butler JE. (1997). Immunoglobulin Gene Organization and the Mechanism of Repertoire Development. Scand J Immunol. P.p: 455-462.
- Butler JE., Wertz N., Zhao Y., Zhang S., Bao Y., Bratch S., Kunz HT., Whitaker Jr., JO y Schountz J. (2010). Two Suborders of Chiropterans Have the Canonical Heavy-Chain Immunoglobulin (Ig) Gene Repertoire of Eutherian Mammals. Elsevier. Doi: 10.1016/j.dci.2010.08.011.
- Ceballos G. y Arrollo-Cabrales J. (2012). Lista Actualizada de los Mamíferos de México 2012. Revista Mexicana de Mastozoología Nueva Época.
- Chi X., Li Y. y Qiu X. (2019). V(D)J Recombination, Somatic Hypermutation and Switch Recombination of Immunoglobulins: Mechanism and Regulation. Immunology. Doi: 10.1111/imm.1373.
- David T. S. Hayman (2019). Bat Tolerance to Viral Infections. Nature microbiology. 728-729.

- Fenton B. M. y Simmons B. Nancy. (2014). *Bats: A world of Science and Mystery*. The University of Chicago Press.
- Garcia-Mariscal A., Blanco B. y Hernandez-Munain C. (2013). Generación de diversidad de los receptores de antígeno en linfocitos: validación del modelo de accesibilidad en el control de la recombinación V(D)J. Elsevier. doi.org/10.1016/j.inmuno.2012.07.003.
- Guerrero E. José Antonio. *Mamíferos en Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, La Biodiversidad en Morelos Estudio de Estado (Primera edición, Volumen II, p.p 339-347)*.
- Jacobs H. y Bross L. (2001). *Towards an Understanding of Somatic Hypermutation*. Elsevier science, 13: 208-218.
- Jebb D., Huang Z., Pippel M., Hughes GM., Lavrichenko K., Devanna P., Winkler S., Jermin LS., Skirmuntt CE., Katzaouraks A., Burkitt-Gray L., Ray DA., Sullivan K., Roscito J., Kirilenko B., Davalos L., Corthals A., Power M., Jones G., ... Teeling E. (2020). Six-Reference-Quality Genomes Reveal Evolution of Bat Adaptations. *Nature*. doi.org/10.1038/s-41586.020.2486.3.
- Johnson N., Arechinga-Ceballos N. y Aguilar-Setien A. (2014). Vampire Bat Rabies: Ecology, Epidemiology and Control. *Viruses*. Doi: 10.3390/v6051911.
- Justin M. H. Heltzel y Patricia J. Gearhart (2019). What Targets Somatic Hypermutation to the Immunoglobulin Loci. *Viral Immunology*. Doi: 10.1089/vim.2019.0149.
- Larson P. A., Bartlett L. M., Garcia K., Kuglelman J., Palacios G. y Sanchez-Lockhart M. (2021). Genomic Features of Humoral Immunity Support Tolerance Model in Egyptian Rousette bats. *Cell Reports*. doi.org/10.1016/J.celrep.2021.109140.
- LeFranc M.P. y Lefranc G. (2001). *The Immunoglobulin Facts Book*.
- Litman W. G. Rast P. J. y Fugmann D. S. (2010). The Origins of Vertebrate Adaptive Immunity. *Nature Reviews Immunology*.
- Lodish H., Berk A., Kaiser C. A., Krieger M., Bretshcer A., Ploegh H., Amon A. y Scott P. M. (2016). *Biología Molecular y Celular*. Editorial Medica Panamericana.

