



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

“EXPRESIÓN, CARACTERIZACIÓN
BIOQUÍMICA Y DETERMINACIÓN DE
ACTIVIDAD FIBRINOLÍTICA DE LA
PROTEÍNA RECOMBINANTE FhT
(rFhT)”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

YERSON JAHEL BUIZA URDANIVIA

LIMA – PERÚ

2024

ASESOR

Dr. José Ronald Espinoza Babilón

CO-ASESORA

MSc. Jenniffer Angélica Ezpinoza Ramirez

JURADO DE TESIS

PRESIDENTE

MG. ANA CECILIA COLAROSI SALINAS

VOCAL

DR. HOLGER MAITA MALPARTIDA

SECRETARIO (A)

DR. WILFREDO EVANGELISTA FALCÓN

DEDICATORIA.

A mis padres Gregorio y Gloria, por su apoyo y cariño.

A mis hermanos, por los momentos de distracción y apoyo.

A Pichia

AGRADECIMIENTOS.

A mis asesores Dr. José R. Espinoza Babilón y MSc Jenniffer Espinoza Ramirez,
por la enseñanza brindada y los consejos.

A la Dra. Patricia Herrera, por el apoyo, la paciencia y la confianza brindada.

A todos los miembros del laboratorio Unidad de Biotecnología Molecular: Pilar
García, Luis Laura, Henry Becerra.

A Mabel Pereda, por la ayuda inmensa y por encontrar el Kit de *Pichia*.

FUENTE DE FINANCIAMIENTO.

El proyecto “Nuevo agente biológico recombinante con actividad fibrinolítica para
su uso en la disolución de trombos”, Contrato No 142-2017-FONDECYT,
financió mis prácticas pre-profesionales y los recursos para el
desarrollo del presente trabajo.

EXPRESIÓN, CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD FIBRINOLÍTICA DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE FhT (rFhT)

INFORME DE ORIGINALIDAD

| | | | |
|---------------------|---------------------|---------------|-------------------------|
| 9% | 8% | 1% | 2% |
| INDICE DE SIMILITUD | FUENTES DE INTERNET | PUBLICACIONES | TRABAJOS DEL ESTUDIANTE |

FUENTES PRIMARIAS

| | | |
|---|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1 | repositorio.upch.edu.pe Fuente de Internet | 2% |
| 2 | Submitted to Universidad Peruana Cayetano Heredia Trabajo del estudiante | 2% |
| 3 | hdl.handle.net Fuente de Internet | 1% |
| 4 | www.researchgate.net Fuente de Internet | 1% |
| 5 | www.colibri.udelar.edu.uy Fuente de Internet | <1% |
| 6 | kipdf.com Fuente de Internet | <1% |
| 7 | repositorio.cinvestav.mx Fuente de Internet | <1% |
| 8 | rupress.org Fuente de Internet | <1% |

ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

INDICE

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABLAS

| | | |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| I | INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 | Planteamiento del problema | 3 |
| 1.2 | Marco teórico..... | 4 |
| 1.2.1 | Sistema de coagulación | 4 |
| 1.2.2 | Sistema de fibrinólisis | 5 |
| 1.2.4 | Prevalencia de enfermedades cardiovasculares | 10 |
| 1.3 | Justificación del estudio | 11 |
| II | OBJETIVOS..... | 14 |
| 2.1 | Objetivo general | 14 |
| 2.2 | Objetivos específicos | 14 |
| III | METODOLOGÍA..... | 15 |
| 3.1 | EXPRESIÓN DE rPro-FhT EN <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 17 |
| 3.2 | EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA rPro-FhT EN <i>Pichia pastoris</i> | 18 |
| 3.2.1 | Secuencia de la proteína FhT | 18 |
| 3.2.2 | Clonación de Pro-FhT en pYES2/NT/B..... | 19 |
| 3.2.3 | Sub Clonación del conspstructo Pro-FhT en pPICZ α C | 20 |
| 3.2.4 | Transformación de pPICZ α C-ProFhT en <i>P. pastori</i> X-33 | 20 |
| 3.2.5 | Expresión de la proteína rPro-FhT | 25 |
| 3.2.6 | Purificación de la proteína rPro-FhT | 25 |
| 3.2.7 | Cuantificación de rPro-FhT | 26 |
| 3.3 | CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA | 26 |
| 3.3.1 | Tiempo de activación y actividad enzimática de rFhT | 26 |
| 3.3.2 | Parámetros cinéticos (Km y Vmax) de rFhT y nativa..... | 27 |
| 3.3.3 | Determinación del pH óptimo de rFhT y nativa..... | 28 |
| 3.3.4 | Efecto de los inhibidores naturales sobre la actividad de rFhT y FhT | 28 |
| 3.4 | ACTIVIDAD FIBRINOLÍTICA..... | 29 |
| 3.4.1 | Evaluación fibrinolítica en coágulos | 29 |
| 3.4.2 | Evaluación fibrinolítica en coágulos de fibrina..... | 29 |
| 3.5 | APROXIMACIÓN COMPUTACIONAL DE LA ESTRUCTURA Y LA INTERACCIÓN CON SUS SUSTRATO DE LA PROTEÍNA rFhT | 30 |

