



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

POSGRADO EN CIENCIAS (QUÍMICA)

TESIS

**“Caracterización Termodinámica de la Asociación del Inhibidor
Cistatina C Humana con la Proteasa Actinidina”**

Que para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS (QUÍMICA)

PRESENTA

I.Q. Francisco Ortíz Gómez

Matrícula: 2222800028

ortizfrancis411@gmail.com

Director de Tesis

Dr. Rafael Arturo Zubillaga Luna

Jurado:

Presidente: Dr. Andrés Hernández Arana

Secretario: Dra. Liliana Iraís Vera Robles

Vocal: Dr. Abraham Landa Piedra

Iztapalapa, Ciudad de México a 5 de diciembre de 2024.

La presente investigación titulada “***Caracterización Termodinámica de la Asociación del Inhibidor Cistatina C Humana con la Proteasa Actinidina***”, se llevó a cabo en el Área de Biofísicoquímica del Departamento de Química perteneciente a la División de Ciencias Básicas e Ingeniería, de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa, bajo la dirección del Dr. Rafael A. Zubillaga Luna. La realización de este trabajo contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia Humanidades y Tecnología (CONAHCyT, México) a través de la beca de maestría (CVU:1236168).

Dedicatoria

*A mis padres,
Por ser mi mayor inspiración y mi refugio constante.
A ustedes, que, con su amor incondicional, su guía y su esfuerzo infinito, me
enseñaron a soñar en grande y a luchar por cada meta.*

*Esta tesis es un reflejo de los valores que me inculcaron y un agradecimiento por todo
lo que han hecho para que este momento sea posible.
Con amor y gratitud eternos.*

Agradecimientos

Al Dr. Rafael A. Zubillaga Luna, por la oportunidad de ser su estudiante y por confiar en mí para llevar a cabo este proyecto. Su guía, conocimientos y experiencia han sido fundamentales en mi formación, y valoro profundamente el respaldo y apoyo personal que me ofreció en cada etapa de este proceso.

Al Dr. Ponciano García Gutiérrez, por su colaboración en la parte de purificación de la actinidina, por todo el apoyo que me brindo durante el desarrollo de este proyecto y por todo su apoyo personal.

A la Dra. Liliana Irais Vera Robles, por formar parte de mi comité de seguimiento, por todo el apoyo que me brindo durante el desarrollo de este proyecto y sobre todo su colaboración en la parte de biología molecular.

Al Dr. Andrés Hernández Arana, por formar parte de mi comité de seguimiento y orientarme para el mejor desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Abraham Landa Piedra, de la facultad de Medicina de la UNAM, por formar parte de mi comité de seguimiento y orientarme para el mejor desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Salvador R. Tello por todo el conocimiento brindado durante el proceso de purificación de la actinidina

Al Dr. Ricardo Israel Amador Zafra por su apoyo en la parte de biología molecular y por todo su apoyo personal.

Al Dr. Leonardo D. Herrera Zúñiga, por su apoyo en la parte de la simulación de dinámica molecular.

Al Dr. David Tovar Anaya, el apoyo brindado en los experimentos de calorimetría.

A la Mtra. Iseo González asistente de la oficina de posgrado, por el apoyo en los trámites administrativos y ante el CONAHCyT.

Al Mtro. César Sánchez por su apoyo en la parte de la simulación de dinámica molecular.

Al laboratorio divisional de espectroscopia de masas de UAM-I y a la Biol. Mónica Rincón por su apoyo en los experimentos de espectrometría de masas.

A la coordinación del posgrado en Química de la UAM-I, al Dr. Francisco Javier Tzompantzi Morales por el apoyo y orientación en los procesos administrativos.

Al laboratorio de Servicios Analíticos del Instituto de Química de la UNAM por su apoyo en los

experimentos de espectrometría de masas

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONAHCyT) por el invaluable apoyo otorgado a través de la beca de maestría, la cual fue fundamental para la realización de este proyecto.

Quiero expresar mi agradecimiento a todos mis compañeros y amigos del Departamento de Química, especialmente a los del Área de Biofísicoquímica. Su compañerismo, apoyo y los momentos de alegría compartidos hicieron de este camino algo inolvidable.

Gracias UAM-I

"La perseverancia es la fuerza silenciosa que transforma cada tropiezo en un paso hacia el éxito y cada desafío en una oportunidad de crecer."

ABREVIATURAS

Aa	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ASA	Área accesible al solvente
ATP	Adenosín trifosfato
CCE	Cistatina C humana estabilizada
CCH	Cistatina C humana
CE	Comisión de Enzimas
ITC	Calorimetría de titulación isotérmica
MD	Dinámica molecular
OD	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido egtázico
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
K	Kelvin
kbp	kilopares de bases (kilo base pairs)
K_i	Constante de Inhibición
kDa	kilo Daltones
K_U	Constante de unión
LB	Luria – Bertani
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight</i>
MMPBSA	<i>Molecular mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area</i>
MMTS	Metilmetanotiosulfonato
NaCl	Cloruro de sodio
NPT	Moles, Presión y Temperatura constantes
PC	Proteasas cisteínicas
PCA	Análisis de componentes principales
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PI	Punto isoeléctrico
pK _a	Logaritmo negativo de la constante de disociación ácida

P_H	Puente de hidrógeno
pM	Picomolar
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
R	Constante universal de los gases
Rg	Radio de giro
RMSD	<i>Root mean square deviation</i>
RMSF	<i>Root mean square fluctuation</i>
rpm	revoluciones por minuto
SA	Ácido sinapínico
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
T	Temperatura
TFG	Tasa de filtración glomerular
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
Uniprot	<i>Universal protein resource</i>
ΔH_{cal}	Entalpía calorimétrica
Å	Angström
ΔASA	<i>change in Accessible Surface Area</i>
ΔG_U	Energía libre de unión
ΔH_U	Entalpía de unión
ΔS_U	Entropía de unión
°C	Grados Celsius

Índice

ABREVIATURAS.....	i
RESUMEN	v
1. INTRODUCCION	1
1.1 Proteínas	1
1.2 Enzimas	2
1.3 Proteasas	4
1.3.1 Proteasas Serínicas.....	5
1.3.2 Proteasas Aspárticas	6
1.3.3 Proteasas Metálicas.....	6
1.3.4 Proteasas Cisteínicas.....	6
1.4 Mecanismo catalítico de proteasas cisteínicas	8
1.5 Cistatinas: Inhibidores de Proteasas Cisteínicas.....	9
1.6 Papel de las Cistatinas en la Medicina	10
1.7 Relaciones termodinámicas de la unión Proteína Ligando	11
2. ANTECEDENTES.....	14
2.1 Actinidina.....	14
2.1.1 Estructura y propiedades	14
2.2 Cistatina C Humana	16
2.3 Interacción Cisteinproteasas – Cistatinas.....	17
3. OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo General	20
3.2 Objetivos Particulares	20
4. MATERIALES Y MÉTODOS	21
4.1 Aislamiento y purificación de la actinidina	21
4.2 Actividad Proteolítica de la actinidina	22
4.3 Expresión de la cistatina C estabilizada.....	22
4.4 Purificación de la CCE	23
4.5 Ensayo de actividad inhibitoria de la CCE.....	24
4.6 Dicroísmo Circular	24
4.7 Espectrometría de masas.....	25
4.8 Construcción del complejo CCE–actinidina	25
4.8.1 Simulación de Dinámica Molecular del modelo del complejo.....	27

4.8.2 Análisis estructural de la interfaz de los complejos CCE–proteasas	27
4.9 Calorimetría de Titulación Isotérmica.....	28
5. RESULTADOS.....	30
5.1 Purificación de la actinidina.....	30
5.2 Expresión y purificación de la cistatina C humana estabilizada (CCE)	32
5.3 Ensayos de actividad inhibitoria de CCE	33
5.4 Propiedades Estructurales, dicroísmo circular	34
5.5 Espectrometría de Masas	35
5.6 Modelado computacional	36
5.6.1 Modelado y simulación de DM de las especies	36
5.6.2 Construcción del modelo cistatina C humana–actinidina	37
5.6.3 Simulación de Dinámica molecular del complejo CCE–actinidina.....	39
5.7 Calorimetría de Titulación Isotérmica.....	44
6. DISCUSIÓN	46
6.1 Aislamiento, purificación y caracterización de la actinidina	46
6.2 Expresión, Purificación y caracterización de la CCE.....	47
6.3 Modelado y simulación de las especies involucradas	48
6.4 Simulación de Dinámica Molecular del complejo	48
6.5 Caracterización termodinámica de los complejos por ITC.....	50
7. CONCLUSIONES	53
REFERENCIAS	55
APÉNDICE.....	63

RESUMEN

En la presente investigación se caracterizó, desde un enfoque termodinámico, la asociación entre la variante estabilizada (L47C/G69C) de la cistatina C humana con la actinidina mediante calorimetría de titulación isotérmica (ITC), técnica de referencia para el estudio cuantitativo de interacciones biomoleculares. La ITC permite determinar con alta precisión la constante de unión (K_U), la energía libre de unión (ΔG_U), la entalpía de unión (ΔH_U) y la entropía de unión (ΔS_U), proporcionando información clave sobre el mecanismo de asociación molecular y la estabilidad del complejo formado. Para ello, se llevó a cabo el aislamiento y la purificación de la proteasa actinidina a partir del fruto del kiwi, bloqueando su cisteína catalítica con metilmetanotiosulfonato para prevenir su autohidrólisis. La cistatina C estabilizada (CCE) fue obtenida por expresión recombinante en *Escherichia coli*, seguida de purificación por cromatografía de intercambio catiónico. La verificación estructural de las proteínas se realizó mediante dicroísmo circular y espectrometría de masas. Se realizaron ensayos para constatar la actividad inhibitoria de la CCE sobre la actividad peptidasa de la papaína, utilizando el sustrato N-benzoil-arginina-p-nitroanilida (BApNA), tanto en ausencia como en presencia del inhibidor, obteniéndose para el último caso una inhibición aproximada del 90%. Para obtener los parámetros termodinámicos de la unión proteasa-inhibidor ambas proteínas se equilibraron en regulador de fosfatos 10 mM, pH 7.0 y 35.0 °C, ajustando la fuerza iónica a 0.10 M con NaCl. Los resultados indicaron que la cistatina C estabilizada se une a la actinidina, aún con su sitio catalítico bloqueado, mostrando una afinidad moderada con una K_U promedio de $1.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, ΔH_U de $-23.6 \text{ kJ mol}^{-1}$ y $T\Delta S_U$ de 9.4 kJ mol^{-1} , valores que se encuentran dentro del intervalo reportado para este tipo de complejos.

Adicionalmente, se modeló la estructura del complejo CCE–actinidina mediante un acoplamiento molecular rígido y se analizaron las interacciones en la interfaz molecular mediante simulaciones de dinámica molecular de 200 ns a 308.15 K, utilizando el software GROMACS 2023.1 y el campo de fuerzas AMBER. El complejo mostró una interfaz mayormente apolar compuesta por numerosos residuos hidrofóbicos, lo que concuerda con la contribución entrópica favorable. La interacción estuvo principalmente mediada por puentes de hidrógeno, puentes salinos e interacciones de van der Waals, reflejadas en un componente entálpico negativo que junto con la contribución entrópica positiva provocan un cambio favorable en la energía libre de unión.

Tanto los resultados calorimétricos como los computacionales se compararon con los datos reportados por Tovar Anaya *et al.*, 2019, para el complejo CCE–quimopapaína, mostrando este una afinidad mayor que el CCE–actinidina, con una constante de unión 10.3 veces más alta y una entalpía de unión 1.75 veces más negativa, lo que se ve reflejado en un mayor número de interacciones, una mayor área polar en su interfaz y una mayor estabilidad.

1. INTRODUCCION

1.1 Proteínas

Las proteínas son macromoléculas fundamentales en todos los seres vivos, estas poseen una notable variedad de funciones e intervienen en la mayoría de los procesos que ocurren en el interior de las células. Su valor biológico se refleja en su alta presencia, constituyendo al menos el 50% del peso seco de las células¹. Además de formar parte de la estructura de los organismos (por ejemplo, se encuentran en los músculos y en el tejido conectivo de los animales, así como en la pared celular de las bacterias), también cumplen roles variados, tales como la regulación de vías metabólicas, el transporte de sustancias, la defensa contra patógenos, la catálisis, la replicación del ADN, entre otras. La amplia gama de funciones que pueden desempeñar está estrechamente ligada a las múltiples combinaciones posibles de sus unidades monoméricas, los 20 aminoácidos unidos por enlaces covalentes¹.

La designación de aminoácido se basa en su estructura química típica, caracterizada por la presencia de un grupo amino (-NH₂) y un grupo carboxilo (-COOH) enlazados a un carbono alfa (-C_α), el cual tiene sus dos valencias adicionales ocupadas por un átomo de hidrógeno (-H) y un grupo variable denominado cadena lateral (-R)¹. De esta manera, las proteínas están formadas por cadenas de aminoácidos conectadas mediante enlaces peptídicos. Estas cadenas se pliegan, adoptando configuraciones tridimensionales que les permiten desempeñar una amplia variedad de funciones biológicas.

Todas las proteínas comparten una estructura química central común; sin embargo, lo que distingue a una proteína de otra es la secuencia específica de aminoácidos que las compone, conocida como estructura primaria. Esta secuencia es crucial, ya que determina la función que la proteína desempeñará. El plegamiento de la cadena polipeptídica, resultado de la formación de puentes de hidrógeno entre los átomos del enlace peptídico, define la estructura secundaria de las proteínas, lo cual conduce a conformaciones con menor energía libre y, en consecuencia, más estables. Las estructuras secundarias más comunes incluyen hélices α , láminas β y giros. La disposición lineal de aminoácidos puede adquirir múltiples configuraciones espaciales mediante el plegamiento del polímero lineal, dando lugar a la estructura terciaria. Este plegamiento ocurre en parte de manera espontánea, debido a la atracción entre aminoácidos con cargas opuestas, a la formación de enlaces disulfuro, a la repulsión de los aminoácidos hidrófobos al agua, a la formación de puentes de hidrogeno, además de ser ayudado por otras proteínas².

Por lo general, las proteínas no están compuestas por una sola cadena de aminoácidos, sino que consisten en múltiples cadenas polipeptídicas (monómeros) que se agrupan para crear proteínas multiméricas, lo cual se denomina estructura cuaternaria. Adicionalmente, aunque la cadena de aminoácidos constituye el componente fundamental de una proteína, algunas pueden contener otros átomos o pequeñas moléculas esenciales para su actividad y estabilidad³. Dada la importancia fundamental de las proteínas en los organismos vivos, el estudio de sus propiedades estructurales y funcionales ha sido siempre una prioridad en el campo de la bioquímica.

1.2 Enzimas

Las enzimas son biomoléculas de naturaleza proteica que destacan por su alta especificidad y su capacidad para acelerar las reacciones químicas al reducir la energía de activación necesaria para que una reacción suceda. Representan el grupo más diverso y especializado de proteínas, actuando como catalizadores en reacciones específicas dentro de organismos vivos o en sistemas biológicos^{2,3}. A menudo, las enzimas no funcionan de manera aislada; en su lugar, se agrupan en secuencias conocidas como rutas metabólicas, además, muchas enzimas poseen la capacidad de regular su propia actividad catalítica, ajustando su función según las necesidades metabólicas.

El sitio activo de una enzima presenta una configuración tridimensional que se ajusta de manera complementaria a la del sustrato, además presenta una distribución igualmente complementaria de potencial eléctrico en su superficie de unión. En otras palabras, si una región del sustrato presenta un potencial positivo, la zona correspondiente del sitio activo exhibirá un potencial negativo, y viceversa. Emil Fischer, un químico alemán, propuso en 1894 una analogía para describir esta especificidad, comparando la relación entre la enzima y el sustrato con la de una llave y su cerradura⁴. Sin embargo, investigaciones posteriores han sugerido que el sitio activo tiene cierta flexibilidad, más allá de la rigidez de una cerradura; la interacción entre la enzima y el sustrato induce cambios conformacionales en la enzima, adaptando el sitio activo para encajar mejor con el sustrato⁵. La variedad de grupos funcionales presentes en estas cavidades del sitio activo facilita un conjunto de interacciones, tanto covalentes como no covalentes, entre la enzima y el sustrato, lo que favorece la conversión del sustrato en producto.

En ciertos casos, la función catalítica de las enzimas depende de la presencia de cofactores, los cuales pueden ser iones o pequeñas moléculas orgánicas conocidas como coenzimas, que son esenciales para que la reacción tenga lugar. Una actividad enzimática mal regulada puede perturbar el

funcionamiento celular y, en humanos, esto puede llevar a problemas de salud. Por esta razón, los organismos regulan la actividad de las enzimas de forma directa mediante activadores o inhibidores, o de manera indirecta a través del control de la síntesis de la enzima

En 1964, la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB, por sus siglas en inglés) formó un comité dedicado a la nomenclatura de las enzimas. Hoy en día, las enzimas se clasifican y se nombran según el tipo de reacción que catalizan, siguiendo las directrices establecidas por esta comisión. Cada enzima recibe una designación que consta de cuatro números, precedida por las letras CE (Comisión de Enzimas), así como un nombre sistemático compuesto por dos partes. Las enzimas se dividen en seis categorías principales: (1) Oxidorreductasas, catalizan la transferencia de átomos de oxígeno, hidrógeno o electrones de un sustrato a otro; (2) Transferasas, catalizan la transferencia de un grupo distinto del hidrógeno de un sustrato a otro; (3) Hidrolasas, catalizan reacciones hidrolíticas, incluyendo esterasas, lipasas y nitrilasas; (4) Liasas, catalizan la eliminación no hidrolítica de grupos funcionales de sustratos, produciendo un doble enlace en el producto o una reacción inversa; (5) Isomerasas, catalizan reacciones de isomerización, incluyendo racemización e isomerización cis-trans; y (6) Ligasas, son responsables de catalizar la formación de nuevos enlaces, junto con la escisión del ATP. La Tabla 1.1 muestra cada tipo de enzima según la reacción catalizada y un ejemplo de estas ^{5,6}

Tabla 1.1. Principales tipos de enzimas nombradas según la reacción que catalizan.

Clase enzimática	Reacción Catalizada
EC 1. Oxidorreductasa	$\text{Piruvato} \xrightleftharpoons[\text{lactato deshidrogenasa}]{\text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{NAD}^+} \text{L-lactato}$
EC 2. Transferasa	$\text{Glucosa} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{hexoquinasa}} \text{ADP} + \text{Glucosa 6 fosfato}$ <p style="text-align: center;">Adenosin trifosfato Adenosin difosfato</p>
EC 3. Hidrolasa	$\text{Maltosa} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{maltasa}} \text{Glucosa} + \text{Glucosa}$
EC 4. Liasa	$\text{Fumarato} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{fumarasa}} \text{L-malato}$

EC 5. Isomerasa	$3\text{-fosfoglicerato} \xrightleftharpoons{\text{fosfogliceromutasa}} 2\text{-fosfoglicerato}$
EC 6. Ligasa	$\text{Piruvato} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{piruvato carboxilasa}} \text{Oxaloacetato} + \text{ADP} + \text{P} + \text{H}^+$

1.3 Proteasas

Las proteasas o enzimas proteolíticas constituyen un extenso grupo de enzimas que facilitan la ruptura de enlaces peptídicos en proteínas y polipéptidos mediante la hidrólisis. Se diferencian en propiedades como la especificidad del sustrato, el sitio activo y el mecanismo catalítico, la temperatura y el pH óptimos y el perfil de estabilidad. Actualmente son las enzimas más importantes para la biotecnología y sus mercados globales han ido creciendo drásticamente en las industrias de piensos, alimentos, textiles, cosmetología, médica y farmacéutica^{7,8,9}. Son cruciales para una variedad de procesos biológicos en organismos que van desde organismos inferiores (virus, bacterias y parásitos) hasta organismos superiores (mamíferos), como la producción de biomoléculas esenciales para regular el tamaño, la composición de proteínas, el recambio y la forma. La hidrólisis llevada a cabo por proteasas es fundamental para activar procesos biológicos clave, como la replicación del ADN. Además de romper enlaces peptídicos, estas enzimas regulan funciones celulares esenciales, como la proliferación celular y la señalización para la apoptosis y la respuesta inmune¹⁰.

De acuerdo con la clasificación de la Comisión de Enzimas, las proteasas pertenecen a las hidrolasas (grupo 3), que hidrolizan enlaces peptídicos (subgrupo 4). Las proteasas se pueden clasificar en exopeptidasas y endopeptidasas, en las que las primeras escinden enlaces peptídicos N- o C-terminales y las segundas rompen enlaces peptídicos internos. Entre ellas, las endopeptidasas encuentran más aplicaciones comerciales que las exopeptidasas^{8,9}. Según el mecanismo proteolítico, las proteasas se dividen en seis grandes grupos: proteasas serínicas, cisteinproteasas, proteasas aspárticas, metaloproteasas, treonina proteasas y glutámico proteasas, siendo las primeras cuatro las más comunes. Alternativamente, las proteasas se pueden clasificar en proteasas ácidas, neutras y alcalinas (básicas) según el pH óptimo. Las proteasas con un pH óptimo en el rango de 2.0 a 5.0 se

denominan proteasas ácidas, las proteasas con un pH óptimo de alrededor de 7.0 son proteasas neutras y las proteasas alcalinas tienen un pH óptimo en el rango de 8.0 a 11.0.

La función de las proteasas es catalizar la hidrólisis de proteínas, lo que ha sido aprovechado para la producción de hidrolizados de proteínas de alto valor a partir de diferentes fuentes de proteínas como la caseína, el suero, la proteína de soja y carne de pescado. Estos hidrolizados de proteínas exhiben propiedades antioxidantes, antitrombóticas, antihipertensivas, anticancerígenas, reguladoras de la saciedad o inmunomoduladoras y tienen una variedad de aplicaciones en formulaciones de alimentos infantiles, productos alimenticios terapéuticos específicos, jugos de frutas y refrescos fortificantes, otros aditivos alimentarios funcionales y alimentos para animales^{11,12,13}.

Tabla 1.2. Principales tipos de proteasas de acuerdo con la Comisión de Enzimas, así como un ejemplo de estas¹¹.

Proteasas	Clasificación	Residuo de aa en el sitio activo	Ejemplo
Proteasas Serínicas	EC 3.4.21	Ser, His	quimotripsina, trombina
Proteasas Cisteínicas	EC 3.4.22	Cys	papaína, catepsina B
Proteasas Aspárticas	EC 3.4.23	Asp, Tyr	pepsina, gastricina
Metaloproteasas	EC 3.4.24	Ion Metálico (Zn ²⁺)	neprisilina, leucosina
Treonina proteasas	EC 3.4.25	Thr	HslU--HslV peptidasa
Endoproteasas	EC 3.4.99	Desconocido	neprosina, Dop isopeptidasa

1.3.1 Proteasas Serínicas

Las proteasas serínicas (EC 3.4.21) reciben su nombre puesto a que su actividad catalítica es mediada por el oxígeno presente en la cadena lateral de un residuo de serina en el sitio activo, que funciona como nucleófilo, al atacar el carbono del grupo carbonilo del enlace peptídico a ser hidrolizado (Fig. 1.1.a). El sitio activo de estas proteasas está formado por una tríada catalítica compuesta por los residuos Asp-His-Ser, donde el aspartato orienta el anillo imidazol de la histidina y esta a su vez desprotona el grupo hidroxilo de la serina, la cual actúa como nucleófilo. También se pueden encontrar otras combinaciones de tríadas catalíticas, tales como Ser-His-Glu y Ser-His-His, así como diadas catalíticas como Ser-Lys/His¹². Estas enzimas suelen activarse en condiciones neutras o alcalinas, con un óptimo de actividad entre pH 7.0 y 11.0 y pueden ser inhibidas irreversiblemente por compuestos como el fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF). Presentan baja especificidad hacia sus sustratos y muchas de ellas exhiben actividad tanto esterolítica como de amidasa. Su masa molecular varía entre 18 y 35 kDa, y sus puntos isoeléctricos suelen encontrarse en un intervalo de

pH entre 4.0 y 6.0. Ejemplos notables de proteasas serínicas incluyen la elastasa, tripsina y la quimotripsina.

1.3.2 Proteasas Aspárticas

Las proteasas aspárticas (EC 3.4.23) llevan a cabo el ataque nucleofílico sobre el enlace peptídico utilizando una molécula de agua previamente activada, en lugar de depender de un grupo funcional propio de la enzima, comúnmente dos residuos de ácido aspártico presentes en el sitio activo son responsables de activar esta molécula de agua. Estas enzimas están formadas por dos dominios, con el sitio catalítico ubicado entre ellos y los residuos de ácido aspártico se encuentran en el motivo Asp-Thr-Gly-X de cada dominio. Se cree que su mecanismo de acción implica una catálisis ácido-base, en la cual, una molécula de agua de ruptura participa directamente en la reacción (Fig. 1.1.c). Se clasifican en cinco grupos y estos a su vez se dividen en diversas familias, entre la que destaca la familia la pepsina, la retropepsina, y enzimas presentes en retrovirus. La masa molecular de estas enzimas varía entre 30 y 45 kDa, presentan una actividad optima a pH bajo y hasta el momento todas las enzimas conocidas de este tipo son endopeptidasas y pueden ser inhibidas por pepstatina^{13,14}.

1.3.3 Proteasas Metálicas

En las metaloproteasas (EC 3.4.24) el ataque nucleofílico es facilitado a través molécula de agua que ha sido activada por un ion metálico divalente, por lo general zinc. Algunos tipos de metaloproteasas necesitan dos iones metálicos para actuar co-catalíticamente. Los iones metálicos están coordinados por ligandos aminoacídicos, usualmente residuos de Lys, Asp, Glu o His. La hidrólisis catalizada por estas enzimas no forma un intermediario covalente, además pueden ser inactivadas por agentes quelantes como el EDTA y el EGTA. Estas proteasas se dividen en 16 grupos, un ejemplo es la termolisina, que pertenece al grupo MA, subgrupo MA(E), familia M4, las cuales tienen un motivo His-Glu-X-X-His, donde el glutamato actúa como el residuo catalítico y las histidinas como ligandos del zinc. Además, las proteasas del subgrupo MA(E), conocidas como Glu-zincinas, incluyen un tercer ligando glutamato^{13,14}. En la termolisina, el motivo específico es His-Glu-Leu-Thr-His, con el residuo Glu166 y una molécula de agua actuando como tercer y cuarto ligando al zinc (Fig. 1.1.d).

