

Sobreviviendo a la hipoxia: inducción génica de la glucólisis anaerobia en camarón

Dra. Gloria Yepiz Plascencia
gyepiz@ciad.mx

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

1. Hipoxia y glucólisis anaerobia
2. Hexocinasa (HK)
3. Lactato deshidrogenasa (LDH)
4. Factor inducido por hipoxia HIF-1
5. Regulación de HK y LDH por HIF-1

camarón blanco

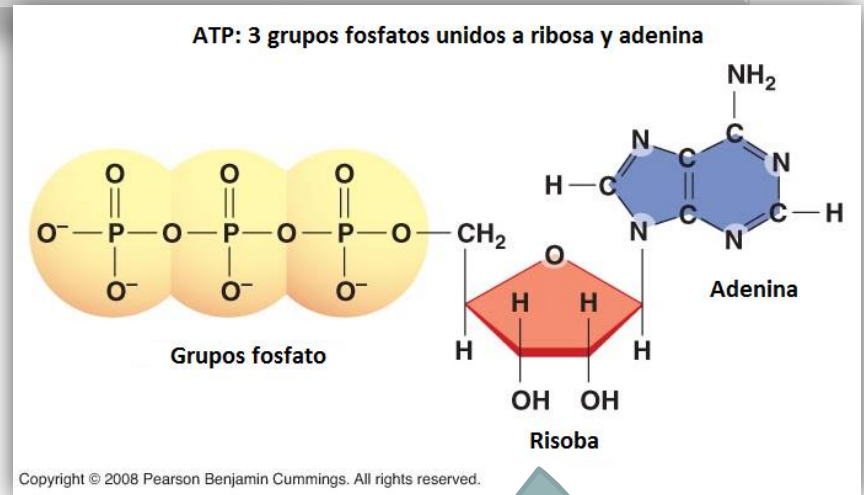
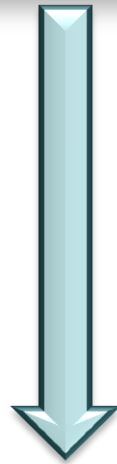
Litopenaeus vannamei



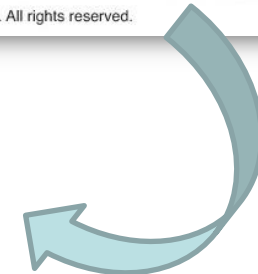
1. Hipoxia y glucólisis anaerobia

Los seres vivos necesitan energía: ATP

1. Carbohidratos
2. Lípidos
3. Proteínas



Vivir
Crecer
Reproducirse
y sobrevivir

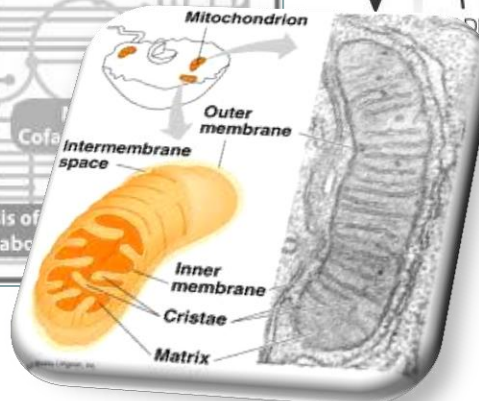
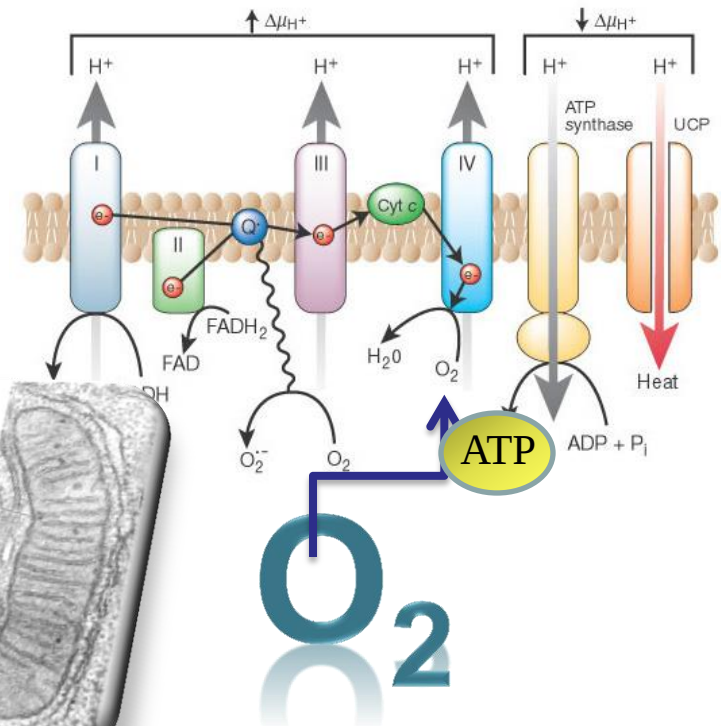
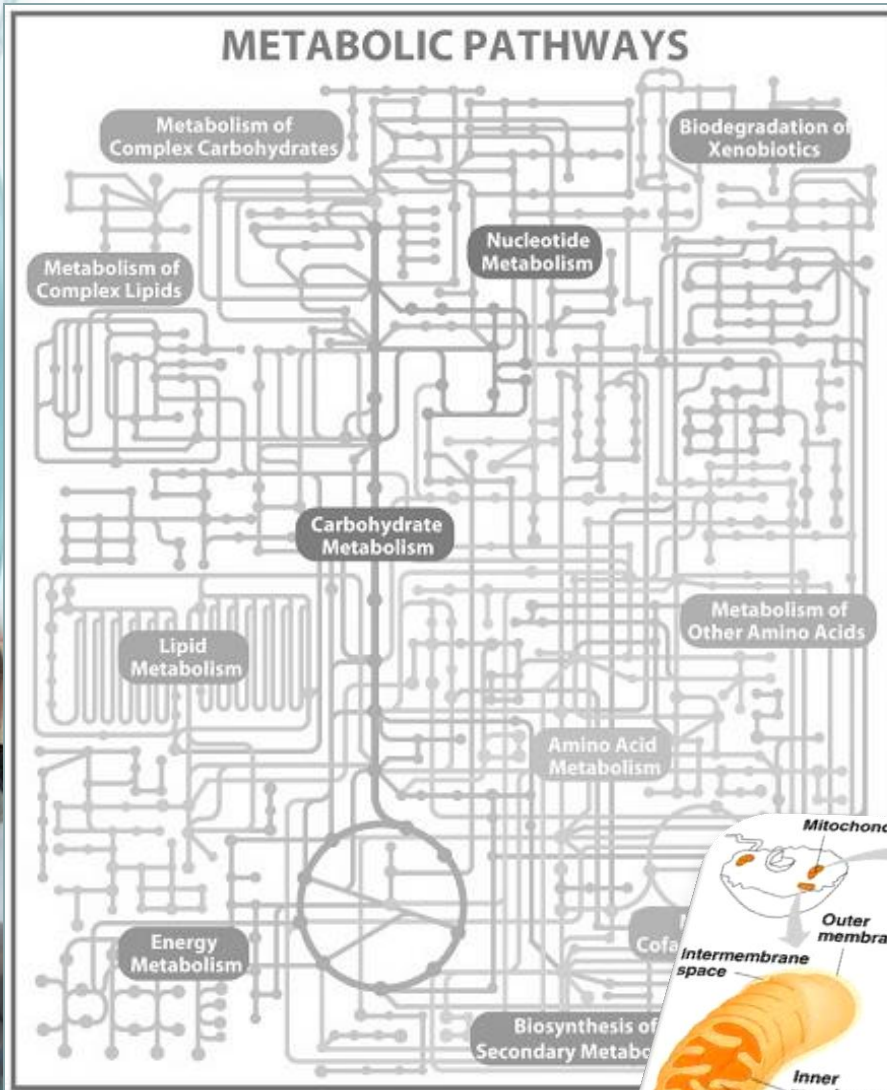