| | | |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.5.1 | Predicción de la estructura tridimensional de la proteína Pro-FhT y FhT mediante modelamiento por homología..... | 30 |
| 3.5.2 | Dinámica molecular..... | 31 |
| 3.5.3 | Interacción de FhT con fibrinógeno y fibrina mediante “Docking” molecular..... | 32 |
| IV | RESULTADOS | 33 |
| 4.1 | EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA rPro-FhT..... | 33 |
| 4.1.1 | Expresión de la proteína rPro-FhT en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 33 |
| 4.1.2 | Expresión de la proteína rPro-FhT en <i>Pichia pastoria</i> | 34 |
| 4.2 | CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE rPro-FhT | 40 |
| 4.3 | ACTIVIDAD FIBRINOLÍTICA | 44 |
| 4.3.1 | fibrinólisis de coágulos de sangre total..... | 44 |
| 4.3.2 | Fibrinólisis de coágulos de fibrina | 45 |
| 4.4 | APROXIMACIÓN COMPUTACIONAL DE LA ESTRUCTURA Y LA INTERACCIÓN CON SUS SUSTRATO DE LA PROTEÍNA rFhT | 48 |
| 4.4.1 | Modelamiento estructural de la proteína Pro-FhT..... | 48 |
| 4.4.2 | Dinámica molecular de Pro-FhT y FhT..... | 52 |
| 4.4.3 | “Docking” molecular | 55 |
| V | DISCUSIÓN..... | 59 |
| VI | CONCLUSIONES..... | 67 |
| VII | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 68 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Estructura de fibrinógeno..... | 6 |
| Figura 2. Diagrama esquemático de coagulación de fibrina | 7 |
| Figura 3. Mecanismo catalítico de hidrólisis del enlace peptídico catalizado por cisteína proteasa..... | 9 |
| Figura 4. Estructura del subsitio de cisteína proteasa | 9 |
| Figura 5. Flujograma de investigación | 16 |
| Figura 6. Constructo de Pro-FhT con sitios de restricción <i>HindIII</i> y <i>XhoI</i> que permiten la clonación en el vector de expresión..... | 18 |
| Figura 7. ProFhT en pUC57 | 24 |
| Figura 8. Vector de expresión pYES2/NT/B..... | 24 |
| Figura 9. Vector de expresión pPICZ α C de 3.6 Kb. | 24 |
| Figura 10. Pools de las fracciones de purificación de rPro-FhT. Carril M, marcador de peso molecular..... | 33 |
| Figura 11 . Activación de rFhT a pH 5 en diferentes tiempos de incubación (30, 120, 180 y 960 minutos)..... | 34 |
| Figura 12. Gel de agarosa de los productos de amplificación de PCR de colonias conteniendo Pro-FhT obtenida con los primers que flanquean pUC57..... | 35 |
| Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR de colonias de DH5 α teñidas con bromuro de etidio. Carril 1, 2, 3, 4 y 5 son colonias transformadas con el producto de ligación pYES2/NT/B-ProFhT..... | 36 |
| Figura 14 . Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de colonias de <i>Pichia pastoris</i> X-33. | 37 |
| Figura 15. SDS-PAGE 12% de la expresión de rPro-FhT en muestras de A) pellet celular B) sobrenadante del cultivo. | 38 |
| Figura 16. Crecimiento de X-33 recombinante a 30 °C con movimiento de 200 rpm. 38 | |
| Figura 17. SDS-PAGE al 12 % del concentrado de las purificaciones de rPro- FhT. . 39 | |
| Figura 18. A) Actividad específica de rPro-FhT (azul) y FhT (rojo) activadas en diferentes tiempos. B) Activación de rPro-FhT. 0, 2, 4, 6, 8, 12 y 16 son los tiempos de incubación en buffer de activación..... | 41 |
| Figura 19. Cinética enzimática. A) Michaelis-Menten para rFhT y FhT B) Lineweaver-Burk para rFhT y FhT..... | 42 |
| Figura 20 . Actividad de proteínasa a diferentes pHs. rFhT (azul) presentó mayor actividad a pH 5, mientras que FhT (negro) a 5.5. | 43 |
| Figura 21. Porcentaje de inhibición de la actividad rFhT (azul) y FhT (negro) sobre el sustrato Z-phe-Arg-pNA..... | 44 |
| Figura 22. Peso conservado de coágulos de sangre total incubados durante 24 y 48 horas a 37°C con rFhT y FhT..... | 45 |
| Figura 23. Degradación de coágulos de fibrina con rFhT y FhT a los 0, 8, 16, 24 y 48 horas. La estructura blanca dentro de los tubos es el coágulo de fibrina | 46 |
| Figura 24. Fibrinólisis de coágulos de fibrina con rFhT y FhT. | 47 |
| Figura 25. Estimado de calidad local de la secuencia de Pro-FhT alineadas con A) 3K24 y B) 2O6X. Cys115, His252 y Asn272 son los aminoácidos del sitio activo. | 49 |
| Figura 26. Estructura tridimensional en representación NewCartoon de A) dominio maduro FhT generado con el molde 2K24 y B) Pro-FhT generado con el molde 2O6X. Color morado representa la estructura del pro-dominio..... | 50 |
| Figura 27. Alineamiento estructural de FhT generado con los moldes 3K24 (naranja) y 2O6X (Verde)..... | 51 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 28. Minimización de energía de FhT (naranja) y Pro-FhT (negro) en un sistema de caja de agua con carga neta cero..... | 52 |
| Figura 29. Equilibrio del sistema en A) temperatura constante de 310.15 K y B) presión constante 4.5×10^{-5} bar-1 de Pro-FhT (negro) y FhT (rojo). | 53 |
| Figura 30. Dinámica molecular. Trayectoria de FhT (rojo) y Pro-FhT (Negro) durante 20 ns en una caja de agua neutra a 310 K..... | 54 |
| Figura 31. Interacción molecular de FhT (Surface - verde) y fibrina (newcartoon - morado) resuelta mediante el programa cluspro..... | 55 |
| Figura 32. Interacción de FhT (Surface verde) con los péptidos de la fibrina. | 57 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1. Lista de plásmidos usados | 22 |
| Tabla 2. Secuencia probable de los péptidos alfa, beta y gama a ser reconocidos por FhT. | 56 |
| Tabla 3. Secuencia probable del péptido alfa a ser reconocido por FhT. | 57 |
| Tabla 4. Secuencia probable del péptido beta a ser reconocido por FhT | 58 |
| Tabla 5. Secuencia probable del péptido gama a ser reconocido por FhT. | 58 |

