



Centro de  
Investigación en  
Dinámica Celular

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas

Centro de Investigación en Dinámica Celular

Área Terminal de Bioquímica y biología molecular

**Síntesis química de variantes de las toxinas CnERG1  
(Y17F, Q21T) y CmERG1 (F17Y, T21Q) y su efecto sobre el  
canal HERG1.**

## **TESIS**

Que presenta:

**LUZ MARÍA RICO JIMÉNEZ**

Para obtener el grado de  
LICENCIADO EN CIENCIAS ÁREA TERMINAL DE  
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Director de tesis:  
Dra. Georgina Gurrola Briones

CUERNAVACA, MORELOS.

A 3 de octubre del 2023

Comité tutelar de este proyecto:

Dra. Carmen Nina Pastor Colón UAEM (Presidente).

Dr. Ramón Antonio González García-Conde UAEM  
(Secretario).

Dra. Georgina Gurrola Briones IBT-UNAM (Vocal).

Dra. Sonia Dávila Ramos UAEM (Suplente).

Dr. Rita María Restano Cassulini IBT-UNAM (Suplente).

## **Agradecimientos**

El presente trabajo fue realizado con el apoyo del Dr. Lourival Domingos Possani Postay del departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBT-UNAM) y gracias al financiamiento de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM), número IN200323, y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) al proyecto de investigación denominado “Venenos y antivenenos”, número 303045.

Esta tesis se la dedico a mi papá, aunque no se encuentre conmigo físicamente estaría entusiasmado por verme terminar la universidad.

Al Dr. Lourival Possani por permitirme realizar el proyecto, a mis compañeros Jimena, Gustavo, Timo, Guillermo, Carmen, Polo, Ángel, Dr. Fernando, por resolverme mis dudas y escuchar mis ensayos de presentación.

Al comité tutorial por sus comentarios y sugerencias.

Mis compañeros y amigos de carrera Julieta, Lupita, Frida, Boris y Abraham por apoyarme y hacer más llevadera la carrera.

A Emilio por haberme acompañado en las desveladas y las idas a comer durante 4 años

A la Dra. Georgina Gurrola por enseñarme, tenerme paciencia, apoyarme en todo el proceso, por sus consejos y comprensión.

A Oso, Chiquisolo, Solovino, Patas cortas y Gris por darme apoyo moral.

## Resumen

La interacción entre las toxinas con los canales iónicos ha dado pie al conocimiento de la estructura y función de estos. Un canal importante que participa en el proceso de repolarización del potencial de acción cardiaco es el canal hERG1. Mutaciones en él derivan en patologías como el síndrome QT largo el cual se ve reflejado en arritmias o muerte súbita en pacientes que lo padecen. Este canal es blanco de una subfamilia de toxinas denominadas Erg toxinas, las cuales al encontrarse en contacto con el canal llevan a cabo un bloqueo del 90% aun en presencia de una concentración saturante de la toxina. Este comportamiento había sido habitual en esta subfamilia hasta que se observó que la Erg toxina (CmErg1) de *Centruroides margaritatus*, es capaz de bloquear el canal totalmente. Basándose en los estudios previos de los sitios de unión de la Erg toxina aislada de *Centruroides noxius* (CnErg1) y de acuerdo con un modelo computacional del complejo entre la toxina y el canal, se propuso que los cambios en la eficiencia del bloqueo eran debidos a los cambios de aminoácidos en las posiciones 17 y 21 de la secuencia de la toxina. Con base en estos antecedentes, se llevó a cabo la síntesis química en fase sólida de las toxinas CnErg1 (Y17F, Q21T) y CmErg1 (F17Y, T21Q) así como las pruebas electrofisiológicas de cada una para corroborar el modelo existente. Se obtuvo como resultado un bloqueo más eficiente al exponer el canal hERG1 a la toxina CnErg1 (Y17F, Q21T) mientras que al exponer el canal hERG1 a la toxina CmErg1 (F17Y, T21Q) se observó un bloqueo parcial. Nuestros resultados nos indican que, de acuerdo con lo que se predice en el modelo, las posiciones 17 y 21 son participes e importantes en la capacidad de bloqueo de las toxinas.

## Índice General

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes .....	1
1.1.2 Erg toxinas .....	2
1.1.3 Canales de potasio .....	3
1.1.4 Canales hERG1.....	3
1.1.5 CmErg1 .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
1.2 Marco teórico.....	5
1.2.1 Síntesis química en fase sólida.....	5
1.2.2 Pruebas electrofisiológicas.....	8
CAPÍTULO 2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA .....	10
2.1 Planteamiento del problema .....	10
2.2 Hipótesis.....	10
2.3 Justificación.....	10
2.4 Objetivo general.....	11
2.5 Objetivos particulares .....	11
CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA .....	12
3.1 Síntesis química en fase sólida empleando Fmoc-aminoácidos .....	12
3.1.1 Fmoc-aminoácidos .....	13
3.1.2 Formación del anhídrido simétrico .....	13
3.1.3 Cuantificación de la resina funcional .....	14
3.1.4 Desprotección .....	15
3.1.5 Acoplamiento .....	15
3.1.6 Validación de la desprotección y acoplamiento.....	16
3.1.6.1 Prueba TNBS.....	16
3.1.6.2 Prueba Kaiser .....	16
3.2 Separación del péptido de la resina.....	17
3.3 Plegamiento .....	18
3.4 Purificación del péptido plegado .....	18
3.5 Cultivos celulares.....	18
3.5.1 Preparación de medio DMEM .....	19
3.5.1.1 Medio DMEM sin suplemento .....	19
3.5.1.2 Medio DMEM suplementado.....	19
3.5.2 Preparación de PBS .....	19
3.5.3 Descongelación de célula .....	19

3.5.4 Pases celulares .....	20
3.5.5 Congelación de células .....	20
3.6 Pruebas electrofisiológicas.....	21
3.6.1 Soluciones fisiológicas.....	21
3.6.2 Preparaciones del equipo.....	22
3.6.3 <i>Patch Clamp</i> de célula unitaria.....	23
Capítulo 4. Resultados.....	25
4.1 Síntesis química de péptidos en fase sólida y purificación .....	25
4.3 Electrofisiología .....	31
CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN.....	33
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES .....	34
PERPECTIVAS .....	34
REFERENCIAS.....	35

## Abreviaturas

DCM:	Diclorometano
DIPCD:	Diisopropilcarbodimida
DIPEA:	N,N-Diisopropiletilamina
DMAP:	4-dimetilaminopiridina
DMEM:	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMF:	N,N-Dimetilformamida
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DTT:	1,4 Ditiotreitól
Fmoc:	9-fluorenilmetiloxicarbonil
HATU:	hexafluorofosfato de N,N,N ' N '-tetrametiluronio
HBTU:	N-[(1H- benzotriazol-1-il)-dimetilamino-metilen]-N-metilmetanaminio
hERG:	human Ether-a-go-go-related-gene
HOBt:	1-hidroxibenzotriazol hidratado
Kv:	Canal de potasio dependiente de voltaje
PBS:	Buffer fosfato salino
RPM:	Revoluciones por minuto
SFB:	Suero fetal bovino
TFA:	ácido trifluoroacético
TIS:	Triisopropilsilano
TNBS:	ácido 2,4,6-trinitrobencensulfónico en solución de metanol
µL:	Microlitros
nM:	Nanomol
µg:	Microgramos



## Tablas

	Descripción	Página
Tabla 1	Composición de los aminoácidos	12
Tabla 2	Información proporcionada por el fabricante para conocer las unidades de absorbancia en la cuantificación.	14
Tabla 3	Porcentajes del reactivo K	16
Tabla 4	Concentraciones de la solución plegamiento	17
Tabla 5	Concentraciones de la solución de Buffer fosfato salino	18
Tabla 6	Solución extracelular alta en potasio	20
Tabla 7	Concentraciones de la solución fisiológica extracelular de sello	21
Tabla 8	Concentraciones en la solución fisiológica intracelular K-aspartato	21

## Figuras

	Descripción	Página
Figura 1	Alineamiento de las Erg toxinas que han sido probadas en electrofisiología	3
Figura 2	Representación de la estructura y el sitio de unión de las toxinas a un canal de potasio dependiente de voltaje	3
Figura 3	Esquema general de la síntesis química de péptidos en fase sólida	6
Figura 4	Esquema general de la técnica “ <i>Patch clamp</i> ”	7
Figura 5	Protocolo de pulsos de estimulación utilizados en el <i>patch clamp</i> .	23
Figura 6	Cromatografía en fase reversa del péptido sintético CmErg1	25
Figura 7	Cromatografía en fase reversa del plegamiento del péptido sintético CmErg1	26
Figura 8	Repurificación del pico de interés del péptido sintético CmErg1	27
Figura 9	Cromatografía en fase reversa del péptido sintético CnErg1	28
Figura 10	Cromatografía en fase reversa del plegamiento del péptido sintético CnERG1	29
Figura 11	Repurificación del pico de interés del péptido sintético CnErg1	30
Figura 12	Representación de la reducción de corriente a través del canal hERG1 en presencia de distintas concentraciones de la toxina sintética CnErg1	31
Figura 13	Curva dosis-respuesta de la toxina sintética CnErg1 en las corrientes hERG1	31
Figura 14	Representación de la reducción de corriente a través del canal hERG1 en presencia de distintas concentraciones de la toxina sintética CmErg1	31
Figura 15	Curva dosis-respuesta de la toxina sintética CmErg1 en las corrientes hERG1	31

# CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Antecedentes

Los escorpiones forman parte de la fauna en gran parte del mundo. Hoy en día se tiene registro de unas 2,200 especies reconocidas, de las cuales una baja cantidad resultan nocivas para el ser humano (Ward et al., 2018).

Las especies de importancia médica pertenecen a la familia *Buthidae*, siendo el género *Centruroides* unas de las principales que habitan en México y en regiones de América del Sur. Hasta ahora este género cuenta con alrededor de 90 especies (Esposito et al., s. f.), de las cuales 24 tienen actividad tóxica en seres humanos. Por su parte, *Centruroides noxius* forma parte de estas; es una especie que habita principalmente en el estado de Nayarit (Riaño-Umbarila et al., 2017), mientras que *Centruroides margaritatus* ha sido identificado en países como Ecuador, partes de México, Colombia, Venezuela y Perú, (W.D. Sissom, 1987). A pesar de formar parte de la misma familia, no poseen el mismo grado de nocividad para los seres humanos.

El veneno es una mezcla de proteínas, péptidos, enzimas, carbohidratos, nucleótidos, lípidos y otros componentes de bajo peso molecular (Beltrán-Vidal et al., 2021). La toxicidad de los venenos de escorpión se debe principalmente a la presencia de péptidos (toxinas) que interaccionan con los canales iónicos de las células. Se han propuesto criterios para la clasificación de las toxinas, resultando en la división en familias las cuales son determinadas por el tipo de canal que poseen como blanco.

Familia 1 (NaScTx): péptidos de 60 a 70 aa unidos por 4 puentes disulfuro que modulan la actividad de los canales de sodio (Gordon et al., 1998).

Familia 2 (KScTx): compuesta por péptidos cortos (30 a 40 aa) y largos (60 a 64 aa) unidas por 3 o 4 puentes disulfuro. Su principal característica es el bloqueo de los canales de potasio (Martin-Eauclaire et al., 1999).

Familia 3 (ClScTx): cadenas cortas menores a 36 aa, y cuentan con 4 puentes disulfuro. Se sugiere que estos péptidos actúan sobre canales de cloro (DeBin et al., 1993).

Familia 4 (CaScTx): incluye péptidos que interaccionan con canales de calcio (Valdivia et al., 1992).

### 1.1.2 Erg toxinas

Dentro de las subdivisiones de la familia 2 se encuentran las Erg toxinas. Estas toman como blanco los canales de potasio dependientes de voltaje, los canales ERG (Ether-a-go-go-related-gene). La primera Erg toxina fue aislada del veneno de *C. noxius* en la década de los noventa y se le dio el nombre formal de CnErg1. Este péptido tiene una longitud de 42 aminoácidos, forma 4 puentes disulfuro y tiene un peso molecular de 4738.36 Da (Gurrola et al., 1999). Las toxinas gamma que ha sido probada su acción con pruebas electrofisiológicas del veneno total son CeErg1, CgErg1, CsErg1 y CexErg1 (Rodríguez de la Vega et al., 2003) mientras que las pruebas electrofisiológicas de las toxinas aisladas se han realizado en CmErg1 (Beltrán-Vidal et al., 2021) , CnErg1, CeErg4 (Restano-Cassulini et al., 2008) y CeErg5 (Restano-Cassulini et al., 2008) por otra parte la CtErg1 aún no tiene las lecturas necesarias para conocer el porcentaje de la corriente residual que pasa a través del canal; sin embargo, el comportamiento habitual de las Erg toxinas presentes en el veneno de otras especies de escorpión, consiste en un bloqueo del 90% del paso de los iones de potasio a través del canal (Beltrán-Vidal et al., 2021).