1.3.4 Proteasas Cisteínicas

Las proteasas cisteínicas (PC) (EC 3.4.22) son una de las cuatro principales clases de hidrolasas de enlaces peptídicos. Utilizan un anión S⁻ de la cadena lateral de cisteína como nucleófilo para hidrolizar enlaces peptídicos (Fig. 1.1.b). Estas enzimas aparecen en todos los seres vivos y

participan en diversos procesos fisiológicos y patológicos, desde la digestión de proteínas hasta cortes específicos y regulados de enlaces peptídicos. Además de su papel en el catabolismo y procesamiento de proteínas, están involucradas en numerosas patologías humanas, lo que ha llevado al desarrollo activo de inhibidores de cisteinproteasas como posibles fármacos¹³⁻¹⁷.

La primera PC aislada y caracterizada fue la papaína, en 1937, a partir de *Carica papaya*, esta junto con las catepsinas y otras proteasas similares pertenecen a la familia más abundante de PC, presentan una masa molecular entre 21 y 30 kDa y una actividad catalítica óptima en un intervalo de pH de 4.0 a 7.0. El genoma humano codifica 11 tipos de catepsinas: B, C, F, H, K, L, O, S, V, X y W, las cuales en conjunto con otras proteasas cisteínica provenientes de parásitos y virus son objetivos potenciales para tratar enfermedades como artritis, osteoporosis, SIDA, enfermedades inmunológicas, aterosclerosis, cáncer y varias enfermedades parasitarias como malaria, amebiasis y Chagas^{17,18,20-24}.

Basado en su análisis de secuencias, las proteasas cisteínicas similares a la papaína se dividen en dos subfamilias: similares a catepsina L y similares a catepsina B, diferenciadas por la estructura del prodominio y el dominio maduro. También se propuso un tercer grupo 'tipo F' basado en análisis filogenéticos que muestran que los prodominios de catepsinas F y W comparten un patrón de secuencia específico, ERFNAQ. La principal diferencia entre las subfamilias existe en la secuencia de los prodominios y su longitud. El prodominio de la subfamilia de catepsina L (catepsinas L, V, K, S, W, F y H) contiene aproximadamente 100 residuos, con dos motivos altamente conservados: ERFNIN y GNFD. Falta el motivo ERFNIN en las catepsinas B, C, O y X. La catepsina B tiene un rasgo característico con el "bucle de oclusión" que le proporciona actividad de carboxidipeptidasa^{20,25,27}.

Para evitar la degradación no intencionada de proteínas, las proteasas cisteínicas (PC) se producen en forma de precursores inactivos, conocidos como zimógenos. Estos zimógenos incluyen un prodominio que impide el acceso del sustrato al sitio activo²¹.

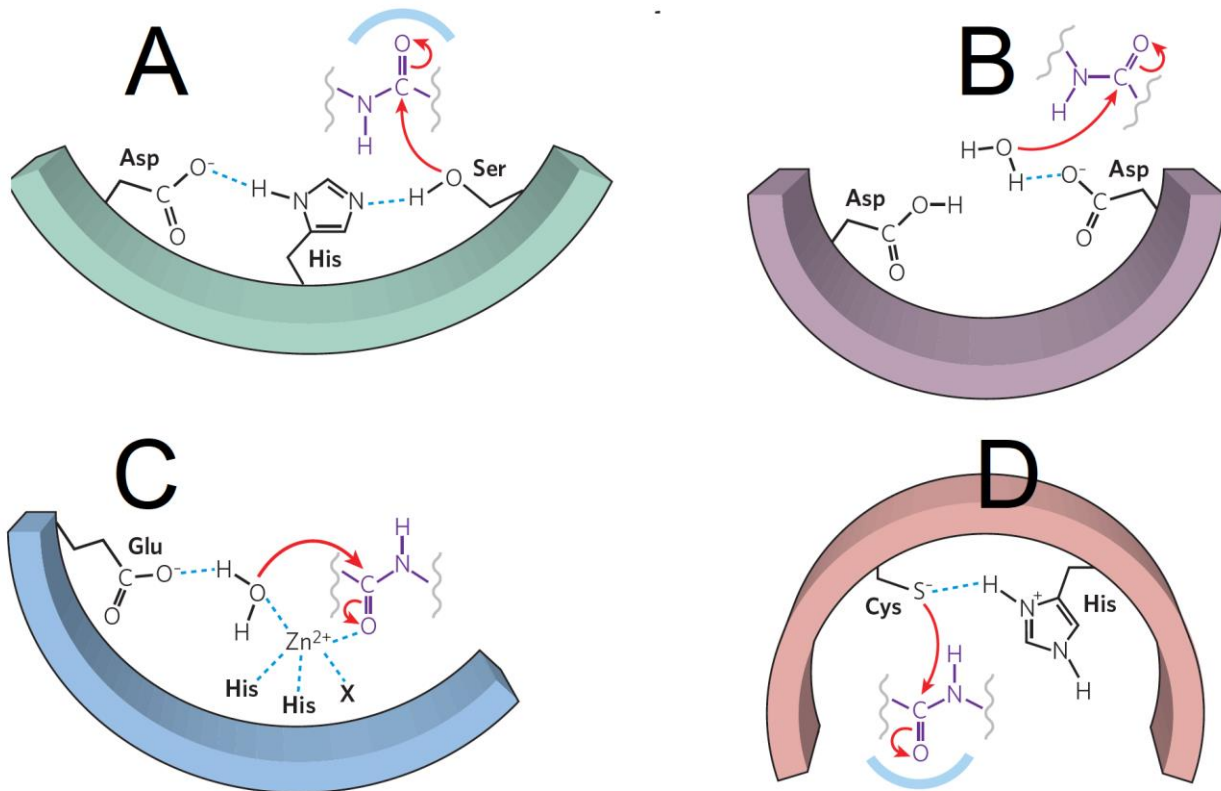


Figura 1.1. Mecanismos catalíticos de los principales tipos de proteasas: serínicas (A), aspárticas (B), metálicas (C) y cisteínicas (D). En los sitios activos de las proteasas serínicas y cisteínicas, el residuo catalítico suele ser activado mediante desprotonación facilitada por un residuo de histidina, lo que genera el nucleófilo encargado de atacar el enlace peptídico a romper. En contraste, las proteasas metálicas y aspárticas activan una molécula de agua que actúa como nucleófilo, en lugar de emplear un grupo funcional de la propia enzima. A pesar de estas diferencias en la activación del nucleófilo, el mecanismo general de escisión del enlace peptídico es, en esencia, similar en todas las clases de proteasas¹³.

1.4 Mecanismo catalítico de proteasas cisteínicas

Las PC están compuestas por una tríada catalítica en su sitio activo, que incluye los residuos Cys-His-Asn. El principio de su mecanismo catalítico radica en la formación de un intermediario covalente, involucrando los residuos de cisteína y de histidina. Este último, actúa como un donador de protones al sustrato, aumentando la nucleofilicidad de la cisteína. Esta a su vez, ataca al carbono del enlace peptídico reactivo, produciendo el primer tioéster intermedio tetraédrico en la reacción con liberación de una amina o un fragmento amino terminal, el cual se estabiliza mediante puentes de hidrógeno con el oxianión del sustrato y con un residuo de glutamina conservado. Finalmente, la hidrólisis del enlace tioéster conduce a la formación de un residuo de ácido carboxílico a partir del fragmento restante del sustrato²⁶. En la Figura 1.2 se ejemplifica este mecanismo en la papaína.

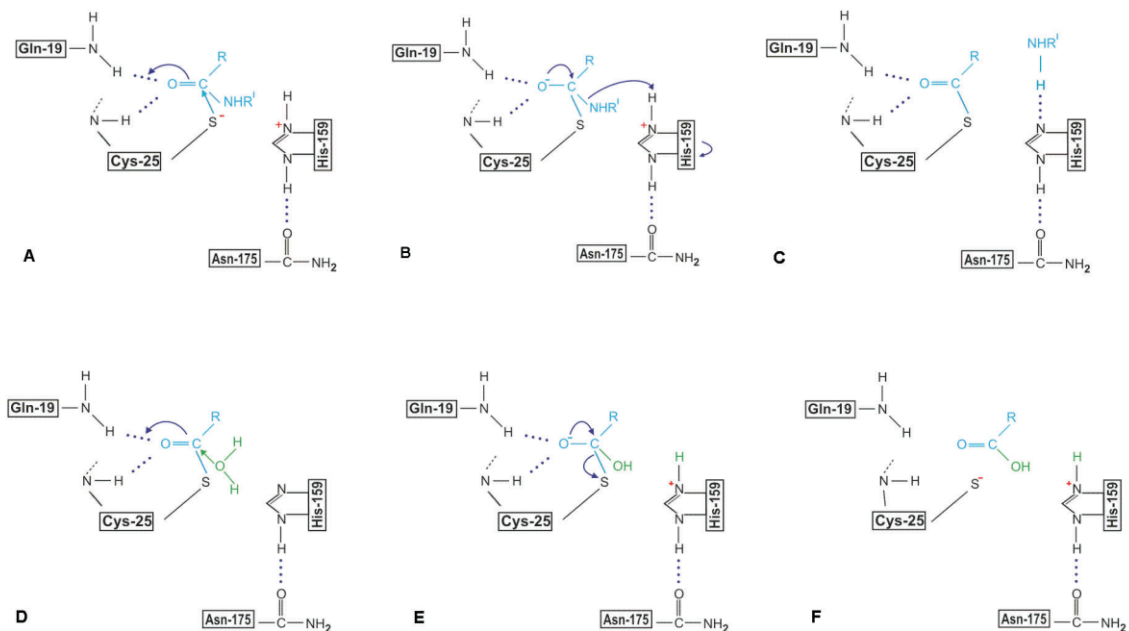


Figura 1.2. Mecanismo catalítico de la papaína. El anión tiolato ataca al carbono del enlace peptídico, convirtiendo doble enlace entre el carbono y oxígeno en un simple enlace(A). El oxígeno toma una carga neta negativa que posibilita la formación de un estado de transición tetraédrico. El oxianión se estabiliza al formar enlaces de hidrógeno con los grupos NH de las cadenas laterales de los residuos Gln19 y Cys25, lo que da lugar a la formación de la cavidad del oxianión (B). La rotación del residuo His facilita la transferencia de protones desde el catión imidazolio hacia el nitrógeno del enlace peptídico que se está hidrolizando, lo que conduce a la escisión. El sustrato recién formado está unido por enlace de hidrógeno a la His159, mientras la parte carboxílica del sustrato es enlazada a la Cys25 vía enlace tioéster, formando una acil-enzima (C). En la siguiente etapa de la reacción, la amina del sustrato se disocia y es reemplazada por una molécula de agua, cuya polarización es facilitada por el nitrógeno del imidazol y posibilita que la molécula de agua ataque el carbono del grupo carbonilo de la acil-enzima (D). Posteriormente se forma un intermediario tetraédrico (E). Finalmente, la desacilación del tioéster permite la reconstrucción del grupo carboxilo en el sustrato hidrolizado, lo que culmina con la liberación de una enzima activa (F)²⁶.

1.5 Cistatinas: Inhibidores de Proteasas Cisteínicas

Las Cistatinas comprenden una extensa familia de proteínas, denominada superfamilia de las Cistatinas, estas actúan como inhibidores competitivos y reversibles de proteasas Cisteínicas formando complejos con sus enzimas objetivos e inhabilitando su sitio catalítico²⁸. El equilibrio adecuado entre las PC libres y sus complejos con inhibidores es fundamental para el correcto funcionamiento de todos los sistemas vivos. Las cistatinas han sido ampliamente estudiadas y revisadas en la literatura, se han identificado proteínas que contienen dominios de cistatina pero que carecen de actividades inhibitoras de proteasas, y muy probablemente se describirán más en un futuro próximo. Estas proteínas junto con las cistatinas de las familias 1, 2, 3 y 4 constituyen la

superfamilia de cistatinas²⁹.

Desde su descubrimiento, la familia de las cistatinas ha crecido y ahora es una superfamilia que se puede clasificar en 4 familias principales, de las cuales, las primeras tres provienen de origen animal, y la cuarta de origen vegetal. Estas son: 1) Estefinas (estefina A y B; también conocidas como cistatina A y B), que son inhibidores no glicosilados de ~11 kDa, carecen de secuencia señal y enlaces disulfuro y generalmente se expresan intracelularmente. 2) Cistatinas, tienen masas moleculares en el intervalo de 13 a 14 kDa, contienen una secuencia señal y enlaces disulfuro en el extremo carboxilo de la molécula. Algunos miembros están glicosilados y la familia está representada por las cistatinas C, D, S, SA y SN. 3) Cininógenos, con masas moleculares en el intervalo de 88 a 114 kDa, están glicosilados y tienen tres dominios de cistatina de la familia 2, dos de los cuales (dominios 2 y 3) tienen actividades inhibitoras de proteasas. 4) Fitocistatinas, se dividen en tres grupos según su masa molecular. El grupo I incluye cistatinas de masa molecular baja, que varía entre 12 y 16 kDa, con un único dominio inhibidor tipo cistatina. El grupo II está formado por proteínas de alrededor de 23 kDa, que presentan una extensión en la región carboxilo terminal. Finalmente, el grupo III agrupa proteínas de aproximadamente 80 kDa, conocidas como multicistatinas, caracterizadas por la repetición de dominios inhibidores tipo cistatina^{29,31}.

1.6 Papel de las Cistatinas en la Medicina

Numerosos estudios concuerdan en que las PC desempeñan roles claves en la progresión de una amplia variedad de tumores. La progresión de un tumor hacia la metástasis implica la destrucción y remodelación de las matrices extracelulares durante la invasión local, la angiogénesis, la intravasación y la extravasación. Estos procesos son facilitados por proteasas serínicas, aspárticas y cisteínicas. Se ha descubierto que la catepsina B cisteinproteasa desempeña un rol importante en la invasión de las células tumorales. Estas enzimas se concentran en el borde de las células metastásicas móviles, donde disuelven las proteínas de la matriz extracelular para allanar el camino para el movimiento de las células. La actividad de estas proteasas es inhibida por las cistatinas, especialmente la cistatina C humana que también está presente extracelularmente y se encuentra en altas concentraciones en la saliva y otros fluidos corporales como el seminal, sinovial y cerebrospinal. Varios estudios han sugerido una relación inversa entre la etapa de progresión del tumor y los niveles de cistatinas en el microentorno tumoral. A medida que los tumores avanzan hacia la etapa final metastásica, los niveles de las cistatinas tanto en el citosol como en los espacios extracelulares se reducen drásticamente. Además, los estudios han demostrado una correlación

directa entre los altos niveles de cistatina C y un mejor pronóstico tumoral, mientras que niveles reducidos de Cistatina C están relacionados con un aumento en la actividad de proteasas que contribuyen a la neurodegeneración en condiciones como la esclerosis múltiple, esto sugiere que las cistatinas pueden ser utilizadas como biomarcadores en el diagnóstico y pronóstico del cáncer²⁹.

La Cistatina C se ha identificado como un marcador adecuado para la prueba de función renal, también conocida como tasa de filtración glomerular (TFG), se observó una excelente correlación entre la secreción de Cistatina C y la TFG, cuando se comparó con los marcadores exógenos estándar de la TFG, como el Cr-EDTA. Esta cistatina ha demostrado además ser un protector potencial contra el desarrollo de placas amiloides en el cerebro, como las que se encuentran en la enfermedad de Alzheimer, estabilizándolas y facilitando su eliminación. Además de inhibir proteasas, las cistatinas estabilizan las Metaloproteinasas de Matriz (MMPs), que participan en la remodelación tisular y el mantenimiento de la matriz extracelular. Esta función de estabilización es crucial en condiciones fisiológicas y en la prevención de autólisis de estas enzimas, lo cual tiene implicaciones en enfermedades degenerativas. Algunas cistatinas, tienen propiedades inmunomoduladoras que ayudan a regular la respuesta inflamatoria. Por ejemplo, en condiciones inflamatorias, pueden reducir la producción de citoquinas proinflamatorias y modulan la actividad de macrófagos, lo cual es relevante en enfermedades autoinmunes e infecciosas²⁹.

Los mecanismos por los cuales las cistatinas modulan la tumorigenicidad no solo se atribuyen a sus roles inhibitorios contra las PC. Estudios realizados por Sokol et al³⁰. identificaron la cistatina C como un nuevo antagonista de la señalización del TGF- β (factor de crecimiento transformador beta). Determinaron que esta interactúa físicamente con el receptor II del TGF- β , anulando así la unión del TGF- β a las células. Se sabe que el TGF- β tiene propiedades supresoras del crecimiento, especialmente en las células epiteliales normales, pero durante la progresión tumoral las propiedades supresoras del tumor del TGF- β a menudo se alteran, convirtiéndose en un poderoso factor de progresión para las células transformadas. La cistatina C es además el inhibidor dominante de PC en el líquido cefalorraquídeo; en la angiopatía amiloide, adultos jóvenes se ven afectados por hemorragia cerebral masiva, a menudo fatal. Esta enfermedad está asociada con una concentración anormalmente baja de cistatina C en el líquido cefalorraquídeo²⁹.

1.7 Relaciones termodinámicas de la unión Proteína Ligando

Las fuerzas impulsoras que regulan la unión entre proteínas y ligandos surgen de varias interacciones

e intercambios de energía entre la proteína, el ligando, el agua y los iones. La relación entre estas fuerzas y la estabilidad del complejo formado está dictada por las leyes de la termodinámica³².

La energía libre de Gibbs (G) es un potencial termodinámico y función de estado que mide la capacidad de un sistema para realizar trabajo máximo o reversible bajo condiciones de temperatura y presión constantes. Es uno de los parámetros termodinámicos fundamentales para describir las fuerzas impulsoras que gobiernan los procesos^{33,34}. En analogía con cualquier proceso espontáneo, la unión proteína–ligando ocurre sólo cuando el cambio en la energía libre de Gibbs (ΔG_U) del sistema es negativo a presión y temperatura constantes. Debido a que el grado de asociación proteína–ligando está determinado por la magnitud del ΔG_U negativo, se puede considerar que ΔG_U determina la estabilidad de cualquier complejo proteína–ligando o, alternativamente, la afinidad de unión de un ligando a un receptor determinado³⁴.

La energía libre de unión estándar, ΔG_U° , describe el cambio en la energía libre bajo condiciones de 1 atm, 298 K y a concentraciones efectivas de los reactivos (proteína, ligando y complejo) de 1 M. Esta se relaciona con la constante de unión, K_U , a través de la ecuación de Gibbs:

$$\Delta G_U^\circ = -RT \ln K_U \quad (1)$$

donde R es la constante universal de los gases ($1.987 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) y T es la temperatura en Kelvin. La ecuación (1) hace evidente que cuanto mayor es la constante de unión K_U , más negativa es la energía libre estándar de unión.

La energía libre de unión (ΔG_U) en cualquier momento durante una asociación (no necesariamente en condiciones de estado estándar) viene dada por:

$$\Delta G_U = \Delta G_U^\circ + RT \ln Q \quad (2)$$

Donde Q representa el cociente de reacción, definido como la proporción entre la concentración del complejo proteína–ligando y el producto de las concentraciones de proteína libre y ligando libre en un momento dado. Cuando Q es igual a K_U , la reacción de asociación alcanza el equilibrio, y ΔG_U se convierte en 0. ΔG_U puede descomponerse en sus componentes entálpicos y entrópicos utilizando la siguiente ecuación fundamental:

$$\Delta G_U = \Delta H_U - T \Delta S_U \quad (3)$$

donde ΔH_U y ΔS_U son el cambio en entalpía y entropía del sistema tras la unión, y T es la temperatura en Kelvin.

La entalpía es una medida de la energía total de un sistema termodinámico, es decir, la suma de las energías internas de los solutos y del disolvente y la cantidad de energía necesaria para hacer espacio

para el sistema (calculada como el producto del volumen del sistema y la presión)³⁵. En un proceso de unión, ΔH_U indica el cambio de energía que ocurre en el sistema al unirse la proteína al ligando. De hecho, el cambio de entalpía tras la unión es el resultado de la formación y la interrupción de muchas interacciones individuales, incluida la pérdida de los enlaces de hidrógeno, las interacciones de van der Waals y electrostáticas formadas entre proteína–disolvente, ligando–disolvente, la formación de enlaces no covalentes entre proteína–ligando, y la reorganización del disolvente alrededor de las superficies del complejo. Estos componentes individuales pueden hacer contribuciones favorables o desfavorables, y el cambio neto de entalpía es el resultado de la combinación de estas contribuciones^{36,37}.

La entropía es una medida de cuán uniformemente se distribuirá la energía térmica en el sistema termodinámico general. ΔS_U es una propiedad termodinámica global de un sistema, su signo positivo o negativo refleja el aumento o disminución general de los grados de libertad del sistema y se puede analizar en tres términos entrópicos:

$$\Delta S_U = \Delta S_{solv} + \Delta S_{conf} + \Delta S_{r/t} \quad (4)$$

donde ΔS_{solv} refleja el cambio de entropía del solvente que surge principalmente del reacondo del solvente en la superficie de contacto de la interfase proteína-ligando al unirse; ΔS_{conf} denota el cambio de entropía conformacional que refleja los cambios en la libertad conformacional tanto de la proteína como del ligando la unión; $\Delta S_{r/t}$ refleja la pérdida de grados de libertad rotacional y traslacional de la proteína y el ligando posterior a la formación del complejo^{37,38}.

2. ANTECEDENTES

2.1 Actinidina

El nombre actinidina, que deriva de *Actinidia*, el género de la planta de origen, y el primer informe de preparación cruda de una PC del kiwi (entonces conocido como "grosella china") fue realizado por Arcus (1959)³⁹, quien se vio impulsado a buscar una enzima de *A. chinensis* por la observación de que la incorporación de la fruta cruda a la gelatina de mesa impide que cuaje. McDowall (1970)⁴⁰ publicó el primer estudio de actinidina purificada hasta cristalinidad. Los trabajos realizados en la Universidad de Massey durante la década siguiente dieron lugar a la publicación de estudios detallados sobre su secuencia de aminoácidos (Carne & Moore, 1978)⁴¹, su estructura cristalográfica (Baker, 1973⁴², 1976⁴³, 1977⁴⁴, 1980⁴⁵; Baker & Dodson, 1980⁴⁶) y la especificidad y cinética de su actividad esterolítica (Baker, Boland, Calder, & Hardman, 1980⁴⁷; Boland, 1973⁴⁸; Boland & Hardman, 1973⁴⁹). Trabajos posteriores, realizados en gran parte en el Reino Unido, investigaron sus características catalíticas, características del sitio catalítico y campos electrostáticos dentro de la actinidina y enzimas relacionadas.

Se ha descubierto que la actinidina tiene efectos significativos en la digestión de las proteínas de los alimentos, proporcionando una mejor digestión del tracto superior (particularmente en el estómago) de una variedad de proteínas alimentarias. En el fruto de kiwi, si bien no se ha identificado ninguna función clara, la enzima comienza a acumularse en la fruta desde el principio y se sospecha que es importante para el desarrollo y protección de la fruta.

2.1.1 Estructura y propiedades

La actinidina es una proteína globular de cadena polipeptídica única, que de acuerdo con datos de UniProt se sintetiza como un polipéptido de 380 residuos de aminoácido, con un péptido señal inicial de 24 residuos, seguido de la región pro- inhibitoria con 102 residuos (24-126). La cadena madura de actinidina consta entonces de 254 residuos con una masa molecular de 27.5 kDa. Por otra parte, de acuerdo con la secuencia de aa de la estructura cristalográfica depositada en el PDB (Protein Data Bank) como 2ACT, la actinidina tiene una masa molecular de 23.7 kDa, correspondientes a una cadena de 220 residuos (Baker 1980).^{45,46}

Existen otros criterios en este sentido, Larocca, Rossano y Riccio (2010)⁵⁰ utilizando MALDI TOF-MS identificaron varias isoformas de actinidina con masas moleculares de 31.2, 30.3, 29.3 y 23.9

kDa, por su parte Grozdanovic *et al.*, (2013)⁵¹ y Chao (2016)⁵² obtuvieron la masa molecular de la actinidina por espectrometría de masas MALDI TOF-MS en modo de ionización positiva y el valor reportado fue de 23.8 kDa en cada caso. Otros estudios como Sugiyama *et al.*, (1996)⁵⁷ y Boland & Hardman (1973)⁴⁹ reportan pesos moleculares de 23.5 kDa y 26.0 ± 5.0 kDa respectivamente.

La proteína madura está plegada en una estructura de dos dominios: el dominio L (dominio I) que consta de los residuos 19-115 y 214-220 y el dominio R (dominio II) de los residuos 1-18 y 116-213 (Baker & Drenth, 1987)⁵³. El dominio L contiene tres regiones helicoidales, con la hélice principal atravesando el centro de la molécula en la interfaz entre los dos dominios. El dominio R forma una lámina B antiparalela torcida, con un interior hidrófobo. Los dos extremos están sellados por hélices cortas en la superficie molecular. Cada dominio se compone de un núcleo hidrofóbico, y la interfaz entre los dos dominios, donde se encuentra el sitio catalítico, se compone principalmente de cadenas laterales hidrofílicas. Estas cadenas laterales pueden interactuar además con una red de ocho moléculas de agua enterradas. La estructura se estabiliza aún más por la presencia de tres enlaces disulfuro: Cys22-Cys65, Cys56-Cys98 y Cys156-Cys206^{53,59}.

Estudios realizados han identificado una serie de formas ácidas y básicas de actinidina (Nieuwenhuizen *et al.*, 2007). Los análisis de etiquetas de secuencias expresadas (EST, por sus siglas en inglés) mostraron la presencia de ARN que codifica para diferentes proteínas de tipo actinidina en *A. deliciosa* y *A. chinensis* con valores de pI de 3,9 y 9,3⁵⁴. Además, se identificaron otros cuatro ARNm putativos de cisteínproteasa en *A. deliciosa* y *A. chinensis*^{55,56}. Anteriormente se había informado de la existencia de formas múltiples de actinidina (Sugiyama *et al.*, 1996⁵⁷; Tello-Solís *et al.*, 1995⁵⁸), pero en ausencia de secuencias completas de proteínas o ácidos nucleicos codificantes, no se podían entender las diferencias, y no se podían descartar modificaciones postraduccionales de la cadena lateral, hidrólisis C-terminal o artefactos de la preparación.