RESUMEN

La proteína FhT es una cisteína proteasa con actividad fibrinolítica *in vitro*. La purificación de esta enzima de su organismo de origen resulta en cantidades limitadas y una baja pureza, además de ser un proceso costoso y laborioso. En esta investigación, empleamos tecnología de ADN recombinante para superar estas limitaciones. El objetivo fue producir la proteína FhT en su forma recombinante y evaluar su actividad fibrinolítica *in vitro*.

Se clonó el gen de la forma zimógena de FhT (rProFhT) en el vector pPICZ α C y se recombinó con el genoma de *Pichia pastoris* X-33. Se expresó rProFhT de 37 kDa y se purificó con un rendimiento de 20 mg/L. La activación de rProFhT a su forma enzimáticamente activa (rFhT) de 25 kDa se logró mediante la incubación con 10 mM de DTT y 1 mM de EDTA a pH 5 durante 8 horas. La enzima alcanzó su actividad óptima a un pH de 5 y mantenía actividad a pH 7 con el sustrato Z-Phe-Arg-pNA. Los parámetros cinéticos de la rFhT con este sustrato fueron V_{max} 1.79×10^{-3} $\mu\text{moles}/\text{min}$ y K_m 76.67 μM , valores similares a los de la enzima nativa FhT (V_{max} 1.15×10^{-3} $\mu\text{moles}/\text{min}$ y K_m 94.14 μM). Además, la enzima rFhT demostró actividad en la degradación de coágulos *in vitro*, comparables a los resultados obtenidos con la FhT nativa.

