



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MORELOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS**

**ERV14 REGULA LA CAPTURA DE GLUCOSA A TRAVÉS DE SU ASOCIACIÓN CON  
LOS TRANSPORTADORES DE HEXOSAS HXT3 Y HXT5.**

**TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS  
PARA OBTENER EL TITULO DE:  
B I O L O G O  
P R E S E N T A:  
LINDA CECILIA MARTÍNEZ MORALES**

**DIRECTOR**  
Dr. PAUL ROSAS SANTIAGO

CUERNAVACA, MORELOS

Enero, 2021



**FACULTAD  
DE CIENCIAS  
BIOLOGICAS**



**Instituto de Biotecnología**  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

## **DEDICATORIA**

Al Dr. Paul Rosas Santiago por ser el mejor mentor, guía y director de este proyecto, por enseñarme cosas nuevas, por depositar su total confianza y apoyo en mí, por inspirarme a seguir este camino de la ciencia, por enseñarme su grandeza a través de su humildad de enseñar, por brindarme sus conocimientos, su tiempo y su espacio para que este proyecto tuviera éxito, por creer en mí y enseñarme a no rendirme, por ser un ejemplo a seguir, gracias por dedicar amor y pasión a este proyecto tanto como yo, espero algún día llegar a ser como Ud.

A mis padres, Linda Morales Aranda y Heladio Martínez Silva, por ser el principal pilar en mi vida, por brindarme apoyo incondicional en todo mi proceso de vida, por dedicar su vida a mi cuidado y bienestar, por procurarme protegerme y amarme siempre, ante todo y todos. Por educarme y brindarme valores para ser una persona humilde, responsable y amable ante el mundo, por demostrarme que quien quiere puede, que no hay obstáculos para poder lograr todo lo que uno se proponga, por su amor infinito, gracias.

A mis hermanos Blanca, Jorge y Víctor, por ser mi inspiración, por ser mi sostén ante mis caídas, por enseñarme a no rendirme, por ser un ejemplo a seguir, por brindarme tiempo y espacio, por estar incondicionalmente y animarme a no tirar la toalla, por brindarme amor, atención y la razón necesaria para ser una mejor persona todos los días.

A Sergio Octaviano, por ser una persona que ha estado incondicionalmente, en los mejores momentos y momentos de tempestad, por inspirarme a crecer, ser una mejor persona, a tener planes y ambiciones en la vida, por escucharme, apoyarme y enseñarme a ser valiente. Por ser el mejor compañero y sostén durante mis proyectos de visa, por aplaudir mis logros y permanecer siempre, por el amor y apoyo infinito, gracias.

A Soledad Quintero por ser la mejor compañera de laboratorio y carrera, por quedarse conmigo hasta noche para terminar nuestros experimentos, por dedicar la misma pasión y amor a la ciencia y la biología, por ser el mejor equipo en todos los aspectos, por apoyarme, escucharme, prestar atención, y estar en cada etapa de este proceso.

A mis amigos Nayeli, Verónica, Bryan Y Violeta, por creer en mí, por escucharme y estar en este proceso, por apoyarme e inspirarme a ser una mejor Bióloga.

A Dios por brindarme salud, amor, y una familia amorosa que ha sido la principal que me ha apoyado en este camino tan bonito y complicado a la vez.

**Este trabajo fue realizado bajo la dirección del Dr. Paul Rosas Santiago en el departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.**

**Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico del proyecto DGAPA a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IA200619**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis Síodos, Ramón Suarez, Laura Lina, Patricia Jaimes, María Luisa Barroso, por dedicar tiempo a mi trabajo, por darme consejos para mejorar, por ayudarme a corregir mis errores, por brindarme críticas constructivas para ser una mejor estudiante, y una mejor Bióloga. Gracias por ayudarme a concluir una etapa y estar en cada paso de este proyecto.

A todos mis maestros de la UAEM por enseñarme a amar la biología y a aprender las mejores e interesantes cosas que esta conlleva, por brindarme conocimientos y la curiosidad por seguir aprendiendo y creciendo en esta campo tan diverso y bonito.

## INDICE GENERAL

RESUMEN .....	10
INTRODUCCIÓN .....	1
1. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES .....	6
1.1 Transportadores de difusión facilitada para Hexosas (GLUTS) .....	6
1.2 Transportadores de hexosas en levadura .....	7
1.3 Transportador HXT3 .....	8
1.4 Transportador HXT5 .....	8
1.5 Transporte de azúcares en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	9
1.6 Ruta secretora.....	11
1.7 Transporte vesicular.....	13
1.8 Ruta secretora temprana.....	14
1.9 Transporte anterógrado .....	14
1.10 COP II.....	15
1.11 Receptores carga.....	17
1.12 Erv14.....	18
1.13 Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	19
2. JUSTIFICACIÓN.....	20
3. HIPÓTESIS.....	21
4. OBJETIVOS .....	22

4.1 OBJETIVO GENERAL.....	22
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES .....	22
5. METODOLOGÍA .....	23
5.1 Estrategia experimental.....	23
5.2 Transformaciones rápidas de levadura con Acetato de Litio. ....	25
5.2.1 Transformaciones .....	25
5.2.2 Pellet y Re suspender .....	26
5.2.3 Master Mix  .....	26
5.3 Observación de los transportadores Hxt3 Y Hxt5 en las membranas celulares a través de microscopia con focal.....	27
5.4 Drop Test.....	28
5.5 Análisis de la expresión génica mediante PCR en tiempo real. ....	30
6. RESULTADOS.....	31
6.1 Localización de HXT3 Y HXT5 .....	32
1.2 Localización de Hxt3-GFP en diferentes Densidades Ópticas.....	34
1.2.1 Localización de Hxt3- GFP en diferentes Concentraciones de Glucosa .....	35
6.3 Localización de Hxt5-GFP en diferentes Densidades Ópticas .....	36
6.3.1 Localización de Hxt5- GFP en diferentes Concentraciones de Glucosa .....	37
6.4 Localización de Erv14 en diferentes Concentraciones de Glucosa.....	38

6.5 Los transportadores Hxt3 y Hxt5 presentes en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pueden transportar otras fuentes de carbono además de la glucosa. ....	40
6.6 La Expresión del gen ERV14 disminuye a bajas concentraciones de glucosa, y en presencia de galactosa y rafinosa .....	42
7. DISCUSIÓN .....	48
8. CONCLUSIÓN.....	52
9. PERSPECTIVAS .....	53
10. REFERENCIAS .....	54

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Célula procariota.....	2
Figura 2: Célula eucariota .....	2
Figura 3: Método de transporte SGLT .....	3
Figura 4: Método de transporte GLUT .....	4
Figura 5: Características de los principales transportadores de azúcares en levaduras. ....	9
Figura 6: Carácter bidireccional de la ruta secretora. ....	12
Figura 7: Receptores carga en la ruta secretora temprana. ....	16
Figura 8: La proteína Erv14 es necesaria para la localización de los transportadores en membrana plasmática. ....	32
Figura 9: La localización de HXT3-GFP a una densidad de 0.025 no se localiza en vacuola.....	34
Figura 10: La localización de HXT3-GFP a bajas concentraciones de glucosa se localiza en esferas internas.....	35
Figura 11: El transportador HXT5-GFP a densidades de 0.025 y 0.075 se localiza solamente en membrana plasmática.....	36
Figura 12: La localización de HXT5-GFP a diferentes concentraciones de glucosa se localiza en membrana plasmática.....	37
Figura 13: Erv14 se localiza en vacuola a bajas concentraciones de glucosa. ....	38
Figura 14: HXT3 Y HXT5 pueden transportar otras fuentes de carbono además de la glucosa. .	40
Figura 15: La Galactosa y la Rafinosa disminuyen significativamente la expresión de Erv14 ...	43
Figura 16: La expresión de Erv14 es reprimida a bajas concentraciones de glucosa. ....	44
Figura 17: La expresión de HXT3 es inducida por maltosa, galactosa y rafinosa. ....	45
Figura 18: La expresión de HXT5 es inducida significativamente por todos los azúcares excepto por fructosa.....	46

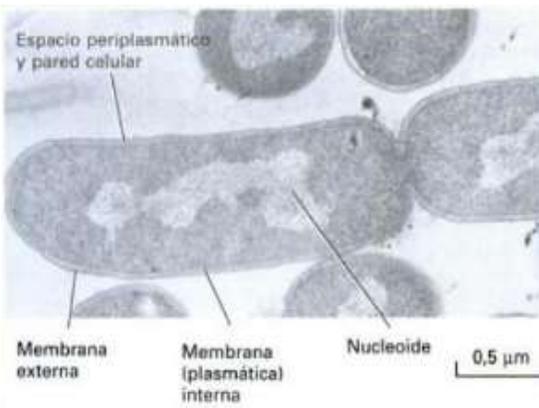
## RESUMEN

Las células usan diferentes macromoléculas para poder crecer y mantener su homeostasis celular. El uso de la glucosa para la generación de ATP permite a las células desarrollarse y reproducirse. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* emplea diferentes transportadores de la familia HXT para transportar varios tipos de azúcares a través de la membrana plasmática y con ello llevar a cabo la glicolisis. En el presente trabajo se investigó la importancia del receptor cargo Erv14 en la correcta salida del retículo endoplásmico a través de la ruta anterógrada mediante el empaquetamiento de los transportadores de hexosas Hxt3 y Hxt5. Nuestros resultados mostraron que la presencia de Erv14 es necesaria para que tanto Hxt3 como Hxt5 se anclen a la membrana plasmática y permitan el consumo de glucosa de las células de la levadura. Estudios de análisis de la expresión génica mostraron que Erv14 reprime los niveles de su transcrito en presencia de poca disponibilidad de glucosa. En su conjunto estos resultados nos sugieren que el receptor cargo Erv14 responde al estatus energético de la célula permitiendo la salida de los transportadores de hexosas Hxt3 y Hxt5 cuando se requiere la captura de glucosa. Más aun los resultados de la presente tesis sugieren que la localización de los transportadores de hexosas está siendo regulada a través de su correcto empaquetamiento y direccionamiento por la ruta secretoria hacia la membrana plasmática.

## INTRODUCCIÓN

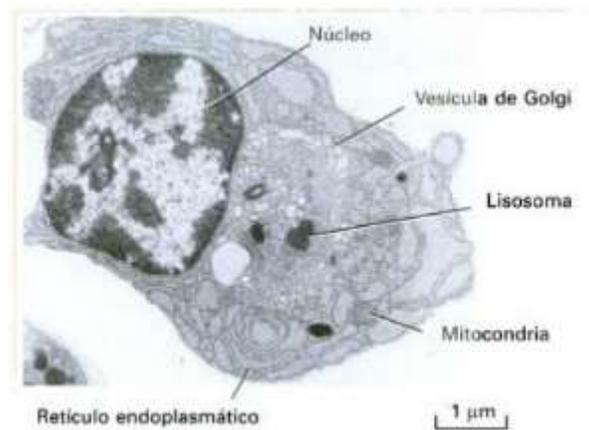
La célula es la parte más pequeña que constituye a los seres vivos, el común denominador, esto es, la unidad que caracteriza a los seres vivos, el principio o unidad fundamental para la organización y funcionamiento del cuerpo y en última instancia, de la vida. Las células presentan una sorprendente variedad de tamaños y formas. Algunas se mueven con rapidez y tienen estructuras que cambian también rápidamente. Otras son en gran manera estacionarias y estructuralmente estables. A pesar de estas y de otras numerosas diferencias, todas las células comparten ciertas características estructurales y realizan muchos procesos complicados básicamente de la misma manera (Lodish, 2005).

El universo biológico se compone de dos tipos de células: procariontes y eucariontes. Las células procariontes constan de un único compartimiento cerrado rodeado por la membrana plasmática, carecen de núcleo definido y tienen una organización interna bastante sencilla. A diferencia de los procariontes (Figura 1) las células eucariontes (Figura 2) contienen un núcleo definido rodeado por una membrana y otros compartimientos internos, los orgánulos, rodeados por membranas extensas. La región de la célula que se extiende entre la membrana plasmática y el núcleo es el citoplasma, que está compuesto por el citosol (fase acuosa) y los orgánulos. Los eucariontes comprenden todos los miembros de los reinos animal y vegetal, incluidos los hongos, los cuales existen en formas multicelulares (mohos), unicelulares (levaduras) y los protozoos que son exclusivamente unicelulares (De Robertis, Hib, y Ponzio, 2000; Lodish, 2005).



**Figura 1:** Célula procariota

Constan de un único compartimento cerrado rodeado por la membrana plasmática, carecen de núcleo definido y tienen una organización interna bastante sencilla (Lodish, 2005).



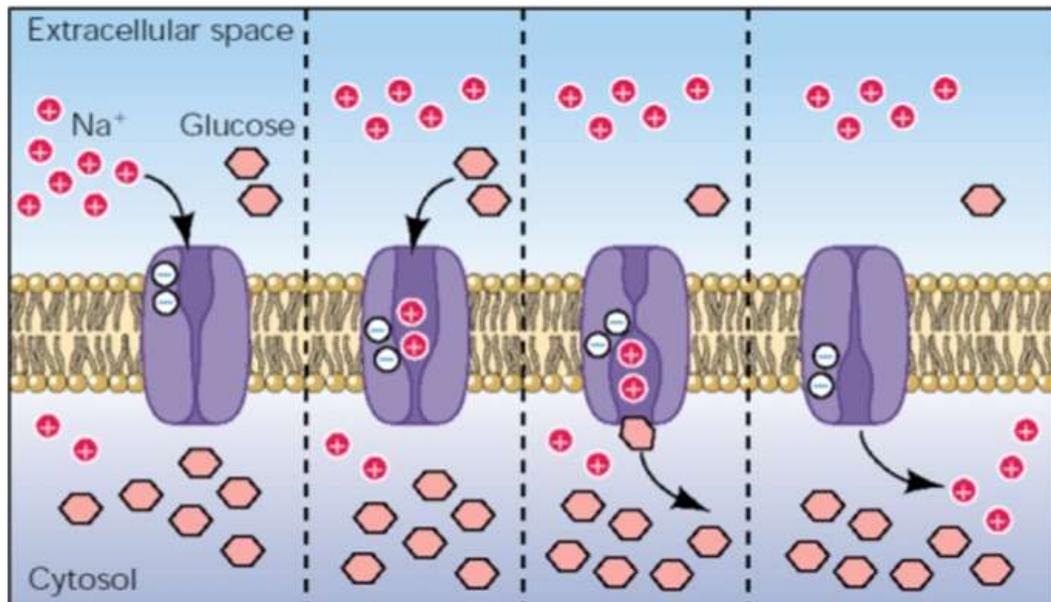
**Figura 2:** Célula eucariota

Contienen un núcleo definido rodeado por una membrana y otros compartimentos internos, los orgánulos, rodeados por membranas extensas (Lodish, 2005).

Al igual que nosotros, cada célula que forma nuestro cuerpo puede crecer, reproducirse, procesar información, responder a estímulos y llevar a cabo una asombrosa variedad de reacciones químicas, sin embargo para llevar a cabo estas funciones la célula requiere energía y uno de los elementos principales para la obtención de energía es la glucosa (Lodish, 2005). Los carbohidratos son sustancias químicas orgánicas de amplia distribución en la naturaleza. En las plantas son producidos por el proceso de la fotosíntesis e incluyen a la celulosa como ejemplo de un carbohidrato estructural y al almidón como carbohidrato de almacén. En las células animales los carbohidratos en forma de glucosa o en su polímero de almacén, el glucógeno sirven como fuente importante de energía para las actividades vitales de la mayoría de las especies vivientes que habitan el planeta (Bermúdez *et al.*, 2007).