	10	20	30	40	Id (%)	
<i>COHLM3</i>   $\gamma$ KTx1.10   <i>CmErg1</i>	DRDSCV	DKSRCAKYGYFQ	ECTDCC	KKYGHNGGTCM	FFKCKCA	
Q86QV6   $\gamma$ KTx1.2   <i>CeErg1</i>	.....	.....Y.....	.....	.....	.....	97.6
Q86QV3   $\gamma$ KTx1.3   <i>CgERG1</i>	.....	.....HY.....	.....	.....	.....	95.2
Q86QU6   $\gamma$ KTx1.4   <i>CsErg1</i>	.....	.....Y.....	.....Q.....	.....A.....	.....	92.9
Q86Qt3   $\gamma$ KTx1.1   <i>CnErg1</i>	.....	.....S.....	.....Y.....	.....Q.....	.....NA.....	90.5
P0C892   $\gamma$ KTx1.7   <i>CeErg4</i>	.....	.....S.....	.....Y.....	.....Q.....	.....A.....	90.5
Q86QU1   $\gamma$ KTx1.6   <i>CexErg1</i>	.....	.....Y.....	.....Q.....	.....A.....	.....S.....	90.5
P0C893   $\gamma$ KTx1.8   <i>CeErg5</i>	.....	.....I.....	.....S.....	.....Y.....	.....Q.....	88.1
COHJW3   $\gamma$ KTx1.9   <i>CtErg1</i>	.....	.....I.....	.....S.....	.....Y.....	.....Q.....	85.7

Figura 1. Alineamiento de las Erg toxinas que han sido probadas en electrofisiología en amarillo se observan los residuos que forman los 4 puentes disulfuro mientras que en rosa las posiciones que se ha determinado son importantes para la unión de la toxina con el canal por parte de CnErg1 (Beltrán-Vidal et al., 2021).

### 1.1.3 Canales de potasio

Los canales iónicos son proteínas transmembranales las cuales permiten el paso de moléculas específicas a través de ellos. Los canales de potasio son una super familia selectiva de iones potasio, en su mayoría conformados por tetrámeros transmembranales comprendidos por 6 segmentos cada uno (Zhao et al., 2019), cuyos extremos N-terminal y C-terminal se encuentran situados de manera intracelular. La activación de este tipo de canales puede ser dependiente del ligando que se les une o del voltaje de la membrana celular (Capera et al., 2019). Particularmente los canales dependientes de voltaje (Kv) se encuentran abiertos durante la despolarización de la membrana (Christie, 1995) y son blanco de toxinas presentes en el veneno de algunos artrópodos.

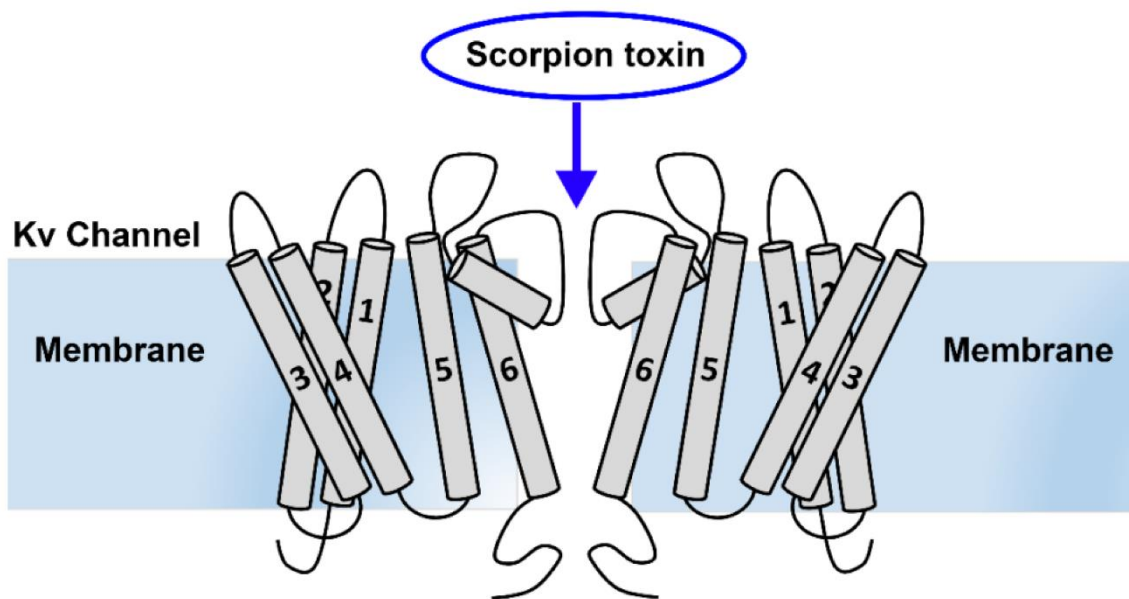


Figura 2 Representación de la estructura y el sitio de unión de las toxinas a un canal de potasio dependiente de voltaje (Zhao et al., 2019).

### 1.1.4 Canales hERG1

En los canales de potasio dependientes de voltaje (Kv) se encuentran los canales *Ether-a-go-go-related gene*; estos cuentan con una estructura característica debido a que cuentan con los 4 tetrámeros de 6 segmentos transmembranales y una torreta en forma de petunia (Zhao et al., 2019). Estos canales se encuentran expresados en

distintos tipos celulares como cerebrales, cardiacos y otros tejidos (Jiménez-Vargas et al., 2017). Juegan un papel fundamental durante el proceso de repolarización durante el potencial de acción cardíaco, mutaciones en estos canales dan pie a síndromes como el síndrome QT largo el cual se define como un trastorno hereditario o adquirido en el que la repolarización ventricular predispone a los pacientes a sufrir arritmias y en algunos casos muerte súbita (Sanguinetti, 2014), lo que los vuelve de interés médico. Este canal es blanco de toxinas de escorpión pertenecientes a la subfamilia de potasio gamma o Erg toxinas (Corona et al., 2002).

### **1.1.5 CmErg1**

Recientemente se ha caracterizado el veneno de *C. margaritatus* y se determinó la presencia de un péptido con actividad tóxica que toma como blanco canales de potasio hERG1. Se reportó que posee una longitud de 42 aminoácidos, forma 4 puentes disulfuro y tiene un peso molecular de 4801.51 Da. Por su similitud en secuencia se afirma ser el miembro número 10 de las Erg toxinas. Al llevar a cabo pruebas electrofisiológicas con células que expresan el canal hERG1 se determinó su capacidad de bloquear completamente al canal, debido a que la unión toxina-canal resulta más estable.

Al hacer el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las toxinas CmErg1 y CnErg1, se determinó que hay un 90.55 % de identidad de secuencia entre ellas (Beltrán-Vidal et al., 2021).

Beltrán-Vidal y colaboradores sugieren que el distinto tipo de bloqueo sobre el canal es consecuencia de la diferencia en las posiciones 17, 21, 26 y 27. Por ensayos de acoplamiento se descartó que los residuos de las posiciones 26 y 27 interactúen con el canal (Beltrán-Vidal et al., 2021). Por lo tanto, se propone que al llevar a cabo las mutaciones específicas en F17Y y Q21T, éstas inducirán la eliminación del bloqueo total de hERG1 por parte CmErg1, mientras que al realizar mutaciones recíprocas en los aminoácidos Y17F y T21Q en CnErg1, se inducirá un bloqueo completo en hERG1 (Beltrán-Vidal et al., 2021).

## 1.2 Marco teórico

### 1.2.1 Síntesis química en fase sólida

Llevar a cabo la síntesis química de péptidos en el laboratorio era un proceso que implicaba el uso de una amplia variedad de soluciones, además de que sintetizar cadenas largas de aminoácidos resultaba poco eficiente debido a la pobre solubilidad y purificación del péptido resultante. Sin embargo, en la década de los 60's, Bruce Merrifield cambió la manera de sintetizar péptidos al implementar una nueva metodología donde utilizó un soporte sólido, el cual cuenta con una molécula enlazante a la que se ancla la cadena peptídica. Esta técnica lleva el nombre de Síntesis de Péptidos en Fase Sólida (SPPS). En 1984, Bruce Merrifield recibió el premio Nobel por sintetizar el tetrapéptido Leucilalanilglicialanina (Merrifield, 1963). La SPPS se lleva a cabo mediante la elongación de la cadena peptídica del extremo C-terminal al N-terminal (de manera contraria a como se lleva a cabo la síntesis de un péptido en el ribosoma). Los aminoácidos se encuentran protegidos en su posición  $\alpha$ -amino y cadenas laterales, evitando así reacciones no deseadas. Por otro lado, los grupos protectores son retirados al final de la síntesis mediante el rompimiento del enlace entre el grupo protector y el aminoácido con reactivos que no dañen la integridad del péptido. Los excesos de reactivos y grupos protectores libres son eliminados mediante un proceso de lavado y filtrado.

El primer paso es el enlace entre el primer aminoácido que se encuentra en el extremo C-terminal y el soporte (resina) de poliestireno. Posteriormente se hace la desprotección, en la que se retirará el grupo protector 9-fluorenilmetiloxycarbonil (Fmoc) del extremo N-terminal de aminoácido ya acoplado con una base; en este caso es una solución de piperidina al 20% en N,N-Dimetilformamida (DMF). El exceso de Fmoc que ahora se encuentra en la solución se retira mediante lavados de la resina con DMF con una duración de un minuto con agitación manual (Mitscher, 2001). Una vez libre el extremo N-terminal; se activará el extremo carboxilo del siguiente aminoácido con N,N-Diisopropiletilamina (DIPEA), N-[(1H-benzotriazol-1-il)-dimetilamino-metilen]-N-metilmetanaminio (HBTU) y 1-hidroxibenzotriazol hidratado (HOBt), este último utilizado para evitar la racemización por parte de los aminoácido y la formación de subproductos. El

aminoácido siguiente es añadido al reactor donde se encuentra la resina y el primer aminoácido para así formar un enlace peptídico, obteniendo como resultado una cadena con dos aminoácidos (Stawikowski & Fields, 2012). En este momento se repite la ruptura del enlace entre el protector Fmoc con el extremo amino del dipéptido; este ciclo se repite hasta completar la unión de todos los aminoácidos deseados.

Entre cada desprotección y acoplamiento se deben realizar pruebas cualitativas las cuales nos indican si se llevó a cabo completamente la remoción del grupo Fmoc o el enlace peptídico entre el nuevo aminoácido y el que ya se encuentra en la cadena. La prueba Kaiser consiste en la reacción de ninhidrina con aminas primarias en presencia de calor; dando como resultado la coloración azul por parte de la solución si la reacción es llevada a cabo (extremo amino libre). De manera contraria al no reaccionar no se observa ninguna coloración en la resina y se obtiene una solución amarillenta (extremo amino con el grupo Fmoc) (Kaiser et al., 1970).

La prueba del ácido 2,4,6-trinitrobencensulfónico en solución de metanol (TNBS) es característica de una coloración roja por parte de la resina cuando el extremo amino se encuentra libre y transparente si está protegido con el grupo Fmoc.

Al no obtenerse el resultado esperado se puede repetir el procedimiento de desprotección o acoplamiento según sea el caso, las veces necesarias para obtener una mayor eficiencia de la síntesis del péptido.