En conclusión, se expresó y caracterizó bioquímicamente un nuevo agente trombolítico recombinante, rFhT, que muestra potencial para su desarrollo y evaluación como agente para el tratamiento de la trombosis.

Palabras clave

Trombosis, trombolíticos, *Pichia pastoris*, activación del zimógeno.

ABSTRACT

The protein FhT is a cysteine protease with *in vitro* fibrinolytic activity. The purification of this enzyme from its original organism results in limited quantities and low purity, in addition to being a costly and laborious process. In this research, we employed recombinant DNA technology to overcome these limitations. The objective was to produce the FhT protein in its recombinant form and evaluate its fibrinolytic activity *in vitro*.

The gene for the zymogen form of FhT (rProFhT) was cloned into the pPICZαC vector and recombined with the genome of *Pichia pastoris* X-33. rProFhT, a 37 kDa protein, was expressed and purified with a yield of 20 mg/L. The activation of rProFhT to its enzymatically active form (rFhT) of 25 kDa was achieved by incubation with 10 mM DTT and 1 mM EDTA at pH 5 for 8 hours. The enzyme reached its optimal activity at pH 5 and retained activity at pH 7 with the substrate Z-Phe-Arg-pNA. The kinetic parameters of rFhT with this substrate were V_{max} 1.79×10^{-3} μmoles/min and K_m 76.67 μM, values similar to those of the native FhT enzyme (V_{max} 1.15×10^{-3} μmoles/min and K_m 94.14 μM). Additionally, rFhT demonstrated activity in degrading clots *in vitro*, comparable to the results obtained with the native FhT.

In conclusion, a new recombinant thrombolytic agent, rFhT, was expressed and biochemically characterized, showing potential for development and evaluation as a treatment for thrombosis.

Keywords

Thrombosis, thrombolytic, *Pichia pastoris*, zymogen activation.

I INTRODUCCIÓN

La hemostasia es un conjunto de mecanismos fisiológicos que permiten que la sangre mantenga su flujo en el interior de los vasos sanguíneos. Cuando ocurre una lesión del vaso sanguíneo, inmediatamente se da formación del tapón plaquetario con el fin de detener la pérdida excesiva de sangre. El tapón plaquetario se estabiliza por la fibrina que se polimeriza formando redes tridimensionales que engloban el coágulo permitiendo que el vaso sanguíneo pueda ser reparado. Finalmente, el coágulo de fibrina debe disolverse para restablecer el flujo sanguíneo, a este proceso se le denomina fibrinólisis [1].

En condiciones normales hay un balance fisiológico entre la coagulación y la fibrinólisis, la alteración de este balance puede provocar hemorragias, así como trombosis, que es la formación no deseada de coágulos de fibrina que bloquean el flujo sanguíneo hacia los tejidos. La trombosis es la causa más frecuente de las enfermedades cardiovasculares tales como el infarto del miocardio, el ataque isquémico transitorio, el accidente cerebrovascular isquémico, el tromboembolismo venoso incluyendo la trombosis venosa profunda, el embolismo pulmonar, entre otros [2-4].

El sistema fibrinolítico (o trombolítico) empieza con la activación de la plasmina a partir de su precursor inactivo, el plasminógeno, por parte de los activadores de plasminógeno. La plasmina es una serina proteinasa que degrada el coágulo de fibrina a productos solubles que incluye fragmentos diméricos D-D y sus complejos no covalentes como el fragmento D-E-D [5]. La disolución del coágulo por acción de la plasmina resulta en el restablecimiento del flujo sanguíneo.

El riesgo de formación de coágulos está asociado a la presencia de comorbilidades como el cáncer, la obesidad, la hipertensión y factores como la edad, el embarazo, la cirugía, la inmovilidad y el trauma. La discapacidad de fibrinólisis está relacionada a alteraciones genéticas de los componentes del sistema de fibrinólisis como la deficiencia de plasminógeno, el aumento de los niveles del inhibidor del activador de plasminógeno I (PAI-1), la mayor expresión de inhibidor de plasmina (α 2-AP) o la baja secreción del activador tisular de plasminógeno (t-PA) o activador de plasminógeno tipo uroquinasa (u-PA) [6].

