

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS INSTITUTO DE  
INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS  
*CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR*

***Estudio del efecto del Zn(II) en la agregación del  
polipéptido amiloide de los islotes (h-IAPP)***

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

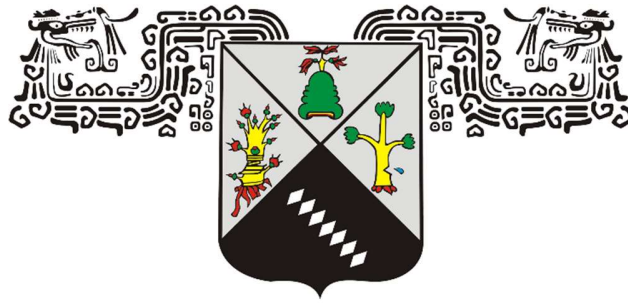
***DIANA AMARET CRUZALTA GONZÁLEZ***

DIRECTOR DE TESIS

**Dra. Lina Andrea Rivillas Acevedo**

CUERNAVACA, MORELOS

JUNIO, 2022



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS INSTITUTO DE  
INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS  
*CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR*

***Estudio del efecto del Zn(II) en la agregación del  
polipéptido amiloide de los islotes (h-IAPP)***

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

***DIANA AMARET CRUZALTA GONZÁLEZ***

DIRECTOR DE TESIS

**Dra. Lina Andrea Rivillas Acevedo**

CUERNAVACA, MORELOS

JUNIO, 2022



**PRESENTA:**

*Lic. En C. DIANA AMARET CRUZALTA GONZÁLEZ*

**DIRECTOR DE TESIS:**

*Dra. LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR, UAEM*

**JURADO REVISOR DE TESIS:**

*Dra. CARMEN NINA PASTOR COLÓN  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR, UAEM*

*Dra. SONIA DÁVILA RAMOS  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR, UAEM*

*Dra. MARIPAZ MARQUEZ QUIROZ  
FACULTAD DE FARMACOLOGÍA, Cinvestav*

*Dr. ÁNGEL ENRIQUE PELÁEZ AGUILAR  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA CELULAR, IBT-UNAM*

*Dra. LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR, UAEM.*

## RESUMEN

La Diabetes Mellitus tipo 2 (DMT-2) es una enfermedad crónica caracterizada por altos niveles de glucosa en sangre y por su resistencia a la insulina. Actualmente, 537 millones de personas en todo el mundo padecen esta enfermedad. La DM-2 presenta depósitos extracelulares de fibras amiloides formadas por el polipéptido amiloide de los islotes (IAPP) y otras proteínas. Esto quiere decir que la DMT-2 es una enfermedad conformacional y degenerativa como el Alzheimer y el Parkinson, entre otras. La IAPP es una hormona de 37 residuos secretada por las células  $\beta$  del páncreas en respuesta a niveles elevados de glucosa. Existe una fuerte correlación entre la aparición de DM-2 en la mayoría de los mamíferos y la secuencia de IAPP. Algunos estudios han demostrado que la proteína IAPP de roedor (r-IAPP) no forma fibras y el roedor no desarrolla DM-2. Las secuencias de IAPP humana (h-IAPP) y r-IAPP difieren sólo en seis residuos, H18R, F23L, A25P, I26V, S28P, S29P. La presencia de Pro en esas posiciones hace que la proteína no sea amiloidogénica. Por otra parte, se ha reportado la pérdida en la homeostasis de iones metálicos en pacientes con DMT-2, lo que podría indicar que los iones metálicos desempeñan un papel en el desarrollo de la enfermedad. En este respecto, se ha reportado que h-IAPP une Cu(II) y la interacción retrasa la formación de fibras. Además, existen informes sobre la interacción de h-IAPP con Zn(II). Sin embargo, no hay consenso sobre el sitio de unión, la estequiometría y su efecto en la agregación de la proteína. En este trabajo se estudió el efecto del Zn(II) en la agregación de diferentes fragmentos de h-IAPP, y los posibles sitios de unión.

## ABSTRACT

Type 2 Diabetes Mellitus (DMT-2) is a chronic disease characterized by high levels of blood glucose, and its resistance to insulin. Currently, 537 million of people around the world have this disease. DMT-2 presents deposits of extracellular amyloid fibers made up of islet amyloid polypeptide (IAPP), and other proteins. This means that DMT-2 is a conformational and degenerative disease such as Alzheimer, Parkinson, and others. IAPP is a 37-residue hormone secreted by the pancreatic  $\beta$  cells in response to high glucose levels. There is a strong correlation between the occurrence of DMT-2 in most mammals and the sequence of IAPP. Studies have shown that the rodent IAPP (rIAPP) does not form fibrils, and the rodent does not develop DMT-2. The sequence of human IAPP (h-IAPP) and r-IAPP differs only at six residues, H18R, F23L, A25P, I26V, S28P and S29P. The presence of Pro at those positions makes the protein non amyloidogenic. On the other hand, a loss in the metal ions homeostasis has been reported in DMT-2 patients, indicating that the metal ions may play a role in the development of the disease. It has been reported that h-IAPP binds Cu(II), and that the interaction delays fibril formation. Also, there are reports about the interaction of h-IAPP with Zn(II), however there are some contradictions about the binding site, stoichiometry, and its effect on protein aggregation. In this work the effect of Zn(II) in the aggregation of different fragments of h-IAPP and its possible binding sites were studied.

*Dedicatoria*  
*A mis padres y hermano por siempre darme su amor y apoyo.*  
*En especial a mi abuela Antonia, sé que estaría orgullosa de este logro.*  
*A mis amigos Ángel, Alma y Dulce por siempre estar conmigo.*

## AGRADECIMIENTOS

- ✚ Agradezco a CONACYT por la beca de maestría otorgada al número de CVU 1065290 y por el financiamiento de Ciencia Básica número A1-S-22109 otorgado a la Dra. Rivillas para el desarrollo del proyecto.
- ✚ A el Dr. Carlos Daniel Amero Tello y el Mtro. en C. Reinier Cárdenas por permitir el uso del equipo de ITC, también por sus observaciones sobre diferentes metodologías que se podrían emplear para desarrollo del proyecto.
- ✚ A la Dra. Guadalupe Zavala por las imágenes de TEM.
- ✚ A mi comité tutorial que evaluó el progreso del proyecto.
- ✚ A mis sinodales por tomarse el tiempo de revisar la tesis y dar sus correcciones.

## ÍNDICE

RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ABREVIATURAS.....	ix
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Diabetes Mellitus .....	1
1.2. Polipéptido amiloide de los Islotes (IAPP) o amilina .....	2
1.3. Características de las fibras tipo amiloide.....	3
1.4. Células $\beta$ pancreáticas, citotoxicidad y mecanismos de protección .....	6
1.5. Iones metálicos: función y efecto en enfermedades conformacionales.....	7
1.6. Zinc y su rol en la diabetes mellitus.....	8
1.7. Zinc e IAPP.....	9
2. HIPÓTESIS.....	11
3.OBJETIVOS.....	11
3.1. Objetivo general.....	11
3.2. Objetivos particulares.....	11
4. METODOLOGÍA.....	11
4.1. Síntesis peptídica.....	11
4.2. Caracterización de los fragmentos sintetizados.....	13
4.3. Purificación de los fragmentos.....	13
4.4. Cinéticas de agregación.....	13



4.5. Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	13
4.6. Afinidad y estequiometría por calorimetría de titulación isotérmica.....	14
4.7. Predicción de sitios de unión por herramientas computacionales.....	14
5. RESULTADOS .....	14
5.1. Caracterización y purificación de los fragmentos sintetizados.....	14
5.2. Cinética de formación de fibras amiloides.....	16
5.2.1. Cinética de formación de fibras del fragmento 1-29.....	16
5.2.2. Cinética de formación de fibras del fragmento 1-29H18A.....	19
5.2.3. Cinética de formación de fibras del fragmento 1-29S28P.....	20
5.3. Afinidad y estequiometría del fragmento 1-29.....	21
5.4. Predicción de sitios de interacción del Zn(II).....	23
6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	24
7. PERSPECTIVAS.....	26
8. REFERENCIAS.....	26
9. ANEXO.....	37

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Alineamiento de secuencias de IAPP entre humano y roedor.....	2
Figura 2. Distancias entre las estructuras $\beta$ cruzadas correspondientes al patrón de difracción de rayos X de las fibras amiloides.....	4
Figura 3. Estructura de la fibra amiloide de IAPP.....	5
Figura 4. Representación esquemática de la cinética de formación de fibras amiloides.....	6
Figura 5. Esquema del proceso de síntesis.....	12
Figura 6. Espectro de masas.....	15
Figura 7. Cromatogramas de purificación.....	16
Figura 8. Cinética de agregación del fragmento 1-29.....	17
Figura 9. Microscopia electrónica de transmisión del fragmento 1-29.....	18
Figura 10. Cinética de agregación del fragmento 1-29 sin fluorescencia de ThT.....	19
Figura 11. Cinética de agregación del fragmento 1-29H18A.....	20
Figura 12. Cinética de agregación del fragmento 1-29S28P.....	21
Figura 13. ITC del fragmento 1-29.....	22
Figura 14. Predicción de los sitios de unión de IAPP a Zn(II).....	24
Figuras del Anexo.	
FS1. Cinética de agregación del fragmento 1-29.....	37
FS2. Cinética de agregación del fragmento 1-29H18A.....	37
FS2. Cinética de agregación del fragmento 1-29S28P.....	38

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efecto de los iones metálicos en la agregación de diferentes proteínas amiloides.....	8
Tabla 2. Fragmentos de h-IAPP sintetizados .....	12
Tabla 3. Peso molecular teórico de los fragmentos sintetizados.....	13
Tabla 4. Tiempos lag de las cinéticas de formación de fibras del fragmento 1-29.....	17
Tabla 5. Tiempos lag de las cinéticas de formación de fibras del fragmento 1-29H18A.....	20
Tabla 6. Tiempos lag de las cinéticas de formación de fibras del fragmento 1-29S28P.....	21
Tabla 7. Parámetros termodinámicos de la interacción de Zn(II) con IAPP1-29 de los diferentes ajustes matemáticos.....	22

## ABREVIATURAS.

°C: grados centígrados

A: alanina

Å: Ångströms

AGE: productos de glicosilación avanzada

A $\beta$ : péptido beta amiloide

Cr(II): cromo II

C-terminal: carboxilo terminal

Cu(II): cobre II

Cys: cisteínas

DIC: N,N Diisopropilcarbodiimida

DM: diabetes mellitus

DMSO: dimetilsilfoxido

DMT-1: diabetes mellitus tipo 1

DMT-2: diabetes mellitus tipo 2

E: glutamato

ESI: ionización por electro spray

Fe(II): hierro II

Fe(III): hierro III

Fmoc: 9-fluorenilmetoxicarbonilo

h-IAPP: polipéptido amiloide de los islotes humanos

His: histidina

HSPG: proteoglicanos de heparán sulfato

IAPP: polipéptido amiloide de los islotes.

ITC: calorimetría de titulación isotérmica

K: lisina

Lag: retraso

Lys: lisina

Mg(II): magnesio II

mg: miligramos

min: minuto

mL: mililitro

mM: milimolar

Mn(II): manganeso II

N-terminal: amino terminal

PDB: protein data bank

Phe: fenilalanina

ppm: partes por millón

R: arginina

r-IAPP: polipéptido amiloide de los islotes de roedor

RINK-amide MBHA: 4-(2',4'-Dimeltoxilfenil-Fmoc-aminometil)-fenoxiacetamido-norleucil-MBHA resina

RMN: resonancia magnética nuclear

ROS: especies reactivas de oxígeno

S:serina

t-Boc: terc-Butiloxicarbonilo

t-But: terc-butilo

TEM: microscopía electrónica de transmisión

TFA: ácido trifluoroacético

ThT: Thioflavina T

V: valina

Z: ión molecular

Zn(II): zinc II

ZnSO<sub>4</sub>: sulfato de zinc

μL: Microlitro

μm: micrómetro

μM: micromolar

μM: micromolar

α: alfa

β: beta

δ: delta

ε: épsilon

γ: gamma

π:

## 1. INTRODUCCIÓN.

### 1.1. DIABETES MELLITUS

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica que se caracteriza por hiperglucemia en sangre. Se conocen varios tipos de diabetes, de las cuales dos son los más comunes; la diabetes mellitus tipo 1 (DMT-1), en la cual el páncreas no secreta suficiente insulina y la diabetes mellitus tipo 2 (DMT-2), donde el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce (1,2). La progresión de la DM deriva en complicaciones en diversos órganos, generando enfermedades como neuropatía diabética, retinopatía, angiopatía y nefropatía. Tales padecimientos son provocados principalmente como consecuencia de la acumulación de productos de glicosilación avanzada (AGE's por sus siglas en inglés) (3).

En las últimas tres décadas, la prevalencia de la DMT-2 ha aumentado drásticamente en países de todos los niveles socioeconómicos, siendo los países de bajos recursos los más afectados (1), se estima que al menos tres de cada cuatro adultos viven con diabetes en países menos desarrollados (4).

Actualmente, existen 537 millones de adultos con diabetes a nivel mundial, las proyecciones estadísticas de diabéticos calculan que en el 2030 habrán 643 millones de diabéticos y para 2045 serán 783 millones de enfermos diabéticos(4). En América del Norte y el Caribe hubo 51 millones de personas enfermas y 931,000 muertes mientras que, en América Central y del Sur hubo 32 millones de enfermos y 410,000 muertes en 2021 (4). La región de América del Norte y el Caribe tiene la segunda prevalencia más alta de diabéticos según la Federación Internacional de Diabetes, además, ocupan el segundo lugar con niños y adolescentes diabéticos y la mortalidad más alta (4). En el 2017, la diabetes fue considerada una de las 10 principales causas de muerte a nivel mundial; tan sólo en el 2021 se estima que siete millones de personas murieron a causa de la enfermedad. Este incremento dramático en el número de diabéticos genera un aumento en los costos del sector salud; en los últimos 25 años se han gastado aproximadamente 966 mil millones de dólares en el diagnóstico y tratamiento de los pacientes (1,4).

El desarrollo de la DMT-2 está precedido por la resistencia a insulina que lleva a condiciones como hiperinsulinemia e hiperglucemia (5). La hiperglucemia induce la síntesis y el aumento en la secreción de insulina, generando hiperinsulinemia; a su vez, la hiperinsulinemia lleva a la falla progresiva de las células  $\beta$  pancreáticas, provocando el aumento de la concentración de glucosa en sangre (hiperglucemia); resultando en la pérdida de volumen y agotamiento de las células  $\beta$  pancreáticas y un efecto citotóxico por niveles altos de glucosa y lípidos en sangre. El acumulación de todos estos mecanismos conduce a la disminución progresiva del funcionamiento de las células  $\beta$  pancreáticas (6,7). Por otro lado, el desarrollo de DMT-2 se favorece por predisposición genética y factores ambientales como inactividad física, mala alimentación, entre otros (1,5).

En el 90% de pacientes se ha encontrado una condición histopatológica debido a la presencia de depósitos fibrilares en las células  $\beta$ -pancreáticas, compuestos principalmente por una proteína conocida como polipéptido amiloide de los islotes (IAPP por sus siglas en inglés) o

amilina (8,9), estos depósitos fibrilares se relacionan con la pérdida de volumen de las células pancreáticas que va desde el 1% hasta el 80% (9–11).

## 1.2. POLIPÉPTIDO AMILOIDE DE LOS ISLOTES (IAPP) O AMILINA

IAPP es una hormona peptídica que se almacena en las células  $\beta$  pancreáticas. Se sintetiza como un pre-peptido de 89 residuos que se procesa por diferentes modificaciones postraduccionales, generando así, un polipéptido de 37 residuos (12,13).

IAPP se almacena a una concentración de aproximadamente 0.8 a 4.0mM en los gránulos secretores de las células  $\beta$  pancreáticas y es secretada bajo los mismos estímulos metabólicos que la insulina. Estas hormonas se liberan al torrente sanguíneo en proporciones 10-100:1 (insulina:IAPP) (14,15). Una vez que IAPP se libera al torrente sanguíneo cruza la barrera hematoencefálica generando los estímulos necesarios para la sensación de saciedad; así mismo se ha registrado que tiene un efecto en el vaciamiento gástrico y el control de peso corporal (16,17). Además, IAPP inhibe la liberación de glucagón y como consecuencia se ve alterada la homeostasis de glucosa en sangre (18).

Se ha encontrado una relación directa entre el potencial amiloidogénico y la estructura primaria de IAPP. Se ha registrado que en mamíferos como primates y gatos la IAPP es altamente amiloidogénica, sin embargo, el efecto es inverso en roedores (19). Se ha comprobado que las diferencias en la secuencia de IAPP dentro de la región 20-29 en roedores (r-IAPP) y humanos (h-IAPP) se correlacionan con la falta de amiloidogenicidad, la h-IAPP y r-IAPP difieren en cinco aminoácidos en esta región, siendo las sustituciones A25P, S28P y S29P las más relevantes para la pérdida de amiloidogenicidad de la proteína (Figura 1) (19). Paralelamente, se ha reportado que la sustitución S28P es la más importante en la disminución de amiloidogenicidad de IAPP (20). Por otro lado, existen reportes evaluando IAPP de roedor y observaron que dependiendo de las condiciones de los experimentos r-IAPP es capaz de formar fibras amiloides (21), por lo que todavía se desconoce a que se debe la pérdida de amiloidogenicidad en roedores.