- Minaya D., Mendoza J. y Iannaccone J. (2021). Ectoparasitic Fauna of the Common Vampire Bat *Desmodus rotundus* (Geoffroy, 1810) (Chiroptera: Phyllostomidae) From Huarochiri, Lima and a Checklist of Ectoparasites in Bats of Peru. *Graellsia*. doi.org/10.3989/graelisia.2021.v77.293.
- Osorio-Rodriguez AN. Y Saldaña-Vázquez RA. (2019). CONTROL POBLACIONAL DEL MURCIÉLAGO VAMPIRO (*DESMODUS ROTUNDUS*) EN MÉXICO: ¿QUÉ TAN EFECTIVA ES PARA REDUCIR LOS CASOS DE RABIA BOVINA?. <https://doi.org/10.22201/ib.9786073020305e.2019.c21>.
- Pavlovich S., Lovett P., Koroleva G., Sanchez Lockhart M., Kepler T. B. y Palacios G. (2018). The Egyptian Rousette Genomes Reveals Unexpected Features of Bat Antiviral Immunity. *Cell Press*. doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.070.
- Rendon-Anaya M. y Alagon A. (2008) Mecanismos Moleculares de diversificación de inmunoglobulinas. Instituto de Biotecnología.
- Schatz D. G. y Ji Y. (2011). Recombination Centres and the Orchestration of V(D)J Recombination. *Nature Reviews Immunology*. Doi:10.1038/hri2941.
- Schoeder H. W. y Cavaan L. (2010). Structure and Function of Immunoglobulins. *American Academy of Allergy*. Doi:10.1016/Jaci.2009.09.046.
- Sia R. W., Zheng Y., Han F., Ma S., Wang L. F. y Leeansyah E. (2022). Exploring the Role of Innate Lymphocytes in the Immune System of Bats and Virus-Host Interactions. *Viruses*. doi.org/10.3390/v1401015.
- Silverman GJ. Y Goodyear CS. (2006). Confounding B-Cell Defences: Lessons from a Staphylococcal Superantigen. *Nature Immunology*. Doi:10.1038/nri1853.
- Sirupurapu V., Safanova Y. y Pevzner PA. (2022). Gene Prediction in the Immunoglobulin Loci. *Genome Research*. Doi: 10.1101/gr.276676.122.
- Skirmuntt C. E., Escalera-Zamudio M., Teeling C. E., Smith S. y Katzourakis A. (2020). The Potential Role of Endogenous Viral Elements In the Evolution of Bats as Reservoirs for Zoonotic Viruses. *Annual Review of Virology*. doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015613.
- Subudhi S., Rapin N. y Misra V. (2019). Immune System Modulation and Viral Persistence in Bats: Understanding Viral Spillover. *Viruses*. doi:10.3390/v11020192.

- Sun L., Wang X., Saredy J., Yuan Z., Yang X. y Wang H. (2020). Innate-Adaptative Immunity Interplay and Redox Regulation In Immune Response. Elsevier.
- Teeling E., Vernes S., Davalos M. S., Ray D. A., Gilbert T. P., Myers E. y Bat 1K Consortium. (2018). Bat Biology, Genomes and The Bat 1K Project: To Generate Chromosome-Level Genomes for All Living Bat Species. Annual Reviews. doi.org/10.1146/annurev-animal-022516-022811.
- Toche P. (2012). Visión Panorámica del Sistema Inmune. Rev. Me. Clin. Condes.
- Wong C. P. A., Li X., Lau S. K. P. y Woo C. Y. D. (2019). Global Epidemiology of Bat Coronaviruses. Viruses. doi: 10.3390/v1102074.
- Wynne J.W., Wong L.F. (2013). Bats and Viruses: Friend or Foe?. PLOS Pathog. Doi: 10.1371/journal.ppat.1003651.
- Xu Z., Zan H., Pone E. J., Mai T. y Casali P. (2012). Immunoglobulin Class-switch DNA Recombination: induction, targeting and beyond. Nature Reviews Immunology. Doi: 10.1038/nri3216.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD
DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Licenciatura en Biología

Programa Educativo de Calidad *Acreditado* por el CACEB 2018-2023

Cuernavaca, Morelos a 3 de mayo de 2023

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 la Pasante de Biólogo: **SIDNEY YARED MARTINEZ SANCHEZ**, con el título del trabajo: **CARACTERIZACIÓN DEL LOCUS DE CADENA PESADA DE INMUNOGLOBULINA (IGH) EN EL MURCIÉLAGO *Desmodus rotundus***.

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación por Tesis como lo marca el artículo 6° 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: DR. JOSÉ ANTONIO GUERRERO ENRIQUEZ.

SECRETARIO: DR. CUAUHTÉMOC JUAN HUMBERTO LANZ MENDOZA.

VOCAL: DR. JESÚS MARTÍNEZ BARNETCHE.