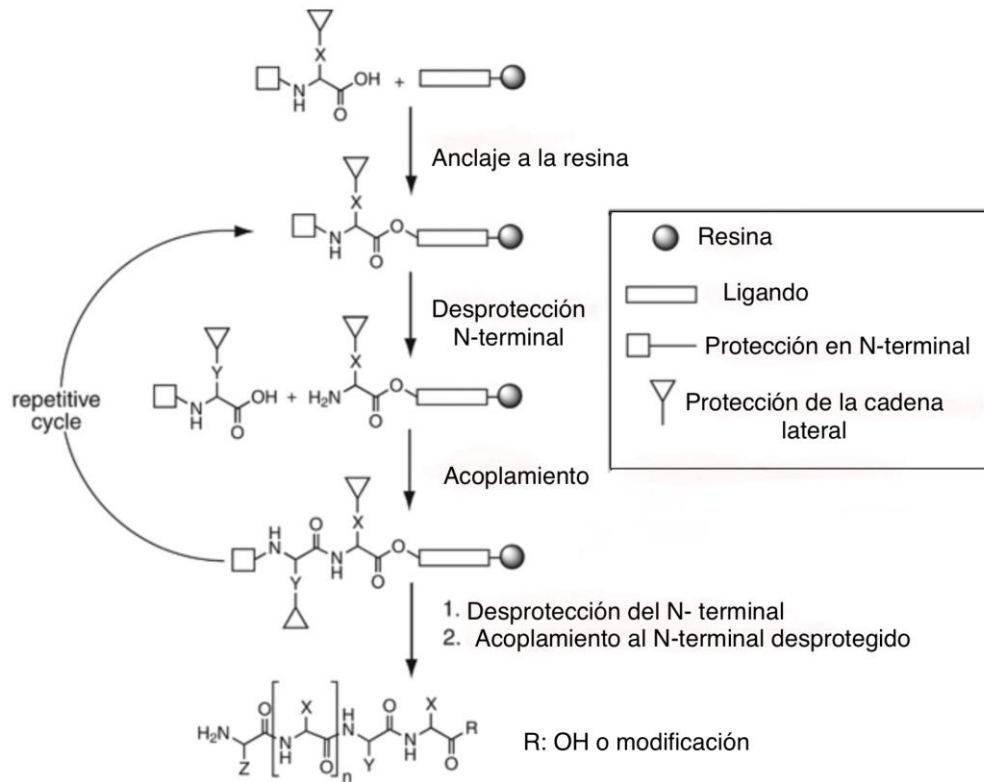


Figura 3. Esquema general de la síntesis química de péptidos en fase sólida. Modificada de (Stawikowski & Fields, 2012).

### 1.2.2 Pruebas electrofisiológicas

El flujo de iones a través de la membrana celular ha sido de interés en los últimos años por lo que para medir la corriente a través de los mismos se desarrolló una técnica nombrada “*Patch Clamp*”, en la que empleando micropipetas para realizar pequeños parches en la superficie celular se observa y mide el comportamiento de un canal iónico (Kornreich, 2007).

El *Patch Clamp* consiste en utilizar una pipeta de vidrio para aproximarse a una célula que se encuentra adherida a una base y mediante presión negativa se forma un sello con la membrana celular. Se hace pasar voltaje y se realiza el registro del flujo de iones (Bell & Dallas, 2018).

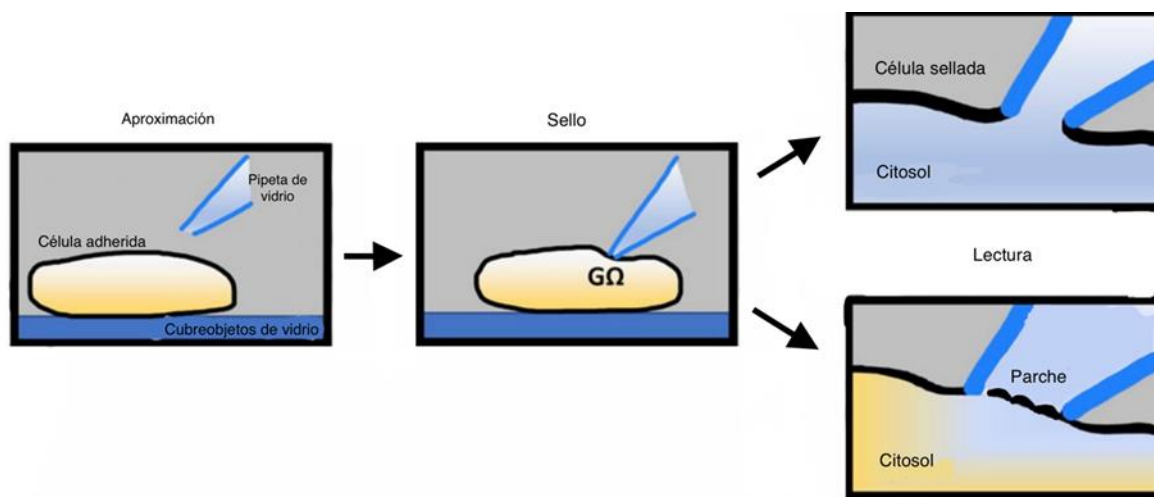


Figura 4. Esquema general de la técnica “*Patch clamp*”, donde se representa el proceso de aproximación y sello además de la configuración de parche perforado y célula sellada. Modificada de (Bell & Dallas, 2018)

La formación del parche célula-micropipeta es dependiente del tipo de datos que se desean obtener, siendo los descritos a continuación los más notables.

- *Cell-attached*: El electrodo se sella herméticamente al parche de la membrana y la célula permanece intacta (Yajuan et al., 2012)
- *Outside-out*: Se forma la configuración “whole cell” y el electrodo se retira lentamente de la célula, lo que permite que el exterior original de la membrana gire su centro y se forme el parche (Yajuan et al., 2012).
- *Inside-out*: Después de formar el sello de  $G\Omega$  la pipeta se retira rápidamente de la célula, formando un parche de membrana que se encuentra adherido a la micropipeta, exponiendo la superficie intracelular de la membrana al medio (Yajuan et al., 2012).
- Parche perforado: Se emplean agentes perforantes de membrana, preferentemente moléculas pequeñas o antibióticos, para generar un solo sistema con la pipeta (Bell & Dallas, 2018).
- Célula completa o sellada: se añade presión negativa adicional para romper la membrana y así con la solución contenida en la membrana formar un solo sistema que comparte características eléctricas y químicas (Bell & Dallas, 2018).

## **CAPÍTULO 2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA**

### **2.1 Planteamiento del problema**

Los modelos computacionales de interacción entre proteínas se han vuelto cada vez más comunes para profundizar en la relación estructura-función. Las técnicas como el modelado molecular abren la posibilidad de observar enlaces y energías entre ligandos y proteínas de moléculas que no existen en la naturaleza. Sin embargo, se deben utilizar técnicas experimentales para validar el comportamiento de estos modelos, así como corroborar si cumplen las aseveraciones que se han hecho con base en ellas.

### **2.2 Hipótesis**

Modificando la toxina CmErg1 mediante el cambio en los aminoácidos, Fenilalanina 17 por Tirosina y Treonina 21 por Glutamina se observará un bloqueo parcial del canal hERG1 mientras que al modificar la toxina CnErg1 cambiando Tirosina 17 por Fenilalanina y Glutamina 21 por Treonina se observará un bloqueo total del canal hERG1.

### **2.3 Justificación**

Los canales de potasio *Ether-a-go-go-Related-Gene* (ERG) son expresados en distintas líneas celulares. Particularmente, en seres humanos se encuentra en células cardíacas. El canal hERG1 es participe en el proceso de repolarización durante el potencial de acción cardíaco, mutaciones en este canal representan patologías como el síndrome de QT largo, el cual se caracteriza por arritmias cardíacas. Además, es blanco específico de toxinas presentes en el veneno de escorpiones, las cuales, al unirse con él, alteran el flujo de iones resultando en insuficiencias cardíacas o arritmias.

## **2.4 Objetivo general**

Comprobar de forma experimental la interacción de las variantes de las toxinas CmErg1 y CnErg1 con el canal hERG1 mediante pruebas electrofisiológicas.

## **2.5 Objetivos particulares**

- Sintetizar las toxinas CmErg1 (F17Y, T21Q) y CnErg1 (Y17F, Q21T).
- Probar la acción de las toxinas en el canal hERG1 mediante pruebas electrofisiológicas.

## CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA

### 3.1 Síntesis química en fase sólida empleando Fmoc-aminoácidos

La toxina CmErg1 (F17Y, T21Q) consta de 4 puentes disulfuro y está compuesta por los siguientes 42 aminoácidos:

- Asp-Arg-Asp-Ser-Cys-Val-Asp-Lys-Ser-Arg-Cys-Ala-Lys-Tyr-Gly-Tyr-Tyr-Gln-Glu-Cys-Gln-Asp-Cys-Cys-Lys-Lys-Tyr-Gly-His-Asn-Gly-Gly-Thr-Cys-Met-Phe-Phe-Lys-Cys-Lys-Cys-Ala, con un peso molecular de 4844.53 Da.

La toxina CnErg1 (Y17F, Q21T) está compuesta por los siguientes 42 aminoácidos

- Asp-Arg-Asp-Ser-Cis-Val-Asp-Lys-Ser-Arg-Cys-Ala-Lys-Tyr-Gly-Tyr-Phe-Gln-Glu-Cys-Thr-Asp-Cys-Cys-Lys-Asn-Ala-Gly-His-Asn-Gly-Gly-Thr-Cys-Met-Phe-Phe-Lys-Cys-Lys-Cys-Ala; posee un peso molecular de 4695.34 Da.

La síntesis se llevó a cabo en un reactor previamente silanizado en una mezcla de Sulfacil 10% en tolueno para evitar que la porosidad de las paredes de vidrio retenga pequeñas cantidades de resina. Se utilizó como fase sólida la resina NovaSyn TG<sup>R</sup> HMP (NovaBiochem) la cual es ideal para la síntesis de péptidos largos; cuenta con un valor de sustitución de 0.18 mmol. Esperando obtener 200 mg de péptido, equivalente a 0.042 mmol (0.042 mmol = 1 equivalente) se pesaron 233 mg de resina, los cuales fueron depositados en un reactor.

### 3.1.1 Fmoc-aminoácidos

Los siguientes aminoácidos fueron utilizados en la síntesis de las toxinas CmErg1 y CnErg1:

Nombre	Peso molecular
N-Fmoc-N-alanine	311.3
Fmoc-L-Asn(Trt)-OH	569.7
Fmoc-Arg-(Pbf)-OH	648.4
Fmoc-Asp-(OtBu)-OH	411.5
Fmoc-Cys-(Trt)-OH	585.7
Fmoc-Gly-OH	297.3
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	425.5
Fmoc-Gln(Trt)-OH	610
Fmoc-His(Trt)-OH	619.7
Fmoc-Lys(Bec)-OH	468.6
Fmoc-L-Met-OH	371.5
Fmoc-Tyr(Tbu)-OH	459.6
Fmoc-Thr(Tbu)-OH	397.5
Fmoc-Phe-OH	387.4
Fmoc-Ser(Tbu)-OH	383.4
Fmoc-Val-OH	339.4

**Tabla 1.** Composición de los aminoácidos, el grupo Fmoc se encuentra en el extremo amino mientras que los grupos de las cadenas laterales se encuentran entre paréntesis.

### 3.1.2 Formación del anhídrido simétrico

Los 233 mg de resina que se encuentran en el reactor fueron solvatados durante 2 días en N,N-Dimetilformamida (DMF) a temperatura ambiente.

Se llevó a cabo la formación del anhídrido simétrico del primer residuo de aminoácido (Fmoc-N-alanina), con un exceso de 10 veces respecto a la capacidad de la resina. Para esto, se pesaron 131 mg del aminoácido. Se disolvió en un mínimo volumen de diclorometano (DCM) y 2 gotas de DMF para completar la solubilización. Se dejó en agitación por 5 minutos y se añadieron 5 equivalentes de

Diisopropilcarbodimida (DIPCDI) (33  $\mu$ L) se continuó la agitación a 0° C durante 30 minutos, evitando la formación de precipitado con ayuda de la adición gotas de DMF.

Se evaporó el DCM, posteriormente se añadió DMF al residuo sólido para solubilizarlo y este se adicionó a la resina previamente solvatada. Se agitó durante un minuto y posteriormente se añadieron al reactor 5.3 mg de 4-dimetilaminopiridina (DMPA) disuelta en DMF. Posteriormente, el reactor se somete a agitación por inversión a temperatura ambiente durante 1 hora.

Se realizaron lavados con 1 minuto de duración a la resina para eliminar el exceso de reactivos: 10 lavados con DMF, 3 lavados con DCM y 3 con metanol. Finalmente, se secó la resina durante 10 minutos en vacío.

### **3.1.3 Cuantificación de la resina funcional**

La cuantificación de Fmoc-aminoácidos acoplados requirió de la toma de un par de alícuotas de resina seca, las cuales fueron debidamente pesadas (1.5 mg y 2.4 mg). A ambas se les añadieron 3 mL de piperidina al 20% y se agitaron suavemente durante 3 minutos.

Se preparó un blanco que contenía piperidina al 20% en DMF. La absorbancia fue medida en un espectrofotómetro *Genesys 10S UV-Vis* a una longitud de onda de 290 nm. Obteniendo así lecturas de 0.405 nm para 1.5 mg de resina y 0.692 nm para 2.4 mg.

La funcionalización en mmol/g se calculó empleando la fórmula *Fmoc acoplado*:  $\text{mmol/g} = \mu\text{g mol F-moc} / \text{mg de resina}$ , y la tabla de referencia, proporcionada por el fabricante de la resina. El promedio de ambos valores aplicados a la fórmula, se obtuvieron 0.040 mmol/g de resina.



