



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ELUCIDACIÓN DE LA CONTRIBUCIÓN DE LA PROTEÍNA
ERV14 EN EL PROCESO DE AUTOFAGIA CELULAR

TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS

Que para obtener el título de

B I Ó L O G O

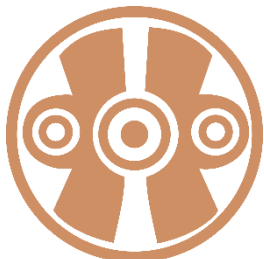
P R E S E N T A

Eréndira Soledad Huerta Quintero

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Paul Rosas Santiago

Cuernavaca, Morelos
Junio, 2021



DEDICATORIA

A mis padres, Norma y Rafael, por seguir brindándome su apoyo, guía, protección y amor, por impulsarme a ser mejor persona, ayudarme a lograr mis metas y sueños, por siempre creer en mí, pero sobre todo porque jamás me han soltado. Gracias a ustedes, mis maestros, por nunca dejarme de enseñar, los amo.

A mi hermano Rafael, por ser mi mayor fortaleza, también por ser mi mejor amigo y brindarme todo tu amor, consejos y protección, pero sobre todo porque nunca has dejado de creer en mí, estoy eternamente agradecida por el constante apoyo que me brindas. Hermano, muchas gracias, con admiración y respeto siempre seguiré tus pasos.

A mi familia Ramírez Quintero, por el inmenso amor y apoyo que me han brindado, no solo en el transcurso de mi carrera, sino que, desde toda la vida, porque con ustedes he pasado momentos de risa, angustia, valentía y diversión. Gracias por hacerme parte de ustedes e integrarme en su familia, con cariño, amor y respeto su hija y hermana Sol.

A mi familia Quintero, por confiar y creer en mí, por su amor y apoyo en cada etapa de mi vida académica, gracias por seguir brindándome su amor, consejos, atención y cuidado, por cada charla y palabra de aliento, también gracias a ustedes he logrado culminar mi carrera profesional.

A mi pareja Moisés Torres, desde un principio y aún sin conocerme tan bien nunca dudaste de mi capacidad para lograr mis metas y desde el inicio de este gran proyecto has estado a mi lado escuchándome y apoyándome, gracias por confiar en mí y por tus palabras de aliento para poder culminar este gran proyecto.

A mis amigas Linda Martínez y Nayeli Roldan, por estar juntas desde el primer día de clases en la carrera y ser parte de este gran trayecto académico, por siempre escucharme y aconsejarme, compartimos momentos inolvidables de felicidad y tristeza, la universidad sin su amistad no hubiera sido el mismo recorrido, gracias por su amistad tan bella y sincera.

RECONOCIMIENTOS

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) de la UNAM IA200619.

AGRADECIMIENTOS

A mi Universidad Autónoma del Estado de Morelos por abrirme las puertas de la institución y brindarme la oportunidad de convertirme en profesional.

A la Facultad de Ciencias Biológicas por proporcionarme las bases elementales para forjar mi camino académico y la formación que me han otorgado.

A mi asesor, Doctor Paul Rosas Santiago, por su gran apoyo, dedicación, paciencia y guía desde principio a fin para llevar a cabo este gran proyecto, así como su confianza, consejos y amistad.

Mis sinodales, quienes estuvieron al tanto de los avances de mi investigación, por sus consejos, enseñanzas y conocimiento que me compartieron para desarrollar y culminar mi proyecto.

A todos mis profesores de la carrera que me brindaron enseñanza, estrategias y conocimiento, siendo parte de mi formación como bióloga.

JURADO ASIGNADO

Presidente: DRA. MARÍA DEL RAYO SÁNCHEZ CARBENTE

Secretario: M. EN C. MARÍA LUISA BARROSO GARCÍA

1° Vocal: DR. PAUL ROSAS SANTIAGO

2° Vocal: M. EN C. LAURA PATRICIA LINA GARCÍA

3° Vocal: M. EN C. PATRICIA MARTÍNEZ JAIMES

Esta tesis se realizó en el Laboratorio del Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología, UNAM, Campus Cuernavaca, Morelos.

Director de tesis:

DR. PAUL ROSAS SANTIAGO

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN.....	2
II.	ANTECEDENTES.....	5
III.	AUTOFAGIA CELULAR.....	7
1.	Tipos de autofagia.....	8
2.	Proceso de autofagia.....	10
IV.	RUTA SECRETORA.....	13
1.	Ruta secretora temprana.....	13
2.	Movimiento bidireccional de la ruta secretora.....	14
V.	TRÁFICO VESICULAR.....	15
1.	Estructura y ensamblaje de las vesículas de transporte COPII.....	16
VI.	PROTEÍNA ERV14.....	18
1.	Interacción entre la proteína Erv14 y las vesículas COPII.....	19
2.	Erv14 y la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
VII.	ORGANISMO MODELO.....	20
1.	Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
VIII.	JUSTIFICACIÓN.....	22
IX.	HIPÓTESIS.....	22
X.	OBJETIVO GENERAL.....	22

XI.	OBJETIVO PARTICULAR	22
XII.	METODOLOGÍA.....	23
1.	Ensayo de fosfatasa alcalina Pho8Δ60	25
2.	Cuantificación de proteínas	26
3.	Curvas de calibración	27
	Elaboración de curvas de calibración para determinar concentración de proteínas y nitrofenol	27
3.1.	Curva de calibración correspondiente a la medición de proteína.....	27
3.2.	Curva de calibración de Nitrofenol, respectivo al ensayo de fosfatasa alcalina Pho8Δ60.	29
XIII.	RESULTADOS.....	32
1.	Recopilación de datos de la extracción de proteína.....	32
2.	Recopilación de datos del ensayo de fosfatasa alcalina Pho8Δ60.....	33
3.	Agrupación de las cifras obtenidas a partir de los ensayos: Cuantificación de proteínas y Fosfatasa alcalina Pho8Δ60.	34
4.	Pruebas estadísticas: Obtención de promedios y desviación estándar	34
4.1.	Hipótesis planteadas.....	35
4.2.	Prueba <i>t</i> -student.....	36
XIV.	DISCUSIÓN	40
XV.	CONCLUSIONES.....	48

XVI.	ANEXO A.....	50
1.	Medios líquidos requeridos para el monitoreo de la autofagia en levaduras: Ensayo fosfatasa alcalina Pho8Δ60.....	50
XVII.	ANEXO B.....	51
1.	Monitoreo de la autofagia en levaduras: Ensayo fosfatasa alcalina, Pho8Δ60.	51
XVIII.	Anexo C.....	54
1.	Obtención de datos de los ensayos: Cuantificación de proteínas y ensayo de fosfatasa alcalina Pho8Δ60.....	54
1.1.	Obtención de la concentración de proteínas.....	54
1.2.	Obtención del ensayo de fosfatasa alcalina-Pho8Δ60.....	57
XIX.	BIBLIOGRAFÍA:	60
XX.	REFERENCIAS FIGURAS:	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Tipos de autofagia: Macroautofagia, Microautofagia y Autofagia mediada por chaperonas (Mizushima et al., 2008).....	10
Figura 2: Proceso autofágico (InvivoGen, 2017).	12
Figura 3: Vías de transporte de la ruta secretora.	14
Figura 4: Revestimiento, formación y estructura de las vesículas COPII (Sato y Nakano, 2007).	17
Figura 5: Curva de calibración de la cuantificación de proteínas.....	28
Figura 6: Reacción de p-nitrofenilfosfato con la fosfatasa alcalina	29
Figura 7: Concentración de nmol de nitrofenol.....	31
Figura 8: Actividad autofágica de la cepa TN124WT.....	36
Figura 9: Actividad autofágica de la cepa TN124Erv14Δ.....	37
Figura 10: Actividad autofágica de las cepas TN124WT y TN124erv14Δ.....	38
Figura 11: Proceso de activación de Pho8Δ60	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Distribución de medios de crecimiento para las cepas TN124WT y TN124 <i>Erv14Δ</i>	25
Tabla 2: Concentración $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de albumina y su absorbancia a 595nm	28
Tabla 3: Concentración de Nitrofenol y su absorbancia medida a 400nm	30
Tabla 4: Nanomoles de nitrofenol x minuto x miligramo de proteína.	34
Tabla 5: Promedios y desviaciones estándar, valor de probabilidad: 0.05.....	35

RESUMEN

La autofagia celular es un proceso en el cual se degrada y recicla material intracelular dañado que se activa en ciertas condiciones de estrés. Una de estas es cuando hay inanición celular, es decir ausencia de nutrientes tales como la glucosa y el nitrógeno con la finalidad de permitir la sobrevivencia de la célula. La metodología del presente trabajo fue evaluar la actividad autofágica mediante el ensayo de fosfatasa alcalina Pho8 Δ 60 en células de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en ausencia de nitrógeno y glucosa, con el objetivo de identificar la Además, se indagó la contribución de la proteína Erv14 en este proceso celular, la cual participa como receptor de proteínas cargo en el tráfico vesicular y forma parte de las vesículas COPII que recientemente se han identificado que contribuyen a la formación del autofagosoma. Los resultados mostraron que la ausencia de Erv14 en las células de levadura resulta en una respuesta menor de la autofagia activada por la falta de nitrógeno. Este resultado permite suponer que la proteína Erv14 contribuye de alguna forma en la activación de la autofagia solo bajo ausencia de nitrógeno. Estos hallazgos abonan información adicional sobre la participación de este tipo de receptores en el tráfico vesicular en donde la autofagia juega un papel importante para mantener la homeostasis celular.

I. INTRODUCCIÓN

El significado de la palabra autofagia deriva del griego “auto” “phagein” que significa “comerse a sí mismo” (Sangedo et al., 2016). La autofagia es un proceso dinámico, programado y fisiológico que ocurre en todas las células eucariotas para la supervivencia celular, se activa como respuesta a la privatización de nutrientes como la glucosa, oxígeno, nitrógeno y aminoácidos, los cuales son factores de crecimiento y a esto se le conoce como estrés celular (Kraft et al., 2017). La autofagia es un proceso intracelular responsable de la degradación y reciclaje de los componentes citoplasmáticos, elimina de forma selectiva el material celular dañino y permite que la célula sobreviva a la deprivación de nutrientes, mediante la movilización de nutrientes a través de la degradación masiva de los componentes citoplasmáticos. Si bien la investigación de las últimas décadas ha llevado al descubrimiento de los factores clave involucrados en la autofagia, la vía aún no se comprende completamente (Torggler et al., 2017). El mecanismo de autofagia celular es la base de estudio para el presente proyecto, el cual se lleva a cabo en células eucariotas y para la investigación a desarrollar usaremos como modelo de estudio a la levadura *S. cerevisiae*. Los primeros estudios de autofagia a nivel molecular se realizaron en la levadura *S. cerevisiae*. Sobre la base de estos estudios, se han encontrado muchos homólogos en eucariotas superiores (Torggler et al., 2017).

Además, en las células eucariotas se da un mecanismo llamado tráfico vesicular, el cual consiste en el transporte de proteínas entre los orgánulos que la conforman, el tránsito de proteínas es vital para mantener las funciones celulares. De manera secuencial, la fabricación de proteínas comienza desde su transcripción en el núcleo de la célula para llevar a cabo su

posterior traducción en los ribosomas y desplazarse en el citoplasma de la célula. La mayoría de las proteínas parten hacia su próximo destino como proteínas de carga en vesículas lipídicas, para empaquetarse en vesículas, muchas de ellas requieren un "receptor de carga", que reconoce y retiene proteínas de carga específicas en las vesículas (Linero, 2016). El tráfico vesicular consiste en la vía retrograda y anterógrada en la que se forman las vesículas COPII y por otro lado en la activación de la autofagia, se forman las vesículas denominadas autofagosomas. La conexión entre ambas vesículas reside en que los autofagosomas, para formarse, necesitan de un donador de membrana entre los que se propone organelos como la mitocondria, el aparato de Golgi, la membrana plasmática. Recientemente se ha identificado que las vesículas tipo COPII son también donadores de membrana para formar al autofagosoma (Boya et al., 2018).

Los autofagosomas y las vesículas COPII, son estructuras compuestas de diversas proteínas que comparten a la proteína Erv14 la cual es un receptor de proteínas cargo de las proteínas Ax12, la cual fue inicialmente identificada en *Drosophila melanogaster* (Cornichon/Cni) (Powers y Barlowe, 1998). Erv14 pertenece a la familia Cornichon (Cni/Erv14) cuyos miembros son proteínas transmembranales, a las cuales se les otorga un papel importante en la exportación eficaz de numerosas proteínas y material celular en la ruta RE-Golgi (retículo endoplásmico y aparato de Golgi) de distintos organismos (Pagant et al., 2015).

En las células de levadura se activa el proceso de autofagia que da lugar a la formación de vesículas de doble membrana denominadas autofagosomas, los cuales se dirigen hacia la vacuola para degradarse. En la presente investigación se intentará dar respuesta a la

participación que tiene la proteína Erv14 dentro de la célula eucariota durante la formación y estructura de los autofagosomas, justo cuando se activa el proceso de autofagia celular a través de varias técnicas (Boya et al., 2018). Para cuantificar si ERV14 participa en la autofagia, se mutó este gen en la cepa TN124 mediante la tecnología de Cre-loxP, trabajo que realizó el Dr. Paul Rosas. Por lo tanto, se usaron dos tipos de cepas TN124-WT (tipo silvestre) y la mutante en ERV14 nombrada TN124*erv14Δ*.

II. ANTECEDENTES

Las primeras investigaciones enfocadas en el mecanismo de autofagia celular tuvieron lugar en el año de 1955 por el científico, citólogo y bioquímico inglés Christian de Duve, puesto que en 1963 postuló el nombre a la sucesión de autofagia celular y fue galardonado con el premio Nobel de fisiología y medicina en 1974 (Giraldez, 2017). Una de sus aportaciones más importantes fue la descripción de los lisosomas en células eucariotas, estos son orgánulos implicados en varios procesos celulares, uno de ellos es la degradación celular, dado que permite reutilizar restos celulares y que sean reciclados o expulsados por las células (Giraldez, 2017). En la década de 1990, el biólogo japonés Yoshinori Ohsumi del Instituto Tecnológico de Japón llevó a cabo la primera investigación de la autofagia a nivel molecular en la levadura *S. cerevisiae*, descubrió 15 genes relacionados con la autofagia, reguladores este proceso (Boya, 2017; Torggler et al., 2017). Hasta el momento se han descrito más de 40 proteínas Atg implicadas en diferentes pasos de las vías autofágicas. Se requiere un conjunto de proteínas Atg, comúnmente conocidas como maquinaria autofágica central, para la autofagia selectiva y en masa, mientras que otras proteínas Atg son específicas para cualquier tipo. Para muchas proteínas de autofagia de levadura, se han identificado homólogos en eucariotas superiores y se ha encontrado que se conservan muchos mecanismos durante la vía autofágica (Torggler et al., 2017).

La proteína Erv14 de *S. cerevisiae* ha sido propuesta como el receptor de proteínas cargo específico para el transporte efectivo de distintas proteínas de membrana (Powers y Barlowe, 1998, 2002; Rosas-Santiago et al., 2016).

