

PROGRAM

EB 2014

Experimental Biology

www.experimentalbiology.org

ANNUAL MEETING OF:

- American Association of Anatomists (AAA)
- The American Physiological Society (APS)
- American Society for Biochemistry and Molecular Biology (ASBMB)
- American Society for Investigative Pathology (ASIP)
- American Society for Nutrition (ASN)
- American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics (ASPET)

Experimental Biology

April 26-30, 2014 - San Diego Convention Center

Carbohydrates downregulates sodium-coupled neutral amino acid transporter-2 (SNAT2) expression

Program
No. 946.5

Victor Ortiz-Ortega¹, Ana Luisa Méndez², Lilia Noriega¹, Nimbe Torres¹, Armando R. Tovar¹
¹Fisiología de la Nutrición, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México D.F. 1400
²Facultad de Enfermería, Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
 *e-mail: vimort99@gmail.com

this work was supported by CONACYT 183037



INTRODUCTION

SNAT has been suggested to play a physiological role in the provision of amino acids that may enter the gluconeogenic pathway in liver. However, SNAT2 transcriptional regulation by carbohydrates has not been studied. The objective of this study was to determine the acute response to 70% sucrose diet (high sucrose diet, HSD) or 10% sucrose diet (low sucrose diet, LSD) on hepatic SNAT2 expression. Wistar rats fed HSD showed a significant decrease of hepatic SNAT2 mRNA and protein expression compared with rats fed LSD or fasted rats. Also, we found a decrease SNAT2 mRNA expression in rat hepatocytes primary culture or HepG2 cells incubated with 25 mM versus 5 mM glucose. SNAT2 promoter mapping showed a putative carbohydrate response element (ChRE). Construct containing this site was ligated in a luciferase vector for functional studies in HepG2 cell line. Promoter activity was decreased when transfection was performed with 25 mM versus 5 mM glucose. Specific protein-DNA complexes were detected by EMSA indicating that carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) binds to ChRE in the SNAT2 promoter. These results showed that sucrose-fed decrease hepatic SNAT2 expression through ChREBP. CONACYT 183037

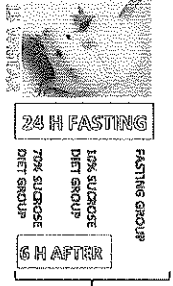
MATERIALS AND METHODS

- SNAT has an important physiological role in the provision of amino acids that may enter the gluconeogenic pathway in liver.
- Recently, our laboratory cloned and analyzed the rat SNAT2 promoter region
- *In silico* analysis showed an ChRE
- However, SNAT2 transcriptional regulation by carbohydrates has not been studied.

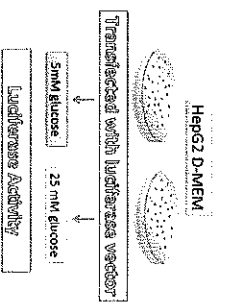
RESULTS

The objective of this study was to determine the acute response to 70% sucrose diet or 10% sucrose diet on hepatic SNAT2 expression.

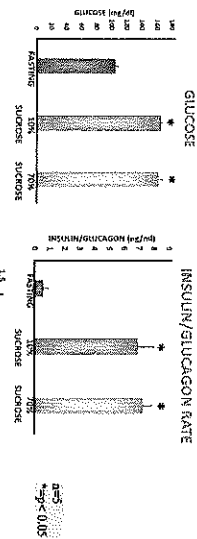
In vivo Studies



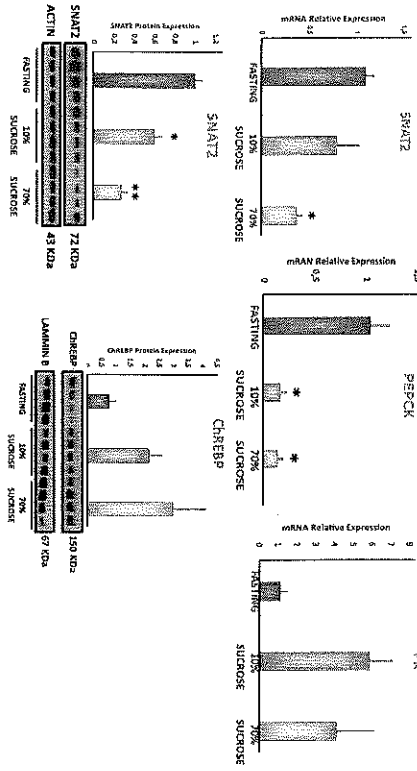
In vitro Studies



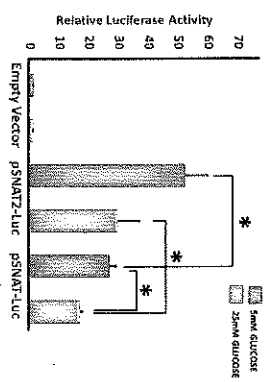
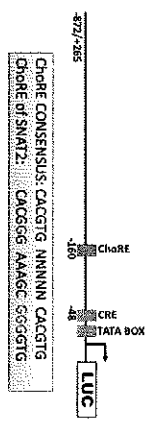
METABOLIC STATE



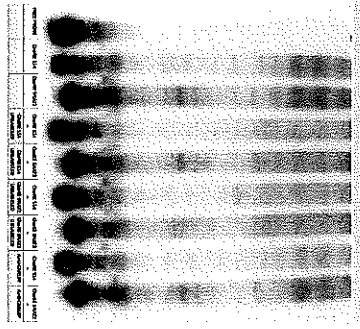
GENE EXPRESSION



LUCIFERASE REPORTER ASSAY



EMSA



Carbohydrates downregulate SNAT2 expression through ChREBP binding to ChRE in the promoter region.

Carbohydrates downregulates sodium-dependent neutral amino acid transporter-2 expression (946.5)

Vicor Ortiz-Ortega¹, Ana Luisa Mendez-Garcia², Lilia Guadalupe Noriega¹, Nimbe Torres¹ and Armando Roberto Tovar¹

 Author Affiliations

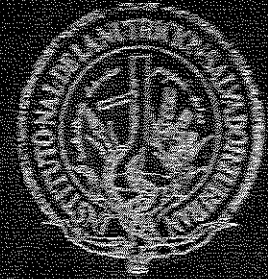
Abstract

SNAT has an important physiological role in the provision of amino acids that may enter the gluconeogenic pathway in liver. However, SNAT2 transcriptional regulation by carbohydrates has not been studied. The objective of this study was to determine the acute response to 70% sucrose diet (high sucrose diet, HSD) or 10% sucrose diet (low sucrose diet, LSD) on hepatic SNAT2 expression. Wistar rats fed HSD showed a decrease of hepatic SNAT2 mRNA and protein expression compared with rats fed LSD or fasted rats. Also, we found a decrease SNAT2 mRNA expression in rat hepatocytes primary culture or HepG2 cells incubated with 25 mM versus 5 mM glucose. SNAT2 promoter mapping showed a putative carbohydrate response element (ChoRE). A construct containing this site was ligated in a luciferase vector for functional studies in HepG2 cell line. Promoter activity was decreased when transfection was performed with 25 mM versus 5 mM glucose. Specific protein-DNA complexes were detected by EMSA indicating that the carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) binds to ChoRE in the SNAT2 promoter. These results showed that sucrose-fed rats decrease hepatic SNAT2 expression through ChREBP.

Grant Funding Source: Supported by CONACyT 183037



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
SAN LUIS POTOSÍ



FACULTAD DE ENFERMERIA
LICENCIATURA EN NUTRICION

Efecto agudo de una dieta alta en
sacarosa sobre la expresión del
transportador de aminoácidos neutros
dependiente de sodio (SNAT2)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIATURA EN NUTRICIÓN

PRESENTA

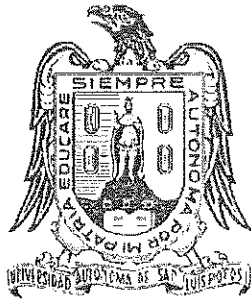
Ana Luisa Méndez García

TUTORES:

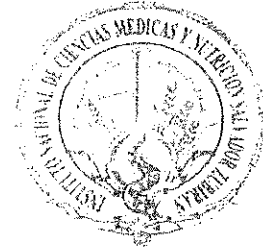
Dr. Víctor Manuel Ortiz Ortega
Dra. Lilia Guadalupe Noriega López



San Luis Potosí, S.L.P. Diciembre 2013



**Universidad Autónoma de
San Luis Potosí**



**Facultad de Enfermería
Licenciatura en Nutrición**

**Efecto agudo de una dieta alta en
sacarosa sobre la expresión del transportador
de aminoácidos neutros dependiente de sodio
(SNAT2)**

TESIS

**Que para obtener el título de:
Licenciatura en Nutrición**

PRESENTA:

Ana Luisa Méndez García

Tutores:

**Dr. Víctor Manuel Ortiz Ortega
Dra. Lilia Guadalupe Noriega López**



**San Luis Potosí, S.L.P.
Diciembre 2013**

Efecto agudo de una dieta alta en sacarosa sobre la expresión del transportador de aminoácidos neutros dependiente de sodio (SNAT2)

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:



Dr. Víctor Manuel Ortiz Ortega
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán



Dra. Lilia Guadalupe Noriega López
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Efecto agudo de una dieta alta en sacarosa sobre la expresión del transportador de aminoácidos neutros dependiente de sodio (SNAT2)

El Jurado de Examen Profesional estuvo constituido por:



LN. Olivia González Acevedo MC.
PRESIDENTE



Dra. Lilia Guadalupe Noriega López
VOCAL



Dr. Jaime Reyes Hernández
SECRETARIO

Esta Tesis fue defendida en examen presentado en el mes de Diciembre de 2013.



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

Productos derivados de la investigación.

Los productos derivados de esta investigación hasta el momento son:

1. Se elaboró un poster con los resultados obtenidos durante la primera etapa para ser presentado en el Congreso Internacional Experimental Biology 2014 realizado en San Diego, California, USA.
2. En cuanto a la formación de recursos humanos la primera etapa del proyecto fue el tema de Tesis de Licenciatura de la pasante de la carrera de Nutrición Ana Luisa Méndez García de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí con el cuál se tituló.
3. Queda pendiente la publicación con los resultados en una revista de alto impacto la cual será enviada en el transcurso de este año.

Atentamente

Dr. Victor Manuel Ortiz Ortega



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

Informe Final

Título del Proyecto: El papel represor de ChREBP sobre el transportador de aminoácidos neutros dependiente de sodio (SNAT2) y su efecto sobre el metabolismo de aminoácidos.

El objetivo general del proyecto fue determinar si ChREBP regula la transcripción del transportador SNAT2 a través de su unión directa al sitio ChoRE localizado en la región promotora de este gen, en respuesta a una alta concentración de carbohidratos.

Para alcanzar este objetivo, el proyecto fue dividido en tres etapas.

En la primera etapa se evaluó el efecto agudo *in vivo* de una dieta alta en carbohidratos sobre la expresión del gen del transportador SNAT2 en ratas. Quince ratas Wistar macho de 200 gramos de peso fueron divididas en tres grupos. Los animales se dejaron en ayuno por 24 horas con agua *ad libitum*. Una vez completado el periodo de ayuno, uno de los grupos no recibió ningún tratamiento adicional realizándose la eutanasia. El segundo grupo fue alimentado con una dieta que contenía 10% de sacarosa, la cual es la cantidad adecuada recomendada por la AIN93 y el tercer grupo fue alimentado con una dieta alta en sacarosa que contenía 70% de la misma. Seis horas posteriores a la alimentación se obtuvo sangre, hígado, músculo y tejido adiposo epididimal de todos los animales.

En los tejidos obtenidos, se evaluó el efecto que tiene el consumo de una dieta alta en sacarosa sobre la expresión del gen del transportador SNAT2 por PCR de tiempo real. En el hígado de ratas se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) en el grupo alimentado con una dieta sacarosa 70%, en comparación con los grupos de dieta sacarosa 10% y ayuno.

Posteriormente se determinó la expresión de la proteína SNAT2 en hígado por western blot, encontrando una disminución del 45% y del 65% en la expresión de la proteína SNAT2 de los grupos de sacarosa 10% y sacarosa 70% respectivamente, con respecto al grupo de ayuno. Este resultado indica que el consumo de una dieta alta en sacarosa reprime la transcripción del gen de SNAT2.

En el músculo y en el tejido adiposo no hubo diferencia significativa en la expresión de SNAT2 entre los grupos experimentales.

Una vez que se evaluó la expresión de SNAT2 en hígado a través de la abundancia relativa del ARNm y de la proteína, procedimos a determinar si la disminución en la expresión del gen del transportador se correlacionaba con un cambio en el contenido y estado de activación del factor de transcripción de la proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos (ChREBP).



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

Los resultados mostraron que hubo un incremento significativo del 120% y del 230% en el contenido de la proteína ChREBP en el hígado de los animales alimentados con dieta sacarosa 10% y dieta sacarosa 70% respectivamente, con respecto al grupo de ayuno.

Estos resultados en su conjunto, nos muestran que existe una disminución en la transcripción del gen del transportador SNAT2 en el hígado de ratas alimentadas con una dieta alta en sacarosa y que este cambio se relaciona con un incremento en la proteína ChREBP activa.

En la segunda y tercera parte del proyecto se realizaron los estudios *in vitro* que involucraron el análisis de la región promotora del gen del transportador SNAT2.

Para esta etapa del proyecto se procedió a amplificar fragmentos de DNA genómico de diferentes tamaños de la región promotora del gen de SNAT2 por medio de delecciones específicas y clonarlos en vectores reporteros de luciferase (pGL3basic). Posteriormente, se determinó la actividad promotora de estas construcciones en respuesta a diferentes concentraciones de glucosa por medio de transfecciones transitorias en la línea celular HepG2.

En estos experimentos observamos que efectivamente existe una disminución en la actividad de luciferase cuando las células son cultivadas en un medio con alta concentración de glucosa (25 mM) en comparación al grupo control el cual se cultivó en medio con 5 mM de glucosa. Este efecto fue mayor cuando se sobre-expresaba el factor de transcripción ChREBP. Estos resultados nos indican que el factor de transcripción ChREBP media el efecto represor de la transcripción de SNAT2 en respuesta a una alta concentración de carbohidratos.

Otro punto que se llevó a cabo durante esta etapa fue la determinación de la unión del factor de transcripción ChREBP al sitio ChoRE *in vitro* por la técnica de EMSA. Los resultados mostraron la formación de complejos DNA-proteína al incubar extractos nucleares obtenidos de células con sobre-expresión de ChREBP con oligonucleotidos que tienen el sitio ChoRE del gen de SNAT2. Se realizó un ensayo de super shift para determinar que la proteína que forma el complejo con la sonda es efectivamente el factor de transcripción ChREBP utilizando un anticuerpo específico anti-ChREBP.