Fmoc umol	Absorbancia (A)	Fmoc umol	Absorbancia (A)
0.1	0.165	0.6	0.990
0.2	0.330	0.7	1.155
0.3	0.495	0.8	1.320
0.4	0.660	0.9	1.485
0.5	0.825	1.0	1.650

Tabla 2. Información proporcionada por el fabricante para conocer las unidades de absorbancia en la cuantificación.

### 3.1.4 Desprotección

Llevar a cabo la desprotección del grupo alfa-amino requiere la adición de 2.1 ml de la solución piperidina al 20% en DMF al reactor donde se contiene la resina y permanece en agitación por inmersión por 3 minutos. Se filtró el reactivo excedente por medio de vacío. Una vez seca la resina, se añadieron 2.1 ml al reactor de la misma solución y permaneció en agitación por 20 minutos. Al finalizar ambos ciclos la resina fue lavada 10 veces en DMF durante 1 minuto, filtrando impurezas entre cada lavado, con el fin de eliminar los grupos protectores y subproductos de reacción.

### 3.1.5 Acoplamiento

Para el acoplamiento se utilizaron los siguientes reactivos:

Fmoc-aminoácido:HBTU:HOBt:DIPEA en la proporción 1:0.9:0.9:2.1 con un exceso de 3 veces con respecto a la proporción antes mencionada. En un vial se pesaron los equivalentes de Fmoc-aminoácido, HBTU, HOBt y se disolvieron en 0.7 mL de DMF. Posteriormente, se añadió el equivalente de DIPEA al vial donde se agita durante 1 minuto. Para homogeneizar la solución se añadió una mínima cantidad de DMF y se vertió al reactor. Finalmente se realizó un lavado del vial con 1 mL del DMF. Para evitar la pérdida de reactivos, el excedente de DMF se añadió al reactor. Se agitó por inversión a temperatura ambiente de 30 minutos a 2 horas.

### **3.1.6 Validación de la desprotección y acoplamiento**

Al terminar un ciclo de desprotección o acoplamiento se llevó a cabo una prueba colorimétrica para observar la eficacia con la que se completó el ciclo. Un resultado positivo indica que el extremo N-terminal se encontraba sin grupo protector, mientras que el resultado negativo demuestra la existencia de un grupo protector en el extremo N-terminal.

#### **3.1.6.1 Prueba TNBS**

Esta prueba se necesitan 2 soluciones (se preparan 100 uL de cada una para evitar la volatilización de los reactivos que la componen y así evitar falsos negativos)

- 10 % de DIPEA en DMF
- 1% TNBS en DMF.

Se tomó alrededor de 0.5 mg de resina con la punta de una espátula y se deposita en un tubo de ensayo donde se añadió una gota de cada solución. Después de 5 minutos de reacción a temperatura ambiente se lavó el exceso de reactivos con DMF para que sea posible observar al microscopio el resultado.

Una coloración rojiza en la resina indica un resultado positivo mientras que la resina incolora indica un resultado negativo.

#### **3.1.6.2 Prueba Kaiser**

Las soluciones que se requieren para esta prueba son las siguientes:

- Kaiser 1: 5 g de ninhidrina en 100 mL de etanol.
- Kaiser 2: 80 g de fenol en 20 mL de etanol.
- Kaiser 3: 2 mL de solución acuosa 0.001 M de cianuro de potasio a 98 mL de piridina.

Se tomó alrededor de 0.5 mg con la punta de una espátula y se depositó en un tubo de ensayo donde se añadió una gota de cada solución. La reacción se llevó a cabo a 120°C por 3 minutos. Una coloración azul intenso indica un resultado positivo, mientras que una coloración amarilla indica un resultado negativo.

### 3.2 Separación del péptido de la resina

Terminada la síntesis se llevó a cabo la separación del péptido de la resina. Previo a este proceso se rompió el enlace del grupo protector Fmoc dejando libre el extremo N-terminal y se secó al vacío en un concentrador *Savant SpeedVac* durante 2 horas para eliminar restos de solventes que se utilizaron (DMF, DCM o metanol) durante la síntesis.

Se preparó 10 mL de “reactivo K” el cual es una solución porcentual que consta de los siguientes reactivos:

Reactivo	Porcentaje en la solución
TFA	83
DTT	1
H <sub>2</sub> O	5
FENOL	5
TIS	1
Tioanizol	5

Tabla 3. Porcentajes del reactivo K

Cuando la mezcla homogenizó se vertió dentro del reactor donde se encontraba la resina seca. Se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 2 horas.

El contenido del reactor se dejó caer por goteo en un matraz que contenía 100 mL de metil-terbutil-éter, manteniendo la solución a 0°C. Se dejó precipitar durante 45 minutos.

Se agitó el precipitado y centrifugó durante 15 minutos a 3,500 rpm a una temperatura de 4°C. El sobrenadante fue decantado en un matraz etiquetado. La pastilla se puso en el vortex por 30 segundos para repetir el proceso hasta que se terminó la solución donde se encontraba el precipitado. El precipitado se lavó 3 veces con metil-terbutil-éter, repitiendo la centrifugación. La pastilla fue disuelta en ácido acético al 20% evitando la formación de burbujas. El péptido disuelto se depositó en 2 viales previamente pesados los cuales fueron congelados en un baño de hielo seco con acetona (-70°C) para posteriormente ser liofilizados durante 24 horas.

### 3.3 Plegamiento

Se prepararon 15 mL de solución de plegamiento con los siguientes reactivos en las concentraciones indicadas, disolviéndolos en un vial que contenía 13 mL de H<sub>2</sub>O tetradestrilada:

Reactivo	Concentración
Fosfato de sodio Dibásico Anhidrido	20 mM
Cloruro de sodio	0.1 M
L-Cistina	0.5 mM
L-Cisteína	5 mM

Tabla 4. Concentraciones de la solución plegamiento

Se tomaron 2.3 mg del péptido liofilizado y se disolvieron en 1 mL de H<sub>2</sub>O tetradestrilada para verterlo en la solución de plegamiento. Con el mililitro restante de H<sub>2</sub>O se lavó el vial del péptido disuelto, evitando así la pérdida de este. La reacción se llevó a cabo durante 1 hora y 45 minutos a temperatura ambiente.

### 3.4 Purificación del péptido plegado

Se añadieron 7 µL de HCl 6 M por cada mililitro de la solución que contenía el péptido plegado para detener la reacción de plegamiento. Se purificó en el HPLC usando una columna analítica C4 (marca Vydac) de 4.6 x 250mm con un tamaño de partícula de 0.5 micrómetros utilizando un gradiente de 0 a 60% de la solución B en 60 minutos.

Solución A: H<sub>2</sub>O + 0.12% de TFA

Solución B: acetonitrilo + 0.1% de TFA

### 3.5 Cultivos celulares

Se utilizaron células de Ovario de Hámster Chino (CHO) previamente transfectadas con el gen pcDNA3.1-hERG1, las cuales expresan de manera estable el canal hERG1. La manipulación de las células se realizó en condiciones de esterilidad utilizando una campana de flujo laminar horizontal.

### 3.5.1 Preparación de medio DMEM

#### 3.5.1.1 Medio DMEM sin suplemento

Para la preparación de 1L se utilizó medio en polvo *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (marca Gíbcó) al cual por indicaciones del fabricante se le añadieron 3.7 g de bicarbonato de sodio. Se ajustó el pH a 7 y se esterilizó haciéndolo pasar por un filtro de membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ . La conservación del medio se realiza a 4 °C.

#### 3.5.1.2 Medio DMEM suplementado

Se preparó una solución porcentual con 89% de medio sin suplemento previamente preparado, con 10% de SFB y 1 % de Geneticina (G418).

### 3.5.2 Preparación de PBS

Se prepararon 500 ml de la solución de Buffer fosfato salino a un pH 7.4

Reactivo	Concentración
Cloruro de sodio	137 mM
Cloruro de potasio	2.7 mM
Fosfato de sodio monobásico	10 mM
Fosfato de sodio dibásico	1.8 mM

Tabla 5. Concentraciones de la solución de Buffer fosfato salino

### 3.5.3 Descongelación de células

Las líneas celulares requieren temperaturas bajas por lo que su conservación se lleva a cabo en tanques de acero inoxidable donde se introduce nitrógeno líquido. La organización dentro de los tanques consiste en contenedores de 1.5 mL llamados crioviales, los cuales son capaces de soportar bajas temperaturas y garantizan la seguridad de las células que contengan. Del tanque de nitrógeno se tomó el criovial

que contiene las células CHO-hERG1. Posteriormente la parte inferior del criovial fue sumergida en agua a 37 °C durante 2 minutos. Las células del criovial se transfirieron en un tubo Falcon con 5 mL de medio DMEM sin suplementar y centrifugaron durante 3 minutos a 500 rpm. El sobrenadante obtenido fue descartado mientras que el pellet celular se resuspendió con 1 mL de medio DMEM suplementado. En una caja Petri de 100 mm x 20 mm se adicionaron 15 mL de medio DMEM suplementado, al igual que el pellet celular resuspendido para posteriormente incubar a 37 °C con un 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **3.5.4 Pases celulares**

Se observaron las células al microscopio para evaluar su confluencia y viabilidad. Se retiró el medio en el que se encontraban por medio de vacío, y posteriormente se le añadieron 4 mL de PBS para realizar un lavado de las células durante un minuto. El PBS fue desechado. Para despegar las células que se encontraban adheridas a las cajas se les adicionaron 500 µL de Tryple/tripsina e incubaron a 37 °C con un 5% de CO<sub>2</sub> durante 4 minutos. Posteriormente se etiquetó una caja nueva con los siguientes datos: dilución/fecha/células CHO-hHERG1. Se agregó 1mL de medio DMEM y se tomó la cantidad necesaria para dilución del pase siguiente (la dilución se determinó por la cantidad de células que se observaron en el microscopio con la finalidad de reducir la confluencia). A la caja etiquetada se le añadieron 4 mL de medio DMEM y la cantidad de células para la dilución.

#### **3.5.5 Congelación de células**

Las células se crecieron en cajas Petri de 100 mm x 20 mm para tener un mayor contenido celular. Cada una de las cajas se lavaron con 5 mL de PBS. Posteriormente, se les añadieron 500 uL de Tryple/tripsina e incubaron a 37 °C con un 5% de CO<sub>2</sub>; esto para despegar las células que se encuentran adheridas a la caja. Después de 4 minutos se observó la cantidad de células que se encontraban despegadas en el microscopio. El contenido celular despegado se depositó en un tubo Falcon el cual se centrifugó a 500 rpm durante 3 minutos. Se descartó el

sobrenadante con una pipeta Pasteur, mientras que el pellet celular fue resuspendido en medio de congelamiento (SFB con un 10% de DMSO); esta mezcla se introdujo en crioviales etiquetados con los siguientes datos: Células CHO hERG1/ # de pase/ fecha de congelación. La temperatura de los crioviales descendió gradualmente (1 °C/ min) hasta llegar a los -80 °C para posteriormente ser introducidos en nitrógeno líquido.

### 3.6 Pruebas electrofisiológicas

La acción de las toxinas sintetizadas y purificadas fue corroborada con la técnica de fijación en parche de membrana (patch-clamp), la cual es una versátil herramienta electrofisiológica para entender el comportamiento de canales iónicos.

#### 3.6.1 Soluciones fisiológicas

Se prepararon 500 mL de la solución fisiológica extracelular alta en potasio y se le ajustó el pH a 7.29

Reactivo	Concentración mM
NaCl	95
KCl	40
CaCl <sub>2</sub>	2
MgCl <sub>2</sub>	2
Hepes	10
Glucosa	5

Tabla 6. Solución extracelular alta en potasio

Se prepararon 500 mL de la solución fisiológica extracelular de sello a un pH de 7.29

Reactivo	Concentración mM
NaCl	130
KCl	5
CaCl <sub>2</sub>	2
MgCl <sub>2</sub>	2
Hepes	10
Glucosa	5

Tabla 7. Concentraciones de la solución fisiológica extracelular de sello

Se prepararon 50 mL de la solución fisiológica intracelular K-aspartato

Reactivo	Concentración mM
NaCl	10
MgCl <sub>2</sub>	2
Hepes	10
K-aspartato	130
EGTA	10
Mg-ATP	1

Tabla 8. Concentraciones en la solución fisiológica intracelular K-aspartato

### 3.6.2 Preparaciones del equipo

Las soluciones se distribuyeron por medio de una bomba (marca razel) que permite un flujo constante de elección, en el caso específico de las pruebas se fijó a 1  $\mu$ L/s. La bomba es conectada a 7 líneas de perfusión en las que se cargó la toxina a distintas concentraciones, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM y 1  $\mu$ M y las dos soluciones fisiológicas (Extracelular de sello y Extracelular alta en potasio). Las micropipetas se fabricaron a partir de capilares de borosilicato con un diámetro externo de 1.2 mm e interno de 0.94 mm, utilizando un *puller* modelo P-30 de Sutter Instrument CO. Una vez llenada con la solución intracelular K-aspartato se fijó sobre el cabezal del electrodo.