Figura 1. Alineamiento de secuencias de IAPP de humano y roedor, en color cian se ilustran los aminoácidos altamente conservados en ambos organismos y en color morado se marcan las diferencias entre las secuencias de estos. Se utilizaron los códigos *Homo Sapiens* (CAA39504) y *Mus musculus* (NP\_034621) de GenBank (22) para generar el alineamiento en WebLogo (23).

IAPP de 37 residuos contiene un puente disulfuro entre las Cys2 y Cys7 y el C-terminal se encuentra amidado, además IAPP se encuentra cargado positivamente a pH neutro. La estructura de IAPP en solución es difícil de determinar por su alta propensión a agregarse *in vitro*, aún a bajas concentraciones. Sin embargo, por dicroísmo circular han reportado que IAPP es una proteína intrínsecamente desordenada y posee un 71% de estructura random coil (24), por espectroscopia de absorción y estudios de RMN muestran un aumento en el contenido helicoidal antes de la conversión a lámina  $\beta$  (25). De igual forma, por RMN se determinó que al interactuar con micelas adquiere una conformación helicoidal (26), y por cristalografía de rayos X donde IAPP está fusionado con la proteína de unión a maltosa (MBP) adquiere dos  $\alpha$  hélices en los residuos 8-18 y 22-17 (27).

Se considera que los intermediarios helicoidales facilitan la conversión de IAPP a la conformación lámina  $\beta$  y la subsecuente asociación intermolecular para formar fibras amiloides. Este tipo de intermediarios helicoidales se han observado en diferentes proteínas amiloides como la proteína  $\beta$  amiloide (28) e insulina (29). Se sugiere que es un mecanismo por el cual se auto asocian un gran número de proteínas aumentando la concentración de secuencias amiloidogénicas que a su vez, promoverá la formación de láminas  $\beta$  intermoleculares (30).

### **1.3. CARACTERÍSTICAS DE LAS FIBRAS AMILOIDES.**

Las fibras amiloides son ensamblajes macromoleculares altamente ordenados que se depositan en diferentes tejidos del cuerpo, causando la disfunción de los órganos y tejidos donde se almacenan. Se conocen alrededor de 50 enfermedades conformacionales en las cuales, las fibras amiloides comparten características estructurales, tanto *in vitro* como *in vivo* a pesar de la amplia diversidad de secuencias de proteínas y polipéptidos que las forman (31–33). Las fibras amiloides tienen una conformación  $\beta$  cruzada paralela o antiparalela que se estabiliza por puentes de hidrógeno (33–35).

Utilizando microscopia electrónica de transmisión se ha observado que las fibras amiloides son estructuras alargadas, no ramificadas de aproximadamente 100Å de diámetro y generalmente con longitud de micrómetros. El uso de diferentes técnicas como difracción de rayos X (36), resonancia magnética nuclear en estado sólido (37) y microscopía crio-electrónica (38), se ha determinado el acomodo supramolecular de las fibras amiloides en alta resolución. Este tipo de formación fibrilar presenta un acomodo altamente ordenado y compuesto por miles de copias del péptido o proteína. Generalmente, las fibras amiloides están formadas por al menos 2 protofilamentos que se enlazan entre sí y/o se asocian lateralmente como cintas planas. El patrón de difracción de rayos X para las fibras amiloides encontradas en diferentes enfermedades conformacionales son similares y corresponden a estructuras  $\beta$  cruzadas, en las cuales el espacio entre las láminas  $\beta$  de los monómeros es de 4.8Å (difracción perpendicular), y la distancia entre las láminas  $\beta$  de los polímeros es de 10Å (reflexión ecuatorial) (Figura 2) (39,40).

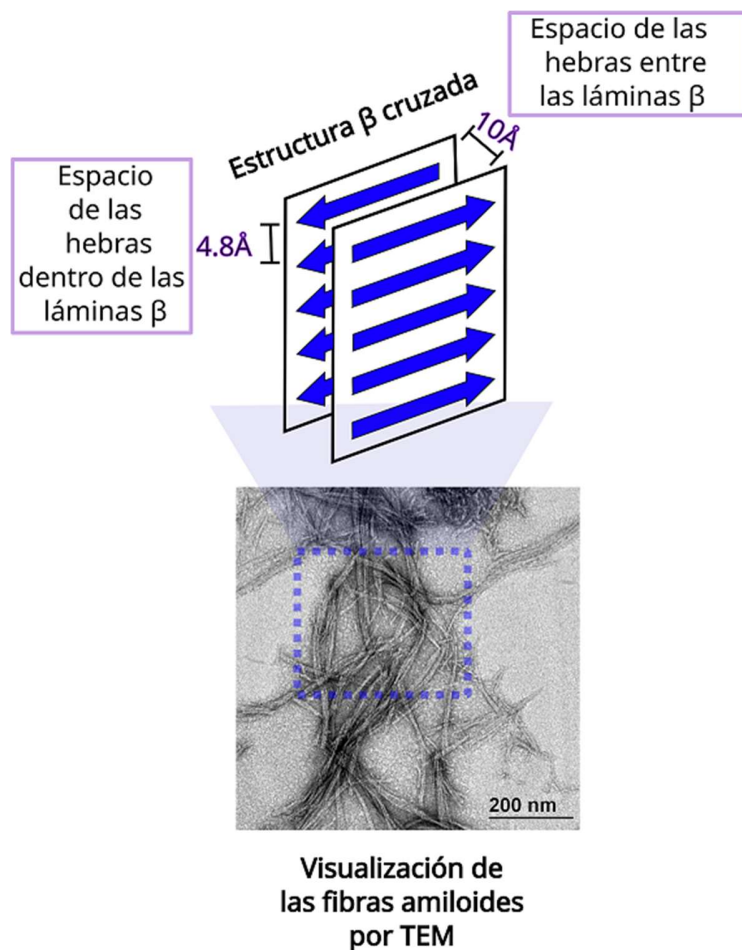


Figura 2. Esquema de las distancias entre las estructuras  $\beta$  cruzadas de las fibras amiloides, estimadas por difracción de rayos X.

Estas estructuras  $\beta$  cruzada características de las fibras amiloides genera una disposición de las cadenas laterales que forman canales conocidos como “escaleras de hebras cruzadas”; predispuestos de manera paralela al eje largo de la fibra. Algunos compuestos heterocíclicos aromáticos como la Thioflavina T (41) y el rojo Congo (42) se intercalan en estos canales y pueden ser detectados por fluorescencia. Sin embargo, todavía no se llega a un consenso del modo de interacción de estos colorantes y las fibras amiloides, pero el uso de estos colorantes es universalmente aceptado como una forma de determinar la presencia de fibras amiloides (43,44).

Por diferentes técnicas se ha determinado el acomodo supramolecular de IAPP en la fibra amiloide. Se observó que los monómeros de IAPP forman dos láminas  $\beta$  entre los residuos 7-18 y 25-36 (36), también hay evidencia de la formación de dos láminas  $\beta$  entre los residuos 8-17 y 26-36 (37). Además, se obtuvo un modelo “serpentino” del protofilamento donde cada monómero forma tres láminas  $\beta$  en los residuos 8-20, 20-29 y 30-37 (Figura 3) (45). Sin embargo, la alta propensión de agregación de IAPP permite que diferentes segmentos de esta puedan formar fibras amiloides; los segmentos ANFLVH y LVHSSN que tienen la His18 son capaces de formar fibras amiloides estabilizadas por la interacción de este residuo entre los monómeros (46). Los segmentos FGAILSS, NFGAILS y AILSST, se encuentran en el núcleo



amiloidogénico de la proteína y forman fibras amiloides por separado, sin necesidad de tener la secuencia de 9 residuos (46), también se han evaluado hexapeptidos de IAPP del segmento 14-37 correspondiente a la región C-terminal que pueden formar fibras amiloides (47). Sin embargo, se ha observado que las fibras amiloides de IAPP de longitud completa y de los fragmentos son polimórficas (48), el polimorfismo se ha observado en otras proteínas amiloides como prion (49),  $\beta$  microglobulina (50) y  $\beta$  amiloide (51).

Generalmente monómeros de la proteína se apilan de manera ordenada uno encima de otro, de tal forma que su interacción se estabiliza por puentes de hidrogeno (34)., sin embargo, se ha observado que el polimorfismo dentro de las fibras está relacionado con la estabilización de las interacciones de puentes de hidrogeno, ya que no en todas las fibras los aminoácidos interaccionan de la misma manera (50). Se ha observado que las fibras de IAPP está formada por dos apilamientos de monómeros relacionados simétricamente, y orientados de tal forma que los polímeros adyacentes se posicionen paralelamente entre sí (26,45)

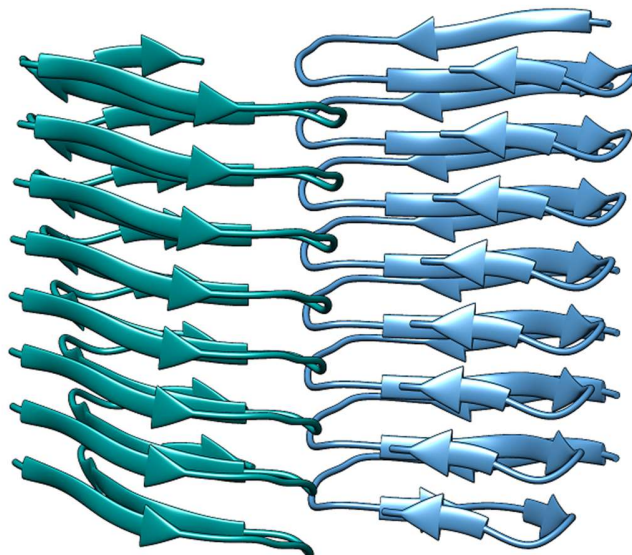


Figura 3. Modelo estructural de la fibra amiloide de IAPP. PDB: 6Y1A (26). Editada en chimera (52).

Una característica compartida entre la mayoría de las proteínas y péptidos amiloides es la cinética de formación de fibras con tendencia sigmoide, donde se pueden observar tres fases (Figura 4). la fase de nucleación, donde ocurren cambios conformacionales y predomina la formación de los oligómeros; la fase de elongación en la cual se forman protofilamentos que conducen a la formación y crecimiento de las fibras y la fase de saturación donde las fibras amiloides maduras están en equilibrio con el péptido soluble residual (53).

Es importante señalar que en ninguna de las tres fases se les puede atribuir un solo evento o proceso, más bien todos los procesos microscópicos están sucediendo durante todo el proceso, aunque el flujo varía según las constantes de velocidad y las características de cada especie en cada momento (53). Además, como el crecimiento de las fibras ocurre en sus

extremos, cualquier proceso que pueda modificar el número de estos, tendrá un impacto significativo en la cinética de formación de fibras, por ejemplo, la fragmentación de las fibras debido a la agitación y la nucleación secundaria que es catalizada por monómeros en la superficie de la fibra a los que se adicionan monómeros solubles, afectan el tiempo de nucleación y la elongación de las fibras (53–55).

Por otro lado, se debe tener en cuenta que se requiere un equilibrio entre la repulsión electrostática y las interacciones hidrofóbicas para desencadenar la formación amiloide. Este equilibrio puede verse alterado por factores como la presencia de iones, pH, temperatura, codisolventes y presión. Se ha observado que, los iones de sal pueden mejorar las interacciones intermoleculares al debilitar las interacciones electrostáticas repulsivas mediante un efecto de Debye-Hückel o mediante la unión iónica directa, esto reduce la entalpía del cambio conformacional que acompaña a la nucleación. Sin embargo, esto puede afectar la morfología de las fibras, ya que se ha observado que en cinéticas muy rápidas las fibras tienden a ser más rizadas y en cinéticas lentas las fibras parecen ser más delgadas y cortas (56,57).

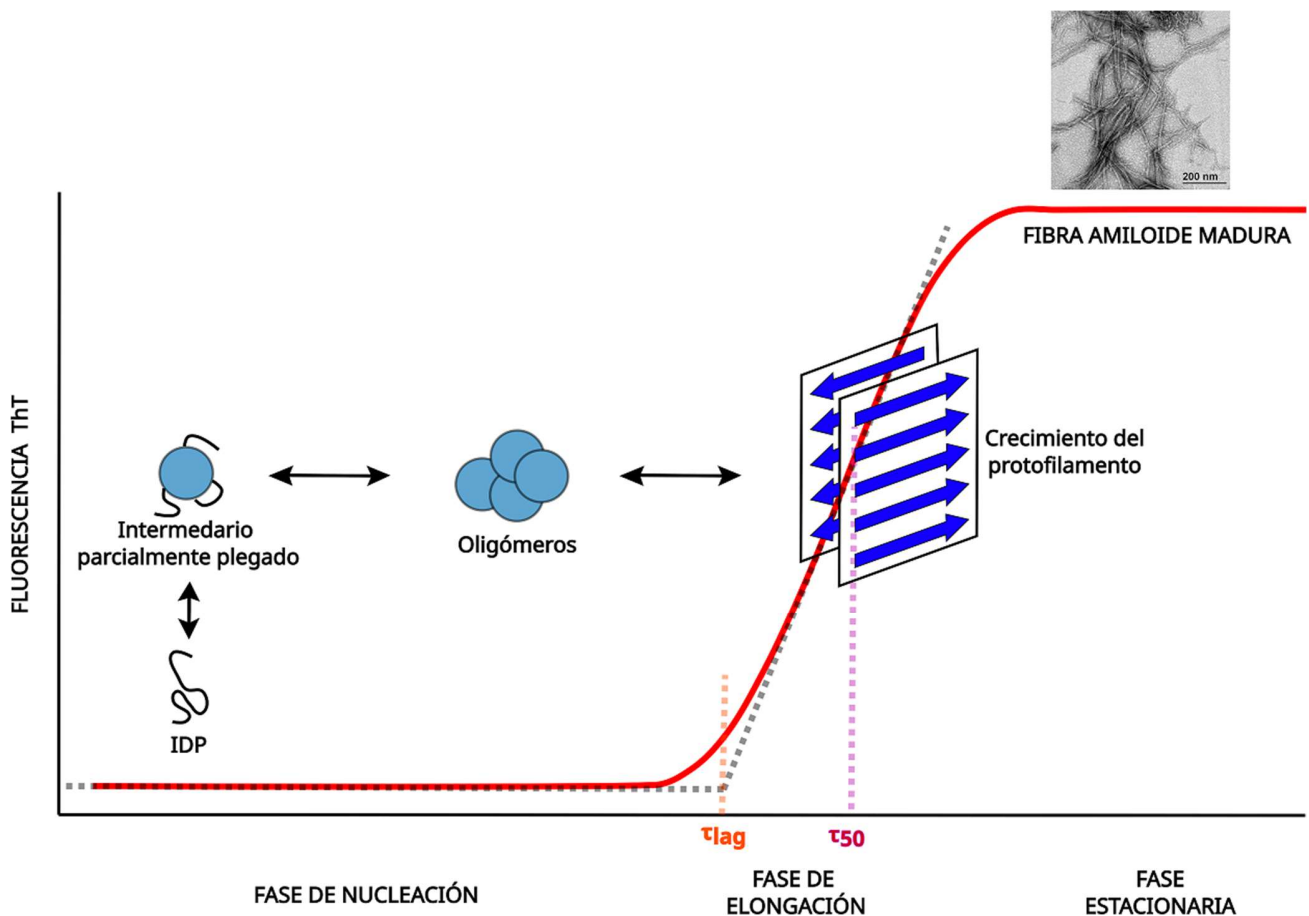


Figura 4. Representación esquemática de la cinética de formación de fibras amiloides de IAPP, donde se marcan las fases de nucleación, elongación y estacionaria, además de los eventos que suceden en cada una.

#### 1.4. CÉLULAS $\beta$ PANCREÁTICAS, CITOTOXICIDAD Y MECANISMOS DE PROTECCIÓN

IAPP se almacena dentro de los gránulos secretores de las células  $\beta$  pancreáticas junto a insulina y Zn(II); se estima que la concentración de insulina, IAPP y Zn(II) en estas células es de 100mM, 10mM y 20mM respectivamente, además, se almacenan en un ambiente ácido, ya que el pH de los gránulos secretores se encuentra entre 3 y 5 (12,15). Una de las grandes interrogantes sin respuesta, es ¿Por qué IAPP no se agrega en condiciones fisiológicas en individuos sanos a pesar de estar almacenado en altas concentraciones, cuando *in vitro* se agrega a concentraciones micromolares?

El desarrollo de la DMT-2 se ve beneficiado por diferentes eventos acumulativos en las células  $\beta$  pancreáticas como la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) (58), la disfunción mitocondrial (59), la lipotoxicidad (60), el aumento de citocinas nocivas para las células  $\beta$  pancreáticas que inducen apoptosis (61), la acumulación de IAPP en la superficie de las células pancreáticas, entre otros (11,62). Mucho se ha especulado si las fibras amiloides están de forma intracelular o extracelular; en modelos transgénicos de roedores diabéticos se ha observado que se pueden acumular fibras en el citoplasma, sin embargo, esto no se ha observado en humanos con DMT-2, aunque existe la posibilidad de que las fibras estén acumuladas en otros compartimentos celulares (63), ya que se han encontrado vestigios no degradados de IAPP soluble debido a alteraciones en los mecanismos de degradación de los gránulos secretores aberrantes; todo esto resulta en la acumulación de IAPP (63,64).