Existen dos vías de tratamiento para disolución de trombosis: la primera vía consiste en el suministro de agentes trombolíticos que activan la plasmina [7]. Estos agentes trombolíticos son clasificados en: Primera generación (estreptoquinasa, uroquinasa, activador tipo uroquinasa); segunda generación (prouroquinasa, complejo activador estreptoquinasa plasminógeno y activador de plasminógeno tisular) y tercera generación (Conjugados de activadores de plasminógeno con anticuerpos en contra de fibrina y plaquetas, reteplasa, tenecteplasa, demetoplasa, estafiloquinasa, etc.) [8-10]. Estos agentes trombolíticos también activan la plasmina circulante que puede degradar otras proteínas como los componentes de la matriz extracelular causando hemorragias [8].

La segunda vía de tratamiento es el suministro de agentes trombolíticos que tengan la capacidad de disolver trombos mediante la acción directa en la degradación de fibrina sin la necesidad de activar a la plasmina. La interacción y degradación directa de la fibrina disminuye el riesgo de causar hemorragias. Hasta el momento no hay un agente con acción directa como que se utilicen en el tratamiento de la

trombosis, pero existen diferentes enzimas en estudio que pueden degradar la fibrina del coágulo de forma directa. Se ha reportado que la enzima FhT puede degradar las redes de fibrina de forma directa y desestabilizar el coágulo [11].

FhT es una cisteína proteinasa perteneciente a la sub-familia de catepsinas. Esta enzima es expresada de forma zimógena (no activa) por un agente biológico y es secretado de forma activa durante la invasión a su hospedero definitivo. La expresión de forma zimógena es parte de la estructura de la cisteína proteinasa y se caracteriza por presentar un pro péptido en el extremo N- terminal que interactúa con el sitio activo inhibiendo su actividad enzimática [12].

1.1 Planteamiento del problema

Para el tratamiento de la trombosis se utilizan enzimas que convierten el plasminógeno en plasmina, que además de degradar las redes de fibrina de los coágulos actúa sobre otras proteínas como el fibrinógeno y proteínas de la matriz extracelular ocasionando hemorragias. Por este motivo se buscan enzimas que degraden directamente la fibrina. En la Unidad de Biotecnología molecular (UBM) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, se encontró que la proteína nativa FhT degrada la fibrina de los coágulos [11].

El proceso de producción de FhT demanda aproximadamente una semana para obtener 1.7 mg de proteína por lote de purificación, además la proteína purificada no tiene una alta pureza [11,51]. La producción de FhT de forma recombinante permitiría reducir los costos y el tiempo de producción, así como obtener la enzima con una mayor pureza, esto es importante para estudiar la actividad enzimática de

manera precisa; además la enzima se puede producir en grandes cantidades que permitan el estudio completo de su caracterización enzimática, así como el estudio de su actividad fibrinolítica. Por este motivo, el objetivo de este estudio es generar la proteína recombinante FhT utilizando un sistema de expresión eucariota para obtener una enzima funcional que se produzca en grandes cantidades.

1.2 Marco teórico

1.2.1 Sistema de coagulación

Los coágulos se forman en los sitios de lesión de vasos sanguíneos para detener la pérdida sanguínea. El proceso empieza con la formación del tapón plaquetario y la liberación de factores de coagulación por las células endoteliales del sitio de la lesión, estos factores actúan en una serie de reacciones enzimáticas que resultan en la activación de la trombina a partir de su precursor protrombina. La trombina es una serina proteinasa que cataliza la formación de las redes de fibrina a partir del fibrinógeno esta es una glicoproteína de 340 kDa que está involucrada en procesos fisiológicos como inflamación, angiogénesis y cicatrización de heridas [1, 17-19]. El fibrinógeno es producido en las células hepáticas y se encuentra mayormente en el plasma sanguíneo a una concentración alrededor de 1.5 - 4 g/L [17-19]. Fibrinógeno está formado por dos subunidades idénticas, cada una con tres cadenas polipeptídicas ($A\alpha$, $B\beta$, γ) (figura 1). Las subunidades y las seis cadenas están unidas por puentes disulfuros formando 18 dominios distintos agrupados en cuatro regiones estructurales, el central E, dos idénticos terminales D y dominios αC (Figura 1a y b) [20].