Estos resultados en conjunto demuestran, *in vitro*, que el factor de transcripción ChREBP se une de manera específica al sitio ChoRE localizado en la región promotora del transportador SNAT2 para regular la transcripción de este gen.

En la tercera etapa del proyecto se determinó el efecto del silenciamiento del factor de transcripción ChREBP sobre la transcripción del transportador SNAT2. Para realizar el knock-down de la proteína ChREBP, la línea celular HepG2 (hepatoma humano) fue transfectada con el plásmido shRNA. Estas células fueron cotransfectadas con las construcciones SNAT2-Luciferasa y posteriormente fueron incubadas en medio DMEM con 5 mM o 25 mM de glucosa. El grupo control fue cotransfectado con los vectores vacíos correspondientes.



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

Los resultados mostraron valores similares de actividad de luciferasa en el grupo shRNA-ChREBP incubado en medio DMEM con 5 y 25 mM de glucosa. En cambio, en el grupo control, transfectado con el shRNA vacío, se observa una disminución en la actividad de luciferasa cuando se incubó en medio con alta concentración de glucosa.

Estos resultados confirman que el factor de transcripción ChREBP media el efecto represor de la transcripción de SNAT2 en presencia de un medio con alto contenido de carbohidratos.

Durante esta etapa también se realizó la generación de la mutación de sitio dirigido del sitio ChoRE utilizando el kit comercial QuickChange (Stratagene). Una vez obtenida la clona de la region promotora con el sitio ChoRE mutado podemos llevar a cabo el análisis de la actividad promotora de la secuencia mutada ante un estímulo de glucosa.

Por otro lado, durante esta etapa se realizó la determinación de la interacción de ChREBP con algunos corepresores por medio de un ensayo de co-inmunoprecipitación. Células de la línea celular HepG2 fueron transfectadas para sobre-expresar al factor ChREBP e incubadas en medio DMEM con 5 o 25 mM de glucosa. Sin embargo, es necesario llevar a cabo ensayos que confirmen la interacción de ChREBP con un corepresor.

Actualmente se estan llevando a cabo estos experimentos para poder concluir definitivamente el proyecto. El poder realizar estos experimentos adicionales le darán un mayor valor a nuestro trabajo para ser publicado en una revista de alto impacto.

Atentamente

Dr. Victor Manuel Ortiz Ortega



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

awse

México, D.F. a 10 de Febrero de 2016

Dr. Víctor M. Ortiz Ortega
Depto. Fisiología de la Nutrición
Presente

Estimado Dr. Ortiz:

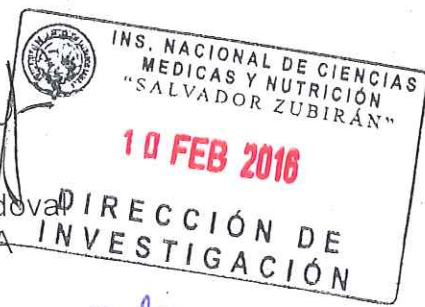
Por este conducto le informo que su proyecto: "EL PAPEL REPRESOR DE CHREBP SOBRE EL TRANSPORTADOR DE AMINOÁCIDOS NEUTROS DEPENDIENTE DE SODIO (SNTA2) Y SU EFECTO SOBRE EL METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS.", con registro CINVA: FNU-685-12/15-1 finalizó en enero del presente año. Por lo que, le solicito de la manera más atenta me haga saber si el proyecto requerirá una prórroga. En caso afirmativo, favor de enviar a la CINVA el periodo de extensión que solicita y de requerir un mayor número de animales especificar y justificar como se utilizarán y los procedimientos experimentales que se llevarán a cabo con los mismos. En caso de no requerir una prórroga favor de llenar el formato de cierre del protocolo que se anexa a la presente. De no recibir respuesta de su parte en el plazo de 30 días, el protocolo se dará por cerrado.

Sin otro particular por el momento, quedo de usted.

Atentamente,

[Handwritten signature]

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la CINVA



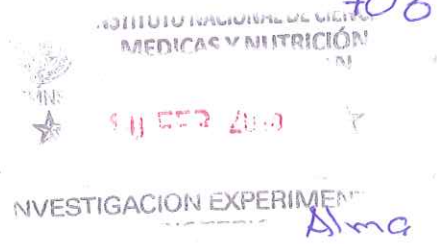
*Cerrado
10-marzo
2016
Mayra Ortega Ortiz
May.*

706

Avenida Vasco de Quiroga No. 15
Colonia Belisario Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
México, Distrito Federal
Tel. (52) 548 70900
www.incmnsz.mx

c.c.p. Dr. Gerardo Gamba Ayala, Director de Investigación
MVZ Mariela Contreras Escamilla, Jefa del DIEB

NAB/nom





INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

Ciudad de México, a 9 de Marzo del 2016

Dra. Norma Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la CINVA
Presente

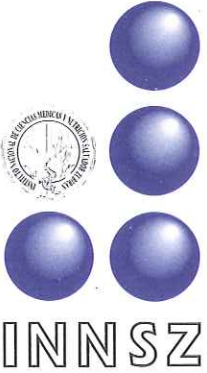
Estimada Dra. Bobadilla:

Por este conducto me permito solicitar el cierre del protocolo: **“El papel represor de Chrebp sobre el transportador de aminoácidos neutros dependiente de sodio (SNTA2) y su efecto sobre el metabolismo de aminoácidos”** con registro CINVA: FNU-685-12/15-1, debido a que el protocolo ha concluido.

Sin otro particular por el momento, quedo de usted.

Atentamente,

Dr. Víctor M. Ortiz Ortega
Nombre y Firma del (a) Investigador (a)



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN Enero 29, 2013

Dr. Victor Manuel Ortiz Ortega
Investigador en Ciencias Médicas
Departamento de Fisiología de la Nutrición
P r e s e n t e .

Con referencia al proyecto de investigación: "El papel represor de ChREBP sobre el Transportador de aminoácidos neutros dependiente de sodio (SNAT2) y su efecto sobre el metabolismo de aminoácidos".

Registro CINVA: 685

Clave: FNU-685-12/15-1

La Comisión de Investigación en Animales (CINVA) revisó su respuesta a las observaciones emitidas por la CINVA, y se decidió **APROBARLO** para su desarrollo.

Atentamente

Dr. Rafael Hernández González
Coordinador de la Comisión de Investigación en Animales

ccp. Dr. Rubén Lisker Y.- Director de Investigación
MVZ., M.en C. Octavio Villanueva Sánchez .Secretario de la Comisión de
Investigación en Animales
Dra. Nimbe Torres y Torres.- Comisión de Investigación en Animales

Investigación
Tradición Servicio
Asistencia Docencia

**INCMNSZ**
DIRECCIÓN DE NUTRICIÓN
01 FEB 2013
DEPARTAMENTO DE
FISIOLOGÍA DE LA NUTRICIÓN

- Vasco de Quiroga 15,
- Delegación Tlalpan
- C. P. 14000 México, D. F.
- Tel. 54-87-09-00

ACUSE

PROTOCOLO CLAVE: FNU-685-12/15-1

TÍTULO: El papel represor de ChREBP sobre el transportador de aminoácidos neutros dependiente de sodio (SNTA2) y su efecto sobre el metabolismo de aminoácidos

INVESTIGADOR RESPONSABLE: Ortiz Ortega Víctor Manuel

DEPARTAMENTO: Fisiología de la Nutrición



Observaciones.

1. Escribir correctamente el nombre de la cepa: **C57BL/6**
2. En el estudio de sobre-expresión de ChREBP se menciona que se:
 - a) inoculará virus por vía intrayugular. Es necesario describir el procedimiento.
 - b) extraerá sangre a los 6 días de inoculación. Especificar el procedimiento y volumen.
3. En el análisis estadístico establecer el valor de p para considerar la significancia estadística.

Objeciones

1. Describir correctamente el procedimiento para realizar la eutanasia por decapitación. **El CO2 no es un agente anestésico.**
2. Establecer los puntos terminales o críticos que determinaran la eutanasia en caso de dolor o sufrimiento de los animales.

PROTOCOLO CLAVE. BMG-741-12/14-1

TÍTULO: Contribución de la regulación de la expresión genética y proteica en los efectos ...

INVESTIGADOR RESPONSABLE: Larrieta Carrasco María Elena

DEPARTAMENTO: Unidad de biología molecular y medicina genómica

Observaciones.

1. Definir el número de animales por grupo.
2. Presentar justificación estadística para la determinación del tamaño de los grupos.

es al Convenio | Firma de Convenio | Firmas del Convenio

e Convenio

0017


00000000183037

Personalizar | Buscar | Primero 1 de 6

<u>Solicitud</u>	<u>Descripción</u>	<u>Código de Responsable</u>	<u>Firma</u>	<u>Fecha/Hora de firma</u>	<u>Requerido</u>
000000000183037	RAYGOZA RENDÓN,KARLA	S. Admin.	<input checked="" type="checkbox"/>	20/11/2012 12:24:50	<input type="checkbox"/>
000000000183037	FABILA CASTILLO,LUIS HUMBERTO	S. Tecnic.	<input checked="" type="checkbox"/>	15/11/2012 14:07:14	<input type="checkbox"/>
000000000183037	ORTIZ ORTEGA,VICTOR MANUEL	R. Técnico	<input checked="" type="checkbox"/>	31/10/2012 12:16:06	<input type="checkbox"/>
000000000183037	KERSHENOBICH STALNIKOWITZ.DAVI	R. Legal	<input checked="" type="checkbox"/>	14/11/2012 08:08:22	<input type="checkbox"/>
000000000183037	ARREDONDO URZUA,MARTHA	R. Admvo.	<input checked="" type="checkbox"/>	14/11/2012 11:30:00	<input type="checkbox"/>
000000000183037	ALMAZÁN AGUILERA,SUSANA	RC	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

[Volver a Buscar](#) | [Seguiente en Lista](#) | [Anterior en Lista](#) | [Notificar](#)

[es al Convenio](#) | [Firma de Convenio](#) | [Firmas del Convenio](#) | [Anexo y/o modificatorios](#)

Observaciones al Convenio | Firma de Convenio | Firmas del Convenio | 

FOL-695

Observaciones al Convenio

Fondo 10017
 Solicitud 000000000183037
 Status 001 Envió de Comentario

[Mostrar Convenio](#)[Enviar Observaciones](#)[Visto Bueno](#)[Imprimir en Papel](#)**CONVENIO DE ASIGNACIÓN DE RECURSOS**

1010/176/2012

MOD. ORD. 27/2012

CB-2012-01
000000000183037

CONVENIO DE ASIGNACIÓN DE RECURSOS QUE CELEBRAN POR UNA PARTE NACIONAL FINANCIERA, S.N.C., FIDUCIARIA DEL FIDEICOMISO DENOMINADO "FONDO SECTORIAL DE INVESTIGACIÓN PARA LA EDUCACIÓN", AL QUE EN LO SUCESIVO SE LE DENOMINARÁ EL "FONDO", REPRESENTADO EN ESTE ACTO POR LA LIC. KARLA RAYGOZA RENDÓN, QUIEN ES TAMBIÉN SECRETARIA ADMINISTRATIVA DEL COMITÉ TÉCNICO Y DE ADMINISTRACIÓN DEL "FONDO", ASISTIDA EN ESTE ACTO POR EL DR. LUIS HUMBERTO FABILA CASTILLO, EN SU CARÁCTER DE SECRETARIO TÉCNICO DEL COMITÉ TÉCNICO Y DE ADMINISTRACIÓN DEL "FONDO"; Y POR OTRA PARTE EL/LA INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION SALVADOR ZUBIRAN, A QUIÉN EN LO SUCESIVO SE LE DENOMINARÁ EL "SUJETO DE APOYO", REPRESENTADO EN ESTE ACTO POR EL/LA DR. DAVID KERSHENOBICH STALNIKOWITZ EN SU CALIDAD DE REPRESENTANTE LEGAL, INSTRUMENTO QUE SUJETAN AL TENOR DE LOS ANTECEDENTES, DECLARACIONES Y CLÁUSULAS SIGUIENTES:

ANTECEDENTES

1. Uno de los objetos primordiales de la Ley de Ciencia y Tecnología (LCyT), contenido en su artículo 1º, consiste en regular los apoyos que el Gobierno Federal se encuentra obligado a otorgar, para impulsar, fortalecer y desarrollar la investigación científica y tecnológica en el país, así como para determinar los instrumentos jurídicos, financieros y administrativos, mediante los cuales cumplirá con esta obligación de apoyo.
2. La Ley Orgánica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología dispone, en su artículo 13 que la canalización de recursos por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, en adelante el "CONACYT", a programas, proyectos, estudios, investigaciones específicas, otorgamiento de becas, en sus diferentes modalidades y cualquier otro apoyo o ayuda de carácter económico que convenga o proporcione, estará siempre sujeta a la celebración de un contrato o convenio, según



sea el caso.