### 3.6.3 *Patch Clamp* de célula unitaria

Con un día de anticipación las células CHO-hErg1 se transfirieron a cajas de 35 mm, evitando la formación de conglomerados mediante pipeteo para propiciar la presencia de células individuales. Se depositaron en el soporte del microscopio, donde se elige la célula a medir y con una pipeta llena de solución fisiológica intracelular K-aspartato, se hizo la aproximación a la célula para realizar un sello de alta resistencia entre un parche de membrana y el vidrio de la pipeta aplicando presión negativa. Una vez alcanzado el sello se rompió el parche de membrana aumentando la presión negativa aplicada para finalmente entrar en comunicación con la célula completa mientras se suministraba solución fisiológica extracelular de sello como se muestra en la figura 3 (Bell & Dallas, 2018).

Una vez lograda la conformación de célula completa, se comenzará el protocolo de pulsos de estimulación (Figura 4), dejando los primeros 10 como control para verificar el paso de corriente a través de los canales. Al estabilizarse la corriente se procedió a cambiar la línea del perfusor y se expuso la célula a una concentración 3nM de la toxina; este proceso se repitió con las concentraciones 10 nM, 30 nM, 100 nM, 1 uL y 3 uL, finalmente se realizó el lavado con solución fisiológica extracelular alta en potasio.

Los datos de las mediciones de cada célula se analizaron con los programas *Clampfit10* y *OriginPro8*. Los valores de corriente obtenidos a diferentes concentraciones de toxina se ajustaron con una ecuación logística de tipo:

$$Y = A2 + (A1 - A2) / (1 + (X/X0)^p)$$

Donde A1 es la asíntota máxima (fijada a 1), A2 la asíntota mínima, X0 el punto medio de la curva (IC50) y p es la pendiente.

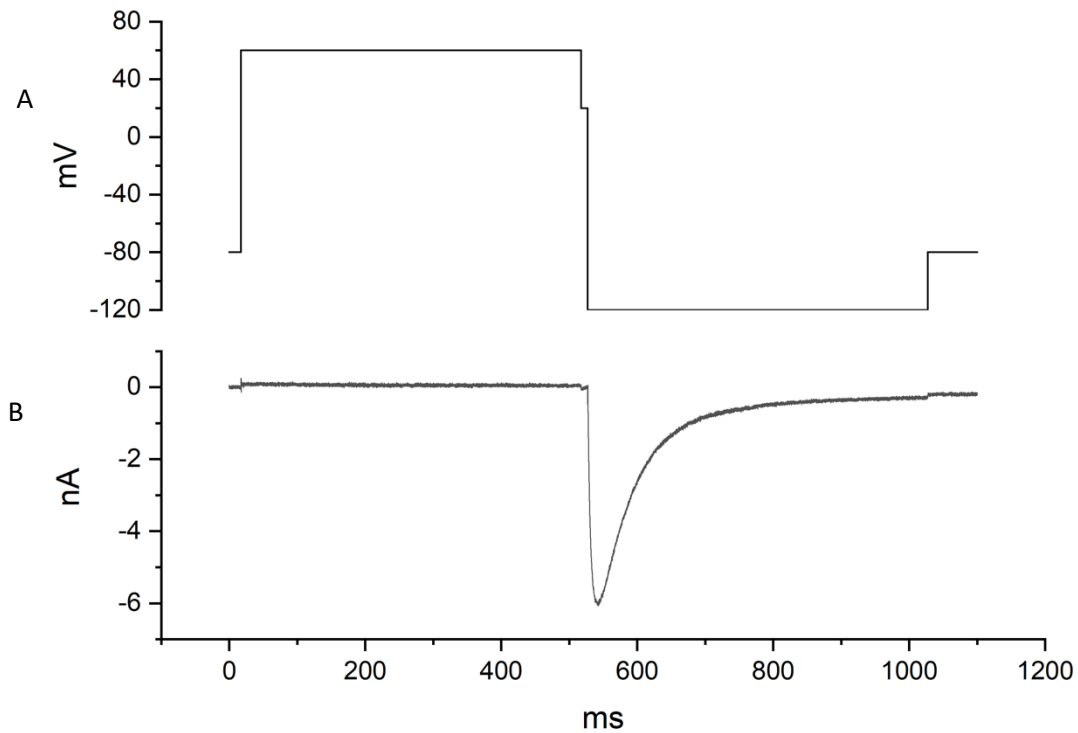


Figura 5. Protocolo de pulsos de estimulación utilizados en el *patch clamp*. **A** Se comenzó con -80mV (potencial de reposo), posteriormente se depolarizó la membrana a 60 mV, se llevó a -120 mV para repolarizar la membrana celular, finalmente regresó a -80 mV; este pulso se repitió cada 6 segundos. **B** Corriente de potasio hERG1 obtenida mediante la estimulación descrita en el panel A

## Capítulo 4. Resultados

### 4.1 Síntesis química de péptidos en fase sólida y purificación

#### CmErg1 (F17Y, T21Q)

Terminada la síntesis, se hizo la ruptura del enlace resina-péptido y, el péptido se liofilizó para llevar a cabo la purificación por cromatografía en fase reversa. El cromatograma del péptido crudo (figura 5), indica la presencia de dos picos mayoritarios, para los cuales, por espectrometría de masas se determinó el peso molecular correspondiente a cada uno. En el pico representado con un círculo se encuentra un péptido con un peso de 4861.04 Da., mientras que en el pico representado con una estrella se encuentra un componente con un peso de 4845.44 Da, lo que sugiere que en el pico de la estrella se encuentra el péptido sintético CmErg1 (F17Y, T21Q), el cual, de manera teórica, presenta un peso molecular de 4844.53 Da.

Los dos picos mayoritarios representados en los cromatogramas poseen una diferencia de 16 Da. Se infiere que puede deberse a la oxidación de la metionina presente en el residuo 35 de la secuencia. Se determinó el peso molecular de la Fmoc-Met-OH utilizada en la síntesis mediante espectrometría de masas y se obtuvo como resultado dos pesos, 372.08 Da. y 388.35 Da. Siendo la diferencia 16 Da, por lo que se confirmó que la diferencia de los pesos moleculares de los péptidos se debe a la oxidación de este aminoácido.

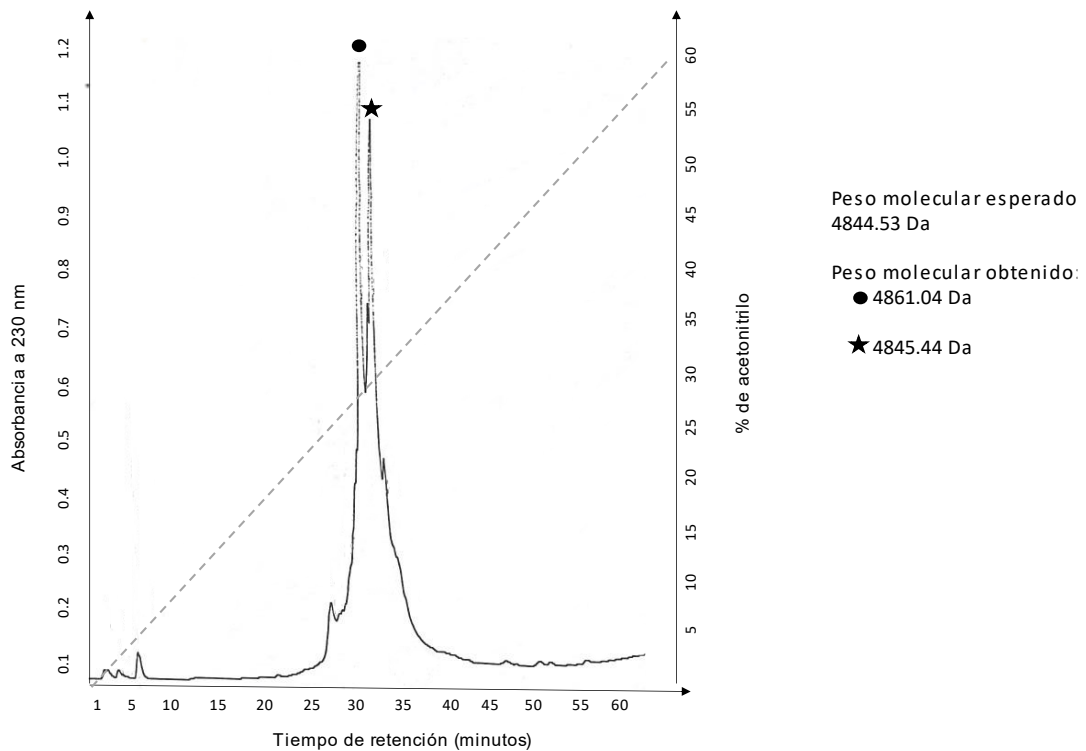


Figura 6. Cromatografía en fase reversa del péptido sintético CmErg1, se disolvió 1 mg de péptido crudo en 1 mL de solución A. Se corrió en un sistema de 0 a 60% de la solución B en 60 minutos a un  $\lambda=230$  nm.

Después del plegamiento del péptido crudo se realizó la cromatografía en fase reversa con 2.3 mg de péptido, obteniendo así el cromatograma del péptido plegado (figura 6). En este se identifica la presencia de dos picos mayoritarios, además de una separación entre ellos. El peso molecular de cada uno se determinó mediante espectrometría de masas. El pico marcado con un círculo representa a un péptido con un peso de 4853.48 Da, mientras que el pico marcado con una estrella representa a un péptido con un peso de 4837.18 Da. Esto indica que el péptido sintético CmERG1 (F17Y, T21Q) esperado se encuentra en el pico de la estrella.

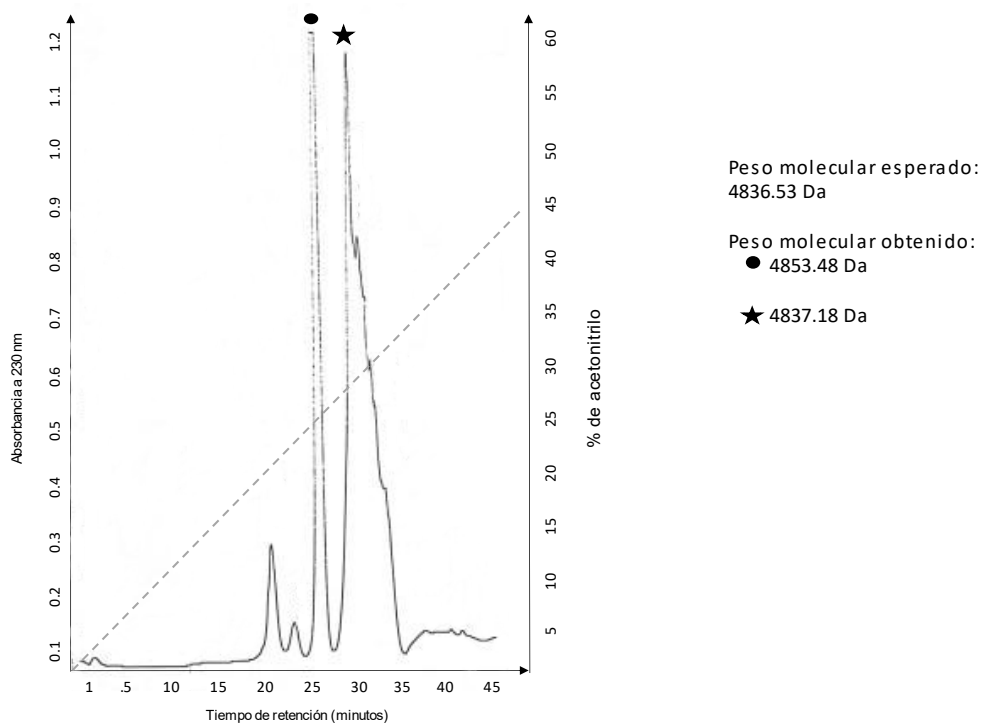


Figura 7. Cromatografía en fase reversa del plegamiento del péptido sintético CmErg1. Se inyectaron 2 mL de solución de solución de plegamiento. Corridos en un sistema de 0 a 60% de la solución B en 60 minutos a un  $\lambda=230$  nm.