Cuando IAPP se secreta al torrente sanguíneo por medio de exocitosis pasa de un pH ácido (5.5), a pH neutro (7.4); la liberación del contenido total del gránulo secretor tarda entre 1 y 2 segundos, pero en ocasiones puede tardar algunos minutos (65); esto permite que IAPP tenga un tiempo de exposición prolongado con la membrana plasmática. Algunos estudios han demostrado que las células  $\beta$  pancreáticas son las más afectadas por la citotoxicidad de IAPP en comparación con los otros tipos celulares que componen el páncreas (células  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  y  $\delta$ ) esto sugiere que las células  $\beta$  son más susceptibles al efecto del IAPP (11,62). La exocitosis es un proceso de fusión membranal, y se ha observado en diferentes modelos animales y humanos con DMT-2 que las fibras amiloides se encuentran en invaginaciones de la membrana (62). Se propone que la modificación de las propiedades de la membrana plasmática en el proceso de exocitosis, al igual que el tiempo de exposición hace más susceptible la interacción de IAPP con estas favoreciendo su interacción e inserción en la membrana. Además, componentes de la matriz extracelular como proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG) interactúan con IAPP, favoreciendo la interacción con la membrana y la formación fibrilar (66).

Se ha estudiado que pre-IAPP de 89 residuos, es más amiloidogénico que el péptido de 37 residuos. En roedores transgénicos que carecen de proteasas como PC1/3 y PC2, encargadas de la proteólisis de pre-IAPP para generar IAPP, muestran un aumento en la deposición fibrilar, y muerte de las células pancreáticas, por lo que una desregulación de las modificaciones postraduccionales de IAPP y sus intermediarios puede conllevar al desarrollo de DMT-2 (67,68).

Dentro de los mecanismos de protección de las células  $\beta$  pancreáticas se encuentra el pH ácido de los gránulos secretores. Este se considera un mecanismo antiagregación en el almacenamiento *in vivo* de IAPP a concentraciones milimolares (69). Se ha analizado este efecto realizando titulaciones de pH en diferentes péptidos modelo; los resultados mostraron

que IAPP a pH básicos es más propensa a formar fibras amiloides, debido a que la His18 está desprotonada pero a pH ácidos la His18 está protonada y esto desfavorece la formación fibrilar debido a la repulsión electrostática (70,71). Además, se ha estudiado el papel que tiene la insulina en la agregación de IAPP, ya que se almacenan juntas en altas concentraciones, y se ha observado que tiene un rol protector dependiente del estado oligomérico de la insulina; IAPP interacciona con dímeros y monómeros de insulina, estos complejos IAPP-insulina compiten con la formación de homodímeros de IAPP que favorecen la agregación de este, es así, como el complejo evita la agregación de IAPP (72).

### **1.5. IONES METÁLICOS: FUNCIÓN Y EFECTO EN ENFERMEDADES CONFORMACIONALES**

Los iones metálicos son micronutrientes presentes en diferentes tejidos de los seres vivos. Se conocen como micronutrientes ya que se necesitan menos de 100 ppm (partes por millón) en el organismo. Algunos de los más conocidos e importantes son Cu(II), Zn(II), Fe(II), Fe(III), Cr(II), Mg(II), Ca(II) y Mn(II). Los iones metálicos tienen diversos roles en las funciones fisiológicas, por ejemplo, son grupos prostéticos de diferentes proteínas, también son cofactores de diversas enzimas para llevar a cabo sus funciones catalíticas y son segundos mensajeros en diversas cascadas de señalización (73–75).

Se ha observado que la desregulación de la homeostasis de diferentes iones metálicos en las enfermedades conformacionales (76) como alzheimer, que es la neurodegeneración gradual que puede ser causada por deposiciones amiloides en la corteza cerebral. Estos depósitos amiloides están constituidos principalmente por el péptido  $\beta$  amiloide ( $A\beta$ ), y se ha observado que las placas amiloides en pacientes con alzheimer muestran niveles elevados de Fe(III), Cu(II) y Zn(II) (77,78). En el Parkinson, enfermedad que afecta principalmente las neuronas dopaminérgicas, se han encontrado cuerpos de Lewy formados por  $\alpha$ -sinucleína e iones metálicos como Zn(II), Mg(II), Fe(III), Cu(II), entre otros (79). Las enfermedades priónicas, que son enfermedades neurodegenerativas transmitibles, se caracterizan por la deposición de fibras amiloides de la proteína prion con iones metálicos como Cu(II) y Zn(II) (80,81). La DMT-2 presenta fibras amiloides de IAPP y existen reportes del efecto de Zn(II) (75,82) y Cu(II) (83) en la formación de estas fibras. Además, se ha reportado la deficiencia de Zn(II) como síntoma de DMT-2, mientras que los niveles de Cu(II) están aumentados (84,85).

Los diversos efectos de los iones metálicos para las diferentes proteínas implicadas en enfermedades conformacionales depende de factores como la concentración y la afinidad a estas (76). Se han realizado estudios sobre el efecto de algunos iones metálicos en la agregación de las proteínas implicadas en diferentes enfermedades conformacionales (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de los iones metálicos en la agregación de diferentes proteínas amiloides.

Proteína	Ion metálico	Efecto en la agregación
IAPP	Cu(II)	Retrasa (83,86,87)
	Zn(II)	Acelera a altas concentraciones e inhibe a bajas concentraciones (82)
$\alpha$ -sinucleína	Cu(II)	Acelera (76)
	Zn(II)	Acelera (88)
	Mg(II)	Inhibe (89)
	Fe(III)	Acelera (89)
Tau	Cu(II)	Acelera (90)
	Zn(II)	Acelera (91)
A $\beta$	Cu(II)	Acelera (92)
	Zn(II)	Acelera (92)
	Fe(III)	Acelera (77)

## 1.6. Zn(II) Y SU ROL EN LA DIABETES MELLITUS

El Zn(II) es el segundo micronutriente más abundante en el cuerpo humano y participa en diversos procesos celulares ya que, es un componente estructural de un gran número de proteínas, incluyendo aquellas que pertenecen a diversas vías de señalización celular como fosforilación de proteínas, actividad de quinasa, modulación del transporte de glucosa, síntesis de glucógeno, lipogénesis, inhibición de gluconeogénesis, lipólisis, regulación de elementos clave en la señalización de insulina y factores de transcripción. (93). En las neuronas, el zinc es liberado sinápticamente por exocitosis es captado por las células adyacentes a través de canales de zinc activados en las células receptoras, como las neuronas postsinápticas y gliales (94–96).

La concentración de Zn(II) en el páncreas es de aproximadamente 20mM, mientras que en plasma es de 14 a 16 $\mu$ M. En organismos multicelulares, casi todo el Zn(II) se encuentra de forma intracelular y su concentración en diferentes orgánulos celulares está altamente regulada por la familia de proteínas transportadoras de zinc como ZnT, ZIP, y metalotioneínas (MT). Las MT son proteínas solubles que regulan la concentración de Zn(II) citosólico, mientras que, las proteínas transmembranales ZIP y ZnT pueden transportar al Zn(II) extracelularmente y a diferentes orgánulos celulares (97).

Algunas mutaciones en los transportadores llevan al fallo de cascadas de señalización, comprometiendo diversas funciones metabólicas relacionadas a la absorción de glucosa o la secreción de insulina, Por ejemplo, ZnT8 es un transportador específico de las células  $\beta$  pancreáticas y es fundamental para el almacenamiento, síntesis y acción de la insulina (72,98). La mutación R325W en la proteína ZnT8, lleva a la desregulación de la homeostasis del ion metálico intracelular, incrementando la susceptibilidad a desarrollar DMT-2 (98,99). Sin embargo, estudios recientes mostraron una fuerte correlación entre la pérdida de función del transportador ZnT8 y la reducción del desarrollo de DMT-2, sugiriendo que la deficiencia de Zn(II) puede ser benéfica (99). Por otra parte, se ha observado de forma clínica cierta dependencia entre la concentración de Zn(II) en plasma con el desarrollo de DM. Se sabe que

hay una correlación del aumento de zincuria (excreción de urinaria de zinc) con la diuresis osmótica como síntoma de la diabetes mellitus, manifestándose en la disminución de la concentración de Zn (II) en plasma (100).

### 1.7. Relación del Zn(II) con IAPP

El Zn(II) tiene un orbital *d* lleno por lo que no participa en reacciones redox sino que funciona como un ácido de Lewis (aceptando pares de electrones); esto lo hace un cofactor ideal para reacciones que requieren un ion redox estable para funcionar como un catalizador. Es importante recalcar que la baja barrera energética para una multiplicidad de geometrías de coordinación hace que le sea posible coordinar de diferentes modos y esto es importante porque puede catalizar transformaciones químicas dependiendo de la geometría del metal. Sin embargo, la geometría más común de los complejos de Zn(II) es la tetraédrica distorsionada. Algunos de los elementos más afines por Zn(II) en las proteínas son el nitrógeno, principalmente de histidinas y amino terminal, el oxígeno de las cadenas laterales de aspartato o glutamato y el azufre de las cisteínas (93,101–103).

Existen muchos reportes del efecto del Zn(II) en la formación de fibras amiloides de IAPP. Sin embargo, estos reportes no se realizan en condiciones estequiométricas y no se tiene claro el efecto del ion metálico en la agregación. Algunos reportes del efecto del Zn(II) en las cinéticas de formación de fibras de IAPP1-37 indican, que a bajas concentraciones de Zn(II) la cinética de agregación presenta aumento en la fase lag y retraso en la tasa de elongación, mientras que, a altas concentraciones de Zn(II) se observa retraso en la fase lag y en la tasa de elongación (82). Además, por estudios de dinámica molecular y cinéticas de agregación se observó que a bajas concentraciones de h-IAPP se generan especies oligoméricas coordinando un átomo de Zn(II), lo que incrementa la probabilidad de contacto y así favorecer la agregación, pero a altas concentraciones de Zn(II) predominan las especies monoméricas de la proteína unidas a un átomo de Zn(II), desfavoreciendo la formación de fibras (104). Sin embargo, con un exceso (1:50) de Zn(II) se genera un efecto de apantallamiento de cargas que favorece la formación fibrilar (efecto Debye-Hückel) (57,104). También, existen reportes donde el Zn(II) a diferentes concentraciones retrasa ligeramente la formación de fibras amiloides (105). Por otro lado, se ha observado que Zn(II) se une a IAPP con alta afinidad (mM) y esta interacción inhibe la agregación de IAPP (106).

Por RMN se demostró que en ausencia de Zn(II), h-IAPP forma una hélice entre los residuos R11-T30 y que el N- y C- terminales se encuentran desordenados. Por medio del experimento TOCSY de RMN se observó que la interacción de h-IAPP con Zn(II) se produce cambios en el desplazamiento químico de la His18 y sus alrededores, y esta interacción provoca la ruptura de la estructura helicoidal entre los residuos V17-S19 favoreciendo la formación amiloide (82). Además, en otros estudios se observó, que mutaciones que provocan la pérdida de la estructura helicoidal desfavorecen significativamente la agregación de IAPP debido a la pérdida de interacciones específicas en la fibra amiloide (107). Sin embargo, estudios de espectrometría de masas mostraron que el Zn(II) interacciona con IAPP (probablemente con la His18) ocasionando una ruptura de la conformación helicoidal que favorece la conversión a lámina  $\beta$  (108).

Por otra parte, en los estudios de afinidad de la interacción de Zn(II) con h-IAPP, se han obtenido diferentes resultados. El fragmento h-IAPP1-19 interacciona en una proporción 6:1

(IAPP:Zn(II)) y este complejo tiene afinidades en el rango  $\mu\text{M}$  (109). Por ensayos de competitividad se observó que IAPP prefibrilar interacciona con baja afinidad. Dado que la interacción IAPP-Zn(II) se observa en ausencia de la His18 y tiene afinidades en el rango mM (106), se considera que IAPP no tiene un sitio específico de unión a Zn(II) (110). Por otra parte, se observó por RMN que Zn(II) se une a IAPP monomérico, pero no se observa interacción con IAPP en estado oligomérico (110).

Para determinar la estequiometría del complejo Zn(II)-IAPP, se han utilizado diferentes péptidos modelo. Por estudios de espectrometría de masas, se reporta que los complejos Zn(II)-h-IAPP1-37 (109) y Zn(II)-r-IAPPR18H (111) son mayoritariamente 1:1 (metal:ligando) y con un exceso de Zn(II) se logra observar con baja abundancia relativa complejos 2:1 (metal:ligando); este segundo sitio de interacción parece tener una afinidad muy baja y podría estar en el N-terminal como se ha observado por RMN (111). Sin embargo, también se ha observado por RMN que el Zn(II) interacciona con IAPP en la His18 y con la Phe15 por medio de interacciones de apilamiento catión- $\pi$  (106,112), por lo que el segundo sitio de interacción no ha sido determinado. Además se ha evaluado el efecto de Zn(II) a diferentes concentraciones y se ha observado que a bajas concentraciones de Zn(II) se favorece la oligomerización de IAPP en hexámeros unidos a un átomo de Zn(II), y a altas concentraciones de Zn(II) se favorece la dimerización de IAPP unidos a un átomo de Zn(II) (104). Además, la estequiometría del fragmento 1-19 con conformación helicoidal reveló que existe un segundo sitio de unión endotérmico que favorece la interacción de Zn(II) y esto genera la oligomerización de 4 monómeros de IAPP (109).

Los estudios que determinan el rol de la His18 en la agregación de IAPP en interacción con Zn(II) son aún más contrastantes, ya que las cinéticas de formación de fibras de diferentes mutantes de IAPP muestran diferentes efectos en la agregación. Mutaciones de H18E y H18R muestran un comportamiento dual, ya que a altas concentraciones de Zn(II) se retrasa la formación de fibras amiloides y a bajas concentraciones de Zn(II) se acelera la agregación. Sin embargo, la mutación H18K acelera la formación amiloide y la sustitución H18A no tiene ningún efecto en la agregación, lo que demuestra que las sustituciones por aminoácidos cargados son importantes en la interacción con Zn(II) (105).

La complejidad de los procesos involucrados en el desarrollo de DMT-2 muestran una gran limitante que genera resultados contrastantes en diversos estudios, por lo que la investigación del efecto de cada uno de los componentes es necesaria para el entendimiento del desarrollo de la enfermedad. Hasta la fecha, no existe consenso sobre el efecto del Zn(II) en la formación de fibras amiloides de h-IAPP, no se conoce la estequiometría y la afinidad de unión y se entiende muy poco sobre los sitios de interacción. En este trabajo se reporta el efecto del Zn(II), la estequiometría y afinidad de la interacción utilizando diversos fragmentos de h-IAPP.

## **2. HIPÓTESIS.**

La interacción de Zn(II) con h-IAPP induce cambios conformacionales que afectan la amiloidogenicidad de la proteína.



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto del Zn(II) en la agregación de h-IAPP en concentraciones estequiométricas

#### **3.2 OBJETIVOS PARTICULARES.**

3.2.1. Sintetizar diferentes fragmentos de h-IAPP

3.2.2. Purificar y caracterizar los fragmentos sintetizados

3.2.3. Evaluar el efecto del Zn(II) en la cinética de formación de fibras amiloides de h-IAPP

3.2.4 Evaluar las diferencias morfológicas de las fibras amiloides en ausencia y presencia de Zn(II)

3.2.4. Evaluar la estequiometría y afinidad de la interacción de Zn(II) con fragmentos de h-IAPP

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 SÍNTESIS PEPTÍDICA

Los fragmentos de la Tabla 2 se sintetizaron en fase sólida con química Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonilo), utilizando 300mg de resina RINK-amide MBHA y aminoácidos protegidos en el N-terminal con el grupo Fmoc, y con las cadenas laterales protegidas por grupos t-Boc (terc-Butiloxicarbonilo) o t-But (terc-butilo) (113).

Tabla 2. Fragmentos de h-IAPP sintetizados.

Fragmento	Secuencia
1-29	KCNTATCATQRLANFLVHSSNCFGAILSS-NH <sub>2</sub>
1-29H18A	KCNTATCATQRLANFLVASSNCFGAILSS-NH <sub>2</sub>
1-29S28P	KCNTATCATQRLANFLVHSSNCFGAILSS-NH <sub>2</sub>

La síntesis química es un proceso cíclico de dos pasos, la desprotección y acoplamiento. El proceso de desprotección consiste en la remoción del grupo Fmoc para dejar libre el N-terminal del aminoácido, en este proceso se utiliza piperidina al 50%, realizando 5 ciclos de desprotección por 45 minutos. Para realizar de manera más eficiente el acoplamiento del siguiente aminoácido se realiza la conversión del C-terminal a un grupo éster activando el aminoácido con DIC (N,N Diisopropilcarbodiimida) durante 15 min. Posteriormente se procede a agregar el aminoácido activado a la resina para la formación del enlace peptídico en el proceso de acoplamiento. Estos pasos se repiten hasta completar la secuencia deseada (113,114). Finalmente, el péptido se separa de la resina mediante hidrólisis ácida con TFA (ácido trifluoroacético) (Figura 5 ) (115).