3. El "CONACYT" con base en las atribuciones legales de que dispone y de conformidad con los lineamientos establecidos en el Plan Nacional de Desarrollo (PND) y en el Programa Especial de Ciencia, Tecnología e Innovación (PECITI), cuyas líneas estratégicas establecen el apoyo a la Ciencia, la Tecnología y la Innovación como elementos de desarrollo del país y el bienestar de la sociedad en su conjunto, tuvo a bien expedir las Reglas de Operación de los Programas del "CONACYT", dentro de las cuales se incluyen las relativas a los Programas de Fomento a la Investigación Científica y de Fomento a la Innovación y al Desarrollo Tecnológico, así como el subprograma de Ciencia Básica aprobado por la Junta de Gobierno del "CONACYT" en su XIII Sesión Ordinaria celebrada en el mes de julio de 2005, el cual contempla dentro de sus objetivos el brindar apoyo al desarrollo de proyectos de investigación básica que contribuyan a incrementar el conocimiento científico en general, ampliar las fronteras del conocimiento, mejorar la calidad de la educación en ciencia y tecnología, fortalecer los posgrados y ampliar la infraestructura científica y tecnológica nacional.
4. Con fecha 4 de diciembre de 2002, la Secretaría de Educación Pública y el "CONACYT", con fundamento en los artículos 15, fracción II, 17 y 18 de la Ley para el Fomento de la Investigación Científica y Tecnológica, actualmente 23, fracción II, 25 y 26 de la LCyT, celebraron un Convenio para establecer el "FONDO".
5. El Convenio de Colaboración celebrado entre la Secretaría de Educación Pública y el "CONACYT" para establecer el "FONDO" fue modificado con fecha 21 de septiembre de 2009, con el objeto de ampliar la vigencia de dicho instrumento y actualizarlo para continuar la operación del "FONDO".
6. El "FONDO" en términos del artículo 25, fracción II de la LCyT, considera como sujetos de apoyo a las Universidades e Instituciones de Educación Superior, públicas y particulares, centros, laboratorios, empresas públicas y privadas y demás personas que se inscriban en el Registro Nacional de Instituciones y Empresas Científicas y Tecnológicas (RENIECYT), los cuales son elegidos mediante concurso y bajo las modalidades que expresamente determine el Comité Técnico y de Administración con apego a las Reglas de Operación del Fideicomiso y según la Convocatoria de Investigación Científica Básica 2012.
7. Con el fin de ajustar la operación y administración del "FONDO", el Comité Técnico y de Administración en su Décimo Octava Reunión Ordinaria, de fecha 15 de diciembre del 2011, mediante acuerdo número 06-SORD18-11 aprobó modificaciones a las Reglas de Operación del "FONDO", lo que hace necesario ajustar el "CONTRATO".
8. En razón de lo anterior, el 15 de junio de 2012, se firmó el Segundo Convenio Modificatorio al Contrato del Fideicomiso del "FONDO" celebrado por el "CONACYT", en su calidad de Fideicomitente; y por otra parte, como la Institución Fiduciaria, Nacional Financiera, S.N.C., el cual tiene por objeto la modificación de las Cláusulas Sexta, Séptima, Octava, Novena, Décima, Décima Primera y Décima Segunda, Décima Cuarta, Décima Séptima y Vigésima Segunda del "CONTRATO".
9. El Comité Técnico y de Administración, previo proceso de evaluación a que se refieren las Reglas de Operación del "FONDO", en su Sesión Ordinaria número 19 de fecha 26 de junio de 2012, mediante Acuerdo número 16-SORD19-12, autorizó la canalización de recursos a favor del "SUJETO DE APOYO", por un monto de \$1,423,480.00 (UN MILLON CUATROCIENTOS VEINTITRES MIL CUATROCIENTOS OCHENTA PESOS 00/100 MN), para el desarrollo del proyecto denominado EL PAPEL REPRESOR DE CHREBP SOBRE EL TRANSPORTADOR DE AMINOACIDOS NEUTROS DEPENDIENTE DE SODIO (SNAT2) Y SU EFECTO SOBRE EL METABOLISMO DE AMINOACIDOS., en lo sucesivo el "PROYECTO".

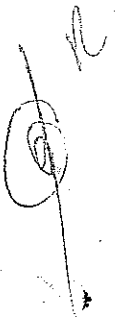
DECLARACIONES

I. El "FONDO" a través de su representante declara que:

- A. Con fecha 27 de diciembre del 2002, el "CONACYT" en su calidad de Fideicomitente, celebró con Nacional Financiera, S.N.C., en su calidad de Institución Fiduciaria, el Contrato de Fideicomiso del "FONDO", en lo sucesivo el "CONTRATO", cuya finalidad fundamental es la canalización de recursos para la realización de investigaciones científicas o tecnológicas, innovación y desarrollos tecnológicos, formación de recursos humanos especializados, becas, divulgación científica y tecnológica, creación y fortalecimiento de grupos o cuerpos académicos de investigación y desarrollo tecnológico y de la infraestructura de investigación y desarrollo que requiera el sector. Lo anterior, en el marco de los programas que el Comité Técnico y de Administración apruebe.
- B. El Contrato de Fideicomiso del "FONDO" celebrado entre el "CONACYT" y Nacional Financiera, S.N.C., fue modificado el 21 de septiembre de 2009, para ampliar la vigencia de dicho instrumento y actualizarlo con el fin de continuar con la operación del "FONDO".
- C. La Secretaría de Educación Pública, con fecha 1º de noviembre de 2010, designó a la Lic. Karla Raygoza Rendón como Secretaria Administrativa del "FONDO" con los derechos y obligaciones contenidos en el "CONTRATO" y en sus Reglas de Operación.
- D. El Comité Técnico y de Administración del "FONDO", en su sesión número 16 de fecha 17 de diciembre de 2010, instruyó a la Fiduciaria el otorgamiento del poder por virtud del cual comparece a la celebración del presente Convenio.
- E. Nacional Financiera S.N.C., en su calidad de Institución Fiduciaria y en cumplimiento a lo dispuesto en el inciso que antecede, le otorgó a la Lic. Karla Raygoza Rendón, poder general para pleitos y cobranzas, actos de administración y para cubrir y manejar cuentas bancarias, mismo que se hizo constar en el testimonio de la escritura pública número 119209 de fecha 27 enero de 2011, otorgada ante la fe del Lic. José Ángel Villalobos Magaña, Notario Público número 9 del Distrito Federal.
- F. Tiene establecido su domicilio en Avenida Insurgentes Sur número 1971, Torre IV, piso 6, Colonia Guadalupe Inn, Delegación Álvaro Obregón, México, Distrito Federal, C.P. 01020, mismo que señala para los fines y efectos legales de este Convenio.

II. El "SUJETO DE APOYO" a través de su representante declara que:

- A. Es un organismo público descentralizado, con personalidad jurídica y patrimonio propios, de conformidad con lo dispuesto en los artículos 3, 9 y 45 de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 2, 14 y 15 de la Ley Federal de las Entidades Paraestatales; 1, 5 fracción III; 9 fracción III de la Ley de los Institutos Nacionales de Salud, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 26 de mayo de 2000; 3 fracciones I, II, XIV; 34 fracción I del Estatuto Orgánico del Instituto, publicado en el Diario Oficial de la Federación el 20 de Octubre de 2009.
- B. El (la) DR. DAVID KERSHENOBICH STALNIKOWITZ cuenta con las facultades para suscribir el presente Convenio, tal y como se desprende de la escritura pública número 137232, de fecha 21 de junio de 2012, pasada ante la fe del LIC. IGNACIO SOTO BORJA, Notario Público número 129, del DISTRITO FEDERAL, MÉXICO, D. F.; manifestando que a la fecha de firma del presente instrumento, sus facultades no le han sido revocadas ni modificadas en forma alguna.



- C. El Registro Federal de Contribuyentes inscrito en la Secretaría de Hacienda y Crédito Público es INC710101RH7.
- D. En atención a la Convocatoria 2012, presentó a concurso la propuesta denominada: "EL PAPEL REPRESOR DE CHREBP SOBRE EL TRANSPORTADOR DE AMINOACIDOS NEUTROS DEPENDIENTE DE SODIO (SNAT2) Y SU EFECTO SOBRE EL METABOLISMO DE AMINOACIDOS.", con clave número 000000000183037, de la que se derivó el "PROYECTO", mismo que se relaciona en el Antecedente 9, que forma parte del objeto del presente Convenio.
- E. Tiene establecido su domicilio en VASCO DE QUIROGA EXT/INT 15, SECCIÓN XVI, TLALPAN, C.P. 14000, MÉXICO, DISTRITO FEDERAL, mismo que señala para los fines y efectos legales de este Convenio.
- F. En cumplimiento a lo dispuesto por los artículos 16, 17 y 25, fracción II de la LCyT, se encuentra inscrito en el Registro Nacional de Instituciones y Empresas Científicas y Tecnológicas (RENIECYT) a cargo del "CONACYT", tal y como se acredita con la constancia de inscripción número 006.

III. Declaración Conjunta:

ÚNICA. Las partes expresamente manifiestan su conocimiento al contenido de lo dispuesto por el artículo 12, fracción II de la LCyT que a la letra dice: "Los resultados de las actividades de investigación, desarrollo tecnológico e innovación que sean objeto de apoyos en términos de esta Ley serán invariablemente evaluados y se tomarán en cuenta para el otorgamiento de apoyos posteriores".

Expuesto lo anterior, las partes se obligan de acuerdo con las siguientes:

CLÁUSULAS

PRIMERA. OBJETO

El objeto del presente Convenio consiste en canalizar los recursos asignados por el "FONDO" en favor del "SUJETO DE APOYO", para la realización del "PROYECTO" aprobado, denominado EL PAPEL REPRESOR DE CHREBP SOBRE EL TRANSPORTADOR DE AMINOACIDOS NEUTROS DEPENDIENTE DE SODIO (SNAT2) Y SU EFECTO SOBRE EL METABOLISMO DE AMINOACIDOS., cuya responsabilidad de ejecución y correcta aplicación de los recursos, queda, desde este momento, plenamente asumida por el "SUJETO DE APOYO".

El objetivo del "PROYECTO" es Determinar si ChREBP regula la transcripción del transportador SNAT2 a través de su unión directa al sitio ChoRE localizado en la región promotora de este gen en respuesta a una alta concentración de glucosa..

El "FONDO" con cargo a su patrimonio, y en cumplimiento de los acuerdos tomados por el Comité Técnico y de Administración, y con sujeción a lo establecido en el presente Convenio, canaliza al "SUJETO DE APOYO" la cantidad total de \$1,423,480.00 (UN MILLON CUATROCIENTOS VEINTITRES MIL CUATROCIENTOS OCHENTA PESOS 00/100 MN).

SEGUNDA. ANEXOS

Los Anexos que forman parte integral del presente Convenio se componen por lo siguiente:

1. El Anexo Uno contiene el Desglose Financiero del "PROYECTO".
2. El Anexo Dos contiene los objetivos, metas, actividades, entregables y plazos con los que se aprobó el "PROYECTO".

Los Anexos sólo podrán ser modificados si para ello concurre la voluntad de las partes, mediante acuerdo por escrito.

TERCERA. OBLIGACIONES DEL "FONDO"

a) Canalizar al "SUJETO DE APOYO" los recursos económicos a que se refiere la Cláusula Primera de este instrumento, mismos que serán entregados en términos de lo presentado en la propuesta contenida en el Anexo Uno, a través de las ministraciones correspondientes a cada una de las etapas que conforman en su conjunto el "PROYECTO".

b) Vigilar por conducto del Secretario Técnico la debida aplicación y adecuado aprovechamiento de los recursos económicos, efectivamente canalizados al "SUJETO DE APOYO".

c) El "FONDO", a través de los medios que considere pertinentes, podrá en cualquier momento realizar auditorías y/o practicar visitas de supervisión, con el propósito de constatar el grado de avance en el desarrollo de los trabajos y la correcta aplicación de los recursos canalizados al "SUJETO DE APOYO".

CUARTA. OBLIGACIONES DEL "SUJETO DE APOYO"

a) El "SUJETO DE APOYO" se obliga a destinar bajo su más estricta responsabilidad los recursos económicos ministrados por el "FONDO", exclusivamente a la realización del "PROYECTO", de conformidad con lo dispuesto en el presente Convenio y los Anexos que forman parte integral del mismo.

b) El "SUJETO DE APOYO" queda expresamente obligado a proporcionar las facilidades necesarias para permitir el acceso a sus instalaciones, así como para mostrar la información técnica y financiera que le sea solicitada por el "FONDO".

c) Rendir los informes a que hace referencia la Cláusula Quinta de este Convenio.

QUINTA. INFORMES

El "SUJETO DE APOYO" deberá presentar los informes respecto del avance del "PROYECTO", de conformidad con lo siguiente:

1. Informe Técnico al cierre de cada etapa conforme a las actividades establecidas en el Anexo Dos del "PROYECTO".
2. Informe Financiero acorde al Desglose establecido en el Anexo Uno del "PROYECTO".

Los Informes mencionados deberán contener los entregables comprometidos para esa etapa, la información de la aplicación de los recursos canalizados, y una valoración razonable sobre la viabilidad de alcanzar el objetivo del "PROYECTO" por parte del "SUJETO DE APOYO".



La recepción de los Informes como soporte, no implica la aceptación definitiva de los resultados, ya que serán debidamente evaluados tanto por el Secretario Técnico (Informe Técnico), como por la Secretaria Administrativa (Informe Financiero) respectivamente, para proceder a la entrega de la ministración correspondiente. En caso de que la evaluación sea positiva le será ministrada la siguiente etapa y de ser negativa los Secretarios antes mencionados procederán a requerir sea subsanada la irregularidad o en su caso, se suspenda o se cancele el apoyo.

Al término del "PROYECTO", el "SUJETO DE APOYO" deberá presentar al Secretario correspondiente un Informe Final Técnico y uno Financiero dentro de los 30 (treinta) días naturales contados a partir de la fecha de conclusión del "PROYECTO", en el Informe Final Financiero se incluirá la solicitud expresa del finiquito de los recursos económicos otorgados, considerando el debido cumplimiento del "PROYECTO" y que los recursos canalizados fueron utilizados única y exclusivamente para su desarrollo.

Para la expedición del Finiquito será indispensable que al término del "PROYECTO", el "SUJETO DE APOYO" reembolse al "FONDO" el remanente de los recursos económicos que no haya aplicado al desarrollo del "PROYECTO", en la cuenta que se determine para tal efecto.

De proceder los Informes Finales Técnico, Financiero y el Finiquito, el "FONDO" por conducto del Secretario Técnico y de la Secretaria Administrativa emitirán un dictamen respectivamente, en el que se contendrá la resolución de cierre del "PROYECTO", conforme a los criterios y procedimientos establecidos por el "FONDO".

El "SUJETO DE APOYO" deberá de guardar toda aquella información técnica-financiera que se genere y que estime relevante para realizar futuras evaluaciones sobre el "PROYECTO", durante un periodo de 5 (cinco) años posteriores a la conclusión de los apoyos otorgados por el "FONDO".

SEXTA. CANALIZACIÓN DE RECURSOS

El "FONDO" por conducto de la Secretaria Administrativa, canalizará los recursos al "SUJETO DE APOYO" en los términos establecidos en el Anexo Uno.

El "SUJETO DE APOYO" deberá presentar recibo institucional o factura según corresponda por cada una de las ministraciones.

Una vez liberada la primera ministración y a la conclusión de la primera etapa del "PROYECTO", el "SUJETO DE APOYO" presentará el Informe Técnico y el Informe Financiero, a efecto de que se realice la ministración correspondiente al periodo siguiente y así sucesivamente, hasta la conclusión del "PROYECTO".

Dicha ministración se realizará siempre y cuando ambas evaluaciones sean favorables.

SÉPTIMA. ÁREAS DE COORDINACIÓN

La Secretaria Administrativa realizará el seguimiento financiero y administrativo del uso de los recursos del "FONDO" por el "SUJETO DE APOYO" en el "PROYECTO" aprobado.

El Secretario Técnico coordinará el seguimiento técnico del "PROYECTO" apoyado con los recursos del "FONDO" así como la evaluación de resultados del mismo.

El "SUJETO DE APOYO" designa a DR. VICTOR MANUEL ORTIZ ORTEGA, como Responsable Técnico del "PROYECTO", quien será el enlace con el Secretario Técnico del "FONDO" para los asuntos técnicos, teniendo como obligación principal la de coordinar:

el desarrollo del "PROYECTO", presentar el informe de cierre, y en general supervisar el fiel cumplimiento del presente Convenio.