El fibrinógeno es soluble en la sangre, pero se vuelve insoluble cuando se convierte en fibrina por la actividad proteolítica de la trombina. El proceso de conversión de fibrinógeno a fibrina es iniciado por la eliminación de fibrinopéptidos A (FpA) y B (FpB) desde las cadenas $A\alpha$ y $B\beta$ de la región E (Figura 2a). La eliminación de FpA y FpB expone los dos pares de sitios de polimerización (knobs A y B) los cuales se asocian con sitios complementarios (holes a y b) de la región D de los otros monómeros de fibrina, formando así un trímero (figura 2b) [19,20]. La interacción knobs-holes entre región E y D genera dos cadenas de protofibrillas que se asocian con otros lateralmente para producir fibrillas más gruesas que se ramifican para formar el coágulo de fibrina. Finalmente, el coágulo de fibrina es estabilizado por el entrecruzamiento de regiones αC vecinas catalizado por el factor de la coagulación XIIIa (Figura 2a) [19-21].

1.2.2 Sistema de fibrinólisis

La fibrinólisis se da por la acción la plasmina la cual es activada a partir plasminógeno; la activación es realizada por los activadores tipo tisular (t-PA) y tipo uroquinasa (u-PA). El plasminógeno es una glicoproteína sintetizada por el hígado y se encuentra de manera circulante y unida al coágulo, ambas formas son los sustratos de los activadores de plasminógeno [6]. La plasmina unida al coágulo presenta un mayor porcentaje de fibrinólisis, pero la plasmina circulante presenta actividad proteolítica inespecífica, es decir, puede actuar sobre otras proteínas, como las proteínas de la matriz extracelular, laminina y fibronectina; también puede cortar el fibrinógeno, esta inespecificidad puede provocar hemorragias pacientes tratados con los activadores de plasminógeno [6].

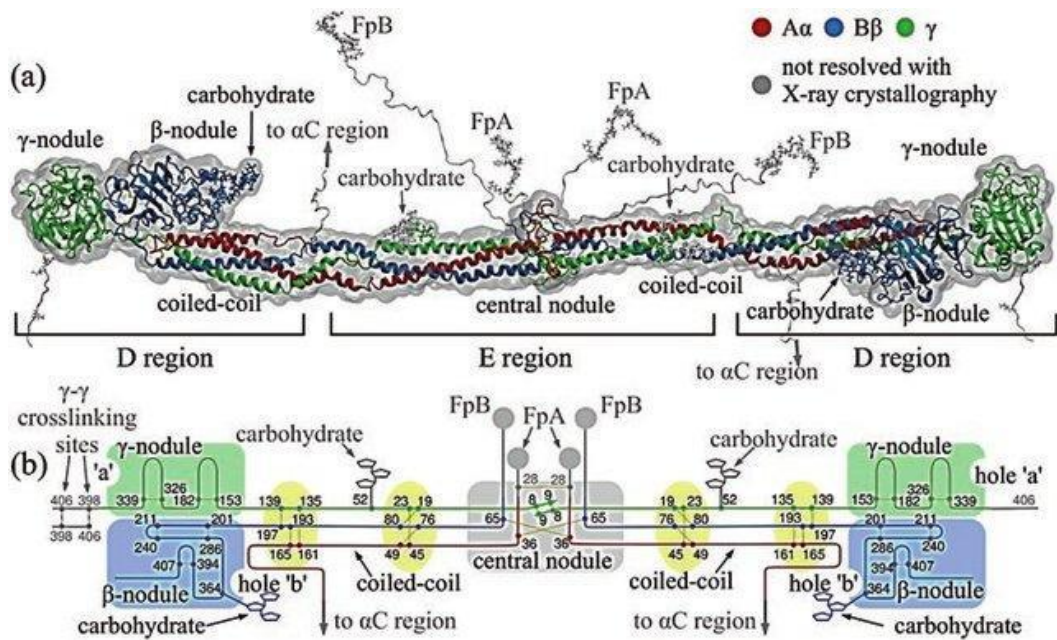


Figura 1. Estructura de fibrinógeno **a)** nivel atómico, resuelto por cristalografía de rayos X a 2.9 Å. El fibrinógeno con 4 regiones: E, α C y dos regiones homólogas D. En esta estructura se referencia a las cadenas polipeptídicas $A\alpha$ y $B\beta$ con sus fibrinopéptidos A y B (FpA y FpB) en la región E y al comienzo de la región α C. **b)** Diagrama de las cadenas polipeptídicas de fibrinógeno. Cadenas polipeptídicas $A\alpha$, $B\beta$ y γ están representadas por líneas proporcionales al número de residuos de aminoácidos en cada cadena. Figura tomada de John Weisel, 2017 [19].