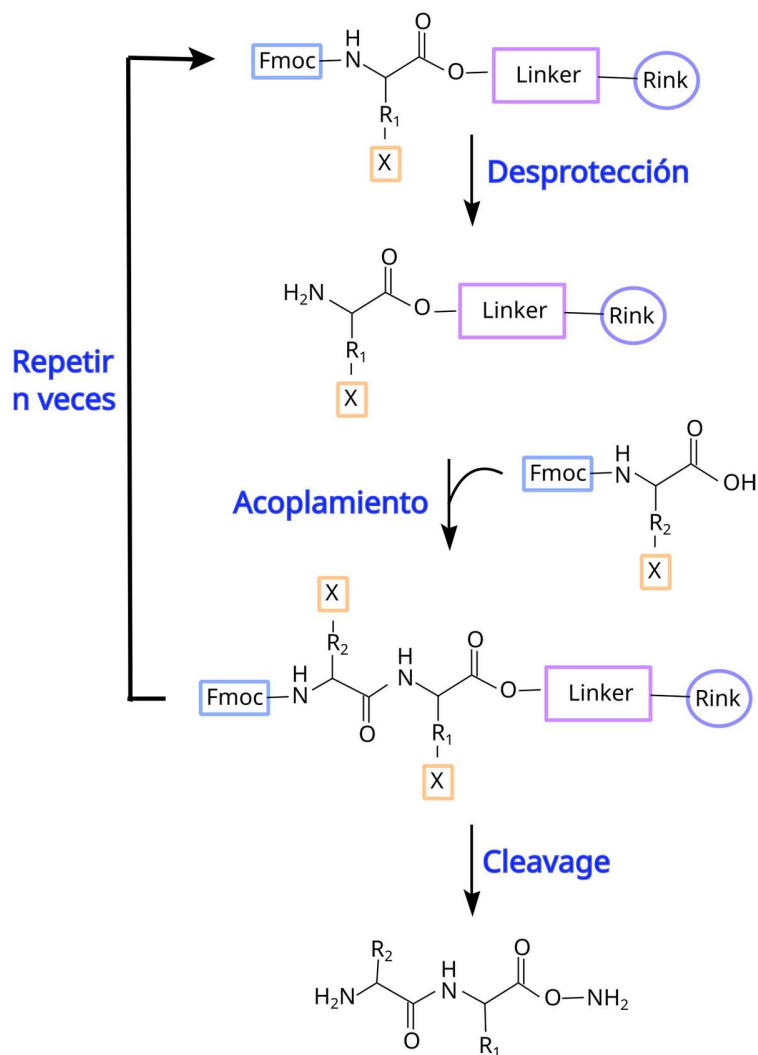


Figura 5. Esquema del proceso de síntesis. Se representan los pasos del proceso, la desprotección y el acoplamiento; la letra X corresponde a los grupos protectores de las cadenas laterales ( $R_1$  y  $R_2$ ) de diferentes aminoácidos. Editada de Soria-Gila (116).

#### 4.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS FRAGMENTOS SINTETIZADOS

Los fragmentos sintetizados se analizaron por espectrometría de masas con ionización ESI (Electrospray ionization) (117). En la Tabla 3 se muestran los pesos moleculares teóricos de los fragmentos. Los pesos fueron calculados con el software Avogadro (118).

Tabla 3. Peso molecular teórico de los fragmentos sintetizados.

Fragmento	Secuencia	Peso molecular (g/mol)
1-29 1-29ox*	KCNTATCATQRLANFLVHSSNFGAILSS	3069.454 3067.438
1-29H18A 1-29H18Aox*	KCNTATCATQRLANFLVASSNFGAILSS	3003.393 3001.377
1-29S28P 1-29S28Pox*	KCNTATCATQRLANFLVHSSNFGAILSS	3079.492 3077.476

\*Ox: oxidado.

### 4.3. PURIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS

Cada péptido sintético se disolvió en 40mL de DMSO (dimetilsulfoxido) y se filtró por una membrana de nylon de 0.2µm. El péptido se inyectó en una columna C-18 de fase reversa con un gradiente lineal de 0 a 100% de acetonitrilo con 0.05% de TFA y un flujo de 3mL/min. La purificación se realizó en un HPLC PerkinElmer Series 200. El péptido puro se liofilizó y almacenó a temperatura ambiente hasta su uso.

### 4.4. CINÉTICA DE AGREGACIÓN.

Las cinéticas de formación de fibras de los péptidos se realizaron siguiendo la intensidad de fluorescencia del Tioflavina T (ThT). El ThT es un fluoróforo con baja intensidad de fluorescencia, pero al intercalarse en las fibras amiloides su intensidad de fluorescencia aumenta, permitiendo seguir la formación de fibras. Todas las cinéticas se realizaron con los péptidos a una concentración de 100µM, en buffer MES 20mM pH 7.4, 25µM de ThT, en ausencia y presencia de 1 a 4 equivalentes de ZnSO<sub>4</sub>. Las cinéticas se realizaron en un fluorómetro Jenway 6285 a una longitud de onda de excitación de 440nm y de emisión de 485nm a 37°C con agitación constante hasta finalizar el experimento.

### 4.5. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM).

Para confirmar la presencia de fibras amiloides se tomaron microscopías del punto final de las cinéticas de formación de fibras de los diferentes péptidos en ausencia y presencia de Zn(II). Los agregados se recuperaron dejando sedimentar la muestra a 4°C durante toda la noche para posteriormente decantar el sobrenadante. El botón se lavó con agua desionizada y se dejó nuevamente sedimentando. Esto se repitió varias veces para eliminar la mayor cantidad de ThT posible. Para la microscopía, el botón de cada condición se resuspendió en 100µL de agua desionizada; 10µL de la muestra se cargaron en rejillas recubiertas de carbono por 1 min e inmediatamente se tiñeron negativamente con 10µL de acetato de uranilo al 20% durante 1min. Se tomaron las imágenes de las muestras con un microscopio electrónico de transmisión Zeiss.

### 4.6. AFINIDAD Y ESTEQUIOMETRÍA POR CALORIMETRÍA DE TITULACIÓN ISOTÉRMICA.

Para determinar la afinidad de la interacción entre el fragmento 1-29 y Zn(II) se realizó calorimetría de titulación isotérmica (ITC por sus siglas en inglés). En la celda se colocó el fragmento 1-29 a una concentración de 100µM en buffer Mes 20mM pH 7.5 y se tituló con Zn(II) a 1.68mM y 3.36mM. Para la titulación con 1.68mM de Zn(II) los volúmenes de inyección fueron de 1.5µL, agitación de 750rpm a 20°C y 180s entre inyecciones para permitir el equilibrio. Para la titulación con 3.36mM, los volúmenes de inyección fueron de 0.75µL, agitación de 750rpm a 20°C y 90s entre inyecciones para permitir el equilibrio. Los experimentos fueron realizados en un equipo Malvern ITC200.

Los termogramas obtenidos se ajustaron a tres diferentes modelos matemáticos usando el software SEDPHAT (119); El modelo de unión a dos sitios simétricos de interacción,  $A+B+B \rightleftharpoons AB+B \rightleftharpoons ABB$ ; el modelo de unión a tres sitios simétricos de interacción  $A+B+B+B \rightleftharpoons AB+B+B \rightleftharpoons ABB+B \rightleftharpoons ABB$  y el modelo de hetero asociación  $A+B \rightleftharpoons AB$ . Los gráficos se realizaron en el software GUSI (120).

## 5. RESULTADOS.

### 5.1. CARACTERIZACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS SINTETIZADOS.

La espectrometría de masas de los fragmentos 1-29, 1-29H18A y 1-29S28P confirmó la presencia de los fragmentos sintetizados. Para cada uno de los fragmentos se obtuvieron iones moleculares de  $z=+3$ , esto corresponde a la masa teórica de los fragmentos con el puente disulfuro entre las Cys 2 y 7 (Tabla 3) (Figura 6).

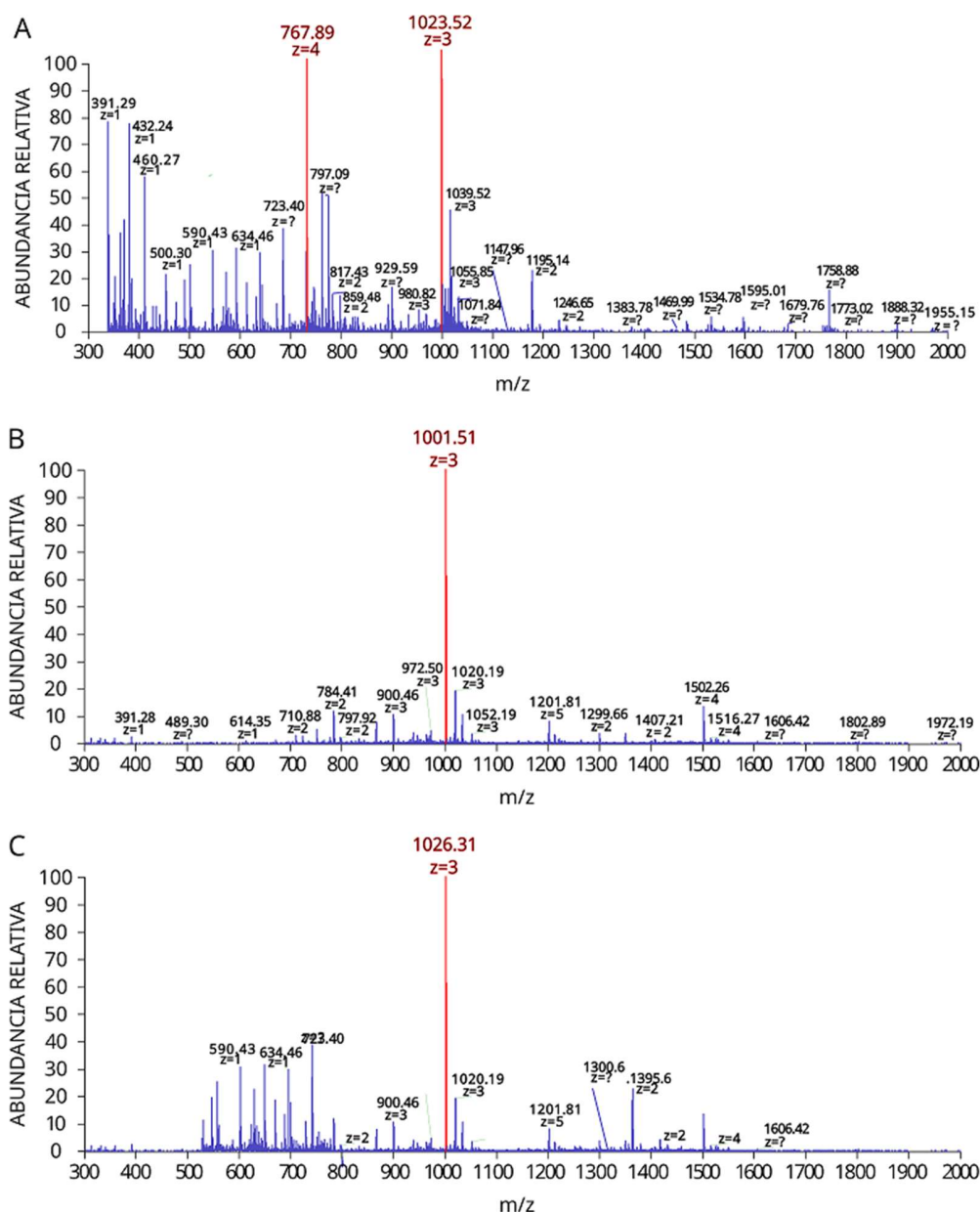


Figura 6. Espectro de masas de los fragmentos 1-29 (A), 1-29H18A (B) y 1-29S28P (C).

En la purificación de los fragmentos se obtuvieron cromatogramas similares para todas las muestras. Se observan dos señales abundantes con diferentes tiempos de retención, una a 5min que corresponde al DMSO y otra señal en aproximadamente 25min que corresponde al fragmento puro que eluyó con 57% de acetonitrilo. (Figura7).

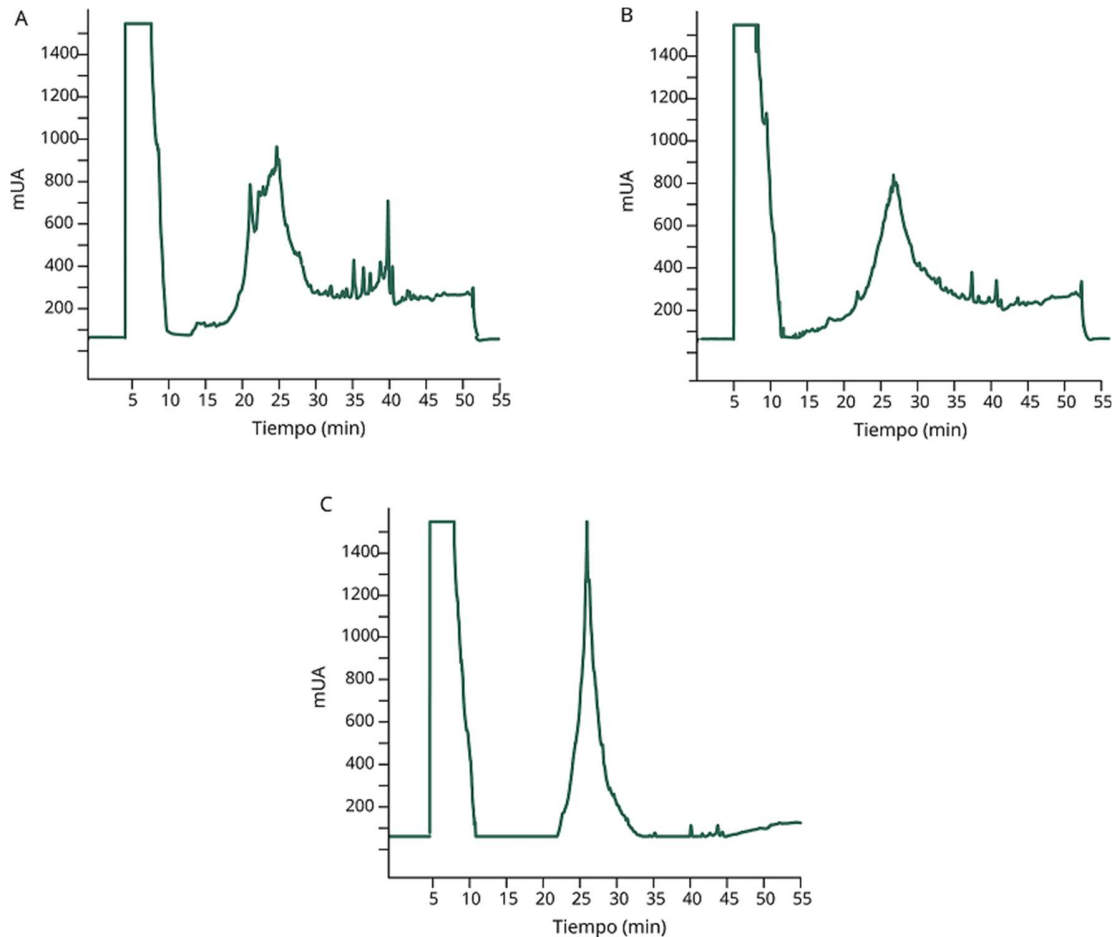


Figura 7. Cromatogramas de purificación de los fragmentos 1-29 (A), 1-29H18A (B) y 1-29S28P (C).

## 5.2. CINÉTICA DE FORMACIÓN DE FIBRAS AMILOIDES.

### 5.2.1 CINÉTICA DE FORMACIÓN DE FIBRAS DEL FRAGMENTO 1-29

La cinética de formación de fibras amiloides del fragmento 1-29 presentó un tiempo lag promedio de  $1012.1 \pm 636.3$  min (Anexo FS1 y Tabla 4). Al realizar la cinética en presencia de 1 hasta 4 equivalentes de Zn(II) (Figura 8) se observaron tiempos lag mayores a partir de 1 equivalente de Zn(II) en comparación con el péptido en ausencia de Zn(II). Estos resultados indican que la interacción con Zn(II) retrasa la formación de fibras amiloides, indicando que existe 1 solo sitio de unión a Zn(II) en este fragmento.

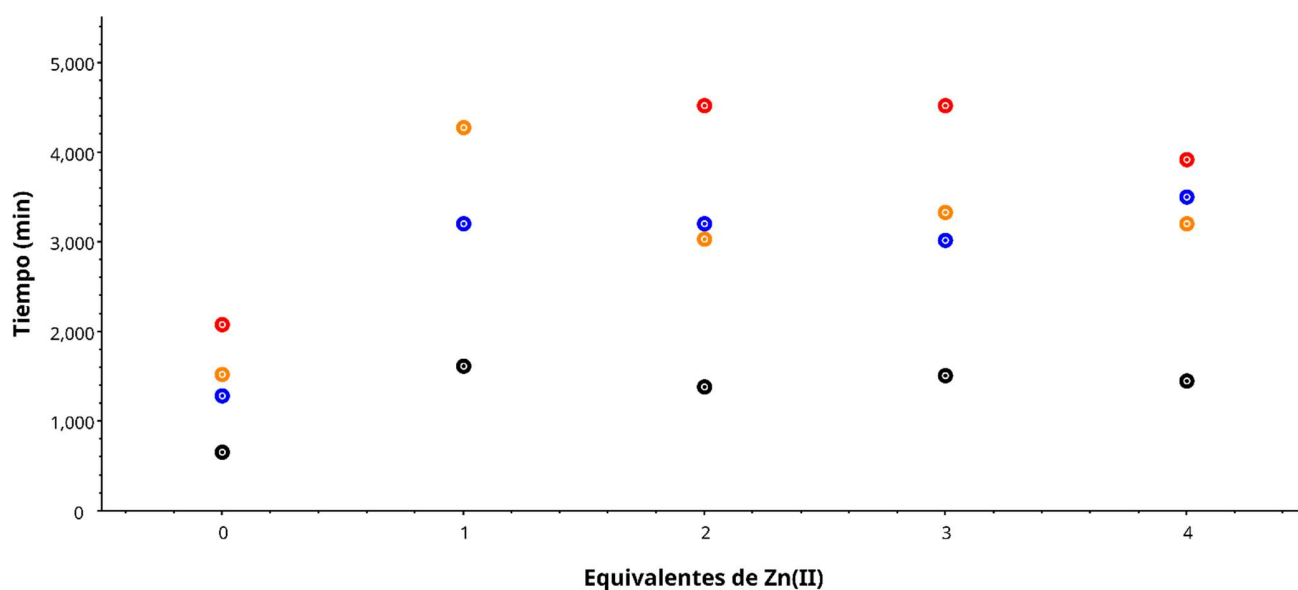


Figura 8. Tiempos lag del fragmento 1-29, se ilustra con diferentes colores los tiempos de las cuatro replicas realizadas.