En caso de ausencia temporal mayor a 90 (noventa) días naturales o definitiva del Responsable Técnico, el "SUJETO DE APOYO" deberá designar al sustituto, notificando de ello al Secretario Técnico del "FONDO", en un plazo que no excederá de 15 (quince) días naturales posteriores a que éste se ausente.

El "SUJETO DE APOYO" designa a C.P. MARTHA ARREDONDO URZUA, como Responsable Administrativo del "PROYECTO", quien auxiliará al Responsable Técnico en su función de enlace con la Secretaría Administrativa y tendrá como obligación directa el manejo de los recursos del apoyo económico canalizado al "SUJETO DE APOYO", así como los asuntos contables y administrativos del "PROYECTO".

En caso de ausencia temporal mayor a 90 (noventa) días naturales o definitiva del Responsable Administrativo, el "SUJETO DE APOYO" deberá designar al sustituto, notificando de ello a la Secretaría Administrativa del "FONDO", en un plazo que no excederá de 15 (quince) días naturales posteriores a que éste se ausente.

OCTAVA. CUENTA BANCARIA

El "SUJETO DE APOYO" deberá disponer de una cuenta de cheques, a través de la cual se le canalizarán las ministraciones correspondientes a cada etapa, misma que deberá ser notificada a la Secretaría Administrativa del "FONDO", debiendo estar a nombre del "SUJETO DE APOYO", la cual será operada mancomunadamente por el Responsable Técnico y el Responsable Administrativo a que se refiere la Cláusula anterior, únicamente para administrar los recursos canalizados al "PROYECTO", por lo que será necesario que la misma se encuentre acreditada ante el "FONDO", previamente a la entrega de la primera ministración.

En caso de que el "SUJETO DE APOYO" maneje cuentas concentradoras, deberá asignar una cuenta específica para el "PROYECTO" notificando de ello a la Secretaría Administrativa, a fin de que se acredite la misma.

En caso de que las cuentas de cheques o concentradoras generen rendimientos, estos deberán ser reintegrados al "FONDO" al término del "PROYECTO", a través de la cuenta que se determine para tal efecto.

Los recursos asignados al "PROYECTO" deberán permanecer en la cuenta específica del mismo, hasta en tanto no sean ejercidos en términos de lo aprobado por el Comité Técnico y de Administración. Los recursos depositados en la cuenta no podrán transferirse a otras cuentas que no estén relacionadas con el objeto del proyecto.

Las ministraciones que se otorguen para la realización de los proyectos no formarán parte del patrimonio del "SUJETO DE APOYO", ni de su presupuesto.

Es obligación del Responsable Administrativo del "PROYECTO" cumplir con todos los requisitos administrativos y contables derivados del presente Convenio.

Asimismo, las aportaciones líquidas, concurrentes y/o complementarias se deberán depositar en la misma cuenta bancaria, para aplicarse en los rubros comprometidos de conformidad con las cantidades y conceptos aprobados que se detallan en el Anexo Uno, el cual forma parte integral del presente Convenio.

Las aportaciones líquidas, concurrentes y/o complementarias realizadas para el desarrollo del "PROYECTO" por el "SUJETO DE APOYO", previas a la formalización del presente instrumento, no se contabilizarán como aportaciones líquidas, concurrentes y/o complementarias del "SUJETO DE APOYO" para el desarrollo del mismo.

El "SUJETO DE APOYO" deberá abrir un sistema de registro contable de los movimientos financieros relativos al "PROYECTO", así como contar con un expediente específico para la documentación del mismo.

NOVENA. PROPIEDAD INDUSTRIAL Y/O DERECHOS DE AUTOR

Las partes convienen en que los Derechos de Propiedad Industrial y/o los Derechos de Autor que se generen como resultado del desarrollo del "PROYECTO", serán propiedad de la persona física o moral, a quien conforme a Derecho le correspondan, en el entendido de que el "FONDO" no tendrá interés jurídico sobre esos derechos.

El "SUJETO DE APOYO" estará obligado a informar por escrito al Secretario Técnico del "FONDO" sobre el estado que guarden los citados derechos y sobre las posibles implicaciones que ello represente para la viabilidad del "PROYECTO".

En las publicaciones o presentaciones que se realicen, derivadas o relacionadas con el resultado del "PROYECTO", el "SUJETO DE APOYO" deberá dar, invariablemente, el crédito correspondiente al "FONDO".

El "FONDO" se reserva el uso de los derechos de propiedad intelectual derivados del "PROYECTO" en aquellos casos en que exista un interés de Estado debidamente justificado, sujetándose a los términos y condiciones que se estipulen en el convenio correspondiente.

DÉCIMA. INFORMACIÓN RESERVADA

Las partes se comprometen a tratar como reservada toda la información intercambiada o acordada con motivo del presente instrumento y la necesaria para el desarrollo del "PROYECTO", excepto aquella que deba considerarse pública en términos de lo dispuesto en la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública Gubernamental, su Reglamento y demás disposiciones jurídicas aplicables.

DÉCIMA PRIMERA. ACCESO A LA INFORMACIÓN

El "SUJETO DE APOYO" se compromete a proporcionar la información del "PROYECTO" requerida por el Sistema Integrado de Información sobre Investigación Científica y Tecnológica (SIICYT) que opera el "CONACYT". Dicha información será publicada en su página de Internet, dando con ello cumplimiento a las disposiciones de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública Gubernamental.

Al término del "PROYECTO", el Responsable Técnico deberá entregar al Secretario Técnico los productos obtenidos con el desarrollo del mismo y se compromete a apoyar en el proceso de transferencia de tecnología, adopción, adaptación, asimilación, entre otros.

El "SUJETO DE APOYO" se compromete a reportar al Secretario Técnico, el impacto Científico y/o Tecnológico derivado del "PROYECTO" desarrollado.

DÉCIMA SEGUNDA. RESCISIÓN

El "FONDO" podrá rescindir el presente Convenio al "SUJETO DE APOYO", sin necesidad de declaración judicial previa ni de dar aviso por escrito, cuando éste incurra en alguno de los supuestos de incumplimiento que de manera enunciativa más no limitativa, a

continuación se señalan:

- a) Aplique los recursos canalizados por el "FONDO" con finalidades distintas a la realización directa del "PROYECTO".
- b) No presente los Informes Técnicos y Financieros al cierre de cada etapa o no atienda las observaciones emitidas por las instancias de evaluación y seguimiento.
- c) No presente los Informes Técnico y Financiero finales o no lo haga satisfactoriamente.
- d) No brinde las facilidades de acceso a la información, o a las instalaciones donde se administra y desarrolla el "PROYECTO".
- e) El estado del "PROYECTO" no guarde congruencia con los informes hasta ese momento presentados.
- f) Por identificación de desviaciones no reportadas en la etapa de desarrollo correspondiente, por parte de los Responsables Técnico y/o Administrativo.
- g) No compruebe la debida aplicación de los recursos canalizados para el "PROYECTO" cuando le sea expresamente requerido por el "FONDO".
- h) Proporcione información o documentación falsa.
- i) Retirar los recursos de la cuenta específica del "PROYECTO" para transferirlos a otras cuentas no relacionadas con el objeto del mismo.
- j) Incurra en algún otro incumplimiento a este Convenio y a sus Anexos.

Cuando el "FONDO", ejercite el derecho contenido en la presente Cláusula, el "SUJETO DE APOYO" reembolsará el remanente de los recursos que le fueron canalizados en un plazo no mayor de 30 (treinta) días naturales, contados a partir del requerimiento escrito que se le formule para tales efectos, con independencia de que se haga acreedor a la sanción a que se refiere la Cláusula siguiente.

DÉCIMA TERCERA. INCUMPLIMIENTO

En aquellos casos en que el incumplimiento por parte del "SUJETO DE APOYO", a través de su Responsable Técnico, a las obligaciones que asume por virtud del presente Convenio, sea tan grave que impida continuar con el desarrollo del "PROYECTO" y el "SUJETO DE APOYO", a través de su Responsable Técnico, no subsane el incumplimiento, el "FONDO" procederá a cancelar el apoyo, y el Responsable Técnico del "PROYECTO" dejará de ser beneficiario de los apoyos que otorga el Gobierno Federal en esta materia, pudiendo tomarse en cuenta este incumplimiento para la participación futura de apoyos de los programas del "CONACYT", incluyendo los diversos Fondos regulados en la LCYT.

DÉCIMA CUARTA. CASO FORTUITO Y/O FUERZA MAYOR

En el supuesto de que por causas de fuerza mayor no pueda terminarse el "PROYECTO", el "SUJETO DE APOYO" deberá notificar al "FONDO" las causas por las que no se puede concluir, debiendo reembolsar en la cuenta que para tal efecto se determine, el remanente de los recursos económicos, que en su caso no hayan aplicado "PROYECTO", en un plazo no mayor a 15 (quince) días naturales contados a partir de la notificación correspondiente.

DÉCIMA QUINTA. TERMINACIÓN ANTICIPADA

El "FONDO" podrá dar por terminado de manera anticipada el presente Convenio, cuando a su juicio existan circunstancias que impidan continuar con el desarrollo del "PROYECTO", previa notificación por escrito que se haga al "SUJETO DE APOYO" con una anticipación mínima de 5 (cinco) días naturales.

En el supuesto de terminación anticipada del presente Convenio, el "SUJETO DE APOYO" reembolsará en depósito al "FONDO", a la cuenta que se determine para tal efecto, el remanente de los recursos de apoyo económico que, en su caso, no haya aplicado al "PROYECTO", en un plazo no mayor a 15 (quince) días naturales contados a partir de la fecha de conclusión del mismo.

En cualquier caso de devolución de recursos económicos del "PROYECTO", el Responsable Administrativo del "PROYECTO" tiene la obligación de dar aviso de inmediato a la Secretaría Administrativa de la devolución de los recursos al "FONDO", y comprobar dicha devolución mediante la entrega de la copia de la ficha de depósito o de la transferencia bancaria, para que el recurso devuelto sea identificado inmediatamente.

DÉCIMA SEXTA. RELACIÓN LABORAL

El "FONDO" no establecerá ninguna relación de carácter laboral con el personal que el "SUJETO DE APOYO" llegase a ocupar para la realización del "PROYECTO"; en consecuencia, las partes acuerdan que el personal designado, contratado o comisionado para la realización del "PROYECTO", estará bajo la dependencia directa del "SUJETO DE APOYO"; y por lo tanto, en ningún momento se considerará al "FONDO" como patrón solidario o sustituto, ni tampoco al "SUJETO DE APOYO" como intermediario, por lo que el "FONDO" no asumen ninguna responsabilidad que pudiera presentarse en materia de trabajo y seguridad social, por virtud del presente Convenio.

DÉCIMA SÉPTIMA. RESPONSABILIDAD CIVIL

Queda expresamente pactado que las partes no tendrán responsabilidad civil por los daños y perjuicios que pudieran causarse como consecuencia de caso fortuito o fuerza mayor, particularmente por el paro de labores académicas o administrativas, en la inteligencia de que una vez superados estos eventos, se reanudarán las actividades en la forma y términos que dictaminen las partes.

DÉCIMA OCTAVA. PREVISIONES ÉTICAS, ECOLÓGICAS Y DE SEGURIDAD

El "SUJETO DE APOYO" se obliga a cumplir y hacer cumplir durante el desarrollo del "PROYECTO" y hasta su conclusión la legislación aplicable especialmente en materia ecológica, de protección a la bioseguridad y la biodiversidad, así como a respetar las convenciones y protocolos en materia ética aplicada a la investigación, la legislación aplicable y la normatividad institucional en materia de seguridad.

DÉCIMA NOVENA. ACTUALIZACIÓN DE DATOS EN EL RENIECYT

El "SUJETO DE APOYO" tendrá la obligación de informar a la Secretaría Administrativa, entre otros cambios los de su situación económica, cambio de domicilio legal, razón o denominación social o representante legal. Asimismo el "SUJETO DE APOYO" se obliga

a mantener actualizada su inscripción e información en el RENIECYT.

VIGÉSIMA. VIGENCIA

El presente Convenio tendrá una vigencia de 36 meses, contados a partir de la fecha de la primera ministración, entendiéndose como formalizado al momento en que se cuente con la firma de todas y cada una de las partes que intervienen en el mismo.

No obstante, la vigencia al Convenio podrá prorrogarse siempre que se cuente con el consentimiento de las partes y el Acuerdo que al respecto emita el Comité Técnico y de Administración del "FONDO", mismo que formará parte integral del presente instrumento.

Las obligaciones a cargo del "SUJETO DE APOYO" concluyen hasta que el "FONDO" expida el oficio de Acta Finiquito.

VIGÉSIMA PRIMERA. ASUNTOS NO PREVISTOS

Los asuntos relacionados con el objeto de este Convenio y que no queden expresamente previstos en sus Cláusulas, ni en sus Anexos, serán interpretados y resueltos de común acuerdo por las partes, apelando a su buena fe y consecución de mismos propósitos, haciendo constar sus decisiones por escrito.

VIGÉSIMA SEGUNDA. CONSENTIMIENTO ELECTRÓNICO

En términos del artículo 1803, fracción I del Código Civil Federal, las partes acuerdan que es su voluntad aceptar íntegramente el contenido obligacional de este Convenio a través de su suscripción mediante el Sistema de People Soft, por lo que reconocen que dicho medio, constituye el consentimiento expreso del presente acuerdo de voluntades.

VIGÉSIMA TERCERA. AUSENCIA DE VICIOS DE VOLUNTAD

Las partes manifiestan que en la celebración del presente convenio no ha mediado circunstancia alguna que induzca a error, dolo, mala fe u otra circunstancia que afecte o vicie la plena voluntad con que celebran el presente instrumento, por lo que el mismo es válido para todos los efectos legales conducentes.

VIGÉSIMA CUARTA. JURISDICCIÓN

Para la solución a toda controversia que se pudiera suscitar con motivo de la interpretación, ejecución y cumplimiento del presente Convenio y sus Anexos, y que no se resuelva de común acuerdo por las partes, éstas se someterán a las Leyes Federales vigentes y Tribunales Federales competentes de la Ciudad de México, Distrito Federal, renunciando desde ahora a cualquier otro fuero que les pudiera corresponder en razón de sus respectivos domicilios presentes o futuros.

PREVIA LECTURA Y CON PLENO CONOCIMIENTO DE SU CONTENIDO, LAS PARTES EXPRESAN SU CONSENTIMIENTO ELECTRÓNICO AL PRESENTE INSTRUMENTO QUE A CONTINUACIÓN SE INSERTA PARA CADA UNA DE ELLAS.