La estructura cristalográfica determinada por refinamiento cristalográfico a una resolución de 1.7 Å, está registrada en el Banco de Datos de Proteínas (PDB: Protein Data Bank) con el código 2ACT⁴⁵ y presenta una cadena que contiene dos dominios estructurales: uno compuesto principalmente de hélices α y el otro formado por hebras β antiparalelas (Figura 2.1). Además, posee una tríada catalítica de compuesta por los residuos Cys25, His162 y Asn182, localizados en la hendidura que separa ambos dominios.

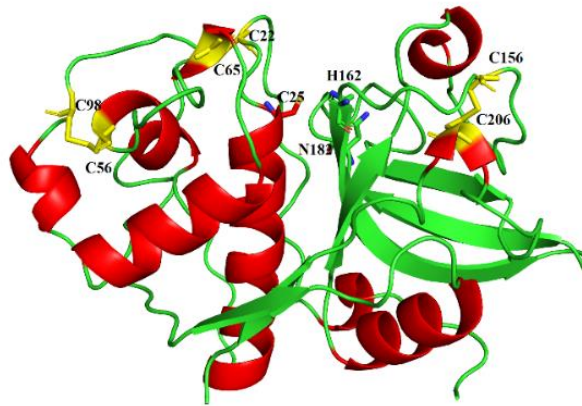


Figura 2.1. Estructura cristalográfica de la actinidina (PDB: 2ACT). La estructura fue representada empleando el software PyMOL 2.5.0. Los puentes disulfuros se muestran de color amarillo mientras la triada catalítica Cys25, His162 y Asn182 se muestra en el interdominio.

2.2 Cistatina C Humana

La cistatina C humana (CCH) es un inhibidor que actúa sobre las cisteinproteasas de la familia 2 que son similares a la papaína. A diferencia de otras cistatinas, la CCH se produce en todas las células nucleadas del organismo, está compuesta por una única cadena polipeptídica codificada por un gen de 7.3 kbp localizado en el cromosoma 20 y se sintetiza además junto con un segmento peptídico adicional. Estructuralmente, la CCH presenta cinco hebras formando una lámina β antiparalela, que abraza una hélice α de cinco giros (Figura 2.2B). En su forma madura y activa, su masa molecular es de 13.4 kDa y está formada por 120 residuos de aminoácidos. No se encuentra glicosilada y posee dos puentes disulfuro, que conectan los residuos 73–83 y 97–117^{63,66}.

En ciertos procesos fisiopatológicos cuya naturaleza todavía no se ha esclarecido, la CCH se encuentra codepositada en las placas amiloides asociadas al Síndrome de Down y el Alzheimer. En la variante natural L68Q, las propiedades amiloidogénicas de la CCH se incrementan de manera considerable, lo que conduce a una angiopatía amiloide cerebral letal en los primeros años de la adultez⁵⁹⁻⁶¹.

En todas las estructuras cristalinas de cistatina C nativa analizadas, se ha observado que, al aumentar su concentración, la proteína forma dímeros con un intercambio de dominios, originados a través de un cambio conformacional de un bucle beta en horquilla L1. Nilsson *et al.*,⁶² desarrollaron un monómero que resiste la dimerización, al introducir un enlace disulfuro entre los residuos 47 y 69 de la secuencia de aminoácidos, lo cual lograron mediante la sustitución de la leucina en la posición 47 y la glicina en la posición 69 por cisteínas (L47C y G69C). La variante estabilizada de cistatina

C (CCE) disminuyó significativamente tanto la dimerización como la formación de fibrillas, manteniendo su capacidad inhibitoria frente a cisteinproteasas. La estructura tridimensional de la CCE fue determinada por difracción de rayos X en 2010 por R. Kolodziejczyk *et al.*,⁶⁵ confirmando el éxito de la ingeniería de proteínas para evitar el intercambio de dominios.

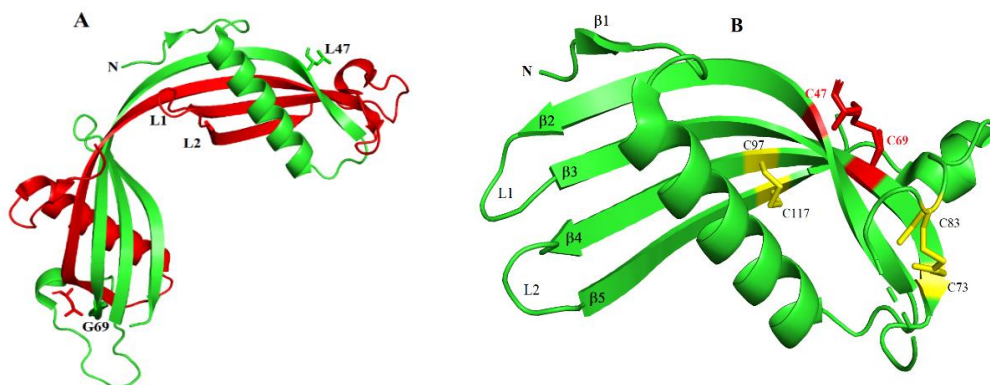


Figura 2.2. Estructuras cristalográficas de la CCH nativa y su mutante estabilizada CCE. En A, CCH nativa (PDB: 1G96), se muestra el dímero con dominios intercambiados. Tiene un dominio de plegamiento similar al monomérico CCE, pero compuesto por dos moléculas (roja y verde). Todos los elementos estructurales del pliegue monomérico se conservan, excepto el bucle L1. En (B) se observa la CCE plegada como monómero (PDB: 3GAX), L47C y G69C en rojo denotan los sitios de mutación introducidos para establecer un enlace disulfuro entre las cadenas $\beta 2$ y $\beta 3$, los puentes disulfuros restantes se muestran de color amarillo. La estructura se representó con el software PyMOL 2.5.0.

2.3 Interacción Cisteinproteasas – Cistatinas

La investigación sobre proteasas y sus inhibidores se enfoca en maximizar sus aplicaciones en medicina, biotecnología, agricultura y otros campos industriales. Se han documentado estudios que utilizan estos inhibidores en el tratamiento de afecciones como artritis, arteriosclerosis, cáncer, diabetes, gingivitis periodontal, pancreatitis, en trastornos hepáticos, pulmonares, cardíacos, renales, musculares, así como en enfermedades neurodegenerativas que incluyen la enfermedad de Batten y el Alzheimer^{60,61,67}.

En el caso de las interacciones cisteinproteasas–cistatinas, están reportados estudios con cistatina de clara de huevo (CEW) donde las constantes de unión varían ampliamente, entre 10^6 y 10^{14} M^{-1} . La constante de la unión (K_U) del complejo CEW–quimopapaína presenta una dependencia en función la fuerza iónica (I) y el pH y su asociación está regulada por una interacción electrostática⁶⁸. Estas interacciones están influenciadas por el pH del medio, que determina el estado de protonación de los residuos ionizables en la interfaz del complejo, de acuerdo con su pK_a en las formas separada o asociada de las proteínas, lo cual influye en la energía de unión electrostática⁶⁸. Tovar Anaya *et al.*, 2019⁶⁴ estudiaron la interacción entre la cistatina C humana nativa (CCH) y su

variante estabilizada (CCE) con la proteasa quimopapaína de papaya (*Carica papaya*) y concluyeron en que el puente disulfuro adicional introducido en CCE evita la dimerización y la formación de oligómeros, lo que la convierte en una mejor candidata que la cistatina C silvestre para investigar la afinidad hacia diversas proteasas cisteínicas.

Se han llevado a cabo múltiples estudios cinéticos, espectroscópicos y cristalográficos para esclarecer el mecanismo de inhibición de las cisteinproteasas por cistatinas. Los resultados han demostrado que el inhibidor se une en un proceso de un solo paso, reversible y de segundo orden, y que incluso las proteasas con su sitio catalítico bloqueado pueden unirse a las cistatinas, aunque con menor afinidad^{69,70}. Esto sugiere que las interacciones entre cisteinproteasas y cistatinas no se limitan a una simple reacción con el residuo catalítico de cisteína de la enzima, como ocurre con los sustratos, sino que involucran contactos entre las regiones de unión de las cistatinas y los residuos específicos que conforman los sitios de unión en la enzima. Pese a su modo de inhibición similar y a su homología estructural, las cistatinas presentan afinidades enzimáticas muy variables, como se ilustra en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Constantes de inhibición K_i [nM] de complejos enzima–cistatina⁷⁶

Cistatinas	Proteasas Cisteínicas				
	Papaína	Catepsina B	Catepsina H	Catepsina L	Catepsina S
A	0.019 ^a	8.2 ^a	0.31 ^a	1.3 ^a	0.05 ^a
B	0.12 ^a	73 ^a	0.58 ^a	0.23 ^a	0.07 ^a
C	0.000011 ^b	0.25 ^a	0.28 ^a	<0.005 ^a	0.008 ^a
D	1.2 ^a	>1000 ^a	8.5 ^a	25 ^a	0.24 ^a
E	0.39 ^c	32 ^c	-	-	-
F	1.1 ^d	>1000 ^d	-	0.31 ^d	-
S	108 ^a	-	-	-	-
SA	0.32 ^a	-	-	-	-
SN	0.016 ^a	19 ^a	-	-	-
H-cininógenos	0.02 ^e	400 ^f	1.1 ^f	0.109 ^f	-
L-cininógenos	0.015 ^a	600 ^a	0.72 ^a	0.017 ^a	-

Ref: a [70]; b [71]; c [72]; d [73]; e [74]; f [75].

A partir de los estudios realizados se determinó que las cistatinas poseen tres regiones cruciales en la interacción con las proteasas cisteínicas, estas regiones incluyen el fragmento N-terminal y los llamados primer y segundo bucle que están ubicados en un extremo de la molécula, estos interactúan directamente con la hendidura catalítica de las PC. Se concluyó además que el fragmento N-terminal es sumamente importante para la actividad inhibitoria de la cistatina C humana (CCH) y que la mayor contribución a la afinidad total se debe a la unión de los residuos

inhibidores Arg8, Leu9 y Val10 en los subsitios S4, S3 y S2 de la enzima^{76,77}. Estudios con péptidos sintéticos correspondientes a la secuencia N-terminal de CCH mostraron que eran muy buenos sustratos de papaína y que la escisión tuvo lugar en el enlace peptídico Gly11-Gly12⁷⁷. A partir del complejo de Cistatina B Humana (Estefina B) con Papaína (código PDB: 1STF) se muestra que las interacciones entre la enzima y las cistatinas está formada por los residuos de aminoácidos del segmento N-terminal que ocupa subsitios de la enzima, así como por dos fragmentos adicionales en bucles de horquilla: uno en el medio y otro en el segmento C-terminal de la proteína. También se ha propuesto que los residuos de aminoácidos hidrofóbicos del primer bucle, así como el residuo de triptófano del segundo bucle ocupan los subsitios de la enzima⁷⁸.

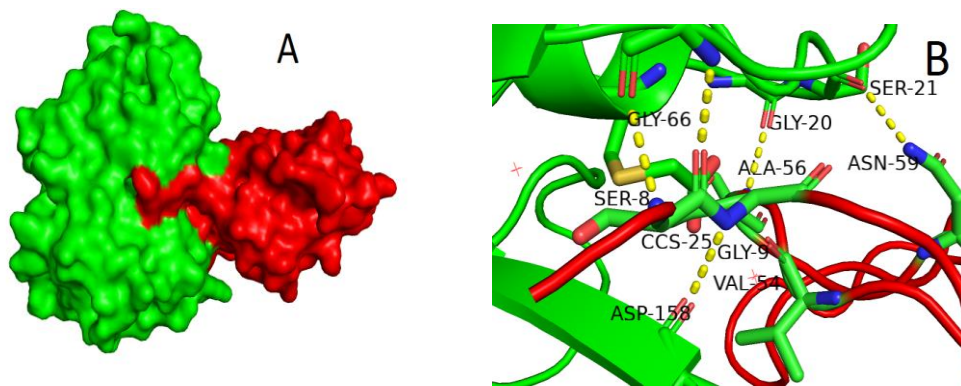


Figura 2.3. Interfaz entre estefina B (rojo) y papaína (verde) (PDB 1STF). La estructura se realizó con el software PyMOL 2.5.0. La superficie de la cuña de Estefina B es complementaria a la ranura del sitio activo de la molécula de papaína (A). El análisis del área de superficie accesible de los componentes proteicos separados y acoplados al complejo muestra que un área total de $1,117\text{Å}^2$ (de un total de $6,907\text{Å}^2$) de Estefina queda enterrada en el complejo, junto con 977Å^2 (de $10,612\text{Å}^2$) de Papaína, utilizando un radio de prueba de 1.4Å . Esto da como resultado una superficie total accesible de $15,438\text{Å}^2$, y una superficie total oculta de $2,094\text{Å}^2$, alrededor del 10% de la superficie de los componentes separados⁷⁸. En B se muestran en amarillo los puentes de hidrógeno de la interfaz del complejo.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Determinar los parámetros termodinámicos de la asociación del inhibidor cistatina C humana en su variante estabilizada L47C/G69C (CCE) con la proteasa actinidina.

3.2 Objetivos Particulares

1. Purificar a homogeneidad la actinidina aislada del fruto del kiwi (*Actinidia deliciosa*).
2. Expresar y purificar a homogeneidad la cistatina C humana variante L47C/G69C (CCE).
3. Verificar la integridad estructural y funcional de las proteínas purificadas.
4. Determinar los parámetros termodinámicos de la unión del complejo actinidina–CCE a pH 7.0 y 35.0 °C (K_U , ΔG_U , ΔH_U y ΔS_U).
5. Modelar la estructura del complejo CCE-actinidina y caracterizar su interfase.
6. Comparar los parámetros termodinámicos de unión de los complejos CCE-actinidina y CCE-quimopapaína, y correlacionar sus diferencias respecto a las estructuras de sus interfaces.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Aislamiento y purificación de la actinidina

La actinidina fue purificada del fruto de kiwi (*Actinidia chinensis*), el proceso comprendió las siguientes etapas (Tello Solís *et al.*, 1995⁵⁸):

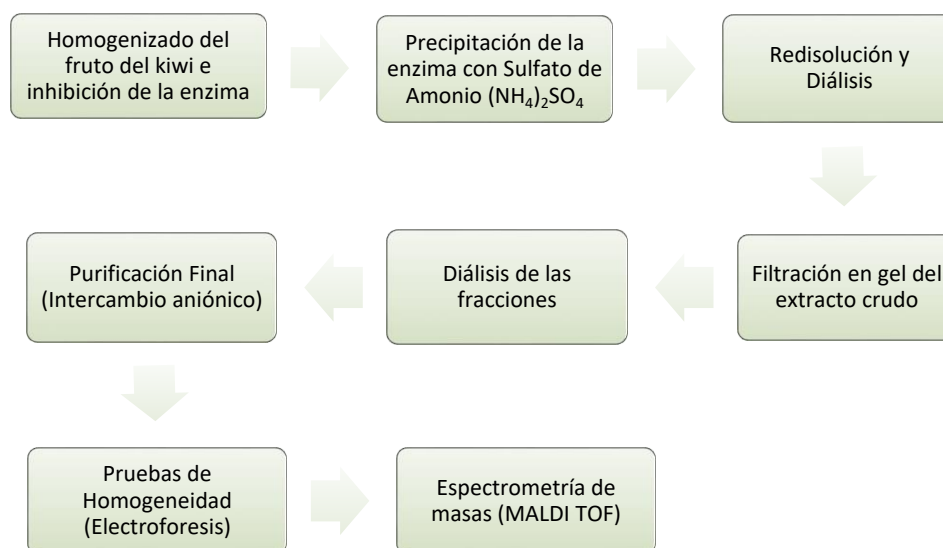


Figura 4.1 Representación esquemática de las etapas del proceso de purificación de la actinidina.

Para evitar la autohidrólisis durante el proceso de purificación, la cisteína catalítica de la actinidina (Cys25) se bloqueó utilizando el inhibidor reversible metilmetanotiosulfonato (MMTS). Se homogeneizó la pulpa de 1.0 kg de kiwi en 0.50 L de tampón de fosfatos 50 mM, pH 6.5, que contenía 5.0 mM de MMTS y 1.0 mM de EDTA. La mezcla resultante se sometió a centrifugación durante 30 minutos en una centrífuga Hermle Z383K a una velocidad de 10,731 g a 4 °C y la enzima fue precipitada del sobrenadante mediante saturación al 75% con sulfato de amonio por 48 horas a 4°C. Posteriormente, se realizó una centrifugación para recuperar el precipitado. Este precipitado se resuspendió en tampón de fosfatos de 50 mM, pH 6.5, y se dializó contra agua desionizada durante 72 horas a 4°C.

Cinco mililitros del extracto crudo, que contenían aproximadamente de 2.0 mg/mL de proteína, fueron inyectados en una columna de filtración en gel HiLoad 16/600, acoplada a un sistema cromatográfico ÄKTA Pure Avant y equilibrada con tampón de fosfato a pH 6.5. La elución se llevó a cabo utilizando el mismo tampón y las fracciones se recolectaron en volúmenes de 5.0 mL cada una. Las fracciones recolectadas se sometieron a pruebas de actividad proteolítica tras su

reactivación con L-cisteína. Las que mostraron actividad fueron concentradas utilizando el sistema Amicon y luego, para evaluar el tamaño y la homogeneidad hasta este punto del proceso, las fracciones fueron analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). Posteriormente se dializaron contra tampón de acetato de 50 mM y pH 5.5.

Alícuotas de proteína de 1.0 mL que contenían alrededor de 1.5 mg/mL fueron inyectadas en una columna de intercambio aniónico Mono Q™ 4.6/100 PE, previamente equilibrada con tampón de acetatos 50 mM, pH 5.5. Los analitos cromatográficos fueron eluidos de la columna a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min, usando un gradiente lineal de 0 a 1.0 M de NaCl disuelto en el mismo tampón. Posteriormente las fracciones recuperadas fueron analizadas por SDS-PAGE para verificar su homogeneidad.

4.2 Actividad Proteolítica de la actinidina

La actividad proteolítica de la actinidina se determinó a pH 6.0 mediante el método de Kunitz⁷⁷, se usó caseína al 2% w/v en tampón de fosfatos 0.05 M como sustrato. La actinidina contenida 200 µl de solución pura (0.4 mg/mL) fue reactivada con 150 µl de L-cisteína 100 mM e incubada por 1 minuto a 40 °C. Posteriormente, 1.0 mL de sustrato fue añadido a la solución e incubado por 10 min a 40 °C. La reacción fue detenida añadiendo 2.0 mL de ácido tricloroacético al 5% v/v. Para separar el precipitado 1.0 mL de solución se centrifugó en una Microcentrífuga Thermo IEC Microlite 3580, durante 10 min a 13,400 g. Inmediatamente se registró la absorbancia del sobrenadante a 280 nm, definiendo la unidad de actividad enzimática, como la cantidad de enzima que produce un aumento en absorbancia de una unidad por minuto, bajo las condiciones del ensayo. Como blanco se sustituyeron los 200 µl de actinidina por agua desionizada y se mantuvieron las demás condiciones del ensayo.

La actividad específica (AE) se calculó mediante la ecuación:

$$AE = \frac{\Delta A_{280}}{c \left(\frac{mg}{ml} \right) (10min)(0.2ml)} \quad (5)$$

Donde: ΔA_{280} es el cambio de Absorbancia a 280 nm causado por la liberación de péptidos con residuos aromáticos por acción de la enzima y c es la concentración de actinidina en la mezcla del ensayo.

4.3 Expresión de la cistatina C estabilizada

Escherichia coli es una bacteria utilizada extensamente en biotecnología y en ingeniería genética para la producción de proteínas recombinantes, debido a su rápida tasa de reproducción y facilidad

de cultivo, lo que permite obtener grandes cantidades de proteínas en un corto período. En este estudio, se obtuvieron proteínas recombinantes a partir del gen que codifica la cistatina C estabilizada (CCE).

Para ello, se transformaron células de la cepa *SHuffle T7 Express C3029* de *Escherichia coli* con el vector de expresión pET-24a(+)-CCE. Luego, se cultivaron en medio de LB agar con 25 µg/mL de kanamicina. Las colonias crecieron durante 24 horas a 30°C, y al alcanzar aproximadamente 2.0 mm de diámetro, se seleccionaron cuatro. Cada una fue inoculada usando la técnica de palillo y cultivada por separado en 5.0 mL de medio LB con 25 µg/mL de kanamicina, a 30°C y con agitación constante de 220 rpm en una incubadora vibratoria de sobremesa Labnet 222-DS.

La densidad óptica de los cultivos se midió a una longitud de onda de 600 nm, y cuando estuvo entre 0.4 y 0.8 unidades de absorbancia, se agregó isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0.4 mM para inducir la sobreexpresión.

Los cultivos fueron centrifugados a 10,731 g en una centrifuga Hermle Z383K durante 12 minutos a 4 °C. El precipitado se resuspendió en un tampón de fosfato a pH 7.4, y se añadió fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) a 1.0 mM para evitar la degradación proteica por acción de las proteasas. Las células fueron lisadas en frío mediante sonicación, con ciclos de 2 minutos, seguidos de 1 minuto de descanso, repitiéndose tres veces, utilizando un Branson Ultrasonics SONIFIER 450. El lisado se centrifugó a 10,731 g en la misma centrífuga Hermle por 20 minutos a 4°C, y se recuperó el sobrenadante, a partir del cual se llevó a cabo la purificación final.

4.4 Purificación de la CCE

Para el cultivo bacteriano, se efectuó un escalamiento de 1 a 100, utilizando 500 mL de medio LB en matraces de 2.0 L, suplementados con kanamicina a una concentración de 25 µg/mL. La densidad óptica se monitorizó a 600 nm y al alcanzar un intervalo requerido (0.4-0.8 UA), se procedió a inducir la sobreexpresión de proteínas mediante la adición de IPTG 0.4 mM. El cultivo se dejó incubar durante la noche a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 10,731 g en una centrífuga Hermle Z383K durante 12 minutos a 4 °C. A continuación, se añadió PMSF a una concentración de 1.0 mM y se llevó a cabo el procedimiento de lisado descrito anteriormente. Una vez lisado los cultivos estos se centrifugaron en la misma centrífuga a 10,731 g por 20 minutos a 4 °C, y se recolectó el sobrenadante. La fase final de purificación se realizó mediante cromatografía de intercambio catiónico, utilizando una columna Hi Trap SP XL de 5.0 mL, previamente equilibrada con un tampón de fosfato de 20 mM, pH 6.0. Los componentes fueron eluidos de la columna a una

velocidad de flujo de 1.0 mL/min, aplicando un gradiente lineal de 0 a 1.0 M de NaCl disuelto en el mismo tampón.

4.5 Ensayo de actividad inhibitoria de la CCE

El ensayo de actividad inhibitoria tiene como objetivo demostrar que la actividad hidrolítica de la papaína es inhibida en presencia de CCE. Para comprobarlo, se modificó el método colorimétrico propuesto por Barret (1981)⁸⁰, que se basa en la inhibición de la actividad peptidasa de papaína sobre el sustrato N-benzoil-arginina-p-nitroanilida (BApNA), ver Figura 4.2. Se utilizó la papaína comercial marca SIGMA, P-4762, lote: 121K7680 y el BApNA marca SIGMA lote:119C-0415

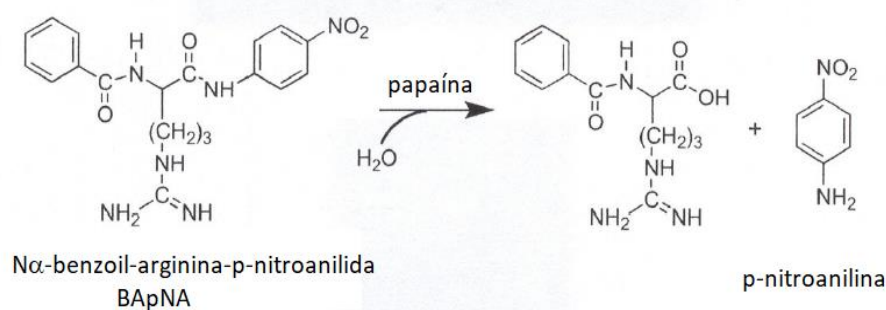


Figura 4.2 Hidrólisis del sustrato BApNA por papaína.

La papaína en concentración 30 μM (0.73 mg/mL) y disuelta en amortiguador Tris-base 20 mM, pH8.0, fue incubada y activada con L-cisteína 5.0 mM durante 5 minutos a 40 °C. Se preparó una solución stock 10 mM de sustrato BApNA disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO). En la celda de reacción, la concentración final de sustrato fue de 1.0, 1.2 y 1.5 mM. El volumen total en la celda de reacción fue de 1.0 mL. La cinética de la reacción se siguió durante 10 minutos a una longitud de onda de 410 nm. Se empleó un Espectrofotómetro UV-1800 Shimadzu de doble haz con una celda de cuarzo de 1.0 cm de paso óptico.

4.6 Dicroísmo Circular

La medición de la actividad óptica en proteínas, atribuible a los enlaces peptídicos, se realiza en la región del ultravioleta lejano, entre 185 y 250 nm, por lo que, para verificar la integridad estructural de las proteínas purificadas, actinidina y CCE, sus espectros de dicroísmo circular (DC) se registraron en la región de 190 a 250 nm. Esta técnica espectroscópica es ideal para determinar la estructura

secundaria y evaluar las propiedades de plegamiento de proteínas, definiéndose como la diferencia en la absorción de luz circularmente polarizada hacia la izquierda y hacia la derecha. Los espectros de DC fueron obtenidos a 25 °C utilizando un espectropolarímetro Jasco J715 con una celda de 0.10 cm de paso óptico. Las muestras de CCE y actinidina fueron dializadas contra un tampón de fosfato 10 mM, pH 7.0, y se ajustaron a una concentración de 0.10 mg/mL. Se utilizó el espectro del tampón como blanco.