El péptido de interés se repurificó, evitando así la contaminación de la toxina con el péptido que se sugiere, tiene la metionina oxidada. Al realizar la cuantificación del péptido repurificado (figura 7) se obtuvieron 181.9  $\mu\text{g}$ , de los cuales, se tomaron 30 $\mu\text{g}$  para preparar 3 alícuotas de 10  $\mu\text{g}$  cada una, las cuales se usaron para realizar las pruebas electrofisiológicas.

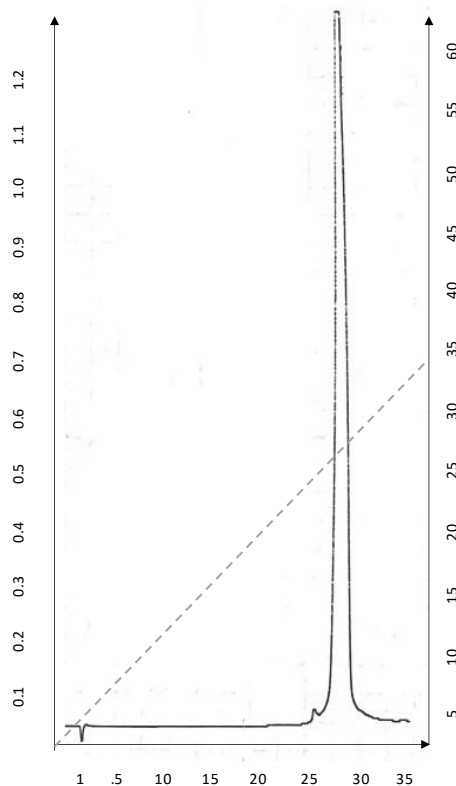


Figura 8. Repurificación del pico de interés del péptido sintético CmErg1. Se corrió en un sistema de 0 a 60% de la solución B en 60 minutos a un  $\lambda=230$  nm.

### CnErg1 (Y17F, Q21T)

Posterior a la ruptura del enlace entre el péptido y la resina, se liofilizó el péptido crudo para llevar a cabo la cromatografía en fase reversa. En el cromatograma (figura 8), se observa la presencia de dos picos mayoritarios, para los cuales por espectrometría de masas se determinó el peso molecular de cada uno. El pico representado con un círculo posee un peso de 4711.90 Da, mientras que el representado con una estrella pesa 4695.74 Da. Esto sugiere en segundo pico se encuentra el péptido sintético CnErg1 el cual de manera teórica tiene un peso molecular de 4695.3 Da.

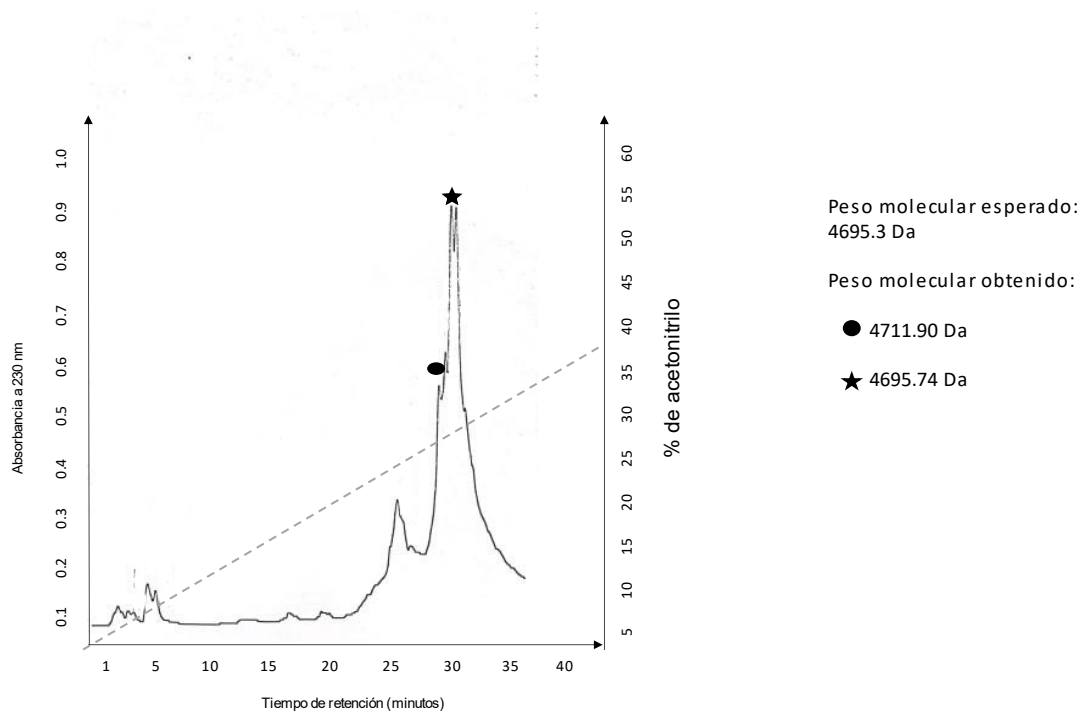


Figura 9. Cromatografía en fase reversa del péptido sintético CnErg1. Se disolvió 1.3 mg de péptido crudo en 1 mL de solución A. Se corrió en un sistema de 0 a 60% de la solución B en 60 minutos a un  $\lambda=230$  nm.

### CnERG1 (Y17F, Q21T)

Se plegaron 3.1 mg de péptido crudo y purificaron mediante cromatografía en fase reversa. En el cromatograma del péptido plegado (Figura 9) se indica la presencia de dos picos mayoritarios. Se determinó el peso molecular de cada uno mediante espectrometría de masas. El pico representado con un círculo obtuvo un peso de 4704.18 Da, mientras que el pico identificado con una estrella tuvo un peso de 4688.23 Da. Esto indica que el péptido sintético esperado CnERG1 (Y17F, Q21T) se encuentra en el pico de la estrella.

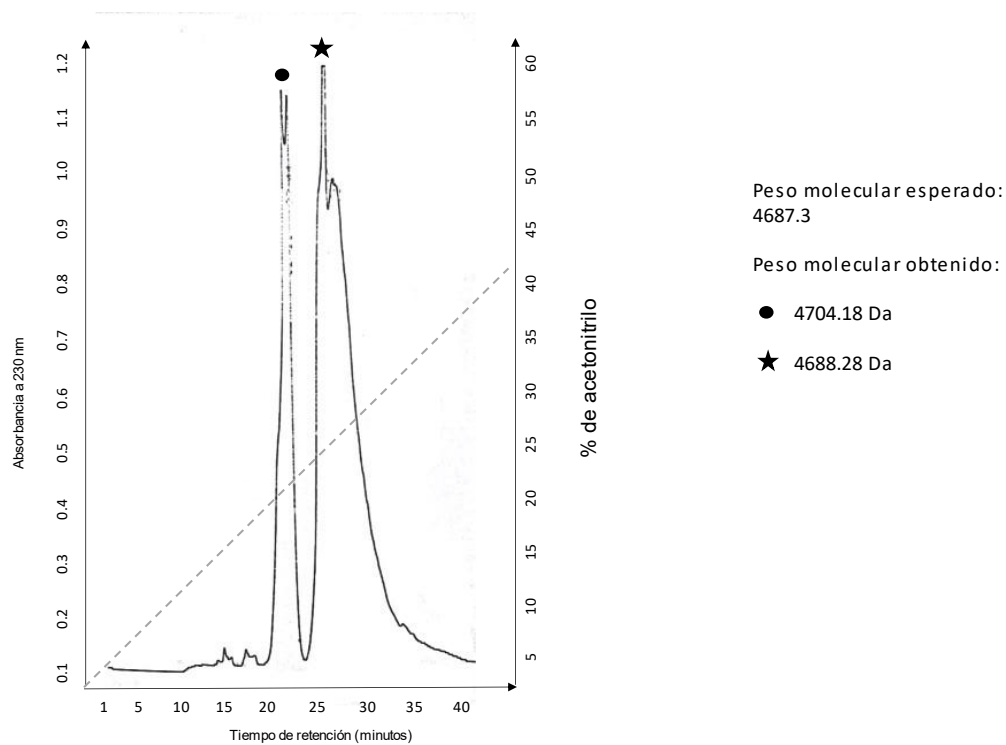


Figura 10. Cromatografía en fase reversa del plegamiento del péptido sintético CnERG1, se inyectaron 4 mL de solución de solución de plegamiento. Se corrió en un sistema de 0 a 60% de la solución B en 60 minutos a un  $\lambda=230$  nm.

Tras la colecta de los picos de interés se realizó la repurificación, asegurando la pureza de la toxina. Se cuantificó el péptido repurificado; se obtuvieron 125.50  $\mu\text{g}$  de los que tomaron 3 alícuotas de 10  $\mu\text{g}$  para las pruebas electrofisiológicas.



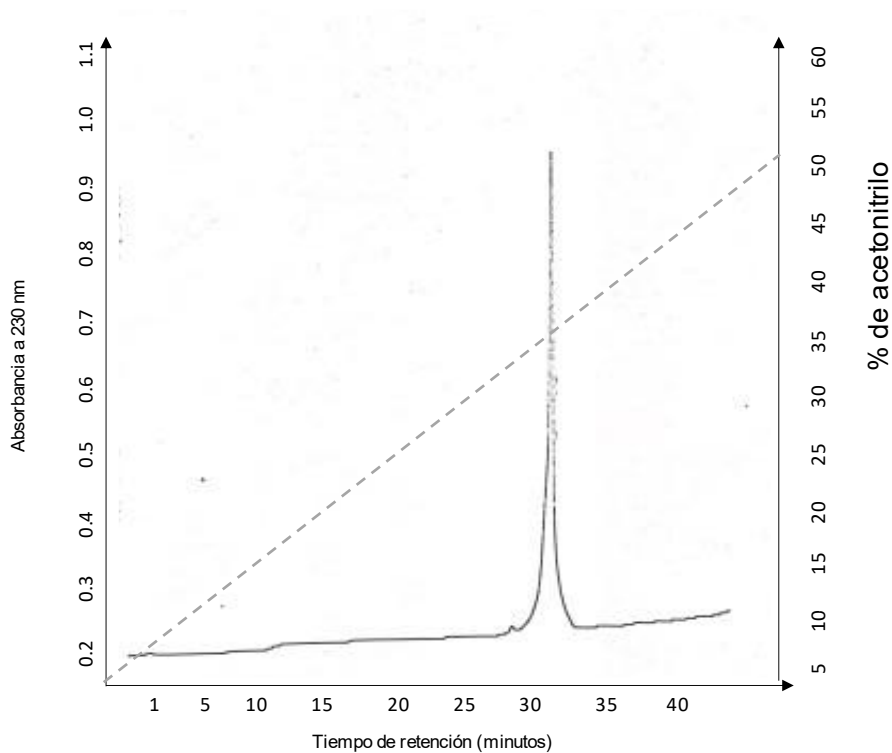


Figura 11. Repurificación del pico de interés del péptido sintético CnErg1. Se corrió en un sistema de 0 a 60% de la solución B en 60 minutos a un  $\lambda=230$  nm.

### 4.3 Electrofisiología

El registro de las corrientes se hizo utilizando el protocolo de estimulación descrito previamente (figura 4): se empezó en solución fisiológica en los primeros 10 pulsos o hasta que la corriente se estabilice y después se añadieron concentraciones crecientes de la toxina sintética, desde 3 nM hasta 3  $\mu$ M (figura 9 y 10). Por cada célula, las corrientes fueron normalizadas a la corriente máxima (registrada en condiciones de control) y los valores obtenidos de 5 células fueron promediados y graficados contra el logaritmo en base diez de las concentraciones utilizadas. Los datos fueron ajustados con una ecuación logística, donde la asíntota máxima fue fijada a 1, (figura 12).

#### CnErg1 (Y17F, Q21T)

La reducción de la corriente a través del canal respecto al aumento de concentración de la toxina se muestra en la figura 11. Al encontrarse en presencia de 1  $\mu$ M se obtuvo una corriente residual del 4%, lo que sugiere un bloqueo casi completo del canal hERG1.

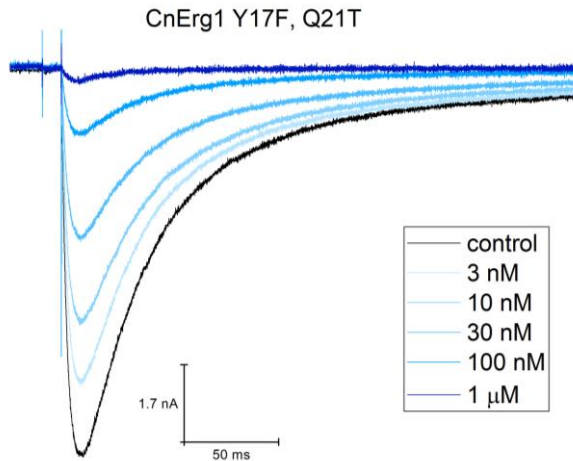


Figura 12. Representación de la reducción de corriente a través del canal hERG1 en presencia de distintas concentraciones de la toxina sintética CnErg1.