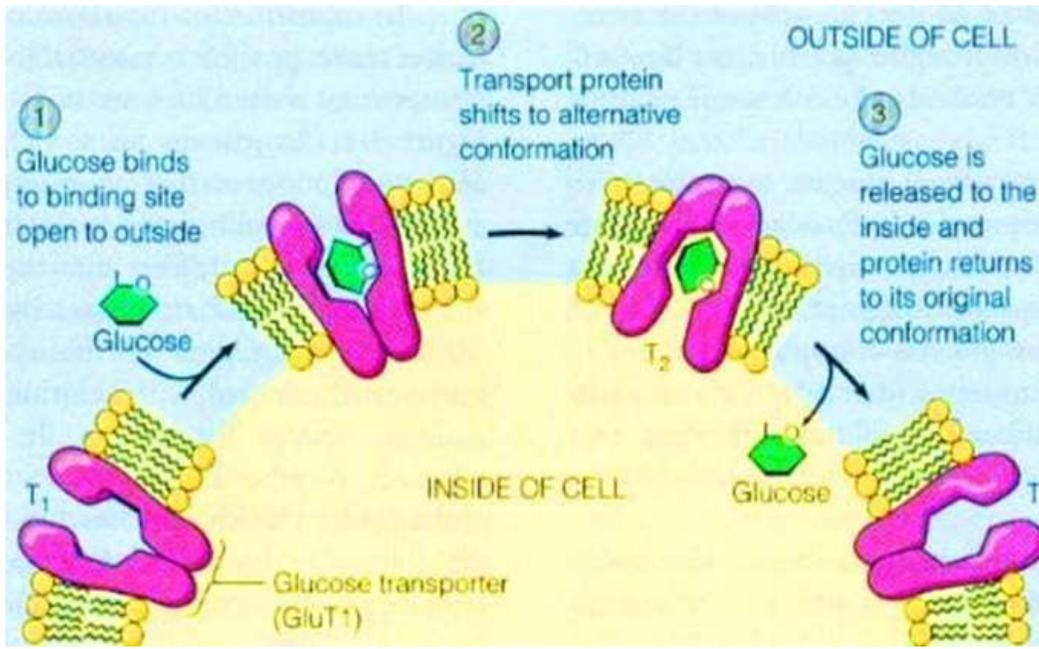
Las hexosas que son monosacáridos (glúcidos simples) formados por una cadena de seis átomos de carbono como la glucosa, galactosa y fructosa cumplen funciones importantes en

las células eucarióticas. Estas moléculas son incapaces de difundir directamente a través de las membranas celulares por lo que requieren proteínas transportadoras especializadas para entrar al interior celular, la naturaleza, a través de millones de años de evolución biológica desarrolló moléculas proteicas que cruzan completamente la membrana y que son capaces de formar “poros” que comunican el exterior con el interior celular, permitiendo el flujo de moléculas como los aminoácidos, vitaminas y carbohidratos en un sentido u otro. Los transportadores para glucosa trabajan de manera coordinada con factores hormonales, receptores, y segundos mensajeros para mantener el flujo de este metabolito en condiciones normales. Los transportadores de glucosa presentes en las células de los organismos superiores se clasifican en dos grandes familias, la Familia de los Gluts (Figura 4) y la familia de los Co-transportadores de Sodio y Glucosa (Figura 3) (Bermúdez *et al.*, 2007).



**Figura 3:** Método de transporte SGLT

Este sistema se denomina SGLT (Sodium/Glucose Transporters), del cual se conocen 6 isoformas (SGLT1-6) que aprovechan el transporte del  $\text{Na}^+$  a favor de su gradiente de concentración para generar una corriente electroquímica que produce los cambios conformacionales necesarios para la traslocación de la glucosa a través de la membrana plasmática. (Bermúdez *et al.*, 2007).



**Figura 4:** Método de transporte GLUT

Conjuntos de secuencias primarias aminoacídicas que determinan estructuras secundarias y terciarias (dominios o motivos) responsables de las características funcionales de la proteína. (Bermúdez *et al.*, 2007).

Como todas las proteínas que son sintetizadas en el retículo endoplasmico (RE) los transportadores de hexosas, que en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se denomina a la familia de estos transportadores como HXT (Hexose transporters), requieren de ser trasladados desde este organelo hasta la membrana plasmática u otros organelos a través de la ruta secretora. Esta ruta va desde el RE hasta el aparato de Golgi (AG) y emplea unas vesículas de transporte conocidas como COPII (Coat protein complex II). Estas vesículas se integran de varias proteínas que forman capas internas y externas y que la ayudan a construirse para dar alojamiento a las proteínas que requieren ser exportadas del RE. Una de esas proteínas que integran a las vesículas COPII es el receptor de proteínas cargo Erv14 (Endoplasmic Reticulum-vesicle), también conocido como cornichon en otros organismos. Esta proteína se encarga de seleccionar y empaquetar a sus proteínas cargo, que son aquellas proteínas que serán exportadas del RE como los transportadores de hexosas. De tal

manera que en este proyecto se busca explorar la dependencia de algunos transportadores de hexosas a Erv14 y con ello entender la participación de este receptor de proteínas cargo en el metabolismo de la célula.

## 1. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

### 1.1 Transportadores de difusión facilitada para Hexosas (GLUTS)

La mayoría de las sustancias con actividad biológica (iones, azúcares, péptidos y lípidos) cruzan la membrana de forma selectiva para desempeñar sus funciones. Aproximadamente el 10% de los genes de una célula están relacionados con transportadores de membrana, lo que nos da una idea de la importancia de este mecanismo para la célula. Los transportadores de glucosa son proteínas transmembrana 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. Se clasifican en tres grandes familias: la familia de los co-transportadores de sodio/glucosa (SGLT, por sus siglas en inglés), la familia de los transportadores de difusión facilitada (GLUT, por sus siglas en inglés) y la familia de los transportadores dulces (SWEET, por sus siglas en inglés) (Machado *et al.*, 2019). En la familia GLUT se han descrito 14 hasta la fecha, todos poseen características comunes como los dominios de reconocimiento a la glucosa y las estructuras secundarias y terciarias junto con sus dominios o motivos que los vuelven característicos de esta familia. Los GLUTS son uniporte, excepto el GLUT13; transportan la glucosa a favor de su gradiente de concentración, de ahí el nombre de difusión facilitada, y constituyen el principal mecanismo de entrada de la glucosa a la célula. Existe la posibilidad de que los transportadores de glucosa emergieran evolutivamente por la duplicación de una proteína con seis dominios transmembrana como lo sugiere la presencia de estructuras repetidas en ambas mitades del transportador (Machado *et al.*, 2019). Todos los transportadores de membrana que median la transferencia de solutos desde el espacio extracelular hacia el citosol (o viceversa) comparten varias características: **Especificidad:** en general cada

transportador es específico para una sola sustancia o un grupo muy emparentado de éstas. **Saturación:** La capacidad de transporte puede alcanzar un máximo cuando todos los sitios de unión para el soluto a transportar están ocupados. **Competición:** ocurre cuando más de una sustancia es capaz de ser transportada por el sistema transportador. En este caso, tal como ocurre en la inhibición competitiva de enzimas, el soluto que se encuentre a mayor concentración será preferentemente transportado. (Bermúdez *et al.*, 2007; Machado *et al.*, 2019).

## 1.2 Transportadores de hexosas en levadura

A nivel molecular, la investigación ha confirmado los genes que codifican los transportadores de hexosas en la levadura. En condiciones enológicas hay numerosos genes implicados en el transporte de los azúcares, que está regulado por una amplia familia multigen denominada HXT. Existen 20 genes HXT. HXT1 y HXT7 son los principales transportadores. HXT2, HXT6 y HXT7 son transportadores de elevada afinidad, mientras que HXT1 y HXT3 son transportadores de baja afinidad. Tanto los transportadores de elevada como de baja afinidad presentan una mayor afinidad por la glucosa que por la fructosa, lo que podría afectar a la velocidad de utilización de estas hexosas. La concentración de hexosas en el medio influenciará la expresión de cada uno de los genes HXT. Ha sido demostrado que HXT3 tiene la mayor capacidad de transporte durante la fermentación y estudios muy recientes evidenciaron también que el gen HXT3 es, en efecto, responsable de la capacidad de algunas levaduras de consumir fructosa (Guillaume *et al.*, 2007). También demostraron que una mutación en un alelo del gen HXT3 era responsable del mejor funcionamiento de las levaduras vínicas gracias a la utilización de la fructosa durante la fermentación o en el caso de paradas de fermentación (Dumont *et al.*,

2008). Para la levadura *Saccharomyces cerevisiae* la glucosa es la fuente de carbono y energía preferida. De ahí que la levadura haya desarrollado mecanismos que rápidamente señalizan la presencia de glucosa y que le aseguran un uso óptimo y exclusivo. En *S. cerevisiae* la presencia de glucosa modula distintos procesos celulares, como la biogénesis de las enzimas mitocondriales, pasando así de un metabolismo oxidativo a un metabolismo fermentativo (Simes, 2018).

### **1.3 Transportador HXT3**

Es un transportador de hexosas de baja afinidad, con una  $K_m$  muy alta para glucosa, cercana a 60 mM (Boles y Hollenberg, 1997). La presencia de glucosa genera una señal suficiente para inducir la expresión de HXT3 aproximadamente 10 veces (Maier *et al.*, 2002). Su inducción por bajos niveles de glucosa es parcialmente dependiente de la vía Snf3p-Rgt1p. A altos niveles de glucosa, la inducción de la transcripción de HXT1 y HXT3 es diferente (Boles y Hollenberg, 1997). Aunque su afinidad sea semejante a la de Hxt1p, la presencia de Hxt3p es esencial para la fermentación normal (Luyten, Riou y Blondin, 2002).

### **1.4 Transportador HXT5**

Hxt5p es un transportador de hexosa funcional con una afinidad moderada por la glucosa ( $K_m = 10$  mM) que se expresa al máximo en condiciones que causan un crecimiento lento, como aumentos en la temperatura o la osmolaridad, así como el crecimiento en presencia de etanol o glicerol o un agotamiento de la glucosa. La inducción de la expresión de HXT5 cuando la glucosa se agota es en función de la tasa de crecimiento y es independiente de la vía de activación por disminución de glucosa (Diderich *et al.*, 2002).

Transportador de hexosa	Afinidad por la glucosa	Expresión durante la fermentación (cepas vínicas)
HXT1	Baja	Comienzo de la fermentación
HXT2	Moderada	Fase Lag.
HXT3	Alta	A lo largo de la fermentación
HXT4	Moderada	Fase de crecimiento
HXT5	Baja	No inducido
HXT6	Alta	Inducido en fase estacionaria
HXT7	Alta	Inducido en fase estacionaria

**Figura 5:** Características de los principales transportadores de azúcares en levaduras.

(Maier , 2002; Luyten , 2002).

### 1.5 Transporte de azúcares en *Saccharomyces cerevisiae*

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* utiliza preferentemente monosacáridos como glucosa, fructosa, manosa y galactosa, y disacáridos como maltosa como fuente de carbono y de energía. La primera etapa de la utilización de estos azúcares es su paso a través de la membrana plasmática, estructura que define la extensión de la célula y que es permeable a moléculas no cargadas de pequeño tamaño e impermeable a moléculas cargadas y de gran tamaño. Los azúcares y la mayoría de los nutrientes no pasan libremente a través de la membrana plasmática. Por ello, su entrada en la célula requiere la acción de proteínas integrales de dicha membrana conocidas con el nombre de transportadores o permeasas (Perdones, 2000). La regulación del metabolismo supone controlar las rutas implicadas a distintos niveles: a corto plazo se modifica la actividad de distintas proteínas, como es el caso de la inactivación por catabolito de los transportadores de galactosa y maltosa; mientras que a largo plazo se producen cambios en la actividad transcripcional. La glucosa en *S. cerevisiae* regula la expresión génica mediante dos rutas diferentes denominadas ruta de inducción y ruta de represión. Mediante la ruta de represión se inactiva la expresión génica de un gran número de genes tales como los genes responsables de la utilización de otras fuentes de carbono distintas a la glucosa, de la gluconeogénesis y la respiración. Por

el contrario, mediante la ruta de inducción se activan los genes responsables de la utilización de la glucosa, tales como genes que codifican para enzimas glicolíticas y transportadores de glucosa, HXT's (Simes, 2018). Prácticamente todas las células conocidas contienen transportadores de azúcares. En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, organismo unicelular eucariota, los transportadores de azúcares han sido ampliamente investigados. En este organismo se han identificado dos sistemas de transporte para monosacáridos: el de glucosa y el de galactosa. El sistema de transporte de glucosa está formado por un elevado número de proteínas capaces de transportar fructosa y manosa además de glucosa. Estas proteínas son codificadas por genes de la familia HXT de la que se han identificado 20 miembros. La expresión de algunos de estos genes es constitutiva mientras que la de otros depende de la concentración de azúcar en el medio (Perdones, 2000).

El transporte de azúcares a través de la membrana plasmática es la primera etapa catalizada de la glicolisis, principal vía de obtención de energía en levadura, y su velocidad limita la velocidad de esta vía. La regulación de estos transportadores es una de las estrategias que utiliza *S. cerevisiae* para adaptarse a ciertos cambios nutricionales. El hecho de que el transporte de azúcares sea el primer punto de control de la glicolisis hace particularmente interesante su estudio. Para que estas proteínas estén localizadas de manera correcta son varios los procesos que tienen que entrar en acción, no obstante, uno de ellos es la denominada ruta secretora. Esta ruta es un proceso de transporte vesicular y opera a lo largo de la ruta y asegura la llegada de diferentes proteínas a los distintos orgánulos destino (Castrejón, Carbo y Martínez, 2007; Perdones, 2000).

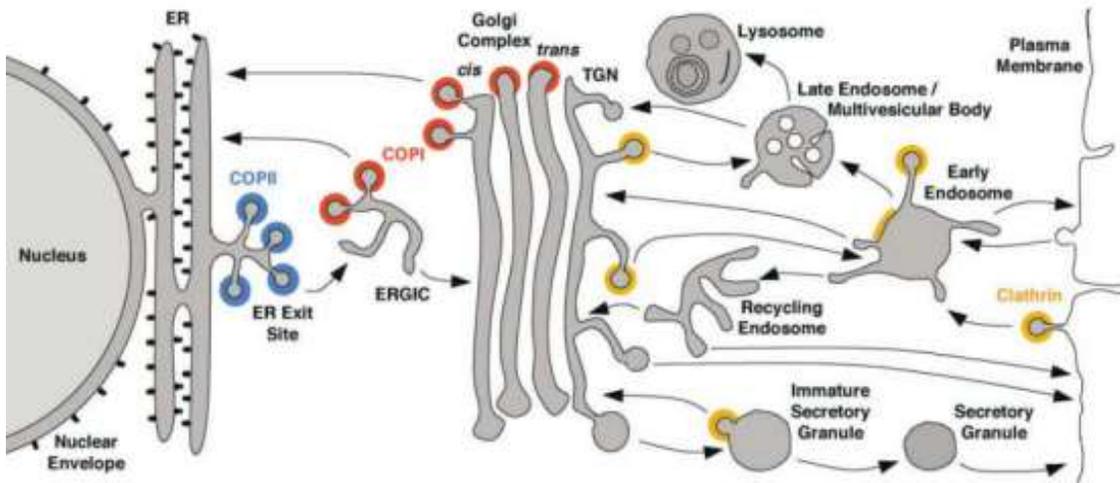
## 1.6 Ruta secretora

Las células eucariotas presentan un elaborado sistema de endomembranas que recubren y delimitan a los orgánulos. Estas membranas poseen varias proteínas que en algunos orgánulos como los peroxisomas son importantes para la biogénesis de este organelo. Estas proteínas que también se requieren para su mantenimiento y adecuado funcionamiento son sintetizadas en el RE. La mayoría de estas proteínas son trasladadas a través de lo que se conoce como la ruta secretora. Dicha ruta es responsable del transporte de una enorme cantidad de proteínas y lípidos a sus destinos funcionales, y es esencial para el funcionamiento de la célula como para el desarrollo pluricelular. De hecho, se estima que un tercio del proteoma de las células eucariotas se incorpora a la ruta secretora (Lee, *et al.*, 2004).

Las proteínas que se van a incorporar a la ruta son sintetizadas por los ribosomas asociados al RE, y se traslocan, al lumen de este orgánulo. En el RE se producen las primeras modificaciones post-traduccionales. Durante estas reacciones, las moléculas son continuamente evaluadas por un sistema de control de calidad a cargo de chaperonas y enzimas de glicosilación, que determinan el momento en el que las proteínas alcanzan un estado conformacional apropiado para abandonar el retículo. En ese momento, las proteínas se concentran en los sitios de salida del retículo o ERES (ER Exit Sites) para posteriormente ser incorporadas en vesículas de transporte asociadas al retículo endoplásmico (Erv) y ser exportadas hacia el aparato de Golgi. En el aparato de Golgi, las proteínas recorren las sucesivas cisternas cis, media y trans de este orgánulo, siendo a su vez ampliamente modificadas de manera secuencial, mediante la elaboración de estructuras carbohidratadas complejas. Una vez que alcanzan el subcompartimento más distal o TGN (Trans Golgi Network), las proteínas son seleccionadas y enviadas en intermediarios de

transporte vesiculares hacia su lugar final de residencia, bien sea el espacio extracelular, la membrana plasmática, los endosomas, la vacuola/lisosoma, los peroxisomas o los gránulos de secreción (Pérez, 2016; Lee, *et al.*, 2004).