4.7 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una técnica analítica que implica la ionización de las muestras en moléculas con carga, permitiendo la medición de la relación masa-carga (m/z). Mediante esta técnica se pueden analizar mezclas de proteínas, es particularmente útil para determinar el peso molecular, identificar secuencias y cuantificar el contenido de proteínas. Para eliminar los iones del amortiguador de pH en las muestras, las alícuotas de CCE y actinidina fueron dializadas contra agua desionizada, posteriormente ambas se concentraron hasta 1.0 mg/mL de proteína y se enviaron a los Laboratorios de Servicios Analíticos del Instituto de Química de la UNAM. Ambas muestras fueron mezcladas con una matriz de ácido sinapínico (SA) en una proporción de 1.5:5. Los espectros de masa se obtuvieron en modo lineal con una polaridad de voltaje positivo realizando 300 disparos para cada uno. Se utilizó el método LP_12kDa.par. Los espectros obtenidos fueron calibrados utilizando la lista de referencia "1-9 KDa CalibStandard_eren". Se empleó la técnica MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight) en un espectrómetro Maldi-Tof MicroFlex Bruker Daltonics.

4.8 Construcción del complejo CCE–actinidina

Se creó un modelo atómico CCE–actinidina a través del acoplamiento molecular de ambas proteínas, procedimiento conocido como *docking*. Se partió de las estructuras de las proteínas libres dispuestas en el PDB, actinidina (2ACT) y cistatina C estabilizada (3GAX). Dado que la estructura cristalográfica de la CCE registrada en el PDB está truncada en la Gly12 y faltan los residuos Pro78 y Asn79 es necesario añadir algunos de los aminoácidos faltantes, para esto se utilizó el software PyMOL 2.5.0 y posteriormente mediante el software ModLoop: (*Modeling of Loops in Protein Structures*)⁸¹ la estructura fue sometida a una minimización de energía para refinar sus geometrías y asegurar la conformación energéticamente más favorable de los residuos añadidos. En el caso de la estructura cristalográfica depositada en el PDB para la actinidina (PDB:2ACT), posee la cisteína catalítica oxidada, por lo que fue sustituida por una cisteína reducida.

Ambas proteínas se sometieron individualmente a simulaciones de dinámica molecular con el propósito de relajar sus estructuras, para ello se utilizó el software GROMACS 2023.1, aplicando el campo de fuerzas AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement)⁸². Antes de iniciar las simulaciones, los estados de ionización de las cadenas laterales en la CCE y la actinidina a pH 7.0 fueron determinados utilizando los valores de pK_a proporcionados por la herramienta PROPKA integrada al servidor PDB2PQR⁸³. Las proteínas se prepararon usando CHARMM-GUI⁸⁴, se colocaron de forma individual en cajas cúbicas de agua, con una distancia mínima de 10 Å entre el borde de la caja y la proteína. Posteriormente, se ionizaron para neutralizar la carga total y solvadas utilizando moléculas de agua TIP4P-épsilon⁸⁷.

La simulación de dinámica molecular se llevó a cabo en un conjunto NPT, utilizando un paso de tiempo de 2 fs, a una temperatura de 308.15 K y una presión de 1.0 bar, durante un período de 100 ns. Para el control de temperatura y presión se emplearon un termostato de escalamiento de velocidades y un barostato Parrinello-Rahman, respectivamente. El algoritmo LINCS se utilizó para restringir las longitudes de los enlaces covalentes. Las interacciones electrostáticas de corto alcance y las de van der Waals se limitaron a 0.9 nm, mientras que las fuerzas electrostáticas de largo alcance se calcularon utilizando el método de malla de partícula de Ewald. Posterior a la simulación se determinó la raíz de desviación cuadrática media (RMSD), la raíz de la fluctuación cuadrática media (RMSF) y el radio de giro (Rg).

Para determinar las estructuras representativas más favorables se realizó un proceso de agrupamiento (*clustering*) mediante el software TTCLUST en su versión 4.3.10. Se seleccionó además como plantilla la estructura cristalográfica de un complejo homólogo registrado en el PDB, (estefina B–papaína, PDB: 1STF), como plantilla para identificar los aminoácidos que podrían formar la interfaz. Simultáneamente, se realizó un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas libres que forman parte de complejos homólogos resueltos, para calcular su porcentaje de identidad en comparación con la actinidina y la CCE, según el caso. Este alineamiento se llevó a cabo utilizando el servidor *Clustal Omega Multiple Sequence Alignment*⁸⁵.

De acuerdo con las alineaciones con mayor porcentaje de identidad y a la estructura del modelo homólogo, se elaboró una lista de aminoácidos potenciales que podrían intervenir en la formación del complejo CCE–actinidina. Esta lista se utilizó como referencia para crear el modelo mediante acoplamiento molecular.

Con los archivos generados del *clustering* de las simulaciones de dinámica molecular a 308.15 K de

la CCE (PDB 3GAX) y la actinidina (PDB: 2ACT), se construyeron los modelos por acoplamiento molecular, para ello se empleó el servidor pyDockweb, (*Structural prediction of protein-protein interactions*)⁸⁶, el cual nos permite establecer restricciones en los posibles aminoácidos involucrados en la interfaz del complejo. Los modelos con las puntuaciones más altas generados por el servidor fueron superpuestos a la estructura cristalográfica usada como plantilla, calculando la desviación cuadrática media (RMSD) en relación con la posición de los carbonos alfa (C α) considerando las coincidencias en las estructuras secundarias. El modelo con el menor valor de RMSD fue seleccionado.

4.8.1 Simulación de Dinámica Molecular del modelo del complejo

Se realizó una dinámica molecular para evaluar la estructura del complejo, utilizando el software GROMACS 2023.1 y el campo de fuerzas AMBER⁸³. El modelo obtenido mediante docking se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección anterior para las proteínas individuales. Asimismo, la simulación de dinámica molecular se llevó a cabo estableciendo los mismos parámetros que se usaron en las simulaciones de las proteínas por separado, pero extendiendo el tiempo de simulación a 200 ns.

Con los datos obtenidos de la simulación se calcularon los valores de RMSD, RMSF, Radio de giro(Rg), Superficie Accesible al solvente (ASA), se realizó además un Análisis del Componente Principal, (PCA, por sus siglas en inglés). Finalmente se realizó un *clustering* sobre las trayectorias aisladas de los mínimos de energía resultantes del análisis de PCA.

4.8.2 Análisis estructural de la interfaz de los complejos CCE–proteasas

La interfaz del modelo obtenido CCE–actinidina fue comparada con la del modelo obtenido por Tovar Anaya *et al.*, 2019⁶⁴ para el complejo CCE–quimopapaína, para ello se utilizó software PDBsum (Pictorial database of 3D structures in the Protein Data Bank)⁸⁹. En ambas interfaces se identificaron los residuos que interactuaban, utilizando un radio de corte de 4.0 Å de cualquier átomo de la cadena opuesta como criterio. Las propiedades estructurales que se compararon incluyeron la cantidad de puentes de hidrógeno (N_{PH}) y de pares iónicos (N_{PS}), el área de superficie de contacto, cuantificada mediante la diferencia en el área de superficie accesible al solvente (ΔASA) entre el complejo y la suma de las áreas de las proteínas individuales, se analizaron por separado las contribuciones polares (ΔASA_p) y no polares (ΔASA_{np}) al ΔASA utilizando un radio de prueba de 1.4 Å. Todas las estructuras se trabajaron con el software PyMOL 2.5.0.

El valor teórico de ΔH_U del complejo se determinó relacionando este parámetro con el tamaño del área superficial oculta en la interfaz del complejo. Esta área se calcula en función de los cambios en el área superficial accesible al solvente⁹¹. La parte del área que queda oculta al solvente se describe mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta ASA = ASA_{COMPLEJO} - (ASA_{ACTINIDINA} + ASA_{CCE}) \quad (7)$$

$$ASA = \Delta ASA_p + \Delta ASA_{ap} \quad (8)$$

Donde: ΔASA_p son las contribuciones polares al área superficial accesible a la solvente y ΔASA_{ap} son las contribuciones apolares al área superficial accesible a la solvente.

Por otra parte, ΔH_U teórico está dada por la siguiente ecuación:

$$\Delta H_U = \Delta h_p \Delta ASA_p + \Delta h_{ap} \Delta ASA_{ap} \quad (9)$$

Donde: Δh_p y Δh_{ap} representan los coeficientes de proporcionalidad para ΔH_U

Tabla 4.2. Coeficientes de proporcionalidad para la entalpía de unión (ΔH_U) de acuerdo a su contribución por unidad de área polar y apolar.

ΔH_U	Δh_p (cal/mol Å ²)	Δh_{ap} (cal/mol Å ²)
García & Hernández ⁹¹	19.4	-7.0
Luque & Freire ⁹²	31.4	-8.44

Se realizó además el cálculo de MMPBSA (*Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area*), para determinar los residuos con mayor aporte a la energía libre de unión en la formación del complejo. El cálculo se realizó sobre las trayectorias aisladas de los mínimos de energía resultantes del análisis de PCA.

4.9 Calorimetría de Titulación Isotérmica

La Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC) proporciona datos termodinámicos cuantitativos de la estabilidad del complejo enzima–inhibidor que permiten dilucidar las fuerzas impulsoras del proceso. Esta técnica mide directamente el intercambio de calor durante la formación de complejos a una temperatura constante, por esta razón se ha convertido en un método de referencia para evaluar las contribuciones entálpica y entrópica que impulsan el proceso de unión, la así llamada firma termodinámica. De un mismo experimento de ITC, obtenemos las firmas termodinámicas K_U , ΔH_U y el número de sitios de unión (n), mientras que ΔG_U y ΔS_U , los podemos calcular a partir de las ecuaciones 1 y 3, respectivamente.

Antes de proceder con los experimentos de ITC, se llevó a cabo la diálisis de ambas proteínas, las cuales, se colocaron simultáneamente en tampón de fosfatos 10 mM a pH 7.0, compuesto por 78 mM de NaCl con el fin de establecer una fuerza iónica de 0.1 M. Cuando las muestras alcanzaron el equilibrio, se filtraron a través de membranas de 0.22 μm y se concentraron utilizando dispositivos Amicon de 0.5 mL y un corte molecular de 10 kDa hasta 0.135 mM y 0.025 mM respectivamente. Finalmente, las muestras a la concentración requerida se sometieron a desgasificación por agitación bajo vacío.

Para los experimentos de titulación isotérmica, se cargaron 200 μL de actinidina en la celda de muestra del calorímetro MicroCal ITC200-GE, mientras que la jeringa se cargó con 40 μL del inhibidor.

La titulación se llevó a cabo siguiendo el programa de inyecciones detallado en la Tabla 4.1, donde la primera inyección sirve para asegurar que la punta de la jeringa contenga solución fresca. Las inyecciones se realizaron con un intervalo de 200 segundos entre ellas, y la agitación se mantuvo a una velocidad constante de 300 rpm. Las isotermas generadas se analizaron utilizando una regresión no lineal basada en el modelo de un sitio de unión descrito por Wiseman et al. en 1989⁸⁸, que se ajusta al modelo de sitios de unión idénticos e independientes, como se muestra en la ecuación 6.

$$\frac{1}{V_0} \left(\frac{dQ}{dX_{tot}} \right) = \Delta H_U \left[\frac{1}{2n} + \frac{n - \left(\frac{n+r}{2} \right) - \left(\frac{X_r}{2} \right)}{\left(X^2 - 2X_r(n-r) + (n+r)^2 \right)^{\frac{1}{2}}} \right] \quad (6)$$

Dónde: V_0 es el volumen de la celda de reacción, Q el calor absorbido o liberado y n es número de sitios de unión .

$X_r = [I_{tot}]/[E_{tot}]$ y $r = 1/[E_{tot}]K_U$, I_{tot} representa la concentración total de inhibidor, E_{tot} es la concentración total de la enzima.

Tabla 4.1. Volúmenes establecidos para las inyecciones los experimentos de ITC.

CCE-actinidina		
Núm. de inyección	Vol. de inyección (μL)	$[I_{tot}]/[E_{tot}]$
1	0.5	0.017
2-8	1.5	0.07-0.38
9-14	2.0	0.46-0.83
15-20	2.5	0.92-1.41
Volumen Total	38	

5. RESULTADOS

5.1 Purificación de la actinidina

La actinidina se purificó en dos etapas de cromatografía. La Figura 5.1 muestra el cromatograma correspondiente a la exclusión molecular, primera etapa de purificación.

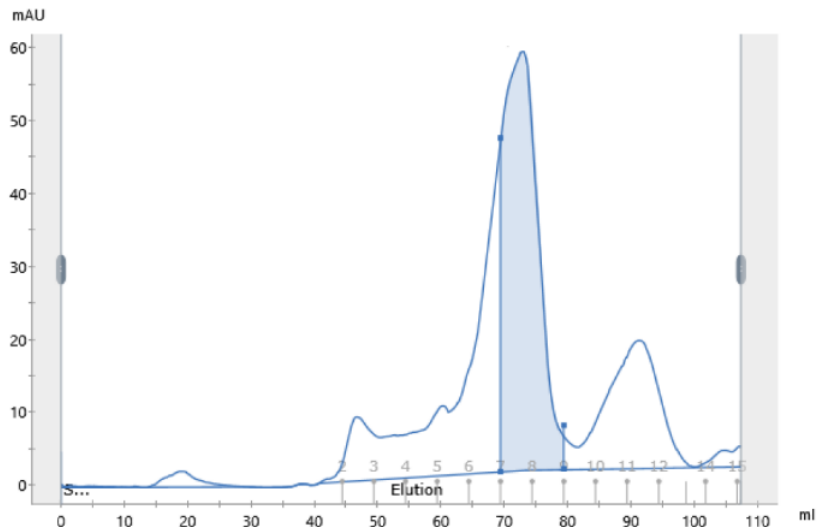


Figura 5.1. Cromatograma de exclusión molecular. La cromatografía se realizó en una columna Superdex 200 HiLoad 16/60 GE, equilibrada con amortiguador de fosfatos de sodio 50 mM, pH 6.5, la parte sombreada corresponde a las fracciones donde se encontró actividad proteolítica.

La SDS-PAGE (Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecil Sulfato de Sodio) es una técnica utilizada comúnmente en biología molecular y bioquímica para separar proteínas según su peso molecular. Al ser desnaturalizadas con SDS, se rompen las interacciones no covalentes existentes en las proteínas y estas adquieren una carga neta negativa proporcional a su masa. Posteriormente son forzadas a migrar a través de un gel de poliacrilamida poroso bajo la influencia de un campo eléctrico. En la Figura 5.2 se representa la electroforesis proveniente de la primera etapa de cromatografía.

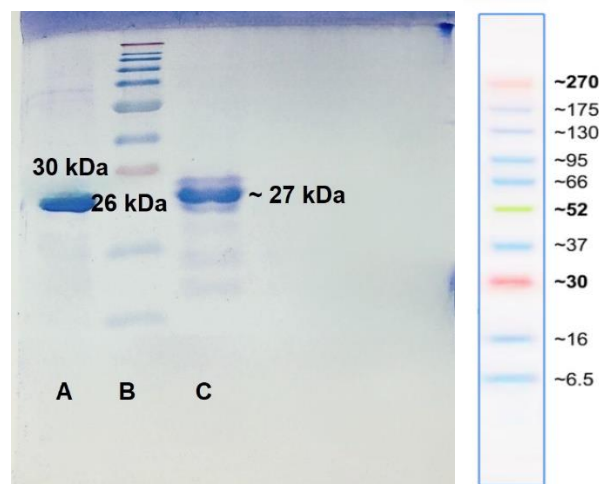


Figura 5.2. A la izquierda, SDS-PAGE de la actinidina, (teñido con azul Coomassie), carril A Ts26GST de masa molecular de 26 kDa, carril B marcadores de masa molecular BlueEasy Prestained Protein Marker, donde la banda roja representa una masa molecular de 30 kDa, carril C fracciones concentradas de actinidina. A la derecha, masas moleculares de cada una de las bandas del marcador utilizado, expresadas en kDa.

La purificación fue realizada por cromatografía de intercambio aniónico. Se obtuvieron dos fracciones de actinidina A1 y A2, con actividad catalítica sobre la caseína de 0.083 y 0.141 unidades / mg de enzima respectivamente. A2 fue la más abundante. La Figura 5.3 muestra el cromatograma proveniente de la segunda etapa de purificación.

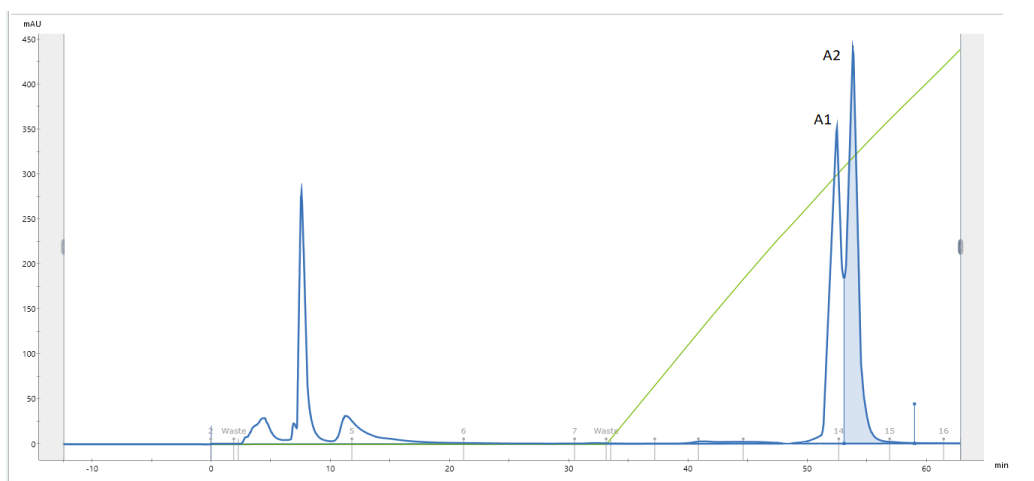


Figura 5.3. Cromatograma de Intercambio Aniónico. La cromatografía se realizó en una columna de intercambio aniónico Mono Q™ 4.6/100 PE, previamente equilibrada con regulador de acetatos 50 mM, pH 5.5. La actinidina eluyó a una concentración aproximada de NaCl de 0.35 M.

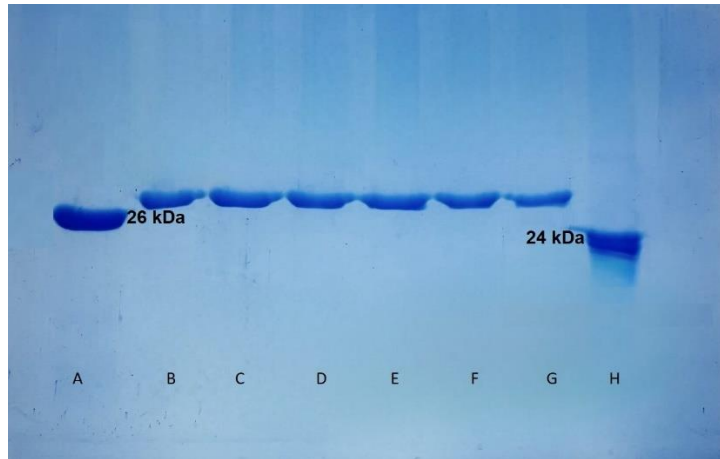


Figura 5.4. SDS-PAGE de la actinidina A1 y A2 proveniente de 3 diferentes cromatografías de intercambio aniónico, (teñido con azul Coomassie). Carril A Ts26GST de masa molecular de 26 kDa, carril B-D fracciones A2 recuperadas en 3 cromatografías realizadas, carril E-G fracciones A1 recuperadas en 3 cromatografías realizadas, carril H Ts24GST de 24 kDa.

5.2 Expresión y purificación de la cistatina C humana estabilizada (CCE)

Se realizó una SDS-PAGE al sobrenadante obtenido después de centrifugar los componentes de lisis de los clones analizados. Las muestras cargadas (Figura 5.5, carriles B-F), presentaron una banda intensa a la altura del marcador de 14.3 kDa.

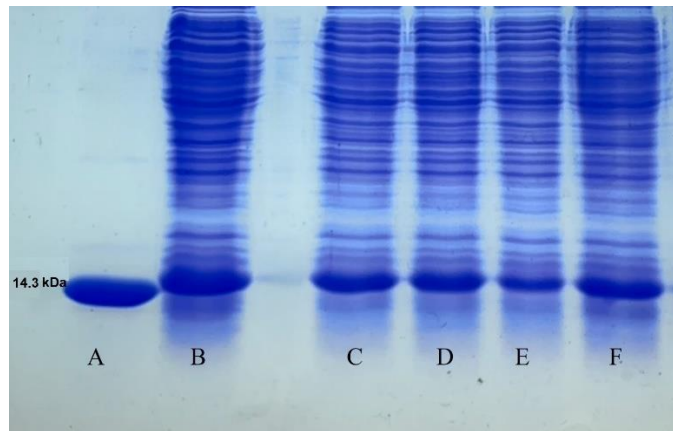


Figura 5.5. SDS-PAGE de la expresión CCE, (teñido con azul Coomassie). Carril A Lisozima de clara de huevo de gallina marca SIGMA, L2879-1G, lote: 026K7045, usada como marcador de peso molecular de 14.3 kDa, carriles B a F expresión de la CCE en diferentes clones analizados.

La purificación se realizó por cromatografía de intercambio catiónico, en la Figura 5.6 se muestra el cromatograma correspondiente a la purificación.

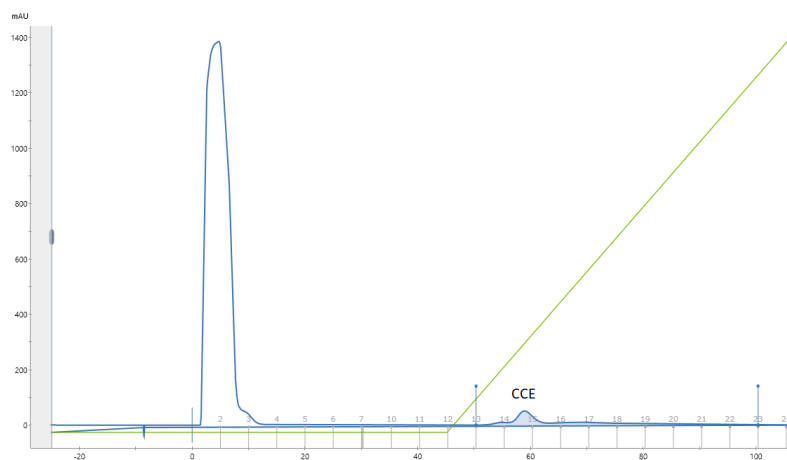


Figura 5.6. Cromatograma de Intercambio catiónico. Se empleó una columna HiTrap SP XL de 5.0 mL previamente equilibrada con amortiguador de fosfatos 20 mM, pH 6.0. El primer pico representa las proteínas que no se unieron a la matriz de la columna luego de la inyección. El segundo pico corresponde a la fracción recuperada por la columna del inhibidor, que eluyó con una concentración de NaCl de 0.22 M

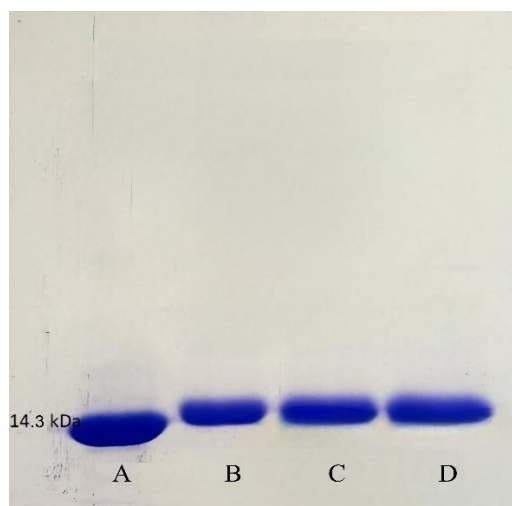


Figura 5.7. SDS-PAGE de la CCE proveniente de diferentes cromatografías de intercambio catiónico, (teñido con azul coomassie). Carril A lisozima de clara de huevo de gallina marca SIGMA, L2879-1G, lote: 026K7045, usada como marcador de masa molecular de 14.3 kDa, carril B, C y D fracciones de CCE recuperadas.

5.3 Ensayos de actividad inhibitoria de CCE

Para verificar la actividad inhibitoria de la CCE sobre la actividad peptidasa de la papaína, se estandarizó el método colorimétrico para la hidrólisis enzimática de BApNA. En la Figura 5.8 se muestran las velocidades de formación del producto de la hidrólisis en ausencia y presencia del inhibidor de la proteasa.

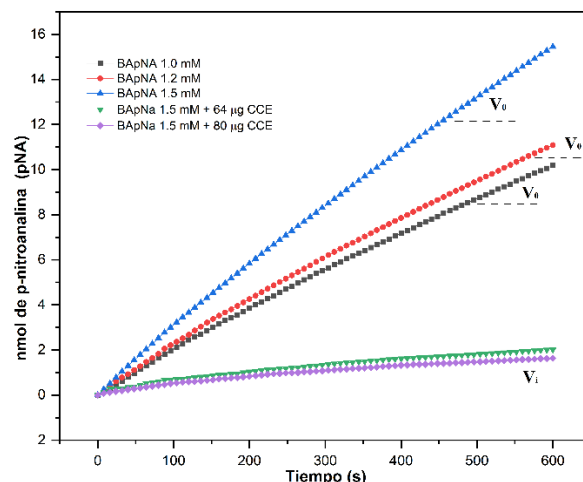


Figura 5.8. Cinéticas de la hidrólisis enzimática de N-benzoil-arginina-p-nitroanilida por papaína. Se muestran en azul, rojo y negro los datos de la hidrólisis de 1.5, 1.2 y 1.0 mM de BAPNA en la celda de reacción. Los datos en verde y morado muestran el efecto de apagamiento de la actividad enzimática causado por la adición de 64 y 80 µg de CCE con 1.5 mM de BAPNA. La papaína fue usada a una concentración de 30 µM (0.73 mg/mL) en todos los ensayos.

5.4 Propiedades Estructurales, dicroísmo circular

Para evaluar la integridad de la estructura secundaria se obtuvieron los espectros de dicroísmo circular en el UV lejano de ambas proteínas a pH 7.0 y a 25 °C. Para el caso de la CCE el espectro presenta un mínimo de elipticidad sobre los 208 nm y un pequeño hombro cercano a los 223 nm, Figura 5.9 panel A. Por otro lado, el espectro que se muestra en el panel B corresponde a la isoforma de actinidina seleccionada; se puede observar un mínimo de elipticidad alrededor de los 208 nm y un hombro próximo a los 220 nm.