Energía: ATP

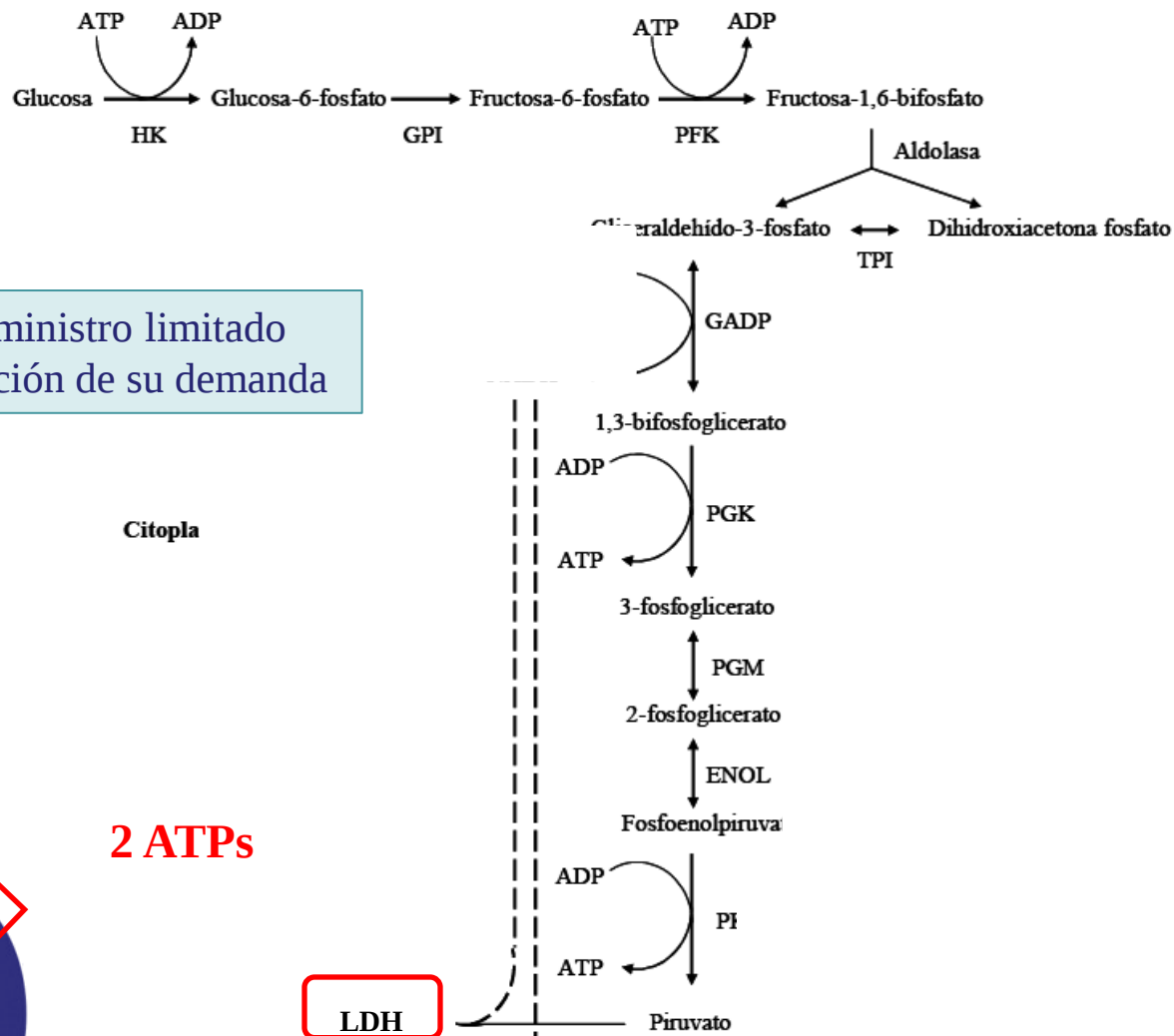
Glucosa

Glucólisis

Ciclo de Krebs
Fosforilación
oxidativa
Transporte de
electrones



Hipoxia: Suministro limitado de O₂ en función de su demanda



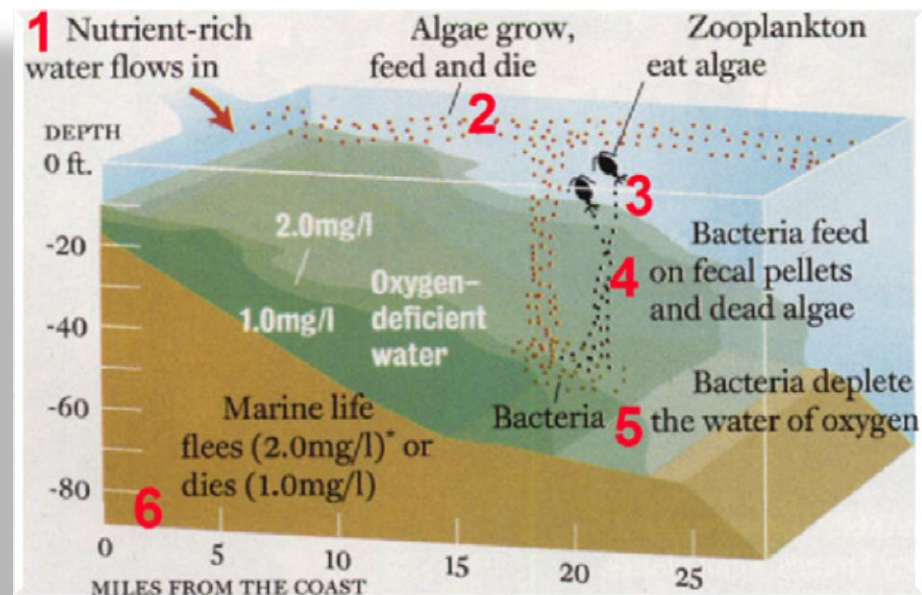
2 ATPs

36 ATPs



Metabolismo anaerobio en crustáceos

- ✓ Inducción de glucólisis anaerobia
- ✓ Aumento de lactato
- ✓ Disminución del crecimiento
- ✓ Baja reproducción
- ✓ Aumenta la mortalidad



Hipoxia natural y por actividades antropogénicas

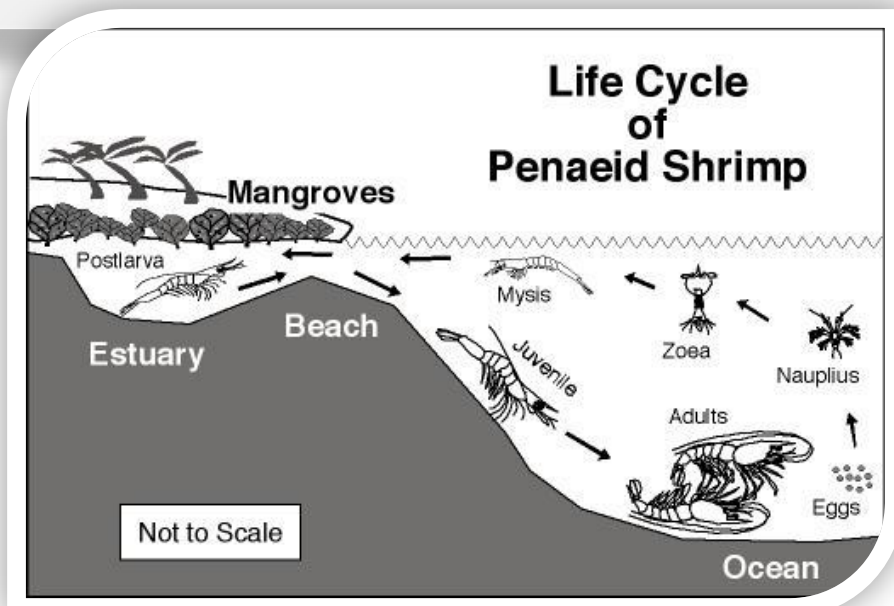


<http://www.gulfhypoxia.net/overview/>

El camarón blanco del Pacífico

Litopenaeus vannamei

- ✓ Es el principal camarón cultivado en América y Asia con 2.3 millones de toneladas producidas en el 2006 (Hedlund, 2007)
- ✓ Los camarones peneidos, pueden tolerar mejor bajas concentraciones de oxígeno (Rosas et al., 1997)
- ✓ Los camarones “sufren” hipoxia en el medio natural y en cultivo
- ✓ La glucólisis anaerobia es la principal fuente de energía en crustáceos en hipoxia





Concentración de lactato y glucosa en hemolinfa de *L. vannamei* en hipoxia

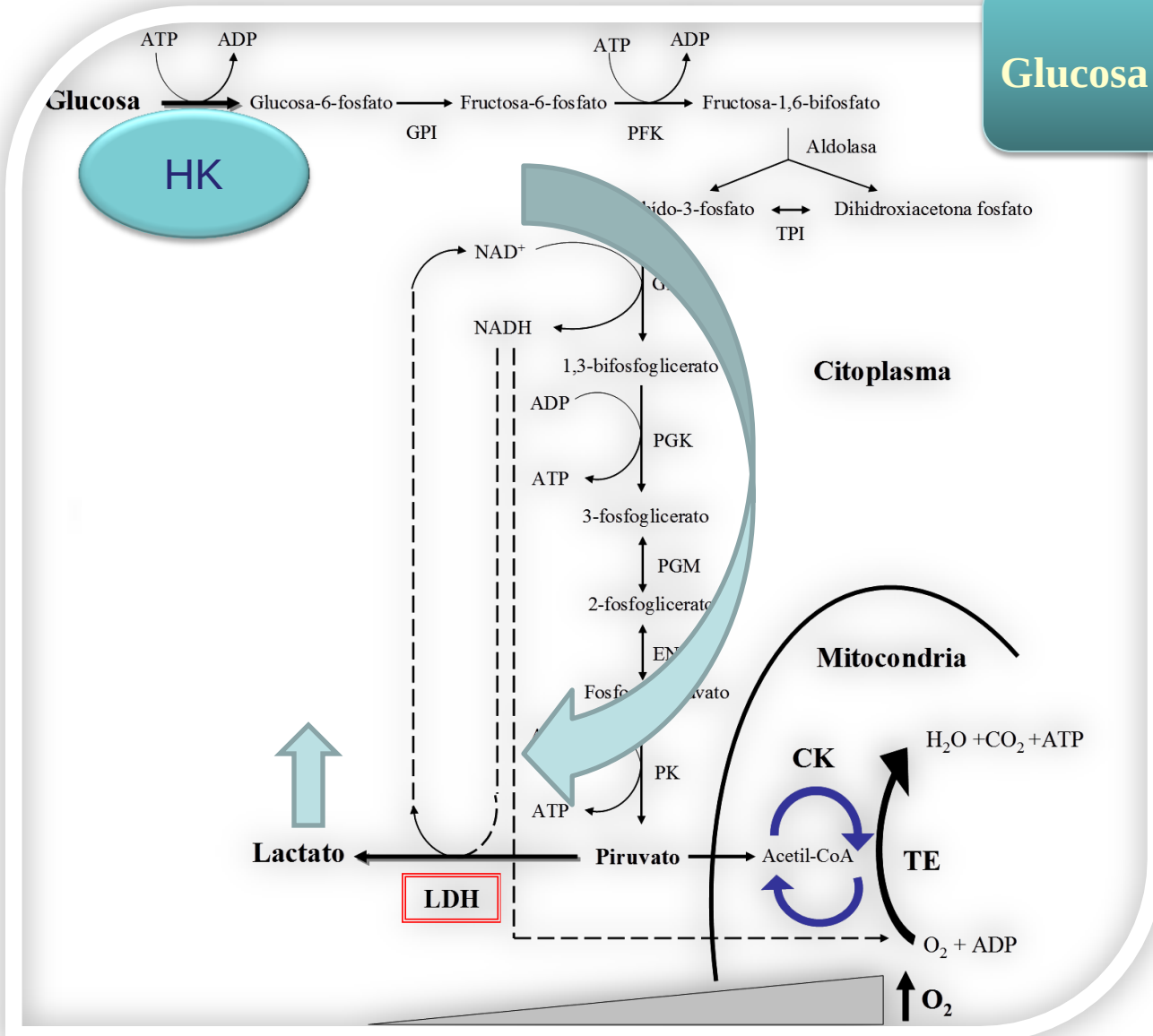
	Control Normoxia	3 días de hipoxia	2 semanas de hipoxia	ANOVA (P)
Glucosa (mg/dL)	12.9±7.2 ^a	57.0±30.2 ^b	45.3±19.7 ^b	<0.05
Lactato (mg/dL)	8.05±1.7 ^a	30.1±17.3 ^b	34.4±20.1 ^b	<0.01
Hemocianina (mg/mL)	84.6±11.3 ^a	76.1±8.2 ^a	110.6±20.0 ^b	<0.01
Proteína (mg/mL)	114.9±19.0	117±5.1	135.7±20.8	NS



Hemolinfa = sangre

2. Hexocinasa - HK

Glucosa → G6P



Para la caracterización de genes.....