Tabla 4 . Tiempos lag de las cinéticas de formación de fibras del fragmento 1-29.

Zn(II)	Tiempo lag (min)						Promedio± Desviación Estándar
	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Repetición 4	Repetición 5	Repetición 6	
0	658.24	1285.80	2076.30	1521.81	530.5	N.D	1012.1±636.3
1	1616.54	3202.16	5863.81	4274.69	N.D	N.D	2492.9±1788.4
2	1386.49	3202.16	4520.21	3032.40	N.D	N.D	2023.5±1284.7
3	1510.31	3019.95	4520.21	3328.18	N.D	N.D	2063.1±1238.6
4	1450.83	3499.79	3916.83	3202.16	N.D	N.D	2011.6±1084.7

N.D: no determinado.

Para confirmar la presencia de fibras amiloides en los puntos finales de cada cinética se tomaron imágenes de TEM (Figura 9). En todas las condiciones se observaron fibras amiloides de morfología no ramificada, con una longitud entre 0.44 y 0.55 $\mu\text{m}$ , y un diámetro de aproximadamente 0.01 $\mu\text{m}$ . Todo esto indica que la interacción con Zn(II) no afecta la morfología de las fibras.



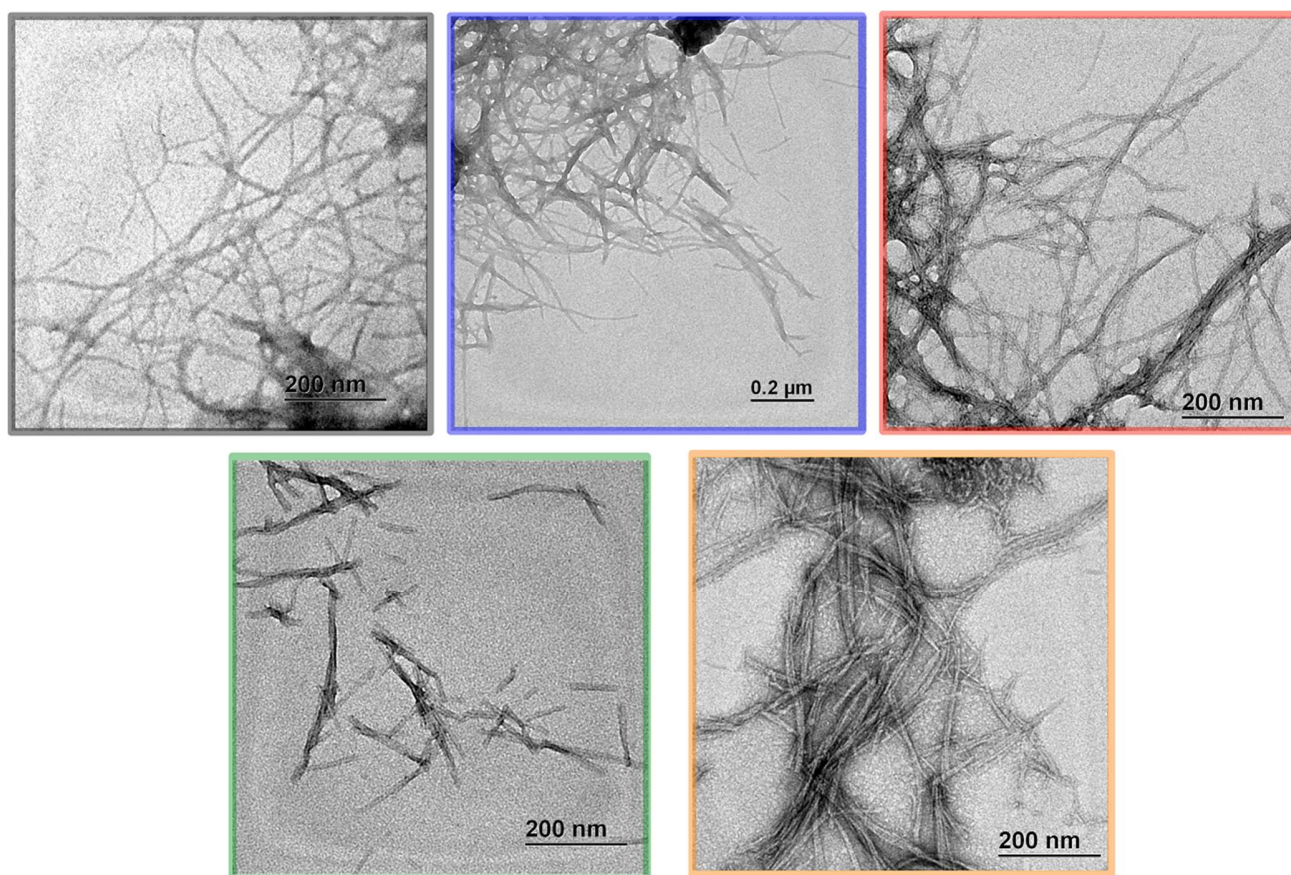


Figura 9. Microscopia electrónica de transmisión del fragmento 1-29. En ausencia (negro), en presencia de 1 (azul), 2 (rojo), 3 (verde) y 4 (naranja) equivalentes de Zn(II).

Como se indica en la Tabla 4, las réplicas 5 y 6 no presentaron aumento en la intensidad de fluorescencia de ThT a excepción de la réplica 5 en ausencia de Zn(II) que tuvo un tiempo lag de 530.5min, estas muestras se refrigeraron y posteriormente a las condiciones con 2 y 3 equivalentes de Zn(II) de la réplica 5 se les colectaron imágenes de TEM. Como se muestra en la Figura 10, la condición con 2 equivalentes de Zn(II) presenta agregados no fibrilares y algunas fibras amiloides de menor longitud que las fibras de la proteína sin Zn(II) (Figura 9). Por otro lado, la condición de 3 equivalentes de Zn(II) presentó menor cantidad de fibras amiloides y fibras más cortas. Lo que indicaría que por lo menos en estas dos replicas el zinc no solo tiene un efecto en la agregación de la proteína, sino que también en la morfología de las fibras.

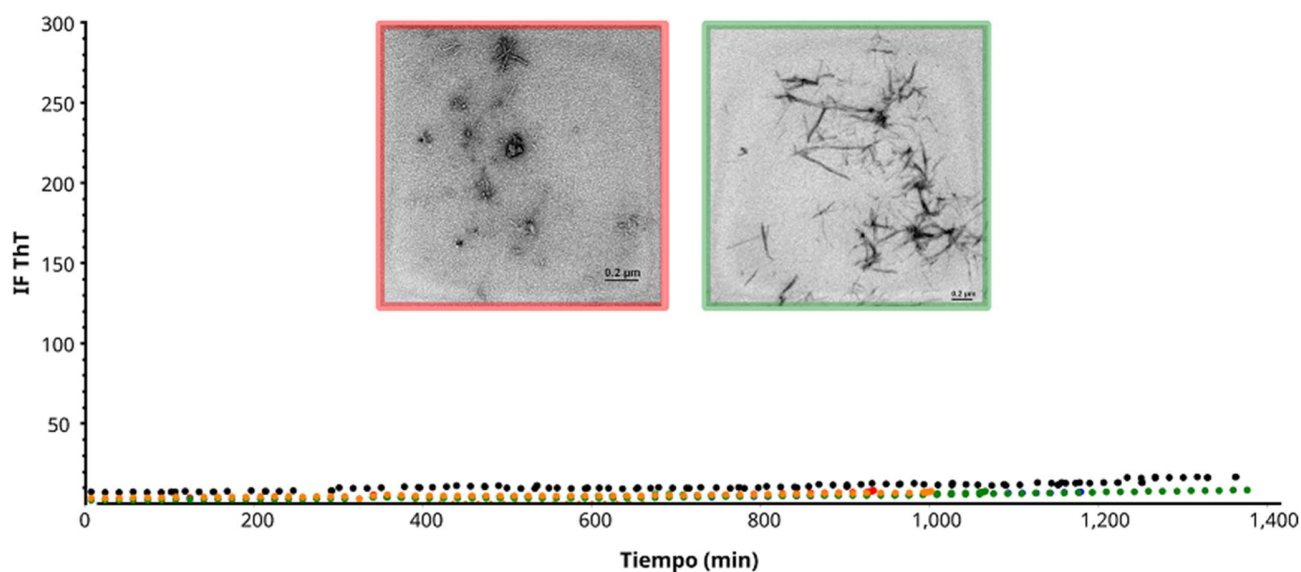


Figura 10. Cinética de agregación del fragmento 1-29 sin fluorescencia de ThT. En ausencia (negro), en presencia de 1 (azul), 2 (rojo), 3 (verde) y 4 (naranja) equivalentes de Zn(II). En la parte superior se muestran los TEM del punto final de las cinéticas a 2 y 3 equivalentes de Zn(II).

### 5.2.2. CINÉTICA DE FORMACIÓN DE FIBRAS DEL FRAGMENTO 1-29H18A.

Se utilizó el fragmento 1-29H18A para evaluar si la pérdida de la H18 afectaba la interacción con Zn(II), ya que se sabe, que los nitrógenos del grupo imidazol de la histidina son los principales componentes que coordinan con el Zn(II) en diversas proteínas.

La cinética de formación de fibras amiloides del fragmento 1-29H18A presentó un tiempo lag de  $920.8 \pm 348.8$  min (Anexo FS2 y Tabla 5). Al realizar la cinética en presencia de 1 hasta 4 equivalentes de Zn(II) (Figura 11) se observó que los tiempos lag de 3 y 4 equivalentes de Zn(II) disminuyen (Tabla 5), lo que indica que la interacción con Zn(II) acelera la formación de fibras amiloides y para este fragmento se tiene un sitio de coordinación diferente a la His18.

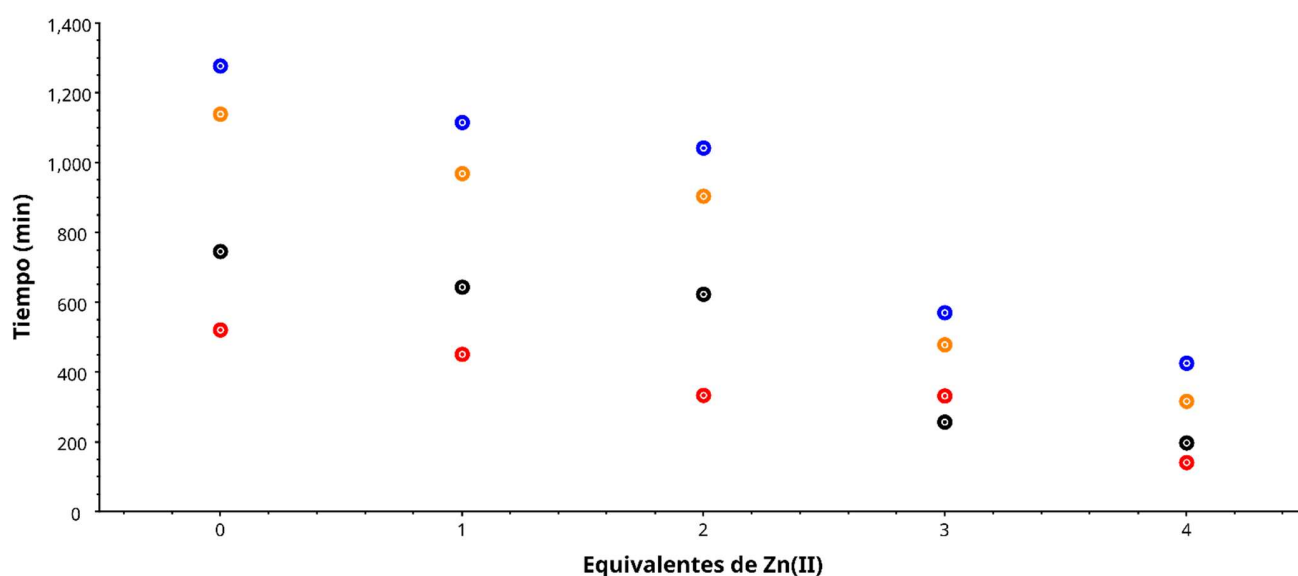


Figura 11. Tiempos lag del fragmento 1-29H18A, se ilustra con diferentes colores los tiempos de las cuatro replicas realizadas

Tabla 5. Tiempos lag de las cinéticas de formación de fibras del fragmento 1-29H18A.

Zn(II)	Tiempo lag (min)				Promedio ±Desviación Estándar
	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 4	Repetición 5	
0	745.5	1276.57	521.23	1139.91	920.8±348.8
1	643.21	1115.10	451.11	969.19	794.7±302.3
2	623.57	1042.55	333.23	903.70	725.8±314.4
3	257.75	571.29	331.35	478.70	409.7±141.5
4	197.31	425	141.41	316.66	270.1±126.5

### 5.2.3. CINÉTICA DE FORMACIÓN DE FIBRAS DEL FRAGMENTO 1-29S28P.

El fragmento 1-29S28P se utilizó como una alternativa menos amiloidogénica existen reportes en los que la sustitución de serina por prolina en la posición 28 inhibe casi por completo la formación amiloide. Sin embargo, bajo las condiciones que se utilizaron para el desarrollo de este proyecto el fragmento 1-29S28P es amiloidogénico

La cinética de formación de fibras amiloides del fragmento 1-29S28P presentó un tiempo lag de  $2543.5 \pm 687.5$  min (Anexo FS3 y Tabla 6). Al realizar la cinética en presencia de 1 hasta 4 equivalentes de Zn(II) (Figura 12) se observó que los tiempos lag de las diferentes condiciones oscilan entre 2000 y 3000 min. Sin embargo, se necesitan estequiometrías 1:4 (IAPP:metal) para tener una ligera aceleración en el tiempo lag de las cinéticas. Estos resultados indican

que los modos de coordinación a Zn(II) cambian en comparación con los fragmento 1-29. Por otra parte, este efecto es similar al observado en el fragmento 1-29H18A.

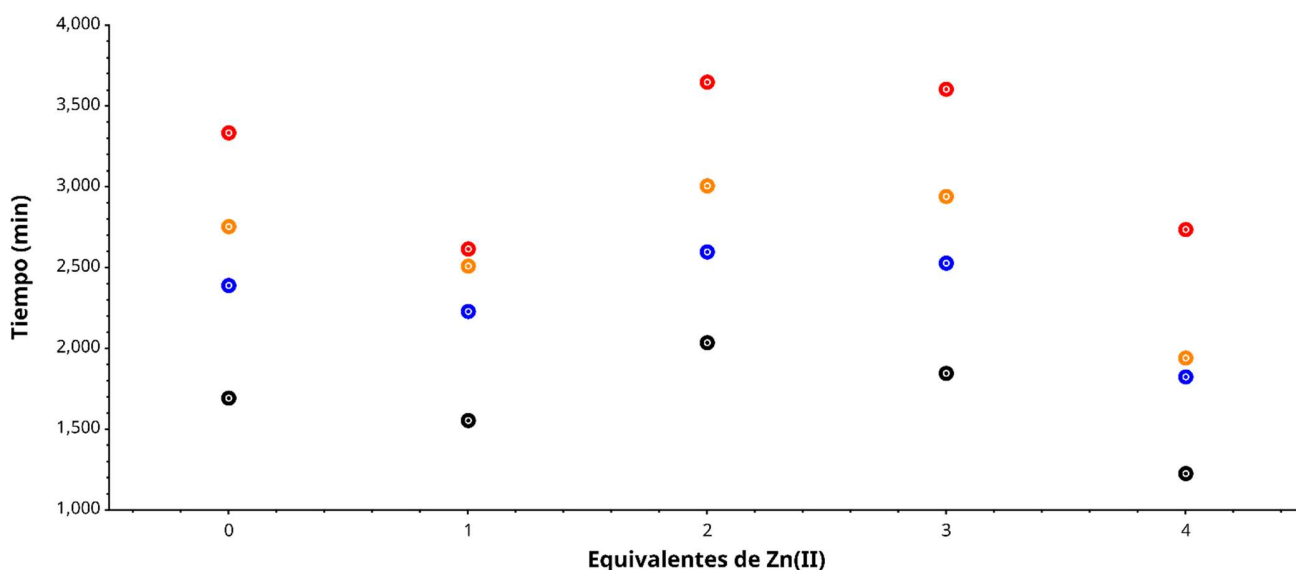


Figura 12. Tiempos lag del fragmento 1-29S28P, se ilustra con diferentes colores los tiempos de las cuatro replicas realizadas

Tabla 6. Tiempos lag de las cinéticas de formación de fibras del fragmento 1-29S28P.

Zn(II)	Tiempo lag (min)				Promedio ±Desviación Estándar
	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 4	Repetición 5	
0	1693.28	2389.54	3334.63	2756.55	2543.5±687.5
1	1555.28	2230.94	2617.85	2511.47	2228.9±477.8
2	2036.35	2597.95	3650.76	3005.73	2822.7±680.2
3	1846.26	2530.63	3605.48	2940.16	2730.6±737.4
4	1227.84	1826.12	2737.19	1942.45	1933.4±620.6

### 5.3. AFINIDAD Y ESTEQUIOMETRÍA DE LA INTERACCIÓN.

Los resultados de ITC (Figura 13) muestran que la interacción del fragmento 1-29 con el Zn(II) es exotérmica, pues en la isoterma se observaron calores negativos. El fragmento 1-29 se tituló hasta 3.5 y 5.5 equivalentes de Zn(II) (Figura 13). En la titulación se puede observar que no se llega a saturación. Esto puede deberse a muchas razones, desde que no se han saturado los sitios de unión a Zn(II), procesos de oligomerización y/o cambios conformacionales en el péptido (120–122). Ambas titulaciones se ajustaron a un modelo de dos y tres sitios de unión simétricos y a un modelo de hetero asociación (Figura 13 y Tabla 7). Estos resultados indican que la interacción del fragmento 1-29 con Zn(II) es débil, pues sus constantes de afinidad se

encuentran en el rango milimolar. Además, se observa que las constantes de disociación y los cambios de entalpía son de menor afinidad en cada sitio de interacción en comparación con el anterior (Tabla 7).