Erv 14/ Cornichon ha sido identificado en la planta de la especie *Arabidopsis thaliana* y también en algunos estudios de los homólogos a Cni/Erv14 en la planta del arroz (*Oryza sativa*). Erv14 está involucrada en la formación de vesículas COPII como receptor para la incorporación de la carga en el transporte mediado por vesículas del RE al aparato de Golgi en levaduras, en los últimos años se ha descrito que Erv14 reconoce dominios transmembrana largos en sus proteínas carga, independientemente de su secuencia. Erv14 podría estar actuando como chaperona de estos dominios transmembrana al inicio de la ruta secretora, además de como adaptador de la cubierta COPII (Herzig et al., 2012). Las vesículas COPII contribuyen a la formación de los autofagosomas, por tanto, estas pueden participar en el proceso de autofagia. Para ello se decidió cuantificar la macroautofagia a través de medir la actividad de fosfatasa de la línea Pho8 Δ 60 en la cepa TN124 (obsequiada por el Dr. Daniel Klionsky del Instituto de ciencias de la vida en Ann Arbor Michigan U.S.A), El enfoque que tendrá esta investigación es la medición del flujo autofágico para determinar la participación de la proteína Erv14 en el proceso de autofagia a través del marcador Pho8 Δ 60, este tipo de medición es fundamental para comprender la regulación de este mecanismo. El ensayo Pho8 Δ 60 emplea un ensayo enzimático sensible, que proporciona una alta relación señal/ruido, lo cual permite una cuantificación precisa del flujo autofágico en levaduras (Noda y Klionsky, 2008). Pho8, fosfatasa alcalina, es una enzima de la vacuola que es entregada a la membrana a través de la vía secretora, el ensayo utiliza una versión genéticamente modificada de Pho8 que carece del dominio transmembranal N-terminal lo que permite su translocación al retículo endoplásmico. En consecuencia, Pho8 Δ 60 permanece en el citosol y se entrega a la vacuola solo mediante autofagia (Noda y Klionsky, 2008).

III. AUTOFAGIA CELULAR

La macroautofagia o también denominada autofagia, es una vía de degradación y reciclaje intracelular muy conservada entre los eucariotas. Durante la autofagia, el material celular es engullido por una membrana de aislamiento que da como resultado la formación de una vesícula de doble membrana, el autofagosoma. La membrana autofagosómica externa se fusiona con un compartimento lítico, como el lisosoma en mamíferos y la vacuola en levaduras y plantas liberando a la vesícula interna en el lumen del compartimento lítico. La vesícula interna, ahora denominada cuerpo autofágico y su contenido son degradados por las hidrolasas residentes, y los catabolitos se exportan al citoplasma y se reciclan (Torggler et al., 2017). La autofagia asegura la homeostasis y la función celular degradando selectivamente los componentes citoplasmáticos dañados, incluidos los orgánulos completos y los grandes agregados de proteínas (Sangedo et al., 2016; Torggler et al., 2017). La autofagia degrada material citoplasmático aleatorio para movilizar nutrientes en condiciones de estrés como la inanición, la autofagia no solo es necesaria para la homeostasis celular, sino también para la supervivencia celular durante la privación de nutrientes (Torggler et al., 2017). El autofagosoma está estructurado por una doble membrana fosfolipídica que contiene diversas proteínas, entre ellas las ATG (genes relacionados con la autofagia), familia de proteínas que diferencian al autofagosoma. La identificación de proteínas ATG permitió visualizar su colaboración en el secuestro de los componentes celulares mediante la formación, elongación y cierre del autofagosoma, posteriormente el autofagosoma se degrada en el lisosoma o vacuola para la levadura (Alegre, 2014).

Gran parte del proceso de la autofagia es mediado por las proteínas de la familia ATG, las cuales se adhieren a las proteínas y orgánulos dañados, marcándolas para la formación de fagóforos (vesículas de doble membrana que contienen el material a reciclar). Algunos miembros de la familia se unen a los fagóforos, comenzando su maduración y fusión con el lisosoma o vacuola para formar el autofagosoma, esta fusión permite que las enzimas lisosomales se ocupen de la degradación enzimática de los sustratos, cuyos productos son exportados al citoplasma para su reutilización (Sangedo et al., 2016; Costas y Rubio, 2017).

1. Tipos de autofagia

Estos son los tres tipos principales de autofagia en células eucariotas: la microautofagia, la autofagia mediada por chaperonas y la macroautofagia, son morfológicamente diferentes, pero todos terminan en el transporte de sustancias a los lisosomas/vacuola para su degradación y reciclaje, estos están esquematizados en la figura dos.

- **Microautofagia:**

En este tipo de autofagia, el contenido citoplasmático es reciclado y degradado e introducido al lisosoma/vacuola a través de invaginaciones que produce la membrana de dicho orgánulo. Este proceso degrada proteínas citosólicas, tanto de manera selectiva como no selectiva, las invaginaciones dejan expuesto el material citosólico secuestrado a disposición de enzimas del lisosoma y de la vacuola, que lo degradan (Marqués, 2018).

- Autofagia mediada por chaperonas:

Degradación selectiva por proteínas que seleccionan cargas únicas y contienen motivos reconocidos por chaperonas para su posterior degradación. Para este tipo de autofagia que solo ha sido reportada para células de mamíferos y esta mediada por chaperonas, se difiere de las otras dos formas mencionadas, en que no hay participación de tráfico de vesículas (Aranquiz et al., 2006). Se degradan proteínas citosólicas, que son directamente enviadas al lisosoma. La autofagia mediada por chaperonas solo degrada proteínas solubles que llevan un motivo peptídico KFERQ (Marqués, 2018), el cual es reconocido por proteínas chaperonas, para luego ser transportadas a los lisosomas. La proteína sustrato y las chaperonas se unen a la membrana lisosomal a través del receptor LAMP2a. Luego la proteína sustrato se despliega y es empujada hacia el lumen del lisosoma para su degradación (Aranquiz et al., 2006).

- Macroautofagia:

Es una vía que consiste en la degradación de proteínas y material citoplasmático dañado y se induce bajo condiciones de privación de nutrientes y estrés celular. Este tipo de autofagia conlleva varios pasos, y está coordinado por vesículas de doble membrana, denominadas autofagosomas, que posteriormente se fusionan con lisosomas o vacuola (Aranquiz et al., 2006).

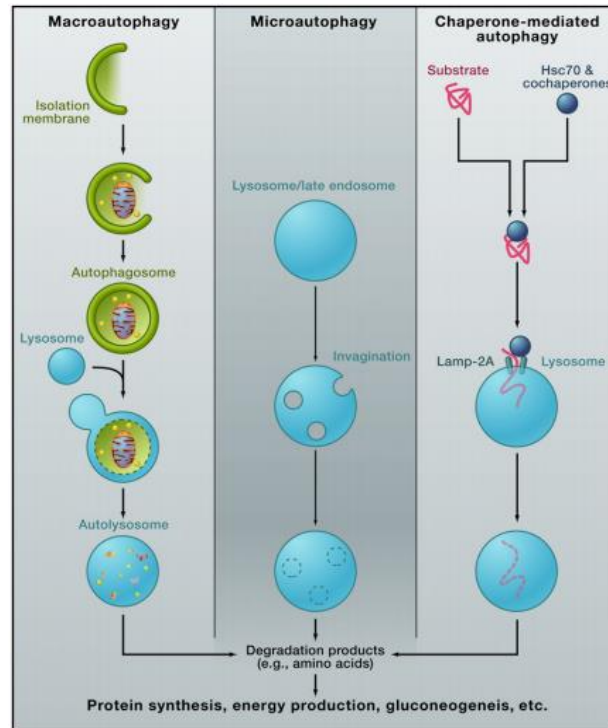


Figura 1: Tipos de autofagia: Macroautofagia, Microautofagia y Autofagia mediada por chaperonas (Mizushima et al., 2008).

2. Proceso de autofagia

El mecanismo de la autofagia incluye distintos elementos y se lleva a cabo en fases: 1. Nucleación, 2. Elongación del fagóforo, 3. Formación del autofagosoma, 4. Fusión, 5. Degradación y Reciclaje. Cuando la célula es sometida a un estrés, como la ausencia de nutrientes se activa el mecanismo de la autofagia.

La nucleación, está regulada por dos vías de señalización: la vía de la AMPK (proteína quinasa dependiente de adenosina monofosfato y la de mTORC1 (complejo formado por 5 proteínas: mTOR, Raptor (regulatory-associated protein of mTOR), mLST8 (proteína letal 8 de mamíferos con SEC13), PRAS 40 (substrato de 40 kDa de Akt rico en prolina) y DEPTOR), cuya regulación depende de la relación AMP/ATP. Este complejo y las proteínas río abajo se regulan por fosforilación/desfosforilación y de esta manera activan a las proteínas encargadas de la iniciación del proceso, y simultáneamente regulan la actividad del complejo quinasa-quinasa ULK, compuesto por ULK1/ULK2 (proteínas quinasa tipo uridina 1 y 2) (Costas y Rubio, 2017).

Al comienzo del proceso, primero la quinasa ULK1 activa por fosforilación a la proteína Beclin1 (también conocida como ATG6) que forma parte del complejo iniciador de la elongación del fagóforo, iniciando la segunda fase llamada elongación del fagóforo. Consecutivamente se crea el complejo PIP3 (3-fosfatidilinositol fosfato), esencial para el reclutamiento de otras proteínas ATG sobre las dobles membranas que provienen del retículo endoplásmico, el complejo de Golgi y las mitocondrias (Costas y Rubio, 2017; Boya et al., 2018). Seguidamente la formación del autofagosoma y la expansión de la doble membrana lipídica se produce por la interacción del fagóforo con el complejo proteico ATG5/ATG12, esta conjugación requiere de la acción enzimática de ATG7 y ATG10. Finalmente, la unión de ATG16 al complejo ATG5/ATG12 produce su multimerización y formación del complejo que permite la inserción de la forma II de LC3 (microtubule-associated protein light chain 3, también conocida como ATG8) en la membrana del fagóforo.

Cabe señalar que la proteína LC3 se sintetiza como pro-LC3, la cual es seleccionada por ATG4, generando la forma activa LC3-I en el citosol y a su vez, al LC3-I se incorporan lípidos por la acción de ATG7 y ATG3 que catalizan su unión a los residuos de fosfatidiletanolamina presentes en la membrana del fagóforo. La unión de LC3-II al fagóforo se requiere para el cierre de la vesícula luego de la captación de los sustratos a procesar y así dar origen al autofagosoma. Posteriormente, el complejo ATG5/ATG12/ATG16 y el LC3-II se liberan para formar el autofagosoma. Atg9, permite que la membrana autofagosomal se alargue y se cierre para formar el autofagosoma maduro (Costas y Rubio, 2017). La cuarta fase se da cuando el autofagosoma se fusiona con los lisosomas o vacuola, esta fase está regulada por la acción de Rab7, Lamp1 y Lamp2, importantes para la maduración del autofagosoma. Finalmente, los sustratos se degradan por la acción de las enzimas vacuolares o lisosomales y los productos de la reacción se liberan al citoplasma para su futura reutilización y así es como se concluye con la última fase que es el reciclaje (Costas y Rubio, 2017; Boya et al., 2018).

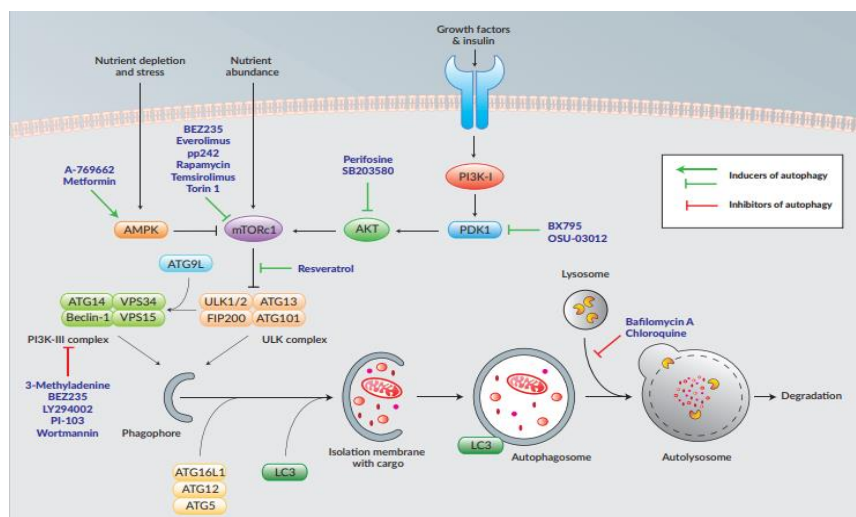


Figura 2: Proceso autofágico (InvivoGen, 2017).

IV. RUTA SECRETORA

Las células eucariotas elaboran diferentes funciones para mantenerse vivas como la producción de energía, síntesis de productos, degradación de desechos, exportación e importación de productos a distintos organelos que las componen, y poseen un sistema de endomembranas que compone la ruta secretora. La ruta es responsable del transporte de una enorme cantidad de proteínas y lípidos a sus destinos funcionales, es esencial tanto para el funcionamiento de la célula como para el desarrollo pluricelular (Lee et al., 2004; Linero, 2016). Para efectuar todo esto, la célula necesita que sus orgánulos estén comunicados entre sí mediante vías y transportadores (Alberts et al., 2016). Este mecanismo permite que las proteínas solubles y las de membrana sean sintetizadas en el retículo endoplasmático (RE), y moverse hacia su destino final a través de la vía secretora (Lodish et al., 2005).

1. Ruta secretora temprana

La ruta secretora temprana comprende el tráfico vesicular entre el retículo endoplásmico (RE) y el aparato de Golgi. El movimiento bidireccional 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, el transporte retrógrado se dirige desde el aparato de Golgi al retículo endoplásmico. Se mantienen los niveles requeridos de proteínas endógenas en el retículo, evita que proteínas mal plegadas avancen por la ruta secretora y recicla los factores necesarios para futuras rondas de transporte anterógrado (Lee et al., 2004; Linero, 2016).

2. Movimiento bidireccional de la ruta secretora

El movimiento bidireccional dentro de la ruta secretora consiste en la conexión de todos los orgánulos celulares; enfocaremos nuestra atención en la vía anterógrada, esta se efectúa desde el retículo endoplásmico (RE) hacia el aparato de Golgi, esta es una vía exportadora que libera moléculas producidas por la célula hacia el exterior, este proceso se da mediante la formación de vesículas de transporte denominadas COPII, mientras que la vía retrógrada exporta partículas desde el complejo de Golgi hacia el retículo endoplásmico (RE) y se da la formación de vesículas COPI (Fig. 3) (Becker et al., 2007; Linero, 2016).

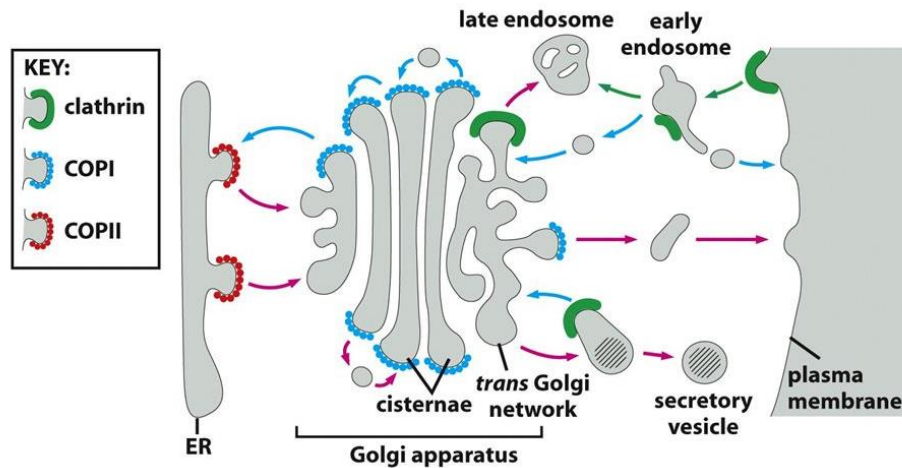


Figura 3: Vías de transporte de la ruta secretora.

En esta figura se muestran en color rojo las proteínas de cubierta COPII que median el transporte desde el retículo endoplásmico al compartimento intermedio (ERGIC). En azul, las cubiertas COPI, son las responsables del transporte retrógrado intra-Golgi y Golgi-retículo. En verde, las vesículas con cubiertas de clatrina, responsables del transporte post-Golgi (Bonifacino y Glick, 2004).