Diseño de oligonucleótidos
degenerados o específicos para PCR



RACE, clonación y secuenciación

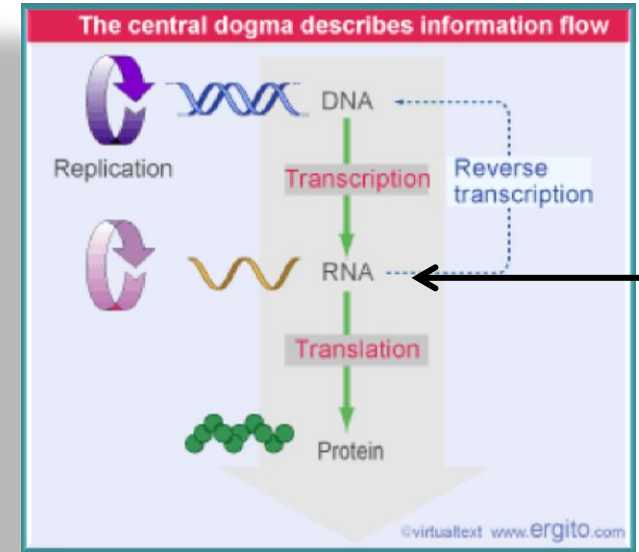
Análisis bioinformático

ClustalW, Blast, ExPASy
Proteomics tools

Análisis filogenético

Neighbor-joining method Jones-Taylor-Thornton
matrix / 1000 replicas / MEGA software version 4