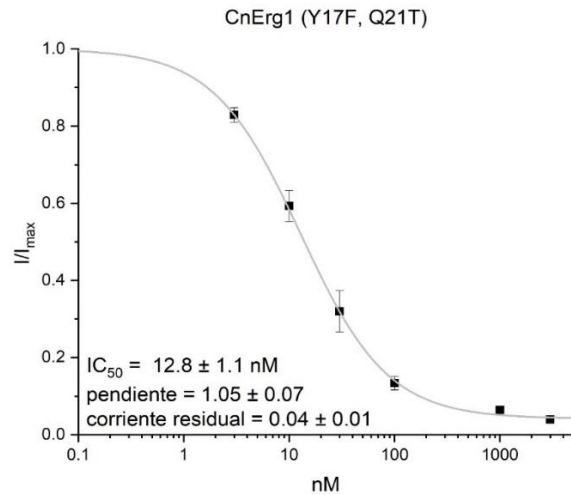


Figura 13. Curva dosis-respuesta de la toxina sintética CnErg1 en las corrientes hERG1.

### CmErg1 (F17Y, T21Q)

Se midieron 4 células que contaban con diversos tamaños. Se observa (figura 13) la reducción de la corriente a través del canal respecto al aumento de concentración de la toxina. Al encontrarse en presencia de 1  $\mu\text{M}$  se obtuvo una corriente residual de 9%, lo que sugiere el flujo de iones a través del canal equivalente al de la subfamilia de las Erg toxinas.

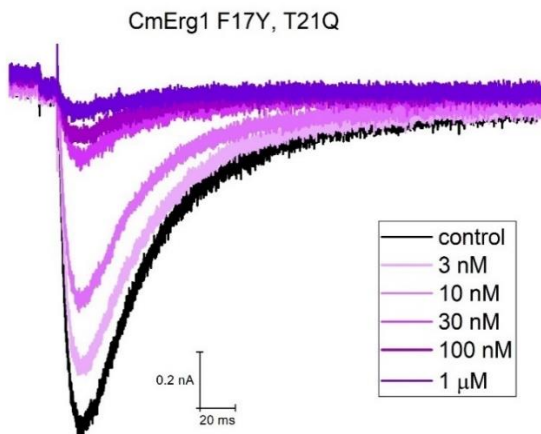


Figura 14. Representación de la reducción de corriente a través del canal hERG1 a distintas concentraciones de la toxina sintética CmErg1.

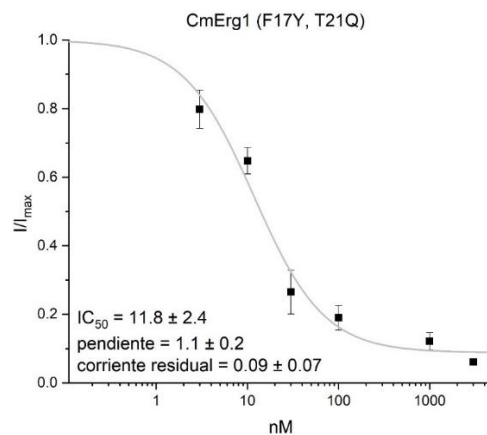


Figura 15. Curva dosis-respuesta de las células CHO-hERG1 en presencia de concentraciones de la toxina sintética CmErg1

## CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN

Gran parte del conocimiento de la estructura y función de los canales iónicos se ha descrito mediante el uso de toxinas (Zhao et al., 2019) por lo que el interés de la acción de la toxina CmErg1 sobre el canal hERG1 radica en su comportamiento inusual. La CmErg1 evita el paso de iones a través de los canales hERG1 (Beltrán-Vidal et al., 2021), de manera distinta a las demás integrantes de las Erg toxinas donde se observa un flujo remanente de aproximadamente el 10 % (Hill et al., 2007). A raíz de esto se propuso un modelo computacional el cual se sugiere cambiar los aminoácidos tirosina 17 por fenilalanina y glutamina 21 por treonina en la toxina CnErg1 lo que resultaría en un mejor bloqueo del canal. Del mismo modo, al cambiar fenilalanina 17 por tirosina y treonina 21 por glutamina en la toxina CmErg1 resultaría en una afectación en su capacidad de bloqueo (Beltrán-Vidal et al., 2021). Al realizar la síntesis en fase sólida de los péptidos con las modificaciones propuestas en el modelo computacional y probar la acción de las toxinas sintéticas en células CHO-hERG1, las cuales expresan de manera estable el canal hERG1, se observó que la acción de CmE1 (F17Y, T21Q) aumenta corriente residual a un 9 % mientras que CnErg1 (Y17F, Q21T) disminuye a un 4%. Estos resultados indican que la predicción del modelo computacional propuesto por Beltrán-Vidal y colaboradores se cumple parcialmente. La toxina CmE1 (F17Y, T21Q) en contacto con el hERG1 deja una corriente residual del 9 % (figura 14, representada en la sección de resultados) el cual es un valor cercano a lo que se observa en la CnErg1 nativa (Hill et al., 2007). En presencia de la toxina CnErg1 (Y17F, Q21T) se observa una reducción en la corriente residual que llega a un valor del 4 % mientras que en la CnErg1 nativa es aproximadamente 10%. Esto indica que los cambios propuestos tienen influencia en la interacción de la toxina con el canal; a pesar de no observar un bloqueo total del flujo de iones sugiere que la influencia de las 2 posiciones distintas tiene un papel en el ambiente de la interacción de la toxina con el canal.

## **CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES**

Se cumple el modelo computacional propuesto ya que al llevar a cabo la modificación de los aminoácidos Y17F, Q21T en la toxina CnErg1 reduce el flujo de iones a través del canal hERG1 mientras que al modificar los aminoácidos F17Y, T21Q en la toxina CmErg1 hay un aumento del flujo de iones a través del canal hERG1.

## **PERPECTIVAS**

- Llevar a cabo la síntesis en fase sólida de las toxinas parentales CnErg1 y CmErg1 y realizar las lecturas electrofisiológicas con cada una para igualar las condiciones experimentales y poder realizar una comparación más objetiva.
- Valorar otras características de bloqueo típicas de las CnErg1 nativa en las toxinas sintéticas como la diferencia de afinidad de la toxina con relación a la concentración de potasio extracelular y la cinética de cierre del canal hERG1 en presencia de toxina.

## REFERENCIAS

- Almaaytah, A., & Albalas, Q. (2014). Scorpion venom peptides with no disulfide bridges: A review. *Peptides*, 51, 35-45. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.10.021>
- Amblard, M., Fehrentz, J.-A., Martinez, J., & Subra, G. (2006). Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis. *MOLECULAR BIOTECHNOLOGY*, 33, 16.
- Bell, D. C., & Dallas, M. L. (2018). Using automated patch clamp electrophysiology platforms in pain-related ion channel research: Insights from industry and academia. *British Journal of Pharmacology*, 175(12), 2312-2321. <https://doi.org/10.1111/bph.13916>
- Beltrán-Vidal, J., Carcamo-Noriega, E., Pastor, N., Zamudio-Zuñiga, F., Guerrero-Vargas, J. A., Castaño, S., Possani, L. D., & Restano-Cassulini, R. (2021). Colombian Scorpion *Centruroides margaritatus*: Purification and Characterization of a Gamma Potassium Toxin with Full-Block Activity on the hERG1 Channel. *Toxins*, 13(6), Art. 6. <https://doi.org/10.3390/toxins13060407>
- Bottiglieri, C., Ferrara, L., Corona, M., Gurrola, G. B., Batista, C., Wanke, E., & Possani, L. D. (2000). Disulfide bridges of Ergtoxin, a member of a new sub-family of peptide blockers of the ether-a-go-go -related K + channel. *FEBS Letters*, 479(3), 156-157. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01891-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01891-3)
- Capera, J., Serrano-Novillo, C., Navarro-Pérez, M., Cassinelli, S., & Felipe, A. (2019). The Potassium Channel Odyssey: Mechanisms of Traffic and Membrane Arrangement. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), 734. <https://doi.org/10.3390/ijms20030734>
- Christie, M. J. (1995). MOLECULAR AND FUNCTIONAL DIVERSITY OF K + CHANNELS. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 22(12), 944-951. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.1995.tb02331.x>
- Chtcheglova, L. A., Atalar, F., Ozbek, U., Wildling, L., Ebner, A., & Hinterdorfer, P. (2008). Localization of the ergtoxin-1 receptors on the voltage

sensing domain of hERG K<sup>+</sup> channel by AFM recognition imaging. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 456(1), 247-254.  
<https://doi.org/10.1007/s00424-007-0418-9>

- Corona, M., Gurrola, G. B., Merino, E., Cassulini, R. R., Valdez-Cruz, N. A., García, B., Ramírez-Domínguez, M. E., Coronas, F. I. V., Zamudio, F. Z., Wanke, E., & Possani, L. D. (2002). A large number of novel Ergtoxin-like genes and ERG K<sup>+</sup>-channels blocking peptides from scorpions of the genus *Centruroides*. *FEBS Letters*, 532(1-2), 121-126.  
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03652-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03652-9)
- Corona, M., Gurrola, G. B., Merino, E., Cassulini, R. R., Valdez-Cruz, N. A., García, B., Ramírez-Domínguez, M. E., Coronas, F. I. V., Zamudio, F. Z., Wanke, E., & Possani, L. D. (2002). A large number of novel Ergtoxin-like genes and ERG K<sup>+</sup>-channels blocking peptides from scorpions of the genus *Centruroides*. *FEBS Letters*, 532(1-2), 121-126.  
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03652-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03652-9)
- Czarnik, A. W. (1998). Solid-phase synthesis supports are like solvents. *Biotechnology and Bioengineering*, 61(1), 77-79.  
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(199824\)61:1<77::AID-BIT13>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(199824)61:1<77::AID-BIT13>3.0.CO;2-6)
- DeBin, J. A., Maggio, J. E., & Strichartz, G. R. (1993). Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 264(2), C361-C369. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1993.264.2.C361>
- Einarsen, K., Calloe, K., Grunnet, M., Olesen, S.-P., & Schmitt, N. (2009). Functional properties of human neuronal Kv11 channels. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 458(4), 689-700.  
<https://doi.org/10.1007/s00424-009-0651-5>
- Frénal, K., Xu, C.-Q., Wolff, N., Wecker, K., Gurrola, G. B., Zhu, S.-Y., Chi, C.-W., Possani, L. D., Tytgat, J., & Delepierre, M. (2004). Exploring structural features of the interaction between the scorpion toxin CnErg1 and ERG K<sup>+</sup>

channels. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 56(2), 367-375.  
<https://doi.org/10.1002/prot.20102>

- Gallacher, D. V., & Morris, A. P. (1986). A patch-clamp study of potassium currents in resting and acetylcholine-stimulated mouse submandibular acinar cells. *The Journal of Physiology*, 373(1), 379-395.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1986.sp016054>
- Gordon, D., Savarin, P., Gurevitz, M., & Zinn-Justin, S. (1998). Functional Anatomy of Scorpion Toxins Affecting Sodium Channels. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, 17(2), 131-159.  
<https://doi.org/10.3109/15569549809009247>
- Gurrola, G. B., Rosati, B., Rocchetti, M., Pimienta, G., Zaza, A., Arcangeli, A., Olivotto, M., Possani, L. D., & Wanke, E. (1999). A toxin to nervous, cardiac, and endocrine ERG K<sup>+</sup> channels isolated from *Centruroides noxius* scorpion venom. *The FASEB Journal*, 13(8), 953-962.  
<https://doi.org/10.1096/fasebj.13.8.953>
- Hill, A. P., Sunde, M., Campbell, T. J., & Vandenberg, J. I. (2007). Mechanism of Block of the hERG K<sup>+</sup> Channel by the Scorpion Toxin CnErg1. *Biophysical Journal*, 92(11), 3915-3929. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.101956>
- Jiménez-Vargas, J. M., Possani, L. D., & Luna-Ramírez, K. (2017). Arthropod toxins acting on neuronal potassium channels. *Neuropharmacology*, 127, 139-160. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.09.025>
- Jimenez-Vargas, J. M., Restano-Cassulini, R., & Possani, L. D. (2012). Interacting sites of scorpion toxin ErgTx1 with hERG1 K<sup>+</sup> channels. *Toxicon*, 59(6), 633-641. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.02.001>
- Jimenez-Vargas, J. M., Restano-Cassulini, R., Quintero-Hernández, V., Gurrola, G. B., & Possani, L. D. (2011). Recombinant expression of the toxic peptide ErgTx1 and role of Met35 on its stability and function. *Peptides*, 32(3), 560-567. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.06.018>
- Kaiser, E., Colescott, R. L., Bossinger, C. D., & Cook, P. I. (1970). Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of