V. TRÁFICO VESICULAR

Es un proceso de comunicación entre orgánulos y se lleva a cabo mediante vesículas, estas son las encargadas de transportar moléculas, principalmente proteínas en su interior o incluidas en sus membranas (Megias et al., 2007). Es decir que el transporte de proteínas de membrana y las solubles se efectúa desde un compartimento delimitado por membrana hasta otro, y es mediado por vesículas de transporte que recogen las proteínas “carga” en brotes que surgen desde la membrana de un compartimento y posteriormente entregan estas proteínas carga al próximo compartimento mediante la fusión con la membrana (Lodish et al., 2005). A lo largo de la ruta secretora, las moléculas viajan en vesículas lipídicas, desde un compartimento donador y se fusionan con un compartimento receptor o aceptor. Este tipo de transporte recibe por ello el nombre de transporte vesicular (Bonifacino y Glick, 2004). Es este un proceso extraordinariamente complejo, debido a su alto dinamismo, junto a la gran cantidad y variedad de sustratos a transportar (Lineró, 2016). El tráfico vesicular que se establece entre los diferentes compartimentos de la ruta secretora posee una naturaleza bidireccional, a su vez es esencial para el correcto funcionamiento de la propia ruta (Lee et al., 2004; Linero, 2016). Asimismo, no sólo se mantiene la identidad estructural y funcional de los orgánulos membranosos, sino que también se garantiza que actúen de forma coordinada. Con ello, se consigue conservar la homeostasis celular y cerciorar la comunicación de la célula con su entorno, regulando tanto la presencia de proteínas y lípidos en la membrana plasmática, como la secreción de moléculas al espacio extracelular (Bonifacino y Glick, 2004; Linero, 2016).

1. Estructura y ensamblaje de las vesículas de transporte COPII

El ensamblaje de la cubierta COPII en la membrana del ERES (sitios de salida del ER (Retículo endoplásmico) (ERES “ER exit sites”) esquematizado en la figura 4, inicia con el reclutamiento y activación de la proteína G pequeña Sar1, a través del intercambio de GDP por GTP, catalizado por GEF o Sec12 intercambiador de nucleótidos de guanina, una proteína integral de membrana del RE (retículo endoplásmico) que actúa como GEF de Sar1. La forma activa de Sar1 despliega una α -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 tiene actividad GAP sobre Sar1 (Linero, 2016). Una vez formado, el complejo cebador o “prebudding complex” (Sar1-Sec23-Sec24-molécula carga transmembrana) 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 vuelve 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 los complejos cebadores, y por tanto para promover la polimerización eficiente de la cubierta y la formación de la vesícula (Sato y Nakano, 2007; Linero, 2016).

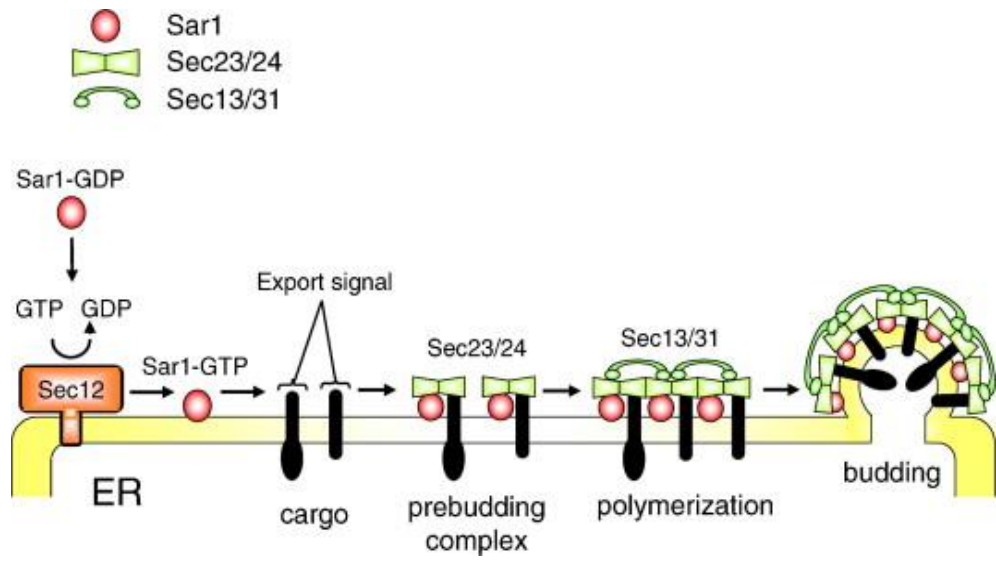


Figura 4: Revestimiento, formación y estructura de las vesículas COPII (Sato y Nakano, 2007).

VI. PROTEÍNA ERV14

El enfoque de este proyecto va dirigido hacia un tipo de proteína receptor cargo, localizada en el retículo endoplásmico y aparato de Golgi, denominada Erv14, la cual es una proteína de membrana (Powers y Barlowe, 2002), que posee tres segmentos que atraviesan la membrana (Powers y Barlowe, 2002). Erv14 pertenece a una familia muy conservada de proteínas, siendo sus homólogos en eucariotas superiores las proteínas de la familia cornichon. El miembro mejor caracterizado de esta familia es la proteína Cni de *D. melanogaster*, necesaria para la exportación desde el retículo endoplásmico (RE) de proteínas de la familia TGF α (factor de crecimiento transformante α) (Castro et al, 2007). Inicialmente Erv14 fue identificada en levaduras *S. cerevisiae*, como un componente fundamental y altamente representada en las vesículas de transporte COPII, que se localizan en el retículo endoplásmico (RE) y el complejo de Golgi. Posteriormente se observó que es necesaria para el transporte de un gran número de proteínas transmembrana. Erv14 es una proteína hidrofóbica pequeña, con tres segmentos transmembrana, un dominio citosólico N-terminal y un dominio luminal C-terminal (Castillon et al., 2009; Herzig et al., 2012; Powers & Barlowe, 1998; Powers & Barlowe, 2002; Linero, 2016).

1. Interacción entre la proteína Erv14 y las vesículas COPII

Erv14 es una proteína derivada de las recubiertas COPII que se movilizan entre los orgánulos: retículo endoplásmico y aparato de Golgi, al ser parte de estas vesículas tiene como función seleccionar a otras proteínas de membrana para empaquetarlas y transportarlas a través de la ruta secretora (Powers y Barlowe, 1998). Erv14 sirve como un adaptador que une una proteína secretora de membrana integral a la cubierta de la vesícula COPII (Powers y Barlowe, 2002). En el retículo endoplasmático, Erv14 interactúa físicamente con los componentes de COPII, así como con su proteína de carga Axl2p (Powers y Barlowe, 2002).

2. Erv14 y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*

En la levadura *S. cerevisiae*, Erv14 se describió primeramente como receptor de carga de la proteína de membrana plasmática Axl2 y estudios posteriores han puesto en manifiesto que es necesaria para la exportación de numerosas proteínas transmembrana del retículo endoplásmico cuyo destino es la ruta secretora tardía o la membrana plasmática (Powers & Barlowe, 1998; Powers & Barlowe, 2002; Castillon et al., 2009; Herzig et al., 2012; Sacristan et al., 2013; Pagant et al., 2015; Linero, 2016). En el arroz se demostró que Cornichon/Erv14 es necesario para que un transportador altamente selectivo a iones de sodio se pueda establecer de manera correcta en la membrana del aparato de Golgi (Rosas-Santiago et al., 2015). En esta tesis se buscó identificar el papel que juega dicha proteína para la formación de autofagosomas cuando se activa la autofagia celular y que tan elemental es para llevar a cabo una buena actividad de este mecanismo celular.

VII. ORGANISMO MODELO

Los hongos son organismos eucariotas, heterótrofos, y en su mayoría carentes de movilidad. Estructuralmente cuentan con un diseño único en la naturaleza, determinada principalmente por la presencia de una pared celular compuesta de varias biomoléculas de origen glúcido y proteico, donde destaca la quitina (Curtis et al., 2008; Velásquez 2018). El estudio con levaduras dio como resultado el descubrimiento de las primeras proteínas relacionadas con la autofagia. La identificación de proteínas Atg ha permitido a los investigadores estudiar los mecanismos de la autofagia en la levadura en detalle molecular, convirtiendo a la levadura en el organismo modelo en el que se comprenden mejor los detalles moleculares de la vía de la autofagia (Torggler et al., 2017)

1. Levadura *Saccharomyces cerevisiae*

Las levaduras son organismos eucariotas de gran diversidad referente a su tamaño y forma, consideradas hongos unicelulares y generalmente sus células son ovaladas, también pueden encontrarse en forma esférica, cilíndrica o elíptica. Son mayores que las bacterias, alcanzando un diámetro máximo de entre 4-5 μm . La levadura *S. cerevisiae*, el nombre de esta especie se deriva del vocablo Saccharo (azúcar), myces (hongo) y cerevisiae (cerveza). 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 (Machin et al., 2016; Curtis et al., 2008).

Las pruebas genéticas en levaduras dieron como resultado el descubrimiento de las primeras proteínas relacionadas con la autofagia, las proteínas Atg, esto permitió estudiar los mecanismos de la autofagia a detalle molecular, las levaduras se usan como organismo modelo en el cual los detalles moleculares de la vía autofagica se entiendan mejor (Kraft, 2017). En la levadura, la autofagia se inhibe cuando se dispone de nutrientes externos. Por lo tanto, nosotros utilizaremos se visualizará el mecanismo de autofagia celular dentro de la especie de levadura ya mencionada.

VIII. JUSTIFICACIÓN

La autofagia celular es un mecanismo de supervivencia celular, permitiendo preservar a la célula cuando los componentes nocivos que se encuentran en el citoplasma son engullidos a través de autofagosomas, los cuales son degradados en orgánulos específicos, vacuola o lisosoma para su posterior reciclamiento dentro de la célula. Este mecanismo de supervivencia se forman vesículas de doble membrana denominadas autofagosomas, importantes para llevar a cabo este proceso. Dentro de la estructura de estas vesículas es posible que se encuentre a la proteína Erv14 y se ha postulado que esta podría ser relevante en el proceso de la autofagia celular. Por lo que es de interés de nuestro grupo de investigación comprender si Erv4 efectivamente es determinante para llevar a cabo la autofagia.

IX. HIPÓTESIS

La proteína Erv14 contribuye al proceso de autofagia en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

X. OBJETIVO GENERAL

Identificar la participación de la proteína Erv14 en el proceso de la autofagia.

XI. OBJETIVO PARTICULAR

Determinar si la proteína Erv14 se requiere para llevar a cabo una correcta autofagia a través del marcador de autofagia Pho860.

XII. METODOLOGÍA

Para llevar a cabo el experimento, se requirió de medios líquidos de YPD (Extracto de levadura 10g, peptona 20g y Glucosa 20g por litro) para crecer a las cepas de la levadura *S. cerevisiae* TN124WT (*Mat a, ura3-52, leu2-3,-112, trp1-1, pho8: pho8Δ60, pho13: LEU2*) y la TN124*erv14Δ* en 50 ml de YPD. Cada cepa se creció por duplicado en matraces de 250ml. Estos cultivos se dejaron crecer en una incubadora por 16 h a 28°C en agitación continua. Una vez concluido ese periodo cada cepa se vertieron en cuatro tubos falcon de 50ml, y se centrifugaron a 4500 rpm durante 5 min. Posteriormente se retiró el sobrenadante, dejando la pastilla de células concentrada al final de cada tubo y se vertió 50ml de agua estéril a cada tubo falcon, para volverse a centrifugar a la misma velocidad y el mismo tiempo. Se decantó el sobrenadante de cada tubo falcon y las células sedimentadas de cada cepa se resuspendieron en 1100 µl de agua estéril, de esta manera se pudo juntar cada muestra de cada cepa en un solo tubo falcon, al final quedaron dos muestras en tubos falcon con las cepas ya mencionadas. Estas dos últimas muestras que contienen las células de levadura fueron utilizadas para el crecimiento de levaduras en medios sin nitrógeno y sin glucosa por lo que a la par se prepararon otros medios.

Se realizaron medios por duplicado, medios YPD como medio de control, YNB como medio mínimo (YNB w/o aminoacids 0.67% y glucosa 2% para 100 ml), YNB-N sin fuente de nitrógeno (YNB w/o aminoacids and ammonium sulphate 0.17 % y glucosa 2 % para 100ml), YNB-G sin glucosa (YNB w/o aminoacids 0.67% para 100 ml) y YNB-NG sin glucosa y sin nitrógeno (YNB w/o aminoacids and ammonium sulphate 0.17% en 100ml). Estos medios se inocularon con las muestras antes obtenidas de las cepas TN124WT y TN124*erv14Δ*, se

les vertió las respectivas medidas: Para el medio YPD (50 μ l), YNB + aminoácidos (50 μ l), YNB-G + aminoácidos (400 μ L), YNB-N (200 μ l) y YNB-NG (400 μ l). Estos se dejaron incubar durante 5 h a 28°C en agitación constante.

Posterior a las 5 horas de incubación, los medios se vertieron en 10 tubos falcon de 15ml etiquetados con sus respectivas cepas y medios, es decir, 5 tubos para TN124WT (YPD, YNB, -N, -G, -NG) y 5 tubos de TN124*Erv14Δ* (YPD, YNB, -N, -G, -NG), estos se centrifugaron (7min a 4500 rpm) y se retiró el sobrenadante dejando la pastilla de células concentrada al final de cada tubo. Continuando, se agregó 500 μ l de agua a cada tubo y esto permitió que se resuspendieran las células y así cada una de las muestras se colocaron en tubos eppendorf, dividiéndolos de la siguiente manera: 250 μ l para cada tubo con su respectiva cepa y medio (TN124WT y TN124*Erv14Δ* (YPD, YNB, -N, -G, -NG)), cabe mencionar que para este paso se realizó una réplica técnica, al final se obtenían 20 tubos eppendorf, 10 eran muestras base y los otros 10 tubos correspondían a la réplica técnica. Sucesivamente los tubos eppendorf se centrifugaron a máxima velocidad durante 3min, se retiró el sobrenadante de cada tubo y se le agregaron 250 μ l de buffer de Lysis (20Mm PIPES pH7.2, 0.5% de Tritón x-100, 50mM KCL, 100Mm acetato de potasio, 10mM MgSO₄, 10mM ZnSO₄ y 1mM PMSF1) junto con aproximadamente 0.3 g de perlas de vidrio; seguidamente cada tubo eppendorf, se colocó en el vortex durante 3 min. Cada tubo eppendorf fue colocado en bandejas de hielo para posteriormente centrifugarse a máxima velocidad por 3min. Al tener las muestras preparadas se realizaron los siguientes ensayos, ensayo de fosfatasa alcalina Pho8 Δ 60 y cuantificación de proteínas.

1. Ensayo de fosfatasa alcalina Pho8 Δ 60

Se prepararon 20 tubos eppendorf, etiquetados para cada medio (YPD, YNB, -N, -G, -NG) y cepa correspondiente (TN124WT y TN124*Erv14* Δ), en los cuales se trabajó de la siguiente manera:

Tabla 1: Distribución de medios de crecimiento para las cepas TN124WT y TN124*Erv14* Δ .

5 tubos eppendorf -TN124WT	5 tubos eppendorf -TN124WT
5 tubos eppendorf-TN124 <i>Erv14</i> Δ	5 tubos eppendorf-TN124 <i>Erv14</i> Δ
Medios: YPD, YNB, -N, -G, -NG	
Estos tubos contenían α p-nitrofenil fosfato junto con buffer de reacción.	Sin, p-nitrofenil fosfato junto con buffer de reacción.

Posteriormente a las muestras se les agregó 400 μ l del buffer de reacción (1.25mM-p-nitrofenol fosfato; 250mM tris-HCL pH 8.5, 0.9% Tritón x-100, 10mM MgSO₄, 10mM ZnSO₄) junto con 100 μ l de la muestra (de los tubos que estaban en la bandeja de hielo) y a los otros 10 tubos eppendorf se les añadió buffer de reacción sin p-nitrofenol fosfato, y 70 μ l de la muestra. La mezcla fue agitada por vortex para homogeneizar, y se le agregaron 500 μ l de glicina (2M, pH=11), finalmente se preparó un blanco con 100 μ l buffer de lisis, 400 μ l buffer de reacción y 500 μ l glicina (2M, pH=11).