Tamura et al., 2007 10



Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de HK

```

1                                     M
1  GACCCACGAGAACTACCTTGTGCGTCACTACAGCATCATTCTGCTACTGCCAGACCTTACAGACAGTTCTTCGAAACAGCTTGAAGATG

2  S S M T E F P V L F I G D E H K K E K V K Q I L S P L V L T
91  TCATCTATGACTGAGTTCCTGTGCTCTTTATTGGAGATGAACATAAAAAAGAAAGGTAAAGCAGATATATCTCCTCTCGTGTAAACA

32  K S Q Q Q E V S S V F L D E M R L G L A S S P E R K S S L L
181 AAGTCGCGAGCAACAGGAAGTTAGTAGTGTCTTCTCGATGAAATGCGTTTGGGCCCTTGCTTCCAGTCCTGAGAGGAAATCTTCCCTTTTG

62  M E N T F I P E L P D G T E N G E Y L A L D L G G T N F R V
271 ATGGAGAATACTTTTATCCCTGAACCTCCTGATGGTACAGAAAATGGTGAATATTGGCTCTAGACCTTGGAGGAACCAATTTTCGAGTC

92  M Y V K M K D G S I T E E I V D Y Y H V P E E R R L G P G A
361 ATGTATGTCAAGATGAAGGATGGAAGTATTACGGAGGAGATTGTGGACTACTATCATGTGCCAGAAGAGCGACGACTTGGACCTGGAGCA

122 E L F D Y L A E C L G N F I K K R K L G G R N L Q L G F T F
451 GAACTCTTTGATTATCTTGCTGAATGTCTTGGAACTTTATAAGAAAAAGAAAATTAGGAGGGCGAAACTTACAGCTCGGTTTCACTTTTC

152 S F P M T Q K S L D V G I L L S W T K S F N C P G V V G E D
541 TCATTCCCAATGACTCAGAAGAGTCTTGATGTTGGAATATTGTTATCTTGGACAAAATCTTCAACTGCCCTGGTGTGTTGGTGAGGAT

182 A V K M L S D A I Q K H G G L D I T V T A V L N D T T G T L
631 GCTGTTAAGATGCTTAGTGATGCTATTGAGAAGCATGGTGGATTAGATATTACAGTCACAGCAGTTCTTAATGACACTACAGGCACACTC

212 V Q G A Y M D K R C A L G M I L G T G S N G C Y I E K V E N
721 GTACAAGGTGCTTATATGGACAAGCGATGTGCTCTGGGCATGATTCTTGGCACTGGCTCTAATGGCTGCTACATAGAAAAAGTTGAGAAT

242 I E K W H G K H Q E A E M I V D I E W G A F G D N G V L D F
811 ATAGAGAAGTGGCATGGAAGCACCAGGAAGCCGAGATGATTGTGGACATAGAATGGGTGCCTTTGGGGATAATGGTGTACTAGATTTTC

272 I K T S W D R A V D S K S L L V K S F T F G K Y F A G K Y L
901 ATCAAGACAAGCTGGGACAGAGCTGTAGACAGCAATCACTGCTTGTTAAATCATTACCTTTGGAAGTACTTTGCTGGAATACTTA

302 G D L Y R E I L L T L S K E G L F C S G N I G K L D T Q G A
991 GGAGACTTATATCGTGAGATTTTACTCACTCTGTCCAAAGAAGGACTCTTCTGTTCTGGTAACATCGGCAAGTTAGATACGCGGGTGCA

332 I T T T D V S N I E R D N M Q G D S E T T R K V I E G V G L
1081 ATTACTACCACTGATGTTTCTAACATTGAGAGGGATAATATGCAGGGCGACTCAGAGACTACTAGAAAGTTCATCGAGGGCGTCGGGCTT

362 T C D E E G F V H C T I C C W S H F L P G G P L R S L L T N
1171 ACGTGTGATGAGGAAGGATTGTACATTGCACAATATGTTGCTGGTCTCATTTTCTACCGGGGGTCTCTCCGTTCTTTATTGACAAAC

392 I L L G A W R G P L H I A I D G S P F H Y H P R F R P L M E
1261 ATCCTGCTGGGCGCATGGAGAGGCCCACTGCACATTGCTATTGACGGATCCCCCTTCCACTATCACCCGAGATTAGACCGCTCATGGAA

422 R L I A E F A P G R P F N L L L V H D G S G K G S A L A A S
1351 AGGCTCATTGCAGAGTTTGTCTCCGCGCAGACCATTAACTGCTGCTGGTTCACGATGGCTCGGGGAAAGGATCAGCTTTAGCAGCTTCC

452 I A E R L Q K R L G K G K A N P L G G G S S Q G V P H P S P