POR EL "FONDO"

POR EL "SUJETO DE APOYO"

LIC. KARLA RAYGOZA RENDÓN
REPRESENTANTE LEGAL DEL "FONDO"
Y SECRETARIA ADMINISTRATIVA

DR. DAVID KERSHENOSICH
STALNIKOWITZ
REPRESENTANTE LEGAL

DR. LUIS HUMBERTO FABILA CASTILLO
SECRETARIO TÉCNICO

DR. VICTOR MANUEL ORTIZ ORTEGA
RESPONSABLE TÉCNICO

C.P. MARTHA ARREDONDO URZUA
RESPONSABLE ADMINISTRATIVO

LAS FIRMAS QUE ANTECEDEN, CORRESPONDEN AL CONVENIO DE ASIGNACIÓN DE RECURSOS QUE CELEBRAN NACIONAL FINANCIERA, S.N.C., EN SU CARÁCTER DE FIDUCIARIA DEL FIDEICOMISO PÚBLICO DE ADMINISTRACIÓN E INVERSIÓN DENOMINADO "PONDO SECTORIAL DE INVESTIGACIÓN PARA LA EDUCACIÓN", EL "FONDO" Y INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION SALVADOR ZUBIRAN, EL "SUJETO DE APOYO", MEDIANTE EL CUAL ESTABLECEN LAS CONDICIONES PARA OTORGAR EL APOYO PARA LLEVAR A CABO EL "PROYECTO" DENOMINADO EL PAPEL REPRESOR DE CHREBP SOBRE EL TRANSPORTADOR DE AMINOACIDOS NEUTROS DEPENDIENTE DE SODIO (SNAT2) Y SU EFECTO SOBRE EL METABOLISMO DE AMINOACIDOS..

Anexo 2: Cronograma de actividades por etapa

Etapa #	Descripción De La Etapa	Descripción De La Meta	Actividades	Productos	Fecha inicial DD-MM-AAAA	Fecha de termino DD-MM-AAAA	Fecha informe avance y final DD-MM-AAAA
001	Esta etapa consta de dos partes: 1) Evaluar el efecto agudo in vivo de una dieta alta en carbohidratos sobre la expresión del gen del transportador SNAT2 en ratas y, 2) Análisis de la región promotora del gen del transportador SNAT2 e identificación del sitio ChoRE	Determinar la abundancia relativa del RNAm de SNAT2 en hígado y tejido adiposo de ratas alimentadas con una dieta alta en carbohidratos. Determinar el contenido de la proteína SNAT2 en hígado y tejido adiposo de estos animales. Determinar el contenido y estado de fosforilación de la proteína ChREBP en extractos nucleares y citosólicos de hígado y tejido adiposo de los mismos animales. Amplificar los fragmentos de DNA genómico de diferentes tamaños de la región promotora del gen de SNAT2 por medio de.	Se utilizarán 30 ratas Wistar macho de 180 g de peso los cuales se dividirán en tres grupos y se colocarán en cajas de alambre de acero inoxidable con periodos de luz-oscuridad de 12 horas. Todos los grupos recibirán su dieta habitual Chow durante dos días y agua ad libitum como periodo de adaptación. Posteriormente, al día siguiente los animales se dejarán en ayuno por 24 horas con agua ad libitum. Una vez completado el periodo de ayuno, uno de los grupos no recibirá ningún tratamiento adicional, el segundo grupo será alimentado con una dieta alta en carbohidratos con 75% de sacarosa por 4 horas y el último grupo recibirá la administración intragástrica de sacarosa. Al final del estudio, se realizará la eutanasia de los animales para obtener sangre, hígado y tejido adiposo. Las muestras de sangre serán centrifugadas para separar el suero y determinar la concentración de glucagon e insulina. Se extraerá RNA total de hígado y tejido adiposo para determinar el contenido de RNAm de SNAT2, ChREBP, PK, ACC y FAS por PCR de tiempo real. Se determinará el contenido de proteína	Se obtendrá la concentración relativa del RNAm de SNAT2, ChREBP, PK, ACC y FAS en hígado y tejido adiposo de ratas alimentadas con una dieta alta en carbohidratos. Se obtendrá la cantidad de proteína de SNAT2 y el grado de fosforilación de ChREBP en hígado y tejido adiposo de estas ratas alimentadas con una dieta alta en carbohidratos. Se determinará el efecto de una alta concentración de sacarosa sobre la transcripción	20/11/2012	19/11/2013	19/12/2013

Total de etapas: \$1423480

Etapa: 001

Tipo de Recurso	Categoría del recurso	Subcategoría del recurso	Descripción de Subcategoría	Importe del recurso
FONDO	GINVE	402	Equipo de laboratorio	410872
FONDO	GINVE	402	Equipo de laboratorio	63173
FONDO	GINVE	402	Equipo de laboratorio	11100
FONDO	GINVE	402	Equipo de laboratorio	74620
FONDO	GINVE	402	Equipo de laboratorio	17215
FONDO	GCORR	332	Seres vivos	10080
FONDO	GCORR	326	Materiales de uso directo	110000
FONDO	GCORR	326	Materiales de uso directo	80000
FONDO	GCORR	326	Materiales de uso directo	70000
FONDO	GCORR	301	Acervos bibliográficos	10000
FONDO	GINVE	401	Equipo de cómputo	27000

Total de etapa: \$884060

Etapa: 002

Tipo de Recurso	Categoría del recurso	Subcategoría del recurso	Descripción de Subcategoría	Importe del recurso
FONDO	GCORR	326	Materiales de uso directo	80000
FONDO	GCORR	326	Materiales de uso directo	90000
FONDO	GCORR	326	Materiales de uso directo	90000
FONDO	GCORR	329	Public ediciones e impresiones	13250
FONDO	GCORR	332	Seres vivos	9540
FONDO	GCORR	301	Acervos bibliográficos	10000
FONDO	GCORR	336	Viáticos	18550
FONDO	GCORR	328	Pasajes	8500
FONDO	GCORR	310	Cuotas de inscripción	4640

Total de etapa: \$324480

Etapa: 003

Tipo de Recurso	Categoría del recurso	Subcategoría del recurso	Descripción de Subcategoría	Importe del recurso
FONDO	GCORR	310	Cuotas de inscripción	4640
FONDO	GCORR	328	Pasajes	8500
FONDO	GCORR	336	Viáticos	18550
FONDO	GCORR	301	Acervos bibliográficos	10000
FONDO	GCORR	326	Materiales de uso directo	80000
FONDO	GCORR	326	Materiales de uso directo	80000
FONDO	GCORR	329	Public ediciones e impresiones	13250

Total de etapa: \$214940

deleciones específicas y clonarlos en vectores de luciferasa. Evaluar la actividad promotora de los fragmentos de DNA clonados. de SNAT2 y de ChREBP fosforilado por western blot. Se amplificarán fragmentos de DNA de la región promotora del transportador SNAT2 y se clonarán en el vector pGL3-basic, se verificará la secuencia por secuenciación y se determinará la actividad promotora por transfección transitoria en células HepG2 y C9 cultivadas a baja (5.5 mM) y alta (25 mM) concentración de glucosa. del transportador SNAT2 in vitro.

Se utilizarán ratones macho C57B6 de 20-40 gramos de peso. El adenovirus codificante de ChREBP será generado a través de recombinación LR utilizando el sistema de expresión adenoviral ViraPower (Invitrogen). El vector de entrada será generado utilizando un plásmido que codifica para ChREBP, el cual se obtuvo gracias a una donación del Dr. Howard Towle. Como control se utilizará un adenovirus codificante de la proteína verde fluorescente (Ad.GFP). Las partículas virales serán purificadas con el kit de purificación Adeno-X Maxi (Clontech). Entonces, los virus serán administrados a ratones C57B6 vía intravenosa. Para ello, los ratones serán anestesiados con isoflurano y se les administrará un total de 1×10^9 unidades formadoras de placas (PFU) del virus recombinante a través de una inyección en la vena yugular. Después de 6 días, se obtendrán muestras de sangre, hígado y de tejido adiposo de animales en ayuno y después de Se determinará el efecto in vivo de una dieta alta en carbohidratos en la expresión de SNAT2 de ratones con

Se determinará el efecto de una dieta alta en

<p>002</p>	<p>sobre-expresión de ChREBP a través de la abundancia relativa del RNAm de SNAT2 en hígado y tejido adiposo. el contenido de la proteína SNAT2 en hígado y tejido adiposo y determinando el contenido y estado de fosforilación de la proteína ChREBP en extractos nucleares y citosólicos de hígado y tejido adiposo de los mismos animales. La identificación del elemento de respuesta en la región promotora de SNAT2 y el factor de transcripción que median la respuesta a glucosa a través de la mutagénesis de sitio dirigido y de los ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA).</p>	<p>ingerir una dieta alta en carbohidratos. Para cada experimento, al menos seis animales recibirán el mismo tratamiento. En el suero se determinará la concentración de glucagón e insulina y en los tejidos se determinará la expresión de los genes piruvato cinasa (PK), acetil-CoA carboxilasa (ACC) y la sintasa de ácidos grasos (FAS) ya que se ha demostrado que estos genes son regulados por ChREBP y también se determinará la expresión de SNAT2 y genes de enzimas degradadoras de aminoácidos, de la gluconeogénesis y de la gliceroneogénesis. La mutagénesis se realizará con el estuche QuikChange site directed mutagenesis (Stratagene) siguiendo las especificaciones indicadas por el proveedor. Para generar las secuencias mutantes se utilizará un plásmido que contiene la secuencia promotora del gen SNAT2 de rata de -872 a +265 como el templado natural (silvestre) y un par de oligonucleótidos específicos con los sitios mutados. La identidad y fidelidad de las construcciones se verificará por secuenciación (Equipo CEQ, Beckman Coulter). El ensayo de retardo de movilidad electroforética se llevará a cabo utilizando el sistema Gel Shift Assay System (Promega). Para esto, los oligonucleótidos de doble hebra se marcarán con [γ-³²P] ATP utilizando la enzima T4 polinucleótido cinasa.</p>	<p>carbohidratos en ratones con sobre-expresión de ChREBP sobre la expresión de SNAT2 y en el metabolismo de aminoácidos en general a través de la concentración relativa del RNAm y de la proteína de SNAT2, Ha1, SDH, PEPCK en hígado y tejido adiposo. Se identificará el elemento de respuesta de ChREBP que media la regulación transcripcional de SNAT2 en respuesta a glucosa. Se presentarán los resultados en un congreso internacional, se publicará un artículo original y se graduará un estudiante de maestría.</p>	<p>20/11/2013 11-01-14</p>	<p>19/11/2014 19-01-14</p>	<p>19/12/2014</p>
------------	--	--	--	--------------------------------	--------------------------------	-------------------

Esta sonda marcada se incubará con 10 µg de extracto nuclear de HepG2 y amortiguador de unión por 30 min a temperatura ambiente. Para el análisis de super shift, se incubará 1 µg de anticuerpo específico anti-ChREBP (Millipore) con el extracto nuclear 15 min antes de la adición de la sonda marcada. Los complejos se separarán en un gel de poliacrilamida al 4% en condiciones no-desnaturalizantes y se visualizarán por autorradiografía.

Se utilizarán cultivos primarios de hepatocitos de rata mantenidos por 24 horas en medio de cultivo D-MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino. Posteriormente, las células se incubarán en medio suplementado con 5.5 mM o 25 mM de glucosa por 30, 60, 120, 180 y 240 minutos y se fijarán con formaldehído al 1% por 10 min a temperatura ambiente. La reacción se detendrá con glicina 0.125 M y se realizarán dos lavados con PBS frío. Las células se cosecharán, se lizarán y se sonicarán para obtener fragmentos de DNA de aproximadamente 300-500 bp. La cromatina soluble se inmunoprecipitará utilizando 4 µg de un anticuerpo específico anti-ChREBP (Millipore) y proteína A agarosa/esperma de salmón. El complejo proteína A agarosa/anticuerpo/DNA se lavará con diferentes soluciones a baja y alta concentración de sales y en buffer TE. El complejo DNA/anticuerpo se eluirá con una solución amortiguada de

Se identificará el elemento de respuesta que media la regulación transcripcional del transportador

003

Consta de dos partes: 1) Determinación de la unión de

Determinación de la unión de

<p>ChREBP se une al elemento de respuesta identificado en la etapa anterior en células vivas (y, 2) Determinar si Ncor2/SMRT es el co-represor que media los efectos de la glucosa sobre la regulación transcripcional de SNAT2.</p>	<p>ChREBP al sitio ChoRE de la región promotora de SNAT2 en células vivas. Determinación de la asociación de Ncor2/SMRT con ChREBP en la regulación de la transcripción de SNAT2 en respuesta a glucosa.</p>	<p>NaHCO3 0.1 M y SDS 1%. La fijación con formaldehído será revertida incubando el complejo con una solución de NaCl 5 M a 65°C por 18 horas. Finalmente, se desproteinará con proteinasa K (10 mg/ml) y se recuperará el DNA para analizarlo por PCR. Para el análisis por PCR se utilizarán un par de oligonucleótidos específicos para el sitio ChoRE de la región promotora de SNAT2. La formación de complejos entre ChREBP y el co-represor Ncor2/SMRT se determinará utilizando la línea celular HepG2 previamente cultivados en medio con un alto contenido de glucosa (4.5 g/L; 25 mM) o en medio con bajo contenido de glucosa (1.0 g/L; 5.5 mM). Se obtendrán los lisados celulares y 50 µg de cada lisado será inmunoprecipitado con 2 µg del anticuerpo anti-Ncor (Millipore o Santa Cruz) por 60 min a 4°C. Los precipitados se colectarán en proteína AVG agarosa por una hora. Después de cuatro lavados con amortiguador RIPA, los precipitados se resuspenderán en buffer de carga con SDS y se calentarán a 95°C por 5 min, se centrifugará y colectará el sobrenadante. Posteriormente, las muestras se separarán en un gel SDS-PAGE, se transferirán a una membrana de PVDF (Hybond-P, Amersham) para posteriormente detectar la presencia de ChREBP por la técnica de Western blot.</p>	<p>SNAT2 por glucosa. Se determinará el papel de Ncor2/SMRT en la represión de la transcripción de SNAT2 por ChREBP en respuesta a glucosa. Se presentarán los resultados en un congreso internacional, se publicará un artículo original y se graduará un estudiante de doctorado.</p>	<p>20/11/2014 11-01-15</p>	<p>19/11/2015 10-01-15</p>	<p>19/12/2015</p>
--	--	---	---	--------------------------------	--------------------------------	-------------------



Instituto Nacional de Ciencias
Médicas y Nutrición

Salvador Zubirán

COMITÉ INSTITUCIONAL DE
INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN
HUMANOS

**FORMATO DE
EVALUACIÓN DE
PROYECTO DE
INVESTIGACIÓN**

No. de registro CIIBH: FNU-685-12/15-1

1. Título del proyecto				
El papel represor de ChREBP sobre el transportador de aminoácidos neutros dependiente de sodio (SNAT2) y su efecto sobre el metabolismo de aminoácidos.				
2. Investigadores				
2a. Identificación				
INVESTIGADOR	Posición institucional	Posición en el proyecto	Teléfono (ext.)	Correo-E
ALEMAN ESCONDRILLAS GABRIELA	INVESTIGADOR EN CIENCIAS MED C	Investigador asociado		galemane@gmail.com
NORIEGA LOPEZ LILIA GUADALUPE	INVESTIGADOR EN CIENCIAS MED C	Investigador asociado		ignoriegal@gmail.com
ORTIZ ORTEGA VICTOR MANUEL	INVESTIGADOR EN CIENCIAS MED C	Investigador responsable		vimort@yahoo.com
TORRES Y TORRES NIMBE	INVESTIGADOR EN CIENCIAS MED F	Investigador asociado		nimbester@gmail.com
TOVAR PALACIO ARMANDO ROBERTO	JEFE DE DEPARTAMENTO	Investigador asociado		tovar.ar@gmail.com
2b. Pertinencia del grupo de investigadores con respecto del proyecto				
3. Instituciones participantes				
4. Patrocinio				
4a. Organismos patrocinadores				
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología				
4b. Especificar si los investigadores reciben pago (monetario o en especie) por su participación específica en la investigación.				
5. Marco teórico				
ANTECEDENTES:				
Todos los organismos regulan la expresión de genes en respuesta a cambios en el medio ambiente nutricional externo. En los organismos multicelulares el control de la expresión de genes involucra interacciones complejas de factores hormonales y neuronales. Además, se ha demostrado que constituyentes dietarios como				

carbohidratos y ácidos grasos participan en la regulación de la expresión de genes en mamíferos (1-6). En contraste, existe considerablemente menos información disponible concerniente al control de la expresión de genes por aminoácidos (7, 8).