Por otro lado, los 10 tubos que si contenían el sustrato p-nitrofenil fosfato, se les realizó una dilución de 1:10, esto nos permitió medir de manera efectiva en el espectrofotómetro y se realizó de la siguiente manera, cada tubo eppendorf fue etiquetado con el nombre de la cepa y medio al que correspondían, en cada uno se agregaron 100 μ l del sustrato p-nitrofenil fosfato

y 900µl de agua estéril, las muestras fueron agitadas mediante un vortex, para homogenizarlas. Seguidamente a cada una de las muestras se les midieron en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 400 nm y se registraron los datos. Se realizó una curva estándar con el reactivo p-nitrophenol de 0 a 100 nmoles para conocer las concentraciones de p-nitrofenol de las muestras a través de su ajuste de los valores obtenidos a la OD₄₀₀ relativos a la curva estándar. La actividad específica está calculada como nmol p-nitrophenol/min/mg de proteína.

2. Cuantificación de proteínas

Se realizó la cuantificación de proteínas de las muestras que se obtuvieron inicialmente, para las muestras base y las réplicas técnicas, para esto se prepararon dos tubos de ensayo, para cada medio y diferente cepa: ((YPD, YNB, -N, -G, -NG) TN124WT y TN124*erv14Δ*), cada uno contenía, 3µl de la muestra de cada medio al que correspondía, 30µl de tritón (0.05%), 800µl de agua y 200 µl de colorante (BioRad, USA). Se preparó una muestra blanco, el cual llevó todo lo mencionado excepto la muestra, se homogeneizaron con uso del vortex. Finalmente se midió cada muestra en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm en celdas y se registraron los datos obtenidos. Para calcular las concentraciones de proteína se usó una curva estándar de un rango entre 0 a 9 mg/ml de BSA. Esto permitió realizar el cálculo por miligramo de proteína, y así homogenizar la cantidad en las muestras.

3. Curvas de calibración

Elaboración de curvas de calibración para determinar concentración de proteínas y nitrofenol

3.1. Curva de calibración correspondiente a la medición de proteína

Como primer paso se realizó una curva de calibración para conocer la concentración de proteínas en una muestra desconocida. Para ello se usó a la albumina, proteína estándar que permite cuantificar la proteína, con la cual se realizó la curva de calibración. En materiales y métodos se describe el protocolo para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford. En el laboratorio se decidió realizar esta curva con las concentraciones de albumina que van de 0 a 9 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Tabla 2: Concentraciones de albumina y su absorbancia a 595nm). Estos valores se graficaron donde las concentraciones están en el eje de las “X” y las absorbancias en el eje de las “Y”. Una vez graficados los datos, se agregó una línea de tendencia de tipo lineal, con esto se pudo obtener una ecuación lineal con las variables necesarias para conocer la concentración de proteína en una muestra desconocida. La fórmula es la siguiente $y = 0.0735x + 0.0944$ con una $R^2 = 0.9962$. Los datos obtenidos de la curva de calibración muestran que se pueden ajustar a la tendencia de tipo lineal ya que la R^2 es muy cercana a 1. La fórmula está integrada por la pendiente que es 0.0735 y el intercepto que es 0.0944. Para poder conocer una concentración de proteína desconocida en una muestra es necesario despejar “x” de la fórmula $y = 0.0735x + 0.0944$. Una vez despejado “x”, la fórmula queda de la siguiente manera $x = (y - 0.0944)/0.0735$. En la fórmula “y” es la absorbancia medida a 595 nm de una muestra con una concentración de proteína desconocida. De esta forma se logró calcular la concentración de proteína de las extracciones de proteína hechas en células de levadura mediante el espectrofotómetro.

Tabla 2: Concentración $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de albumina y su absorbancia a 595nm

Concentración $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Abs 595 nm
0	0.00E+00
0.75	0.154
1.5	0.206
2.25	0.26
3	0.3
3.75	0.361
4.5	0.441
5.25	0.484
6	0.524
6.75	0.589
7.5	0.669
8.25	0.707
9	0.737

A continuación, se muestra la gráfica de la curva de calibración para cuantificar proteína, la cual muestra la concentración de microgramos sobre microlitros y la absorbancia a 595 nm que corresponde.

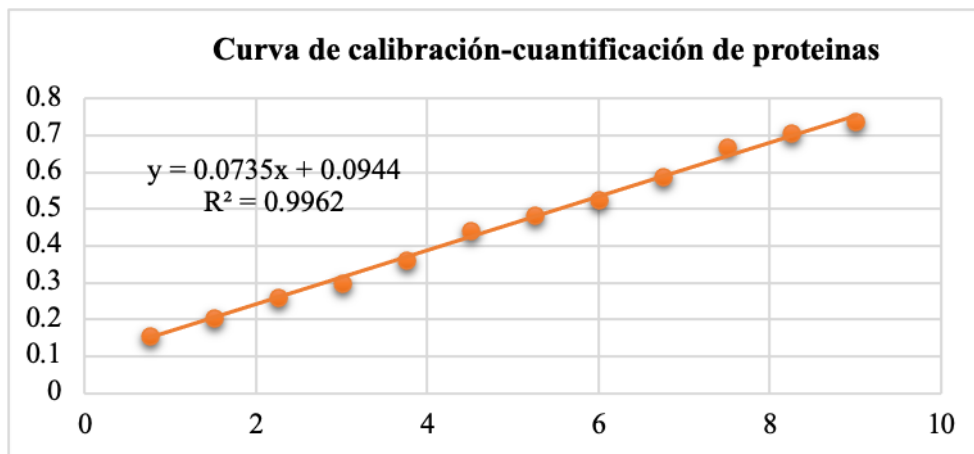


Figura 5: Curva de calibración de la cuantificación de proteínas

Absorbancia a 595 nm (eje de las y) que corresponden a la cantidad de proteínas en mg en el eje de las x.

3.2. Curva de calibración de Nitrofenol, respectivo al ensayo de fosfatasa alcalina Pho8Δ60.

Del mismo modo también se realizó una curva de calibración, en donde se utilizó la solución 4-Nitrophenol, en el laboratorio se utiliza para detectar presencia de p-nitrofenol mediante la desfosforilación de la fosfatasa alcalina (Figura 6).

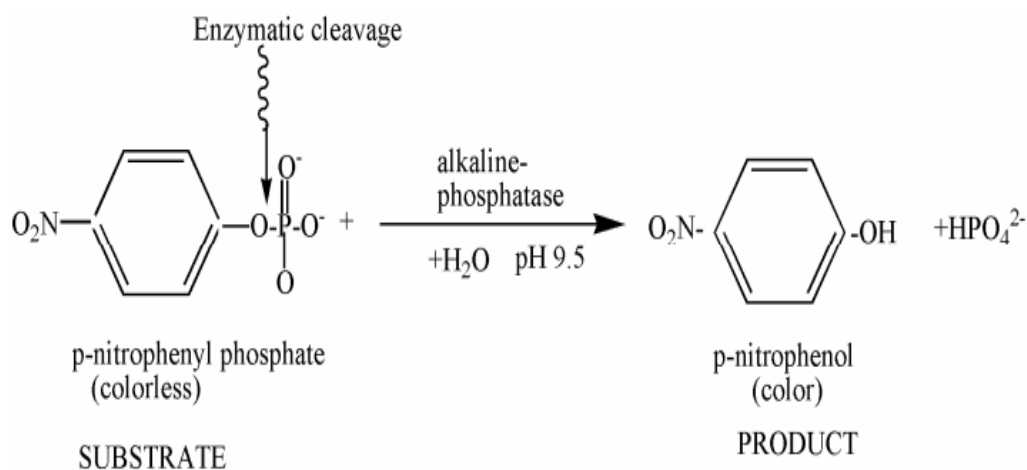


Figura 6: Reacción de p-nitrofenilfosfato con la fosfatasa alcalina

Esta reacción da como resultado el producto de color amarillo p-nitrofenol.

La concentración va desde 0 nmol a 10 nmol de nitrofenol y las mediciones se hicieron a una absorbancia de 400nm (Tabla 3: Concentración de Nitrofenol y absorbancia medida a 400nm). estos datos fueron graficados, de tal manera que en el eje de las "x" se encuentran las concentraciones y en el eje de las "y" están las absorbancias. Ya que se estableció la gráfica, se agregó una línea de tendencia de tipo lineal y se obtuvo una ecuación lineal con las variables requeridas para obtener la concentración de nitrofenol en una muestra desconocida. Se realizó la siguiente formula, $y = 0.1869x + 0.009$ con una R² de 0.9934,

en la cual será necesario despejar a ‘x’ para conocer la concentración de nitrofenol de una muestra desconocida.

En esta fórmula se obtuvo una pendiente que fue 0.1869 y el intercepto es 0.009, de tal manera que ‘x’ es la concentración que queremos saber y ‘y’ es la absorbancia medida a 400nm, al despejar a ‘x’, la fórmula queda de la siguiente manera: $x = (y - 0.009)/0.1869$.

Tabla 3: Concentración de Nitrofenol y su absorbancia medida a 400nm

Concentración nmol de nitrophenol	Abs 400 nm
0	0
1	0.25
2	0.362
3	0.602
4	0.735
5	0.91
6	1.098
7	1.294
8	1.46
9	1.814
10	1.852

La siguiente figura presenta la gráfica correspondiente a la curva de calibración de la medición de nitrofenol (Figura 7), donde se usó la solución de p-nitrofenol. Está representada con los siguientes elementos, en el eje de las ‘x’ o abscisas, encontramos la concentración de nmol de nitrofenol y de en eje de las ‘y’ u ordenadas la absorbancia a 400 nm.

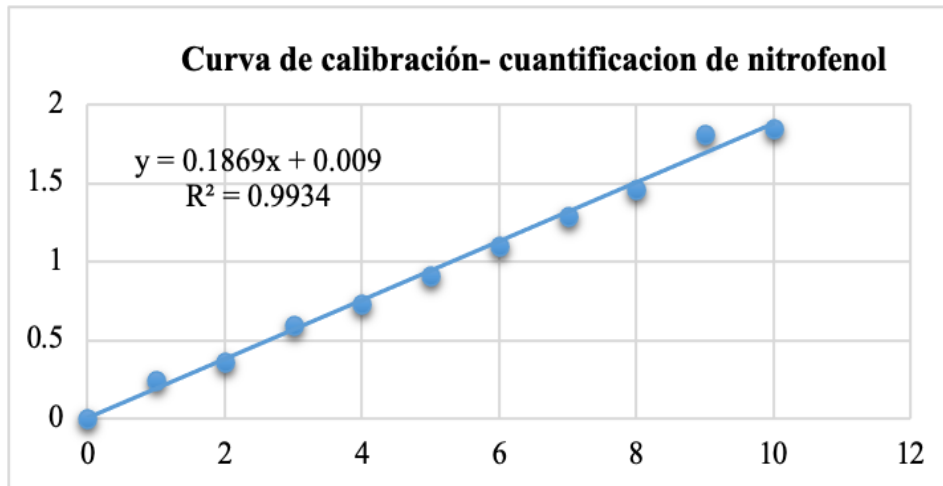


Figura 7: Concentración de nmol de nitrofenol (eje de las x) y la absorbancia a 400 nm (eje de las y)

XIII. RESULTADOS

Mediante la elaboración de curvas de calibración para ambos ensayos (cuantificación de proteínas y ensayo de fosfatasa alcalina Pho8 Δ 60), se obtuvieron absorbancias de cada una de las muestras correspondientes de ambos ensayos, dichas cifras respaldan el resultado final obtenido en esta investigación (Figura 10), se elaboró un proceso de obtención de resultados mediante Excel en donde se colocaron las cifras obtenidas y se siguieron los siguientes pasos.

1. Recopilación de datos de la extracción de proteína

Para comenzar, se obtuvo la absorbancia a 595nm de la extracción de proteína de cada muestra, posterior a esto se realizaban los siguientes cálculos para obtener los microgramos por microlitro de proteína, en este paso el valor de la OD₅₉₅ se le resta el valor de 0.0944 (intercepto en la fórmula) y esta diferencia se divide entre el valor de 0.0735 (pendiente en la fórmula) de tal manera que se calcula la concentración de la proteína en las muestras descritas. Debido a que se usó 100 ul de solución de cada muestra para realizar el ensayo de la fosfatasa alcalina, se determinó la cantidad de proteína en mg en estos 100 ul. De esta manera, estos últimos datos se requirieron para la obtención de datos del ensayo de fosfatasa alcalina Pho8 Δ 60. Estos pasos corresponden a las tablas mostradas en el anexo C.

2. Recopilación de datos del ensayo de fosfatasa alcalina Pho8Δ60

Se prosiguió a calcular los datos del ensayo de fosfatasa alcalina Pho8Δ60 de la siguiente manera: se obtuvo la absorbancia a 400nm de la extracción de cada muestra, el valor de cada concentración era multiplicado por 10, ya que se realizó una dilución de 10 veces para poder medir la absorbancia OD₄₀₀ sin salirse de los valores de la curva de calibración del p-nitrofenol. También consideramos el valor que se obtuvo a la OD₄₀₀ de estas mismas muestras, pero sin el sustrato p-nitrofenol fosfato, esto para eliminar la señal de fondo emitida por las soluciones utilizadas y que pudieran emitir alguna señal a 400 nm, de este modo lo que proseguía en esta columna era restar la OD₄₀₀ que contenía p-nitrofenol menos la OD₄₀₀ sin p-nitrofenol. Posteriormente a ese valor, se obtenían los nanomoles mediante una resta, se restaba con 0.009 (intercepto en la fórmula) e inmediatamente se dividía entre 0.1869. El siguiente paso consistía en dividir dicha cantidad entre 5 ya que fueron los minutos que estuvo en incubación la reacción sobre la mesa de trabajo a temperatura ambiente. Finalmente, esa última cantidad se dividía entre el resultado final que se obtenía de la cuantificación de proteínas de acuerdo con el medio y cepa al cual estaban emparejados, es por eso que era muy importante llevar una buena administración de los datos, para evitar confusión al momento de realizar este último paso. Con esto se pudo cuantificar los nmol de nitrofenol*min*mg de proteína. Ambos procesos de recopilación de datos corresponden a las tablas mostradas en el anexo C.

3. Agrupación de las cifras obtenidas a partir de los ensayos: Cuantificación de proteínas y Fosfatasa alcalina Pho8Δ60.

En este apartado se realizó una tabla en donde se colocaron las cifras obtenidas del anexo C, que corresponden a las tablas del ensayo de fosfatasa alcalina Pho8Δ60 de cada replica, que son los resultados finales extraídos de las concentraciones de las muestras obtenidas (Tabla 2). En las tablas mostradas del anexo C corresponden al número de réplicas que se realizaron en este experimento, y cada una de ellas incluye los datos que se obtuvieron en el orden descrito con antelación.

Tabla 4: Nanomoles de nitrofenol x minuto x miligramo de proteína.

Tipo de cepa	Medio líquido	Datos de réplicas biológicas					
TN124-WT (tipo silvestre)	YPD	24.7431674	20.34322	19.1285719	33.2976736	7.3259204	4.13424826
	YNB	24.115539	12.050119	22.1137201	34.0038914	0.6008532	18.0640122
	YNB_G	86.7815082	67.14701	125.042226	142.279237	34.699273	46.3660369
	YNB_N	258.06265	230.42218	303.290371	384.036115	168.30161	107.021035
	YNB_NG	76.707223	42.097822	122.585627	155.726607	76.695397	43.7319547
TN124 ^{erv14Δ} (mutante)	YPD	21.524314	13.84945	6.46939629	20.573781	25.093773	22.9162039
	YNB	13.15849	3.2024302	6.24296543	17.617478	3.5720558	18.5479597
	YNB_G	72.654982	56.523342	14.6166347	92.850183	2.5688098	36.8611413
	YNB_N	156.74857	146.94306	36.6406145	135.15133	95.394089	118.160093
	YNB_NG	76.327968	39.164329	16.6516626	70.945489	37.66286	78.477448

4. Pruebas estadísticas: Obtención de promedios y desviación estándar

A continuación, se muestra una tabla que indica los promedios y desviaciones estándar (Tabla 5), obtenidos de los datos de la tabla de réplicas biológicas (Tabla 4). Se requiere de estos

nuevos datos para poder elaborar una gráfica que refleje la variedad de la actividad autofágica en los diferentes medios que se utilizaron y como se ve afectada en ausencia de la proteína Erv14, la cual se mostrara más adelante.