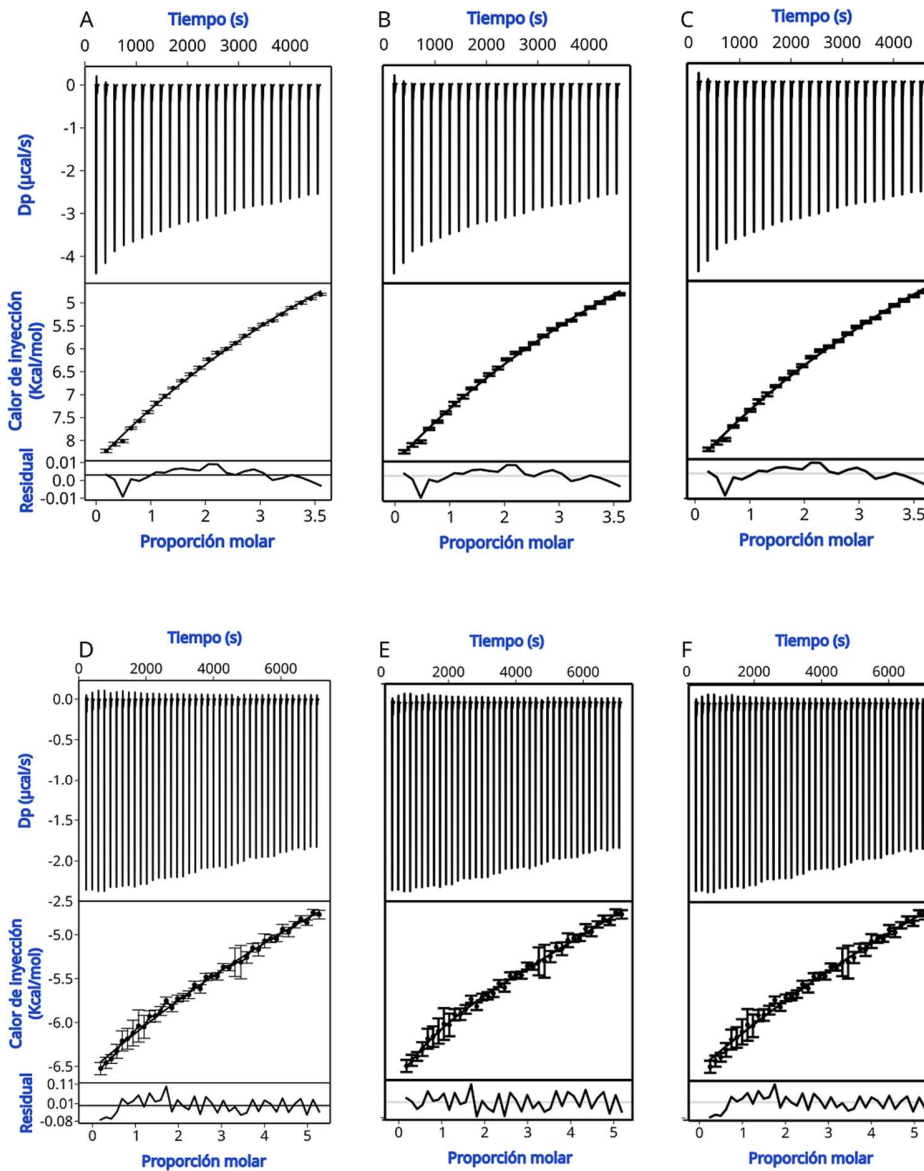


Figura 13. Termogramas ajustados de la titulación del fragmento 1-29 hasta 3.5 (A, B, C) y 5.5 (D, E, F) equivalentes de Zn(II), ajustados a un modelo de 2 sitios simétricos (A y D), a 3 sitios simétricos (B y E) y modelo de hetero asociación (C y F).

Tabla 7. Parámetros termodinámicos de la interacción de Zn(II) con h-IAPP1-29.

Titulación hasta 3.5 equivalentes de Zn(II)		Titulación hasta 5.5 equivalentes de Zn(II)	
Kd ( $\mu\text{M}$ )	$\Delta\text{H}(\text{Kcal/mol})$	Kd ( $\mu\text{M}$ )	$\Delta\text{H}(\text{Kcal/mol})$
Modelo de unión a 2 sitios simétricos			
217.22	-593.13	444.4	-324.4
1062.16	-593.21	1908.25	-325.36
Modelo de unión a 3 sitios simétricos			
364.94	-1505.19	541.85	-42.48
1828.76	-1505.27	1395.38	-43.44
2768.09	-30000	1090.27	-30000
Modelo de unión de hetero asociación			
704.93	-2221.4	159.04	-497.22

## 6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

La DM es un grave problema de salud que en los últimos años ha presentado un incremento dramático alrededor del mundo (1,4). La DMT-2 es uno de los tipos más comunes de DM y se ha visto una relación directa en la progresión de la enfermedad y la pérdida de volumen de células  $\beta$  pancreáticas; en pacientes con DM esta pérdida va desde el 1% al 80% (9). Estudios histopatológicos de páncreas de difuntos con DMT-2 determinó que en la superficie del páncreas se encuentran depósitos fibrilares compuestos principalmente IAPP (11).

Las cinéticas de formación de fibras amiloides de los fragmentos 1-29, 1-29H18A y 1-29S28P mostraron que el Zn(II) induce efectos variados dependiendo del fragmento y de la concentración del ion metálico. Para el fragmento 1-29, la interacción con Zn(II) parece ser de baja afinidad, de acuerdo con lo observado por ITC (Tabla 7). Sin embargo, tal interacción retrasa la formación de fibras a partir de 1 equivalente de Zn(II) y sin afectar la morfología fibrilar (Figuras 8 y 9). Con estas observaciones se puede especular que la interacción con Zn(II) estabiliza un intermediario que compite con el cambio conformacional necesario para formar la fibra. El sitio de unión reportado por diversos autores es la His18 (82,123), sin embargo, no tenemos datos experimentales que confirmen o descarten este sitio.

El retraso en la formación de fibras se observó en todas las réplicas del fragmento 1-29, a pesar de que los tiempos lag variaron considerablemente entre réplica y réplica (Tabla 4). Esto indica que la cinética de formación de fibras amiloides del fragmento 1-29 en presencia y ausencia de Zn(II) es un fenómeno estocástico. Este efecto se ha observado en otros sistemas como la  $\beta$  amiloide (124), la prion (80), entre otros. Las cinéticas de formación de fibras dependen de diversos factores como la predisposición para adoptar estructuras secundarias, hidrofobicidad, cargas o concentración de proteína, entre otros. En este caso, en la fase de nucleación pueden formarse diferentes intermediarios conformacionales, conduciendo a una alta heterogeneidad de poblaciones, generando diferencias estocásticas en cada muestra, a pesar de partir del mismo stock. Adicionalmente, simulaciones de dinámica molecular han sugerido que los monómeros iniciales de cadenas polipeptídicas y sus asociaciones pueden estabilizar agregados tempranos de estructuras considerablemente diferentes (124,125).

Por otra parte, el fragmento 1-29H18A mostró una cinética de formación de fibras en ausencia de Zn(II) con un tiempo lag menor que el fragmento 1-29, con tiempos lag de  $920.8 \pm 348.8$  min y  $1012.1 \pm 636.3$  min respectivamente. Esto indica que la mutación H18A favorece el cambio conformacional necesario para la formación fibrilar, pues al sustituir un grupo voluminoso como la histidina por un grupo más pequeño como la alanina, disminuiría el impedimento estérico en la conformación necesaria. La His18 se encuentra en una posición clave en la estructura fibrilar, ya que está en el asa que conecta las dos láminas  $\beta$  que se asocian para formar la fibra (Figura 3) (36,126). Además, la cinética de formación de fibras de 1-29H18A en presencia de 3 y 4 equivalentes Zn(II) mostró que la interacción acelera la formación de fibras amiloides (Figura 11 y Tabla 5). Éste es el efecto contrario a lo observado en el fragmento 1-29, lo que indica que el Zn(II) está interactuando en un sitio diferente a la His18 y además puede ser menos accesible en el intermediario y de menor afinidad, ya que se necesita un "exceso" del ion metálico para observar un efecto. Existen diferentes reportes sobre otros sitios de unión de Zn(II) a IAPP donde se han usado fragmentos con mutaciones en la His18, y en ausencia de

esta se han observado afinidades en el rango mM de la interacción (106), lo que hace considerar que IAPP no tiene un sitio específico de unión a Zn(II) (110). Sin embargo, este segundo sitio de unión podría favorecer el plegamiento de la proteína para la formación fibrilar, un posible sitio de interacción sería el N-terminal como reportan algunos autores (123).

Por otro lado, el fragmento 1-29S28P tiene un tiempo lag mucho mayor que el fragmento 1-29, con tiempos lag de  $2543.5 \pm 687.5$  min y  $1012.1 \pm 636.3$  min, respectivamente. Esto se ha reportado con anterioridad; ya que, las sustituciones en las posiciones 25, 28 y 29 por prolinas hacen a la proteína menos amiloidogénica, particularmente la sustitución S28P, de la cual se ha reportado por no formar fibras amiloides bajo ciertas condiciones experimentales (20). La disminución en la amiloidogenicidad se debe a que la prolina es un aminoácido que desestabiliza estructuras secundarias por la pérdida de interacciones tipo puentes de hidrógeno (34,125). El efecto del Zn(II) en la agregación del fragmento 1-29S28P no es tan notorio como en los fragmentos 1-29 y 1-29H18A ya que se observa una ligera disminución en el tiempo de agregación a partir de 4 equivalentes de Zn(II) (Figura 12 y Tabla 6). Efecto similar al encontrado en el fragmento 1-29H18A, esto podría indicar que el afectar la amiloidogenicidad del fragmento genera otro tipo de intermediario, el cual puede tener un segundo sitio de unión menos accesible y de menor afinidad por lo que un exceso de Zn(II) es necesario para favorecer la interacción y llevar a cabo la formación de fibras amiloides. Por RMN se ha observado que el Zn(II) interacciona con IAPP en la His18 y con la Phe15 por medio de interacciones de apilamiento catión- $\pi$  (106,112), ya que en el fragmento 1-29S28P aún conservamos estos residuos podemos deducir que la interacción de Zn(II) con estos aminoácidos sigue existiendo pero, debido a la sustitución S28P el intermediario es diferente y por lo tanto no vemos el mismo efecto que en el fragmento 1-29.

Además es importante recordar que se requiere un equilibrio entre la repulsión electrostática y las interacciones hidrofóbicas para desencadenar la formación amiloide, los iones de sal pueden mejorar las interacciones intermoleculares al debilitar las interacciones electrostáticas repulsivas mediante un efecto de Debye-Hückel o mediante la unión iónica directa, esto reduce la entalpía del cambio conformacional que acompaña a la nucleación (56,57). Probablemente en nuestras condiciones de trabajo 3 y 4 equivalentes de Zn(II) para los fragmento 1-29H18A y 1-29S28P favorecen el apantallamiento de las cargas y favorecen la formación amiloide.

Son necesarios más estudios para tratar de explicar este comportamiento. Sin embargo, con todo lo anterior, se puede decir que la His18 parece ser el primer y más importante sitio de unión a Zn(II) en h-IAPP.

## **7. PERSPECTIVAS.**

Evaluar las diferencias en los oligómeros de la fase nucleación.

Evaluar la afinidad por Zn(II) del fragmento 1-29H18A.

Determinar los sitios de interacción del Zn(II) en h-IAPP.



## 8. REFERENCIAS.

1. Unknown. WHO Diabetes mellitus. Diabetes mellitus. 2018.
2. Egan AM, Dinneen SF. What is diabetes? Vol. 47, Medicine (United Kingdom). 2019.
3. Goh SY, Cooper ME. The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(4):1143–52.
4. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas: Tenth edition 2021. International Diabetes Federation. 2021.
5. Norouzi S, Adulcikas J, Sohal SS, Myers S. Zinc transporters and insulin resistance: Therapeutic implications for type 2 diabetes and metabolic disease. Vol. 24, *Journal of Biomedical Science.* 2017.
6. Hupfeld CJ, Olefsky JM. Type 2 Diabetes Mellitus: Etiology, Pathogenesis, and Natural History. In: *Endocrinology: Adult and Pediatric.* 2015.
7. Marzban L, Park K, Verchere CB. Islet amyloid polypeptide and type 2 diabetes. Vol. 38, *Experimental Gerontology.* 2003.
8. Roham PH, Save SN, Sharma S. Human islet amyloid polypeptide: A therapeutic target for the management of type 2 diabetes mellitus. *J Pharm Anal [Internet].* 2022 Apr 7 [cited 2022 Apr 12]; Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2095177922000272>
9. Röcken C, Linke RP, Saeger W. Immunohistology of islet amyloid polypeptide in diabetes mellitus: Semi-quantitative studies in a post-mortem series. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1992;421(4).
10. Opie EL. The relation of diabetes mellitus to lesions of the pancreas. Hyaline degeneration of the islands of langerhans. *J Exp Med.* 1901;5(5).
11. Clark A, Wells CA, Buley ID, Cruickshank JK, Vanhegan RI, Matthews DR, et al. Islet amyloid, increased A-cells, reduced B-cells and exocrine fibrosis: Quantitative changes in the pancreas in type 2 diabetes. *Diabetes Res.* 1988;9(4).
12. Foster MC, Leapman RD, Li MX, Atwater I. Elemental composition of secretory granules in pancreatic islets of Langerhans. *Biophys J.* 1993;
13. Kiriya Y, Nochi H. Role and Cytotoxicity of Amylin and Protection of Pancreatic Islet  $\beta$ -Cells from Amylin Cytotoxicity. *Cells.* 2018;
14. Kahn SE, D'Alessio DA, Schwartz MW, Fujimoto WY, Ensink JW, Taborsky GJ, et al. Evidence of cosecretion of islet amyloid polypeptide and insulin by  $\beta$ -cells. *Diabetes.* 1990;39(5).
15. Kanatsuka A, Makino H, Ohsawa H, Tokuyama Y, Yamaguchi T, Yoshida S, et al. Secretion of islet amyloid polypeptide in response to glucose. *FEBS Lett.* 1989;259(1).
16. Zhang X-X, Pan Y-H, Huang Y-M, Zhao H-L. Neuroendocrine hormone amylin in diabetes. *World J Diabetes.* 2016;7(9).
17. Enoki S, Mitsukawa T, Takemura J, Nakazato M, Aburaya J, Toshimori H, et al. Plasma islet amyloid polypeptide levels in obesity, impaired glucose tolerance and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 1992;15(1).
18. Gedulin BR, Jodka CM, Herrmann K, Young AA. Role of endogenous amylin in glucagon secretion and gastric emptying in rats demonstrated with the selective

- antagonist, AC187. *Regul Pept.* 2006;137(3).
19. Betsholtz C, Christmansson L, Engström U, Rorsman F, Svensson V, Johnson KH, et al. Sequence divergence in a specific region of islet amyloid polypeptide (IAPP) explains differences in islet amyloid formation between species. *FEBS Lett.* 1989;
  20. Ridgway Z, Eldrid C, Zhyvoloup A, Ben-Younis A, Noh D, Thalassinos K, et al. Analysis of Proline Substitutions Reveals the Plasticity and Sequence Sensitivity of Human IAPP Amyloidogenicity and Toxicity. *Biochemistry.* 2020;59(6).
  21. Erthal LCS, Marques AF, Almeida FCL, Melo GLM, Carvalho CM, Palmieri LC, et al. Regulation of the assembly and amyloid aggregation of murine amylin by zinc. *Biophys Chem.* 2016;218.
  22. Sayers EW, Cavanaugh M, Clark K, Pruitt KD, Schoch CL, Sherry ST, et al. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 2022;50(D1).
  23. Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Res.* 2004;14(6).
  24. Kayed R, Bernhagen J, Greenfield N, Sweimeh K, Brunner H, Voelter W, et al. Conformational transitions of islet amyloid polypeptide (IAPP) in amyloid formation in vitro. *J Mol Biol.* 1999;
  25. Yonemoto IT, Kroon GJA, Dyson HJ, Balch WE, Kelly JW. Amylin proprotein processing generates progressively more amyloidogenic peptides that initially sample the helical state. *Biochemistry.* 2008;
  26. Nanga RPR, Brender JR, Vivekanandan S, Ramamoorthy A. Structure and membrane orientation of IAPP in its natively amidated form at physiological pH in a membrane environment. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2011;
  27. Wiltzius JJW, Sievers SA, Sawaya MR, Eisenberg D. Atomic structures of IAPP (amylin) fusions suggest a mechanism for fibrillation and the role of insulin in the process. *Protein Sci.* 2009;
  28. Kirkitadze MD, Condrón MM, Teplow DB. Identification and characterization of key kinetic intermediates in amyloid  $\beta$ -protein fibrillogenesis. *J Mol Biol.* 2001;312(5).
  29. Mihara H, Takahashi Y. Engineering peptides and proteins that undergo  $\alpha$ -to- $\beta$  transitions. *Curr Opin Struct Biol.* 1997;7(4).
  30. Abedini A, Raleigh DP. A role for helical intermediates in amyloid formation by natively unfolded polypeptides? *Phys Biol.* 2009;6(1).
  31. Knowles TPJ, Vendruscolo M, Dobson CM. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2014.
  32. Chiti F, Dobson CM. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. Vol. 75, *Annual Review of Biochemistry.* 2006.
  33. Iadanza MG, Jackson MP, Hewitt EW, Ranson NA, Radford SE. A new era for understanding amyloid structures and disease. Vol. 19, *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2018.
  34. Tsemekhman K, Goldschmidt L, Eisenberg D, Baker D. Cooperative hydrogen bonding in amyloid formation. *Protein Sci.* 2007;16(4).
  35. Harrison RS, Sharpe PC, Singh Y, Fairlie DP. Amyloid peptides and proteins in review.

Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology. 2007.

36. Wiltzius JJW, Sievers SA, Sawaya MR, Cascio D, Popov D, Riek C, et al. Atomic structure of the cross- $\beta$  spine of islet amyloid polypeptide (amylin). Available from: <http://www.protein-science.org/cgi/>
37. Luca S, Yau WM, Leapman R, Tycko R. Peptide conformation and supramolecular organization in amylin fibrils: Constraints from solid-state NMR. *Biochemistry*. 2007;46(47).
38. Röder C, Kupreichyk T, Gremer L, Schäfer LU, Pothula KR, Ravelli RBG, et al. Cryo-EM structure of islet amyloid polypeptide fibrils reveals similarities with amyloid- $\beta$  fibrils. *Nat Struct Mol Biol*. 2020;27(7).
39. Sunde M, Blake C. The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and x-ray diffraction. Vol. 50, *Advances in Protein Chemistry*. 1997.
40. Nelson R, Eisenberg D. Structural Models of Amyloid-Like Fibrils. Vol. 73, *Advances in Protein Chemistry*. 2006.
41. Biancalana M, Koide S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. Vol. 1804, *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. 2010.
42. Yakupova EI, Bobyleva LG, Vikhlyantsev IM, Bobylev AG. Congo Red and amyloids: History and relationship. Vol. 39, *Bioscience Reports*. 2019.
43. Gade Malmos K, Blancas-Mejia LM, Weber B, Buchner J, Ramirez-Alvarado M, Naiki H, et al. ThT 101: a primer on the use of thioflavin T to investigate amyloid formation. Vol. 24, *Amyloid*. 2017.
44. Kim YS, Randolph TW, Manning MC, Stevens FJ, Carpenter JF. Congo red populates partially unfolded states of an amyloidogenic protein to enhance aggregation and amyloid fibril formation. *J Biol Chem*. 2003;278(12).
45. Kajava A V., Aebi U, Steven AC. The Parallel Superpleated Beta-structure as a Model for Amyloid Fibrils of Human Amylin. *J Mol Biol*. 2005 Apr 29;348(2):247–52.
46. Soriaga AB, Sangwan S, MacDonald R, Sawaya MR, Eisenberg D. Crystal structures of IAPP amyloidogenic segments reveal a novel packing motif of out-of-register beta sheets. *J Phys Chem B*. 2016;120(26).
47. Wiltzius JJW, Landau M, Nelson R, Sawaya MR, Apostol MI, Goldschmidt L, et al. Molecular mechanisms for protein-encoded inheritance. *Nat Struct Mol Biol*. 2009;16(9).
48. Goldsbury CS, Cooper GJS, Goldie KN, Müller SA, Saafi EL, Gruijters WTM, et al. Polymorphic fibrillar assembly of human amylin. *J Struct Biol*. 1997;119(1).
49. Cortez LM, Kumar J, Renault L, Young HS, Sim VL. Mouse prion protein polymorphism Phe-108/Val-189 affects the kinetics of fibril formation and the response to seeding: Evidence for a Two-Step Nucleation polymerization mechanism. *J Biol Chem*. 2013;288(7).
50. Liu C, Zhao M, Jiang L, Cheng PN, Park J, Sawaya MR, et al. Out-of-register  $\beta$ -sheets suggest a pathway to toxic amyloid aggregates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(51).
51. Andrews ME, Inayathullah NM, Jayakumar R, Malar EJP. Conformational polymorphism and cellular toxicity of IAPP and  $\beta$ AP domains. *J Struct Biol*. 2009;166(2).

52. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. 2004;25(13).
53. Arosio P, Knowles TPJ, Linse S. On the lag phase in amyloid fibril formation. *Phys Chem Chem Phys*. 2015;17(12).
54. Batzli KM, Love BJ. Agitation of amyloid proteins to speed aggregation measured by ThT fluorescence: A call for standardization. *Mater Sci Eng C*. 2015 Mar 1;48:359–64.
55. Michaels TCT, Šarić A, Habchi J, Chia S, Meisl G, Vendruscolo M, et al. Chemical Kinetics for Bridging Molecular Mechanisms and Macroscopic Measurements of Amyloid Fibril Formation. *Annu Rev Phys Chem*. 2018;69.
56. Morel B, Varela L, Azuaga AI, Conejero-Lara F. Environmental conditions affect the kinetics of nucleation of amyloid fibrils and determine their morphology. *Biophys J*. 2010;99(11).
57. Marek PJ, Patsalo V, Green DF, Raleigh DP. Ionic strength effects on amyloid formation by amylin are a complicated interplay among debye screening, ion selectivity, and hofmeister effects. *Biochemistry*. 2012;51(43).
58. Rodriguez Camargo DC, Tripsianes K, Buday K, Franko A, Göbl C, Hartlmüller C, et al. The redox environment triggers conformational changes and aggregation of hIAPP in Type II Diabetes. *Sci Rep*. 2017;7.
59. Supale S, Li N, Brun T, Maechler P. Mitochondrial dysfunction in pancreatic  $\beta$  cells. *Trends Endocrinol Metab*. 2012 Sep 1;23(9):477–87.
60. Giacca A, Xiao C, Oprescu AI, Carpentier AC, Lewis GF. Lipid-induced pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction: Focus on in vivo studies. Vol. 300, *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. 2011.
61. Wang C, Guan Y, Yang J. Cytokines in the Progression of Pancreatic  $\beta$ -Cell Dysfunction. *Int J Endocrinol*. 2010;2010.
62. Westermark P. Fine structure of islets of Langerhans in insular amyloidosis. *Virchows Arch Abteilung A Pathol Anat*. 1973;359(1).
63. Rivera JF, Gurlo T, Daval M, Huang CJ, Matveyenko A V, Butler PC, et al. Human-IAPP disrupts the autophagy&sol;lysosomal pathway in pancreatic  $\beta$ -cells: protective role of p62-positive cytoplasmic inclusions. *Cell Death Differ* [Internet]. 2011;18:415–26. Available from: [www.nature.com/cdd](http://www.nature.com/cdd)
64. Rivera JF, Costes S, Gurlo T, Glabe CG, Butler PC. Autophagy defends pancreatic  $\beta$  cells from Human islet amyloid polypeptide-induced toxicity. *J Clin Invest*. 2014 Aug 1;124(8):3489–500.
65. Michael DJ, Ritzel RA, Haataja L, Chow RH. Pancreatic  $\beta$ -cells secrete insulin in fast- and slow-release forms. *Diabetes*. 2006;55(3).
66. Hull RL, Zraika S, Udayasankar J, Kisilevsky R, Szarek WA, Wight TN, et al. Inhibition of glycosaminoglycan synthesis and protein glycosylation with WAS-406 and azaserine result in reduced islet amyloid formation in vitro. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2007;293(5).
67. Higham CE, Hull RL, Lawrie L, Shennan KIJ, Morris JF, Birch NP, et al. Processing of synthetic pro-islet amyloid polypeptide (proIAPP) “amylin” by recombinant prohormone

- convertase enzymes, PC2 and PC3, in vitro. *Eur J Biochem.* 2000;267(16).
68. Marzban L, Rhodes CJ, Steiner DF, Haataja L, Halban PA, Verchere CB. Impaired NH<sub>2</sub>-terminal processing of human proislet amyloid polypeptide by the prohormone convertase PC2 leads to amyloid formation and cell death. *Diabetes.* 2006;55(8).
  69. Raleigh D, Zhang X, Hastoy B, Clark A. The  $\beta$ -cell assassin: IAPP cytotoxicity. *J Mol Endocrinol.* 2017;59(3).
  70. Abedini A, Raleigh DP. The role of His-18 in amyloid formation by human islet amyloid polypeptide. *Biochemistry.* 2005;
  71. Jha S, Snell JM, Sheftic SR, Patil SM, Daniels SB, Kolling FW, et al. pH dependence of amylin fibrillization. *Biochemistry.* 2014;
  72. Nedumpully-Govindan P, Ding F. Inhibition of IAPP aggregation by insulin depends on the insulin oligomeric state regulated by zinc ion concentration. *Sci Rep.* 2015;5.
  73. Kazi TG, Afridi HI, Kazi N, Jamali MK, Arain MB, Jalbani N, et al. Copper, chromium, manganese, iron, nickel, and zinc levels in biological samples of diabetes mellitus patients. *Biol Trace Elem Res.* 2008;122(1).
  74. Chen YW, Yang CY, Huang CF, Hung DZ, Leung YM, Liu SH. Heavy metals, islet function and diabetes development. Vol. 1, *Islets.* 2009.
  75. Khan AR, Awan FR. Metals in the pathogenesis of type 2 diabetes. 2014 [cited 2022 Jan 16]; Available from: <http://www.jdmndonline.com/content/13/1/16>
  76. Poulson BG, Szczepski K, Lachowicz JI, Jaremko L, Emwas A-H, Jaremko M. Aggregation of biologically important peptides and proteins: inhibition or acceleration depending on protein and metal ion concentrations. 2020;
  77. Drago D, Bolognin S, Zatta P. Role of Metal Ions in the A $\beta$ ; Oligomerization in Alzheimers Disease and in Other Neurological Disorders. *Curr Alzheimer Res.* 2008;
  78. Hane F, Leonenko Z. Effect of metals on kinetic pathways of amyloid- $\beta$  aggregation. Vol. 4, *Biomolecules.* 2014.
  79. Bisaglia M, Tessari I, Mammi S, Bubacco L. Interaction between  $\alpha$ -synuclein and metal ions, still looking for a role in the pathogenesis of Parkinson's disease. Vol. 11, *NeuroMolecular Medicine.* 2009.
  80. Prusiner SB. Prions. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1998.
  81. Singh N, Das D, Singh A, Mohan ML. Prion protein and metal interaction: Physiological and pathological implications. Vol. 12, *Current Issues in Molecular Biology.* 2010.
  82. Brender JR, Hartman K, Nanga RPR, Popovych N, De La Salud Bea R, Vivekanandan S, et al. Role of zinc in human islet amyloid polypeptide aggregation. *J Am Chem Soc.* 2010;
  83. Rivillas-Acevedo L, Sánchez-López C, Amero C, Quintanar L. Structural basis for the inhibition of truncated islet amyloid polypeptide aggregation by Cu(II): Insights into the bioinorganic chemistry of type II diabetes. *Inorg Chem.* 2015;
  84. Aspinwall CA, Brooks SA, Kennedy RT, Lakey JRT. Effects of intravesicular H<sup>+</sup> and extracellular H<sup>+</sup> and Zn<sup>2+</sup> on insulin secretion in pancreatic beta cells. *J Biol Chem.* 1997;272(50).

85. Flores CR, Puga MP, Wrobel K, Garay Sevilla ME, Wrobel K. Trace elements status in diabetes mellitus type 2: Possible role of the interaction between molybdenum and copper in the progress of typical complications. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011;91(3).
86. Mold M, Bunrat C, Goswami P, Roberts A, Roberts C, Taylor N, et al. Further insight into the role of metals in amyloid formation by IAPP1-37 and ProlAPP1-48. *J Diabetes Res Clin Metab.* 2015;4(1).
87. Ward B, Walker K, Exley C. Copper(II) inhibits the formation of amylin amyloid in vitro. *J Inorg Biochem.* 2008;102(2).
88. Kim TD, Paik SR, Yang C-H, Kim J. Structural changes in  $\alpha$ -synuclein affect its chaperone-like activity in vitro. 2000.
89. Golts N, Snyder H, Frasier M, Theisler C, Choi P, Wolozin B. Magnesium inhibits spontaneous and iron-induced aggregation of  $\alpha$ -synuclein. *J Biol Chem.* 2002;277(18).
90. Huang Y, Wu Z, Cao Y, Lang M, Lu B, Zhou B. Zinc binding directly regulates tau toxicity independent of tau hyperphosphorylation. *Cell Rep.* 2014;8(3).
91. Voss K, Harris C, Ralle M, Duffy M, Murchison C, Quinn JF. Modulation of tau phosphorylation by environmental copper [Internet]. 2014. Available from: <http://www.translationalneurodegeneration.com/content/3/1/24>
92. Attanasio F, De Bona P, Cataldo S, Sciacca MFM, Milardi D, Pignataro B, et al. Copper(ii) and zinc(ii) dependent effects on A $\beta$ 42 aggregation: A CD, Th-T and SFM study. *New J Chem.* 2013;37(4).
93. Williams RJP. The biochemistry of zinc. *Polyhedron.* 1987;6(1).
94. Yamasaki S, Sakata-Sogawa K, Hasegawa A, Suzuki T, Kabu K, Sato E, et al. Zinc is a novel intracellular second messenger. *J Cell Biol.* 2007;177(4).
95. Ketterman JK, Li Y V. Presynaptic evidence for zinc release at the mossy fiber synapse of rat hippocampus. *J Neurosci Res.* 2008;86(2).
96. Hershinkel M, Moran A, Grossman N, Sekler I. A zinc-sensing receptor triggers the release of intracellular Ca<sup>2+</sup> and regulates ion transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(20).
97. Jansen J, Karges W, Rink L. Zinc and diabetes - clinical links and molecular mechanisms. Vol. 20, *Journal of Nutritional Biochemistry.* 2009.
98. Wijesekara N, Dai FF, Hardy AB, Giglou PR, Bhattacharjee A, Koshkin V, et al. Beta cell-specific Znt8 deletion in mice causes marked defects in insulin processing, crystallisation and secretion. *Diabetologia.* 2010;53(8).
99. Flannick J, Thorleifsson G, Beer NL, Jacobs SBR, Grarup N, Burt NP, et al. Loss-of-function mutations in SLC30A8 protect against type 2 diabetes. *Nat Genet.* 2014;46(4).
100. Naik S, Ramanand S, Ramanand J. A medley correlation of serum zinc with glycemic parameters in T2DM patients. *Indian J Endocrinol Metab.* 2019;23(2).
101. McCall KA, Huang CC, Fierke CA. Function and mechanism of zinc metalloenzymes. In: *Journal of Nutrition.* 2000.
102. Kaufman GB. *Inorganic chemistry: principles of structure and reactivity*, 4th ed. (Huheey, James E.; Keiter, Ellen A.; Keiter, Richard L.). *J Chem Educ.* 1993;70(10).
103. Gregory DS, Martin ACR, Cheetham JC, Rees AR. The prediction and characterization