La ruta secretora consiste en una serie de compartimentos membranosos especializados mejor conocidos como vesículas cuya composición molecular característica les permite desarrollar sus funciones eficientemente. El correcto funcionamiento de la célula sólo se puede conseguir si dichos orgánulos se comunican entre sí, de forma que sus distintas actividades y demandas estén coordinadas. Esta comunicación se basa, fundamentalmente, en la continua transferencia de moléculas de unos compartimentos a otros. Esto implica que los orgánulos sean estructuras altamente dinámicos, y necesiten, por tanto, de mecanismos para retener y reciclar sus moléculas propias (Pérez, 2016).



**Figura 6:** Carácter bidireccional de la ruta secretora.

En azul se muestran las proteínas de cubierta COPII que median el transporte desde el retículo endoplásmico al compartimento intermedio (ERGIC). En rojo, las cubiertas COPI, son las responsables del transporte retrógrado intra-Golgi y Golgi-retículo (Bermúdez *et al.*, 2007).

## **1.7 Transporte vesicular**

A lo largo de la ruta secretora (Figura 6), las moléculas viajan en vesículas lipídicas, que se evaginan desde un compartimento donador, y se fusionan con un compartimento receptor o aceptor. Este tipo de transporte se denomina transporte vesicular. Las proteínas clave que se encuentran durante todas las etapas del ciclo de vida de una vesícula de transporte son las denominadas proteínas de cubierta. Éstas son proteínas citosólicas que se asocian formando complejos de alto peso molecular que se reclutan conjuntamente a las membranas y desencadenan la formación de las vesículas de transporte. Las proteínas de cubierta son específicas de cada paso de transporte, dando identidad a las vesículas. Esencialmente, las proteínas de cubierta son las responsables de concentrar y seleccionar a las proteínas carga, separándolas del resto de proteínas presentes en los orgánulos donadores y, posteriormente, deformar la membrana para promover la evaginación de la vesícula naciente (budding) (Bonifacino y Glick, 2004).

El proceso de evaginación se desencadena cuando las proteínas de cubierta se asocian a la membrana del orgánulo donador y generan mecánicamente una curvatura hacia el citoplasma formando la gema. Al mismo tiempo, las proteínas de cubierta capturan a las moléculas carga que se deben incorporar a la vesícula, interaccionando con señales específicas presentes en los dominios citosólicos de estas proteínas carga. De este modo, quedan acoplados los procesos de captura selectiva de la carga y la evaginación de la membrana. Las cubiertas proteicas se organizan en dos capas, una externa y otra interna. La capa interna es la responsable de la captura y concentración de la carga, actuando como un adaptador entre la capa externa y las membranas. Por otro lado, la capa externa es la responsable de deformar la membrana, aportando la rigidez necesaria a la vesícula naciente

para su liberación. La interacción de la capa interna con la externa constituye un sistema de autorregulación del ensamblaje y el tamaño de las vesículas (Bonifacino y Glick, 2004).

### **1.8 Ruta secretora temprana**

La ruta secretora temprana comprende el tráfico entre el RE y el aparato de Golgi. La naturaleza bidireccional (Figura 6) del transporte vesicular en esta ruta es esencial para su correcto funcionamiento. Así, mientras que el transporte anterógrado permite la salida de las proteínas de secreción desde el RE hacia sus destinos funcionales del AG, el transporte retrógrado desde el AG al RE mantiene los niveles requeridos de proteínas endógenas en el retículo, y evita que proteínas mal plegadas avancen por la ruta secretora y recicle los factores necesarios para futuras rondas de transporte anterógrado. El establecimiento del flujo bidireccional en la ruta secretora temprana depende de las proteínas de cubierta COPII y COPI, las cuales participan en la generación de las vesículas mediadoras del transporte anterógrado y retrógrado respectivamente (Lee *et al.*, 2004).

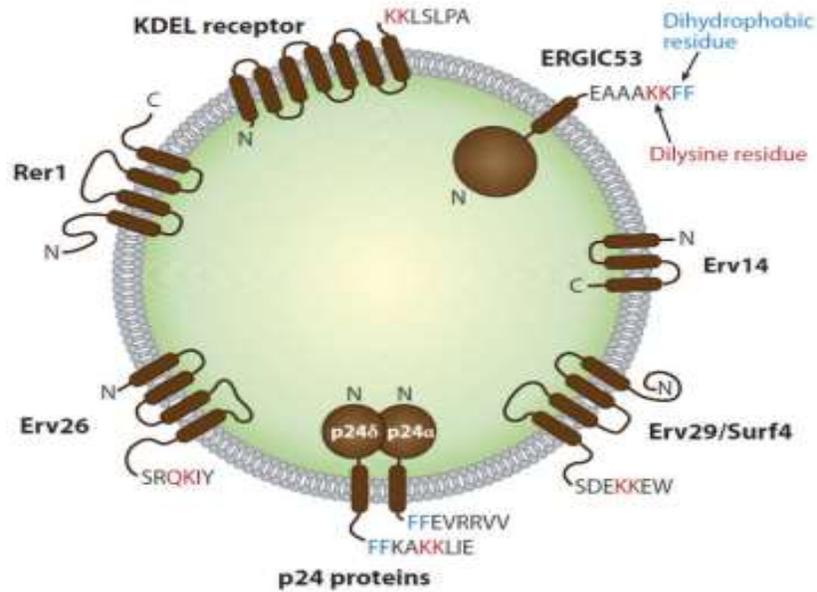
### **1.9 Transporte anterógrado**

Una vez que las proteínas han completado su síntesis, maduración y plegamiento en el RE, son competentes para ser exportadas hasta el Golgi en vesículas COPII. Estas se forman en unos dominios especializados de la membrana del RE denominados sitios de salida o ERES (ER Exit Sites). Tras su evaginación de los ERES, las vesículas COPII se anclan y fusionan con la membrana del Golgi liberando allí su carga y completando, de esta forma, la primera etapa de transporte anterógrado de la ruta secretora. Las proteínas citosólicas de cubierta COPII son reclutadas selectivamente a la membrana de los ERES donde tras ensamblarse deforman la membrana para generar una vesícula lipídica a la vez que concentran a las

proteínas carga en dicha vesícula haciendo efectiva su exportación del RE (Barlowe y Miller, 2013).

### **1.10 COP II**

El ensamblaje de la cubierta COPII en la membrana del ERES se inicia con el reclutamiento y activación de la pequeña GTPasa Sar1, a través del intercambio de GDP por GTP, catalizado por Sec12, una proteína integral de membrana del RE que actúa como factor de intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF) de Sar1. La forma activa de Sar1 despliega una  $\alpha$ -hélice anfipática N-terminal que permite su asociación estable con la membrana. Sar1-GTP recluta a la capa interna de la cubierta, formada por Sec23-24. Sec24 interacciona con las moléculas carga transmembrana separándolas de las residentes del RE y concentrándolas en la vesícula naciente, mientras que Sec23 actúa como un activador de la GTPasa (GAP) sobre Sar1 (Linero, 2016). Una vez formado, el complejo que inicia la evaginación (Sar1-Sec23-Sec24-molécula carga transmembrana) se recluta a su vez a la capa externa de la cubierta, formada por Sec13-Sec31. La proteína Sec31 estimula la actividad GAP de Sec23, de forma que Sar1 hidroliza su GTP y traslada al citosol en su estado inactivo unido a GDP. En este momento, las proteínas de cubierta quedan asociadas a la membrana gracias a su interacción con las moléculas carga transmembrana, y Sar1-GDP puede iniciar un nuevo ciclo de actividad. Sar1 estaría por tanto continuamente asociándose y disociándose de las membranas del RE, promoviendo la concentración de las cargas, que son clave para estabilizar el inicio de la evaginación de la vesícula y por tanto para promover la polimerización eficiente de la cubierta, de la formación y terminación de la vesícula, además de esta función, Sar1 contribuye a separar las proteínas carga relevantes y a promover la escisión de la vesícula naciente (Bielli *et al.*, 2005; Hariri *et al.*, 2014).



**Figura 7:** Receptores carga en la ruta secretora temprana.

En sus dominios citosólicos presentan señales para unir las cubiertas COPII (azul) y las cubiertas COPI (rojo) (Dancourt y Barlowe, 2010).

Aunque la incorporación de la hélice de Sar1, junto a la forma cóncava del dímero Sec23-Sec24 contribuyen a la deformación inicial de la membrana, parece ser la capa externa formada por Sec13-Sec31 es la que tiene una mayor capacidad para generar la red proteica que da forma esférica a la vesícula, gracias a su mayor rigidez estructural, permite contrarrestar la curvatura presente en una membrana rica en proteínas carga completamente ubicadas en el lado luminal (Copic *et al.*, 2012). Existen muchas proteínas de secreción que no pueden interactuar directamente con la cubierta COPII, porque son completamente luminales o porque sus dominios citosólicos carecen de señales adecuadas. En este caso, es necesaria la intervención de proteínas adaptadoras que reconozcan a esas proteínas y las conecten con la cubierta COPII. Estos adaptadores reciben tradicionalmente el nombre de receptores de carga (Dancourt y Barlowe, 2010).

### **1.11 Receptores carga**

Como se ha comentado anteriormente, durante la exportación de proteínas desde el RE las proteínas de cubierta de las vesículas COPII reconocen señales en los dominios citosólicos de las proteínas carga para incorporarlas en las vesículas nacientes. Sin embargo, muchas de las proteínas de secreción no pueden interactuar directamente con dicha cubierta ya que son completamente lumbinales o bien, sus dominios citosólicos carecen de estas señales. Por ello, todas estas proteínas necesitan para incorporarse eficientemente en las vesículas COPII de la acción de una proteína transmembrana que actúe como adaptadora conectándolas con la cubierta. Estas proteínas adaptadoras se denominan genéricamente receptores de carga o de transporte (Dancourt y Barlowe, 2010). Los receptores de carga son por tanto proteínas transmembrana con al menos dos dominios claramente diferenciados: un dominio citosólico con las señales necesarias para unir a las cubiertas COPII y COPI, lo que permite que ciclen entre el RE y el Golgi, y un dominio luminal y/o transmembrana que reconoce las formas maduras o correctamente plegadas y/o ensambladas de sus cargas. De esta manera, se consigue acoplar la selección de la proteína carga con el ensamblaje de la cubierta y la posterior formación de la vesícula COPII. Hasta la fecha se han podido identificar sólo algunos de los motivos reconocidos por los diferentes receptores en los dominios lumbinales de las proteínas carga, como carbohidratos específicos (reconocidos por dominios de lectinas) y determinadas secuencias de aminoácidos denominadas dominios o motivos (Dancourt y Barlowe, 2010).

Hasta la fecha se han identificado varios receptores de transporte (Figura7). Todos ellos tienen en común que son proteínas muy abundantes, con señales tanto de exportación del RE como de reciclaje, las cuales les permiten ciclar continuamente entre el RE y el Golgi. Además, la carencia individual de cada uno de estos receptores sólo afecta al transporte

específico de sus ligandos y no a otras proteínas de secreción. Otra característica importante es que están muy conservados en la escala evolutiva, aunque en algunos organismos no se hayan identificado todavía sus ligandos o sustratos. Por último, es importante destacar que todos los receptores que se han caracterizado son oligómeros, con lo que aumentan considerablemente su eficiencia de transporte (Dancourt y Barlowe, 2010).

### **1.12 Erv14**

Erv14 es una proteína que ha sido caracterizada inicialmente en *Drosophila melanogaster* con el nombre de cornichon (CNIH) y como otros receptores de carga está localizado en el retículo endoplásmico (ER). Erv14 reside en el RE y se incorpora selectivamente a las vesículas COPII. Erv14 es una proteína transmembrana que cicla entre el RE y el aparato de Golgi temprano y está involucrado en la selección de carga que se incorpora a las vesículas COPII. En levaduras, Erv14 interactúa físicamente con Se24 y Axl2. Axl2 es una proteína integral de la membrana plasmática ya que se requiere para la gemación axial de las células haploides. En la ausencia de Erv14, Axl2 no se incorpora a las vesículas COPII (Nakanishi, Suda y Neiman, 2007).

Los reportes muestran que Erv14 es necesario para el transporte de un gran número de proteínas transmembranales. La familia a la que pertenece está muy conservada, siendo sus homólogos en eucariotas superiores las proteínas de la familia cornichón. El miembro mejor caracterizado de esta familia es la proteína CNIH de *D. melanogaster*, necesaria para la exportación desde el RE de proteínas de la familia TGF $\alpha$  (factor de crecimiento transformante  $\alpha$ ). En *S. cerevisiae*, Erv14 se describió inicialmente como receptor de carga de la proteína de la membrana plasmática Axl2; y estudios posteriores han puesto de

manifiesto que es necesaria para la exportación desde el RE de numerosas proteínas transmembrana cuyo destino es la ruta secretora (Lineró, 2016).

### **1.13 Levadura *Saccharomyces cerevisiae***

La levadura *S. cerevisiae* ha sido el microorganismo más ampliamente utilizado por el hombre a través del tiempo; aunque no se tuviera, en un principio, conciencia plena de la participación del microorganismo en la elaboración de diversos alimentos como el pan o las bebidas alcohólicas, constituye el grupo de microorganismos más íntimamente asociado al progreso y bienestar de la humanidad; su nombre deriva del vocablo Saccharo (azúcar), myces (hongo) y cerevisiae (cerveza) (Suárez *et al.*, 2016).

Es una levadura heterótrofa, que obtiene la energía a partir de la glucosa y tiene una elevada capacidad fermentativa. Puede aislarse con facilidad en plantas y tierra, así como del tracto gastrointestinal y genital humano. Es necesario en el proceso de producción de alcohol, que a su vez constituye una valiosa fuente de proteínas y vitaminas para la alimentación. El uso más extendido está enmarcado en la panificación y en las industrias de fabricación de cerveza, vinos y alcohol. La levadura inactivada por temperatura se usa como fuente de nutrimentos en alimentación animal y humana, tanto en forma de levadura íntegra como a partir de sus derivados. Esta levadura es una de las especies considerada como microorganismo GRAS (Generally Recognized As Safe), por lo que ha sido aprobada para su uso como aditivo alimentario. Gran parte de lo que sabemos acerca de las proteínas en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi, que promueven la secreción de proteínas, se elucidó por primera vez en levaduras (Suárez *et al.*, 2016).

## 2. JUSTIFICACIÓN

Los transportadores de glucosa tienen una gran importancia para la generación de energía que es necesaria para que los seres vivos puedan existir, una deficiencia o alteración en las medidas de este sustrato podrían provocar alguna enfermedad o alguna alteración en el cuerpo humano. Erv14 es un receptor cargo que permite a las proteínas transmembranales ser transportadas en las vesículas COP II y llegar a los orgánulos correspondientes para su correcta función. Este proyecto se enfoca en estudiar la dependencia que tienen los transportadores de hexosas Hxt3 y Hxt5 a Erv14 en las células de *Saccharomyces cerevisiae* para que transiten desde el RE al AG, y como es que Erv14 influye en la correcta localización de estos transportadores para regular la captura de glucosa a través de la membrana plasmática.

### **3. HIPÓTESIS**

Erv14 es necesario para la correcta localización de Hxt3 Y Hxt5 en la membrana plasmática.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la participación de Erv14 en la captura de glucosa a través de su asociación con los transportadores Hxt3 y Hxt5.

### 4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Identificar si Erv14 es necesario para que los transportadores Hxt3 Y Hxt5 lleguen a la membrana plasmática.
2. Determinar si los transportadores Hxt3 y Hxt5 presentes en *Saccharomyces cerevisiae* pueden transportar otras fuentes de carbono además de la glucosa.
3. Identificar qué tipo de azúcar induce la expresión de Erv14.