Tabla 5: Promedios y desviaciones estándar, valor de probabilidad: 0.05.

Cepa	Medio	Promedio	Desviación estándar
TN124-WT Silvestre	YPD	18.16213359	9.935548982
	YNB	18.49135582	10.38535795
	YNB_G	83.71921518	39.19842187
	YNB_N	241.8556602	89.41799862
	YNB_NG	86.25743845	41.00168779
TN124Erv14A Mutante	YPD	18.40448637	6.360503726
	YNB	10.39022986	6.348184776
	YNB_G	46.01251547	31.54591928
	YNB_N	114.8396261	40.21565862
	YNB_NG	53.20495943	23.32001379

4.1. Hipótesis planteadas

Asimismo, se plantearon las siguientes hipótesis, lo cual favoreció plantear la prueba estadística y determinar cuál de estas se rechaza.

- Hipótesis nula: La actividad de la fosfatasa alcalina no cambia por la mutación del gen ERV14.
- Hipótesis alternativa: La actividad de la fosfatasa alcalina si cambia por la mutación del gen ERV14.

4.2. Prueba *t*-student

Se hizo uso de la prueba *t* de student de una cola, la cual nos ayuda a estimar el valor de la media de las muestras extraídas y mostró que hay diferencias significativas en la actividad de la fosfatasa alcalina. Posteriormente, los datos adquiridos se graficaron para mostrar en qué tipo de medio se alcanzó la mayor actividad de autofagia, de la cepa silvestre TN124WT y la cepa TN124 $erv14\Delta$, como se observa en las siguientes figuras.

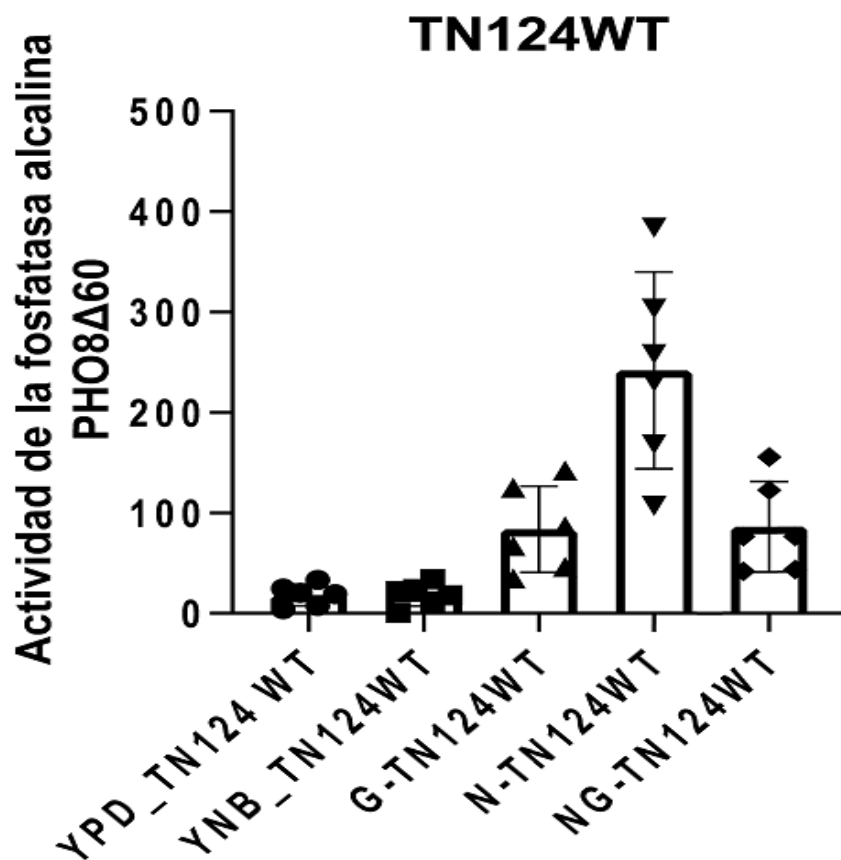


Figura 8: Actividad autofágica de la cepa TN124WT

Actividad de la fosfatasa alcalina de las células de la cepa TN124 tipo silvestre crecidas en medio rico (YPD), medio mínimo (YNB), medio mínimo sin nitrógeno, medio mínimo sin glucosa y medio mínimo sin nitrógeno y glucosa.

Como se puede observar en la figura 8, se tomó en cuenta los promedios y desviaciones estándar obtenidos de la tabla 5, con la cual se identifica que tan dispersos están los datos con respecto a la media; con lo cual se expone lo siguiente, la actividad autofágica con respecto a la fosfatasa alcalina Pho8 Δ 60 en la cepa TN124 tipo silvestre crecida en el medio rico YPD mostró una actividad de 18.16 y esta actividad fue similar cuando esta misma cepa se creció en el medio mínimo YNB actividad de 18.49, continuando, en el crecimiento del medio mínimo YNB sin glucosa obtuvo una actividad de 83.71, se muestra un mínimo incremento de la actividad de la fosfatasa alcalina, seguidamente la actividad de la fosfatasa alcalina de la cepa crecida en un medio mínimo sin nitrógeno obtuvo una actividad de 241.85 este fue el mayor incremento de la actividad de la fosfatasa alcalina, y por último en el crecimiento del medio mínimo sin nitrógeno y glucosa se mostró una actividad de la fosfatasa alcalina de 86.25, por lo tanto se puede concluir que el medio que el incremento mayor de la actividad de la fosfatasa alcalina fue el medio sin nitrógeno en la cepa TN124 tipo silvestre.

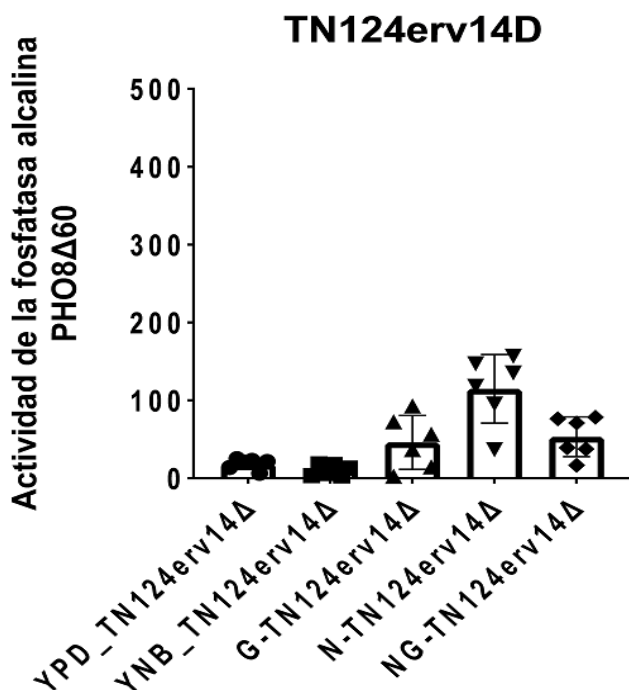


Figura 9: Actividad autofágica de la cepa TN124Erv14 Δ

A continuación, se describe la figura 9 con los promedios y desviaciones estándar extraídas de la tabla 7, se interpretó lo siguiente, la actividad de la fosfatasa alcalina Pho8Δ60 de la cepa TN124*erv14Δ* crecida en el medio rico YPD muestra una actividad de 18.40, seguidamente en el crecimiento del medio mínimo YNB reveló una actividad de 10.39, la actividad de la fosfatasa alcalina Pho8Δ60 de la cepa crecida en el medio mínimo sin glucosa se obtuvo una actividad de 46.01, posteriormente la actividad de la fosfatasa alcalina Pho8Δ60 de esta misma cepa crecida en el medio mínimo sin nitrógeno muestra una actividad de 114.83 y por último en el medio mínimo sin glucosa y nitrógeno se obtuvo una actividad de 53.20. Del mismo modo se obtuvo el mayor incremento de la actividad de la fosfatasa alcalina en el medio sin nitrógeno en la cepa TN124*erv14Δ*. En la siguiente gráfica se describen los promedios de la actividad de la Pho8Δ60 en cada una de las cepas crecidas en los diferentes medios y la actividad de la Pho8Δ60 de las cepas TN124-WT y TN124*erv14Δ*. La actividad se registra como unidades arbitrarias de un cálculo de los nmol de p-nitrophenol/min/mg de proteína.

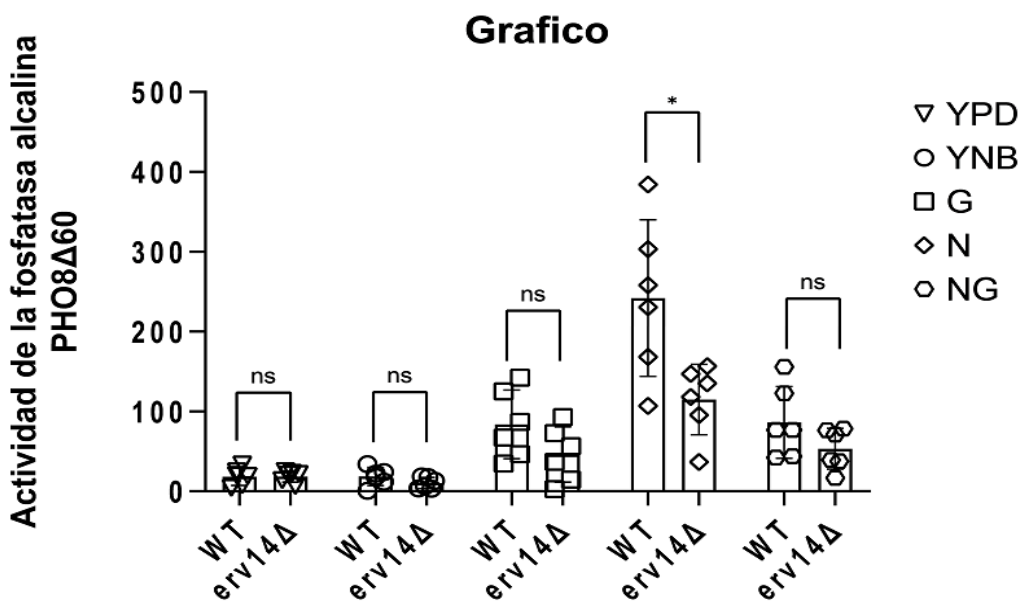


Figura 10: Actividad autofágica de las cepas TN124WT y TN124*erv14Δ*

Al obtener esta última gráfica (Figura 10), en conjunto se encuentra la actividad de la fosfatasa alcalina Pho8 Δ 60 correspondiente a las cepas TN124 tipo silvestre y mutante en el gen ERV14, en la cual la actividad refleja lo siguiente, las cepas TN124WT y TN124*erv14* Δ crecidas en el medio rico YPD, muestra que no hay diferencia significativa al igual que en el medio mínimo YNB. Continuando, se nota que la actividad de la fosfatasa alcalina Pho8 Δ 60 en las cepas TN124WT Y TN124*erv14* Δ crecidas en el medio mínimo sin glucosa refleja que no hay diferencia significativa. Como se puede observar en la gráfica de la figura 10, el medio que promueve la mayor actividad de la fosfatasa alcalina Pho8 Δ 60 es el medio mínimo sin nitrógeno e indica que existe una diferencia significativa entre la cepa silvestre y la mutante en ERV14, siendo menor la actividad en la cepa mutante. Por último, la actividad de la fosfatasa alcalina Pho8 Δ 60 crecidas en el medio mínimo sin nitrógeno y glucosa muestra que no hay diferencia significativa.

Por lo tanto, se puede concluir que la actividad de la fosfatasa alcalina en la cepa mutante en el gen ERV14 sí cambia y se observó una disminución significativa, lo cual permitió rechazar la hipótesis nula y concluir que la mutación de ERV14 en la cepa TN124 reduce la respuesta de autofagia medida a través del marcador Pho8 Δ 60, de manera interesante los medios sin glucosa generan una menor actividad de la Pho8 Δ 60 que aquella que genera cuando solo hace falta nitrógeno. Estos resultados nos muestran que ERV14 es necesario para una respuesta normal de la macroautofagia en las células de las levaduras crecidas en medios sin nitrógeno.

XIV. DISCUSIÓN

La autofagia se encarga de la supervivencia celular, en el cual los orgánulos dañados, los metabolitos tóxicos y patógenos intracelulares son degradados y reciclados aportando energía para la célula, se induce en una variedad de condiciones de inanición, como el agotamiento de nitrógeno, carbono, fósforo, zinc y otras. Sin embargo, aparte de la falta de nitrógeno, no está claro cómo estos estímulos inducen la autofagia (Adachi,2017). Conservada en levaduras y plantas, esta vía de degradación es altamente eficiente en la transformación de proteínas y orgánulos, y tiene un papel esencial en el mantenimiento de las reservas de aminoácidos libres tras la inanición (Onodera y Ohsumi, 2005 ; Thompson y Vierstra, 2005). Se ha confirmado que los mecanismos básicos de la autofagia de las plantas son similares a los de las levaduras y animales. (Ren et al., 2014). La levadura *S. cerevisiae*, la autofagia es particularmente crítica para el mantenimiento de la viabilidad celular durante la inanición, así como para la esporulación de las células (Adachi,2017). Las células de levadura responden a la privación de ciertos nutrientes como la glucosa o el nitrógeno y al inducir autofagia se recuperan fragmentos de proteínas para su uso en funciones críticas. La glucosa es un nutriente y fuente de energía ATP para la célula, la levadura asimila una amplia gama de fuentes de carbono. De estos, el monosacárido glucosa es la fuente de carbono más preferida para *S. cerevisiae*. y se metaboliza por glucólisis (Adachi,2017). El aporte de la glucosa a las células conduciría a una reducción de los niveles de autofagia puesto que dicho nutriente aporta los requerimientos energéticos que necesitan para su crecimiento y división celular (Alegre,2014).

Mientras que el nitrógeno se encuentra en una variedad de biomoléculas como los aminoácidos y bases nitrogenadas que se usan para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos (Finello, 2019). La regulación y señalización responsables de la autofagia inducida por inanición de nitrógeno están relativamente bien caracterizadas, las bases mecánicas de la inducción de la autofagia en respuesta a otras condiciones de inanición no se comprenden bien. También varios estudios sugieren que la falta de carbono puede inducir la autofagia (Adachi,2017). Ante la privación de estos nutrientes llevaría a la célula a aumentar los niveles de autofagia para suplir las necesidades energéticas y obtener mediante la degradación proteica las necesidades básicas que se requieran en la biosíntesis de las moléculas esenciales para la supervivencia celular (Finello, 2019). En este estudio se examinó la participación de la proteína Erv14 en *S. cerevisiae* con autofagia activa y crecidas en medios de diferentes condiciones, sin nitrógeno y glucosa, con el propósito de observar el efecto que genera la ausencia de dichos nutrientes en la mutante de la proteína Erv14, mediante el ensayo de fosfatasa alcalina Pho8 Δ 60. La proteína Erv14 se ha caracterizado por ser un receptor que facilita el movimiento de proteínas carga reconocidas por las vesículas COPII que viajan entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi e inicialmente se describió a Erv14 como receptor de carga de la proteína de membrana plasmática Axl2p (Pagant et al., 2015; Linero, 2016). Como se muestra en la figura 8, la actividad de la fosfatasa alcalina Pho8 Δ 60 de la cepa TN124WT - tipo silvestre crecida en un medio rico YPD obtuvo una actividad autofágica de 18.16 y medio mínimo YNB con una actividad autofágica de 18.49 no revelaron una mayor actividad autofágica a comparación con el resto de los demás medios, el medio mínimo sin glucosa mostró una actividad autofágica de 83.71, mientras que el medio

mínimo sin nitrógeno revelo un actividad autofágica de 241.85 y finalmente el medio mínimo sin ambos nutrientes reflejo una actividad menor 86.25.