Los mamíferos deben regular en forma precisa la homeostasis de los aminoácidos debido a que: 1) los organismos multicelulares son incapaces de sintetizar todos los aminoácidos, 2) el aporte de aminoácidos tiene fluctuaciones debido a los periodos de ayuno que se dan a lo largo de un día y, 3) no existen almacenes importantes de aminoácidos indispensables, en contraste como sucede con los lípidos o la glucosa los cuales son almacenados en forma de triacilglicéridos y glucógeno, respectivamente. Recientemente, se ha demostrado que cambios en la disponibilidad de aminoácidos tiene profundos efectos sobre algunos aspectos de la función celular, no solo a nivel de la regulación de la expresión de genes y señalización celular (9, 10), sino también, en el transporte y metabolismo de los propios aminoácidos (11). De esta manera, es de gran importancia mantener el balance en la concentración de aminoácidos libres intracelulares.

El tamaño y composición de la poza de aminoácidos libres intracelulares está determinado, en parte, por la síntesis y actividad de diferentes transportadores o "sistemas" localizados en la membrana celular. La capacidad de mantener los aminoácidos intracelulares en concentraciones mayores o iguales a las encontradas en el medio ambiente extracelular se facilita ampliamente por medio de la presencia de una multitud de transportadores de aminoácidos en la membrana plasmática, algunos de los cuales funcionan activamente concentrando los aminoácidos dentro de la célula, mientras que otros pueden facilitar el eflujo celular por mecanismos de intercambio (12, 13).

Los aminoácidos zwitteriónicos constituyen el grupo con mayor número de transportadores debido a la diversidad química del grupo alquilo lateral presente en su

estructura. Los sistemas de este grupo mejor estudiados son el ASC, el N, el L y el sistema A, siendo éste último, el objeto de estudio en el presente proyecto de investigación.

1. Sistema A o SNAT2

El sistema de transporte A, actualmente denominado transportador de aminoácidos neutros dependiente de sodio-2 (SNAT2), se encuentra en todas las células de los mamíferos, con excepción de los reticulocitos y los eritrocitos (14). Christensen fue quien identificó este sistema en las células Ehrlich del líquido de ascitis murino y lo designó como A debido a su preferencia por el aminoácido alanina (15). Los aminoácidos sustratos de este transportador abarcan a la alanina, la glicina, la serina, la prolina y la glutamina. El transporte de aminoácidos por el sistema A es dependiente de sodio, con una estequiometría Na^+ /aminoácido 1:1 (16, 17).

La principal función del sistema A parece ser la de mantener los niveles citosólicos de aminoácidos dispensables elevados. Es importante enfatizar que el papel del sistema A en la formación de la poza intracelular de aminoácidos no solo se restringe a sus sustratos preferidos. Gracias a una compleja red de mecanismos de transporte y a reacciones metabólicas, los aminoácidos dispensables, particularmente la alanina y la glutamina, son utilizados subsecuentemente por otros sistemas de transporte para intercambiarlos por aminoácidos indispensables. Esto nos indica que la actividad del sistema A influye la poza de aminoácidos intracelular y la actividad de otros sistemas de transporte (18).

Los transportadores de aminoácidos que hasta la fecha han sido clonados se han reclasificado y organizado en familias que forman parte del grupo de proteínas de transporte membranal denominados acarreadores de solutos o SLC (por sus siglas en inglés solute-linked carrier) (13). En el año 2000 tres grupos de investigación

independientes clonaron el DNA complementario (DNAc) que codifica para un transportador de aminoácidos provisto con características operacionales típicas de la actividad del sistema A (19-21). El producto de este gen se nombró SNAT2 (sodium-dependent neutral amino acid transporter-2) y se clasificó como un miembro de la familia *SLC38* (22). Hasta la fecha se han caracterizado tres isoformas del sistema A, las proteínas SNAT1 [*SLC38A1*, (23, 24)], SNAT2 [*SLC38A2*, (19-21)] y SNAT4 [*SLC38A4*, (25, 26)]. Se ha demostrado que SNAT2 es la principal isoforma con características similares al sistema A y existe una relación directa entre la abundancia del RNA mensajero (RNAm) de SNAT2 y la actividad del sistema A (27, 28).

La clonación de las tres isoformas del sistema A abre la posibilidad de estudiar los mecanismos moleculares que regulan la transcripción de este transportador. Además, la identificación molecular de las isoformas *SLC38* proporciona una valiosa herramienta para poder evaluar el papel que juega cada uno de ellos en diferentes procesos fisiológicos (22). Por ejemplo, en el hígado, se sugiere un papel para SNAT2 en la provisión de aminoácidos que pueden entrar a la vía de la gluconeogénesis como la alanina.

Durante más de 30 años de investigación, desde su descubrimiento, se han reportado una gran variedad de mecanismos que regulan la actividad del sistema A. En estudios realizados con diferentes tipos celulares se ha demostrado que la expresión y actividad del sistema A incrementa por la acción de diversas hormonas que incluyen al cortisol (29), el estradiol (30), el glucagon y la insulina (31-33). La acción de la insulina y del glucagon sobre la actividad del sistema A del hígado es una excepción del efecto opuesto clásico que estas hormonas tienen sobre el metabolismo hepático. Estos datos reflejan la compleja regulación *in vivo* del sistema A, que depende de la adecuada interacción de diferentes hormonas que son capaces de modular su actividad.

Sin embargo, existe poca información acerca de los mecanismos moleculares que

regulan la expresión de este transportador. Recientemente, Ortiz V y colaboradores (34) clonaron y analizaron la región promotora de este gen e identificaron el elemento de respuesta que media la regulación transcripcional de SNAT2 por AMP cíclico en rata. En este estudio los autores reportaron sitios potenciales de unión a factores de transcripción como GRE, AP-1, Sp-1, GC-box y de manera interesante un elemento de respuesta a carbohidratos (ChoRE).

DEFINICION DE PROBLEMAS :

Actualmente la glucosa es considerada no solo como una fuente de energía sino también como una molécula de señalización que actúa en forma sinérgica con la insulina para activar la glucólisis y la lipogénesis *de novo* (4, 35). Los genes regulados por la glucosa comparten una secuencia consenso conservada denominada elemento de respuesta a carbohidratos (ChoRE). Este elemento está compuesto de dos motivos de 6 bp conocidos como cajas-E (E-box) cuya secuencia es CACGTG separadas por 5 bp (36).

El factor de transcripción que reconoce el motivo ChoRE fue designado como la proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos (ChREBP, Mondo B y WBSCR14) (37) cuya expresión es más abundante en hígado, intestino delgado, riñón y tejido adiposo pardo y blanco. La expresión de ChREBP es inducida en el hígado en respuesta a dietas altas en carbohidratos (38). Una vez activado por glucosa, ChREBP se transloca del citosol hacia el núcleo. En el núcleo, ChREBP forma un heterodímero

con la proteína X similar a Max (Max-like protein X, Mlx) uniéndose al sitio ChoRE para la regulación transcripcional de sus genes blancos. Inicialmente se demostró que ChREBP induce la actividad transcripcional del promotor de L-PK en hepatocitos cultivados bajo altas concentraciones de glucosa (37). Ahora se sabe que ChREBP regula varias enzimas involucradas en la glucólisis y la lipogénesis tales como piruvato cinasa, acetil-CoA carboxilasa y la sintasa de ácidos grasos.

Sin embargo, no se han realizado estudios donde se demuestre si ChREBP también puede regular la expresión de genes relacionados con el metabolismo de aminoácidos como es el caso del transportador SNAT2.

JUSTIFICACION :

Estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio utilizando cultivo primario de hepatocitos de rata demostraron una disminución significativa en la abundancia del RNAm de SNAT2 cuando las células se incubaron en presencia de una alta concentración de glucosa (25 mM) respecto al grupo control (5.5 mM de glucosa). Este hecho, junto con el reporte de un motivo ChoRE en la región promotora de SNAT2 de rata (34) respaldan la posibilidad de que SNAT2 sea otro gen regulado por ChREBP. Al parecer ChREBP funcionaría como un represor de la transcripción del transportador SNAT2 como un mecanismo para disminuir el aporte de aminoácidos glucogénicos cuando la célula se encuentra en un medio con alta concentración de glucosa y mantener la homeostasis en el metabolismo general.

En apoyo a esta teoría existen estudios previos en los que se demuestra que ChREBP puede actuar también como un represor transcripcional. Boergesen M y colaboradores (39) demostraron que ChREBP reprime la expresión de PPAR α en células β pancreáticas. Por otro lado, Noriega L y colaboradores (40) demostraron que ChREBP reprime la expresión de SIRT1.

El mecanismo a través del cual ChREBP funciona como represor transcripcional no ha sido estudiado, sin embargo, es probable que esté mediado por la asociación de un co-represor. De manera interesante, el análisis de la expresión de ChREBP en el hígado de 41 cepas de ratones pertenecientes a la población de referencia genética BXD demostró una correlación positiva a la expresión del co-represor Ncor2/SMRT.

Las proteínas co-represoras SMRT (por siglas en inglés, silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors) y N-CoR (nuclear hormone receptor-corepresor) fueron originalmente identificadas como co-represores para receptores nucleares, sin embargo, se ha demostrado que también pueden interactuar con otros factores de transcripción (41). SMRT y N-CoR son parálogos uno del otro y funcionan de manera similar; reclutando y activando enzimas de remodelamiento de la cromatina. Mientras que algunos co-activadores reclutan o poseen actividad de acetiltransferasas de histonas (HATs), SMRT y N-CoR reclutan desacetilasas de histonas (HDACs). Estos co-represores y los factores de remodelamiento de la cromatina son reclutados por factores de transcripción en regiones específicas del promotor realizando cambios en la estructura de la cromatina (42).

Todos estos datos apoyan la hipótesis de que ChREBP puede mediar la represión transcripcional del transportador SNAT2 en respuesta a una alta concentración de glucosa. De esta manera, el estudio de la región promotora del transportador SNAT2 ayudará a comprender los diferentes mecanismos que regulan su transcripción y, a su vez, proporcionar indicios acerca de cómo este transportador mantiene la homeostasis celular bajo diferentes condiciones fisiológicas como puede ser el ayuno y el posprandio.

6a. Hipótesis

La glucosa reprime la transcripción del transportador de aminoácidos SNAT2 a través de la activación y unión del factor de transcripción ChREBP a un sitio ChoRE en la región promotora de este gen con la

asociación del co-represor Ncor2.

6b. Objetivos.

Determinar si ChREBP regula la transcripción del transportador SNAT2 a través de su unión directa al sitio ChoRE localizado en la región promotora de este gen en respuesta a una alta concentración de glucosa.

7. Metodología: Diseño general.

a) Diseño del estudio: CONTROLADO

b) Descripción de maniobra o intervención.

1. Estudios *in vivo*.

Efecto de una dieta alta en carbohidratos sobre la expresión de SNAT2 en ratas

Se utilizarán 30 ratas Wistar macho de 180 g de peso las cuales serán obtenidas del bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición (INCMNSZ). Los animales se dividirán aleatoriamente en tres grupos y se colocarán en cajas individuales de alambre de acero inoxidable con periodos de luz-oscuridad de 12 horas. Todos los grupos recibirán su dieta habitual Chow durante dos días y agua *ad libitum* como periodo de adaptación. Posteriormente, al día siguiente los animales se dejarán en ayuno por 24 horas con agua *ad libitum*. Una vez completado el periodo de ayuno, uno de los grupos recibirá una dieta control que contenga solo 10% de sacarosa, el segundo grupo será alimentado con una dieta alta en carbohidratos con 75% de sacarosa en comparación de la dieta control que contiene solo 10% de sacarosa de acuerdo a las recomendaciones de la AIN93 para roedores (43) por 4 horas y el último grupo recibirá la administración intragástrica de sacarosa. Al final del estudio, serán anesteciados con CO₂ y se realizará la decapitación de los animales para obtener sangre, hígado y tejido adiposo. Las muestras de sangre serán centrifugadas para separar el suero el cual se almacenará en congelación hasta su uso para determinar la concentración de glucagon e insulina. Por otro lado, las muestras de hígado y tejido adiposo se congelarán inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenarán a -70°C para posteriormente determinar la expresión de SNAT2.

¡chuu!

CO₂ NO es 200% de O₂

expresión relativa de RNAm del gen SNAT2 en animales con dieta alta en sacarosa vs animales con dieta control. Por lo tanto: $n = 2(0.155)^2(1.96+0.84)^2/(0.2)^2$, $n=9.4$. Con base en lo anterior se necesitarán un promedio de 10 animales por grupo.

d) Procedimiento de reclutamiento del paciente

NO APLICA

e) Mecanismo de asignación del tratamiento.

Los animales se dividirán de acuerdo a lo establecido en la descripción de la maniobra o intervención. La distribución se hará de manera aleatoria.

f) Grupos de tratamiento.