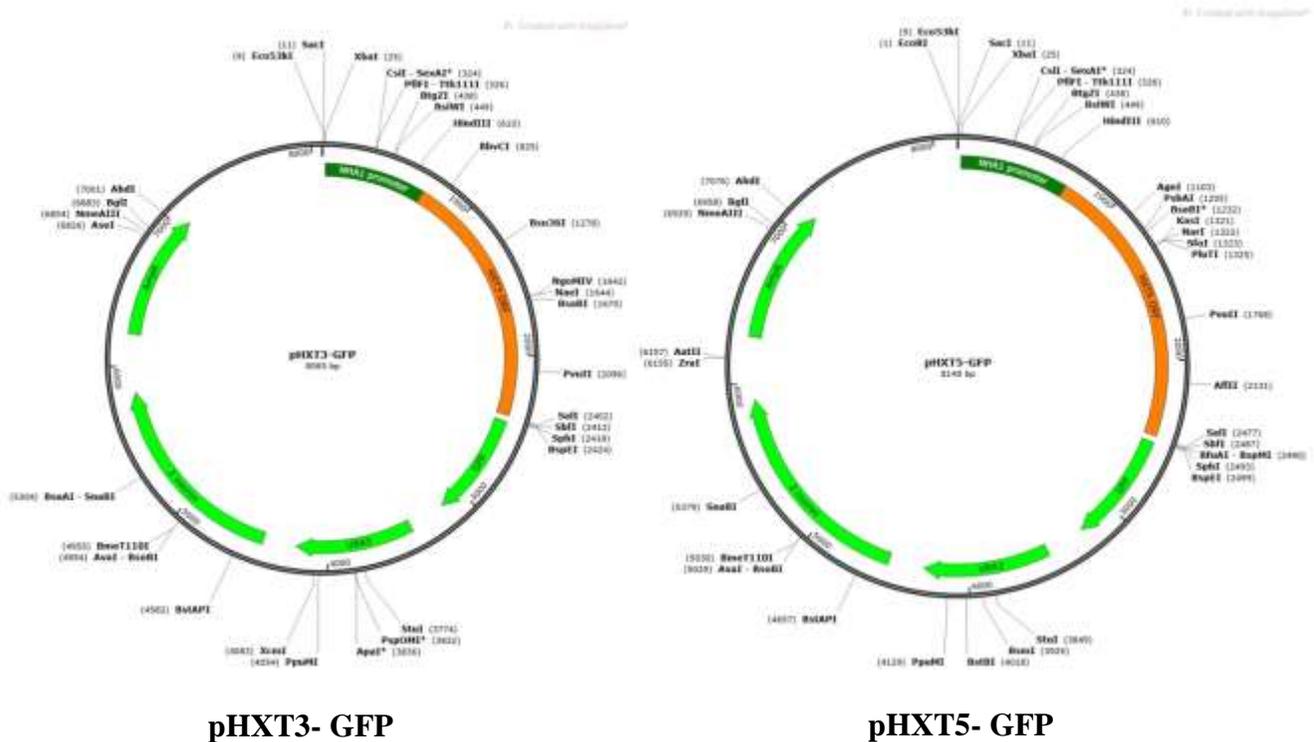
## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Estrategia experimental

Actividad	M	J	J	A	S	O	N	D	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	E	
<b>Planteamiento del problema</b>	■																					
<b>Revisión de literatura</b>		■																				
<b>Estructura de la tesis</b>		■	■																			
<b>Experimentos transformaciones rápidas de levadura y observaciones en microscopia confocal</b>			■	■	■	■																
<b>Seminario I (2019)</b>							■															
<b>Experimentos Densidades ópticas y % de glucosa Drop Test</b>								■	■	■	■	■										
<b>Seminario II</b>													■									
<b>PCR en tiempo real</b>														■	■	■	■	■	■	■	■	■
<b>Semirario III</b>																						■

Las levaduras son organismos eucariotas muy diversos respecto a su tamaño, forma y color. Son hongos unicelulares, generalmente ovaladas, pero también pueden encontrarse en forma esférica, cilíndrica o elíptica. Son mayores que las bacterias, alcanzando un diámetro máximo de entre cuatro y cinco  $\mu\text{m}$ . Se reproducen por fisión binaria o gemación y algunas pueden ser dimórficas o bifásicas y crecen como micelio bajo condiciones ambientales especiales. Son resistentes a antibióticos, sulfamidas y otros agentes antibacterianos de forma natural. Se conoce la secuencia completa de su genoma y se mantiene en constante revisión, lo que ha permitido la manipulación genética de los casi 6600 genes que codifican el genoma de levadura. Los constituyentes macromoleculares de las levaduras incluyen proteínas, glicoproteínas, polisacáridos, polifosfatos, lípidos y ácidos nucleicos. Su pared celular comprende entre 15 y 25 % de la masa seca de la célula y sus principales componentes son polisacáridos (80-90 %), esencialmente glucanos y mananos, con una

menor contribución de quitina, además de proteínas y lípidos. El contenido de proteínas en las levaduras varía entre el 40 y el 50 % de su peso seco y tienen una excelente calidad en función de su perfil de aminoácidos esenciales. La mayoría de las levaduras toleran un rango de pH entre 3 y 10, pero les resulta favorable un medio ligeramente ácido con un pH entre 4,5 a 6,5. (Suárez *et al*, 2016). La levadura que utilizamos en este proyecto fue *Sacharomyces cerevisiae*, debido a su rápido crecimiento, fácil manipulación y gusto por los azúcares, que son actores principales y fundamentales en este proyecto.



Los plásmidos son moléculas de ADN extra cromosómico generalmente circular que se replican y transmiten independientes del ADN cromosómico. Están presentes en bacterias y en algunas ocasiones en organismos eucariotas como levaduras.

Características: Origen de replicación: (capacidad de poder replicarse independiente). No se cambia la secuencia del ori. Sitio de resistencia a un antibiótico (gen de resistencia). Polylinker, región contenida dentro de las secuencias de los genes que codifican para los marcadores que contienen múltiples sitios de restricción para las enzimas de restricción, que permiten la inserción de los fragmentos de ADN que desea clonar en un sistema. Se utilizaron estos plásmidos porque cuentan con el casette de uracilo, se fusiono traduccionalmente a la proteína verde fluorescente (GFP) en el carboxilo terminal de los transportadores Hxt3 y Hxt5. La proteína GFP nos permitió visualizar a los transportadores debido a que con una longitud de onda de luz de 488 nm es posible excitar a esta proteína y a una longitud de 514 nm se puede visualizar su emisión de la fluorescencia

## **5.2 Transformaciones rápidas de levadura con Acetato de Litio.**

Medios de crecimiento y cepas.

Se prepararon 50ml de medio YPM sólido (Extracto de levadura 10 g, Peptona 20 g, Maltosa 20 g, Agar 24 g para un litro de solución). Se esterilizó y se vertió en cajas Petri con 25ml de medio YPM cada una. Se plaquearon las cepas EBY.VW.4000 (*hxt1 through -17Δ::loxP gal2Δ::loxP stl1Δ::loxP agt1Δ::loxP ydl247wΔ::loxP yjr160cΔ::loxP*) y EBY.VW.4000*erv14Δ* en las cajas Petri. Se prepararon 100 ml de medio YPM líquido y 150ml de YNB sólido. Se utiliza maltosa, ya que EBY.VW.4000 no puede crecer en glucosa debido a que tiene mutados los transportadores de hexosas.

### **5.2.1 Transformaciones**

Se inició con un pre-cultivo de la cepa EBY.VW.4000 en un matraz de 250 ml que contenía 5 ml de YPM. Al día siguiente. Se agregaron 45 ml de YPM por cada 5 ml de pre-cultivo y

se esperó un tiempo estimado de 4 horas (el cultivo tuvo aproximadamente 2 a 3 veces el duplicado de la densidad celular en los medios frescos).

### **5.2.2 Pellet y Re suspender**

Se usaron 50 ml de cultivo celular para 10-20 transformaciones. Se precipitaron 50 ml de células en un tubo falcón de 50 ml por centrifugación durante 7 min a 4500rpm a temperatura ambiente. Durante la centrifugación, se desnaturizó ADNss durante 10 min a 96 ° C y se refrigeró 5 min en hielo. Una vez terminada la centrifugación se desechó todo el sobrenadante y re suspendieron las células en 45 ml de agua y, 5 ml de 10xLiAc-TE (1 M LiAc, 20 mM NaEDTA, 100 mMTris-HCL/Tris Base, ph 7.5), se mezcló invirtiendo el tubo y posteriormente se centrifugaron las células durante 7 minutos a 4500 rpm. Se desecho la mayor parte del líquido sobrenadante y se usó solo el líquido restante en el tubo para re suspender las células.

### **5.2.3 Master Mix**

Para 10 transformaciones. Se agregaron 700µl de PEG 4000 al 50% (w/v), 80µl de 10xLiAc-TE en un tubo de 1,5 ml y se mezcló con una pipeta de 1 ml. Todo se hizo a temperatura ambiente, excepto el ADNss que se mantuvo en hielo hasta que se agregó al master mix. Se agregaron 180 µl de células y 30 µl de ADNss desnaturizado y se mezcló inmediatamente con la pipeta de 1 ml.

Todo se hizo a temperatura ambiente, excepto el ADNss que se mantuvo en hielo hasta que se agregó a la mezcla. Se agregaron 98 µL del master mix en cada tubo de PCR que contuvo 1 µl de ADN plasmidico (pHXT3-GFP o pHXT5-GFP). Se vertieron 2µl de agua estéril en cada tubo de PCR para poder homogenizar el ADN con la solución de

transformación. Se mezclaron las células con el plásmido pipeteando y se incubaron los tubos de PCR en el termociclador con las siguientes condiciones:

- 28 ° C 5 min
- 28 ° C 30min
- 42 ° C 13min
- 28 ° C continuamente

Cuando el programa de PCR volvió a 28 ° C. Se desechó la solución con una punta de 200uL y se agregaron 100uL de agua, para re suspender las células. Para plaquear, se agregaron 20uL de agua, y 20uL del contenido de los tubos de PCR y, se colocaron perlas de vidrio para distribuir el contenido, se dejaron en la incubadora 3 días a 28° C. Se aislaron 4 colonias en una caja Petri, estriando en cada parte una colonia.

### **5.3 Observación de los transportadores Hxt3 Y Hxt5 en las membranas celulares a través de microscopia con focal.**

Se hicieron 25ml de medio mínimo líquido YNB (Yeast Nitrogen Base w/o aminoacids 0.67% y glucosa 2%) + HTL (Histidina, Triptófano, Leucina a una concentración final de 20µg/ml para histidina y el triptófano, ya que para leucina son 240µg/ml). En 4 tubos falcón se agregaron 5ml de medio YNB. De las cajas en donde se aislaron las colonias, con una puntilla se tomó una pequeña cantidad de células y se inocularon los medios.

Posteriormente se dejaron en la incubadora toda la noche a 28° C en movimiento continuo.

Al día siguiente, para obtener las células se realizaron dos maneras diferentes dependiendo el crecimiento de las células. Gran cantidad de células: se tomaron las muestras directamente de los tubos donde fueron sembradas. Poca cantidad de células: se colocaron pequeñas cantidades de medio en tubos eppendorf, y se realizó una centrifugación para

concentrar la mayor cantidad de células. Una vez obtenidas las células se colocaron 20µl de células en un portaobjetos y 20µl de agua para distribuir las células y observar con mayor facilidad, posteriormente se colocó un cubre objetos y en las orillas se colocó esmalte transparente para sellar la muestra y evitar derrames en el equipo y evaporación del medio, se esperó a que secase el esmalte y la muestra se observó al microscopio.

A través del microscopio confocal multifotónico invertido Olympus FV1000 equipado con un objetivo de inmersión en aceite 60x (Olympus). Se visualizó a la proteína GFP por excitación con un láser de argón multilínea a 488 nm y el detector espectral se ajustó entre 515/30 nm para la emisión. Este equipo se encuentra dentro del Laboratorio Nacional de Microscopia Avanzada (LNMA) dentro del Instituto de Biotecnología de la UNAM, Campus Morelos.

#### **5.4 Drop Test**

Se aislaron colonias para tener células frescas, en cajas Petri con medio mínimo YNB+HTL (La cantidad de cajas dependió de los resultados que se esperaron en el drop test), la caja se dividió en dos y se plaquearon las células. Se esperaron 2 días para que las células crecieran. Se realizaron 12 cajas Petri en medio YNB+HTL, cada par tuvo un carbohidrato distinto, de esta manera se identificó si los transportadores lograron transportar otra fuente de carbono además de la glucosa. Los carbohidratos que se utilizaron fueron: maltosa, rafinosa, sacarosa, galactosa, glucosa y fructosa, debido a que todos tienen una estructura diferente.

Posteriormente se rotularon 6 tubos eppendorf: Gru.empty WT (plásmido vacío), Gru.empty *erv14Δ* HXT5. WT, HXT5. *erv14Δ*, HXT3. WT, HXT3. *erv14Δ*.

En cada tubo se agregaron 700uL de agua y con una punta azul o amarilla se agregó la mayor cantidad de células que fueron plaqueadas a la mitad en las cajas Petri y se agregaron a los tubos.

En otros 6 tubos eppendorf. Se agregaron 990uL de agua y 10uL de los tubos anteriores y se midió la densidad óptica. Los resultados obtenidos, se multiplicaron por 100, y de lo obtenido, se realizó la siguiente formula...

$$Vf = \frac{(3) (1ml)}{\text{Resultados obtenidos por 100}}$$

Los resultados dados de la formula OD, se restaron a mil, y lo obtenido fue la cantidad de agua que se agregó a los siguientes tubos eppendorf. En otros 6 tubos eppendorf se agregó la cantidad obtenida de la OD de células del primer tubo eppendorf y se agregó la cantidad obtenida de mil menos la OD, de agua. Para plaquear las células, lo primero que se hizo fue esterilizar la placa donde se realizaron las diluciones, se lavó, se secó y se esterilizo.

Una vez que se esterilizo, se escogieron los pozos donde se colocaron las diluciones, las diluciones fueron de 1 a 10, de 10 a 100 y de 100 a 1000, en el primer pozo se agregaron 200uL de células con una  $OD_{600}=3$ . En los siguientes pozos de 1 a 10, de 10 a 100 y de 100 a 1000, se agregaron 180uL de agua. Del primer pozo donde estaban los 200uL de células a una  $OD_{600}=3$  se tomaron 20uL, y se agregaron al primer pozo de 1 a 10, se pipeteo dejando todo homogéneo, del pozo de 1 a 10 se tomaron 20uL y se agregaron al pozo de 10 a 100, se pipeteo dejando todo homogéneo, del pozo de 10 a 100 se tomaron 20uL nuevamente y se agregaron al pozo de 100 a 1000, se pipeteo dejando todo homogéneo.

Para plaquear las diluciones seriales, en una caja Petri se agregó un poco de etanol al replicador de placas, seguido se puso sobre el mechero para esterilizar el replicador de placas que se utilizó, hecho esto, se esperó a que enfriara, y posteriormente el replicador de placas se metió en la placa donde estaban las distintas diluciones, al momento de sacarlo de la placa se verificó que llevara gotas de las diluciones en sus puntas, al confirmar la presencia de las gotas, se plaquearon las cajas Petri con sus respectivos carbohidratos. Se dejaron secar y posteriormente se sellaron con parafilm, finalmente se dejaron en la incubadora en crecimiento por 2 días.

### **5.5 Análisis de la expresión génica mediante PCR en tiempo real.**

La extracción de ARN total de células de levadura se llevó a cabo con Trizol (Invitrogen). Posteriormente 5 µg de ARN total libre de ADN genómico se usó para realizar la transcripción reversa y así generar ADN complementario (ADNc) usando oligo dT (JenaBiociencias). El ADNc se usó como templado para llevar a cabo las reacciones de PCR en tiempo real cuantitativo. La amplificación de ADNc se realizó a través de un master mix SYBR Green (JenaBioscience) en un termociclador Step-One (Applied Biosystems). Los volúmenes de reacción fueron de 20µl, los cuales contenían el ADNc, los oligos, el master mix del SYBR Green y el agua estéril. El programa de amplificación fue el siguiente:

95°C 10 min

40 ciclos con las siguientes condiciones

95°C 15 s

60°C 15 s

72°C 15 s

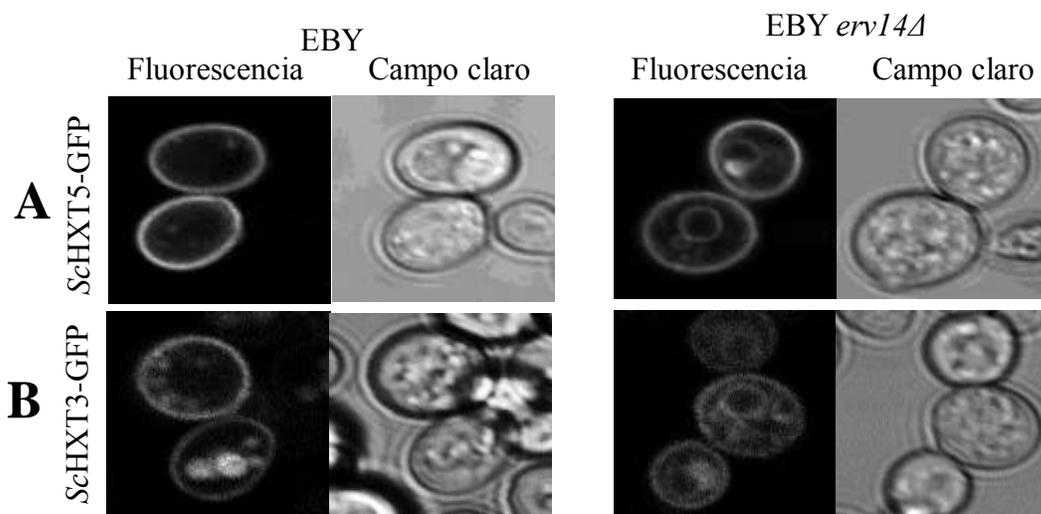
El gen ALG9 (manosiltransferasa) se usó como un gen de expresión endógena o control estándar para normalizar la expresión de los datos al gen de estudio. Se llevaron a cabo tres replicas biológicas con sus respectivas replicas técnicas.