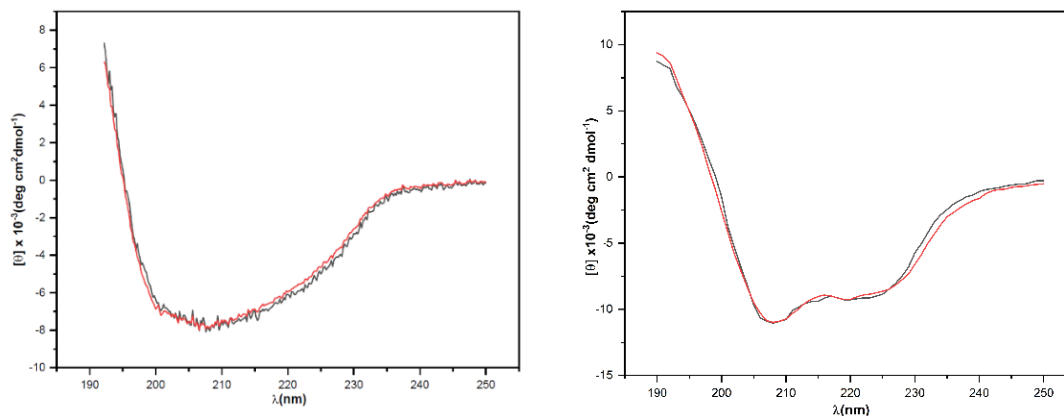


Figura 5.9. Espectros de dicroísmo circular (DC) obtenido a pH 7.0 y 25 °C para ambas proteínas. En el recuadro de la izquierda se muestra, en línea roja, el espectro de dicroísmo obtenido para la CCE, mientras que en línea negra se muestra el espectro de dicroísmo obtenido por Tovar Anaya *et al.*, 2019. En el recuadro de la derecha se muestra, en línea roja, el espectro de dicroísmo obtenido para la actinidina, mientras que en línea negra se representa el espectro de dicroísmo obtenido por Tello Solís *et al.*, 1995. Todas las muestras se trabajaron a una concentración de 0.10 mg/mL.

5.5 Espectrometría de Masas

De acuerdo con los espectros de masas MALDI-TOF obtenidos para las muestras analizadas se obtuvo para la CCE una masa molecular de 12,565 Da, contra una masa esperada de 13,400 Da para la proteína intacta; mientras que, para la actinidina con su cisteína catalítica bloqueada se obtuvo una masa molecular de 23,783 Da, para una masa esperada de 23,787 Da de la proteasa bloqueada. La actinidina presentó además otro pico correspondiente a una masa molecular de 23988.818 Da, lo que podría corresponder a una isoforma. La Figura 5.10 y 5.11 muestran los espectros de masas obtenidos

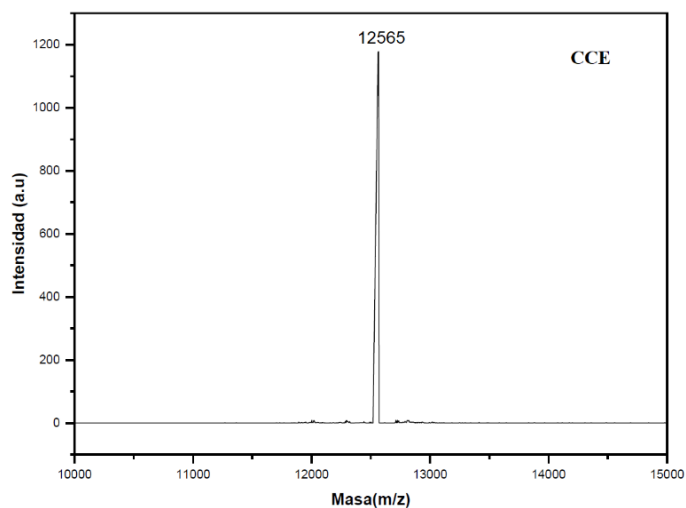


Figura 5.10. Espectro de masas MALDI -TOF para la CCE. El espectro se obtuvo en modo lineal positivo, empleando una matriz de ácido sinápnico.

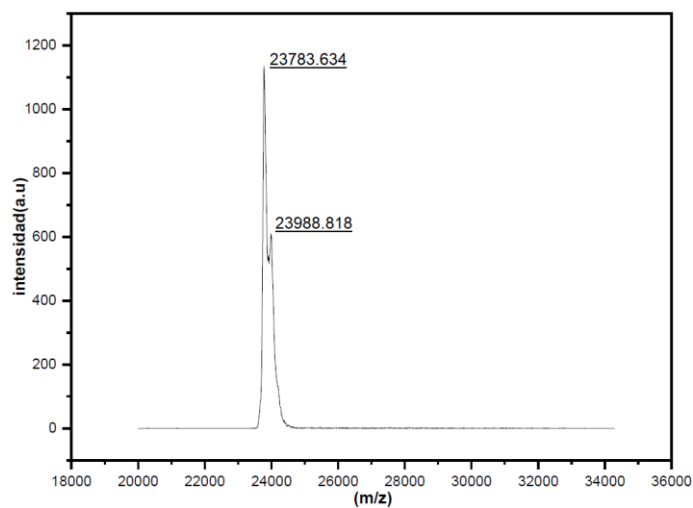


Figura 5.11. Espectro de masas MALDI -TOF para la actinidina. El espectro se obtuvo en modo lineal positivo, empleando una matriz de ácido sinápnico.

5.6 Modelado computacional

5.6.1 Modelado y simulación de DM de las especies

Debido a que la estructura cristalográfica depositada en el PDB para la CCE (PDB:3GAG) se encuentra truncada en el extremo amino terminal, iniciando en la Gly12, y a fin de lograr un modelo computacional lo más parecido a la especie molecular obtenida experimentalmente, se adicionaron los residuos Leu9, Val10 y Gly11 para obtener una cadena con una masa de 12,576 Da, acorde con el resultado de espectrometría de masas (Fig. 5.10). La Figura 5.12 muestra los residuos de aa añadidos al extremo amino terminal.

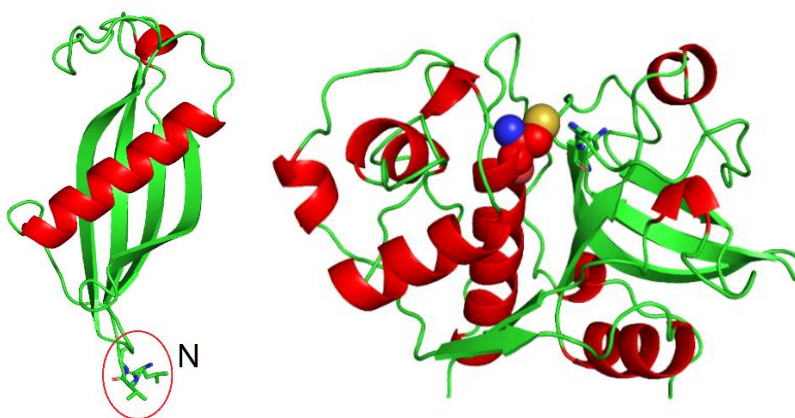


Figura 5.12. Modelos 3D de la CCE y la actinidina respectivamente, en la figura de la izquierda (CCE) se señalan con un círculo rojo, los 3 residuos añadidos en el extremo amino terminal. En la figura de la derecha (actinidina) se resalta en esferas la cisteína catalítica reducida. Los cambios se realizaron en el software PyMOL 2.5.0.

Para relajar la estructura cristalográfica de ambas proteínas se corrieron simulaciones de dinámica molecular por duplicado a 308.15 K en solvente explícito con un tiempo de simulación de 100 ns. La Figura 5.13 muestra los perfiles de RMSF y RMSD para cada proteína. Se puede observar de acuerdo con el perfil de RMSD de cada una, que ambas se comportan de manera estable durante el tiempo de simulación y que presentan notables fluctuaciones, principalmente la cistatina en sus extremos amino y carboxilo terminal.

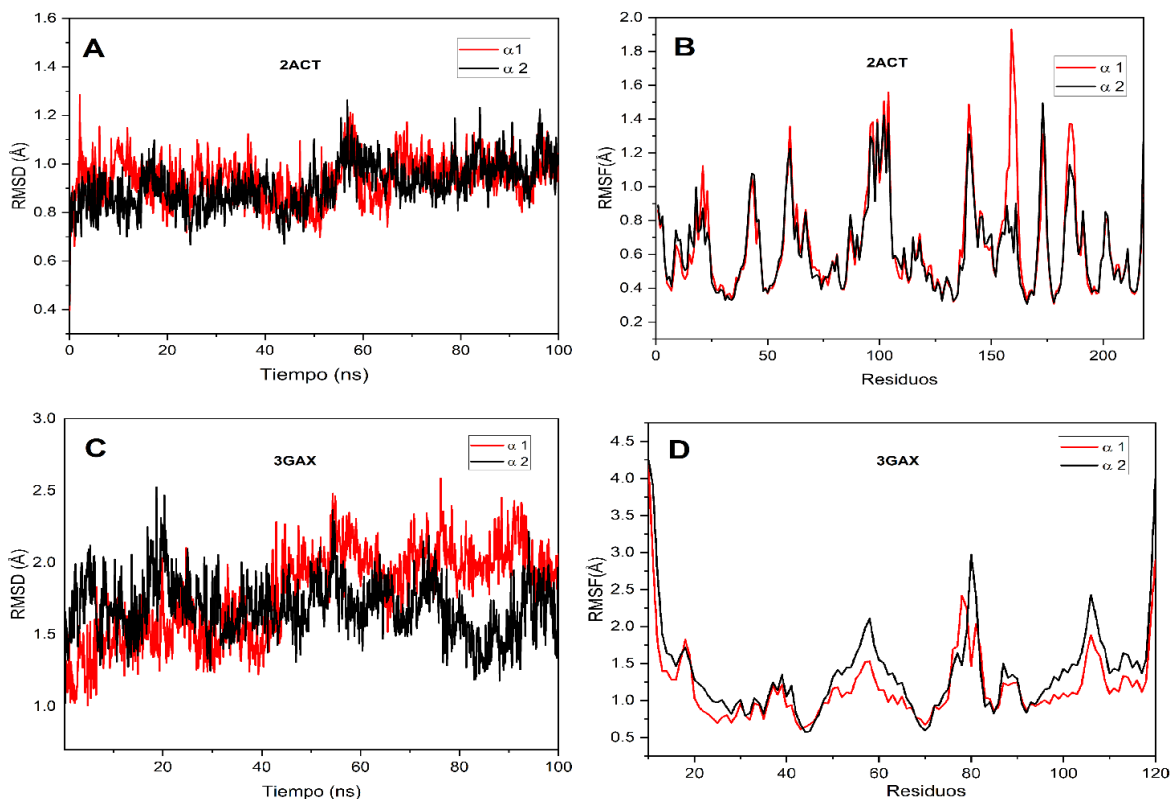


Figura 5.13. Simulación de dinámica molecular en solvente explícito a 308.15 K durante 100 ns, en un conjunto NPT. En A y C se muestran los perfiles de RMSD de actinidina y CCE respectivamente donde cada color corresponde a una de las 2 réplicas realizadas. De igual manera B y D se muestran los perfiles de RMSF para la actinidina y CCE respectivamente.

5.6.2 Construcción del modelo cistatina C humana–actinidina

Se realizaron alineamientos múltiples de secuencias de aminoácidos para la proteasa actinidina con diferentes PC cuyas estructuras 3D en complejos homólogos cisteinproteasas–cistatinas son conocidas (Figura 5.14). Asimismo, se realizaron alineamientos múltiples para la CCE con otras cistatinas inhibidoras de PC (Figura 5.15).

Del alineamiento de la secuencia de la CCE con otras cistatinas inhibidoras de PC se obtuvo que mayor porcentaje de identidad fue 49.17 % entre la CCE (PDB: 3GAX) y cistatina D humana (PDB: 1ROA), seguido de la CCE y la CEW (PDB:1A67) con un porcentaje de identidad de un 43.10%. Por su parte la estefina B (PDB: 2OCT) alcanzó un porcentaje de identidad respecto a la CCE de un 22.99 %. En el caso de la actinidina (PDB: 2ACT), una vez alineada su secuencia de aminoácidos con la secuencia de otras PC, el mayor porcentaje de identidad se obtuvo con la quimopapaína (PDB: 1YAL) y fue de 49.31%. Con respecto a la papaína (PBD: 9PAP) la comparación nos arroja un 48.34% de identidad.

2ACT Actinidina	LPSYVDWRSAGAVVDIKSQGECGGCWAFSAIATVEGINKITSGSLISLSEQELIDCGRTQ	60
1YAL Quimopapaína	YPQSIDWRAKAVTPVKNQGGACGSCWAFSTIATVEGINKIVTGNLLELSEQELVDCDKH-	59
9PAP Papaína	IPEYVDWRQKAVTPVKNQGGSCGSCWAFSAVVTIEGIIKIRTGNLNQYSEQELLDCCR-	59
	* . :*** ** . :*. ** *. ***** :. :*. ** * * :*. * . ***** :*. :	
2ACT Actinidina	NTRGCDGGYITDGFQFIINDGGINTEENYPYTAQDGDVALQDQKYVTIDTYENVPYNN	120
1YAL Quimopapaína	-SYGCKGGYQTTSLQYVAN-NGVHTSKVYPYQAKQYKCRATDKPGPKVKITGYKRVPSNC	117
9PAP Papaína	-SYGCNGGYPWSALQLVAQ-YGIHYRNTYPYEGVQRYCRSREKGPYAAKTDGVRQVQPYN	117
	: ** . *** . :. * : : * : : : *** . : * : : *	
2ACT Actinidina	EWALQTAVTYQPVSVLDAAGDAFKQYASGIFTGPCGTAVDHAIVVGYGTEGGVDYWIV	180
1YAL Quimopapaína	ETSLGALANQPLSVLVEAGGKPFQLYKSGVFDGPGCTKLDHAVTAVGYGTSDGKNYIII	177
9PAP Papaína	QGALLYSIANQPVSVLQAAGKDFQLYRGGIFVGPCKGNKVDHAVAAGVYG---PNYILI	173
	: : : : : * : * * : * . * . * : * . * * * * . : * * * . * * * * : * : :	
2ACT Actinidina	KNSWDTTWGEEGYMRLRNVGG-AGTCGIATMPSYPVKYNN	220
1YAL Quimopapaína	KNSWGPWGEKGYMRLKRQSGNSQGTGCVYKSSYPFKGFA	218
9PAP Papaína	KNSWGTGWGENGYIRIKRGTGNSYGVCLYTSSFPVKNN--	212
	***. . ***. ** : * : * . * . * . * : . * * *	

Figura 5.14. Alineamiento de secuencias múltiples entre proteasas cisteínicas en su forma madura. Se conservan 86 posiciones idénticas (*) y 31 posiciones similares (:). El mayor porcentaje de identidad de actinidina (PDB: 2ACT) se obtuvo con la quimopapaína (PDB: 1YAL) y fue de 49.31%. Con respecto a la papaína (PDB: 9PAP) la comparación nos arroja un 48.34% de identidad.

2OCT Estefina B	-----MMSGAPSATQPATAETQHIADQV-----RSQLEEKYNKFPVFKAVSFKSQV	47
1A67 Cistatina de Pollo	---SEDRSRLLGAPVPVDENDEGLQRALQFAMAENRAS-NDKYS--SRVVRVISAKRQL	54
1ROA Cistatina D	GSASAQSRLLAGGIHATDLNDSVQCALDFAISEYNKVKINKDEYY--SRPLQVMAAYQQI	58
3GAX Cistatina C	-SSPGKPPRLVGGPMDASVEEAGVRRALDFAVGEYNKAS-NDMYH--SRACQVVRARKQI	56
	: * . . . : : . : : * : : * :	
2OCT Estefina B	VAGTNYFIKVVHGVDEDFVHLR-----VFQSLPHENK-----SLTSLSNYQ	86
1A67 Cistatina de Pollo	VSGIKYILQVEIGRTTCKPKSSGDLQSCFEHDEPEMAKYTTCTFVVYSIPWLNQIKLLESK	114
1ROA Cistatina D	VGGVNYFFNVKFGRTTCTKSQPNLDNCPFNQPKLKEEFCSFQINEVPWEDKISILNYK	118
3GAX Cistatina C	VAGVNYFLDVELCRITCTKTPNLDNCPFHDPHLKRAKAFCSFQIYAVPWQGTMTLSKST	116
	* . * : * : * . . : : * . * . . : : : :	
2OCT Estefina B	TNKAKHDELTYF	98
1A67 Cistatina de Pollo	CQ-----	116
1ROA Cistatina D	CRKV-----	122
3GAX Cistatina C	CQDA-----	120

Figura 5.15. Alineamiento de secuencias múltiples entre cistatinas inhibitoras de cisteinproteasas. Se alinearon la CCH (PDB:3GAX), la cistatina D humana (CDH), (PDB:1ROA), la CEW (PDB:1A67) y la estefina B (PDB:2OCT), el mayor porcentaje de identidad fue 49.17 % entre la CCH y CDH, seguido de la CCH y la CEW con un porcentaje de identidad de un 43.10%. Se conservan 9 posiciones idénticas (*) y 16 posiciones similares (:).

Tabla 5.1. Porcentaje de identidad obtenidos del alineamiento de secuencias de aminoácidos de la CCE y la actinidina con la secuencia de aminoácidos de otras Cistatinas y proteasas cisteínicas respectivamente.

Proteínas	Porcentaje de identidad
CCE/CDH	49.17
CCE/CEW	43.10
CCE/estefina B	22.99
actinidina /quimopapaína	49.31
actinidina /papaína	48.34

La configuración tridimensional del complejo papaína–estefina B sirvió como base para desarrollar un modelo inicial del complejo CCE–actinidina. El acoplamiento molecular se llevó a cabo en el servidor pyDockweb, que permite restringir la zona de unión para la generación del complejo. La Tabla 5.2 muestra los residuos predichos como parte de la interfaz de acuerdo con el alineamiento de secuencias y del modelo base utilizado. En la Figura 5.16 se muestra el modelo obtenido para el complejo CCE–actinidina sobrepuesto con el complejo estefina B–papaína.

Tabla 5.2. Posibles residuos aminoacídicos que intervienen en la formación del complejo CCE–actinidina.

Proteínas	Posibles residuos de la interfaz
CCE	V10, G11, A26, I56, V57, A58, W106
actinidina	Q19, G20, C22, G23, G67, G68, D185

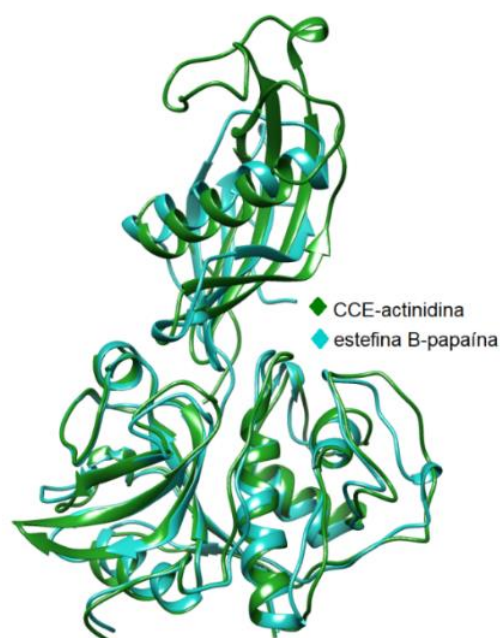


Figura 5.16. Estructura tridimensional de complejo CCE–actinidina. Se muestra la sobreposición sobre el complejo homólogo papaína–estefina B, la cual arrojó un RMSD de 1.94 Å respecto a los carbonos α . La estructura se representó con el software UCSF Chimera.

5.6.3 Simulación de Dinámica molecular del complejo CCE–actinidina

La estabilidad estructural del modelo obtenido del acoplamiento molecular rígido fue evaluada mediante una dinámica molecular y comparada con los datos obtenidos por Tovar Anaya *et al.*, 2019 para el complejo CCE–quimopapaína. En la Figura 5.17 se puede apreciar que ambos modelos son estables de acuerdo con sus perfiles de RMSD. La evolución del RMSF en la Figura 5.18 refleja las zonas con mayores fluctuaciones durante el tiempo de simulación, mostrando mayores fluctuaciones el complejo CCE–actinidina. Por otro lado, en la Figura 5.19 se muestra el radio de giro para ambos

modelos, se puede observar que alrededor de los 100 ns los sistemas comienzan a comportarse de forma similar y a compactarse ligeramente. En la Figura 5.20 se muestra la superficie accesible al solvente de ambos modelos. El análisis de PCA sobre la trayectoria de la simulación de dinámica molecular arrojó dos mínimos de energía, en la Figura A1 del Apéndice se muestra la proyección y visualización de estos mínimos de energía libre. Los clústeres obtenidos para las trayectorias aisladas de estos mínimos se muestran en las Figuras A2, A3 y A4 del apéndice.

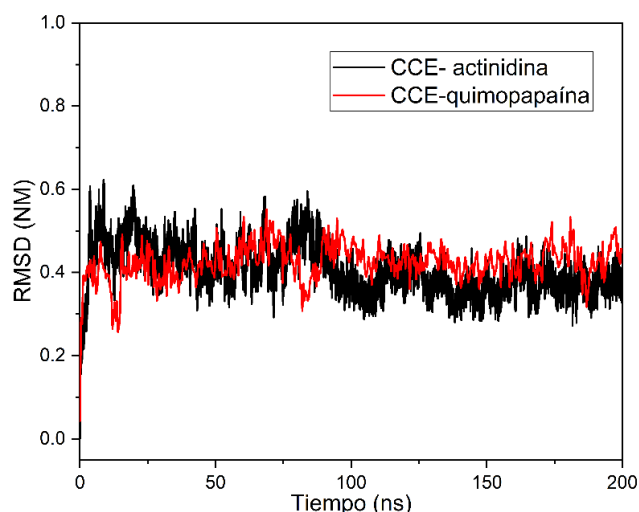


Figura 5.17. Perfiles de RMSD obtenidos para las simulaciones. En negro se muestran los datos de RMSD de la simulación del complejo CCE–actinidina y en rojo se muestran los datos de RMSD de la simulación del complejo CCE–quimopapaína.

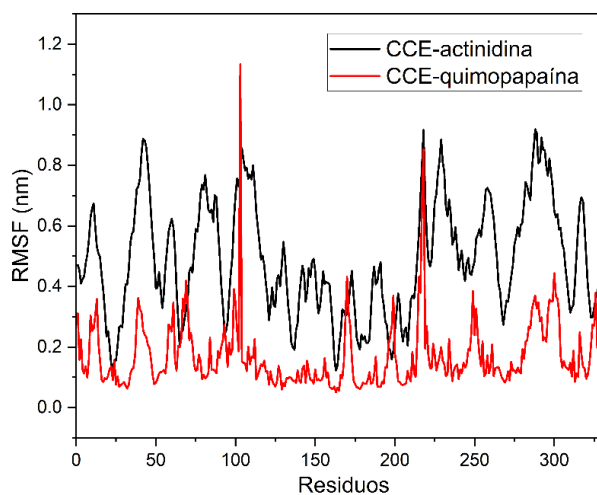


Figura 5.18. Perfiles de RMSF obtenido para las simulaciones. En negro se muestran los datos de RMSF de la simulación del complejo CCE–actinidina y en rojo se muestran los datos de RMSF de la simulación del complejo CCE–quimopapaína.

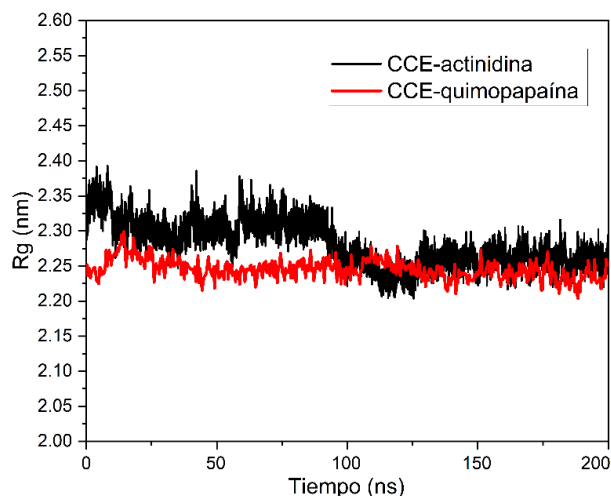


Figura 5.19. Radio de giro obtenido para las simulaciones. En negro se muestran los datos del radio de giro para la simulación del complejo CCE–actinidina y en rojo se muestran los datos del radio de giro de la simulación del complejo CCE–quimopapaína.

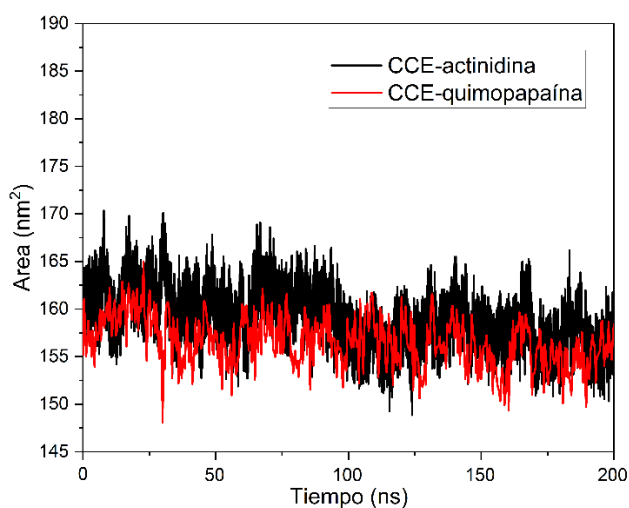


Figura 5.20. Superficie accesible al solvente obtenido para ambas simulaciones. En negro se muestran los datos de la superficie accesible al solvente para la simulación del complejo CCE–actinidina y en rojo se muestran los datos del radio de giro de la simulación del complejo CCE–quimopapaína.

Para analizar la interfaz del modelo final, se estableció un radio de corte de 4.0 \AA . Dentro de este intervalo se identificaron un total de 27 residuos, de los cuales 12 pertenecen a la CCE y ocupan un área de 838.5 \AA^2 , esto representa un 11.7% del área total de la CCE que es de 7170.9 \AA^2 . Los restantes 15 residuos pertenecen a la actinidina, ocupan un área de 717.3 \AA^2 , esto representa un 6.9% del área total de la actinidina que es 10378.5 \AA^2 .