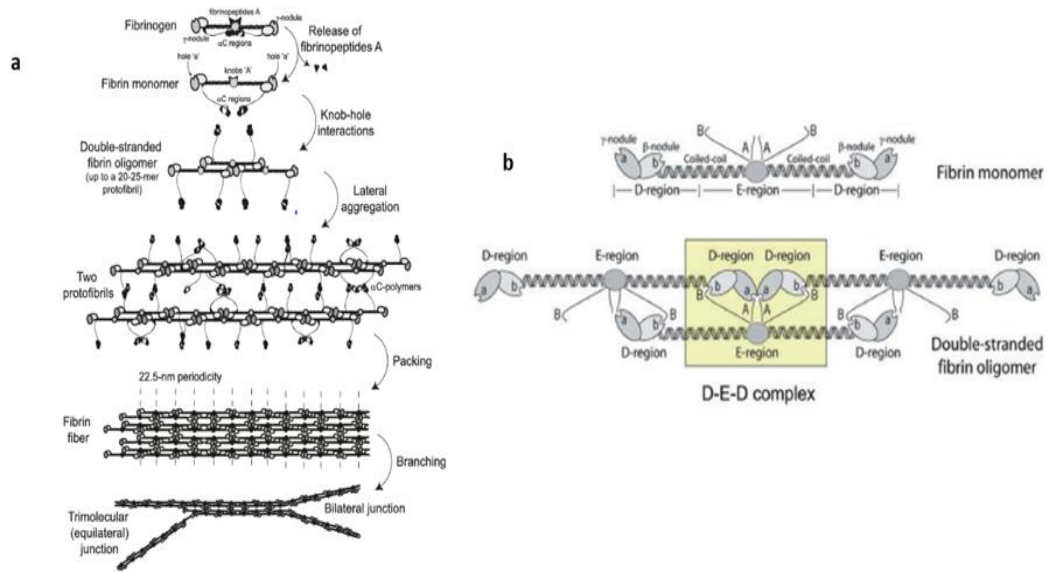


Figura 2. Diagrama esquemático de coagulación de fibrina **a)** Cuando los fibrinopéptidos son eliminados, ocurre la interacción knob-hole que forma un oligómero que se extiende para producir dos cadenas de protofibrilla. Las protofibrillas se agregan lateralmente por un proceso potenciado por la interacción de regiones αC . **b)** Diagrama esquemático de interacción knob-hole. knob A y B en el dominio central son complementarios a holes a y b que siempre están expuestos a los extremos de la proteína [19].

1.2.3 Proteína FhT

La proteína FhT es una catepsina perteneciente a la familia de cisteína proteasas. Las cisteínas proteasas generalmente son expresadas en forma de zimógeno; presentan un pro-dominio que está unido al sitio activo de la enzima inhibiendo la actividad catalítica, por ello la forma inactiva o zimógena de FhT es representada como Pro-FhT. La activación de la enzima está mediada por la escisión del pro-dominio por la actividad autocatalítica a valores de pH bajos [12]. En el mecanismo de acción de proteólisis enzimática participan tres aminoácidos; la histidina, actúa como donador de protón y potencia la nucleofilicidad de la cisteína; la cisteína nucleofílica, ataca el carbono del enlace peptídico del sustrato produciendo el primer intermediario tioéster de la reacción y liberando un fragmento amino terminal del sustrato; por último, la asparagina ayuda a orientar al residuo de Cys y a convertirla en un mejor aceptor de electrones a través de los efectos electrostáticos (Figura 3) [22, 23].

Por otro lado, las estructuras terciarias de las catepsinas presentan sub-sitios del sitio activo (catalytic pocket). Estos promueven un mejor arreglo del sitio activo para acomodar y catalizar la ruptura de enlaces péptidos con diferentes secuencias (figura 4a y b). La variación de residuos de aminoácidos en los sub-sitios conlleva a que las distintas variantes de catepsinas tengan un sustrato específico [24,25].

La proteína FhT es una cisteína proteasa que consta de 981 nucleótidos que codifican una proenzima o zimógeno de 37.1 kDa y la forma madura o activa es de 25 kDa [24,25]. FhT presenta actividad fibrinolítica *in vitro* que se evidenció mediante microscopía electrónica.