## 6. RESULTADOS

Como se menciona en los materiales y métodos ambas construcciones pHXT3-GFP y pHXT5-GFP realizadas por el Dr. Paul Rosas en el laboratorio de la Dra. Hana Sychrová en el Instituto de Fisiología Celular de la Academia de Ciencias de la Republica Checa en Praga se usaron para transformar en las cepas EBY.VW.4000 y EBY.VW.4000*erv14Δ*. La mutación del gen ERV14 dentro de la cepa EBY.VW.4000 la realizo el Dr. Paul Rosas en Praga. El uso de la cepa EBY.VW.4000 es muy útil en estos experimentos ya que tiene mutados a todos los transportadores de hexosas que le permiten a la levadura crecer con una fuente de carbono como la glucosa, de tal manera que la única fuente que permite a estas levaduras crecer es la maltosa, la cual es un disacárido compuesto por dos glucosas. La maltosa es ingerida por las levaduras a través de un simportador H<sup>+</sup>-maltosa, es decir que para que la levadura interiorice la maltosa hacia el citoplasma celular requiere de la fuerza motora de protones (Loureiros-Dias y Peinado, 1984).

## 6.1 Localización de HXT3 Y HXT5

Con el objetivo de identificar la dependencia de la localización de los transportadores de hexosas Hxt3 y Hxt5 en la membrana plasmática a *Erv14*, se realizaron observaciones bajo el microscopio confocal. Para ello se fusionó traduccionalmente a la proteína verde fluorescente (GFP) en el carboxilo terminal de los transportadores Hxt3 y Hxt5. La proteína GFP nos permite visualizar a los transportadores debido a que con una longitud de onda de luz de 488 nm es posible excitar a esta proteína y a una longitud de 514 nm se puede visualizar su emisión de la fluorescencia.



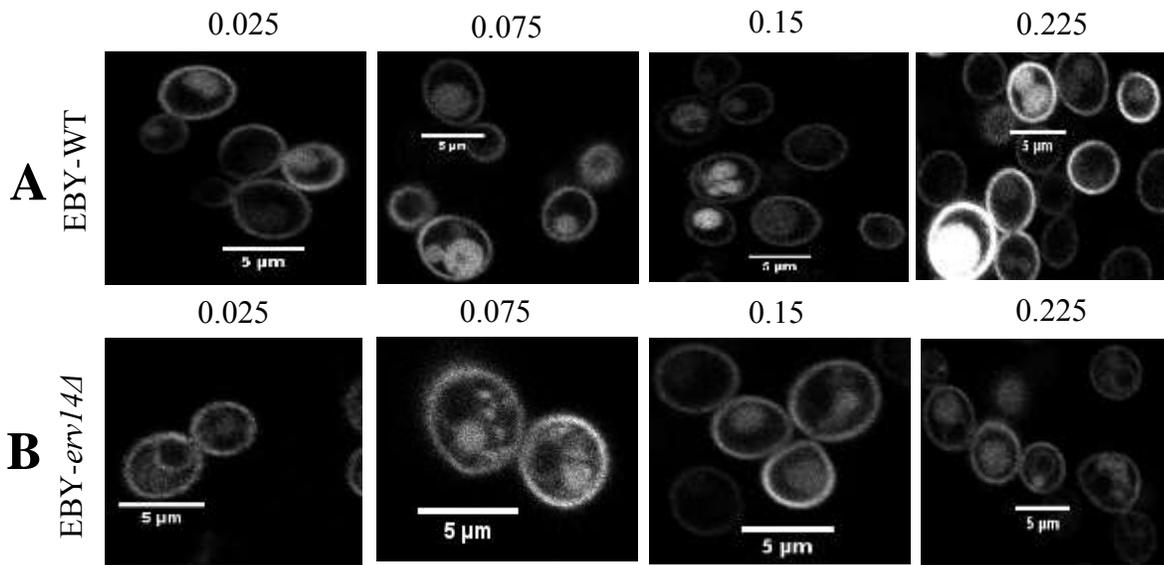
**Figura 8:** La proteína *Erv14* es necesaria para la localización de los transportadores en membrana plasmática.

En esta figura podemos observar imágenes que se obtuvieron de microscopía confocal en células de levadura en dos cepas, la cepa EBY (Silvestre) que tiene mutados todos los transportadores de hexosas y la cepa EBY *erv14Δ* (Mutante) que además de tener mutados todos los transportadores de hexosas tiene mutado al gen *ERV14* que dice ser el receptor cargo de estos transportadores de hexosas. **A)** Podemos observar la localización del transportador Hxt5 que es emitida por la fluorescencia de la proteína verde fluorescente (GFP) en la cepa EBY y EBY *erv14Δ*, en el lado izquierdo se observa la fluorescencia y en el derecho el campo claro. En la cepa EBY en fluorescencia la localización se observa en membrana plasmática, en la cepa EBY *erv14Δ* en fluorescencia la localización se observa en membrana plasmática y retículo cortical. **B)** Podemos observar la localización del transportador Hxt3 que es emitida por la fluorescencia de la proteína verde fluorescente (GFP) en la cepa EBY y EBY *erv14Δ*, en el lado izquierdo se observa la fluorescencia y en el derecho el campo claro. En la cepa EBY en fluorescencia la localización se observa en membrana plasmática en orgánulos internos en lo que presumimos que es vacuola, en la cepa EBY *erv14Δ* en fluorescencia la localización se observa en membrana plasmática y retículo peri nuclear y retículo cortical.

Como se puede apreciar en la Figura 8 cuando la cepa silvestre EBY.VW.4000 (EBY) se transforma con la construcción pHXT5-GFP, la emisión de la fluorescencia de la GFP asociada a Hxt5 se observa en la membrana plasmática que delimita muy bien el contorno de la levadura. En el caso de la emisión de la fluorescencia asociada al transportador Hxt3 se observa que su localización es en la membrana plasmática pero también está en unas estructuras esféricas que podrían ser vesículas o vacuolas. En la cepa EBY.VW.4000*erv14Δ* (EBY*erv14Δ*), la cual carece del gen ERV14 la localización de Hxt5 cambio a lo que es el retículo endoplásmico cortical, que está muy pegado a la membrana plasmática y al retículo perinuclear, el cual delimita el núcleo. En el caso de Hxt3 se observó que también la localización cambio de la membrana plasmática hacia el retículo endoplásmico, donde inclusive ya no se aprecian lo que presumiblemente podrían ser las vacuolas.

Debido a que este experimento se realizó más de una vez, en otras visualizaciones observamos a los transportadores Hxt3 y Hxt5 expresaron una mayor y menor fluorescencia, lo que nos llevó a dos conclusiones: la primera fue que los transportadores expresaron una mayor o menor fluorescencia debido a la densidad celular, y la segunda fue que los transportadores expresaron una mayor o menor fluorescencia debido a la concentración de glucosa. Se realizaron experimentos a diferentes densidades ópticas (0.025, 0.075, 0.15 y 0.225; Figura 8) y experimentos a diferentes porcentajes de glucosa (0.015, 0.031, 0.062, 0.25, 0.5, 1 y 2) y los resultados fueron los siguientes (Figura 9).

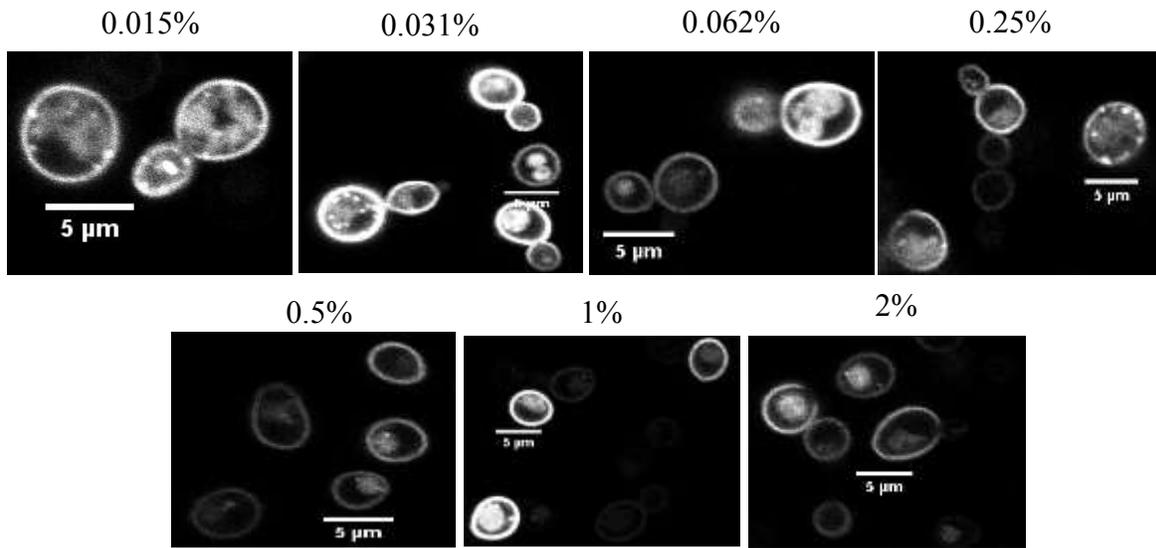
## 1.2 Localización de Hxt3-GFP en diferentes Densidades Ópticas



**Figura 9:** La localización de Hxt3-GFP a una densidad de 0.025 no se localiza en vacuola

En esta figura se pueden observar imágenes que se obtuvieron a través de microscopía confocal en células de levadura en las cepas EBY-WT (Silvestre) y EBY-*erv14Δ* (Mutante) crecidas a diferentes densidades ópticas **A)** Podemos observar que de la densidad 0.025 a la densidad 0.225 la localización del transportador Hxt3 se observa en la membrana plasmática y en lo que podría ser vacuola. **B)** Podemos observar que en la densidad 0.025 la localización del transportador Hxt3 se observa en membrana plasmática y en retículo peri nuclear, de la densidad 0.075 a la densidad 0.225 la localización del transportador Hxt3 se observa en membrana plasmática y probablemente vacuola.

### 1.2.1 Localización de Hxt3- GFP en diferentes Concentraciones de Glucosa



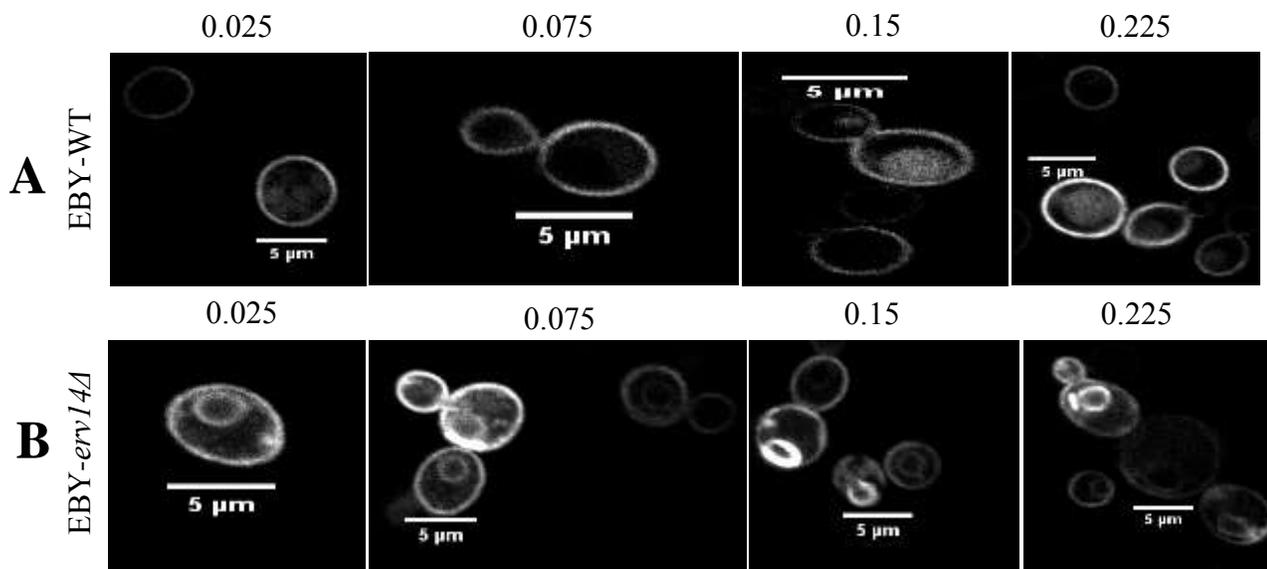
**Figura 10:** La localización de Hxt3-GFP a bajas concentraciones de glucosa se localiza en esferas internas.

En esta figura se pueden observar imágenes que se obtuvieron a través de microscopia confocal en células de levadura en la cepa *EBY-WT* (Silvestre) crecidas a diferentes concentraciones de glucosa. Podemos observar que a la concentración que va desde 0.015% a 0.25% la localización del transportador Hxt3 se observa en membrana plasmática, en pequeñas esferas internas y en lo que se presume es vacuola. De la concentración 0.5 a 2% la localización del transportador Hxt3 se observa en membrana plasmática, en vacuola, pero ya no hay localización en esferas internas.

A diferentes densidades ópticas la localización del transportador Hxt3 dentro de la cepa *EBY-WT* (Figura 9) se visualiza muy similar en todas las densidades es decir en la membrana plasmática y en lo que presumiblemente es la vacuola, pero en la densidad 0.225 la localización de Hxt3 se ve más intensa en la membrana plasmática, mientras que en la en la densidad 0.075 el transportador Hxt3 se visualiza más en lo orgánulos internos. También se observó la localización de Hxt3 a diferentes densidades ópticas en la cepa *EBYerv141* (Figura 9) y bajo todas las condiciones Hxt3 se mantuvo en membrana plasmática y retículo endoplásmico, no obstante, a 0.075 de densidad óptica se observó un incremento en la fluorescencia en estructuras esféricas que presumiblemente podría ser vacuola. Cuando las células se crecieron a diferentes concentraciones de glucosa (Figura 10), Hxt3 tiene una

mayor localización en la membrana plasmática a una concentración de 0.031%. Cabe mencionar que las imágenes de todas las condiciones a las que se crecieron las células se adquirieron bajo las mismas condiciones de registro, por lo que el incremento de la intensidad de la emisión de la fluorescencia de la GFP no se debe al cambio en las condiciones de registro de las imágenes. En estas condiciones no consideramos relevante registrar las imágenes de la fluorescencia de la GFP asociada a Hxt3 en la cepa *EBYerv14Δ* ya que nos interesó conocer si había algún cambio en la abundancia de Hxt3 en la membrana plasmática bajo las diferentes concentraciones de glucosa.