Estos resultados indican que a falta de nitrógeno es cuando la actividad autofágica es aún más elevada, y a falta de glucosa existe actividad, pero no es tan elevada, curiosamente cuando ambos nutrientes están ausentes la actividad es menor, lo cual nos pone en una controversia interesante, será que la célula al estar en un estado de autofagia le afecte más el no poseer ciertos nutrientes, ya que en ausencia de nitrógeno reveló una actividad mayor que con la glucosa. Por otro lado, y basándonos en estos resultados, fue relevante la participación de la proteína *Erv14* en el proceso de medición de la actividad autofágica para indicarnos que en su ausencia la actividad autofágica se ve afectada minuciosamente, tal como se puede observar en la gráfica de la figura 9, existe un patrón similar a la figura 8 pero en cuanto a la actividad autofágica se reflejó una disminución, en medios rico YPD una actividad de 18.40, en el medio mínimo YNB actividad de 10.39, los medios sin glucosa una actividad de 46.01, sin nitrógeno actividad de 114.83, y en el medio sin ambos nutrientes una actividad de 53.20, tal como se mencionó se ve ese mismo patrón de la figura 8 pero estos resultados nos arrojan que en ausencia de *Erv14* la actividad autofágica disminuye. Por lo tanto, la carencia de *Erv14* en la autofagia no afecta la formación de los autofagosomas, ya que su formación y crecimiento no se ve afectada, pero si en cuanto a la medición de la actividad autofágica. Como se puede observar en la figura 10, se muestra la actividad de la fosfatasa alcalina *Pho8Δ60* de las cepas TN124WT y TN124*erv14Δ* en la cual ambas cepas son comparadas, y se muestra cuales medios obtuvieron significancia, nuevamente se puede visualizar que los medios sin nitrógeno obtuvieron una actividad autofágica elevada y tienen significancia, al

comparar ambas cepas demostramos que la privación de nitrógeno se obtuvo una de actividad autofágica elevada a comparación de los demás medios.

Por lo tanto, el nitrógeno es un elemento esencial para las funciones de los seres vivos, por ejemplo, la autofagia en plantas contribuye a la movilización de nitrógeno y producción de semillas, en estudios recientes han descubierto las funciones de la autofagia en plantas sobre la removilización de nitrógeno tanto en condiciones de inanición como durante las fases normales de crecimiento de modo que la removilización del nitrógeno en las hojas se convierte así en un paso crítico durante la maduración de la semilla (Ren et al., 2014). Los investigadores de levaduras, animales y plantas han utilizado la inanición de nitrógeno como un procedimiento estándar para inducir la autofagia (Ren et al., 2014).

Ren et al., (2014) nos indican que a un mayor nivel de autofagia se puede facilitar mejor el flujo de nitrógeno en el cuerpo de la planta, lo que permite una mayor producción de flores y el posterior establecimiento de semillas. En conjunto, la autofagia puede considerarse un factor esencial en la removilización del nitrógeno. La actividad autofágica facilita la eliminación de proteínas oxidadas y mantiene la longevidad celular, y, por otro lado, la autofagia contribuye a la degradación de los componentes celulares y al reciclaje de los nutrientes que se movilizarán para los órganos que los necesitan (C. Masclaux-Daubresse et al., 2016), y de acuerdo con los resultados obtenidos en esta investigación, nos indican que la autofagia es inducida por falta de glucosa y nitrógeno, en medios ricos y medios mínimos también se ve reflejada una actividad mínima aun cuando estos medios contienen lo necesario para su buen crecimiento celular, esa mínima actividad arrojada nos dice que aun teniendo

los nutrientes necesarios para un buen crecimiento la célula podría contener algún organelo celular dañado.

La carencia de nitrógeno en la célula produce activación de la autofagia que como ya vimos su actividad es mayormente elevada en ausencia y presencia de la proteína Erv14, el nitrógeno pudiera ser un nutriente aún más indispensable para la célula, como si a nosotros los humanos nos quitaran agua y comida, ¿con cuál de estos dos elementos no sobreviviríamos tanto? en este caso nosotros no sobreviviríamos sin agua, por ende para la célula el nitrógeno es importante para llevar a cabo sus funciones principales, que como se mencionó se encuentra en una variedad de biomoléculas como los aminoácidos y bases nitrogenadas que se usan para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos (Finello, 2019), pero no dejemos de darle importancia a la glucosa ya que la célula la requiere como fuente de energía ATP (Adachi,2017). La interacción del nitrógeno y glucosa son elementos trascendentes para el metabolismo y señalización en levaduras, animales y plantas, y la autofagia tiene un papel principal en ellos dado la importancia de la autofagia para mantener la homeostasis celular y la vitalidad en levaduras, plantas y animales (Guiboileau et al., 2013; Ren et al., 2014).En esta investigación se llevó a cabo la medición de la actividad autofágica en diferentes condiciones, medios de crecimiento sin nitrógeno, sin glucosa y sin nitrógeno y glucosa en presencia y ausencia del gen Erv14 mediante el marcador de autofagia Pho8 Δ 60, el cual es un sistema de monitoreo cuantitativo del flujo autofágico en levaduras, basado en la medición de la actividad enzimática resultante del suministro vacuolar, lo cual revela la actividad autofágica (Noda y Klionsky, 2008). Al realizar la evaluación autofágica se observó que en ausencia de Erv14 la actividad de la autofagia disminuyó y de manera significativa en

medios sin nitrógeno, se pretende responder si Erv14 es un gen esencial para el proceso autofágico y que interacción tiene.

Shima, Kirisako y Nakatogawa (2019), indican que Erv14 no es tan importante para la formación de los autofagosomas, ya que en células crecidas con rapamicina por dos horas se demostró que Ape1, el cual es un marcador del correcto funcionamiento del autofosoma ya que cuando se induce la autofagia pre-maduro (p-Ape1) llega directamente a la vacuola y ahí se procesa en un Ape1 maduro (m-Ape1), mostrando que en la cepa tipo silvestre hay una mayor proporción de Ape1 maduro que Ape1 pre-maduro, indicado que existe un correcto ensamblaje del autofosoma. Sin embargo, cuando se muta el gen ATG2, el cual es un gen importante para la formación de autofagosomas, la proteína Ape1 no se madura porque no llega a la vacuola lo que nos dice que este cargo de los autofogomas ya que a la ausencia de Atg2 los autofagosomas no se forma bien y por ende no puede llegar a la vacuola para degradarse. Para entender si Erv14 tenía una participación en la formación de los autofagosomas se observó también si ApeI se madura en la ausencia de este gen, los resultados reportados muestran que la ausencia de Erv14 no modifica la maduración de ApeI en la vacuola, sugiriendo que este gen no participa en la formación del autofosoma. Se utilizó otro marcador, Pgc1 fusionado a GFP, de igual forma las células fueron incubadas hasta por 8 h con rapamicina, los resultados mostraron que el procesamiento de Pgc1-GFP siguió su ruta normal hasta la vacuola donde la GFP es liberada de Pgc1. De esta manera se logró evaluar que la ausencia de Erv14 no interfirió en la ruta de Pgc1 desde el citoplasma hasta la vacuola. Esto indicó que Erv14 no es un gen esencial para la formación de los autofagosomas. (Shima et al., 2019).

En los resultados obtenidos de esta investigación se hizo uso del método Pho8Δ60, se mostró que la actividad de la fosfatasa alcalina Pho8Δ60 evaluada en diferentes medios de crecimiento, tiene diferentes vías que son las diferentes ausencias de nutrientes como la glucosa, nitrógeno y sin glucosa y nitrógeno, ya que en el medio sin glucosa la actividad de la autofagia medida a través de Pho8Δ60 se incrementó, pero el mayor incremento de la actividad de la autofagia se observó en el medio sin nitrógeno. Nuestros resultados mostraron que la autofagia a través del marcador Pho8Δ60 se activa en mayor magnitud sin nitrógeno, pero sin glucosa parece ser que no es la misma ruta. Es necesario tomar en cuenta que estos experimentos se realizaron a 5 horas de exposición. Los estímulos utilizados en esta investigación reflejaron que este proceso celular responde de manera diferenciada entre ellos, ya que la vía del nitrógeno, glucosa, y sin nitrógeno y glucosa poseen mecanismos particulares de cada uno de ellos, ya que efectúan niveles diferentes de autofagia. Al no obtener glucosa, la vía se ve modificada, igual que a la ausencia de nitrógeno, pero su actividad autofágica se ve aún más elevada, y curiosamente cuando ambos nutrientes no están presentes la actividad disminuye. Los distintos niveles de actividad autofágica de cada uno de los estímulos están bien diferenciados y se puede decir que este proceso celular responde manera específica a cada uno de los estímulos, esto indica que cada uno es una vía y mecanismo particular que se ejerce sobre la autofagia. Esto da hincapié para realizar estudios a fondo sobre el control y manejo de cada uno de los estímulos que se utilizaron para evaluar la actividad autofágica. Como ya se mencionó en esta investigación se hizo uso del marcador Pho8Δ60, nuestros resultados muestran que usando este marcador se observó que la incubación sin nitrógeno durante un periodo de 5 h evoco una mayor respuesta que la registrada sin glucosa por el mismo tiempo. Esta evidencia sugiere que la ruta que activa a

los autofagosomas y engloban a la Pho8 Δ 60 para llevarla hacia la vacuola es diferente cuando las levaduras son incubadas sin glucosa vs sin nitrógeno. Los datos obtenidos demuestran que Erv14 pareciera tener una contribución para que la autofagia activada por ausencia de nitrógeno se lleve de manera adecuada, sin embargo, los mismos datos muestran que Erv14 no es fundamental como lo reportan Shima y colaboradores (2019). Más estudios necesitan ser realizados para profundizar en los complejos mecanismos moleculares en los que posiblemente Erv14 participe para realizar una eficiente autofagia.

XV. CONCLUSIONES

- 1) El medio rico YPD y el medio mínimo YNB no estimuló la autofagia revelada a través del marcador Pho8Δ60.
- 2) El medio mínimo sin glucosa estimuló más la actividad autofágica mediante el marcador Pho8Δ60 que el medio YPD y el medio YNB.
- 3) El medio mínimo sin nitrógeno estimuló más la actividad del marcador Pho8Δ60 que el medio mínimo YNB sin glucosa.
- 4) Las células crecidas en el medio mínimo sin nitrógeno y glucosa mostraron una actividad menor del marcador Pho8Δ60 que la actividad del medio mínimo sin nitrógeno
- 5) La célula al estar expuesta a los diferentes estímulos que activan la autofagia indica que este proceso celular responde de manera diferenciada a los estímulos al igual que las vías y mecanismos que cada estímulo ejerce sobre la autofagia son particulares.
- 6) Al usar el marcador de la autofagia Pho8Δ60 se observó que la incubación sin nitrógeno durante un periodo de 5 h evocó una mayor respuesta que la registrada sin glucosa por el mismo tiempo.
- 7) Por lo tanto la ruta que activa a los autofagosomas y engloba a la Pho8Δ60 para llevarla hacia la vacuola es diferente cuando las levaduras son incubadas sin glucosa vs sin nitrógeno.

8) La mutación del gen ERV14 no afecta en la en formación de los autofagosomas, pero al momento de evaluar la actividad autofágica esta se ve modificada en ausencia de esta proteína, por lo tanto, Erv14 si es importante para llevar un buen proceso de la autofagia en las células de levadura solo en condiciones deficientes de nitrógeno.

Se necesitan más estudios para profundizar en los complejos mecanismos moleculares en los que posiblemente la proteína Erv14 participe para realizar una eficiente autofagia, ya que se podría demostrar si Erv14 interviene en el mecanismo de autofagia a través de ensayos de supervivencia al igual que establecer la participación de la proteína Erv14 en la acumulación de autofagosomas dentro de la vacuola celular.

XVI. ANEXO A

1. Medios líquidos requeridos para el monitoreo de la autofagia en levaduras: Ensayo fosfatasa alcalina Pho8 Δ 60.

- YPD: Medio rico, el cual permite crecimiento favorable de la levadura, contiene: extracto de levadura, peptona, una fuente de energía y glucosa.
- YNB+HMLTU: Medio mínimo, contiene YNB sin aminoácidos, posteriormente se le añaden aminoácidos.
- YNB-G+HMLTU: Medio mínimo sin glucosa, en este tipo de medio se retira la fuente de nitrógeno < glucosa y se le añaden aminoácidos.
- YNB-N: Medio mínimo sin nitrógeno, el cual contiene sulfato de amonio, como fuente de nitrógeno.
- YNB-NG: Medio mínimo sin nitrógeno y glucosa, YNB sin aminoácidos y sulfato de amonio.

XVII. ANEXO B

1. Monitoreo de la autofagia en levaduras: Ensayo fosfatasa alcalina, Pho8 Δ 60.

El método o ensayo de Pho8 Δ 60 (fosfatasa alcalina), es un sistema de monitoreo cuantitativo del flujo autofágico de levadura, basado en la medición de la actividad enzimática resultante del suministro vacuolar, lo cual refleja el flujo autofágico. La cepa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* TN124, contiene una proteína denominada Pho8, localizada en la membrana celular, la cual codifica la enzima fosfato vacuolar. Pho8 es un gen que codifica la única fosfatasa alcalina vacuolar en *Saccharomyces cerevisiae*, posee una cola citosólica N-terminal y un segmento de membrana integral, sitio activo y el C-terminal se encuentra en el lumen vacuolar (Noda y Klionsky, 2008). Pho8 transita a la vacuola a través del complejo de Golgi, posterior de la síntesis como forma inactiva en el retículo endoplásmico, después de que llega a la vacuola, el propéptido en el extremo C, se separa mediante proteasas vacuolares, lo que da como resultado la forma activa. Para hacer uso de Pho8 en el monitoreo de la autofagia, los 60 aminoácidos terminales, incluido el dominio transmembranal, se eliminan genéticamente y la enzima resultante se designa como Pho8 Δ 60 (Noda y Klionsky, 2008; Torggler et al., 2017). Ante esto, la enzima modificada ya no puede ingresar al retículo endoplásmico, se dispersa por todo el citosol de forma inactiva y una vez que se el mecanismo de autofagia está presente en la célula una porción de Pho8 Δ 60 se incorpora de forma no selectiva a los autofagosomas y es transportado hacia el lumen vacuolar, donde se activa por proteasas vacuolares. La única forma de que Pho8 Δ 60 llegue a la vacuola es a través de la autofagia, y si eso ocurre, se elimina el propéptido C-terminal. Por consiguiente, la liberación vacuolar de Pho8 Δ 60 a través de la vía autofágica puede medirse enzimáticamente, lo que constituye la base de esta investigación (Giezen, 2007).

Una de las propiedades de Pho8 Δ 60 es que se dispersa por todo el citosol, de esta manera cuando la levadura presenta autofagia, Pho8 Δ 60 se incorpora a los autofagosomas que seguirán su ruta habitual hasta llegar a la vacuola. Una vez activada la Pho8 Δ 60 esta puede llevar a cabo la liberación de fosfato inorgánico (a esta acción se le conoce como desfosforilación) y que químicamente ocurre por la hidrolización del enlace éster fosfórico entre un grupo fosfato y un radical orgánico a pH básico (pH óptimo entre 9 y 10) liberando fosfato inorgánico de un sustrato específico denominado p-nitrophenyl phosphate (el cual no tiene color) y que por acción de la Pho8 Δ 60 se generan los productos p-nitrophenol (el cual es de color amarillo) y un fosfato inorgánico (Torggler et al., 2017). Puede medirse evaluando la capacidad del lisado de células Pho8 Δ 60 para desfosforilar sustratos como el fosfato de para-nitrofenilo o el fosfato de α -naftilo (Torggler et al., 2017). La conversión de para-nitrofenilfosfato incoloro en para-nitrofenol amarillo puede medirse espectrofotométricamente como un aumento en la absorción a 400 nm. Pho8 Δ 60 se utiliza en un ensayo enzimático sensible que proporciona una señal que permite la cuantificación del flujo autofágico en la levadura. Consecuentemente, la actividad de la fosfatasa alcalina Pho8 Δ 60 es una forma de medir la actividad de la autofagia (Torggler et. al ,2017).