1441 ATTGCTGAGAGACTGCAGAAAGGCTGGGAAAAGGAAAGGCGAATCCACTTGGAGGAGGCAGAGCCAAGGAGTCCCTCATCATCTCCC
482 Q I *
1531 CAAATCTAGAGCTTGCCAAAATTGGACTTGGAAAAGAAATAGCTACTGCTTTCCCAAGCCCTTTCAAATCCTGAAAAGAAAAGCAGAAAA
1621 AATATGAATATAATTCTGGCTTTCGAAAAAATGGTGGAAAATATATTCAAGTTGATGTACATCAACTTTGATGATATGTTATTTTCG
1711 ATGTGAGGGACAATTTTATTTTATTTTTCATAATTTTTCCTTAAAGACAAAGCTAAACAGTTTACACAAAATTANCCTTATGCT
1801 AATATAGATTCTTTGTTGTTCAATAAACAATATCCGGGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Características de la HK

cDNA de HK

- ❖ 1869 pb
- ❖ Proteína de 483 amino ácidos
- ❖ PM 53 kDa

Identidad de HK de camarón

- ❑ Abeja *Apis mellifera* (47%)
- ❑ Mosca de la fruta *D. melanogaster* A y C (38%)
- ❑ Hombre *H. sapiens* I, II y GK (37%)
- ❑ Pez *Cyprinus carpio* (35%)

L. *vannamei* HK1 LLMENTFIPELPDGTENGEYLAIDLGGTNFRVYVKMKDGS----ITEEIVDYHVPEER 115
A. *mellifera* HK LQMENTYVPELLDGTGKGLYLAIDLGGTNFRVYVLELDHGI----PKREEVKYHISSDL 120
D. *melanogaster* HKC VKCFPTYVQDLPTGDEMKGKYLALDLGGTNFRVYVLSLK----GHHDATVDSQIYAVPKDL 100
O. *mikiss* GK VKMLPTYVCSSTPEGSEVGDFLAIDLGGTNFRVYVVKVGEDEERGKVKVETKHQMYSI SEDA 119
H. *sapiens* GK VKMLPTYVRSSTPEGSEVGDFLSIDLGGTNFRVYVVKVGEDEEGQWSVTKKHQMYSI SEDA 115
M. *musculus* GK VKMLPTYVRSSTPEGSEVGDFLSIDLGGTNFRVYVVKVGEDEAGQWSVTKKHQMYSI SEDA 114
T. *cruzi* HK LRMLPSYVYKTDPSKATGVFYALDLGGTNFRVYVVTCKEGR---VADRVDKVFVIPPQA 122
S. *cerevisiae* GK LPMIPAFVTGSPNGTERGVLLAIDLGGTNFRVYVSVNLHGDH----TFSMEQMSKIPDDL 117
H. *sapiens* HK2 VKMLPTYCATPDGTGKGDFLAIDLGGTNFRVYVVRVRNGKWG---GVEMHNKIYAI PQEV 566
M. *musculus* HK2 VKMLPSYVRSIPDGTGHEGDFLAIDLGGTNFRVYVVKIRSGKKR---TVMHNKIYSI PLEI 593
: : : : * : ***** : : :

L. *vannamei* HK1 RLQ---PGAELFDYLAEC LGNFIKRKLGGG-----NLQIGTFSFPMTPKSLDVGIL 165
A. *mellifera* HK RVG---SGIRLFDYLAECVSDVFVIAQGLQDV-----ELPIGTFSFPMIHSIDIGIL 170
D. *melanogaster* HKC MVG---PGVDLFDHIAAGCLAKFVEKHKDMKTA-----YLPITGTFSPFCVVLGKEGIL 150
O. *mikiss* GK MTG---TAEMLFDYIAECISDFLNRQHIIKHK-----KLPIGTFSFPVRNENIDKGI 169
H. *sapiens* GK MTG---TAEMLFDYISECISDFLDKHKQMKHK-----KLPIGTFSFPVRNEDIIDKGI 165
M. *musculus* GK MTG---TAEMLFDYISECISDFLDKHKQMKHK-----KLPIGTFSFPVRNEDIIDKGI 164
T. *cruzi* HK LQG---TAEDLFGFIAQSVKMMEQKAPEDLNR---TVPIGTFSFPTBKGVVHGFL 174
S. *cerevisiae* GK LLDENVTSDDLFGFLARTLAFEMKHYHPDELAKGKDAKPMKIGTFSFVPTDTSINSGTL 177
H. *sapiens* HK2 MHG---TGDELFDHIVQCIADFLYMGKGV-----SLPIGTFSFPCQNSIDESIL 616
M. *musculus* HK2 MQG---TGDELFDHIVSCISDFLDYMGIKGP-----RMPITGTFSPCKTSIDCGIL 643
: . . * : : : : ***** : . . *

L. *vannamei* HK1 LSTKSFNCFVVGEDAVKMLSDAIQKHGGLDITVTAIVLNDTTGTLVQGYAYMDK----- 219
A. *mellifera* HK VTKTKFNCFDVVNEDAVKLLREALDRRGDTKVKVVAI LNDTTGTLVQGSTLDL----- 224
D. *melanogaster* HKC VRITKGFDCAVVEGEDVGRMLHEAIQRRGDADIAVVAI LNDTTGTLMSCAHRNA----- 204