### 6.3 Localización de Hxt5-GFP en diferentes Densidades Ópticas

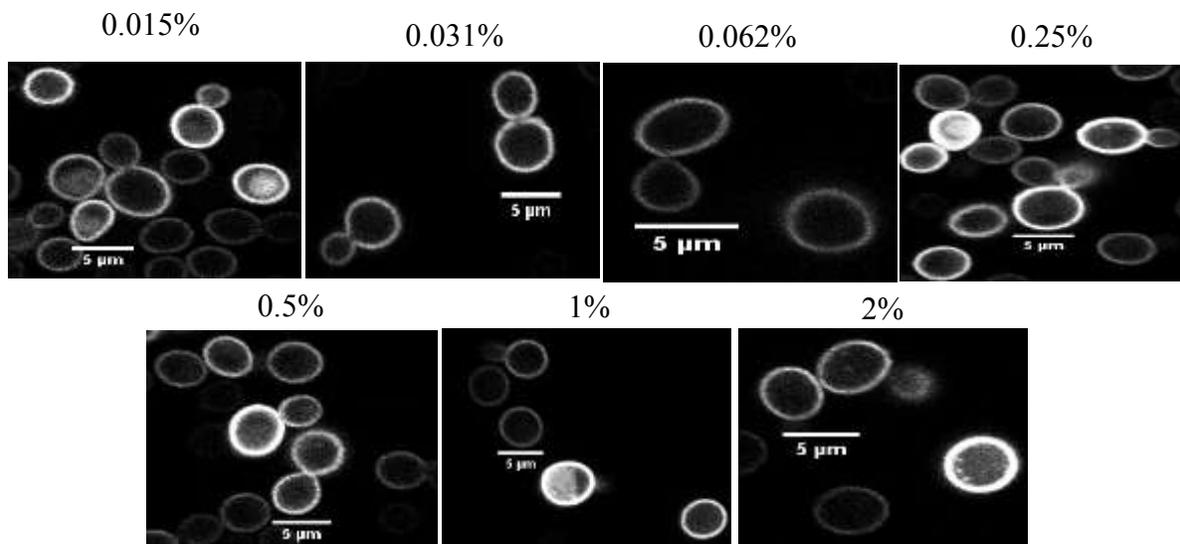


**Figura 11:** El transportador Hxt5-GFP a densidades de 0.025 y 0.075 se localiza solamente en membrana plasmática

En esta figura se pueden observar imágenes que se obtuvieron a través de microscopia confocal en células de levadura en las cepas *EBY-WT* (Silvestre) y *EBY-erv14Δ* (Mutante) crecidas a diferentes densidades ópticas **A)** Podemos observar que de la densidad 0.025 a la densidad 0.225 la localización del transportador Hxt5 se observa en la membrana plasmática, pero en 0.15 y 0.225 también se observa en lo que podría ser vacuola. **B)** Podemos observar que de la densidad 0.025 a la densidad 0.225 la localización del transportador Hxt5 se observa en membrana plasmática y en retículo peri nuclear.

Cuando se visualizó la localización de Hxt5 en la cepa EBY (Figura 11) se observó muy similar en todas las densidades ópticas, pero en la densidad 0.225 y 0.075 el transportador HXT5 mostró una mayor localización en la membrana plasmática. También se observó una fluorescencia de la GFP asociada a Hxt5 dentro de la vacuola siendo más evidente a una  $OD_{600} = 0.225$ . Cuando se observó la localización de Hxt5 en la cepa EBY *erv14Δ* (Figura 11) se observó que su localización se mantuvo en el RE y en unas estructuras muy cercanas al retículo perinuclear en forma de cilindro o en pequeñas esferas que en algunas células solo eran en un número igual a uno.

### 6.3.1 Localización de Hxt5- GFP en diferentes Concentraciones de Glucosa

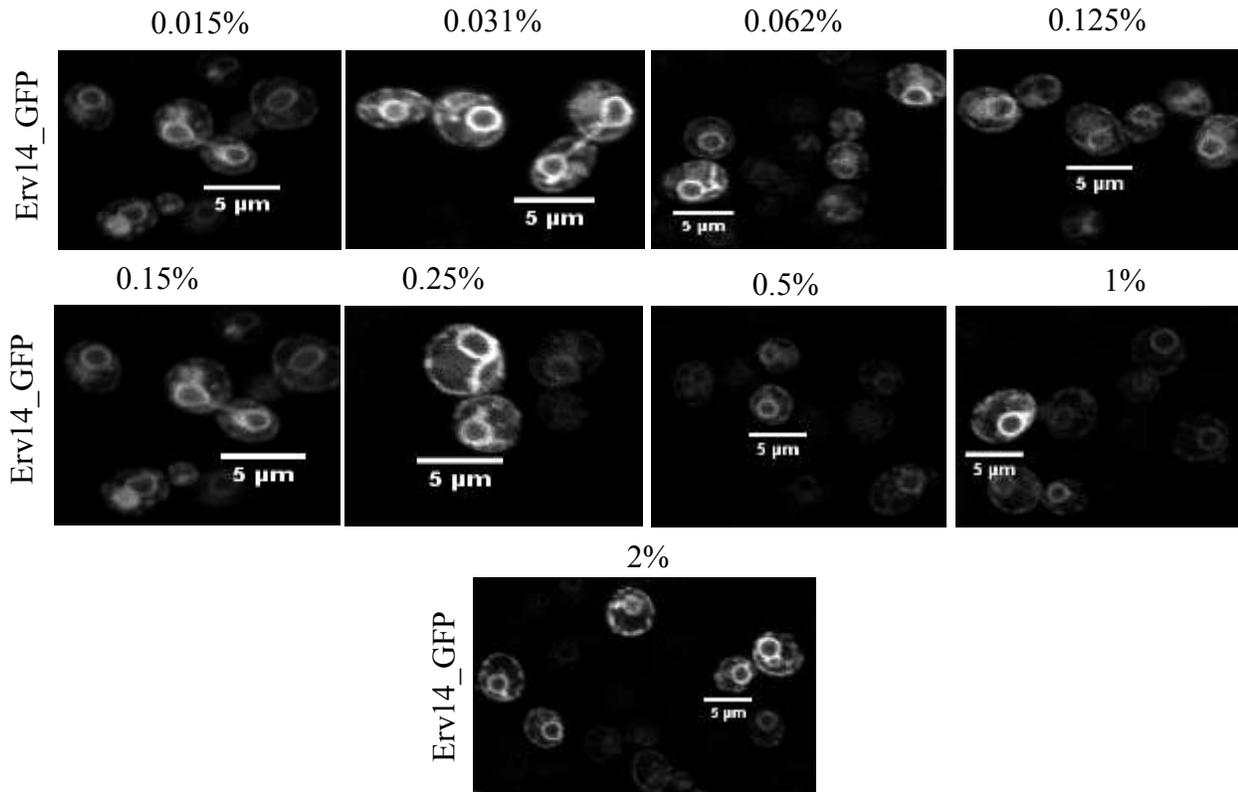


**Figura 12:** La localización de HXT5-GFP a diferentes concentraciones de glucosa se localiza en membrana plasmática.

En esta figura se pueden observar imágenes que se obtuvieron a través de microscopía confocal en células de levadura en la cepa EBY-WT (Silvestre) crecidas a diferentes concentraciones de glucosa. Podemos observar que de la concentración 0.015% a la concentración de 2% el transportador Hxt5 se observa en membrana plasmática. En la densidad 0.015% la localización del transportador Hxt5 se observa también en algunas células, en estructuras internas que podrían ser vacuola.

La visualización de las células crecidas a diferentes porcentajes de glucosa (Figura 12) nos mostró que Hxt5 de manera muy general muestra una localización primordialmente en la membrana plasmática y muy similar en todos los porcentajes de glucosa probados. Sin embargo, se observó que en algunas células la fluorescencia asociada a la GFP estaba localizada al interior de lo que presumiblemente consideramos podría ser vacuola. De igual manera las condiciones del registro de las imágenes se mantuvieron igual para la adquisición de todas las condiciones de crecimiento de las levaduras.

#### 6.4 Localización de Erv14 en diferentes Concentraciones de Glucosa

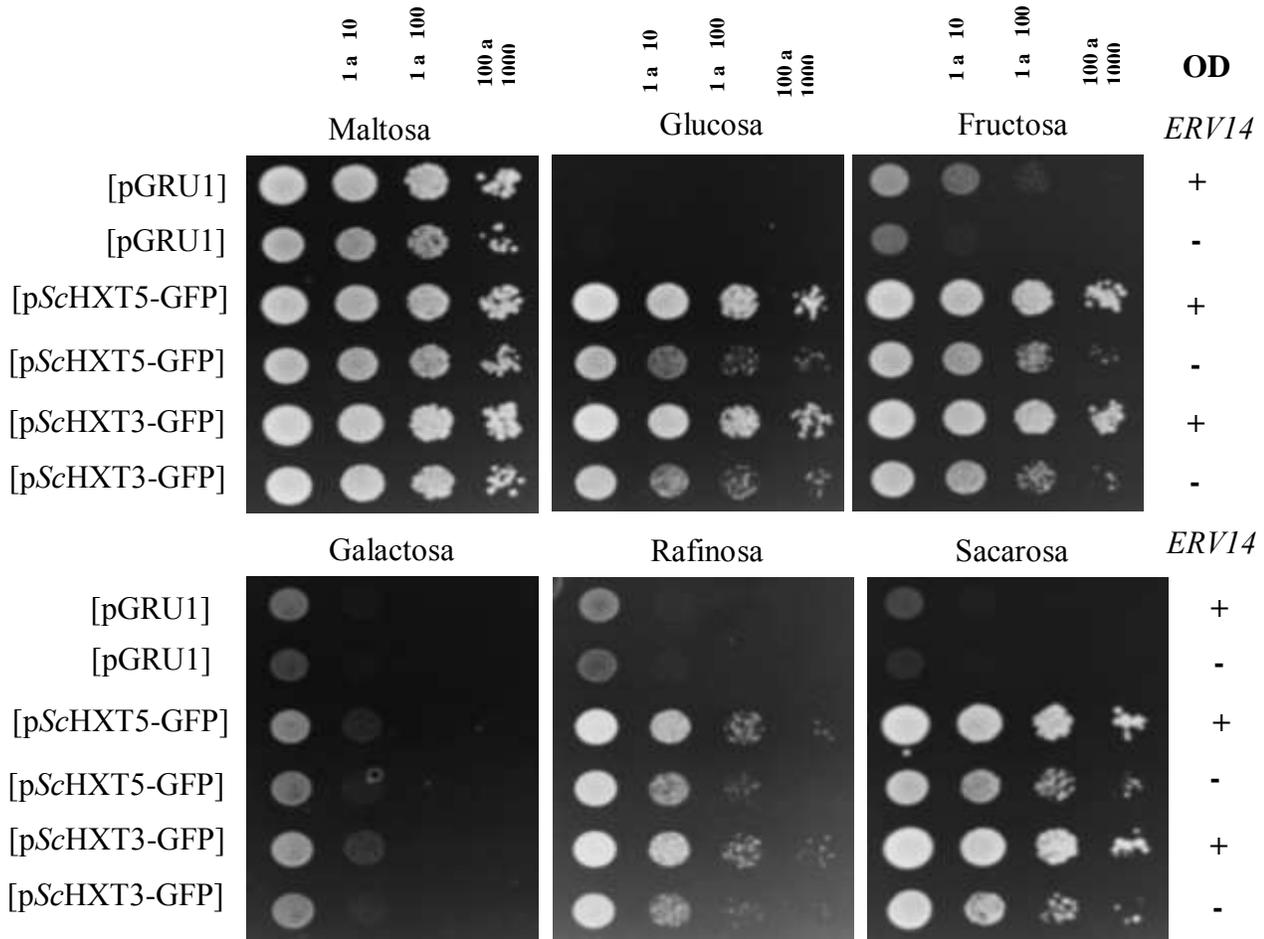


**Figura 13:** Erv14 se localiza en vacuola a bajas concentraciones de glucosa.

En esta figura se pueden observar imágenes que se obtuvieron a través de microscopia confocal en células de levadura en la cepa Erv14-GFP crecidas a diferentes concentraciones de glucosa. Podemos observar que de la concentración 0.015% a la concentración de 2% el gen Erv14 se observa en el retículo endoplásmico cortical y peri nuclear y en el aparato de Golgi. De la concentración 0.015% a la concentración 0.15% también se puede observar a Erv14 en lo que podría ser vacuola.

Con la finalidad de recabar más información sobre la posible regulación que se ejerce en la localización de Erv14 por la disponibilidad de glucosa se decidió crecer a las células de levadura a los mismos porcentajes de glucosa (0.015, 0.031, 0.062, 0.25, 0.5, 1 y 2) que se usaron para visualizar a los transportadores de hexosas. Posteriormente se visualizó la localización de Erv14 gracias a la construcción (pERV14-GFP) que se utilizó para expresar a Erv14 dentro de la cepa BY4741 *erv14Δ* para su posterior visualización bajo microscopia confocal. La localización de Erv14 se visualiza en el retículo endoplásmico cortical y perinuclear y en el aparato de Golgi en forma de esferas de distintos tamaños. Se observó que a diferentes concentraciones de glucosa Erv14 se mantiene localizado en estos organelos, pero también se apreció que una mayor localización de Erv14 se internalizó en la vacuola a bajas concentraciones de glucosa.

### 6.5 Los transportadores Hxt3 y Hxt5 presentes en *Saccharomyces cerevisiae* pueden transportar otras fuentes de carbono además de la glucosa.



**Figura 14:** Hxt3 Y Hxt5 pueden transportar otras fuentes de carbono además de la glucosa.

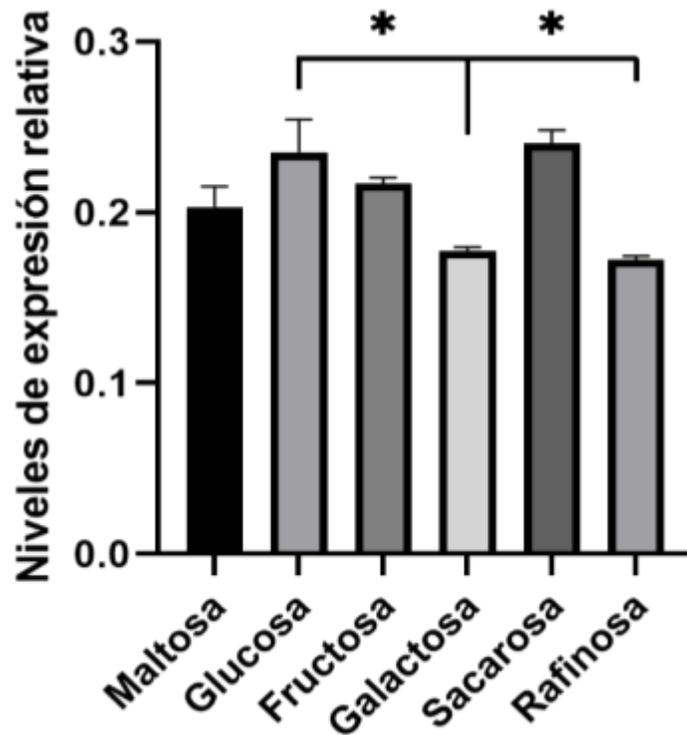
En esta figura podemos observar imágenes obtenidas de un ensayo de gota. Utilizando la cepa EBY.VW.4000 que tiene mutados a todos los transportadores de hexosas. Las cepas con el gen *Erv14* (indicado con +) y sin el gen *Erv14* (indicado con -), se utilizaron para incorporarle un plásmido vacío (pGRU), un plásmido con el transportador Hxt5 (pScHXT5-GFP) y otro con el transportador Hxt3 (pScHXT3-GFP). Los azúcares empleados para llevar a cabo los estudios de crecimiento se indican en la parte superior de cada imagen. Los números arriba indican las diluciones seriales que se hicieron a partir de una  $OD_{600} = 3$ . Esta es una representación de tres repeticiones.

Para determinar si los transportadores de hexosas Hxt3 y Hxt5 pueden transportar otras fuentes de carbono además de la glucosa, se realizaron ensayos de gota (ver materiales y métodos), de los cuales obtuvimos los siguientes resultados. La cepa EBY.VW.4000 no puede crecer en glucosa debido a que los transportadores de hexosas se le han mutado. En la (Figura 14) se observa que las cepas transformadas con el plásmido vacío tanto en EBY silvestre (indicada con el símbolo +) como en EBY $erv14\Delta$  (indica en la figura con el símbolo -) no son capaces de crecer en un medio con glucosa, pero se puede observar que con los otros carbohidratos existe un crecimiento ligero, siendo el mejor con maltosa. La cepa EBY tiene la capacidad de crecer en maltosas debido a la presencia de un simportador H<sup>+</sup>-maltosa. De manera interesante se observó que las hexosas como la fructosa y la galactosa permiten un ligero crecimiento de la cepa EBY silvestre (+) y EBY $erv14\Delta$  (-), siendo mejor el crecimiento en fructosa, sin embargo, también se notó una disminución del crecimiento de las levaduras crecidas en fructosa en la cepa mutante de ERV14 (-). En el caso de la rafinosa que es un trisacárido compuesto por glucosa, fructosa y galactosa, se observó un menor crecimiento comparado al del disacárido de la sacarosa que está compuesto por glucosa y fructosa. En ambos carbohidratos se observó que la mutación de ERV14 disminuye ligeramente el crecimiento de las levaduras. Esto nos indica que la mutación de ERV14 por si sola está generando cambios en la levadura ya que estas observaciones son hechas en las cepas que contienen el plásmido vacío. Cuando la cepa EBY (+) se transformó con los plásmidos pHXT5-GFP y pHXT3-GFP (Figura 14) por separado se observó que las levaduras restablecieron su crecimiento en un medio con glucosa mostrando que ambos transportadores son capaces de absorber glucosa. Sin embargo, cuando Hxt5 y Hxt3 se expresaron en la cepa EBY $erv14\Delta$  (-) y se crecieron en medios con glucosa se observó una reducción en el crecimiento. Esto nos indicó que la

captura de glucosa al interior de la célula se ve limitada por la ausencia del gen ERV14. Cuando las levaduras que expresaron a Hxt5 y a Hxt3 en la cepa EBY (+) se crecieron en medios con fructosa, rafinosa y sacarosa se observó un crecimiento adecuado de las células lo que nos indicó que ambos transportadores además de glucosa pueden transportar estos carbohidratos. Cuando las células se crecieron en medios con galactosa se observó un crecimiento menor al compararse con el resto de los carbohidratos. En la cepa EBY*erv14Δ* (-) el crecimiento de las levaduras expresando tanto Hxt5 como Hxt3 fue menor si se compara con aquellas que expresan a ERV14 (+), siendo más notoria la diferencia en las células crecidas en medios con galactosa. Estos estudios nos muestran que hay un eficiente transporte de carbohidratos desde el espacio extracelular al citoplasma a través de los transportadores Hxt3 y Hxt5 y que se incrementa por la expresión de ERV14.