Se determinó que el área polar en la interfaz es de 482.13 \AA^2 , mientras que el área no polar es de 1073.67 \AA^2 . Se identificaron un total de 7 puentes de hidrógeno y 1 puente salino, mismos que se

muestran en la Figura 5.21. En la Tabla 5.3 se muestra un listado de estas interacciones con sus respectivas distancias de enlace. De acuerdo con el Análisis *MMPBSA* realizado, los residuos que contribuyen a la energía libre de unión se pueden observar en el panel A de la Figura 5.22, mientras que el panel B muestra los residuos que hacen contacto en la interfaz con un radio de corte de 4.0 Å. La lista completa de contactos atómicos en la interfaz se muestra en la Tabla A1 del Apéndice. En la Tabla 5.4 se muestran los valores de superficie accesible al solvente del complejo CCE–actinidina, tanto de las proteínas por separado como de la interfaz del complejo, junto con los valores de sus contribuciones polar y apolar. En la Tabla 5.5 se exponen los valores de ΔH_U estimados mediante los modelos semiempíricos de área superficial accesible al solvente para este complejo.

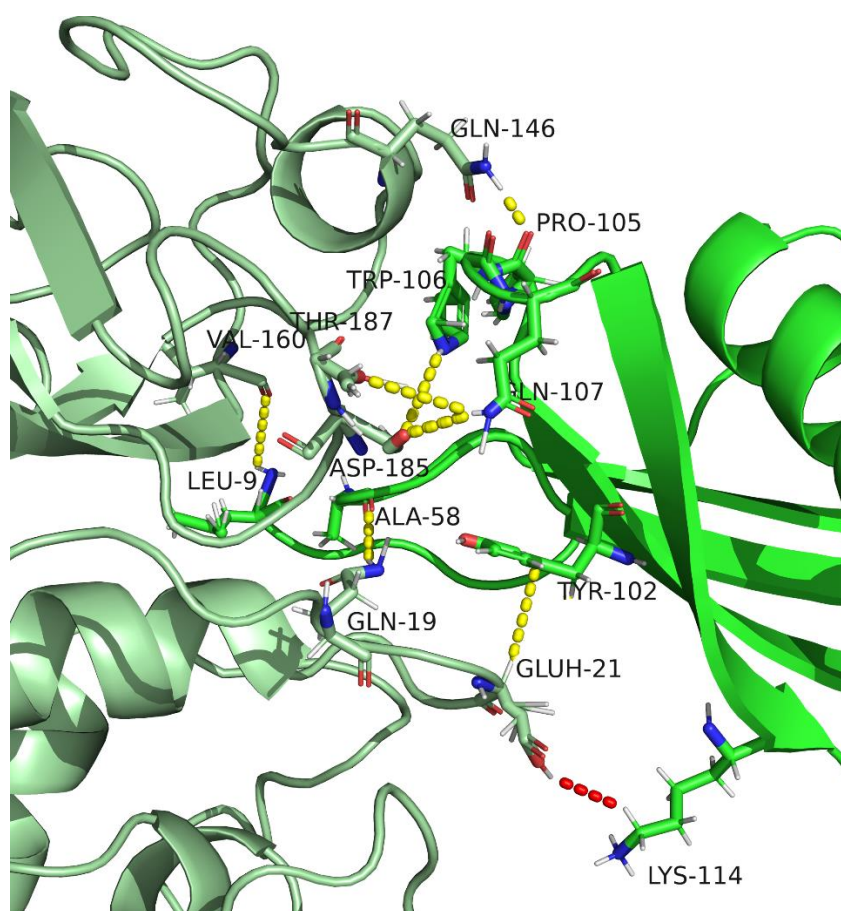


Figura 5.21. Interfaz del complejo CCE–actinidina. Se muestran, de color amarillo los 7 puentes de hidrógenos encontrados en la interfaz y de color rojo el puente salino.

Para el caso del complejo CCE–quimopapaína presentado por Tovar Anaya *et al.*, 2019⁶⁴ se encontraron en la interfaz un total de 47 residuos; 28 pertenecientes a quimopapaína y 19 a CCE (Tabla A2 del apéndice). Se identificaron 9 puentes de hidrógeno y 2 puente salinos .

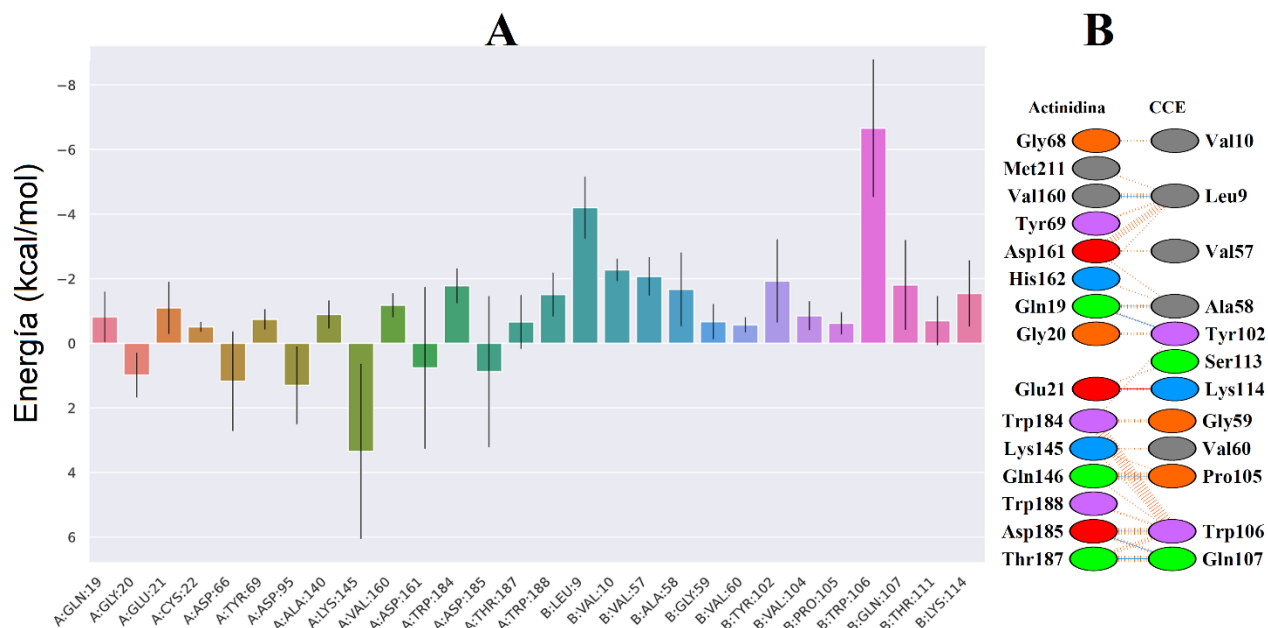


Figura 5.22 (A) Aporte por residuo a la energía libre de unión ΔG_U (kcal/mol) de acuerdo con los cálculos de MMPBSA. (B) Aminoácidos que interaccionan en la interfaz del complejo CCE–actinidina. Los residuos cargados positivamente, están de color azul (H,K,R); los residuos cargados negativamente están en rojo (D,E); los que presentan carga neutra están resaltados de color verde (S,T,N,Q); los alifáticos de color gris (A,V,L,I,M); los aromáticos de color morado (F,Y,W); y la prolina y la glicina de color Naranja (P,G), las interacciones existentes se representan con líneas con el código de colores: puentes de hidrógeno, puentes salinos y otras interacciones.

Tabla 5.3. Lista de contactos formados en la interfaz de los complejos CCE – actinidina en un radio de corte de 4.0 Å.

Interacción	Actinidina	CCE	Distancia (Å)
PH	(NE2) Gln19	(O) Ala58	2.72
PH	(NE2) Glu21	(OH) Tyr102	3.31
PH	(NE2) Gln146	(O) Pro105	3.02
PH	(O) Val160	(N) Leu9	2.97
PH	(OD2) Asp185	(NE1) Trp106	3.07
PH	(OD2) Asp185	(NE2) Gln107	3.25
PH	(OG1) Thr187	(NE2) Gln107	2.87
PS	(OE2) Glu21	(NZ) Lys114	3.61

Tabla 5.4. Superficie accesible al solvente del complejo CCE–actinidina, de las proteínas por separado y de la interfaz del complejo, junto con los valores de sus contribuciones polar y apolar. Estos valores se determinaron en el programa GETAREA

	ΔASA Total		
	ΔASA (Å ²)	ΔASA_p (Å ²)	ΔASA_{ap} (Å ²)
CCE–actinidina	15993.6	6744.9	9248.7
Actinidina	10380.5	4440.0	5940.5
CCE	7170.9	2789.1	4381.8
Interfaz	-1557.8	-484.2	-1073.6

Tabla 5.5. Valores de ΔH_U estimados mediante los modelos semiempíricos de área superficial accesible al solvente para el complejo CCE–actinidina. El ΔH_U fue calculado con los coeficientes de proporcionalidad expuestos en la Tabla 4.2.

Modelo	ΔH_U (kJ/mol)
García & Hernández ⁹¹	-7.69
Luque & Freire ⁹²	-25.4

5.7 Calorimetría de Titulación Isotérmica

Las isotermas se obtuvieron por duplicado a 35 °C, en la Figura 5.22 y 5.23 se muestran los resultados obtenidos para el sistema. Los parámetros K_U y ΔH_U se obtuvieron ajustando los datos integrados y corregidos, mediante la resta del calor de dilución al modelo de sitios de unión idénticos e independientes (Ec. 5), los parámetros $T\Delta S_U$ y ΔG_U se obtuvieron mediante la ecuación 4. Los valores de los parámetros ΔH_U , K_U , $T\Delta S_U$ y ΔG_U calculados se reportan en la Tabla 5.6.

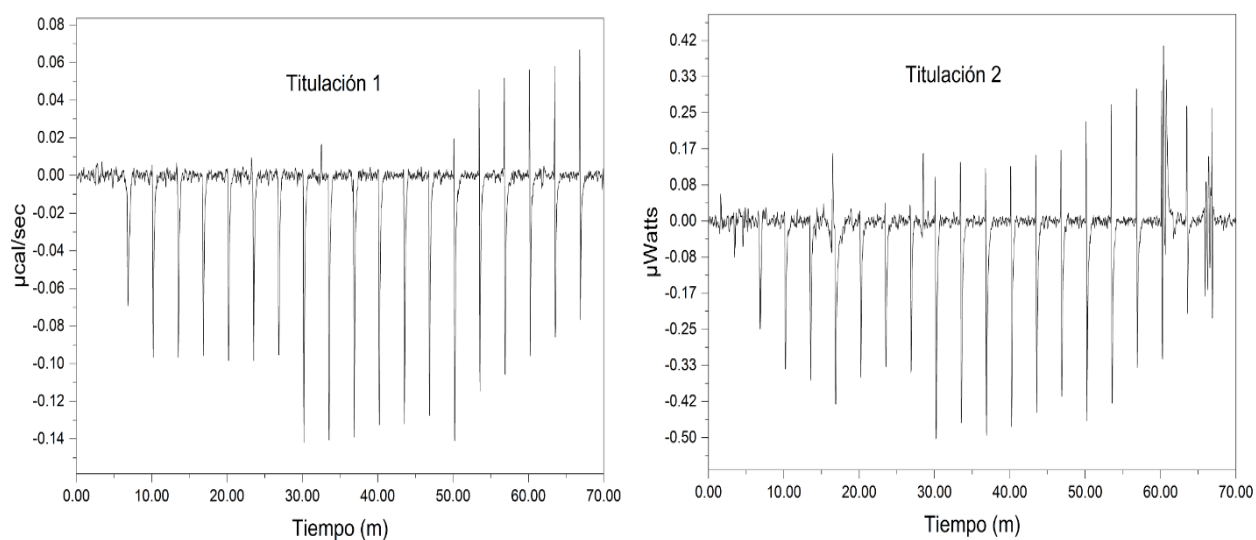


Figura 5.23. Titulaciones calorimétricas 1 y 2 del sistema CCE–actinidina a pH 7.0 y 35 °C. Los picos hacia abajo en la gráfica indican un sistema exotérmico. Los experimentos se realizaron a pH 7.0 en amortiguador de fosfatos 10 mM que contenía 78 mM de NaCl para fijar la fuerza iónica a 0.1 M.

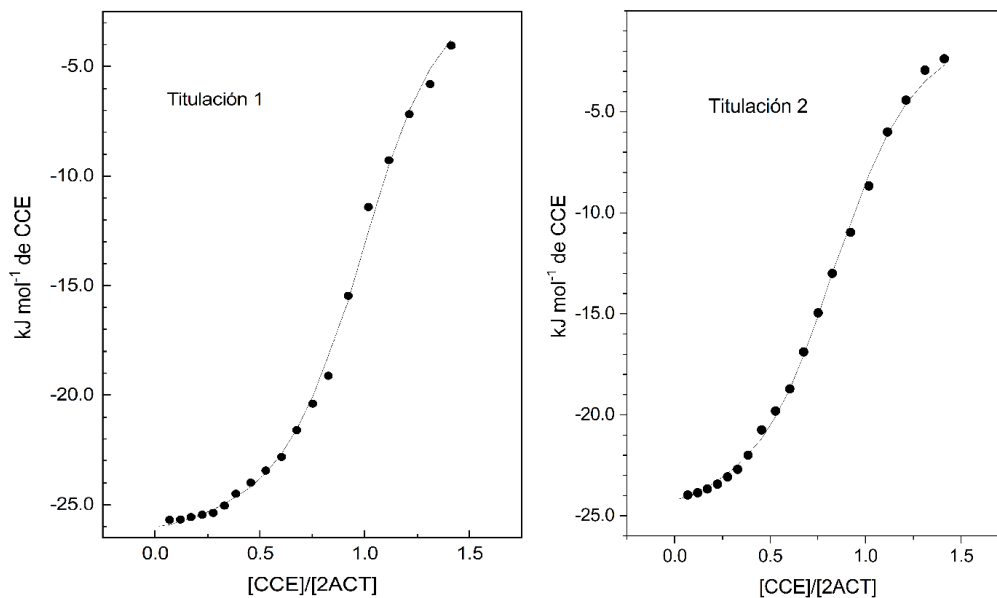


Figura 5.24. Isotermas de titulación 1 y 2 del sistema CCE–actinidina a pH 7.0 y 35°C. Los círculos negros representan los datos corregidos e integrados tras restar el calor de dilución, mientras que la línea continua muestra el ajuste realizado a través de una regresión no lineal de la isoterma al modelo de sitios de unión idénticos e independientes.

Tabla 5.6. Parámetros termodinámicos obtenidos por ITC (n , ΔH_U , K_U , $T\Delta S_U$ y ΔG_U) para el sistema CCE–actinidina a pH 7.0 y 35°C.

Experimentos	Sistema (jeringa/celda)	$K_U (x10^6) (M^{-1})$	$\Delta G_U (kJ/mol)$	$\Delta H_U (kJ/mol)$	$T\Delta S_U (kJ/mol)$	N
1	CCE–actinidina	1.35	-36.2	-27.0	9.2	0.99
2	CCE–actinidina	0.96	- 35.3	-25.7	9.6	0.86
Promedio	CCE–actinidina	1.16	-35.7	-26.3	9.4	0.93

6.DISCUSIÓN

6.1 Aislamiento, purificación y caracterización de la actinidina

La purificación de la actinidina se logró en dos etapas, primeramente, se realizó una cromatografía de exclusión molecular, seguida de otra de intercambio aniónico aprovechando el bajo punto isoeléctrico de la proteasa. En este último paso se obtuvieron dos fracciones de actinidina, A1 y A2, con su Cys catalítica bloqueada con un grupo tiometilo. Dado que eluyeron a diferente concentración de NaCl, es probable que tengan diferentes cargas y se trate entonces de isoformas diferentes. A2 fue la isoforma más abundante y la última en eluir en el gradiente salino aplicado a la columna de intercambio aniónico (Figura 5.3). Esta isoforma presentó además una mayor actividad específica (0.141 unidades / mg de enzima) y fue la que utilizamos en todos los experimentos posteriores. Mostró además ser homogénea en la SDS-PAGE, observándose una sola banda cercana y anterior a un marcador de 26 kDa como se muestra en la Figura 5.4. Considerando que se utilizaron al menos 2.0 µg de proteína por carril en el gel, y dado que el límite de detección para proteínas con la tinción de Coomassie es de 20 ng, se puede concluir que la muestra de actinidina purificada alcanzó un nivel de pureza de al menos el 99%. La isoforma A1 eluyó junto con A2 en la cromatografía de exclusión molecular y ambas mostraron la misma movilidad electroforética en SDS-PAGE.

El espectro de dicroísmo circular obtenido para la actinidina en el UV lejano, concuerda con los espectros de dicroísmo circular ya reportados previamente por Tello Solís *et al.*, 1995⁵⁸, esto indica que la integridad estructural no se ve afectada durante el proceso de purificación, además el análisis de la estructura secundaria realizado en el software *Dichroweb* nos arrojó un contenido del 33.1 % de hélice α , 11.9% de láminas β y 33.5% giros, concordando esto con la estructura secundaria de la actinidina depositada en el PDB (PDB:2ACT), la cual está compuesta por un 29.5 % de hélice α y 15.0 % en láminas β .

La masa molecular obtenida mediante espectrometría de masas para la actinidina en este estudio y otros anteriores es de 23.7 kDa,^{51,52} que concuerda con el valor de la masa molecular reportada para la estructura cristalográfica depositada en el PDB. En el espectro de masas MALDI TOF de la actinidina se obtuvo además un segundo pico con una masa de 23.9 kDa lo cual podría ser una isoforma con pequeños cambios en la estructura primaria. Existen estudios que reportan hasta 10 isoformas de actinidina con una sorprendente variación en sus puntos isoeléctricos que va desde 3.9 hasta 9.3⁵⁴.

6.2 Expresión, Purificación y caracterización de la CCE

Se obtuvieron las muestras homogéneas de CCE luego de una cromatografía utilizando una columna de intercambio catiónico HiTrap SP XL, equilibrada con regulador de fosfatos pH 6.0. Esta columna contiene una matriz de sulfopropilos con carga negativa, y al tener la CCE un punto isoeléctrico de 8.57 y estar disuelta a un pH por debajo de su punto isoeléctrico tendría una carga neta positiva, que la hará unirse a la matriz de la columna, mientras que las impurezas existentes de la expresión eluyen rápidamente al no interactuar con la matriz. Posteriormente, la proteína atrapada por la matriz de la columna puede ser recuperada mediante un gradiente de NaCl, en este caso la CCE eluyó a una concentración de NaCl de 0.22 M.

El análisis de las muestras por SDS-PAGE mostró muestras homogéneas de CCE puesto que cada ensayo presentó una sola banda a la altura del marcador de 14.3 kDa (Figura 5.7 carril B, C y D)

Su actividad inhibitoria fue comprobada mediante el método colorimétrico con BApNA, cuya hidrólisis libera p-nitroanilina, un compuesto de color amarillo que permite monitorear la reacción espectrofotométricamente al medir la velocidad de formación del producto (V). Se determinó el porcentaje de inhibición como

$$\% \text{ Inhibición} = \left(\frac{V_0 - V_I}{V_0} \right) 100\%$$

donde, V_0 y V_I son las velocidades de formación de producto en la hidrólisis de BApNA en ausencia y presencia de CEE, respectivamente. En las condiciones ensayadas la inhibición de papaína alcanzó un 90% aproximadamente.

En cuanto a la estructura secundaria de la CCE, el espectro de dicroísmo obtenido en la región UV lejano coincide con el reportado anteriormente por Tovar Anaya *et al.*, 2019, como se puede ver en la figura 5.9. Además, el análisis del espectro con el software *Dichroweb* predijo un 48 % de hojas β y un 4% de hélice α , por su parte la estructura cristalográfica de la CCE depositada en el PDB está compuesta por 47% de hoja β y de 13% en hélice α .

Por otro lado, el espectro de masas de la CCE obtenido por MALDI TOF reveló un único pico con un valor de 12,565 Da, correspondiente a la cistatina CCCE escindida en su extremo amino, comenzando en el residuo de Leu9. Esta escisión en el extremo amino terminal ya había sido reportada por Tovar Anaya *et al.*, 2019 y en diversos trabajos⁹³, aunque no está claro que es lo que la promueve.

6.3 Modelado y simulación de las especies involucradas

De acuerdo los perfiles obtenidos de la desviación cuadrática media (RMSD) y de fluctuación cuadrática media (RMSF) mostrados en la figura 5.13 se determinó que ambas proteínas permanecen estables. En el caso de la CCE los residuos en el extremo amino terminal son muy móviles y no aparecen en la estructura cristalográfica depositada en el PDB como 3GAX, sin embargo, estudios preliminares reportan que los residuos Leu9 y Val10 son fundamentales en la inhibición de cistatinas a PC^{66,67}, razón por la cual fueron añadidos junto con la Gly11.

6.4 Simulación de Dinámica Molecular del complejo

Mediante la simulación de DM se evaluó la estabilidad del complejo CCE–actinidina. El perfil de RMSD se mantuvo estable y similar al perfil de RMSD obtenido para el complejo CCE–quimopapaína por Tovar Anaya *et al.*, 2019, observándose mínimas variaciones respecto a los carbonos alfa de ambas estructuras (Figura 5.17).

El modelo obtenido para el complejo CCE–actinidina presentó un radio de giro mayor en un principio que se mantuvo estable, hasta que entre los 90 y 100 ns presentó un cambio conformacional, compactándose más la estructura, esto puede deberse en un principio a las restricciones impuestas durante el docking, una vez que comenzó la dinámica el complejo se reorganizó de la forma energéticamente más favorable, concluyendo el tiempo de simulación con un Rg similar al obtenido para el complejo CCE–quimopapaína.

En cuanto a los perfiles de RMSF, el complejo CCE–actinidina presentó mayores fluctuaciones que el complejo CCE–quimopapaína durante toda la simulación, principalmente en los extremos. La superficie accesible al solvente se comportó de manera similar en ambos complejos.

Las interacciones presentes en ambas interfaces, en un radio de corte de 4.0 Å, son puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals y puentes salinos. El complejo CCE–quimopapaína, formó dos puentes de hidrógeno más y un puente salino adicional comparado con el complejo CCE–actinidina. De igual manera, el número de contactos atómicos intercatenarios fue mayor para la interfaz del complejo CCE–quimopapaína, que presentó 104 contactos contra 70 del complejo CCE–actinidina. En la Figura 6.1 se muestran esquemáticamente los contactos de la interfaz de cada complejo. El mayor número de interacciones en la interfaz del complejo CCE–quimopapaína sugiere una mayor entalpía de unión.

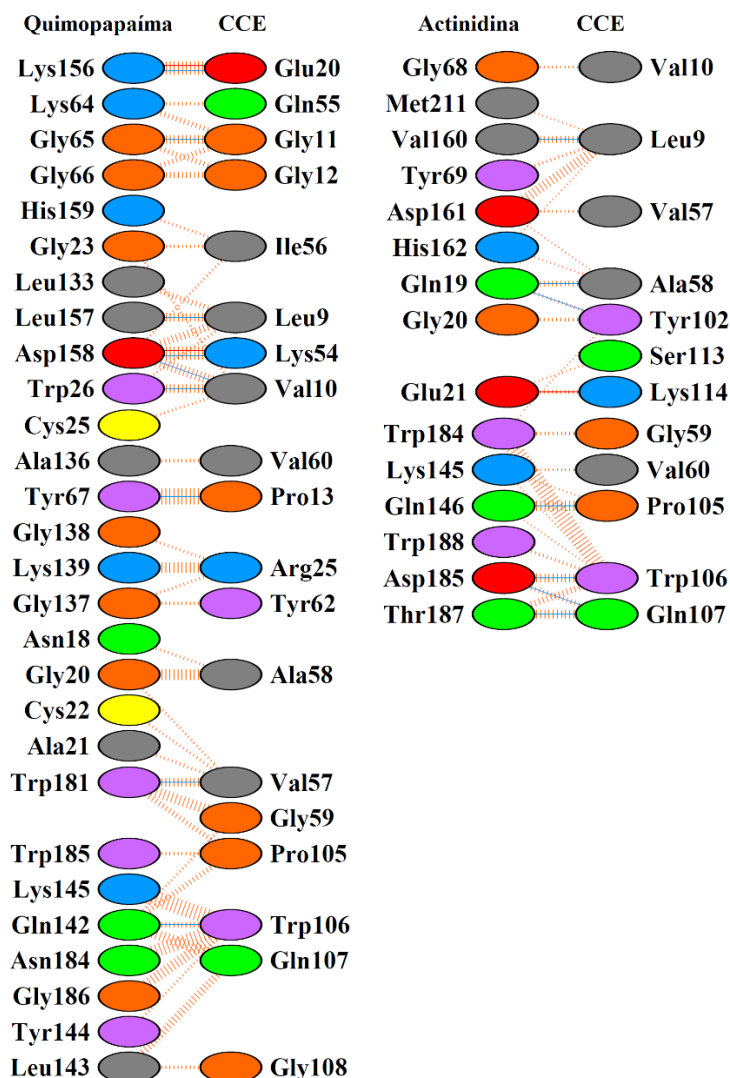


Figura 6.1 Aminoácidos que interaccionan en la interfaz de los complejos. A la izquierda se muestran las interacciones existentes en la interfaz del complejo CCE–quimopapaína y a la derecha las interacciones existentes en la interfaz del complejo CCE–actinidina. Los residuos cargados positivamente, están de color azul (H,K,R); los residuos cargados negativamente están en rojo (D,E); los que presentan carga neutra están resaltados de color verde (S,T,N,Q); los alifáticos de color gris (A,V,L,I,M); los aromáticos de color morado (F,Y,W); y la Prolina y la Glicina de color Naranja (P,G), las interacciones existentes se representan con líneas con el código de colores: puentes de hidrógeno, puentes salinos y otras interacciones. Para el caso de otras interacciones, el ancho de la línea a rayas es proporcional al número de contactos atómicos.