O. *mikiss* GK LNTKGFKASGAEGNNVGLLRDAIKRRGDFEMDVAMVNDTVATMISCYEDR----- 223
H. *sapiens* GK LNTKGFKASGAEGNNVGLLRDAIKRRGDFEMDVAMVNDTVATMISCYEDR----- 219
M. *musculus* GK LNTKGFKASGAEGNNVGLLRDAIKRRGDFEMDVAMVNDTVATMISCYEDR----- 218
T. *cruzi* HK IKTKGFSTFVVEGKDVVLLQKALKR-MEVKVKVVALCNDTVGTLITNYFFDP----- 227
S. *cerevisiae* GK IKTKGFRIADTVGKDVVQLYQQLSAQGMPIKVVALTNDTVGTLISHCYTSNTDSMT 237
H. *sapiens* HK2 LKTKGFKASGCEGDDVVTLLKEA IHRREEFDLDVAVVNDTVGTMTCGEDEP----- 670
M. *musculus* HK2 ITTKGFKATDCVGHVATLLRDAVKRREEDLDVAVVNDTVGTMTCAYEEP----- 697
: * * : : : : : * : * : * : *

L. *vannamei* HK1 -----RCALGMI LGTSGNGCYIEKVENIEKWHGK-HQEA-----MIVDIEWGAFGNG 267
A. *mellifera* HK -----DTAIGL LGTGSNACYIERADRVHEWETERHGERQ-----VIIDIEWGAFGNG 273
D. *melanogaster* HKC -----DCRVGV LGTGSNACYVEDVENVDLRAADFCKTKRS-----VIVNAEWGAFGEGG 254
O. *mikiss* GK -----SCEVGM LGTGSNACYMEEMRTVELVEGEGR-----MCVNTIEWGAFGANG 269
H. *sapiens* GK -----QCEVGM LGTGSNACYMEEMQNVELVEGDEGR-----MCVNTIEWGAFGDSG 265
M. *musculus* GK -----QCEVGM LGTGSNACYMEEMQNVELVEGDEGR-----MCVNTIEWGAFGNSG 264
T. *cruzi* HK -----DTQVGV LGTGSNACYFEDAYAVTKEPVSVAARGTTQ-----T PINMECGNFDSKY 277
S. *cerevisiae* GK SGEISEPVGICIFGTGTNGCYMEEINKITKLPQELRDLKLIKEGKTHMIINVEWGSFDN-E 296
H. *sapiens* HK2 -----HCEVGL LGTGSNACYMEEMRNVELVEGEGR-----MCVNMIEWGAFGNG 716
M. *musculus* HK2 -----SCIEGL LGTGSNACYMEEMKNVEMVEGNQGG-----MCINMEWGAFGNG 743
: * * : * : * : : : * * *

L. *vannamei* HK1 HFLPGGPLRLSLTNILLG-AWRGP-----LHIAIDGSPFHYHPRFRPLMERLIAEFA-- 428
A. *mellifera* HK VSNRAALVSIICLAVLLKRIDRKH-----VTIAIDGSPYKHHPRLETWIKQYIPLLA-- 437
D. *melanogaster* HKC VAKRAATLVAIGVSGLVNRTSNRR-----VIVGIDGSPYRYHPKFDAYMRQTLOKLVK- 425
O. *mikiss* GK VSTRAAHMCSAGLAGVINRMRERRSPAVLKITVGIDGSPYKLHPCFQDRFHVVREL-- 436
H. *sapiens* GK VSTRAAHMCSAGLAGVINRMRESRSEDVMRITVGIDGSPYKLHPSFKERFHASVRLT-- 432
M. *musculus* GK VSTRAAHMCSAGLAGVINRMRESRSEDVMRITVGIDGSPYKLHPSFKERFHASVRLT-- 431
T. *cruzi* HK VGRRAAQISAMCSAPLVKTRKEG-----RATVAIDGSPFEKTPSFRLLQNNMNAILG- 442
S. *cerevisiae* GK ISRRSAYLAAPVLAAILKTNALNKRYHGEVEIGIDGSPVEYYPGFRSMLRHAIALSPLG 473
H. *sapiens* HK2 VARRAAQLCGAGMAAVDRIRENRGLDALKVTVGIDGSPYKLHPHFVAKVMHETVKDLA-- 883
M. *musculus* HK2 VSKRAAQQLCGAGMAAVVQKIRENRGLDHLNVTVGIDGSPYKLHPHFSRIMHQTVKELS-- 910
: . . : : : : * : : : :

L. *vannamei* HK1 --PGRPFNLLLHVGSGSGSALAASIAERLQKRLGKGKANPLGGSSQGVPHPS PQI 483
A. *mellifera* HK --PDHKFKMIHAEISGSGAALVAAIAQRLQNRLD----- 470
D. *melanogaster* HKC --ADKEWDIMLSEISGSGAALVAAVASKTK----- 454
O. *mikiss* GK --PHCDITFIQSEISGSGAALISAVACKMAACMLTP----- 471
H. *sapiens* GK --PSCIEITFIESEISGSGAALVSAVACKK-ACMLGQ----- 466
M. *musculus* GK --PNCEITFIESEISGSGAALVSAVACKK-ACMLGQ----- 465