#### **6.6 La Expresión del gen ERV14 disminuye a bajas concentraciones de glucosa, y en presencia de galactosa y rafinosa**

Los resultados anteriores nos mostraron que la captura de carbohidratos podría estar relacionada con los niveles de expresión de ERV14, por lo que se buscó identificar que carbohidrato regula la expresión del gen de ERV14. Para ello se planteó hacer estudios de la regulación de la expresión génica a través de ensayos de la cuantificación del mensajero por medio de PCR tiempo real. De tal manera que las células de la cepa BY4741 se crecieron en medios ricos de crecimiento por 12 h. para producir las suficientes células que posteriormente se crecieron en medios mínimos (YNB) con diferentes azúcares (maltosa, glucosa, rafinosa, fructosa, sacarosa y galactosa) durante 5 h.

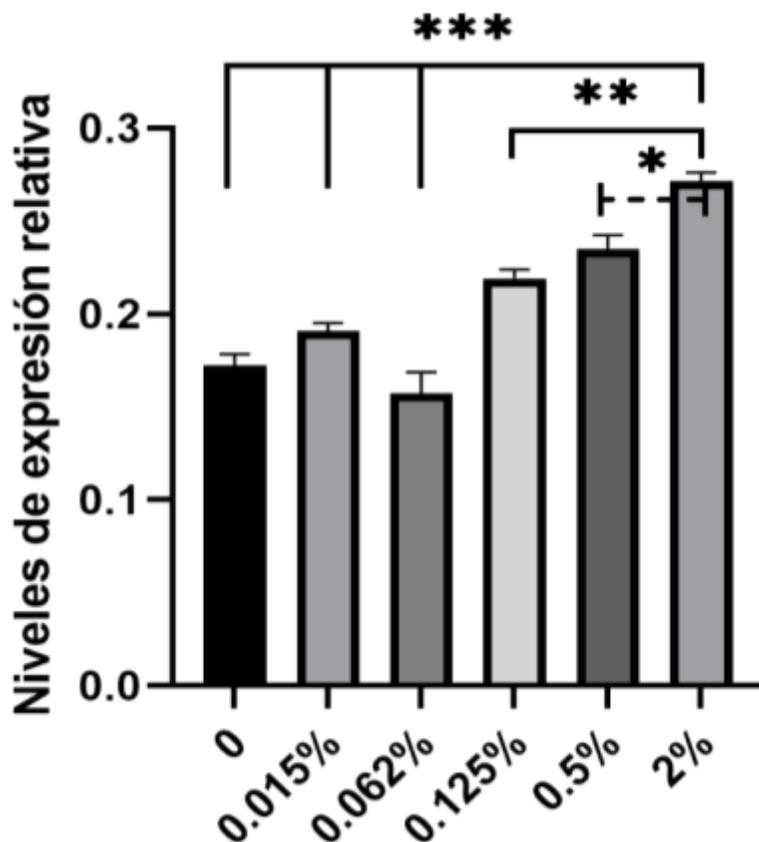


**Figura 15: La Galactosa y la Rafinosa disminuyen significativamente la expresión de Erv14**

Esta figura nos muestra la gráfica obtenida de los experimentos realizados en PCR en tiempo real, para saber que fuente de carbono induce la expresión del gen Erv14, se utilizó a ALG9 como nuestro gen endógeno, y se realizaron 3 réplicas de cada elemento. La gráfica nos muestra que la Galactosa y la Rafinosa son los principales carbohidratos que reprimen la expresión de Erv14 comparándose con el resto de los carbohidratos. Mientras que la glucosa y la sacarosa son los carbohidratos que más inducen su expresión. Los valores son los promedios  $\pm$  ES de 3 réplicas técnicas. Una prueba *t*-test de muestras no pareadas se usó para determinar la diferencia significativa entre las muestras con un valor de  $*p < 0.05$ . Las células crecidas en glucosa se tomaron como la condición control de referencia.

Como gen endógeno se usó a AGL9 (manosiltransferasa) con el cual se normalizó la expresión de ERV14 a través del método  $\Delta\Delta C_t$ . Los resultados de la expresión génica de ERV14 muestran que la galactosa y la rafinosa reprimieron la expresión de ERV14 al compararse con el resto de los carbohidratos. Esto llamo la atención ya que en los ensayos de gota se observó que el crecimiento de las levaduras es menor en estos dos azúcares por lo que surgió la duda de si la expresión de ERV14 está siendo reprimida por la falta de

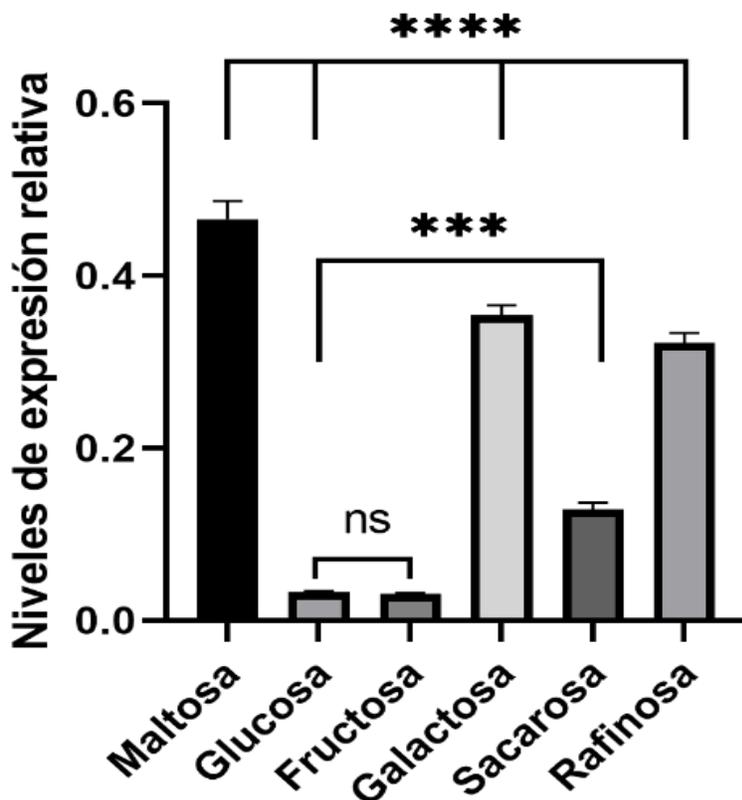
glucosa. Para responder esta pregunta se realizaron ensayos de RT-PCR tiempo real de células crecidas a diferentes porcentajes de glucosa (0, 0.015, 0.062, 0.125, 0.5 y 2) durante 5 h.



**Figura 16: La expresión de ERV14 es reprimida a bajas concentraciones de glucosa.**

Esta figura nos muestra los experimentos realizados en PCR en tiempo real, la expresión del gen *Erv14* a diferentes porcentajes de glucosa, se utilizó a *ALG9* como nuestro gen endógeno. La gráfica nos muestra que a bajas concentraciones de glucosa hay una disminución en la expresión del gen. Los valores son los promedios  $\pm$  ES de 3 réplicas técnicas. Una prueba *t*-test de muestras no pareadas se usó para determinar la diferencia significativa entre las muestras con un valor de  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.001$ ,  $***p < 0.0001$ . Las células crecidas en 2% de glucosa se tomaron como la condición control de referencia.

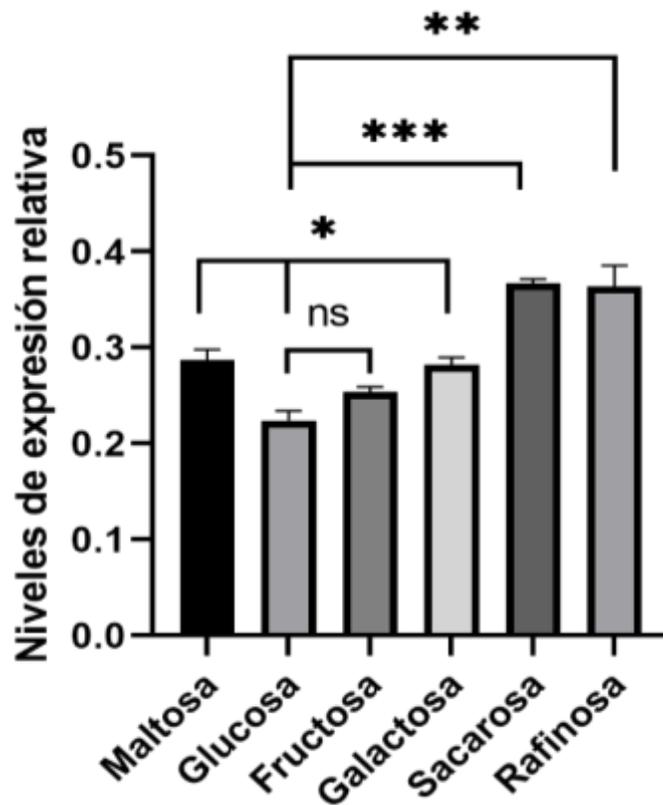
Los resultados mostraron que la expresión de ERV14 se reprime conforme se disminuyen los porcentajes de glucosa, a partir de %0.062 se observó una disminución significativa en el transcrito de ERV14. De igual forma el gen AGL9 se usó como gen endógeno para normalizar la expresión de ERV14 en todas las condiciones y el ADNc de células crecidas en 2% de glucosa se usó como la condición control de referencia.



**Figura 17: La expresión de HXT3 es inducida por maltosa, galactosa y rafinosa.**

Esta figura nos muestra la gráfica obtenida de los experimentos realizados en PCR en tiempo real, para saber qué fuente de carbono induce la expresión del transportador HXT3. La gráfica nos muestra que la maltosa, galactosa, sacarosa y rafinosa incrementan la expresión de HXT3. Los valores son los promedios  $\pm$  ES de 3 réplicas técnicas. Una prueba *t*-test de muestras no pareadas se usó para determinar la diferencia significativa entre las muestras con un valor de \*\*\*\* $p < 0.0001$  y \*\*\* $p < 0.0003$ . Entre glucosa y fructosa no hubo diferencia significativa (ns). Las células crecidas en glucosa se tomaron como la condición control de referencia.

Los resultados de la expresión génica del transportador HXT3, muestran que la maltosa, rafinosa y galactosa estimulan la expresión significativamente de este transportador, al compararse su expresión de células crecidas en glucosa. Esto llamó la atención, ya que en los ensayos de gota, el crecimiento del transportador HXT3 tiene un crecimiento adecuado en estos azúcares, esto sugiere que este transportador tiene preferencia hacia estos carbohidratos, lo que contribuye a un crecimiento adecuado en la levadura.



**Figura 18: La expresión de HXT5 es inducida significativamente por todos los azúcares excepto por fructosa.**

Esta figura nos muestra la gráfica obtenida de los experimentos realizados en PCR en tiempo real, para saber que fuente de carbono induce la expresión del transportador HXT5. La gráfica nos muestra que la sacarosa y la rafinosa inducen significativamente mayor la expresión del transportador HXT5, seguida por la maltosa y galactosa. Los valores son los promedios  $\pm$  ES de 3 réplicas técnicas. Una prueba *t*-test de muestras no pareadas se usó para determinar la diferencia significativa entre las muestras con un valor de \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.004$  y \*\*\* $p < 0.0002$ . Las células crecidas en glucosa se tomaron como la condición control de referencia.

Los resultados de la expresión génica del transportador HXT5 muestran que la rafinosa y sacarosa estimularon significativamente más la expresión del transportador Hxt5, al compararse con el resto de los carbohidratos. Sin embargo, todos estimulan la expresión de manera significativa del transportador HXT5, excepto la fructosa. Esto llamó la atención ya que en los ensayos de gota se observó que el crecimiento de las levaduras en maltosa, sacarosa y fructosa tiene un crecimiento adecuado, mientras que en galactosa y rafinosa el crecimiento de la levadura es menor.

## 7. DISCUSIÓN

La proteína Erv14 fue identificada inicialmente como un componente esencial de las vesículas de transporte COPII, localizándose en RE y AG. Posteriormente se observó que es necesaria para el transporte de un gran número de proteínas transmembrana. En *S. cerevisiae*, Erv14 se describió inicialmente como receptor de carga de la proteína de membrana plasmática Axl2p (Linero, 2016); estudios posteriores han revelado que es necesaria para la exportación del RE de numerosas proteínas transmembrana cuyo destino es la ruta secretora o la membrana plasmática, tales como son los transportadores de la familia HXT (Castillon *et al.*, 2009; Pagant *et al.*, 2015). En este estudio analizamos la participación que tiene Erv14 en la dependencia de la localización de los transportadores de hexosas Hxt3 y Hxt5 en la membrana plasmática. Como se muestra en la (Figura 8) la cepa EBY.VW.4000 (EBY) que se transformó con las construcciones pHXT5-GFP y pHXT3-GFP emitieron la fluorescencia de la GFP asociada a Hxt5 y Hxt3 en la membrana plasmática, por otro lado en la cepa EBY.VW.4000*erv14Δ* (EBY*erv14Δ*) (Figura8), la cual carece del gen ERV14, la localización de Hxt5 y Hxt3 cambio a lo que es el retículo endoplásmico, esto nos indica que Erv14 es esencial para que estos transportadores puedan llegar a su destino que es la membrana plasmática. En la fermentación alcohólica por *S. cerevisiae* la glucosa tiene una mayor tasa de consumo que la fructosa, como en la mayoría de las levaduras industriales usadas en vinicultura, quedando una alta discrepancia entre el consumo de las cantidades de las dos azúcares, por lo que la habilidad de la levadura para fermentar la fructosa es de importancia crítica para mantener la fermentación hasta el final del proceso (Guillaume *et al.*, 2007). Luyten *et al.* (2002) Encontraron que Hxt1 y Hxt3 tienen un papel importante en las condiciones enológicas debido a los altos contenidos de glucosa y fructosa, Hxt1 tiene una función importante durante el inicio de la fermentación,

mientras que Hxt3 es el único transportador que asegura el perfil normal de fermentación, además se expresa durante todas las fases y presuntivamente es responsable de la capacidad de algunas levaduras de consumir fructosa. Según (Llopis, 2016) a nivel molecular, la investigación ha confirmado los genes que codifican los transportadores de hexosas en la levadura. En condiciones enológicas hay numerosos genes implicados en el transporte de los azúcares, que está regulado por una amplia familia denominada HXT. Existen 18 genes HXT. Hxt1 y Hxt7 son los principales transportadores. Hxt2, Hxt6 y Hxt7 son portadores de elevada afinidad, mientras que Hxt1 y Hxt3 son transportadores de baja afinidad. Estudios recientes evidenciaron que el gen Hxt3 es, en efecto, responsable de la capacidad de algunas levaduras de consumir fructosa (Llopis, 2016). Como podemos observar en la (Figura 14) las transformaciones hechas con el transportador Hxt3 nos muestran que este transportador además de transportar glucosa y fructosa, también es capaz de transportar otros carbohidratos tales como la sacarosa, rafinosa y ligeramente la galactosa, pero también podemos observar que este transportador sigue teniendo preferencia a algunos carbohidratos, y en ellos se destaca a glucosa, fructosa y sacarosa. Cabe destacar que la presencia de Erv14 junto con Hxt3 permite un mejor crecimiento en todos los azúcares, que cuando carece de Erv14. El gen HXT5 codifica un transportador de hexosa funcional que tiene afinidad moderada por la glucosa ( $K_m = 10 \text{ mM}$ ), afinidad moderada baja por la fructosa ( $K_m = 40 \text{ mM}$ ) y baja afinidad por la manosa ( $K_m > 100 \text{ mM}$ ). La sola presencia de Hxt5 en un mutante nulo de transporte de hexosa es suficiente para mantener un flujo a través de la glucólisis desde la glucosa hasta los productos fermentativos. Sin embargo, la presencia de HXT5 como único gen transportador de hexosa da como resultado un crecimiento extremadamente deficiente en presencia de glucosa, lo que sugiere la participación de la represión de la glucosa en la regulación transcripcional de HXT5