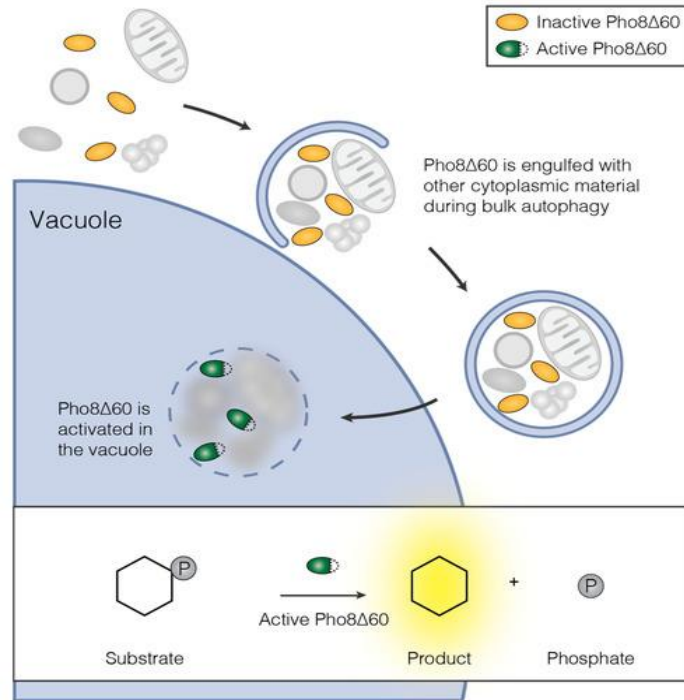


Figura 11: Proceso de activación de Pho8Δ60

El precursor inactivo de Pho8Δ60 es secuestrado aleatoriamente en el autofagosoma junto con material citoplásmico. Tras la entrega a la vacuola, Pho8Δ60 se activa. La actividad de Pho8Δ60 se mide en lisado celular suministrando un sustrato de fosfatasa. Dependiendo del sustrato, la desfosforilación por Pho8Δ60 produce productos que pueden detectarse espectrofotométricamente o espectrofluorométricamente; (Torggler et al., 2017).

XVIII. Anexo C

1. Obtención de datos de los ensayos: Cuantificación de proteínas y ensayo de fosfatasa alcalina Pho8 Δ 60.

Las siguientes tablas contienen cifras de lo que se describió en el apartado de recopilación de datos de la extracción de proteína y del ensayo de fosfatasa alcalina Pho8 Δ 60, estas tablas son un respaldo del resultado final de esta investigación.

1.1. Obtención de la concentración de proteínas

Réplicas biológicas de extracción de proteína

Tipo de cepa	Medio	Abs 595	ug-ul	ug en 100 ul	mg en 100 ul
TN124-WT (tipo silvestre)	YPD	1.439	18.2938776	365.877551	0.365877551
	YNB	1.262	15.8857143	317.7142857	0.317714286
	YNB_G	2.038	26.4435374	528.8707483	0.528870748
	YNB_N	1.399	17.7496599	354.9931973	0.354993197
	YNB_NG	2.04	26.4707483	529.414966	0.529414966
TN124erv14 (mutante)	YPD	1.0335	12.7768707	255.537415	0.255537415
	YNB	0.988	12.1578231	243.1564626	0.243156463
	YNB_G	1.827	23.5727891	471.4557823	0.471455782
	YNB_N	1.186	14.8517007	297.0340136	0.297034014
	YNB_NG	1.824	23.5319728	470.6394558	0.470639456

Tipo de cepa	Medio	Abs 595	ug-ul	ug en 100 ul	mg en 100 ul
TN124-WT (tipo silvestre)	YPD	1.547	19.7632653	276.6857143	0.276685714
	YNB	1.894	24.4843537	342.7809524	0.342780952
	YNB_G	1.792	23.0965986	323.352381	0.323352381
	YNB_N	1.243	15.6272109	218.7809524	0.218780952
	YNB_NG	1.916	24.7836735	346.9714286	0.346971429
TN124erv14 (mutante)	YPD	1.287	16.2258503	227.1619048	0.227161905
	YNB	0.954	11.6952381	163.7333333	0.163733333
	YNB_G	1.795	23.137415	323.9238095	0.32392381
	YNB_N	1.085	13.477551	188.6857143	0.188685714
	YNB_NG	2.084	27.0693878	378.9714286	0.378971429

Tipo de cepa	Medio	Abs 595	ug-ul	ug en 100 ul	mg en 100 ul
TN124-WT (tipo silvestre)	YPD	1.478	18.8244898	376.4897959	0.376489796
	YNB	1.277	16.0897959	321.7959184	0.321795918
	YNB_G	1.977	25.6136054	512.2721088	0.512272109
	YNB_N	1.31	16.5387755	330.7755102	0.33077551
	YNB_NG	1.948	25.2190476	504.3809524	0.504380952
TN124erv14 (mutante)	YPD	1.067	13.2326531	264.6530612	0.264653061
	YNB	0.907	11.0557823	221.1156463	0.221115646
	YNB_G	1.48	18.8517007	377.0340136	0.377034014
	YNB_N	1.143	14.2666667	285.3333333	0.285333333
	YNB_NG	1.672	21.4639456	429.2789116	0.429278912

Tipo de cepa	Medio	Abs 595	ug-ul	ug en 100 ul	mg en 100 ul
TN124-WT (tipo silvestre)	YPD	1.527	19.4911565	389.8231293	0.389823129
	YNB	0.956	11.722449	234.4489796	0.23444898
	YNB_G	1.912	24.7292517	494.585034	0.494585034
	YNB_N	1.25	15.722449	314.4489796	0.31444898
	YNB_NG	1.95	25.2462585	504.9251701	0.50492517
TN124erv14 (mutante)	YPD	0.837	10.1034014	336.7800454	0.336780045
	YNB	0.7875	9.42993197	314.3310658	0.314331066
	YNB_G	1.1865	14.8585034	495.2834467	0.495283447
	YNB_N	0.6055	6.9537415	231.7913832	0.231791383
	YNB_NG	0.792	9.49115646	316.3718821	0.316371882

Tipo de cepa	Medio	Abs 595	ug-ul	ug en 100 ul	mg en 100 ul
TNI24-WT (tipo silvestre)	YPD	1.6565	21.2530612	708.4353741	0.708435374
	YNB	1.2725	16.0285714	534.2857143	0.534285714
	YNB_G	1.7485	22.5047619	750.1587302	0.75015873
	YNB_N	1.087	13.5047619	450.1587302	0.45015873
	YNB_NG	1.6865	21.6612245	722.0408163	0.722040816
TNI24erv14 (mutante)	YPD	0.896	10.9061224	363.537415	0.363537415
	YNB	0.8045	9.66122449	322.0408163	0.322040816
	YNB_G	1.2885	16.2462585	541.5419501	0.54154195
	YNB_N	0.7845	9.38911565	312.9705215	0.312970522
	YNB_NG	1.0545	13.062585	435.4195011	0.435419501

Tipo de cepa	Medio	Abs 595	ug-ul	ug en 100 ul	mg en 100 ul
TNI24-WT (tipo silvestre)	YPD	1.5355	19.6068027	653.5600907	0.653560091
	YNB	1.061	13.1510204	438.3673469	0.438367347
	YNB_G	1.616	20.7020408	690.0680272	0.690068027
	YNB_N	1.0915	13.5659864	452.1995465	0.452199546
	YNB_NG	1.767	22.7564626	758.5487528	0.758548753
TNI24erv14 (mutante)	YPD	0.671	7.84489796	261.4965986	0.261496599
	YNB	0.6605	7.70204082	256.7346939	0.256734694
	YNB_G	1.173	14.6748299	489.1609977	0.489160998
	YNB_N	0.676	7.91292517	263.7641723	0.263764172
	YNB_NG	0.9295	11.3619048	378.7301587	0.378730159

1.2. Obtención del ensayo de fosfatasa alcalina-Pho8Δ60

Réplicas biológicas del ensayo de medición de Nitrofenol

Tipo de cepa	Medio	Abs 400	Multiplicado por 10	OD400 con Nitro-OD400 sin nitro	nmol nitrofenol	min	mg
TN124-WT (tipo silvestre)	YPD	0.093	0.93	0.855	4.526484751	9.052969502	24.74316743
	YNB	0.088	0.88	0.725	3.830925629	7.661851257	24.11553903
	YNB_G	0.465	4.65	4.298	22.94810059	45.89620118	86.78150819
	YNB_N	0.916	9.16	8.57	45.80524345	91.61048689	258.0626547
	YNB_NG	0.414	4.14	3.804	20.30497592	40.60995185	76.70722298
TN124erv14 (mutante)	YPD	0.06	0.6	0.523	2.750133761	5.500267523	21.52431386
	YNB	0.045	0.45	0.308	1.599785982	3.199571964	13.15849034
	YNB_G	0.348	3.48	3.21	17.12680578	34.25361156	72.65498238
	YNB_N	0.479	4.79	4.36	23.27982879	46.55965757	156.7485723
	YNB_NG	0.362	3.62	3.366	17.96147673	35.92295345	76.32796828

Tipo de cepa	Medio	Abs 400	Multiplicado por 10	OD400 con Nitro-OD400 sin nitro	nmol nitrofenol	min	mg
TN124-WT (tipo silvestre)	YPD	0.071	0.71	0.682	3.600856073	7.201712146	19.12857194
	YNB	0.068	0.68	0.674	3.558052434	7.116104869	22.1137201
	YNB_G	0.609	6.09	5.995	32.02782236	64.05564473	125.0422258
	YNB_N	0.963	9.63	9.384	50.16051364	100.3210273	303.2903712
	YNB_NG	0.586	5.86	5.787	30.91492777	61.82985554	122.5856275
TN124erv14 (mutante)	YPD	0.178	0.178	0.169	0.856072766	1.712145532	6.46939629
	YNB	0.149	0.149	0.138	0.690208668	1.380417335	6.242965429
	YNB_G	0.629	0.629	0.524	2.755484216	5.510968432	14.61663466
	YNB_N	1.096	1.096	0.986	5.227394329	10.45478866	36.64061445
	YNB_NG	0.751	0.751	0.677	3.574103799	7.148207598	16.6516626

Tipo de cepa	Medio	Abs 400	Multiplicado por 10	OD400 con Nitro-OD400 sin nitro	nmol nitrofenol	min	mg
TNI24-WT (tipo silvestre)	YPD	0.061	0.61	0.535	2.81433922	5.62867844	20.3432203
	YNB	0.055	0.55	0.395	2.06527555	4.1305511	12.0501185
	YNB_G	0.239	2.39	2.038	10.8560728	21.7121455	67.1470099
	YNB_N	0.531	5.31	4.72	25.2059925	50.411985	230.422185
	YNB_NG	0.171	1.71	1.374	7.30337079	14.6067416	42.09782239
TNI24erv14 (mutante)	YPD	0.038	0.38	0.303	1.57303371	3.14606742	13.84944988
	YNB	0.02	0.2	0.058	0.26217228	0.52434457	3.202430187
	YNB_G	0.199	1.99	1.72	9.15462814	18.3092563	56.52334206
	YNB_N	0.303	3.03	2.6	13.8630284	27.7260567	146.9430625
	YNB_NG	0.165	1.65	1.396	7.42108079	14.8421616	39.16432867

Tipo de cepa	Medio	Abs 400	Multiplicado por 10	OD400 con Nitro-OD400 sin nitro	nmol nitrofenol	min	mg
TNI24-WT (tipo silvestre)	YPD	0.125	1.25	1.222	6.490101659	12.98020332	33.29767359
	YNB	0.076	0.76	0.754	3.986088818	7.972177635	34.00389138
	YNB_G	0.668	6.68	6.585	35.18459069	70.36918138	142.2792372
	YNB_N	1.154	11.54	11.294	60.37988229	120.7597646	384.0361153
	YNB_NG	0.743	7.43	7.357	39.31514179	78.63028357	155.7266071
TNI24erv14 (mutante)	YPD	0.031	0.31	0.268	1.38576779	6.928838951	20.57378116
	YNB	0.026	0.26	0.216	1.107544141	5.537720706	17.61747822
	YNB_G	0.181	1.81	1.728	9.197431782	45.98715891	92.85018349
	YNB_N	0.13	1.3	1.18	6.265382558	31.32691279	135.151326
	YNB_NG	0.09	0.9	0.848	4.489031568	22.44515784	70.94548887

Tipo de cepa	Medio	Abs 400	Multiplicado por 10	OD400 con Nitro-OD400 sin nitro	nmol nitrofenol	min	mg
TNI24-WT (tipo silvestre)	YPD	0.044	0.44	0.203	1.037988229	5.189941145	7.325920379
	YNB	0.01	0.1	0.003	0.064205457	0.321027287	0.600853212
	YNB_G	0.118	1.18	0.982	5.205992509	26.02996255	34.69927297
	YNB_N	0.314	3.14	2.841	15.15248796	75.76243981	168.3016117
	YNB_NG	0.225	2.25	2.079	11.07544141	55.37720706	76.69539701
TNI24erv14 (mutante)	YPD	0.038	0.38	0.35	1.824505083	9.122525415	25.09377313
	YNB	0.008	0.08	0.052	0.230069556	1.15034778	3.572055843
	YNB_G	0.014	0.14	0.043	0.278223649	1.391118245	2.568809757
	YNB_N	0.127	1.27	1.125	5.971107544	29.85553772	95.39408879
	YNB_NG	0.077	0.77	0.622	3.279828785	16.39914393	37.66286049

Tipo de cepa	Medio	Abs 400	Multiplicado por 10	OD400 con Nitro-OD400 sin nitro	nmol nitrofenol	min	mg
TN124-WT (tipo silvestre)	YPD	0.034	0.34	0.11	0.540395934	2.701979668	4.134248261
	YNB	0.038	0.38	0.305	1.583734617	7.918673087	18.06401216
	YNB_G	0.135	1.35	1.205	6.399143927	31.99571964	46.36603693
	YNB_N	0.214	2.14	1.818	9.678972713	48.39486356	107.0210352
	YNB_NG	0.162	1.62	1.249	6.634563938	33.17281969	43.73195469
TN124erv14 (mutante)	YPD	0.031	0.31	0.233	1.198501873	5.992509363	22.91620386
	YNB	0.03	0.3	0.187	0.952380952	4.761904762	18.54795972
	YNB_G	0.078	0.78	0.683	3.606206528	18.03103264	36.86114126
	YNB_N	0.132	1.32	1.174	6.233279829	31.16639914	118.160093
	YNB_NG	0.121	1.21	1.12	5.94435527	29.72177635	78.47744803

XIX. BIBLIOGRAFÍA:

Adachi, A., Koizumi, M., Ohsumi, Y. (2017). Autophagy induction under carbon starvation conditions is negatively regulated by carbon catabolite repression. *Journal of biological chemistry*, 292, 19905-19918, doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.817510>

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2016). *Biología molecular de la célula* (6ª ed.). Barcelona, España: Omega.

Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2013). *Biología molecular de la célula* (4ª ed.). New York: Garland Science.

Alegre, C. (2014). *Estudio de los mecanismos de regulación de la autofagia por glucosa*, Universidad Politécnica Valencia (Escuela técnica superior de ingeniería agronómica y del medio rural), Valencia, España.

Antonny, B., D. Madden, S. Hamamoto, L. Orci, and R. Schekman, (2001). Dynamics of COPII vesicles with GTP and stable analogs. *Nat. Cell Biol.* 3, 531–537.