T. *cruzi* HK --PGCDVTALAREISGSGAALFISALVVNDK----- 471
S. *cerevisiae* GK AEGERKVKHLKIATKISGSGAALCALVA----- 500
H. *sapiens* HK2 --PKCDVSFLQSEISGSGAALITAVACRIEAGQR----- 917
M. *musculus* HK2 --PKCTVSFLLSEISGSGAALITAVGVRLRGDPTNA----- 945
: * * : * : * : : * : :

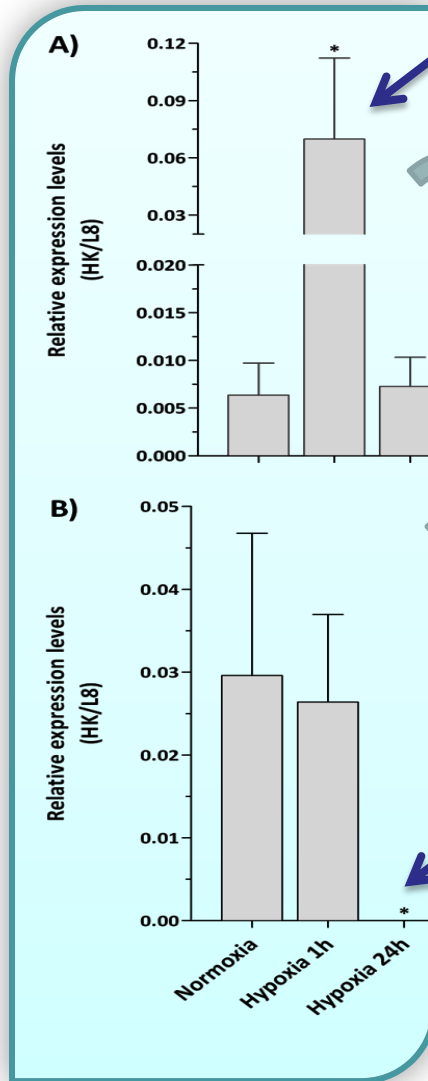
• Sitios de unión a glucosa, ATP y Mg²⁺ conservados

- PM de HK *L. vannamei* 53 KDa
- HK de invertebrados:
D. melanogaster (50 kDa)
A. mellifera (51 kDa)
H. americanus (50 kDa)

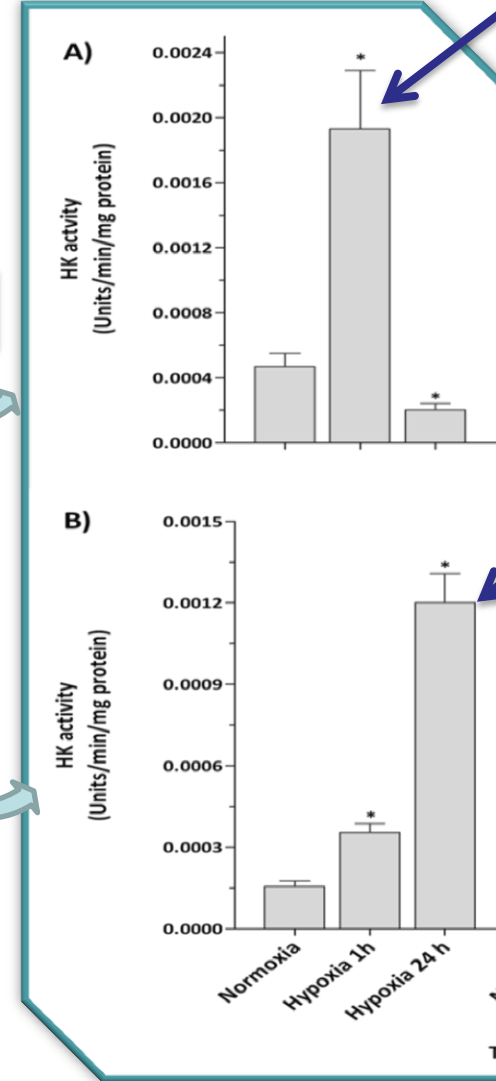
HK con especificidad por glucosa en Hp de *L. vannamei*

Actividad y expresión de HK en hipoxia

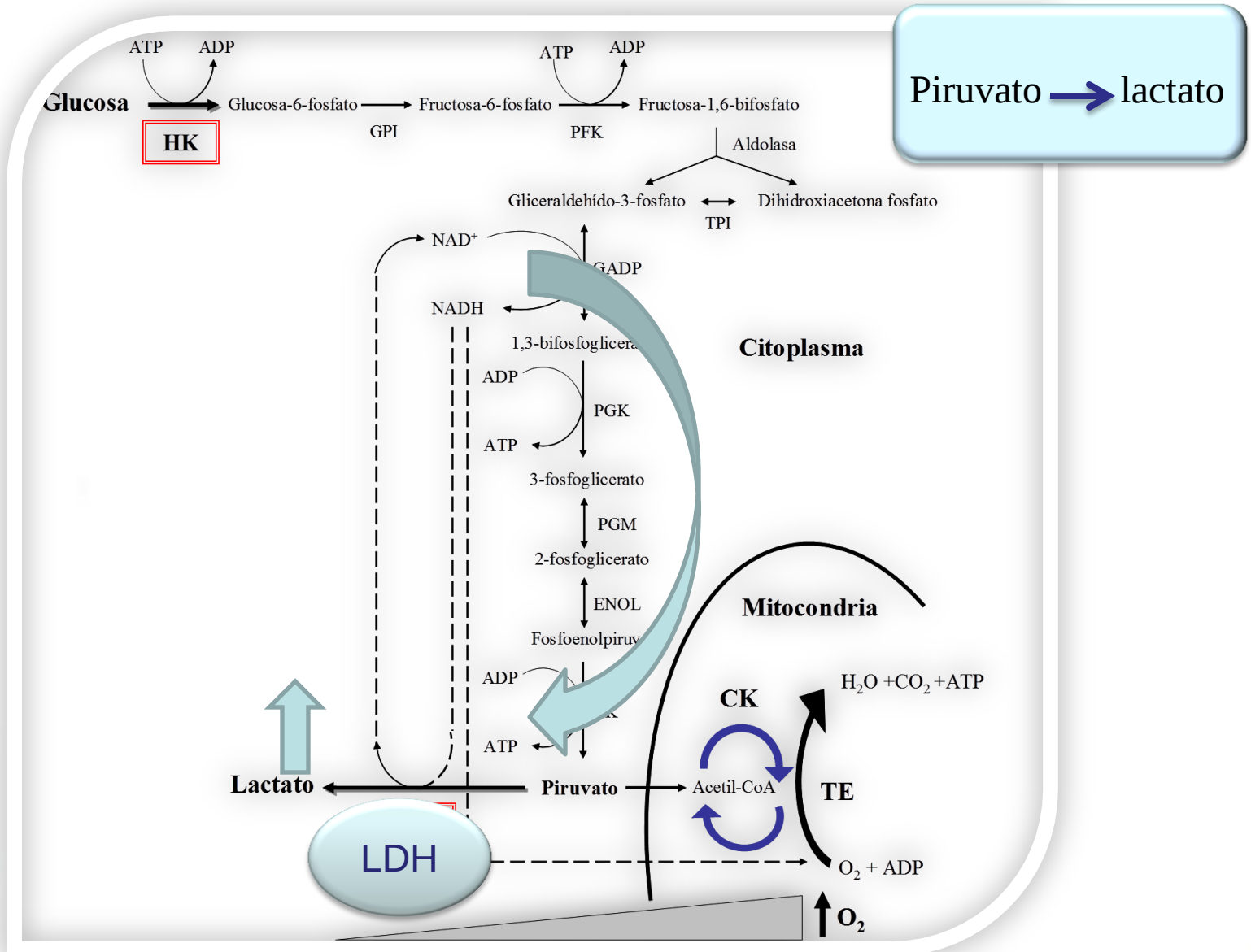
Expresión



Actividad

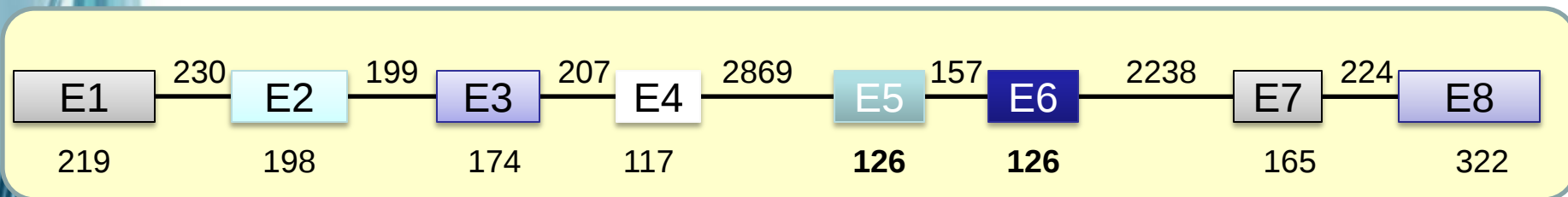


3. Lactato deshidrogenasa- LDH

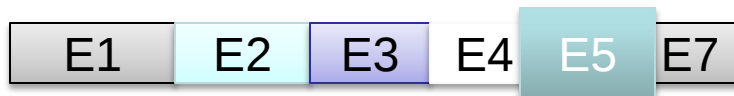


Corte y empalme alternativo mutuamente excluyente del gen de LDH genera dos subunidades

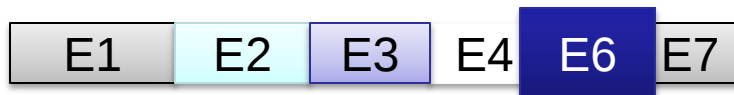
✓ El gen completo es de 7,571 pb y tiene 7 intrones, uno en el 3'UTR



LDH1



LDH2

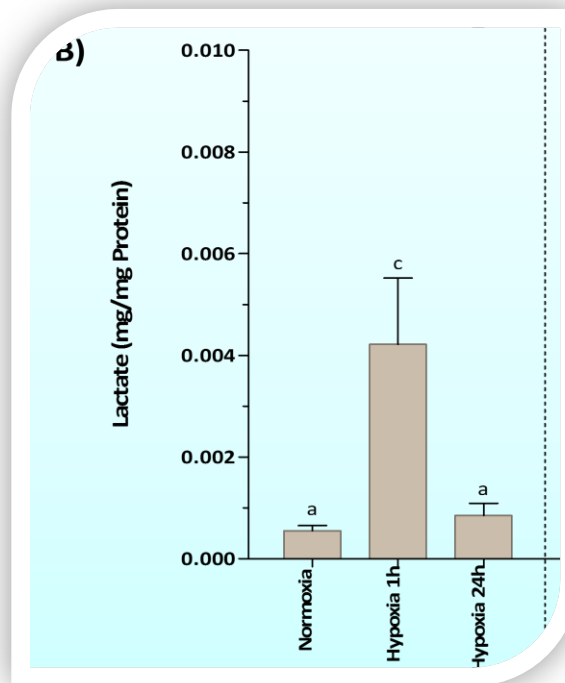


Alineamiento de LDHs

[illegible]

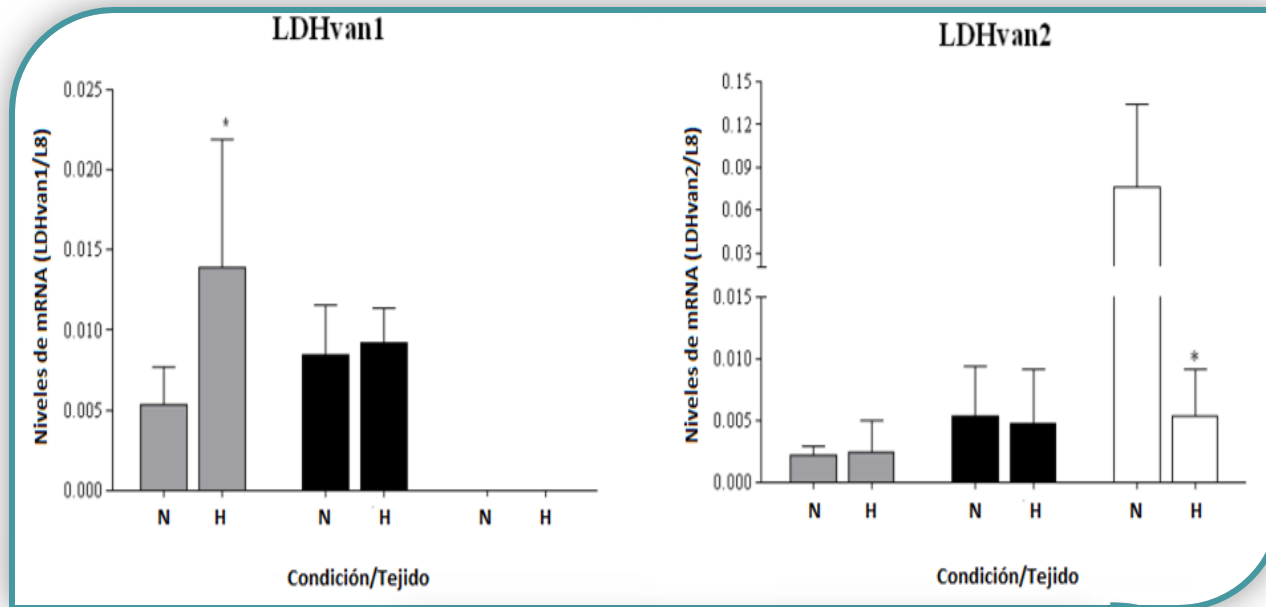
Exon 5 y Exon 6

Producción de lactato en branquias durante hipoxia

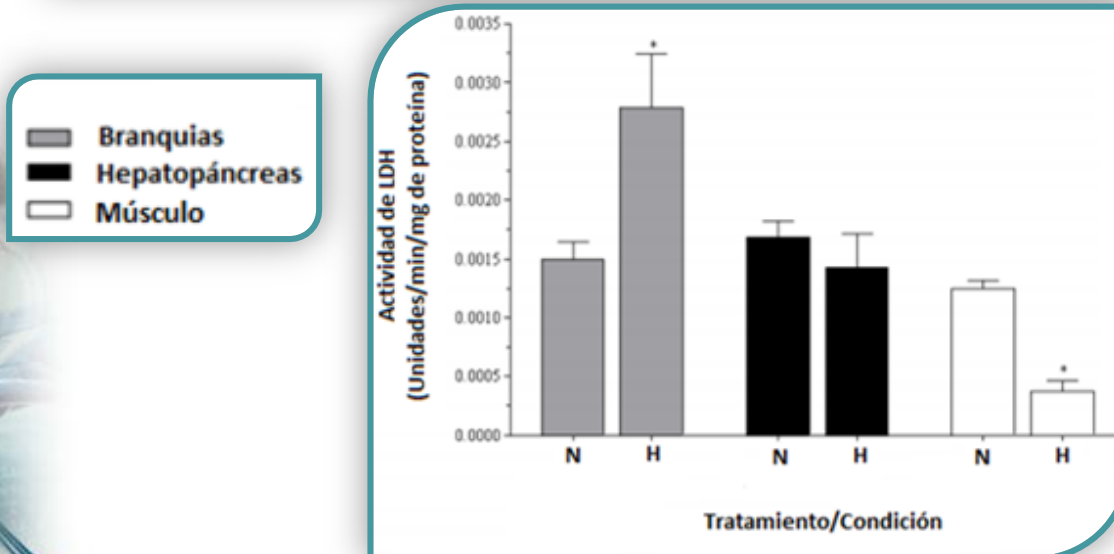


Soñanez-Organis et al., 2012

La expresión conjunta de LDH1 y LDH2 correlaciona con la actividad total de LDH

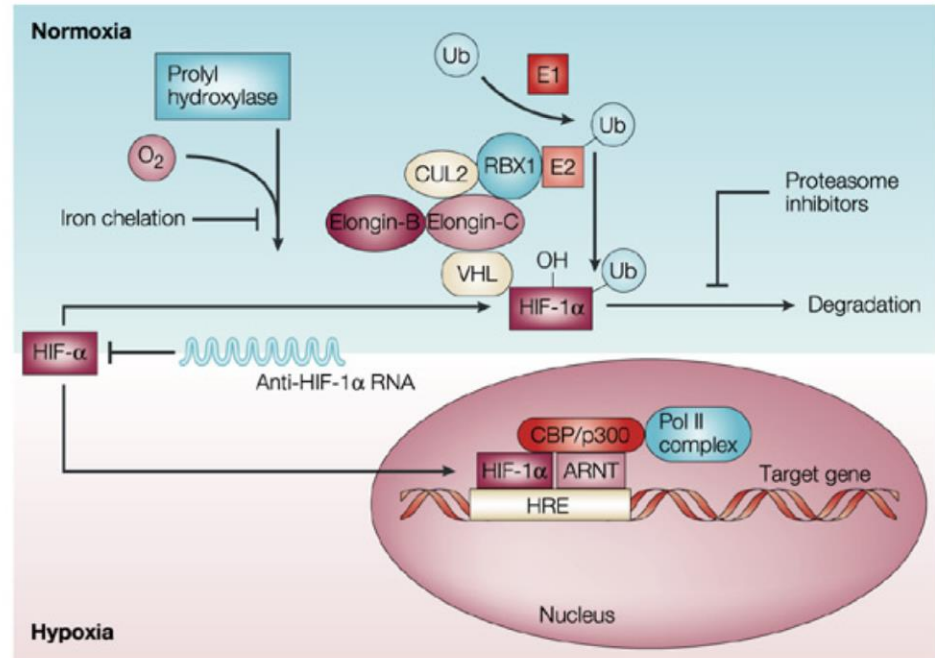
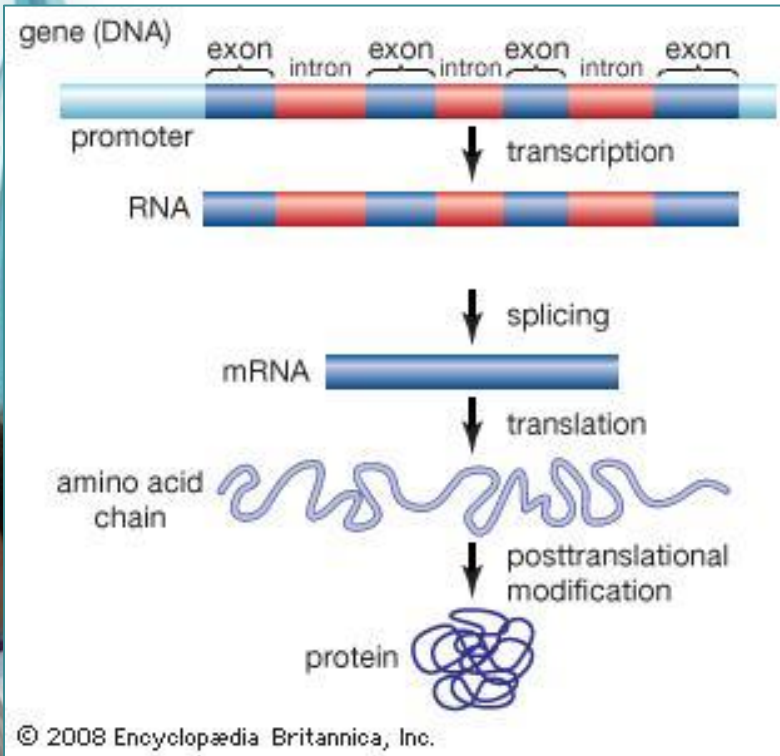


mRNA



Actividad enzimática

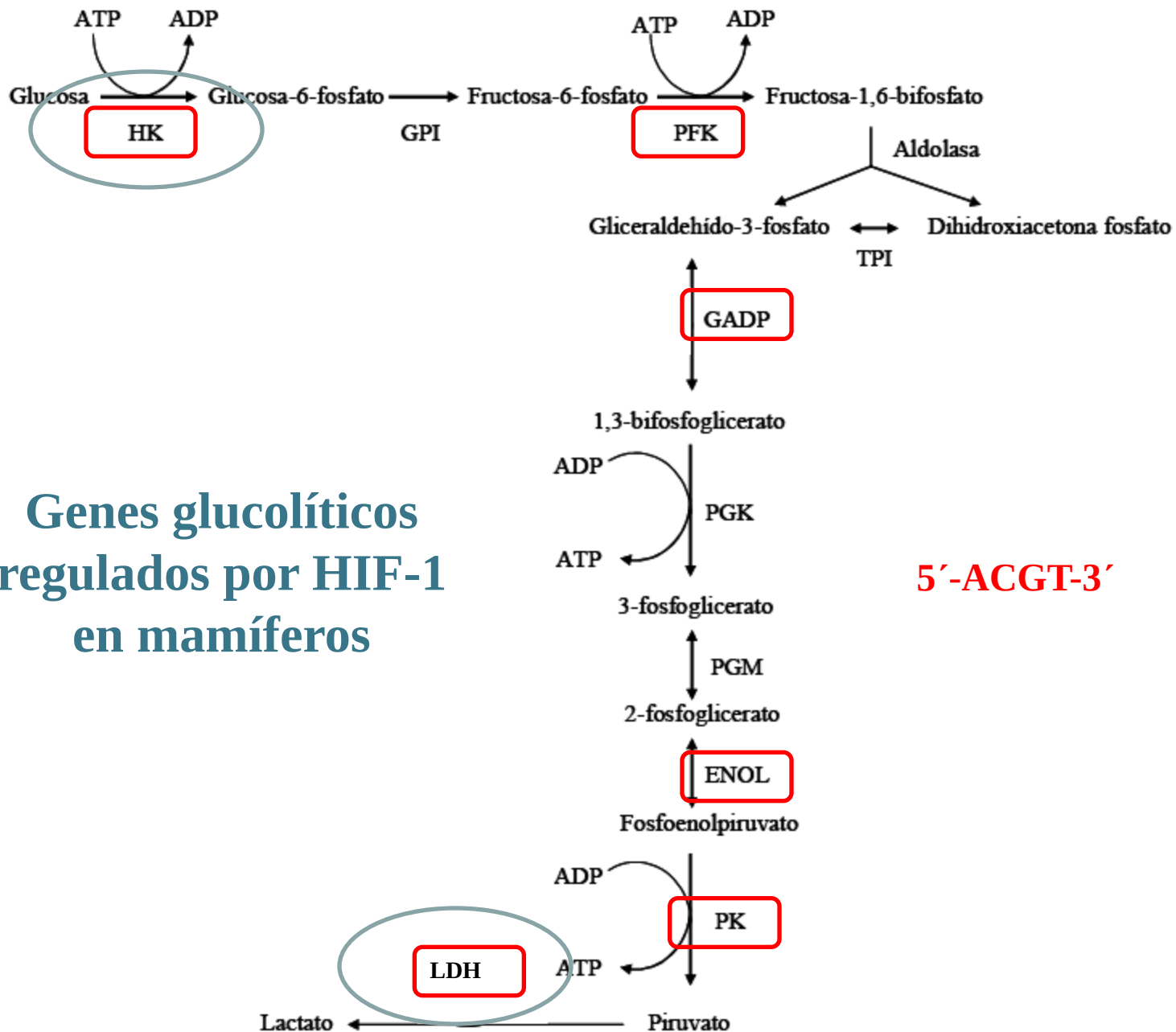
4. Factor Inducido por hipoxia HIF-1



Nature Reviews | Cancer

Factor de transcripción

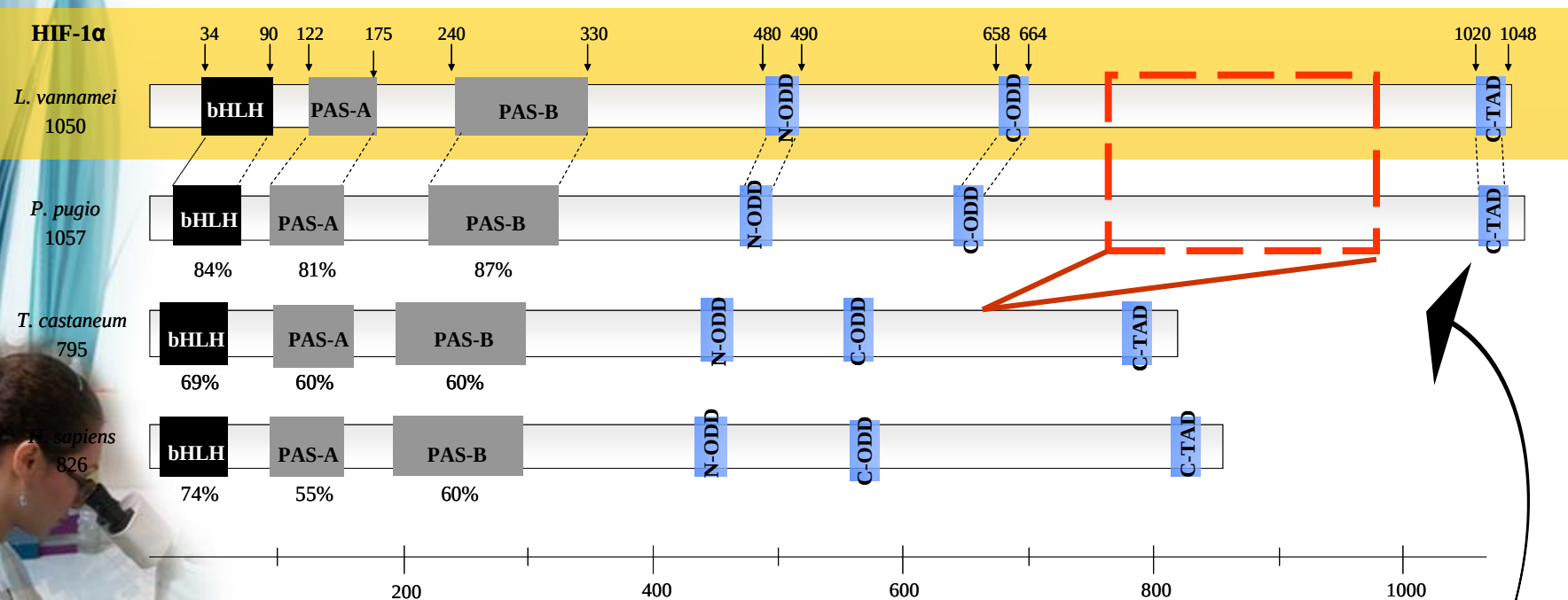
HIF-1 "Regulador Maestro"



Genes glucolíticos regulados por HIF-1 en mamíferos

5'-ACGT-3'

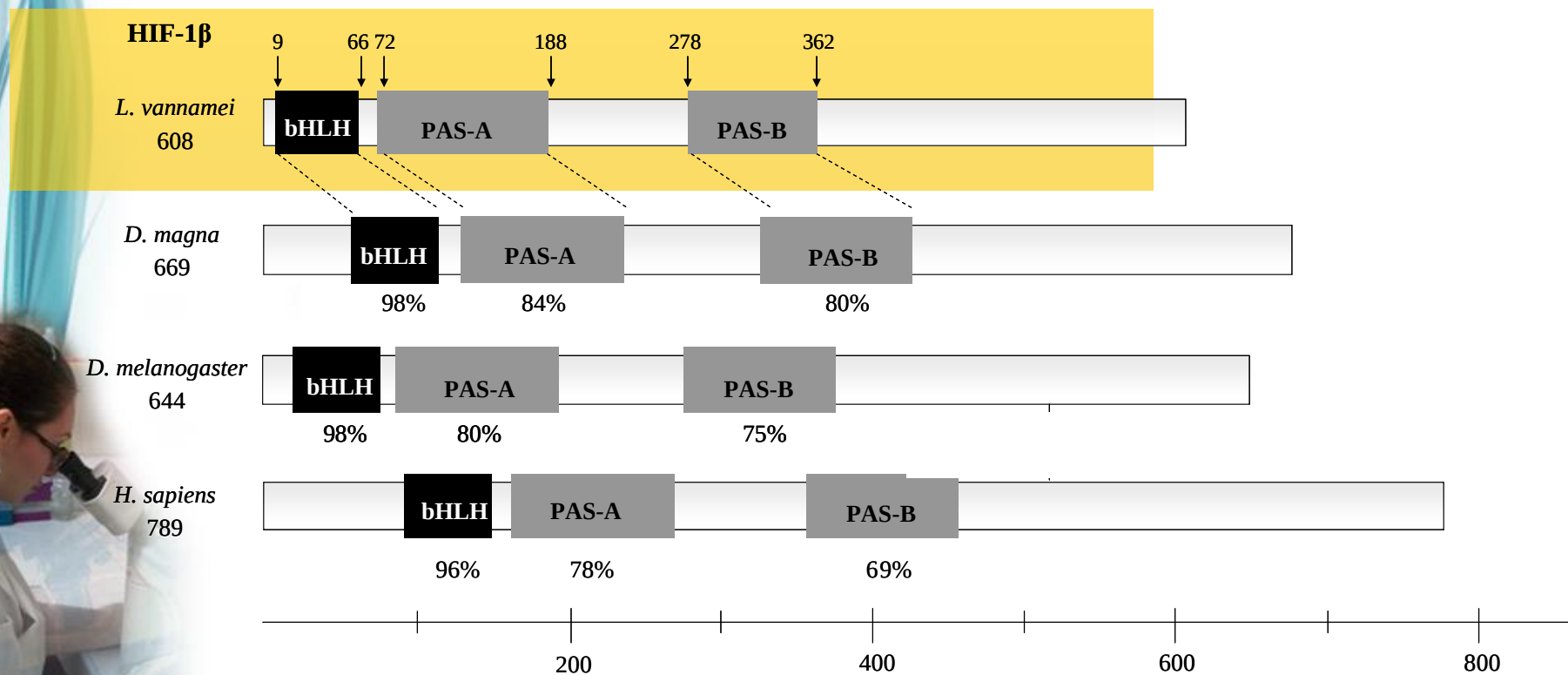
Dominios de HIF-1 α de *L. vannamei*: comparación con proteínas homólogas



224 aminoácidos > HIF-1 α de vertebrados

Dominios conservados

Dominios de HIF-1 β de *L. vannamei* y proteínas homólogas



Dominios conservados

Como probar la función de HIF-1 en hipoxia?

No hay mutantes conocidos en camarón!

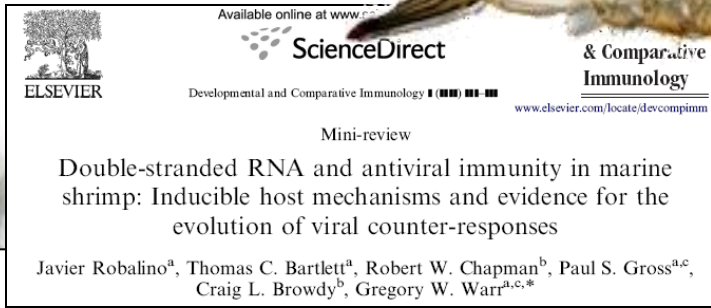
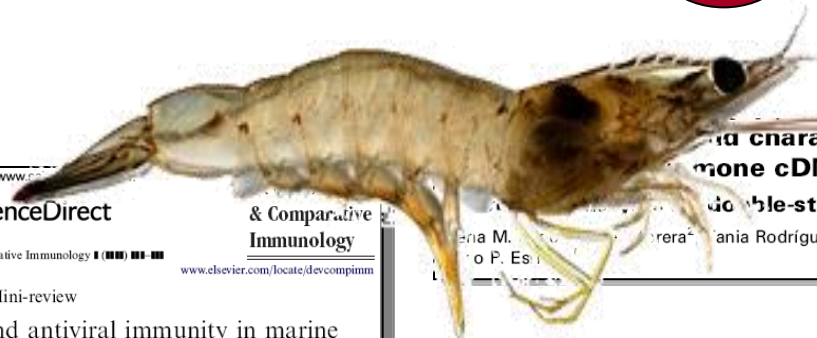
Silenciamiento de genes usando RNA de interferencia (RNAi) en camarones peneidos

- ✓ RNA de doble cadena (dsRNA) induce mecanismo del RNAi provocando:
- ✓ En camarón el dsRNA es específico y efectivo

Degradación del mRNA



Síntesis de proteína (FUNCIÓN)



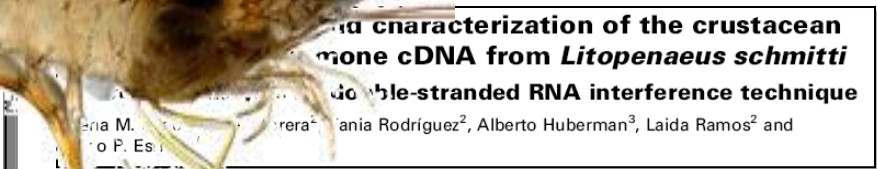
Javier Robalino^a, Thomas C. Bartlett^a, Robert W. Chapman^b, Paul S. Gross^{a,c},
Craig L. Browdy^b, Gregory W. Warr^{a,c,*}

Fish & Shellfish Immunology xx (2006) 1–5

Short communication