(Diderich, *et al.*, 2001). En mamíferos El Glut-5 es un transportador específico para fructosa ( $K_m = 10-13$  mM) que se expresa fundamentalmente en la células del ribete en cepillo del intestino delgado donde media el paso de la fructosa desde el lumen a la célula epitelial intestinal (Bermúdez, *et al.*, 2007). En la Figura 14 las transformaciones hechas con el transportador Hxt5 nos muestran que este transportador además de transportar fructosa, también es capaz de transportar otros carbohidratos tales como glucosa, sacarosa, rafinosa y ligeramente galactosa, también podemos observar que este transportador sigue teniendo preferencia a algunos carbohidratos, y en ellos se destaca a glucosa, fructosa y sacarosa. Cabe destacar que la expresión de este transportador con la proteína Erv14 hay un mejor crecimiento en todos los azúcares, que cuando carece del gen ERV14. Los genes HXT también difieren en sus patrones de expresión, y son estrictamente regulados con respecto a su transporte cinético. La glucosa es el factor principal que controla la expresión de genes HXT. Los transportadores con alta o afinidad moderada como lo son HXT6, HXT7, HXT2 y HXT4: son inducidos por concentraciones bajas de glucosa y reprimidos por altas concentraciones de glucosa. Un transportador de baja afinidad, HXT1, es inducido por altas concentraciones de glucosa, mientras que el otro, HXT3, es sólo débilmente regulado por la concentración de glucosa. Adicionalmente, otros factores influyen en la expresión del gen HXT, incluyendo presión osmótica, hambre y el estado fisiológico de las células. La capacidad de transporte de los Hxt también se controla en a nivel postraduccional, ya que las proteínas pueden degradarse en la vacuola después de internalizarse a través de endocitosis. La fuente de carbono que induce la represión génica del gen ERV14 (Figura 15) es la galactosa y la rafinosa, y también se observó que a porcentajes bajos de glucosa (Figura 16), la expresión del gen ERV14 es reprimida. Al igual que la familia HXTs el factor principal que induce la expresión de este

gen es la glucosa. Para el transportador HXT3 la maltosa, la galactosa y la rafinosa son los azúcares que inducen la expresión de este transportador (Figura 17), cabe mencionar que la maltosa es un disacárido formado por dos glucosas, lo cual nos quiere decir que al igual que otras hexosas, la glucosa sigue siendo el principal factor para la expresión de este transportador. En la Figura 18 podemos observar que hay similitud en los valores de las diferentes fuentes de carbono, pero quien induce la expresión del transportador HXT5 es la sacarosa y la rafinosa, ambos carbohidratos están compuestos por una glucosa en su estructura, y por fructosa que como se mencionó anteriormente, este transportador es encargado de transportar a la fructosa.

## 8. CONCLUSIÓN

La proteína Erv14 es un receptor cargo que ayuda a distintas proteínas llegar a su destino para realizar su función correcta, gracias a que los transportadores HXT son cargo de esta proteína, se determinó que la proteína Erv14 es necesaria para que nuestros transportadores de interés HXT3 y HXT5 lleguen a la membrana plasmática, así estos transportadores se encargan de regular la captura de glucosa en *Sacharomyces cerevisiae*.

Gracias a las repeticiones realizadas en cada experimento determinamos que estos transportadores tienen comportamientos diferentes en distintos ambientes como, diferentes concentraciones de glucosa y diferentes densidades ópticas, gracias a más experimentos realizados se determinó que el transportador Hxt3-GFP a una densidad óptica de 0.025 no se localiza en vacuola, y bajas concentraciones de glucosa se localiza en estructuras internas con forma de esferas.

Mientras que el transportador Hxt5-GFP en las densidades 0.025 y 0.075 se localiza solamente en membrana plasmática y a diferentes concentraciones de glucosa se localiza en la membrana plasmática. También se determinó que Erv14 se localiza en la membrana plasmática a bajas concentraciones de glucosa.

Por medio de los ensayos de Drop Test, se determinó que los transportadores de hexosas HXT3 y HXT5 pueden transportar otras fuentes de carbono además de la glucosa.

El empleo del análisis de la expresión génica mediante PCR en tiempo real determinó que las fuentes de carbono que disminuyen significativamente la expresión de Erv14 son galactosa y rafinosa, y que la expresión de Erv14 es reprimida a bajas concentraciones de glucosa.

Se determinó que la expresión del transportador HXT3 es inducida por maltosa, galactosa y rafinosa. Y se determinó que la expresión del transportador HXT5 es inducida significativamente por todos los azúcares excepto por fructosa.

## **9. PERSPECTIVAS**

Se necesitan más estudios para profundizar en el papel que tiene Erv14 sobre la dependencia de los transportadores de hexosas HXT3 y HXT5 para llegar a la membrana plasmática, de igual manera se necesita saber si hay otros factores que cambien la localización de estos transportadores además de la densidad óptica y las diferentes concentraciones de glucosa. Se podría demostrar si existen más fuentes de carbono que estos transportadores puedan transportar.

## 10. REFERENCIAS

- Barlowe, C, K., & Miller, E. A. (2013). Secretory protein biogenesis and traffic in the early secretory pathway. *Genetics* 193: 383-410.
- Bermúdez, V., Bermúdez, F., Arraiz, N., Leal, E., Linares, S., Mengual, E & Carrillo, M. (2007). Biología molecular de los transportadores de glucosa: clasificación, estructura y distribución. *Archivos venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 26(2), 76-86.
- Bielli, A., Haney, C, J., Gabreski, G., Watkins, S, C., Bannykh, S, I, & Aridor, M. (2005). Regulation of Sar1 NH2 terminus by GTP binding and hydrolysis promotes membrane deformation to control COPII vesicle fission. *The Journal of cell biology* 171: 919-924.
- Boles, E., & Hollenberg, C. (1997). The molecular genetics of hexose transport in yeast. *FEMS Microbiology Reviews*, 21: 85-111.
- Bonifacino J, S, & Glick, B, S. (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* 116: 153-166
- Castillon, G, A., Watanabe, R., Taylor, M., Schwabe, T, M. & Riezman, H., (2009). Concentration of GPI anchored proteins upon ER exit in yeast. *Traffic* 10: 186-200.
- Castrejón, V., Carbo, R., & Martínez, M. (2007). Mecanismos moleculares que intervienen en el transporte de la glucosa. *REB*, 26(2), 49-57.
- Copic, A., Latham, C, F., Horlbeck, M, A., D'Arcangelo, J, G., & Miller, E, A. (2012). ER cargo properties specify a requirement for COPII coat rigidity mediated by Sec13p. *Science* 335: 1359-1362.

- Dancourt, J., & Barlowe, C. (2010). Protein sorting receptors in the early secretory pathway. *Annu Rev Biochem* 79: 777-802.
- De Robertis, D., Hib, J., & Ponzio, R. (2000). *Biología celular y molecular de De Robertis. El ateneo.*
- Diderich, J, A., Schepper, M., Van Hoek, P., Luttkik, M., Van Dijken, J., Pronk, J., & Kruckeberg, A. (1999). Glucose Uptake Kinetics and Transcription of HXT Genes in Chemostat Cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 274:15350–15359.
- Diderich, J, A., *et al.* (2001). Análisis funcional del homólogo del transportador de hexosa HXT5 en *Saccharomyces cerevisiae*. *Levadura* 18 (16): 1515-24.
- Dumont, A., Raynal, C., Raginel, F., Ortiz-Julien, A., Suarez, C., & Heras, J, M. (2008). Capacidad de las levaduras enológicas de consumir fructosa. *La semana vitivinícola*, 3237, 2502-2507.
- Guillaume, C., P. Delobel, J, M., Sablayrolles, B., & Blondin, B. (2007). Molecular basis of fructose utilization by the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a mutated HXT3 allele enhances fructose fermentation. *Appl Environ Microbiol.* 73(8):2432-2439.
- Hariri, H., Bhattacharya, N., Johnson, K., Noble, A, J., & Stagg, S, M. (2014). Insights into the mechanisms of membrane curvature and vesicle scission by the small GTPase Sar1 in the early secretory pathway. *J Mol Biol.* 426: 3811-3826.
- Lee, M, C., Miller, E, A., Goldberg, J., Orci, L., & Schekman, R. (2004). Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 87-123.
- Hariri, H., Bhattacharya, N., Johnson, K., Noble, A, J., & Stagg, S, M. (2014). Insights into the mechanisms of membrane curvature and vesicle scission by the small GTPase Sar1 in the early secretory pathway. *J Mol Biol.* 426: 3811-3826.

- Lee, M, C., Miller, E, A., Goldberg, J., Orci, L., & Schekman, R. (2004). Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 87-123.
- Linero, A, M, P. (2016). Papel de los receptores de carga en la organización funcional de la ruta secretora temprana (*Doctoral dissertation, Universidad de Sevilla*).
- Lodish, H. (2005). Biología celular y molecular. Ed (2). *Médica Panamericana*.
- Llopis-Torregrosa, V. (2016). Mecanismos de regulación de transportadores de iones y nutrientes a través de proteínas de tráfico relacionadas con las arrestinas. *Doctoral dissertation*.
- Luyten, K., Riou, C., & Blondin, B. (2002). The hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* play different roles during enological fermentation. *Yeast*, 19: 713–726.
- Maier, A., Völker, B., Boles, E., & Fuhrmann, G. (2002). Characterisation of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* with plasma membrane vesicles (countertransport) and intact cells (initial uptake) with single Hxt1, Hxt2, Hxt3, Hxt4, Hxt6, Hxt7 or Gal2 transporters. *FEMS Yeast Research* 2, 539-550.
- 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.
- Nakanishi, H., Suda, Y., & Neiman, A, M. (2007). Erv14 family cargo receptors are necessary for ER exit during sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of cell science*, 120(5), 908-916.
- Pagant, S, W, A., Edwards, S., Diehl, F., & Miller, E, A. (2015). Sec24 is a coincidence detector that simultaneously binds two signals to drive ER export. *Current biology*: CB 25: 403-412.

- Perdones, M, P, L. (2000). Inactivación del transportador de maltosa en levadura: mecanismos de su degradación (*Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid*).
- Pérez-Linero, A, M. (2016). *Papel de los receptores de carga en la organización funcional de la ruta secretora temprana*.
- Suárez-Machín, C., Garrido-Carralero, N. A., & Guevara-Rodríguez, C, A. (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. *Revisión bibliográfica. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 50(1), 20-28.
- Simes, A. (2018). *Estudio molecular y cinético de la captación de glucosa y fructosa por levaduras de la especie Saccharomyces cerevisiae aisladas de una bodega de la región del Añelo*.

Cuernavaca, Morelos a 17 de enero 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: **LINDA CECILIA MARTÍNEZ MORALES**, con el título del trabajo: **ERV14 REGULA LA CAPTURA DE GLUCOSA A TRAVÉS DE SU ASOCIACIÓN CON LOS TRANSPORTADORES DE HEXOSAS HXT3 Y HXT5.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para contar con el **voto de calidad** y pueda optar por la Modalidad de **Titulación Profesional por Etapas** como lo marca el artículo 33° 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. RAMÓN SUÁREZ RODRÍGUEZ

SECRETARIO: M. EN C. MARÍA LUISA BARROSO GARCÍA

VOCAL: DR. PAUL ROSAS SANTIAGO

SUPLENTE: M. EN C. PATRICIA MARTÍNEZ JAIMES

SUPLENTE: M. EN C. LAURA PATRICIA LINA GARCÍA

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

**PAUL ROSAS SANTIAGO | Fecha:2022-01-17 15:42:50 | Firmante**

cNIOfUU+GS2fu+v3ureNSsYXyZdqSzk2DUbOt8Jt9KJip3YtqXRo+0V1vn6WY/KeMP10CGvQdlz2rlxaEoqFIXysV3JSNZbQqFc9LNcJpr4n3yjGloKbePWanMcEhP/kJc4WsjLmcC  
VJIn/kNBW+VntemXlh2Xtb5aCiY/6cSh2iJ6trT98U2gxO+/Qm1EzRm9ziDUaycm3pQJnPxTdbobOFw9g0vGMGGQq3CYCtgvPRYm  
QbzUSRALU3Bf4wiVGTd1OWXqrNTnu+L  
QhGzzmK6pOTAdBsh24lvGkSO+kXBKXdAgI/rvceSrTods5bXzaWj/XArIr8HeeioXlpXyOyQ==

**RAMON SUAREZ RODRIGUEZ | Fecha:2022-01-17 15:56:41 | Firmante**

lhvN/HNvuhy0YSws5Y9PaUoOHgl/S2l8zH9rkMybf/uiLQfyeF+N/jvpaDVsfDos7kxdGaq3DDViuByPK1tLwllbBObVoV7KqKPo6lXtUlf  
UHEP0DKKE84yXy7ytYtnGFoYhBA2d8lQTiy  
P7tObvdqrhv0w5sb4RjyDrMabpQqpKRSDQBsBK4QLM6BPvKNLuDPw8BjDQ2o3sKBdOhmCHuMJ1NVvLQqsw6EDuPBWPkjsGqY  
+LmikdeMrG+wwAONC9QuJNi6gZpZYqd/  
34ZAwEGQPn7h1Q63QtAs9peZGr7Eb+wM+MEHeVbh6zFx3iqYIZ+3lgZdCabXdvK4g3DqR+Q==

**MARIA LUISA BARROSO GARCIA | Fecha:2022-01-17 20:08:00 | Firmante**

IsRF+5F0wivUvl61l8k2HKkXXxPVXW9BfdbYIOws0PPdx2maYaDWuZCPGXFHQXw6gE69qdWDV05bRi3bgBAjzqe4vboUU9TqKma  
b0jRzLRRf47Ly4hbY/q6mp+fEOMEpddTiN  
uw73S9lcAzyY0Z8HhRSeYkfWezxFKyGwKf6EI6TZdlwSEHDoHIGTuAl6NdS5BQM7IVSX17pAD0DjBmYUgu2hxB/nj+/ZN3FkXLpZQ  
S32l6t4qjeBr7QomBkrkGhwNoc0ZbzCBY  
RomTH0wAgmhYCPnDLpGDqt1QVvkF7h3r3BrvcGMLThiyI8u0G1B1y18HSusuGo/wf8p0d6E0Xg==

**PATRICIA MARTINEZ JAIMES | Fecha:2022-01-18 14:03:03 | Firmante**

cWZuUlmdtJM8/pK2+eWINzWdkZ5lZtBm/E+g8yFzXj1f5G9jnXaBjkhq9rLFImECjDUucbON+Q0JZOqu8EtHzgpJqYeyAICbNVHZQzr  
h31hKpXa/A5UE99rP9xRptZoYU+8IOZHh  
YPwDWgpKcHPuO6q0lCpuwmZ4Cgavd0yNLQqReginSo0nEqygbtjrz5UJCcPjNwMmq8EY7V4dAslHHxt/m3NqLs0mxM9ExSsseifB  
MK4tTeVvp+vNqZSpNtbYRQ4FxeV3UjviX  
Ld3FThNfqtya+GPed9kcJM7tCQSI+W3Sjf6UjzQ0h0xht9ZKzoo5Mqko3MAAdIKTRoq1+QRw==

**LAURA PATRICIA LINA GARCIA | Fecha:2022-01-20 14:19:51 | Firmante**

o6gJWSK1McBIV/zxzIzl7Nbnz0iCi6g2q6pTj2FZP1bs39KrZ224WCLefjupsW6qX6LphPERwfgBxzjNYvPjq19pmTs4+sQEawwuwMzV  
aMH54tGa4eHyD28z0mSfNMj1rm+DRDR  
php1NIsDEtqOvr0tuti4wQmaZ/u98y0a89Aver4U864K1Yth/kUaqxynwtM3vxuokz1qNVsX7eUDdnGJGR3/QMAZfQfkWHeDY0EOJoU/o  
qv1MtCtTeRvqLsQj0NwmQyK/OnzyY2ifdK M8LHxLPI4u6iZ0O+B50MJ6zrPRpXM7NZgZKJg1LzkrFFTo+dnVeWufpV1w0l+bacPw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección

electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



**P7AogvzJC**

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/EaMQsTR8QxO4Y870zc0c7QuY3Gbb5XeB>