Aranquiz, P., Contreras, A., Rojas, D., Troncoso, R., Mambio, P., Toro, B., Sanhueza, C., Penanen, C., Elizondo, J., Parra, V., Chiong, M., Araya, G., Lavandero, S. (2006). Autofagia del cardiomicito: ¿Un nuevo mecanismo de adaptación al estrés o de muerte celular?. *Revista Chilena de cardiología*, 25 (3), 331-338.

- Barlowe, C. K., d'Enfert, C., Schekman, R. (1993). Purification and characterization of Sar1p, GTP small protein required for the transport of vesicles from the endoplasmic reticulum. *J. Biol Chem*, 268 (2), 873 – 879.
- Becker, W., Kleinsmith, L., Hardin, J. (2007). *El mundo de la célula* (6a ed.). Madrid, España: Pearson educación.
- Bi, X., J. D. Mancias, and J. Goldberg, (2007). Ideas sobre la nucleación de la capa COPII a partir de Sec23-Sar1 complejo con la activación del fragmento de Sec31. *Dev. Cell*, 13, 635–645.
- Boya, P. (2017). Autofagia: como nuestras células se reciclan. *Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular*. doi: http://dx.doi.org/10.18567/sebbmdiv_ANC.2017.01.2
- Boya, P., Codogno, P., Rodriguez-Muerla, N. (2018). Autophagy in stem cells: repair, remodeling and metabolic reprogramming. *The company of Biologists*, 145, doi:10.1242/dev.146506
- Bonifacino J., Glick B. (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell*. 116, 153-166.

- Bonifacino, J., and B. Glick, (2004). Budding vesicle mechanisms and fusion. *Cell Press*, 116, 153–166. doi: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)01079-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)01079-1)
- C. Masclaux-Daubresse (2016): Autophagy controls carbon, nitrogen, and redox homeostasis in plants, *Autophagy*. *Taylor and Francis Group*, doi: 10.4161/auto.36261.
- Campbell, N., Reece, J. (2007). *Biología general* (7^a ed.). Buenos Aires; Madrid: Panamericana.
- Costas, M., Rubio, M. (2017). Autofagia, una estrategia de supervivencia celular. *IDIM-CONICET*, 77, 314-320.
- Copper, G., Hausman, R. (2008). *La célula* (4^a ed.). Madrid, España: Marban.
- Curtis, H., Barnes, A., Flores, G. (2008). *Curtis Biología*. (7^a ed.). Buenos Aires: Panamericana.
- Dancourt, J.; Barlowe, C. Protein sorting receptors in the early secretory pathway. (2010) *Annu. Rev. Biochem* 79, 777–802.
- Engel, A., Gaub, H. E. (2008). Structure and mechanics of membrane proteins. *Annu Rev Biochem*. 77, 127-148.

- Finello, J. (2019). *Rol de la autofagia inducida por déficit nutricional en la briofita Physcomitrella patens*. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.
- Giraldez, C. (2016-2017). Yoshinori Ohsumi, las levaduras y la autofagia: El redescubrimiento de un proceso conocido. *Acta Herediana*, 59, 42-45.
- Gomez-Navarro, N., Miller, E. (2016). Protein sorting at the ER-Golgi interface. *Journal Cell Biol.* 215(6), 769 – 778.
- Guiboileau A., Avila-Ospina L., Yoshimoto K., Soulay F., Azzopardi M., Marmagne A., et al. (2013). Consecuencias fisiológicas y metabólicas de la deficiencia de autofagia para el manejo de los recursos de nitrógeno y proteínas en hojas de *Arabidopsis* dependiendo de la disponibilidad de nitratos. *Nuevo Phytol.* 199 683-694 10.1111 /nph.12307
- Lee M., Miller E., 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. (2016). *Papel de los receptores de carga en la organización funcional de la ruta secretora temprana*. Universidad de Sevilla, Sevilla-Andalucía, España

Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M., Zipursky, S., Darnell, J. (2005). *Biología celular y molecular* (5a ed.). Buenos Aires, Argentina: Panamericana.

Machín, C., Carralero, N., Guevara, C. (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. *Sistema de Información Científica Redalyc, Red de Revistas Científicas*, 50 (1), 20-28. doi: <https://www.redalyc.org/pdf/2231/223148420004.pdf>

Matsuoka, K., Orci, L., Amherdt, M., Bednarek, S. Y., Hamamoto, S., Schekman, R., Yeung, T. (1998). COPII vesicles in formation and reconstitution purified with proteins and chemically defined with liposomes. *Cell*. 93(2), 263 – 275.

Matsuoka, K., R. Schekman, L. Orci, and J. E. Heuser, (2001). Structure of the COPII vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98, 13705–13709.

Marqués, P., (2018). *Enfermedades neurodegenerativas y mecanismos de control de calidad celular: autofagia y alzheimer*. Universidad Complutense, facultad de farmacia, Madrid, España.

Megias, M., Molist, P., Pombal, M. (2017). *Atlas de histología animal y vegetal*. (1ª ed.). Vigo, España: Escribus.

Miller, E. A., Beilharz, T. H., Malkus, P. N., Lee, M. C., Hamamoto, S., Orci, L., Schekman, R. 2003. Multiple charge binding sites in COPIIs ensure the capture of various proteins in transport vesicles. *Cell*. 114(4), 497 – 509.

Mizushima, N., Levine, B. (2010). Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nature Cell Biology*. 12, 823-830. doi: 10.1038/ncb0910-823

Mossessova, E., Blickford, L. C., Goldberg, J. (2003). SNARE Selectivity of COPII Cell vesicles, *Cell*, 114 (4), 483 – 95.

Nakano, A., Muramatsu M. (1989). A new GTP protein, Sar1p, is involved in the transport of the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. *Journal of Cell Biology*, 109 (6), 2677 – 2691.

Nakanashi, E., Suda, Y., Neiman, A. (2007). Erv14 family cargo receptors are necessary for ER exit during sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of cell science*, 120, 908-916.

Noda, T., Klionsky, D. (2008). The quantitative Pho8 Δ 60 Assay of nonspecific autophagy. *Elsevier*, 451, 33-42.

Onodera J., Ohsumi Y. (2005). Autophagy is required for maintenance of amino acid levels and protein synthesis under nitrogen starvation. *J. Biol*, 280 31582–31586
10.1074/jbc.M506736200

- Paniagua, R., Nistal, M., Sesma, P., Alvarez-Uria, M., Fraile, B. Anadon, R., Saez, F., Gonzales, M. (2000). *Biología celular* (1ª ed.). México, D.F., México: Mc Graw-Hill Interamericana.
- Pagant, S., Wu, A., Edwards, S., Diehl, F., Miller, E. A. (2015). Sec24 is a coincidence detector that simultaneously binds two signals to drive ER export. *Curr Biol.* 25(4): 403 – 412
- Power, J., Barlowe, C. (1998). Transport of Axl2p Depends on Erv14p, an ER–Vesicle Protein Related to the *Drosophila* cornichon Gene Product. *Journall of cell Biology.* 145 (5), 1209-1222. doi: <https://doi.org/10.1083/jcb.142.5.1209>
- Powers, J., Barlowe, C. (2002). Erv14p Directs a transmembrane secretory protein into COPII-coated transport vesicles. *Molecular Biology of the Cell*, doi: <https://www.molbiolcell.org/doi/10.1091/mbc.01-10-0499>
- Ren, C., Liu, J., & Gong, Q. (2014). Functions of autophagy in plant carbon and nitrogen metabolism. *Frontiers in Plant Science*, 5. doi:10.3389/fpls.2014.00301
- Rosas-Santiago, P., Lagunas-Gomez, D., Barkla, B. J., Vera-Estrella, R., Lalonde, S., Jones, A., Frommer, W. B., Zimmermannova, O., Sychrova, H., Pantoja, O. (2015). Identification of rice cornichon as a posible cargo receptor for the Golgi-localized

sodium transporter OsHKT1; 3. *Journal of Experimental Botany*. 66 (9), 2733 – 2748.

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

Roemer, T., K. Madden, J. Chang, and M. Snyder. (1996) Selection of axial growth sites in yeast requires Axl2p, a novel plasma membrane glycoprotein. *Genes Dev*, 10:777–793. <https://doi.org/10.1101/gad.10.7.777>

Sangedo, A., Aleman, L., Villa, M., Chavez, M., García, L., Lavandero, S. (2016). Autofagia en el sistema cardio vascular: pasado, presente y futuro. *Revista chilena de cardiología*, 35 (3), 228-241. doi: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rchcardiol/v35n3/art04.pdf>

Sato K., Nakano, A. (2003). Oligomerization of a cargo receptor directs protein sorting into COPIIcoated transport vesicles. *Molecular biology of the cell* 14: 3055-3063

Shima, T., Kirisako, H., Nakatowoga, H. (2019). COPII vesicles contribute to the autophagosomal membrane. *Journal of cell biology*, .doi: <https://doi.org/10.1083/jcb.201809032>

- Thompson A. R., Vierstra R. D. (2005). Autophagic recycling: lessons from yeast help define the process in plants. *Curr. Opin. Plant Biol*, 8 165–173 10.1016/j.pbi.2005.01.013
- Torggler, R., Papinski, D., Kraft, C. (2017). Assays to monitor autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cells*, 6 (23), 1-24.
- Vázquez, M., Luna, P. (2005). Patología renal aguda y crónica. *Proteínas en nutrición artificial* (1ª ed.). Barcelona, España: EDIKAMED S.L
- Van der Giezen, M. (2007). *Protein Targeting Protocols* (2a ed.). Nueva Jersey, Estados Unidos: Humana Press.
- Velasquez, L. (2018). *Identificación del homólogo a Cornichon/Erv14 y su papel en la regulación del crecimiento del hongo filamentoso Neurospora crassa*, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, Ensenada, Baja California, México.
- Yoshihisa, T., Barlowe, C., Schekman, R. (1993). Requirement for a GTPase to be activated in the formation of vesicles of the endoplasmic reticulum. *Science*. 259(5100): 1466 – 1468

XX. REFERENCIAS FIGURAS:

- Boya, P., Codogno, P., Rodriguez, N. (2018). Autophagy in stem cells: repair, remodelling and metabolic reprogramming. *The company of Biologists*. (145), 1-14, doi: doi:10.1242/dev.146506
- Bonifacino J., Glick B. (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell*. 116, 153-166.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A., Klionsky, D. (2008). Autophagy disease through cellular self-digestion. *Nature publishing group*. 451 (28), 1069-1075.
- InvivoGen. (2017). Mitochondrial DNA in innate immunity and autophagy. *InvivoGen insight*
- Sato, K., Nakano, A. (2007). Mechanims of COPII Vesicle formation and protein sorting. *Elsevier*. 581, 2076-2082.
- Torggler, R., Papinski, D., Kraft, C. (2017). Assays to monitor autophagy in saccharomyces cerevisiae. *Cells*, 6 (23), 1-24.

Cuernavaca, Morelos a 28 de septiembre de 2021

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

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **ERENDIRA SOLEDAD HUERTA QUINTERO**, con el título del trabajo: **Elucidación de la contribución de la proteína Erv14 en el proceso de autofagia celular.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación de **Trabajo de Desarrollo 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: DRA. MARÍA DEL RAYO SÁNCHEZ CARBENTE

SECRETARIO: M. EN C. MARÍA LUISA BARROSO GARCÍA

VOCAL: DR. PAUL ROSAS SANTIAGO

SUPLENTE: M. EN C. LAURA PATRICIA LINA GARCÍA

SUPLENTE: M. EN C. PATRICIA MARTINEZ JAIMES



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

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

Sello electrónico

PAUL ROSAS SANTIAGO | Fecha:2021-10-11 17:37:43 | Firmante

oqhY1j5OEB0PJ67eouQBt+ufQjIPMF0lmb1/i5r6M8K9UgVlhMxJDgU7L1x6TXHttjggsPxS/eNCL1kmYvnC4feHfXHiU9lo7KyflVaTfSGRqF1aCkul2S3IYt1UA6WOJXy8TWrKN4h
opKFHeHll0osSAW6+t4SXpKiF4UpnZe32zHiv2lJXZVDI46rUjD1+75biL8Fk1U3cSG7dgbGq5o/Jtz81hrjfn9yORCHzx1J4Y84/GDbeJsAl1kkOxgEC5EgUJdiDCwiiyeKJK9hFnkdV6
LkHcSSRRtyLRFADYWPp1YE7aP3rmJr2YHzn2PqdlRPAUJiQCoAxdl5+6ihJA==

PATRICIA MARTINEZ JAIMES | Fecha:2021-10-11 19:43:35 | Firmante

H3l9/7kH5Ry2A3tCfAJAXf1CMsY9Jxsxswxde9+FRnb+oB6Mzjw7gPp9YgMyWsh0/x6rlbpbpxvcq32C4utAbvRPBCm+PusLKjmevnuhWuYeCm4N3IYtQjBvXXQ2z1rkCqV2HyR
FRX5LQ8XuXGPKTpOnMvdjLcSQSDoQu7XGXLrhoS17MDCPJXPFDpQ6zWXOqlvprPBA366mfRtyfNHiecyOcSTOOoywaUVJQmxUyfqWLDNjJwQreUryio2b+NbyJqHEHXG
A2DOZ0urOk6bZVbaiWwfbBdJh2gyIrvB0C7fGXgJWiRwJvfrnw931i2ov8lbi5atZRfbEKT2j0g==

LAURA PATRICIA LINA GARCIA | Fecha:2021-10-11 20:47:28 | Firmante

sqJHG+MGLYcN626Qv0YLDbthDv9oHaYHMBujHos4plu4kqTsGAYfUp9BuC6Gulx2lcCVNrqTErm+Vddy/08xK4kscU07tuRF47xxozfzqUvmD+VJg4ucJePfmQ5m+DUO6XFKX
9fteqzPG+umbamzUH9VD7roe0Xy2+aBAYRFjciYUOEaJIWCjMi8VnOXJ0TlIirS3RIeTYe4FBDdD9QUJJDWnQpTxRRtG1SQQn2kYzdcnqCfH9laet2sNODOV+3pEk14OpLZUL1er2
vWwc6dc5mXn2D0R+z7FMmeKWgcm/zv+SHkxWNUBnK04lu/Nq92NY7QBmYnHjMkC/fv0dQ==

MARIA LUISA BARROSO GARCIA | Fecha:2021-10-12 14:55:55 | Firmante

tmDkE7e0P3si1o66d7wsJUkmN0Yaqo6qWmZgqWMIE761a7l8UWLke4oAYDcc9tyBFKTx+earJxm5gqOvKI0JL8fl0aAS7uU0DH04d/w86DFHqstEeu9JUw/6EBYD+ix0ji9wFmK
dtFZ7Lj6pe84hfVbRklotRgWZ/Wj9V8UDE/ADvYQ9hZqto6ywpInbkKHj1Om9X2Mb8xti90ccyKrTeW8eleZB4Gtot8r2qjt86XUEWZKrEJWPYskD+5NvBigpNNg1OMFncjx+N0NqV
OhIXmVGrfwU3zJF0V8HrjOPGHG6+jmhQU6yyCDYIKnBuXEhtsjHKf+17pqq9Oug==

MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE | Fecha:2021-10-15 16:33:47 | Firmante

YKSmsdAniQs738aLvLaVGPJNCHGQOBhq+2H1XzSPjYrVoNk6my7v0KX/9NP6uAixsEKrEkoPq6jMztKeWaYtAYjWGWL27NiSj55g3BGp8B9uwbtiOdBg1mHFJzhliF9OvskbW
3BHcWOY0HCcQhKrecfANVRyDWKy2kECUI99VdEP3/UnSiupt41jC9d6B1jEIF8AUbbVNnmSxPdURTKAb1nK3ervn5Cep8F1Nlkr1x2GTUEKsRbKC9SUF0g/TtKx8/BzRjzjMp
OZ7eFYxLuxPRX8B4UW0wFipLomWrmUzRLRvmpyb3925ba6/h+hgcM3Uhy8UR/LVyxqf0RqA==

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



umHiANKGc

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Buw1UVnPs0g8T79XWXArvasU1rPqoTs>