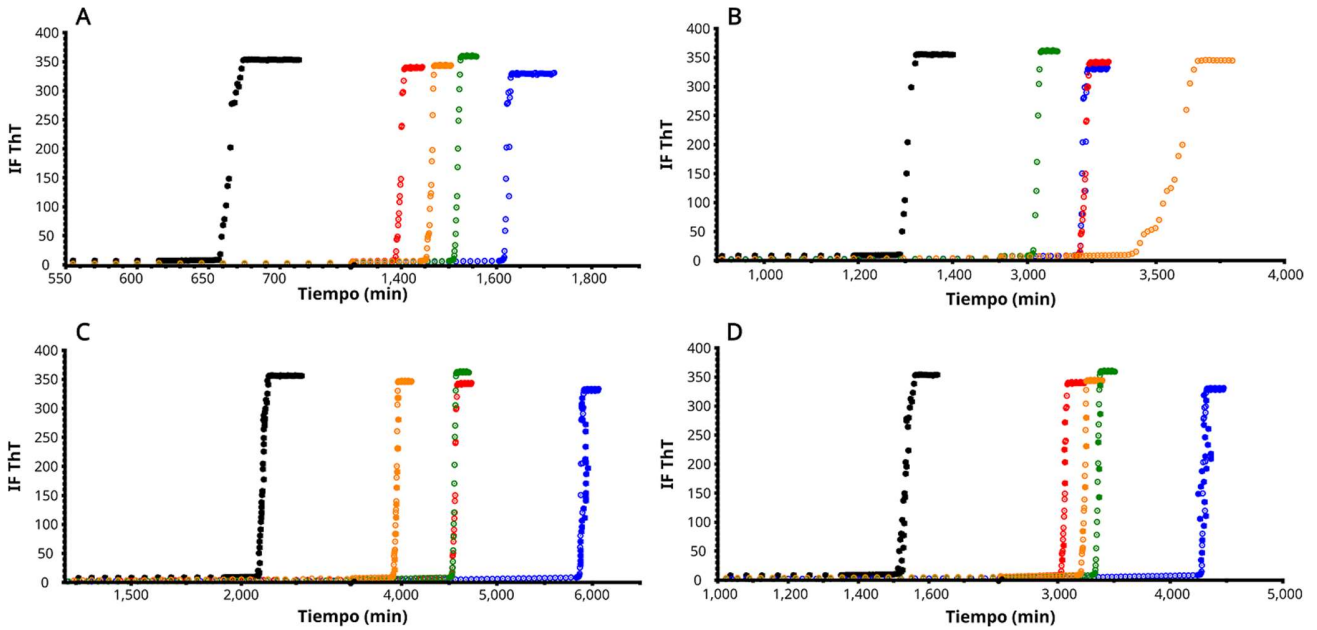
- of metal binding sites in proteins. *Protein Eng Des Sel*. 1993;6(1).
104. Nedumpully-Govindan P, Yang Y, Andorfer R, Cao W, Ding F. Promotion or Inhibition of Islet Amyloid Polypeptide Aggregation by Zinc Coordination Depends on Its Relative Concentration. *Biochemistry*. 2015;54(50).
  105. Khemtemourian L, Antoniciello F, Sahoo BR, Decossas M, Lecomte S, Ramamoorthy A. Investigation of the effects of two major secretory granules components, insulin and zinc, on human-IAPP amyloid aggregation and membrane damage. *Chem Phys Lipids*. 2021;237.
  106. Hartman K, Brender JR, Subramanian V, Youngstrom DW, Ramamoorthy A. Zinc Inhibits Human Islet Amyloid Polypeptide (IAPP) Amyloidogenesis. *Biophys J*. 2010;98(3).
  107. Koo BW, Hebda JA, Miranker AD. Amide inequivalence in the fibrillar assembly of islet amyloid polypeptide. *Protein Eng Des Sel*. 2008;21(3).
  108. Ilitchev AI, Giammona MJ, Schwarze JN, Buratto SK, Bowers MT. Zinc-Induced Conformational Transitions in Human Islet Amyloid Polypeptide and Their Role in the Inhibition of Amyloidosis. *J Phys Chem B*. 2018;
  109. Salamekh S, Brender JR, Hyung SJ, Nanga RPR, Vivekanandan S, Ruotolo BT, et al. A two-site mechanism for the inhibition of IAPP amyloidogenesis by zinc. *J Mol Biol*. 2011;
  110. Brender JR, Krishnamoorthy J, Messina GML, Deb A, Vivekanandan S, La Rosa C, et al. Zinc stabilization of prefibrillar oligomers of human islet amyloid polypeptide. *Chem Commun*. 2013;
  111. Magri A, Tabbi G, Di Natale G, La Mendola D, Pietropaolo A, Zoroddu MA, et al. Zinc Interactions with a Soluble Mutated Rat Amylin to Mimic Whole Human Amylin: An Experimental and Simulation Approach to Understand Stoichiometry, Speciation and Coordination of the Metal Complexes. *Chem - A Eur J*. 2020;
  112. Bakou M, Hille K, Kracklauer M, Spanopoulou A, Frost C V., Malideli E, et al. Key aromatic/hydrophobic amino acids controlling a cross-amyloid peptide interaction versus amyloid self-assembly. *J Biol Chem*. 2017 Sep 1;292(35):14587–602.
  113. FIELDS GB, NOBLE RL. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int J Pept Protein Res*. 1990;
  114. Stawikowski M, Fields GB. Introduction to peptide synthesis. *Curr Protoc Protein Sci*. 2012;
  115. KING DS, FIELDS CG, FIELDS GB. A cleavage method which minimizes side reactions following Fmoc solid phase peptide synthesis. *Int J Pept Protein Res*. 1990;
  116. Soria Gila ML. Síntesis y evaluación de péptidos y derivados peptídicos con aplicaciones significativas en desarrollo de fármacos, biotecnología y diagnosis [Internet]. 2016. 31–55 p. Available from: <http://hdl.handle.net/10481/48166>
  117. Indelicato S, Bongiorno D, Ceraulo L. Recent Approaches for Chemical Speciation and Analysis by Electrospray Ionization (ESI) Mass Spectrometry. Vol. 8, *Frontiers in Chemistry*. 2021.
  118. Hanwell MD, Curtis DE, Lonie DC, Vandermeersch T, Zurek E, Hutchison GR. Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform.

J Cheminform. 2012;

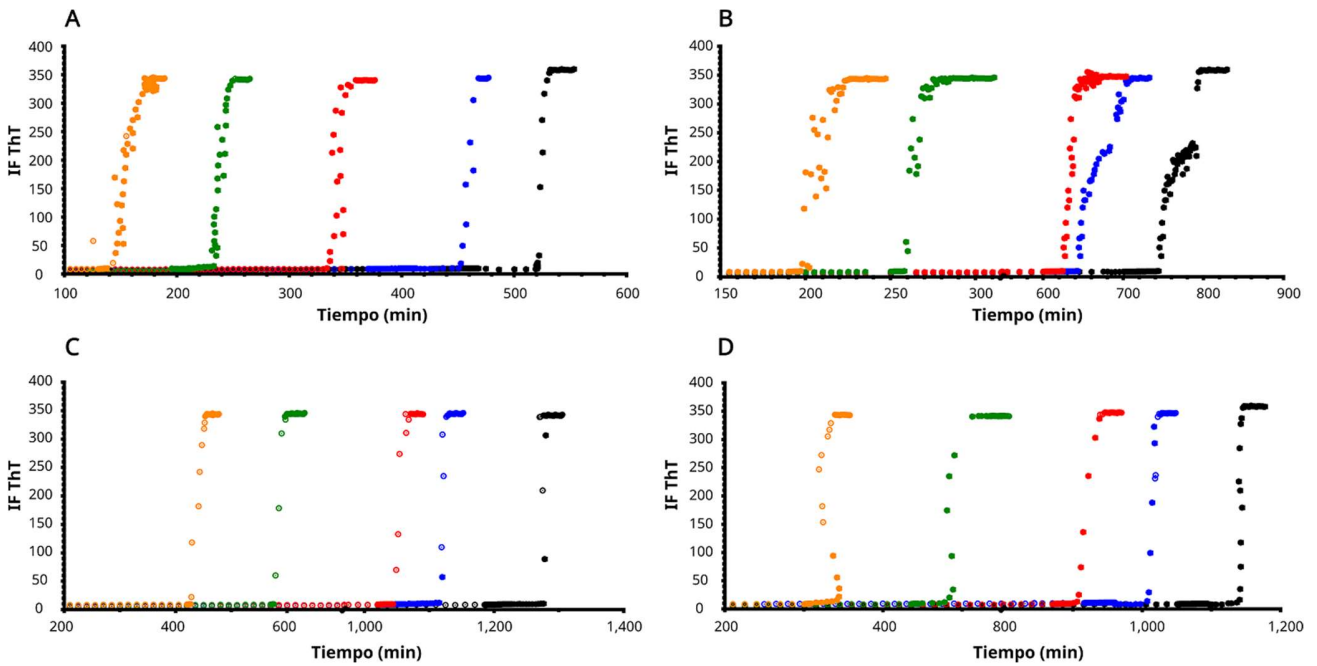
119. Zhao H, Piszczek G, Schuck P. SEDPHAT - A platform for global ITC analysis and global multi-method analysis of molecular interactions. *Methods*. 2015;76.
120. Brautigam CA, Zhao H, Vargas C, Keller S, Schuck P. Integration and global analysis of isothermal titration calorimetry data for studying macromolecular interactions. *Nat Protoc*. 2016;11(5).
121. Talmard C, Bouzan A, Faller P. Zinc binding to amyloid- $\beta$ : Isothermal titration calorimetry and Zn competition experiments with Zn sensors. *Biochemistry*. 2007;46(47).
122. Wineman-Fisher V, Miller Y. Effect of Zn<sup>2+</sup> ions on the assembly of amylin oligomers: Insight into the molecular mechanisms. *Phys Chem Chem Phys*. 2016;18(31).
123. Magrì A, Tabbì G, Di Natale G, La Mendola D, Pietropaolo A, Zoroddu MA, et al. Zinc Interactions with a Soluble Mutated Rat Amylin to Mimic Whole Human Amylin: An Experimental and Simulation Approach to Understand Stoichiometry, Speciation and Coordination of the Metal Complexes. *Chem - A Eur J*. 2020;26(57).
124. Hortschansky P, Schroeckh V, Christopeit T, Zandomenighi G, Fa'ndrich M, Fa'ndrich F. The aggregation kinetics of Alzheimer's b-amyloid peptide is controlled by stochastic nucleation. Available from: <http://www.proteinscience.org/cgi/doi/10.1110/ps.041266605>.
125. Rg Gsponer J, Haberthü U, Caflisch A. The role of side-chain interactions in the early steps of aggregation: Molecular dynamics simulations of an amyloid-forming peptide from the yeast prion Sup35 [Internet]. Vol. 100, PNAS. 2003. Available from: [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0835307100](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0835307100)
126. Luca S, Yau W-M, Leapman R, Tycko R. Peptide Conformation and Supramolecular Organization in Amylin Fibrils: Constraints from Solid State NMR NIH Public Access. *Biochemistry* [Internet]. 2007;46(47):13505–22. Available from: <http://www.acs.org>.



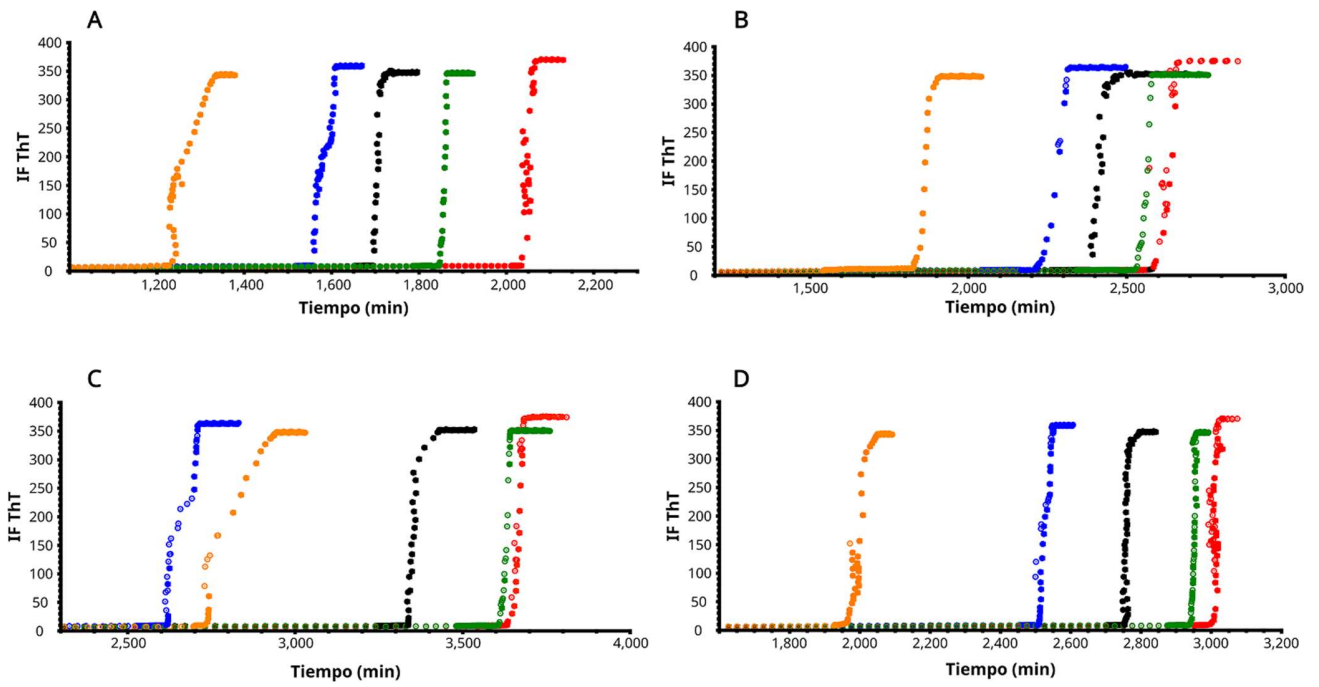
ANEXO.



FS1. Cinética de agregación del fragmento 1-29 en ausencia (negro), en presencia de 1 (azul), 2 (rojo), 3 (verde) y 4 (naranja) equivalentes de Zn(II). Los paneles corresponden a diferentes replicas



FS2. Cinética de agregación del fragmento 1-29H18A. En ausencia (negro), en presencia de 1 (azul), 2 (rojo), 3 (verde) y 4 (naranja) equivalentes de Zn(II).



FS3. Cinética de agregación del fragmento 1-29S28P. En ausencia (negro), en presencia de 1 (azul), 2 (rojo), 3 (verde) y 4 (naranja) equivalentes de Zn(II).

**DR. JEAN MICHEL GRÉVY MACQUART**  
**COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS**  
**PRESENTE**

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada: ***Estudio del efecto del Zn(II) en la agregación del polipéptido amiloide de los islotes (h-IAPP)***, que presenta la alumna **Diana Amaret Cruzalta González (10036970)** para obtener el título de **Maestro en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dra. Carmen Nina Pastor Colón CIDC-UAEM	APROBADO	
Dra. Sonia Dávila Ramos CIDC-UAEM	APROBADO	
Dra. Maripaz Marquez Quiroz D. de Farmacología, Cinvestav	APROBADO	
Dr. Ángel Enrique Peláez Aguilar IBT-UNAM	APROBADO	
Dra. Lina Andrea Rivillas Acevedo CIDC-UAEM	APROBADO	



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

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

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

### Sello electrónico

**CARMEN NINA PASTOR COLON** | Fecha:2022-05-18 09:03:38 | Firmante

k1daO2yrlj3+F9qXrvPNhmBw4VIsF/92kcQAV06YYdwUbHtPlCPuGUFiQTme1HEvsrrmqOnZj51EJjwPafMSShyGeCPKXJRHK48v7AsznsS9hhFZYJLp7W4wngZ/usszQZ5yWzNI6MrQibZEHj45tpVvMgYMaQ61TxoMvk8UqoHh2WhFr1eaP2hEorYrfeNcz8uUS6Y15ZIJ0qQUS2xHndqE5s+adJyLrPWUyS8q6tsz/GjJaO+3mQDa3t3AEq3xoE9LvFLnSxee07DIX3J/VV///jhYksnEPAwu/dtajAtZfoPHWRrPMIK5PmvskuH+m/atoGyVJi8lv5Ge8RzBb8A==

**SONIA DAVILA RAMOS** | Fecha:2022-05-18 09:57:50 | Firmante

jjzr4jZNL0UDHFS3vc/UgD32ey9sbsG4xlEabZDAyXIK85bAQ6sIPItGaBSob3JkKxpMy8Nt97+j3cRR0ULA6ckBEFtp8wO0vMfinOgsjb41X+34+bY+DyEJIOYmN060nq+JfZZx/dDYstWU3I34IY7zASwhgiFzHFdZxLvqGuwEUNHkrUozPoseMP49tdn9xtkftznQkUvUSkGEaGJGMX47VA17uxZqngNbyShj4+A0REH7jyhKr1t57WKAgzpaxU0Lc8LFJmN3JhcYLGvWHSHPyWP0iDgdW8HUZKFe+64EAhRbhISqPsDhoJ7mYgy7FFPch3ReqsuoPbeUGmQ==

**MARIPAZ MARQUEZ QUIROZ** | Fecha:2022-05-18 11:35:41 | Firmante

rafiBrJmjiK8XMCyvMMzo7Gm3tAvhzExZ7JK4stxBWq0p4KLRqrARlzpXn2Moku+EUEAAhZ0XChfn7MNEaVpJu4+BMH7nekYbQ1tMf/fBt9gQ6hkg5hvnJHAdXXHCuevWpqqwxyG186/56HR/fUUJfxCLpama8pHXBgZ/AdFlaxgdGCdzzogHPAMbFdcRIRNuSn88xMcc+ve9Yw1RBn+zd0kzaPj8oVQxTYoLdWwgyYMapdRFyVJKeCzVkam3dgpqKFYFm4iMqan1cyUPzHGO3Rim+HRUeYDOtQ0aK3svOYkiLPFqGTwx9DCXitRsePI38HqRfwwErTeTfWi9RuJiw==

**LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO** | Fecha:2022-05-18 13:31:20 | Firmante

panNPE+711p6nsRnKSpYblk9bqEXvvZpU/0gUHnk2kbV7B35XXkFuApEDI9DiR66z1wQklwrBoThiXqfFTYXtFKBeG63kmuk3TmRlo4o/XE8FROXjMYMWDkLLReuZmrGvg+IL30iQBRESCxCI2ICjUy/Lij7a71uDglWtmwiwOq1JEQSoTOXgwHqRaeZ8Xv4XxTLGxMehcArKIYydKVbSLnMRbV3k2BSTTniX5rMinLd9U6SSRETu7vaMYug+FoNSCAPEoR+5z3TwfYZFR03eQ6QadqK+FHc/STDJv9n/mWpEMBNLM3b8FIRSd3M3rm6xTL5LXqc8+wDVXYg==

**ANGEL ENRIQUE PELAEZ AGUILAR** | Fecha:2022-05-18 18:38:48 | Firmante

Pc7IF3n2+j3TGOqZTHDpS0GJrNy1tWxYbX0YVv6f1/lb0E64Ynd7iW9hwNS1hDcokHGg9jjBrgNJuwYdQWmTUzcZFz/PkmHCczr44SzTG+VLebL0bsN4bVng+6BqTnJlWZtkoB3Ih/slORmsNpC/UNkpRdPqcAhLOdp+w5s1dyYQWXRJHpiQp7FBD0U7Y5rjBupvQSH/vjbsIRPeGGRBuMCFhj2/PA67aXOkDXqErXdc+dHxoy7Dq66MpOfMdQm2yJkKcacZFKuWNODk070VC9K2THOYUDFBAL1QxTXQYG/S89+CxLeAgASBhtE7kHDwEduTmmZY/nqGaDpK3Dt+g==

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



zAh74aE9B

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/31TqdgK6la7UuuQI55ImXOhjvVDQsFyR>