Los grupos se encuentran descritos en la descripción de la maniobra o intervención.

g) Duración del seguimiento individual.

El estudio tiene como objetivo evaluar el efecto agudo de una dieta alta en sacarosa sobre la expresión del transportador de aminoácidos SNAT2 por lo cual el seguimiento no será más de 2 días.

8. Metodología: Criterios de selección

Se eliminarán del estudio aquellos animales que presenten pérdida espontánea de peso (20% de peso en un periodo de 2 a 10 días) así como aquellos que presenten diarrea o letargia persistente.

9. Metodología: Desenlaces y variables

Estos parámetros fueron descritos en el Diseño general.

10. Riesgos y beneficios del estudio

BENEFICIO :

NO APLICA

RIESGOS:

MOLESTIAS GENERADAS : NO APLICA

COMPLICACIONES DE PROCEDIMIENTO : NO APLICA

EFFECTOS ADVERSOS : NO APLICA

EFFECTOS PSICOLOGICOS : NO APLICA

METODOS DE SEGURIDAD : NO APLICA

PROCEDIMIENTOS : NO APLICA

OTRO TIPO DE RIESGO : NO APLICA

11. Costos

COSTOS TOTALES DE LA INVESTIGACIÓN	
Admon. Gastos pacientes	\$ 0.00

Animales	\$ 19,620.00
Equipos	\$ 512,245.00
Estudios	\$ 0.00
Fondo de apoyo	\$ 0.00
Materiales	\$ 771,735.00
Personal	\$ 0.00
Publicaciones	\$ 26,500.00
Suscripciones	\$ 30,000.00
Varios	\$ 26,280.00
Viatcos	\$ 37,100.00

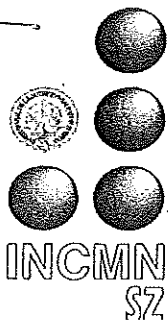
12. Citas bibliográficas.

1. Gurney AL, Park EA, Liu J, Giralt M, McGrane MM, Patel YM, Crawford DR, Nizielski SE, Savon S, Hanson RW. Metabolic regulation of gene transcription. *J Nutr* 1994; 124: 1533S-1539S.
2. Vaulont S, Vasseur-Cognet M, Kahn A. Glucose regulation of gene transcription. *J Biol Chem* 2000; 275: 31555-31558.
3. Towle HC. Glucose and cAMP: adversaries in the regulation of hepatic gene expression. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98: 13476-13478.
4. Towle HC. Glucose as a regulator of eukaryotic gene transcription. *Trends Endocrinol Metab* 2005; 16: 489-494.
5. Towle HC. Metabolic regulation of gene transcription in mammals. *J Biol Chem* 1995; 270: 23235-23238.
6. Girard J, Perdereau D, Foufelle F, Prip-Buus C, Ferré P. Regulation of lipogenic enzyme gene expression by nutrients and hormones. *FASEB J* 1994; 8: 36-42.
7. Kilberg MS, Hutson RG, Laine RO. Amino acid-regulated gene expression in eukaryotic cells. *FASEB J* 1994; 8: 13-19.
8. Fafournoux P, Bruhat A, Jousse C. Amino acid regulation of gene expression. *Biochem J* 2000; 351: 1-12.
9. Taylor PM. Amino acid transporters: eminences grises of nutrient signaling mechanisms? *Biochem Soc Trans* 2009; 37: 237-241.
10. Wu G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino acids* 2009; 37: 1-17.
11. Averous J, Bruhat A, Mordier S, Fafournoux P. Recent advances in the understanding of amino acid regulation of gene expression. *J Nutr* 2003; 133: 2040S-2045S.
12. Palacin M, Estevez R, Bertran J, Zorzano A. Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol Rev* 1998; 78: 969-1054.
13. Hundal HS, Taylor PM. Amino acid transporters: gate keepers of nutrient exchange and regulators of nutrient signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 296: E603-E613.
14. Kilberg MS, Stevens BR, Novak DA. Recent advances in mammalian amino acid transport. *Annu Rev Nutr* 1993; 13: 137-165.
15. Oxender DL, Christense HN. Distinct mediating systems for the transport of neutral amino acids by the Ehrlich cell. *J Biol Chem* 1963; 238: 3686-3699.
16. Dall'Asta V, Bussolati O, Guidotti GG, Gazzola GC. Energization of amino acid uptake by system A in cultured human fibroblasts. *J Biol Chem* 1991; 266: 1591-1596.
17. Geck P, Heinz E. Coupling in secondary transport. Effect of electrical potentials on the kinetics of ion linked cotransport. *Biochim Biophys Acta* 1976; 443:49-63.
18. Bussolati O, Dall'Asta V, Franchi-Gazzola R, Sala R, Rotoli BM, Visigalli R, Casado J, Lopez-Fontanals M, Pastor-Anglada M and Gazzola GC. The role of system A for neutral amino acid transport in the regulation of cell volume. *Mol Membr Biol* 2001; 18: 27-38.
19. Sugawara M, Nakanishi T, Fei YJ, Huang W, Ganapathy ME, Leibach FH, Ganapathy V. Cloning of an amino acid transporter with functional characteristics and tissue expression pattern identical to that of system A. *J Biol Chem* 2000; 275: 16473-16477.
20. Yao D, Mackenzie B, Ming H, Varoqui H, Zhu H, Hediger MA and Erickson JD. A novel system A isoform mediating Na⁺/neutral amino acid cotransport. *J Biol Chem* 2000; 275: 22790-22797.

21. Reimer RJ, Chaudhry FA, Gray AT, Edwards RH. Amino acid transport system A resembles system N in sequence but differs in mechanism. <i>Proc Natl Acad Sci</i> 2000; 97: 7715-7720.
22. Mackenzie B, Erickson JD. Sodium-coupled neutral amino acid (System N/A) transporters of the SLC38 gene family. <i>Pflugers Arch Eur J Physiol</i> 2004; 447: 784-795.
23. Varoqui H, Zhu H, Yao D, Ming H, Erickson JD. Cloning and functional identification of a neuronal glutamine transporter. <i>J Biol Chem</i> 2000; 275: 4049-4054.
24. Chaudhry FA, Schmitz D, Reimer RJ, Larsson P, Gray AT, Nicoll R, Kavanaugh M, Edwards RH. Glutamine uptake by neurons: interaction of protons with system A transporters. <i>J Neurosci</i> 2002; 22: 62-72.
25. Sugawara M, Nakanishi T, Fei YJ, Martindale RG, Ganapathy ME, Leibach FH and Ganapathy V. Structure and function of ATA3, a new subtype of amino acid transport system A, primarily expressed in the liver and skeletal muscle. <i>Biochim Biophys Acta</i> 2000; 1509: 7-13.
26. Desforges M, Lacey HA, Glazier JD, Greenwood SL, Mynett KJ, Speake PF, Sibley CP. SNAT4 isoform of system A amino acid transporter is expressed in human placenta. <i>Am J Physiol Cell Physiol</i> 2006; 290: C305-C312.
27. Hatanaka T, Huang W, Wang H, Sugawara M, Prasad PD, Leibach FH, Ganapathy V. Primary structure, functional characteristics and tissue expression pattern of human ATA2, a subtype of amino acid transport system A. <i>Biochim Biophys Acta</i> 2000; 1467: 1-6.
28. Hatanaka T, Huang W, Martindale RG, Ganapathy V. Differential influence of cAMP on the expression of the three subtypes (ATA1, ATA2, and ATA3) of the amino acid transport system A. <i>FEBS Lett</i> 2001; 505: 317-320.
29. Jones HN, Ashworth CJ, Page KR, McArdle HJ. Cortisol stimulates system A amino acid transport and SNAT2 expression in a human placental cell line (BeWo). <i>Am J Physiol Endocrinol Metab</i> 2006; 291: E596-E603.
30. López A, Torres N, Ortiz V, Alemán G, Hernández-Pando R, Tovar AR. Characterization and regulation of the gene expression of amino acid transport system A (SNAT2) in rat mammary gland. <i>Am J Physiol Endocrinol Metab</i> 2006; 291: E1059-E1066.
31. Kilberg MS, Neuhaus OW. Hormonal regulation of hepatic amino acid transport. <i>J Supramol Struct</i> 1977; 6: 191-204.
32. Fehlmann M, LeCam A, Freychet P. Insulin and glucagon stimulation of amino acid transport in isolated rat hepatocytes. Synthesis of a high affinity component of transport. <i>J Biol Chem</i> 1979; 254:10431-10437.
33. Kelley DS, Shull JD, Potter VR. Hormonal regulation of amino acid transport and cAMP production in monolayer cultures of rat hepatocytes. <i>J Cell Physiol</i> 1980; 103: 159-168.
34. Ortiz V, Alemán G, Escamilla-Del-Arenal M, Recillas-Targa F, Torres N, Tovar AR. Promoter characterization and role of CRE in the basal transcription of the rat SNAT2 gene. <i>Am J Physiol Endocrinol Metab</i> 2011; 300: E1092-E1102.
35. Poupeau A, Postic C. Cross-regulation of hepatic glucose metabolism via ChREBP and nuclear receptors. <i>Biochim Biophys Acta</i> 2011; 1812: 995-1006.
36. Shih H-M, Liu Z, Towle HC. Two CACGTG motifs with proper spacing dictate the carbohydrate regulation of hepatic gene transcription. <i>J Biol Chem</i> 1995; 270: 21991-21997.
37. Yamashita H, Takenoshita M, Sakurai M, Bruick RK, Henzel WJ, Shillinglaw W, Arnot D, Uyeda K. A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 2001; 98: 9116-9121.
38. Dentin R, Benhamed F, Pegorier JP, Fougelle F, Viollet B, Vaulont S, Girard J, Postic C. Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation. <i>J Clin Invest</i> 2005; 115: 2843-2854.
39. Boergesen M, Poulsen LC, Schmidt SF, Frigerio F, Maechler P, Mandrup S. ChREBP mediates glucose repression of peroxisome proliferator-activated receptor α expression in pancreatic β -cells. <i>J Biol Chem</i> 2011; 286: 13214-13225.
40. Noriega LG, Feige JN, Canto C, Yamamoto H, Yu J, Herman MA, Matakis C, Khan BB, Auwerx J. CREB and ChREBP oppositely regulate SIRT1 expression in response to energy availability. <i>EMBO Rep</i> 2011; 12: 1069-1076.
41. Privalsky ML. The role of corepressors in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. <i>Ann Rev Physiol</i> 2004; 66: 315-360.
42. Jepsen K, Rosenfeld MG. Biological roles and mechanistic actions of co-repressor complexes. <i>J Cell Sci</i> 2002; 115: 689-698.

43. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey Jr. GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993; 123: 1939-1951.

44. Berry MN, Friend DS. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol* 1969; 43: 506-520.



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
"SALVADOR ZUBIRÁN"

México, D.F. a 23 de Julio de 2012

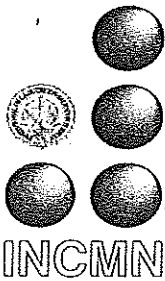
DECLARACIÓN DE LOS INVESTIGADORES

TÍTULO DEL PROYECTO: EL PAPEL REPRESOR DE ChREBP SOBRE EL TRANSPORTADOR DE AMINOÁCIDOS NEUTROS DEPENDIENTE DE SODIO (SNAT2) Y SU EFECTO SOBRE EL METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS.

Clave de Registro: FNU-685-12/15-1

Los investigadores que participamos en el proyecto arriba mencionado sometemos voluntariamente a evaluación dicho proyecto ante la Comisión de Investigación en Animales y declaramos libremente:

- *Que conocemos todos los aspectos del estudio y contamos con la capacidad de llevarlo a buen término.*
- *Que la revisión minuciosa de los antecedentes científicos del proyecto justifican su realización y nos comprometemos a mantener un estándar científico elevado que permita obtener información útil para la sociedad.*
- *Que conocemos los riesgos potenciales a los que exponemos al personal técnico, investigadores y los animales mismos involucrados en el proceso experimental, que se encuentran tanto en contacto directo como indirecto en el lugar donde se realiza la investigación. Por lo anterior, se establecen en el protocolo las medidas precautorias necesarias.*
- *Que pondremos el bienestar de los animales sujetos de investigación y la seguridad del personal en contacto con ellos por encima de cualquier otro objetivo.*
- *Que nos conduciremos de acuerdo con EL PRINCIPIO GENERAL DE LAS TRES R's descrito en el Manual del Usuario del SISTEMA ELECTRÓNICO DE REGISTRO DE PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN: Comisión de Investigación en Animales, numeral 13 (<http://132.247.8.10/invp/archivos/Manual.pdf>). Asimismo, nos someteremos a los estándares de comportamiento ético y científico aceptados nacional e internacionalmente según lo establecido por la Ley General de Salud y el Reglamento en Materia de Investigación para la Salud de México, La NOM 062-ZOO-1999: "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio" (publicada por SAGARPA en el Diario Oficial, 22 de agosto del 2001), y los lineamientos para el buen uso de los animales recopilados por el Consejo Internacional para La Ciencia de los Animales de Laboratorio en colaboración con la Organización Mundial de la Salud (ICLAS-WHO, <http://www.iclas.org/harmonization.htm>).*



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
"SALVADOR ZUBIRÁN"

Nombre del investigador	Firma
Dr. Victor Manuel Ortiz Ortega	
Dra. Lilia Guadalupe Noriega López	
Dra. Gabriela Alemán Escondrillas	
Dra. Nimbe Torres y Torres	
Dr. Armando Roberto Tovar Palacio	



Instituto Nacional de Ciencias
Médicas y Nutrición
Salvador Zubirán

(1426)
INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS Y
NUTRICIÓN

SALVADOR ZUBIRÁN

Dirección de Investigación

FORMA ÚNICA PARA REGISTRO
DE PROYECTOS

FECHA DE RECEPCIÓN: 27/06/2012

CLAVE: FNU-685-13/15-1

TÍTULO: El papel represor de ChREBP sobre el transportador de aminoácidos neutros dependiente de sodio (SNAT2) y su efecto sobre el metabolismo de aminoácidos.