SUPLENTE: DRA. MARIA DEL RAYO SÁNCHEZ CARBENTE.

SUPLENTE: DRA. ELIZABETH ERNESTINA GODOY LOZANO.

Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, C.P. 62209, Tel-fax: (777) 329 7047
www.uaem.mx/organizacion-institucional/unidades-academicas/facultades/ciencias-biologicas



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



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

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

Sello electrónico

CUAUHTEMOC JUAN HUBERTO LANZ MENDOZA | Fecha:2023-05-03 12:46:57 | Firmante

O5fiv3RAAd0vwZjFqAoyAL9CFsHXloauPWUWhG9hqTnjPmkQRGTNLCEzzaaRHsmhmfPEIE54bhoLebDmRFoThP3AWKboTs3s+fdVdwsCb6w/LbvaXM7uHBHzCvx100citzm0krLvP4BSG0OELhJDOPhJiUCu5HF0h9/Yzh3cijg14LREDpklBe1IT8Itx5KheYh9EKly6ydnHtgzTqzb+anvRcFnqi+liTynaxHula1BcUzQ2XVIO0PuvyyH06otaOVddJEqJnLBGnmZSoSazJ8AldL+91VhYQK8JJe+upo0wG7k1ecZRMglA3IroyG5kCrgtdQRA+jh1Vy2EJA==

JESÚS MARTÍNEZ BARNETCHE | Fecha:2023-05-03 13:04:44 | Firmante

VjsPY57aeNWYJ7Dw7LFdnLLU2cNzMjxr/R1P2OmmUYRGq91blAMEwie/UhLR6daxNpV7AItZSetSQaEBc4aGr4aBwoPesWcg3niOm0AifRAM2lvO/cpIO8pcqxt1X/qdggqI5YcVqY4diDZeudymX9TG1C4QaZTAcYkg+G73wwTeWV9Lxb3jx5gh6LDWb2Lxrd92wSlrEvu4R/8xlcWR7hosGGRdLbKZNXvZkG29ADKFBMIMyp4n1jwW0cOfesbuvaFes2qbpjZah7m107TySNZ2qAZ6tC7iZr9KvGDe4S5nkYmO2NUJjoRF2pEaXG4T1g1wi6TpUzCaBtKKyxHNQ==

MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE | Fecha:2023-05-26 11:04:37 | Firmante

QWsoYQzJsnArTZIDZ5+UJZ3NgyGEQGaBvBH0tdvPByRt6tj/5XzUQKcKZKuC8WifNjQTgFNOAp297gLv+c6D+StMaTT1ayM+9lqX5G1q3J3MQNJrYVKMyHPxoCVplocDYeZLIINwvymtB15rI06osdZvEIEytIMHLNda8tg3dggwZmLwS2JXdoKW5S0pc3zEa7rOwblJKydhf2j1YEm2CikjHrWPxcug1KPB4hLceWtxHooY5zqPre9v+uutTJQDY9Lium+FEIjbyqggbhOF2VTckCPVcAMSLt+fYJDDxs3ai6f1+zKqFUEmqxk+Xxq/w+Lnd6qkuk5k+S4elQ==

JOSE ANTONIO GUERRERO ENRIQUEZ | Fecha:2023-06-15 10:00:36 | Firmante

llsUjfg1vpY950LenRzisHUODciDDcVXPKeGA3qPgm9ALegBiHCpmTgmD5WMEuYR75NS/kHgvjn1KF8OFAGr63va7UYeAJ0ItaLx/7GPsTWC18Wt/urGDHz77JIUTwH46zwEA7cBNC6F7oqcrjyBsrTvlzKZjTPGPjL0Gzn5bTdO8cl5V/wCuk2jSkUuoBlybmaiFidX6ZqvKOPih7sLcubkZkE3Uaabh6wNPoXr/juYGNKHp4CN8fpZHPZ+n0EmNZ5zbWCYvIX693VIC9pWd417mKXT/duiZjZwpvO/s5UcqOvOeiXGrVCq5fF2DulHi8iE9A1EMUFzkJU5g==

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



LAFXWuJ5r

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/VmN4PIotT4YwGoUG1z1ruMgcRmw4CBn>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023