- peptides. *Analytical Biochemistry*, 34(2), 595-598.  
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(70\)90146-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(70)90146-6)
- Kornreich, B. G. (2007). The patch clamp technique: Principles and technical considerations. *Journal of Veterinary Cardiology*, 9(1), 25-37.  
<https://doi.org/10.1016/j.jvc.2007.02.001>
  - Merrifield, R. B. (1963). Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society*, 85(14), 2149-2154.  
<https://doi.org/10.1021/ja00897a025>
  - Mitscher, L. A. (2001). *Solid-Phase Synthesis. A Practical Guide* Edited by S. A. Kates (Consensus Pharmaceuticals, Inc.) and F. Albericio (University of Barcelona, Spain). Marcel Dekker, Inc., New York, NY. 2000. Xx + 826 pp. 14.5 x 22.5 cm. \$250.00. ISBN 0-8247-0359-6. *Journal of Natural Products*, 64(1), 142-142. <https://doi.org/10.1021/np990740p>
  - Mouhat, S., Jouirou, B., Mosbah, A., De Waard, M., & Sabatier, J.-M. (2004). Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. *Biochemical Journal*, 378(3), 717-726. <https://doi.org/10.1042/bj20031860>
  - Pardo-López, L., García-Valdés, J., Gurrola, G. B., Robertson, G. A., & Possani, L. D. (2002). Mapping the receptor site for ergotoxin, a specific blocker of ERG channels. *FEBS Letters*, 510(1-2), 45-49.  
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)03218-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)03218-5)
  - Patch-Clamp Electrophysiology. (2019, enero 24). *Medicine LibreTexts*.  
[https://med.libretexts.org/Bookshelves/Pharmacology\\_and\\_Neuroscience/Book%3A\\_Neuroscience\\_\(Ju\)/03%3A\\_Fundamental\\_Neuroscience\\_Techniques/3.02%3A\\_Patch-Clamp\\_Electrophysiology](https://med.libretexts.org/Bookshelves/Pharmacology_and_Neuroscience/Book%3A_Neuroscience_(Ju)/03%3A_Fundamental_Neuroscience_Techniques/3.02%3A_Patch-Clamp_Electrophysiology)
  - Perrin, M. J., Subbiah, R. N., Vandenberg, J. I., & Hill, A. P. (2008). Human ether-a-go-go related gene (hERG) K<sup>+</sup> channels: Function and dysfunction. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 98(2), 137-148.  
<https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2008.10.006>
  - Possani, L. D., Becerril, B., Delepierre, M., & Tytgat, J. (1999). Scorpion toxins specific for Na<sup>+</sup>-channels. *European Journal of Biochemistry*, 264(2), 287-300. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00625.x>



- Restano-Cassulini, R., Olamendi-Portugal, T., Zamudio, F., Becerril, B., & Possani, L. D. (2008). Two Novel Ergtoxins, Blockers of K<sup>+</sup>-channels, Purified from the Mexican Scorpion *Centruroides elegans elegans*. *Neurochemical Research*, 33(8), 1525-1533. <https://doi.org/10.1007/s11064-008-9634-8>
- Riaño-Umbarila, L., Rodríguez-Rodríguez, E. R., Santibañez-López, C. E., Güereca, L., Uribe-Romero, S. J., Gómez-Ramírez, I. V., Cárcamo-Noriega, E. N., Possani, L. D., & Becerril, B. (2017). Updating knowledge on new medically important scorpion species in Mexico. *Toxicon*, 138, 130-137. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.08.022>
- Rodríguez de la Vega, R. C., Merino, E., Becerril, B., & Possani, L. D. (2003). Novel interactions between K<sup>+</sup> channels and scorpion toxins. *Trends in Pharmacological Sciences*, 24(5), 222-227. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(03\)00080-4](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(03)00080-4)
- Sanguinetti, M. (2014). HERG1 Channel Agonists and Cardiac Arrhythmia. *Current opinion in pharmacology*, 0, 22-27. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2013.11.006>
- Smith, P. L., Baukrowitz, T., & Yellen, G. (1996). The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. *Nature*, 379(6568), 833-836. <https://doi.org/10.1038/379833a0>
- Stawikowski, M., & Fields, G. B. (2012). Introduction to Peptide Synthesis. *Current Protocols in Protein Science*, 69(1). <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps1801s69>
- Torres, A. M., Bansal, P., Alewood, P. F., Bursill, J. A., Kuchel, P. W., & Vandenberg, J. I. (2003). Solution structure of CnErg1 (Ergtoxin), a HERG specific scorpion toxin. *FEBS Letters*, 539(1-3), 138-142. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00216-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00216-3)
- Tytgat, J., Chandy, K. G., Garcia, M. L., Gutman, G. A., & Martin-Eauclaire, M.-F. (s. f.). A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms:  $\alpha$ -KTx molecular subfamilies. 4.
- Valdivia, H. H., Kirby, M. S., Lederer, W. J., & Coronado, R. (1992). Scorpion toxins targeted against the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>(2+)</sup>-release channel of

- skeletal and cardiac muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(24), 12185-12189. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.24.12185>
- W.Davis Sissom. (1987). The Genus *Centruroides* in South America (Scorpiones, Buthidae). *American Arachnological Society*, 15(1), 11-28.
  - Wang, X., Jimenez-Vargas, J. M., Xu, C., Possani, L. D., & Zhu, S. (2012). Positive selection-guided mutational analysis revealing two key functional sites of scorpion ERG K<sup>+</sup> channel toxins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 429(1-2), 111-116. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.10.065>
  - Ward, M. J., Ellsworth, S. A., & Nystrom, G. S. (2018). A global accounting of medically significant scorpions: Epidemiology, major toxins, and comparative resources in harmless counterparts. *Toxicon*, 151, 137-155. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.07.007>
  - Yajuan, X., Xin, L., & Zhiyuan, L. (2012). A Comparison of the Performance and Application Differences Between Manual and Automated Patch-Clamp Techniques. *Current Chemical Genomics*, 6, 87-92. <https://doi.org/10.2174/1875397301206010087>
  - Zhao, Y., Chen, Z., Cao, Z., Li, W., & Wu, Y. (2019). Diverse Structural Features of Potassium Channels Characterized by Scorpion Toxins as Molecular Probes. *Molecules*, 24(11), 2045. <https://doi.org/10.3390/molecules24112045>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

Control Escolar de Licenciatura



VOTOS DE APROBATORIOS

**SECRETARIA EJECUTIVA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS APLICADAS  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**

**P R E S E N T E**

Por medio del presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la **C. RICO JIMENEZ LUZ MARIA** con número de matrícula **10018637** cuyo título es:

**Síntesis química de variantes de las toxinas CnERG1 (Y17F, Q21T) y CmERG1 (F17Y, T21Q) y su efecto sobre el canal HERG1**

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **LICENCIADO EN CIENCIAS ÁREA TERMINAL DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR.**

Cuernavaca, Mor a 30 de noviembre del 2023

Atentamente  
Por una universidad culta  
*Una universidad de excelencia*

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

**DRA. CARMEN NINA PASTOR COLÓN  
DR. RAMON ANTONIO GONZÁLEZ GARCÍA CONDE  
DRA. GEORGINA GURROLA BRIONES  
DRA. SONIA DÁVILA RAMOS  
DRA. RITA MARÍA RESTANO CASSULINI**

**(PRESIDENTE).  
(SECRETARIO).  
(VOCAL).  
(SUPLENTE).  
(SUPLENTE)**

MIE/VRRC/eae

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209.  
Tel. (777) 329 70 00, Ext. 3270 / correo IICBA@uaem.mx



*Una universidad de excelencia*

RECTORÍA  
2017-2023



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:2023-11-30 12:28:22 | Firmante**

XHyjppq3e8SkevVW/k4EXWxmVaoNhxw0lJzbeXAESFLDInEP4vvX7plq9QRZtW4uwb+LhgXTzmBnvHBV2RRWpn6AEK4trlSeVyVsmhZz03gMmjkm7Dcnh7+4YkBW7py4oJoY9FD8Aa9K+U5nrUa9bomRX5aHavGv9pEJOPtm+eH4SCKOgVi2saLBGQGMZ9Njlvd+yjeJYCQdSvSrBR/qYI6NtYgLFkwFpcmFelwiXrvhQLhUopbJQrinP22RwPzhZtmR1+yqrO1PbbZly/lnk0zgzldg+WrAKIEhTzKGbUPf2bpyljANFKe/+SmUKh7xPfiA8SCXVixX/H8/IKX2A==

**RITA MARIA RESTANO CASSULINI | Fecha:2023-11-30 12:32:33 | Firmante**

gsr7hzcAng+X7skJIECYiWlr1YMAuqQw7UWf+Mxbk++b+CJ8W5w44aTg1h+D4bUDKgm+fR6sSDPmlBqCUF4kjZB1ukrFAavvKH8Kf8Mh7e2VqjnoCVDJwurs6NaaExp82f2/0ebgkKt/zTSIJCNQ18zpu31YEjUBTqzQgSaAIEMGbNMiPYf85rDgBzKuGw0yjf9dkbogi90Ngy3ouH9I05BjRyDuMrh1pWMQufs8t1BuJ+2WxEcvf1z/QOPiWUW8k4+sg4aHkO2d8d4fcOgSZCNqa3c+g2+oQsclL4IBI7AKPISLOg+/7dqng06fLLcw6u8voiv6mq9Pm+Awr7g==

**SONIA DAVILA RAMOS | Fecha:2023-11-30 14:37:25 | Firmante**

VJdfhTecVaV0Hk1Tb99kUAvjweOJoB9OfPNjviE34gtL0ocM74REUHVfuk854lg/B4CJmlFOV+UHWtV8bEWjr8W1hc6HEcL6jgx8glb27Nk2S7glv3c1p1h33/Q9uX6EothMdAPk/Z2mF9uHYsni3haStfKZ/LDovSoNHDG8P2dcZwAnoayCGpkU2vmHYPEXX+9O6wuvuqIw7Axkij25hXIAH7LkV+FY46PCDOqbbvU/MdLlORGSZtMgm5r46E3LJSXcMCzJ4wzabaxGuZqaZqWO+MRiDbn/gW6ViavxCLrTcPwGTCsWAtPjjwdguC6+oht9g+64V/+pTA==

**RAMON ANTONIO GONZALEZ GARCIA CONDE | Fecha:2023-11-30 16:04:33 | Firmante**

wPElPnH8hps7fpylEmXXV/+GyRX9IFcQiSMqRyBR1dHXuC5BFmLCAuU9xa+qa8uhspPGLf8zFJ2eNxs8EKH/2fixdIK6WdzaSYnKht2qnf6lf2MYZJz5AqNibtVPfyXm2GNWWmGnqqJlBbvbmwJmYvGiR0D6bawhIS1nVBsOc8rnXM4OUgurCRH2q28OnGVQW5BAGIb8VKXsjUPixn3qdF9Cnbb8/Alnk13uRCiLnItXXF1GHhC/dciAQcP51xXvjkbPgPc9qhgeJl8gTn35T2g1c3574KngAgToZUS8PyuJfYFCAXuRC/ooSKFJ7qEsQgkgnBQ08Ynl0woaH5hA==

**GEORGINA GURROLA BRIONES | Fecha:2023-12-01 10:02:51 | Firmante**

CKWugof3ZzA7Sn6/KlkthYqopnsmQbf4BgKxiOrlOFCJ7cmaexuGgVQEOnCs7brZLp8sw4T9jY/4mYTO61TvZDfyKrQSz4TxlTdgfWnyClkx26jUy5Sy9xQDITP3356hTIRTUSHtHtjirVF+nDWSbtu+GRB4qsdTM1PKZt/zhhAkCJiTp5+e+qLEP9C+vA4FkzgyRQpsxzHjXV0tNmFHGJ9FP1h+O9RU+DiLFPJOR6JpNv35P7iAN+f4Jq6039vf91eqHZOGg3AomrwbLciCsfhQ5dMce3+vV/A4GITZscGXcKfnNxsN8IBQU8UzRDXof36MplfFzm74bGdsFFDQ==

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



txD3nFvHo

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/6bPbcGWECPU5N0PpGt0tBvYRbrTd1u1>