Protection of shrimp (*Penaeus chinensis*) against
white spot syndrome virus (WSSV) challenge
by double-stranded RNA

Chun Soo Kim^a, Zenke Kosuke^a, Yoon Kwon Nam^b,
Sung Koo Kim^c, Ki Hong Kim^{a,*}



online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Research 114 (2005) 133–139



www.elsevier.com

Knocking down caspase-3 by RNAi reduces
mortality in Pacific white shrimp
Penaeus (Litopenaeus) vannamei challenged
with a low dose of white-spot syndrome virus

Anchukorn Rijiravanich^{a,b}, Craig L. Browdy^c,
Boonsirm Withyachumnarnkul^{a,b,*}

Bioensayo Hipoxia/silenciamiento HIF-1

- ✓ Camarones 15 ± 1.5 g
- ✓ 28 °C, 34 ppm, aeración constante, luz controlada y alimentados diariamente (Purina 35%)

Tratamientos

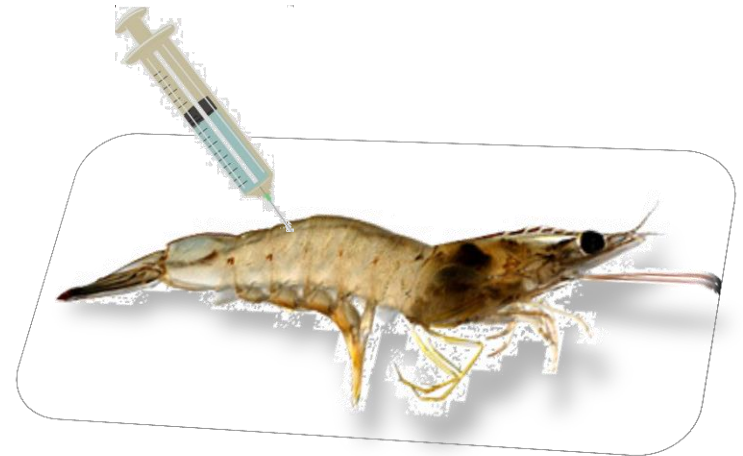
Solución Salina
(SS, controles)

dsRNA HIF-1 α

dsRNA HIF-1 β



10 μ g dsRNA en 100 μ L de SS



24 horas en normoxia
(5.5 ± 1.2 mg/L OD),
seguido de hipoxia
por 1 y 24 h

Tanques 50 L / 15 camarones x tanque; Tris base 20 mM y
NaCl 400 mM, pH 7.4)

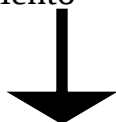
Bioensayo Hipoxia/silenciamiento HIF-1

Condición/Tiempo

1.5 mg/L O₂ x 1 h

1.5 mg/L O₂ x 24 h

5 camarones X
tratamiento



Branquias

Músculo

Hemolinfa

1 Extracción de RNA total

Cuantificación de mRNA:
HIF-1 (α y β), HK y LDH

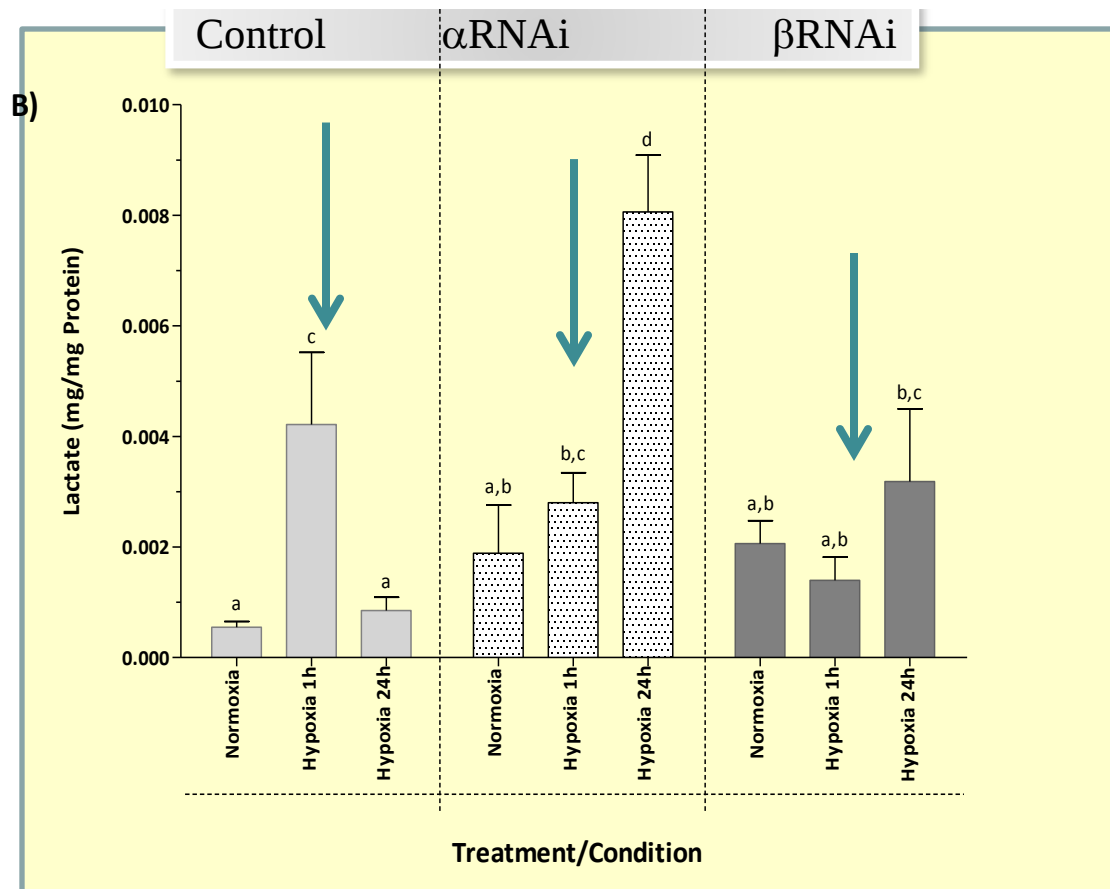
Extractos crudos

2 Cuantificación de metabolitos

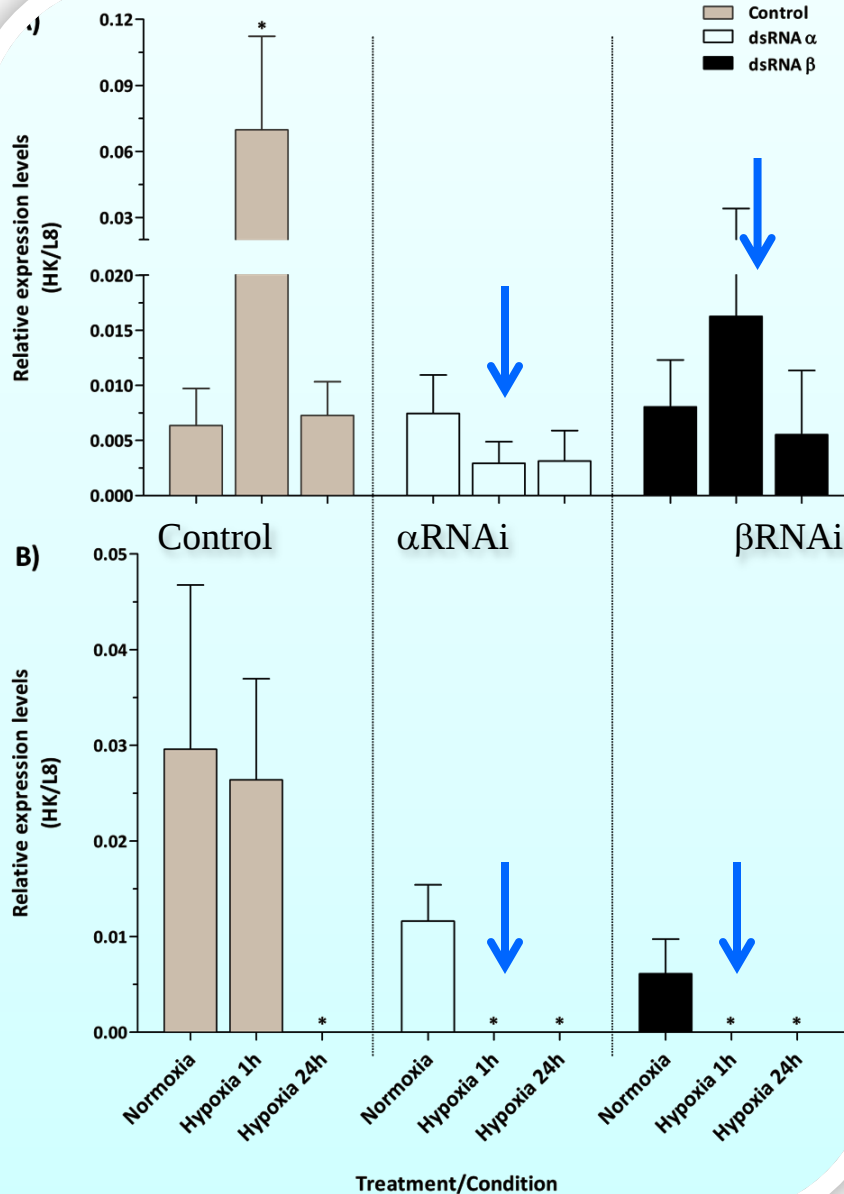
▪ Actividad enzimática de HK y
LDH



Lactato en branquias durante la hipoxia y silenciamiento de HIF-1



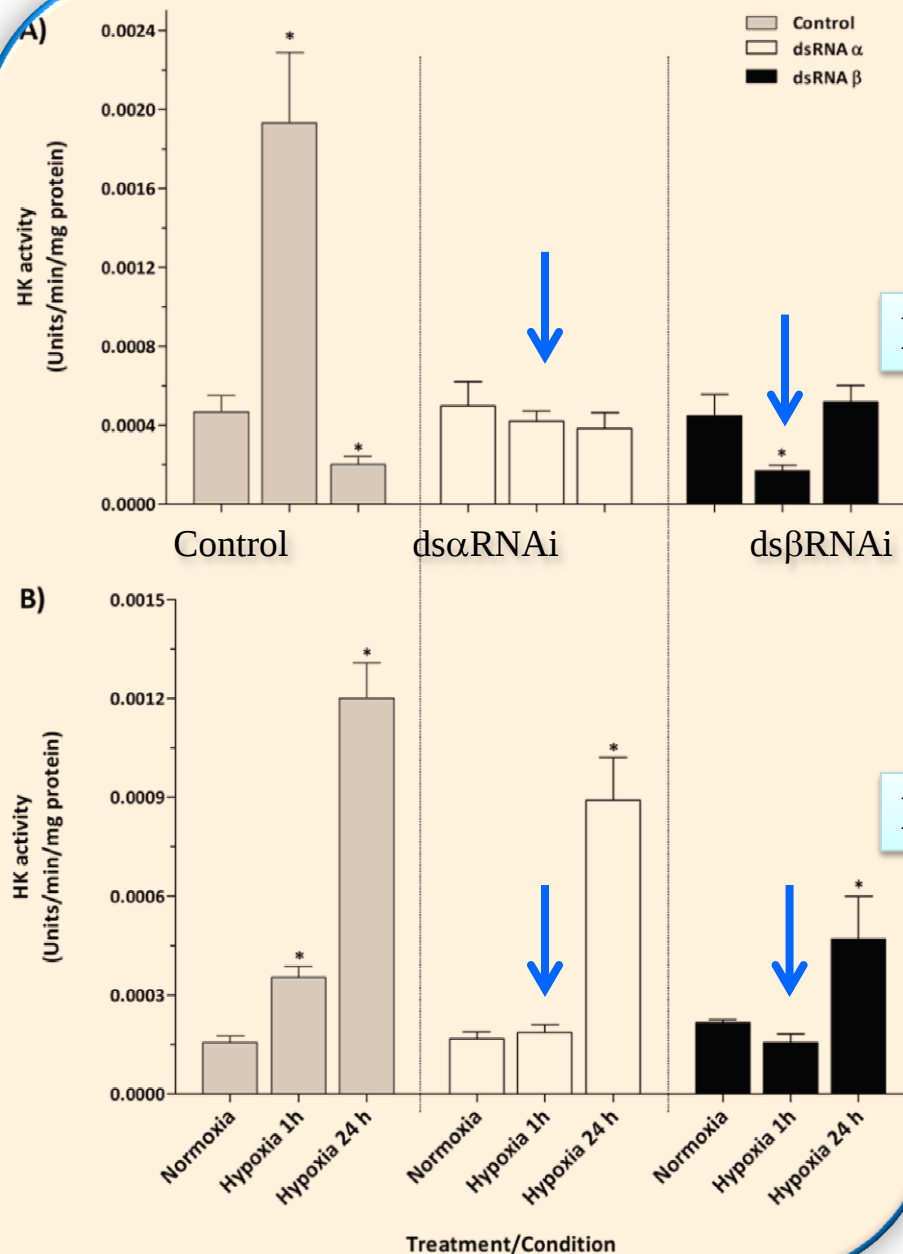
Expresión de HK en hipoxia en camarones con HIF-1 silenciado



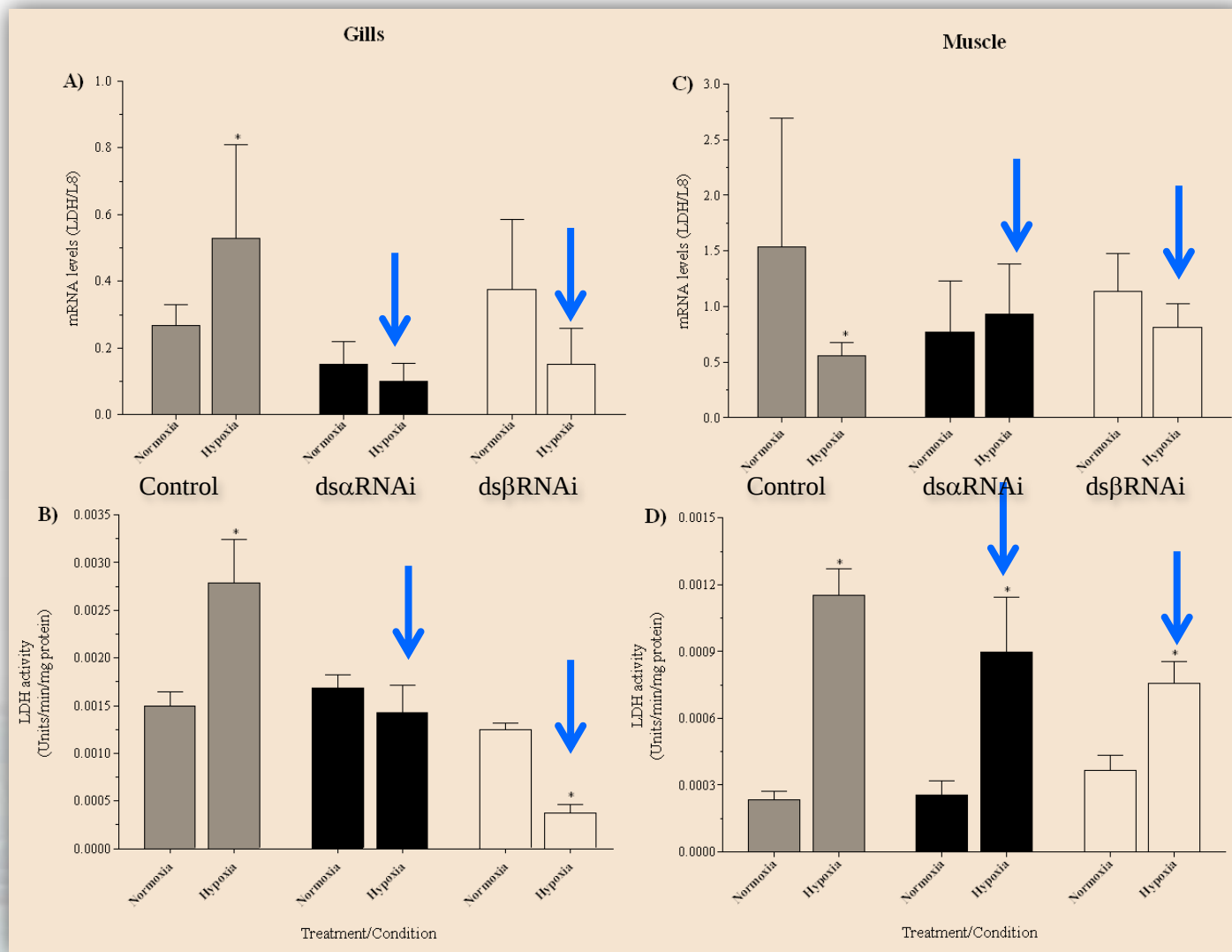
Soñanez-Organis et al., 2009

Actividad de HK en hipoxia en camarones con HIF-1 silenciado

Soñanez-Organis et al., 2011



Expresión y actividad de LDH en hipoxia y con silenciamiento de HIF-1

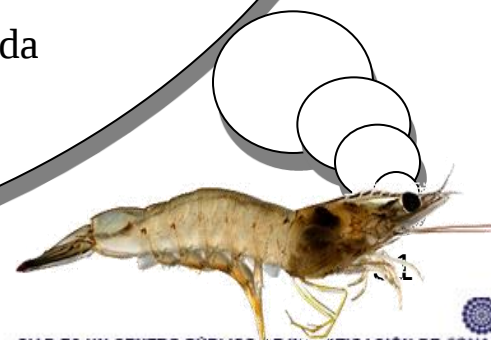


Branquias

	Hipoxia	HIF-1 silenciado+hipoxia
Lactato	↑	⊘ ↓
Actividad HK y LDH	↑	⊘ ↓
Expresión HK y LDH	↑	⊘

Músculo

Lactato	↑	↑ ⊘
Actividad HK	↑	⊘
Actividad LDH	↑	↑
Expresión HK	↓	No detectada
Expresión LDH	↓	⊘



- ✓ Las enzimas hexocinasa y lactato deshidrogenasa son rápidamente inducidas durante la hipoxia
- ✓ La inducción de HK y LDH es mediada por HIF-1

Colaboradores

- ❖ Alma Beatriz Peregrino
- ❖ Lilia Leyva
- ❖ Teresa Gollas
- ❖ Rogerio Sotelo
- ❖ Silvia Gómez
- ❖ Alonso López

Ex-estudiantes

- ❖ José Soñanez
- ❖ Bertha Leal
- ❖ Antonio García Triana
- ❖ Carlos Humberto Trasviña
- ❖ Manuel de Jesús Ochoa

- ❖ Estudiantes actuales
- ❖ José Alfredo Martínez
- ❖ Monserrath Felix
- ❖ Keni Cota
- ❖ Dahlia Nuñez
- ❖ Ambar Fregoso



Apoyos de CONACYT y UC-MEXUS