En la Tabla 6.1 se resumen los parámetros asociados a la interfaz de los complejos CCE–actinidina y CCE–quimopapaína. La interfaz del complejo CCE–actinidina es predominantemente no polar (69.0 % de área no polar) y en mayor porcentaje que la interfaz del complejo del complejo con quimopapaína (59.3 % de área no polar); en consecuencia, el área polar de la interfaz de este último

complejo es aproximadamente un 10 % mayor en comparación con el complejo de actinidina. En ambos casos los modelos semiempíricos basados en las áreas de la interfaz, predicen un carácter exotérmico para la unión. La mayor área polar del complejo CCE–quimopapaína concuerda con el mayor número de enlaces de hidrógeno y otras interacciones polares (ver Tabla A3 del apéndice), lo cual se refleja en un ΔH_U más negativo (Tabla 6.1) y sugiere una mayor afinidad que la del complejo CCE–actinidina.

Tabla 6.1. Comparación entre las interfaces de los complejos CCE–actinidina y CCE–quimopapaína

Comparación entre la interfaz de los complejos		
Parámetros	CCE–actinidina	CCE– quimopapaína
$\Delta ASA (\text{Å}^2)$	-1555.8	-2455.5
$\Delta ASA_{ap} (\text{Å}^2)$	-1073.7 (69.0%)	-1455.9 (59.3%)
$\Delta ASA_p (\text{Å}^2)$	-482.1 (31.0%)	-999.6 (40.7%)
Residuos	27	47
Puentes de Hidrógeno	7	9
Puentes Salinos	1	2
ΔH_U García & Hernández (kJ/mol)	-7.69	-38.5
ΔH_U Luque & Freire (kJ/mol)	-25.4	-79.9

En el complejo CCE–actinidina los residuos que contribuyen más favorablemente a la energía libre de unión de acuerdo con los cálculos de MM-PBSA (Figura 5.22) son la Leu9B formando un puente de hidrógeno con Val160A, además de diferentes interacciones con otros residuos (Met211A, Tyr69A, Asp161A, His162A), el Trp106B que forma un puente de hidrógeno con la Asp105A e interacciona además con el Trp184A, Lys145A, Gln146A, Trp188A, Asp185A y Thr187A.

6.5 Caracterización termodinámica de los complejos por ITC

Para el complejo CCE–actinidina se obtuvieron valores de ΔH_U de -26.3 kJ/mol y de ΔG_U de -35.7 kJ/mol, de lo cual se desprende que la formación del complejo es exotérmica y espontánea. Por otra parte, la contribución entrópica ($T \Delta S_U$) fue de 9.4 kJ/mol, favoreciendo de igual manera la unión del complejo. El valor de ΔH_U obtenido concuerda muy bien con el valor estimado mediante las contribuciones polares y no polares al área superficial accesible al solvente usando los coeficientes de proporcionalidad de Luque & Freire⁹² que fue de -25.4 kJ/mol.

Debido a que la actinidina es una proteasa que sufre de auto hidrólisis se hizo necesario bloquear el grupo sulfhidrilo de la cisteína catalítica antes de su purificación. Para ello se usó el metilmetanotiosulfonato como inhibidor, por tanto, los parámetros termodinámicos que aquí se muestran fueron calculados con

su cisteína catalítica bloqueada, lo cual no impide la formación del complejo. Abrahamson & Björk (1992)⁷¹ determinaron las constantes cinéticas de asociación y disociación del complejo actinidina–CCH con diferentes agentes bloqueadores. Para el caso del bloqueo con metilmetanotiosulfonato reportaron una constante de unión de $7.6 \pm 0.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, mientras que sin bloqueo la afinidad fue de $5.3 \pm 1.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$. Para el complejo actinidina–CCE obtuvimos un valor de constante de unión de $1.16 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, que es similar al valor antes mostrado para el complejo con la cistatina C silvestre.

Al comparar los sistemas CCE–actinidina y CCE–quimopapaína notamos que el primero tiene un valor de ΔG_U menos negativo en comparación con el segundo (Tabla 6.2), lo que indica que el complejo con actinidina es menos estable. Las firmas termodinámicas son diferentes pues en el caso del complejo CCE–actinidina las contribuciones entálpica y entrópica son ambas favorables a la unión, mientras que para el complejo CCE–quimopapaína la contribución entrópica es desfavorable (Tabla 6.2), esta diferencia en las contribuciones entrópicas puede ser explicada por varias razones. Cuando dos proteínas se unen para formar un complejo, sus grados de libertad (movimientos de rotación y traslación) se reducen, por tanto, si un complejo tiene más restricciones en los movimientos internos o en los grados de libertad conformacionales en comparación con otro complejo, la contribución entrópica será menor. En este caso el complejo CCE–quimopapaína es más rígido en comparación con el complejo CCE–actinidina, debido a que en su interfaz presenta una mayor cantidad de contactos atómicos, mayor número de enlaces de hidrogeno y un puente salino más, asimismo tendrá una menor entropía conformacional puesto que tiene menos posibilidades de flexión y movimiento interno.

Otra razón es que la formación de un complejo también puede liberar o restringir moléculas de agua previamente ordenadas alrededor de la superficie de las proteínas. Si esta formación resulta en una menor liberación de moléculas de agua ordenadas en comparación con un segundo complejo, la contribución entrópica será menor. En este sentido el complejo CCE–actinidina presenta un mayor porcentaje de área apolar en su interfaz, 69.0 % contra un 59.3% del complejo CCE–quimopapaína, esto indica que hay una mayor cantidad de residuos hidrofóbicos, por tanto, un mayor desplazamiento de moléculas de agua en la formación del complejo CCE–actinidina y una mayor contribución entrópica.

El valor de la constante de unión del complejo CCE–quimopapaína ($12.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) es mayor comparado con el del complejo CCE–actinidina ($1.16 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) y la entalpía de unión es más

exotérmica para el complejo CCE–quimopapaína, lo cual se ve reflejado en una mayor área polar, un mayor número de contactos atómicos en la interfaz y una mayor afinidad. En la Tabla 6.2 se resumen las firmas termodinámicas para la unión de los complejos CCE–actinidina y CCE–quimopapaína a pH 7.0 y 35 °C.

Tabla 6.2. Comparación de las firmas termodinámicas de la unión del complejo CCE–actinidina y CCE–quimopapaína a pH 7.0 y 35°C.

Complejo	$K_U (x10^6) (M^{-1})$	$\Delta G_U (kJ/mol)$	$\Delta H_U (kJ/mol)$	$T\Delta S_U (kJ/mol)$
CCE–actinidina	1.16	-35.7	-26.3	9.4
CCE–quimopapaína	12.0	-41.7	-46.1	-4.4

7. CONCLUSIONES

Se purificó a homogeneidad la actinidina aislada del fruto del kiwi, se expresó y purificó la cistatina C humana variante L47C/G69C (CCE), manteniendo ambas proteínas su integridad estructural y funcional.

Se modeló la estructura del complejo CCE–actinidina, mostrando una interfaz mayormente apolar, lo que sugiere que la contribución entrópica debe ser favorable.

La simulación de dinámica molecular mostró que el complejo CCE–actinidina es estable y ambas proteínas se mantienen unidas por puentes de hidrógeno, puentes salinos e interacciones de van der Waals.

Se determinaron los parámetros termodinámicos para la asociación del complejo CCE–actinidina a pH 7.0 y 35.0 °C, tanto el componente entálpico como el entrópico favorecen esta unión.

Las interacciones de CCE tanto con quimopapaína como con actinidina son exotérmicas; sin embargo, el complejo CCE–quimopapaína muestra una afinidad mayor que el CCE–actinidina, con una constante de unión 10.3 veces más alta y una entalpía de unión 1.75 veces más negativa.

8. PERSPECTIVAS

Determinar los parámetros termodinámicos para la asociación del complejo CCE–actinidina a diferentes temperaturas para determinar el cambio en la capacidad calorífica de unión mediante la ecuación integrada de van't Hoff y por calorimetría de titulación isotérmica.

Resolver la estructura cristalográfica del complejo CCE–actinidina por difracción de rayos X.

Determinar los parámetros termodinámicos de la interacción entre la cistatina C humana y la catepsina K humana y analizar la interfaz del complejo.

REFERENCIAS

1. Amit Kessel, Nir Ben-Tal. (2011) Introduction to proteins: structure, function, and motion. Boca Raton, FL: CRC Press
2. Lehninger, A. L., Nelson D. L. y Cox M. M. (2005) Principios de Bioquímica, cuarta edición, Ed. Omega, Barcelona, España.
3. Christopher K. Mathews, K. E. Van Holde, Dean R. Appling y Spencer J. Anthony-Cahill. (2013). Bioquímica. Cuarta edición, Ed. PEARSON EDUCACIÓN
4. E. Fischer, Ber. Dtsch. Chem. (Ges. 1894) 27. 2985.
5. Daniel E. Koshland, Jr. (1994) The Key-Lock theory and the induced fit theory. *Angew. Chem. Int. Ed. Ed. Engl.* 33: 2375-2378
6. Sinead Boyce, Keith F Tipton. (2001). Enzyme classification and Nomenclature. Encyclopedia of life sciences/ Nature publishing group.
7. P. Singhal, V. Nigam, A. Vidyarthi, Studies on production, characterization and applications of microbial alkaline proteases, *Int. J. Adv. Biotechnol. Res.* 3 (3) (2012) 653669.
8. Maurer, K.-H. Detergent Proteases. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2004, 15, 330–334.
9. Rawlings, N. D., Barret Alan J., Thomas Paul D., Huang Xiaosong, Bateman Alex y Finn Robert D. (2018). The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitor in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Research.* 46: D624-D632
10. J. Yin, J.-C. Chen, Q. Wu, G.-Q. Chen, Halophiles, coming stars for industrial biotechnology, *Biotechnol. Adv.* 33 (7) (2015) 1433’1442.
11. Białkowska, E. Gromek, T. Floreczak, J. Krysiak, K. Szulczewska, M. Turkiewicz, Extremophilic proteases: developments of their special functions, potential resources and biotechnological applications, in: P.H. Rampelotto (Ed.), *Biotechnology of Extremophiles: Advances and Challenges*, Springer International Publishing, Cham, 2016, pp. 399-444.
12. Hedstrom, L. Serine protease mechanism and specificity. *Chem. Rev.* **102**, 4501–4523 (2002).
13. Erez, E., Fass, D., & Bibi, E. (2009). How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane. *Nature*, 459(7245), 371–378. <https://doi.org/10.1038/nature08146>
14. Beynon, R. & Bond, J. *Medicinal Chemistry. A Biochemical Approach (Second Edition)*. *Biochemical Education* **18**, (2001).

15. Joel D. A. Tyndall, Tessa Nall, David P. Fairlie. (2005). Proteases universally recognize beta strands in their active sites. *Chemical Reviews*. 105: 973-999
16. Chapman, H. A., Riese, R. J., and Shi, G. P. (1997). Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu. Rev. Physiol.* 59, 63–88. doi: 10.1146/annurev.physiol.59.1.63
17. Vasiljeva, O., Reinheckel, T., Peters, C., Turk, D., Turk, V., and Turk, B. (2007). Emerging roles of cysteine cathepsins in disease and their potential as drug targets. *Curr. Pharm. Des.* 13, 387–403. doi: 10.2174/138161207779313542
18. Walsh, G. (2014). “Protein sources,” in *Proteins: Biochemistry and Biotechnology*, 2nd Edn (Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell), 80–83. doi: 10.1002/9781119117599.ch3
19. A. K. Balls, Hans Lineweaver y R. R. Thompson. (1937). Crystalline Papain. *Science* 86: 3794.
20. Rossi, A., Deveraux, Q., Turk, B., and Sali, A. (2004). Comprehensive search for cysteine cathepsins in the human genome. *Biol. Chem.* 385, 363–372. doi: 10.1515/BC.2004.040
21. Lecaille, F., Kaleta, J., and Bromme, D. (2002). Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. *Chem. Rev.* 102, 4459–4488. doi: 10.1021/cr0101656
22. Petrov, V., Fagard, R., and Lijnen, P. (2000). Effect of protease inhibitors on angiotensin-converting enzyme activity in human T-lymphocytes. *Am. J. Hypertens.* 13, 535–539. doi: 10.1016/S0895-7061(99)00236-8
23. Gills, J. J., Lopiccio, J., Tsurutani, J., Shoemaker, R. H., Best, C. J., AbuAsab, M. S., et al. (2007). Nelfinavir, A lead HIV protease inhibitor, is a broad-spectrum, anticancer agent that induces endoplasmic reticulum stress, autophagy, and apoptosis in vitro and in vivo. *Clin. Cancer Res.* 13, 5183–5194. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0161
24. Salminen-Mankonen, H. J., Morko, J., and Vuorio, E. (2007). Role of cathepsin K in normal joint sand in the development of arthritis. *Curr. Drug Targets* 8, 315–323. doi: 10.2174/138945007779940188
25. Turk, D., Podobnik, M., Kuhelj, R., Dolinar, M., and Turk, V. (1996). Crystal structures of human pro cathepsin B at 3.2 and 3.3 Angstroms resolution reveal an interaction motif between a papain-like cysteine protease and its propeptide. *FEBS Lett.* 384, 211–214. doi: 10.1016/0014-5793(96)00309-2
26. Rzychon, M., Chmiel, D., & Stec-Niemczyk, J. (2004). Modes of inhibition of cysteine

- proteases. *Acta biochimica Polonica*, 51(4), 861–873
27. Dieter Bromme, S.W. (2011). “Role of cysteine cathepsin extracellular proteolysis,” in *Extracellular Matrix Degradation*, eds R.P.M. William and C. Parks (Berlin: Springer), 23–51.
28. Martinez, M., and Diaz, I. (2008). The origin and evolution of plant cystatins and their target cysteine proteinases indicate a complex functional relationship. *BMCE vol. Biol.* 8:198. doi:10.1186/1471-2148-8-198
29. Ochieng, J., & Chaudhuri, G. (2010). Cystatin superfamily. *Journal of health care for the poor and underserved*, 21(1 Suppl), 51–70. <https://doi.org/10.1353/hpu.0.0257>
30. Sokol JP, Schiemann WP. Cystatin C antagonizes transforming growth factor beta signaling in normal and cancer cells. *Mol Cancer Res.* 2004 Mar;2(3):183–95.
31. Ni J, Abrahamson M, Zhang M. Cystatin E is a novel human cysteine proteinase inhibitor with structural resemblance to family 2 cystatins. *J Biol Chem.* 1997 Apr 18;272(16):10853–8.
32. Du X, Li Y, Xia (2016). Insights into P-L interactions. Mechanism, models, and methods *IJMS16*
33. Gilson, M. K., & Zhou, H. X. (2007). Calculation of protein-ligand binding affinities. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 36, 21–42. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.36.040306.132550>
34. Gibbs, JW Un método de representación geométrica de las propiedades termodinámicas de sustancias mediante superficies. *Trans. Connecticut Acad. Artes y ciencias.* 1873, 2 , 382–404.
35. Li, H.; Xie, Y.; Liu, C.; Liu, S. Bases fisicoquímicas para el plegamiento, la dinámica y la unión de proteínas a ligandos. *Ciencia. Ciencia de la vida de China.* 2014 , 57 , 287–302.
36. Perozzo, R.; Folkers, G.; Scapozza, L. Termodinámica de las interacciones proteína-ligando: historia, presencia y aspectos futuros. *J. Recepción. Señal. Transducir. Res.* 2004,24, 1–52.

37. Liu, SQ; Xie, YH; Ji, XL; Tao, Y.; Bronceado, DY; Zhang, KQ; Fu, YX Plegado de proteínas, unión y paisaje energético: una síntesis. En *Ingeniería de Proteínas*; Kaumaya, PTP, Ed.; InTech: Rijeka, Croacia, 2012; págs. 207–252.
38. Bronowska, AK Termodinámica de las interacciones ligando-proteína: implicaciones para el diseño molecular. En *Termodinámica—Estudios de Interacción—Sólidos, Líquidos y Gases*; Moreno-Piraján, JC, Ed.; InTech: Rijeka, Croacia, 2011; págs. 1–48.
39. Arcus, A. C. (1959). Proteolytic enzyme of *Actinidia chinensis*. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 33, 242–244.
40. McDowall, M. A. (1970). Anionic proteinase from *Actinidia chinensis*—Preparation and properties of crystalline enzyme. *European Journal of Biochemistry*, 14, 214–221.
41. Carne, A., & Moore, C. H. (1978). Amino-acid sequence of tryptic peptides from actinidin. A proteolytic enzyme from fruit of *Actinidia chinensis*. *The Biochemical Journal*, 173, 73–83.
42. Baker, E. N. (1973). Preliminary crystallographic data for actinidin. A thiol protease from *Actinidia chinensis*. *Journal of Molecular Biology*, 74, 411–412.
43. Baker, E. N. (1976). Structure of actinidin at 5.5 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 101, 185–196.
44. Baker, E. N. (1977). Structure of actinidin—Details of polypeptide-chain conformation and active-site from an electron-density map at 28 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 115, 263–277.
45. Baker, E. N. (1980). Structure of actinidin, after refinement at 1.7-Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 141, 441–484.
46. Baker, E. N., & Dodson, E. J. (1980). Crystallographic refinement of the structure of actinidin at 1.7 Å resolution by fast fourier least-squares methods. *Acta Crystallographica. Section A*, 36, 559–572.
47. Baker, E. N., Boland, M. J., Calder, P. C., & Hardman, M. J. (1980). The specificity of actinidin and its relationship to the structure of the enzyme. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 616, 30–34.
48. Boland, M. J. (1973). Properties of Actinidin. *Chemistry in New Zealand*, 37, 83–88
49. Boland, M. J., & Hardman, M. J. (1973a). Actinidin-catalyzed hydrolysis of N-alpha

- benzyloxycarbonyl- L-lysine P-nitrophenyl ester—pH-dependence and mechanism. *European Journal of Biochemistry*, 36, 575–582.
50. Larocca, M., Rossano, R., & Riccio, P. (2010). Analysis of green kiwi fruit (*Actinidia deliciosa* cv. Hayward) proteinases by two-dimensional zymography and direct identification of zymographic spots by mass spectrometry. *Journal of the science of food and agriculture*, 90(14), 2411–2418. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4100>
51. Grozdanović, M. M., Drakulić, B. J., & Gavrović-Jankulović, M. (2013). Conformational mobility of active and E-64-inhibited actinidin. *Biochimica et biophysica acta*, 1830(10), 4790–4799. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.06.015>
52. Chao Dongfang. (2016). Actinidin: The predominant protease in kiwifruit: A thesis presented in partial fulfilment of the requirements for the degree of Master of Philosophy in Food Technology at Massey University, Manawatu, New Zealand.
53. Baker, E. N., & Drenth, J. (1987). The cysteine proteinases: Structure and mechanism. In F. Journak & A. McPherson (Eds.), *Biological macromolecules and assemblies*, Vol. 3, (pp. 313–368). New York: Wiley.
54. Nieuwenhuizen, N. J., Beuning, L. L., Sutherland, P. W., Sharma, N. N., Cooney, J. M., Bielecki, L. R. F., et al. (2007). Identification and characterization of acidic and novel basic forms of actinidin, the highly abundant cysteine protease from kiwifruit. *Function a Plant Biology*, 34, 946–961.
55. Praekelt, U. M., McKee, R. A., & Smith, H. (1988). Molecular analysis of actinidin, the cysteine proteinase of *Actinidia chinensis*. *Plant Molecular Biology*, 10, 193–202.
56. Atkinson, R. G., Gunaseelan, K., Wang, M. Y., Luo, L., Wang, T., Norling, C. L., et al. (2011). Dissecting the role of climacteric ethylene in kiwifruit (*Actinidia chinensis*) ripening using a 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase knockdown line. *Journal of Experimental Botany*, 62, 3821–3835
57. Sugiyama, S., Ohtsuki, K., Sato, K., & Kawabata, M. (1996). Purification and characterization of six kiwifruit proteases isolated with two ion-exchange resins.
58. Tello Solis, S. R., Valle Guadarrama, M. E., & Hernandez Arana, A. (1995). Purification and circular-dichroism studies of multiple forms of actinidin from *Actinidia chinensis* (kiwifruit). *Plant Science*, 106, 227–232.

59. Abrahamson M. (1996). Molecular basis for amyloidosis related to hereditary brain hemorrhage. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 226: 47-56
60. Levy, E. (2008). Cystatin C: a potential target for Alzheimer's treatment. *Expert Reviews of Neurotherapeutics* 8: 687-689.
61. M. Sastre, M. Calero, M. Pawlik, PM. Mathews, A. Kumar, V. Danilov, SD. Schmidt, RA. Nixon, B. Frangione y E. Levy. (2004). Binding of cystatin C to Alzheimer's amyloid beta inhibits in vitro amyloid fibril formation. *Neurobiol Aging*. 25: 1033-1043
62. Nilsson M, Wang X, Rodziewicz-Motowidlo S, Janowski R, Lindstrom V, Onnerfjord P, Westermark G, Grzonka Z, Jaskolski M & Grubb A (2004) Prevention of domain swapping inhibits dimerization and amyloid fibril formation of cystatin C: use of engineered disulfide bridges, antibodies, and carboxymethylpapain to stabilize the monomeric form of cystatin C. *J Biol Chem* 279, 24236–24245.
63. Adelina S. Oliveira, José Xavier-Filho y Maurício P. Sales. (2003). Cysteine Proteinases and Cystatins. *Brazilian Archives of Biology and Technology an International Journal* 46(1):91 – 104.
64. Tovar-Anaya, Vera-Robles, Vieyra-Eusebio, Garcia-Gutierrez, Reyes-Espinosa, Hernandez-Arana, Arroyo-Reyna, A. Zubillaga (2019). Stabilized Human Cystatin C Variant L47C/G69C Is a Better Reporter Than the Wild-Type Inhibitor for Characterizing the Thermodynamics of Binding to Cysteine Proteinases.
65. Robert Kolodziejczyk (2010). Crystal structure of human cystatin C stabilized against amyloid formation.
66. Yongjun Zhou, Yan Zhou, Jun Li, Jian Chen, Yuqin Yao, Lin Yu, Desheng Peng, Mingrong Wang, Dan Su, Yong He y Lantu Gou. (2015). Efficient expression, purification and characterization of native human cystatin C in *Escherichia coli* periplasm. *Protein Expression and Purification*. 111: 18-22.
67. Yamada M. Cerebral amyloid angiopathy: an overview. *Neuropathology*. 2000 Mar; 20(1):8–22.
68. Reyes-Espinosa, Arroyo-Reyna, A. Zubillaga, (2019). Effects of pH on the Association between the Inhibitor Cystatin and the Proteinase Chymopapain.
69. Bode, W., Engh, R., Musil, D., Thiele, U., Huber, R., Karshikov, A., Brzin, J., Kos, J., &

- Turk, V. (1988). The 2.0 Å X-ray crystal structure of chicken egg white cystatin and its possible mode of interaction with cysteine proteinases. *The EMBO journal*, 7(8), 2593–2599. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1988.tb03109>.
70. Abrahamson M. (1994). Cystatins. *Methods in enzymology*, 244, 685–700. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)44051-4](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)44051-4)
71. Lindahl, P., Abrahamson, M., & Björk, I. (1992). Interaction of recombinant human cystatin C with the cysteine proteinases papain and actinidin. *The Biochemical journal*, 281 (Pt 1)(Pt 1), 49–55. <https://doi.org/10.1042/bj2810049>
72. Ni, J., Abrahamson, M., Zhang, M., Fernandez, M. A., Grubb, A., Su, J., Yu, G. L., Li, Y., Parmelee, D., Xing, L., Coleman, T. A., Gentz, S., Thotakura, R., Nguyen, N., Hesselberg, M., & Gentz, R. (1997). Cystatin E is a novel human cysteine proteinase inhibitor with structural resemblance to family 2 cystatins. *The Journal of biological chemistry*, 272(16), 10853–10858. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.16.10853>
73. Ni, J., Fernandez, M. A., Danielsson, L., Chillakuru, R. A., Zhang, J., Grubb, A., Su, J., Gentz, R., & Abrahamson, M. (1998). Cystatin F is a glycosylated human low molecular weight cysteine proteinase inhibitor. *The Journal of biological chemistry*, 273(38), 24797–24804. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.38.24797>
74. Müller-Esterl, W., Fritz, H., Machleidt, W., Ritonja, A., Brzin, J., Kotnik, M., Turk, V., Kellermann, J., & Lottspeich, F. (1985). Human plasma kininogens are identical with alpha-cysteine proteinase inhibitors. Evidence from immunological, enzymological and sequence data. *FEBS letters*, 182(2), 310–314. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(85\)80322-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(85)80322-7)
75. Barrett A. J. (1986). The cystatins: a diverse superfamily of cysteine peptidase inhibitors. *Biomedica biochimica acta*, 45(11-12), 1363–1374.
76. Grzonka, Z., Jankowska, E., Kasprzykowski, F., Kasprzykowska, R., Lankiewicz, L., Wicz, W., Wiczczak, E., Ciarkowski, J., Drabik, P., Janowski, R., Kozak, M., Jaskólski, M., & Grubb, A. (2001). Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. *Acta biochimica Polonica*, 48(1), 1–20.
77. Grubb, A., Abrahamson, M., Olafsson, I., Trojnar, J., Kasprzykowska, R., Kasprzykowski, F., & Grzonka, Z. (1990). Synthesis of cysteine proteinase inhibitors structurally based on the proteinase interacting N-terminal region of human cystatin C. *Biological chemistry Hoppe-Seyler*, 371 Suppl, 137–144.