INVESTIGADOR RESPONSABLE: Cruz Ortega Victor Manuel

DEPARTAMENTO O SERVICIO: DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA DE LA NUTRICIÓN

TIPO DE INVESTIGACIÓN: Investigación Experimental

PATROCINADORES:

Patrocinador	Cantidad
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología	\$ 1,423,480.00

VIGENCIA DEL PROYECTO: Del 11/01/2013 al 10/01/2016

	Trimestre 1	Trimestre 2	Trimestre 3	Trimestre 4
Primer año	\$ 834,060.00	\$ 0.00	\$ 0.00	\$ 0.00
Segundo año	\$ 324,480.00	\$ 0.00	\$ 0.00	\$ 0.00
Tercer año	\$ 214,940.00	\$ 0.00	\$ 0.00	\$ 0.00

CUSTO TOTALES DE LA INVESTIGACIÓN		INSTITUCIONES PARTICIPANTES	
Personal (sueldos y sobresueldos al personal)	\$ 0.00		
Equipos (de laboratorio, cómputo, transporte, etc.)	\$ 603,930.00		
Materiales (reactivos, consumibles, desechables, etc.)	\$ 680,000.00		
Animales (adquisición, cruces, procedimientos, etc.)	\$ 13,500.00		
Estudios (de laboratorio, gabinete, especiales, etc.)	\$ 0.00	Comité de Investigación en Humanos	Comité de Investigación en Animales
Viajes (reuniones científicas y trabajo de campo)	\$ 54,100.00	Director de Investigación	Director General
Publicaciones	\$ 26,500.00		
		Fecha de resolución	
		31-01-2013	

(de laboratorio, gabinete, especiales, etc.)		Fecha de resolución
Viaticos	\$ 54,100.00	
(reuniones científicas y trabajo de campo)		
Publicaciones	\$ 26,500.00	
costo directos de publicación, sobregiro)		
Suscripciones	\$ 39,280.00	
libros, revistas, software, periódicos, etc)		
Varios	\$ 0.00	
(teléfono, fax, fotocopias, mensajería, etc)		
Fondo de apoyo	\$ 0.00	
(15% de la cantidad total de proyecto)		
Admon. Gastos pacientes	\$ 0.00	
Total :	\$ 1,423,480.00	

Estudio en animales con sobre-expresión de ChREBP

Se utilizarán 20 ratones macho C57B6 de 20-40 gramos de peso, los cuales serán obtenidos del bioterio del INCMNSZ. Para esta parte del estudio es necesario considerar otros 30 ratones adicionales los cuales serán utilizados para estandarizar la técnica para la sobre-expresión de ChREBP por adenovirus.

El adenovirus codificante de ChREBP será generado a través de recombinación LR utilizando el sistema de expresión adenoviral ViraPower (Invitrogen). El vector de entrada será generado utilizando un plásmido que codifica para ChREBP, el cual se obtuvo gracias a una donación del Dr. Howard Towle. Como control se utilizará un adenovirus codificante de la proteína verde fluorescente (Ad.GFP). Las partículas virales serán purificadas con el kit de purificación Adeno-X Maxi (Clontech). Entonces, los virus serán administrados a ratones C57B6 vía intravenosa. Para ello, los ratones serán anestesiados con isoflurano y se les administrará un total de 1×10^9 unidades formadoras de placas (PFU) del virus recombinante a través de una inyección en la vena yugular. Después de 6 días, se obtendrán muestras de sangre, hígado y de tejido adiposo de animales en ayuno y después de ingerir una dieta alta en carbohidratos. Para cada experimento, al menos seis animales recibirán el mismo tratamiento. En el suero se determinará la concentración de glucagon e insulina como se menciona posteriormente y en los tejidos se determinará la expresión de los genes piruvato cinasa (PK), acetil-CoA carboxilasa (ACC) y la sintasa de ácidos grasos (FAS) ya que se ha demostrado que estos genes son regulados por ChREBP además de determinar la expresión de SNAT2.

Efecto de la sobre-expresión de ChREBP en ratones sobre el metabolismo de aminoácidos a nivel sistémico

Para determinar el papel que tiene ChREBP, y su efecto, en la regulación del metabolismo de aminoácidos a nivel sistémico, utilizaremos 10 ratones con sobre-expresión de ChREBP por grupo. A uno de los grupos se les administrará intraperitonealmente una carga de alanina, el grupo control recibirá únicamente el vehículo. Posteriormente, se obtendrá sangre cada 15 min durante un periodo de 2

C57B6

*¿Cómo se
distingue el
suero de la
ví?*

horas para determinar la concentración de glucosa. Al finalizar la curva se anesteciarán con CO₂, se realizará la eutanasia de los animales por decapitación, se obtendrá el hígado para determinar la expresión de enzimas degradadoras de aminoácidos y de enzimas de la gluconeogénesis y el tejido adiposo para determinar la expresión de enzimas de la gliceroneogénesis.

No es
Eutanasia

Determinación de la concentración de glucagon e insulina en suero

La concentración de glucagon y de insulina en el suero de las ratas o ratones se determinará con un estuche comercial utilizando la técnica de ELISA (Linco Research Immunoassays, St Charles, MO).

Extracción de RNA total

Se extraerá RNA total de hígado utilizando el reactivo de Trizol. En el caso de las muestras de tejido adiposo se utilizará la técnica de gradiente de densidad con cloruro de cesio y tiocianato de guanidina.

PCR cuantitativo

Se utilizarán 300 nanogramos de RNA total para sintetizar DNAc por medio de la enzima transcriptasa reversa MMLV. Posteriormente se realizará el PCR cuantitativo utilizando sondas y oligonucleótidos TaqMan de cada gen específico para el equipo ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, CA).

2. Estudio *in vitro*.

I. Clonación de la región promotora en el vector de luciferasa pGL3-basic

Obtención de DNA genómico

El DNA genómico se obtendrá a partir de hígado de rata el cual se utilizará como templado para la amplificación de fragmentos de DNA de la región promotora del gen del transportador SNAT2 de rata. El tejido se congelará rápidamente en nitrógeno líquido y se aplastará para producir pedazos que sean fácilmente digeridos. Posteriormente se colocará en una solución con proteinasa K y SDS y se incubará hasta que la mayoría de la proteína celular sea degradada. Esta digestión se desproteinizará a través de extracciones sucesivas con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, se recuperará por precipitación con etanol y se resuspenderá en agua libre de DNAsas y RNAsas.

Amplificación de fragmentos de DNA genómicos de SNAT2 por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se utilizará el sistema Expand High Fidelity PCR System (Roche Applied Science) el cual está compuesto de una mezcla de enzimas que contiene una Taq DNA polimerasa termoestable y una Tgo DNA polimerasa que es una DNA polimerasa termoestable con actividad de corrección (proofreading). Esta mezcla de polimerasas genera productos de PCR con un rendimiento, fidelidad y especificidad elevados a partir de todo tipo de DNA. Este sistema está optimizado especialmente para amplificar eficientemente fragmentos de DNA de hasta 5 kb.

Clonación de la región promotora y generación de construcciones con deleciones progresivas unidireccionales 5'

La región promotora del gen del transportador SNAT2 de rata se amplificará por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando oligonucleótidos específicos diseñados con base en el análisis *in silico* de la región 5' no traducida. Actualmente ya clonamos un fragmento de DNA de 1137 pb en el vector pGL3-basic (Promega) el cual abarca la región de -872 a +265 del promotor y ya se ha evaluado su actividad promotora. Las deleciones progresivas 5' de la región promotora se obtendrán

por PCR y se clonarán en el mismo vector. Todas las construcciones serán verificadas por secuenciación utilizando el sistema Dye terminator cycle sequencing with Quick Start kit (Beckman coulter) en el secuenciador automático CEQ 8800 marca Beckman Coulter.

II. Cultivo celular, transfección transitoria y ensayos reporteros de luciferasa

Se utilizarán dos líneas celulares, las HepG2 que son de hepatoma humano y las C9 que son hepatocitos de rata. Las células se crecerán en medio de cultivo DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%, L-glutamina (2 mM), penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 µg/ml) a 37°C y 5% de CO₂. Las células se sembrarán en cajas de cultivo de 35 mm a una confluencia del 80% y se transfectarán utilizando el reactivo de transfección Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Las células se co-transfectarán con 0.25 µg de cada plásmido reportero de luciferasa y 0.01 µg del vector de expresión de renilla (pRL-TK) el cual servirá como un control interno para normalizar la eficiencia de la transfección. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se lizarán y se determinará la actividad de la luciferasa usando el Luciferase Assay Dual System (Promega). Las actividades de luciferasa se expresarán como la relación Luciferasa/Renilla.

III. Cultivo primario de hepatocitos de rata

Para los estudios in vitro se utilizarán 30 ratas Wistar macho de aproximadamente 6 semanas de edad provenientes del bioterio del INCMNZS sin ningún tratamiento para obtener cultivo primario de hepatocitos. Es importante enfatizar que se utilizarán 1-2 ratas por mes durante el tiempo que dure el proyecto. Los hepatocitos de rata se aislarán utilizando la técnica de perfusión con colagenasa de Berry y Friend (44). Brevemente, la rata es anesteciada con éter y posteriormente se canula la vena porta del hígado. Una vez canulada se extrae el hígado y se corta la arteria femoral para que el

animal muera. Al hígado se le infunde una solución salina amortiguada con colagenasa y los hepatocitos son separados por centrifugación de otras células hepáticas diferentes del parénquima y del debris celular. La viabilidad celular se determinará por exclusión con azul Tripano. Se sembrarán 50,000 células por cm^2 en placas de cultivo tratadas para máxima adherencia (cell bind) y se mantendrán en medio DMEM suplementado con glucosa, L-glutamina, piridoxina, piruvato de sodio y 10% de suero fetal bovino. El medio se reemplazará 4 horas después para eliminar las células muertas.

IV. Mutagénesis de sitio dirigido

La mutagénesis se realizará con el estuche QuikChange site directed mutagenesis (Stratagene) siguiendo las especificaciones indicadas por el proveedor. Para generar las secuencias mutantes se utilizará un plásmido que contiene la secuencia promotora del gen SNAT2 de rata de -872 a +265 como el templado natural (silvestre) y un par de oligonucleótidos específicos con los sitios mutados. La identidad y fidelidad de las construcciones se verificará por secuenciación (Equipo CEQ, Beckman Coulter).

V. Preparación de extractos nucleares y ensayo de retardo de movilidad electroforética (EMSA)

Los extractos nucleares se obtendrán de la línea celular HepG2 utilizando el estuche comercial Nuclear Extract (SIGMA). La concentración de proteína se determinará por el método de Lowry.

El ensayo de retardo de movilidad electroforética se llevará a cabo utilizando el sistema Gel Shift Assay System (Promega). Para esto, los oligonucleótidos de doble hebra se marcarán con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ utilizando la enzima T4 polinucleótido cinasa. Esta sonda marcada se incubará con 10 μg de extracto nuclear de HepG2 y amortiguador de unión por 30 min a temperatura ambiente. Para el análisis de super shift, se incubará 1 μg de anticuerpo específico anti-ChREBP (Millipore) con el extracto nuclear 15 min antes de

la adición de la sonda marcada. Los complejos se separarán en un gel de poliacrilamida al 4% en condiciones no-desnaturalizantes y se visualizarán por autorradiografía.

VI. Ensayo de Inmunoprecipitación de la Cromatina (ChIP)

Se utilizarán cultivos primarios de hepatocitos de rata mantenidos por 24 horas en medio de cultivo D-MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino. Posteriormente, las células se incubarán en medio suplementado con 5.5 mM o 25 mM de glucosa por 30, 60, 120, 180 y 240 minutos y se fijarán con formaldehído al 1% por 10 min a temperatura ambiente. La reacción se detendrá con glicina 0.125 M y se realizarán dos lavados con PBS frío. Las células se cosecharán, se lisarán y se sonicarán para obtener fragmentos de DNA de aproximadamente 300-500 bp. La cromatina soluble se inmunoprecipitará utilizando 4 µg de un anticuerpo específico anti-ChREBP (Millipore) y proteína A agarosa/esperma de salmón. El complejo proteína A agarosa/anticuerpo/DNA se lavará con diferentes soluciones a baja y alta concentración de sales y en buffer TE. El complejo DNA/anticuerpo se eluirá con una solución amortiguada de NaHCO₃ 0.1 M y SDS 1%. La fijación con formaldehído será revertida incubando el complejo con una solución de NaCl 5 M a 65°C por 18 horas. Finalmente, se desproteinizará con proteinasa K (10 mg/ml) y se recuperará el DNA para analizarlo por PCR. Para el análisis por PCR se utilizarán un par de oligonucleótidos específicos para el sitio ChoRE de la región promotora de SNAT2.

VII. Coinmunoprecipitación

La formación de complejos entre ChREBP y el co-represor Ncor2/SMRT se determinará utilizando la línea celular HepG2 previamente cultivados en medio con un alto contenido de glucosa (4.5 g/L; 25 mM) o en medio con bajo contenido de glucosa (1.0 g/L; 5.5 mM). Se obtendrán los lisados celulares y 50 µg de cada lisado será inmunoprecipitado con 2 µg del anticuerpo anti-Ncor (Millipore o Santa Cruz) por 60 min a 4°C. Los precipitados se colectarán en proteína A/G agarosa por una hora. Después de cuatro lavados con amortiguador RIPA, los precipitados se resuspenderán

en buffer de carga con SDS y se calentarán a 95°C por 5 min, se centrifugará y colectará el sobrenadante. Posteriormente, las muestras se separarán en un gel SDS-PAGE, se transferirán a una membrana de PVDF (Hybond-P, Amersham) para posteriormente detectar la presencia de ChREBP por la técnica de Western blot.

VIII. Western blot

Las proteínas serán separadas a través de un gel SDS-PAGE y transferidas a la membrana de PVDF. Enseguida, las membranas serán bloqueadas con leche en polvo sin grasa al 5% durante una hora. Se realizarán 3 lavados de 5 min cada uno con TBS-Tween y se incubarán toda la noche con el anticuerpo primario (anti-ChREBP). Las membranas se lavarán nuevamente tres veces por 10 min en TBS-Tween y se incubarán con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano por 2 horas. Se revelará utilizando el reactivo de detección de quimioluminiscencia (Mllipore) y se expondrá a placas de autorradiografía. Para el análisis cuantitativo, se realizará una densitometría de los blots con el software Image J (Aspire Software International, VA, USA).

IX. Análisis estadístico

Los resultados se presentarán como el promedio \pm error estándar de la media (SEM). Los datos con una distribución variable se transformarán logarítmicamente antes de su análisis. Los datos serán evaluados usando un análisis de varianza de una vía y cuando la interacción resulte significativa se realizará la prueba PLSD de Fisher. Las diferencias se considerarán significativas con una $p < 0.05$

c) Tamaño de muestra

En la descripción de la maniobra o intervención se describe el número de animales que se utilizarán dependiendo de cada objetivo. Este número se determinó según la siguiente ecuación $n=2S^2 (Za + Zb)^2/D^2$; donde S=desviación estandar, D= diferencia mínima de los valores de RNAm obtenidos entre los animales del grupo control y los que recibieron la dieta alta en sacarosa, a=tasa de error 0.05, b=potencia de la prueba 0.8. $Za + Zb = 1.96 + 0.84$ constantes. Se utilizaron datos obtenidos de un estudio piloto previo realizado en el departamento de Fisiología de la Nutrición utilizando los valores de