78. Stubbs, M. T., Laber, B., Bode, W., Huber, R., Jerala, R., Lenarcic, B., & Turk, V. (1990). The refined 2.4 Å X-ray crystal structure of recombinant human stefin B in complex with the cysteine proteinase papain: a novel type of proteinase inhibitor interaction. *The EMBO journal*, 9(6), 1939–1947. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb08321.x>.
79. Ali, M. (2018). Optimizing extraction conditions of actinidin from kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Al-Mustansiriyah Journal of Science*, 28, 61. <https://doi.org/10.23851/mjs.v28i3.57>
80. Barret, A. J. Cystatin, the egg white inhibitor of cysteine proteinases. *Methods in Enzymology*, **1981**, 80, 771 - 778.
81. <https://modbase.compbio.ucsf.edu/modloop/>
82. <https://ambermd.org/AmberModels.php>.
83. <https://server.poissonboltzmann.org/pdb2pqr>.
84. <https://www.charmm-gui.org/?doc=input/solution>.
85. <https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>.
86. <https://life.bsc.es/pid/pydockweb>.
87. Alejandre, J., & Chapela, G. A. (2010). The surface tension of TIP4P/2005 water model using the Ewald sums for the dispersion interactions. *The Journal of chemical physics*, 132(1), 014701. <https://doi.org/10.1063/1.3279128>.
88. Wiseman T, Williston S, Brandts JF, Lin L-N. (1989). Rapid measurement of binding using a new titration calorimeter. *Anal. Biochem.* 179: 131-137
89. <https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/>.
90. <https://curie.utmb.edu/getarea.html>
91. García-Hernández, E., & Hernández-Arana, A. (1999). Structural bases of lectin-carbohydrate affinities: comparison with protein-folding energetics. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 8(5), 1075–1086. <https://doi.org/10.1110/ps.8.5.1075>
92. Luque I. and Freire E. (2002). Structural parameterization of the binding enthalpy of small ligands. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 49: 181-190 *Science* 12(1): 135-142.
93. Janowski, R., Abrahamson, M., Grubb, A., & Jaskolski, M. (2004). Domain swapping in N-truncated human cystatin C. *Journal of molecular biology*, 341(1), 151–160. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.06.013>

APÉNDICE

A. Simulación de dinámica molecular

A.1. Simulación de DM de la CCE

De acuerdo con el perfil de RMSF de las simulaciones de dinámica molecular realizado a la cistatina C estabilizada se puede apreciar la movilidad existente en su extremo amino terminal en la figura E1, mientras las otras partes de la proteína se mantiene estable, con pocas fluctuaciones. Asimismo, en la figura E2 se aprecia el perfil de RMSD del mismo inhibidor.

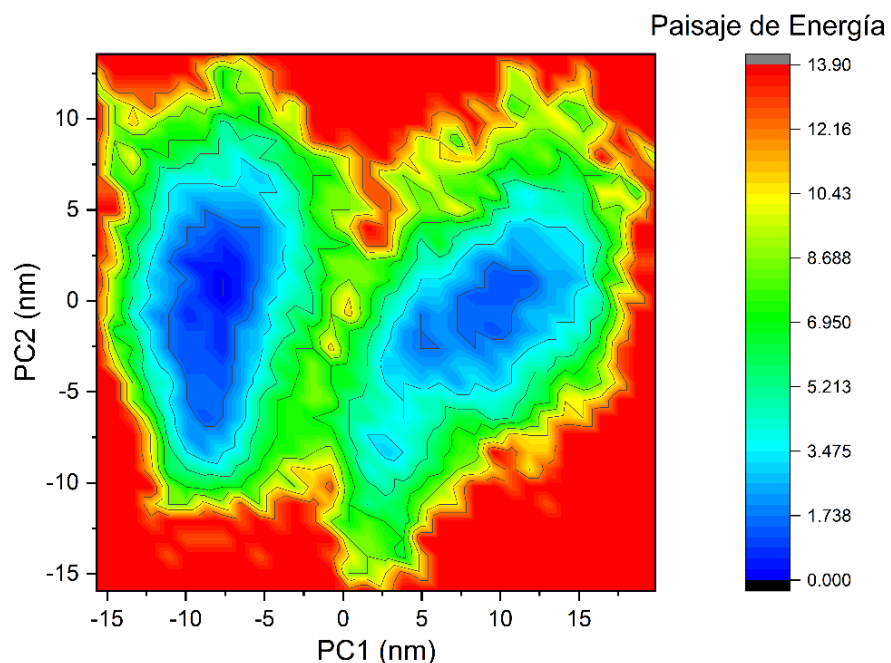


Figura A1. Proyección de Energía libre de paisaje (*Free Energy Landscape, FEL*) sobre los primeros componentes principales obtenidos de la simulación con el modelo CCE-actinidina.

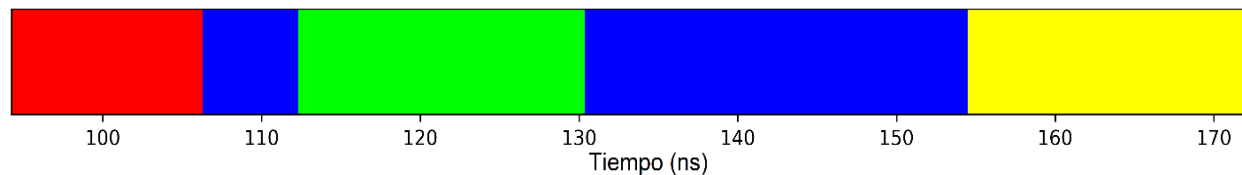


Figura A2. Distribución respecto al tiempo de cada clúster definido con las trayectorias aisladas de los mínimos de energía obtenidos del PCA.

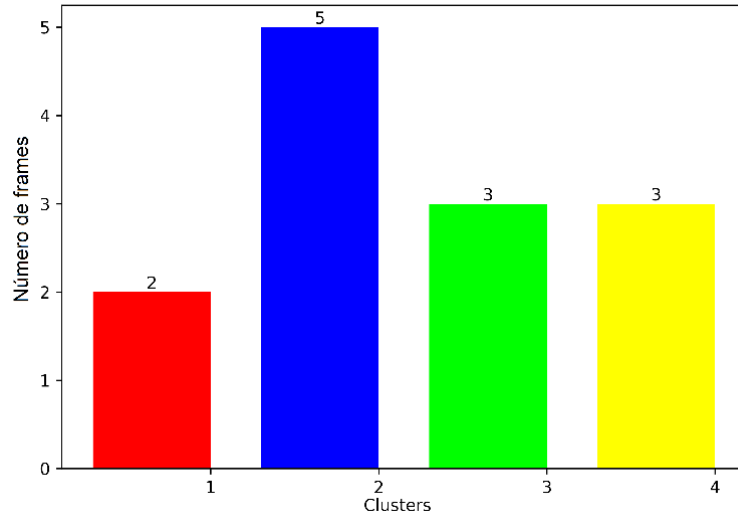


Figura A3. Distribución de *snapshots o frames* de los clústeres definidos con las trayectorias aisladas de los mínimos de energía de la simulación de dinámica molecular

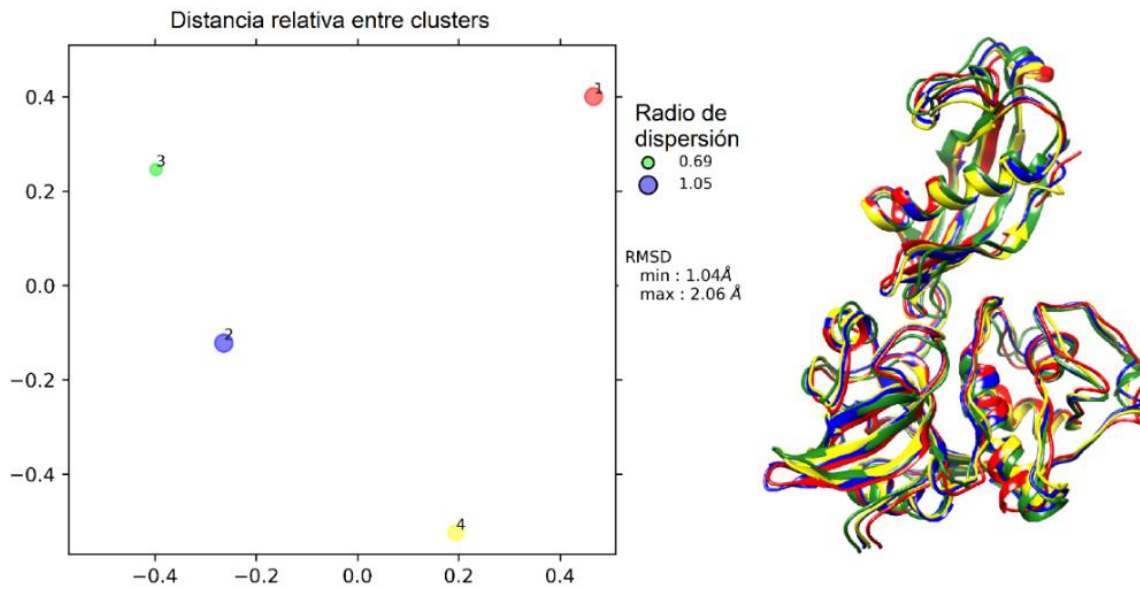


Figura A4. Distancia relativa entre clusters y superposición de los 4 clusters obtenidos.

Tabla A1. Lista de contactos en la interfaz del complejo CCE–actinidina con un radio de corte de 4.0 Å.

	No.	Átomo	Residuo	Cadena		No.	Átomo	Residuo	Cadena	Distancia
1.	285	CG	GLN	19	A <-->	4650	OH	TYR	102	B 3.82
2.	288	CD	GLN	19	A <-->	3950	O	ALA	58	B 3.68
3.	289	OE1	GLN	19	A <-->	3950	O	ALA	58	B 3.71
4.	290	NE2	GLN	19	A <-->	3950	O	ALA	58	B 2.72
5.	290	NE2	GLN	19	A <-->	4650	OH	TYR	102	B 3.31
6.	301	O	GLY	20	A <-->	4652	CE2	TYR	102	B 3.89
7.	301	O	GLY	20	A <-->	4649	CZ	TYR	102	B 3.68
8.	306	CB	GLU	21	A <-->	4817	OG	SER	113	B 3.71
9.	314	OE2	GLU	21	A <-->	4834	CE	LYS	114	B 3.28
10.	314	OE2	GLU	21	A <-->	4837	NZ	LYS	114	B 3.61
11.	963	N	GLY	68	A <-->	3217	CG1	VAL	10	B 3.85
12.	977	CG	TYR	69	A <-->	3205	CD2	LEU	9	B 3.69
13.	978	CD1	TYR	69	A <-->	3205	CD2	LEU	9	B 3.77
14.	2122	O	LYS	145	A <-->	4702	CB	TRP	106	B 3.45
15.	2111	CD	LYS	145	A <-->	4688	CG	PRO	105	B 3.66
16.	2114	CE	LYS	145	A <-->	3968	CG2	VAL	60	B 3.78
17.	2133	CD	GLN	146	A <-->	4697	O	PRO	105	B 3.71
18.	2134	OE1	GLN	146	A <-->	4696	C	PRO	105	B 3.50
19.	2134	OE1	GLN	146	A <-->	4697	O	PRO	105	B 3.33
20.	2134	OE1	GLN	146	A <-->	4691	CB	PRO	105	B 3.40
21.	2134	OE1	GLN	146	A <-->	4698	N	TRP	106	B 3.77
22.	2135	NE2	GLN	146	A <-->	4696	C	PRO	105	B 3.79
23.	2135	NE2	GLN	146	A <-->	4697	O	PRO	105	B 3.02
24.	2318	C	VAL	160	A <-->	3194	CA	LEU	9	B 3.86
25.	2319	O	VAL	160	A <-->	3190	N	LEU	9	B 2.97
26.	2319	O	VAL	160	A <-->	3194	CA	LEU	9	B 3.06
27.	2319	O	VAL	160	A <-->	3196	CB	LEU	9	B 3.88
28.	2322	CA	ASP	161	A <-->	3210	O	LEU	9	B 3.56
29.	2322	CA	ASP	161	A <-->	3201	CD1	LEU	9	B 3.79
30.	2330	C	ASP	161	A <-->	3210	O	LEU	9	B 3.71
31.	2330	C	ASP	161	A <-->	3201	CD1	LEU	9	B 3.48
32.	2331	O	ASP	161	A <-->	3210	O	LEU	9	B 3.15
33.	2331	O	ASP	161	A <-->	3201	CD1	LEU	9	B 3.59
34.	2331	O	ASP	161	A <-->	3941	N	ALA	58	B 3.39
35.	2329	OD2	ASP	161	A <-->	3931	CG1	VAL	57	B 3.81
36.	2332	N	HIS	162	A <-->	3201	CD1	LEU	9	B 3.71
37.	2340	ND1	HIS	162	A <-->	3943	CA	ALA	58	B 3.49
38.	2685	O	TRP	184	A <-->	4650	OH	TYR	102	B 3.53
39.	2669	CG	TRP	184	A <-->	4713	CH2	TRP	106	B 3.64
40.	2670	CD1	TRP	184	A <-->	4711	CZ2	TRP	106	B 3.53
41.	2670	CD1	TRP	184	A <-->	4713	CH2	TRP	106	B 3.48
42.	2683	CD2	TRP	184	A <-->	4713	CH2	TRP	106	B 3.48
43.	2672	NE1	TRP	184	A <-->	4711	CZ2	TRP	106	B 3.62
44.	2672	NE1	TRP	184	A <-->	4715	CZ3	TRP	106	B 3.71
45.	2672	NE1	TRP	184	A <-->	4713	CH2	TRP	106	B 3.29
46.	2674	CE2	TRP	184	A <-->	4715	CZ3	TRP	106	B 3.52
47.	2674	CE2	TRP	184	A <-->	4713	CH2	TRP	106	B 3.33
48.	2681	CE3	TRP	184	A <-->	3951	N	GLY	59	B 3.79
49.	2681	CE3	TRP	184	A <-->	3953	CA	GLY	59	B 3.84
50.	2675	CZ2	TRP	184	A <-->	4715	CZ3	TRP	106	B 3.69
51.	2690	CB	ASP	185	A <-->	4708	NE1	TRP	106	B 3.59
52.	2690	CB	ASP	185	A <-->	4711	CZ2	TRP	106	B 3.72
53.	2693	CG	ASP	185	A <-->	4708	NE1	TRP	106	B 3.59
54.	2693	CG	ASP	185	A <-->	4734	NE2	GLN	107	B 3.78
55.	2694	OD1	ASP	185	A <-->	4734	NE2	GLN	107	B 3.69
56.	2695	OD2	ASP	185	A <-->	4706	CD1	TRP	106	B 3.89
57.	2695	OD2	ASP	185	A <-->	4708	NE1	TRP	106	B 3.07
58.	2695	OD2	ASP	185	A <-->	4734	NE2	GLN	107	B 3.25
59.	2724	C	THR	187	A <-->	4706	CD1	TRP	106	B 3.76
60.	2725	O	THR	187	A <-->	4706	CD1	TRP	106	B 3.72
61.	2716	CB	THR	187	A <-->	4734	NE2	GLN	107	B 3.85
62.	2722	OG1	THR	187	A <-->	4706	CD1	TRP	106	B 3.44
63.	2722	OG1	THR	187	A <-->	4708	NE1	TRP	106	B 3.59
64.	2722	OG1	THR	187	A <-->	4729	CG	GLN	107	B 3.04
65.	2722	OG1	THR	187	A <-->	4732	CD	GLN	107	B 3.29
66.	2722	OG1	THR	187	A <-->	4734	NE2	GLN	107	B 2.87
67.	2718	CG2	THR	187	A <-->	4734	NE2	GLN	107	B 3.75

68.	2726	N	TRP	188	A	<-->	4706	CD1	TRP	106	B	3.69
69.	2726	N	TRP	188	A	<-->	4708	NE1	TRP	106	B	3.52
70.	3063	SD	MET	211	A	<-->	3205	CD2	LEU	9	B	3.61

Tabla A2. Lista de contactos en la interfaz del complejo **CCE–quimopapaína** con un radio de corte de 4.0 Å.

	No.	Átomo	Residuo	Cadena		No.	Átomo	Residuo	Cadena	Distancia		
1.	280	OD1	ASN	18	A	<-->	4053	CB	ALA	58	B	3.23
2.	307	N	GLY	20	A	<-->	4053	CB	ALA	58	B	3.85
3.	308	CA	GLY	20	A	<-->	4053	CB	ALA	58	B	3.83
4.	310	O	GLY	20	A	<-->	4037	CB	VAL	57	B	3.72
5.	310	O	GLY	20	A	<-->	4051	N	ALA	58	B	3.39
6.	310	O	GLY	20	A	<-->	4053	CB	ALA	58	B	3.44
7.	318	O	ALA	21	A	<-->	4038	CG1	VAL	57	B	3.74
8.	329	O	CYS	22	A	<-->	4036	CA	VAL	57	B	3.78
9.	335	CA	GLY	23	A	<-->	4023	O	ILE	56	B	3.75
10.	337	O	GLY	23	A	<-->	3327	O	VAL	10	B	3.34
11.	355	SG	CYS	25	A	<-->	3327	O	VAL	10	B	3.62
12.	367	CD1	TRP	26	A	<-->	3303	CG	LEU	9	B	3.86
13.	367	CD1	TRP	26	A	<-->	3327	O	VAL	10	B	3.52
14.	369	NE1	TRP	26	A	<-->	3326	C	VAL	10	B	3.74
15.	369	NE1	TRP	26	A	<-->	3327	O	VAL	10	B	3.17
16.	936	CA	LYS	64	A	<-->	3340	O	GLY	11	B	3.63
17.	942	C	LYS	64	A	<-->	3340	O	GLY	11	B	3.75
18.	938	CG	LYS	64	A	<-->	4004	OE1	GLN	55	B	3.90
19.	957	N	GLY	65	A	<-->	3339	C	GLY	11	B	3.68
20.	957	N	GLY	65	A	<-->	3340	O	GLY	11	B	2.88
21.	958	CA	GLY	65	A	<-->	3340	O	GLY	11	B	3.81
22.	958	CA	GLY	65	A	<-->	3345	CA	GLY	12	B	3.86
23.	959	C	GLY	65	A	<-->	3345	CA	GLY	12	B	3.78
24.	967	O	GLY	66	A	<-->	3338	CA	GLY	11	B	3.85
25.	967	O	GLY	66	A	<-->	3339	C	GLY	11	B	3.65
26.	967	O	GLY	66	A	<-->	3344	N	GLY	12	B	3.30
27.	967	O	GLY	66	A	<-->	3345	CA	GLY	12	B	3.84
28.	978	CE2	TYR	67	A	<-->	3357	O	PRO	13	B	3.71
29.	979	CZ	TYR	67	A	<-->	3357	O	PRO	13	B	3.60
30.	980	OH	TYR	67	A	<-->	3351	N	PRO	13	B	3.78
31.	980	OH	TYR	67	A	<-->	3356	C	PRO	13	B	3.84
32.	980	OH	TYR	67	A	<-->	3357	O	PRO	13	B	2.77
33.	980	OH	TYR	67	A	<-->	3355	CD	PRO	13	B	3.80
34.	2008	CD2	LEU	133	A	<-->	3304	CD1	LEU	9	B	3.53
35.	2008	CD2	LEU	133	A	<-->	3305	CD2	LEU	9	B	3.78
36.	2057	O	ALA	136	A	<-->	4072	CG2	VAL	60	B	3.54
37.	2066	O	GLY	137	A	<-->	3531	NH2	ARG	25	B	2.96
38.	2066	O	GLY	137	A	<-->	4107	OH	TYR	62	B	3.53
39.	2071	CA	GLY	138	A	<-->	3531	NH2	ARG	25	B	3.85
40.	2077	N	LYS	139	A	<-->	3529	CZ	ARG	25	B	3.72
41.	2077	N	LYS	139	A	<-->	3530	NH1	ARG	25	B	3.87
42.	2077	N	LYS	139	A	<-->	3531	NH2	ARG	25	B	3.74
43.	2079	CB	LYS	139	A	<-->	3528	NE	ARG	25	B	3.90
44.	2140	C	GLN	142	A	<-->	4840	O	GLN	107	B	3.47
45.	2141	O	GLN	142	A	<-->	4795	CA	PRO	105	B	3.81
46.	2141	O	GLN	142	A	<-->	4799	C	PRO	105	B	3.88
47.	2141	O	GLN	142	A	<-->	4808	N	TRP	106	B	3.02
48.	2141	O	GLN	142	A	<-->	4809	CA	TRP	106	B	3.67
49.	2141	O	GLN	142	A	<-->	4832	N	GLN	107	B	3.70
50.	2141	O	GLN	142	A	<-->	4840	O	GLN	107	B	3.47
51.	2135	CB	GLN	142	A	<-->	4840	O	GLN	107	B	3.77
52.	2138	OE1	GLN	142	A	<-->	4062	CA	GLY	59	B	3.85
53.	2150	N	LEU	143	A	<-->	4840	O	GLN	107	B	3.65
54.	2151	CA	LEU	143	A	<-->	4840	O	GLN	107	B	3.78
55.	2153	CG	LEU	143	A	<-->	4840	O	GLN	107	B	3.69
56.	2153	CG	LEU	143	A	<-->	4850	CA	GLY	108	B	3.76
57.	2180	O	TYR	144	A	<-->	4816	CE3	TRP	106	B	3.68
58.	2191	CA	LYS	145	A	<-->	4818	CZ3	TRP	106	B	3.53
59.	2192	CB	LYS	145	A	<-->	4818	CZ3	TRP	106	B	3.48
60.	2193	CG	LYS	145	A	<-->	4816	CE3	TRP	106	B	3.52
61.	2193	CG	LYS	145	A	<-->	4818	CZ3	TRP	106	B	3.48

62.	2195	CE	LYS	145	A	<-->	4821	O	TRP	106	B	3.47
63.	2196	NZ	LYS	145	A	<-->	4821	O	TRP	106	B	3.80
64.	2334	CD	LYS	156	A	<-->	3452	OE2	GLU	20	B	3.31
65.	2335	CE	LYS	156	A	<-->	3452	OE2	GLU	20	B	3.40
66.	2336	NZ	LYS	156	A	<-->	3450	CD	GLU	20	B	3.15
67.	2336	NZ	LYS	156	A	<-->	3451	OE1	GLU	20	B	2.95
68.	2336	NZ	LYS	156	A	<-->	3452	OE2	GLU	20	B	2.64
69.	2358	C	LEU	157	A	<-->	3300	N	LEU	9	B	3.90
70.	2359	O	LEU	157	A	<-->	3300	N	LEU	9	B	2.75
71.	2359	O	LEU	157	A	<-->	3301	CA	LEU	9	B	3.20
72.	2378	O	ASP	158	A	<-->	3301	CA	LEU	9	B	3.58
73.	2378	O	ASP	158	A	<-->	3306	C	LEU	9	B	3.69
74.	2378	O	ASP	158	A	<-->	3304	CD1	LEU	9	B	3.51
75.	2378	O	ASP	158	A	<-->	3321	N	VAL	10	B	2.98
76.	2378	O	ASP	158	A	<-->	3322	CA	VAL	10	B	3.86
77.	2378	O	ASP	158	A	<-->	3323	CB	VAL	10	B	3.54
78.	2378	O	ASP	158	A	<-->	3325	CG2	VAL	10	B	3.51
79.	2373	CB	ASP	158	A	<-->	4021	CD1	ILE	56	B	3.88
80.	2374	CG	ASP	158	A	<-->	3983	NZ	LYS	54	B	3.21
81.	2375	OD1	ASP	158	A	<-->	3982	CE	LYS	54	B	3.88
82.	2375	OD1	ASP	158	A	<-->	3983	NZ	LYS	54	B	3.00
83.	2376	OD2	ASP	158	A	<-->	3982	CE	LYS	54	B	3.74
84.	2376	OD2	ASP	158	A	<-->	3983	NZ	LYS	54	B	2.73
85.	2387	ND1	HIS	159	A	<-->	4020	CG2	ILE	56	B	3.30
86.	2710	CD1	TRP	181	A	<-->	4041	O	VAL	57	B	3.68
87.	2712	NE1	TRP	181	A	<-->	4041	O	VAL	57	B	3.13
88.	2713	CE2	TRP	181	A	<-->	4041	O	VAL	57	B	3.87
89.	2713	CE2	TRP	181	A	<-->	4061	N	GLY	59	B	3.85
90.	2714	CE3	TRP	181	A	<-->	4796	CB	PRO	105	B	3.56
91.	2715	CZ2	TRP	181	A	<-->	4061	N	GLY	59	B	3.84
92.	2715	CZ2	TRP	181	A	<-->	4062	CA	GLY	59	B	3.89
93.	2716	CZ3	TRP	181	A	<-->	4796	CB	PRO	105	B	3.65
94.	2717	CH2	TRP	181	A	<-->	4062	CA	GLY	59	B	3.87
95.	2758	O	ASN	184	A	<-->	4813	CD2	TRP	106	B	3.53
96.	2758	O	ASN	184	A	<-->	4815	CE2	TRP	106	B	3.90
97.	2758	O	ASN	184	A	<-->	4816	CE3	TRP	106	B	3.16
98.	2758	O	ASN	184	A	<-->	4818	CZ3	TRP	106	B	3.32
99.	2758	O	ASN	184	A	<-->	4819	CH2	TRP	106	B	3.70
100.	2769	CD1	TRP	185	A	<-->	4796	CB	PRO	105	B	3.77
101.	2789	N	GLY	186	A	<-->	4816	CE3	TRP	106	B	3.56
102.	2789	N	GLY	186	A	<-->	4818	CZ3	TRP	106	B	3.54
103.	2792	O	GLY	186	A	<-->	4818	CZ3	TRP	106	B	3.22
104.	2792	O	GLY	186	A	<-->	4819	CH2	TRP	106	B	3.78

Tabla A3. Número de contactos formados en la interfaz de los complejo **actinidina–CCE** y **quimopapaína–CCE** con un radio de corte de 4.0 Å.

Contacto	ACT–CCE	QMP–CCE
C-C	17	17
C-N	6	6
C-O	6	17
S-C	1	0
N-C	8	8
N-O	3	7
N-N	1	2
O-C	15	32
O-N	9	10
O-O	4	4
S-O	0	1
TOTAL	70	104



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00120

Matrícula: 2222800028

Caracterización
Termodinámica de la
Asociación del Inhibidor
Cistatina C Humana con la
Proteasa actinidina.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 16:00 horas del día 5 del mes de diciembre del año 2024 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. ANDRES HERNANDEZ ARANA
DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA
DRA. LILIANA IRAIS VERA ROBLES

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS (QUÍMICA)

DE: FRANCISCO ORTIZ GOMEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



Francisco Ortiz Gomez

FRANCISCO ORTIZ GOMEZ
ALUMNO

REVISÓ

Rosalía Serrano de la Paz

MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI

Román Linares Romero
DR. ROMAN LINARES ROMERO

PRESIDENTE

Andrés Hernández Arana
DR. ANDRES HERNANDEZ ARANA

VOCAL

Abraham Landa Piedra
DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA

SECRETARIA

Liliana Iraís Vera Robles
DRA. LILIANA IRAIS VERA ROBLES