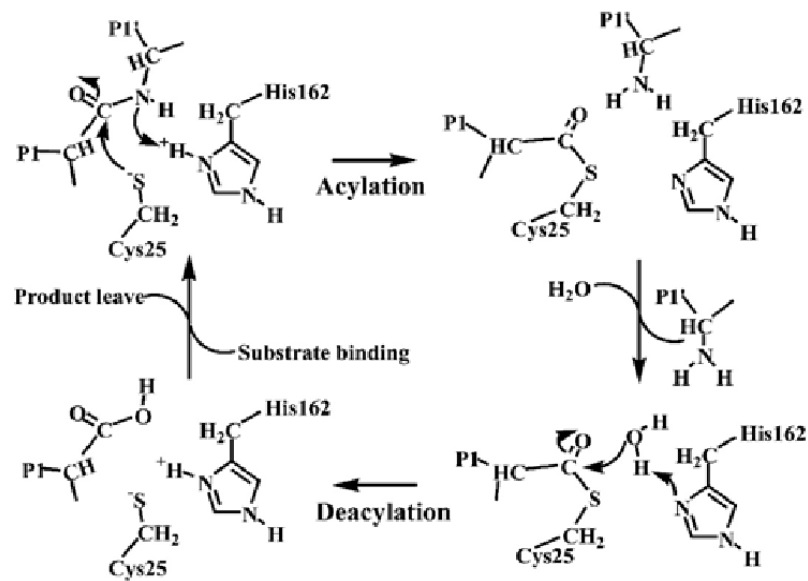


Figura 3. Mecanismo catalítico de hidrólisis del enlace peptídico catalizado por cisteína proteasa [23]

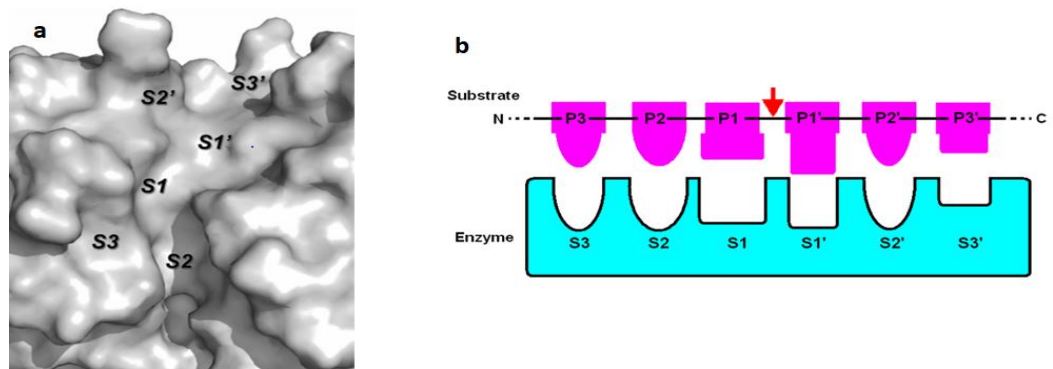


Figura 4. Estructura del sub-sitio de cisteína proteasa **a)** Localización del sub-sitio en el sitio activo de la catepsina [24-26]. **b)** Nomenclatura de la interacción del sustrato con el sitio activo de la enzima haciendo referencia los diferentes sub-sitios (S3, S2, S1, S1', S2' y S3') y el clivaje del sustrato.

1.2.4 Prevalencia de enfermedades cardiovasculares

La enfermedad cardiovascular (ECV) constituye uno de los problemas de salud pública más importante por las altas tasas de morbilidad y mortalidad a nivel global. Una de las causas frecuentes de las ECV es la trombosis, cuya prevalencia ha venido aumentando en los últimos años. Dependiendo de dónde se forme el coágulo, la trombosis puede ocasionar infarto de miocardio, accidente cerebrovascular o tromboembolismo venoso, condiciones que resultan en altas tasas de mortalidad [13]. El riesgo a desarrollar trombosis está relacionada a factores genéticos (deficiencia de anticoagulantes, factor VII, etc.), adquiridos (edad, cáncer, obesidad, etc.) y desencadenantes (embarazo, cirugía, inmovilidad, trauma, etc.) [13,14].

La prevalencia de la trombosis se ha incrementado durante estos últimos años causando elevadas tasas de morbilidad y mortalidad en el mundo; considerando tromboembolismo venoso como fatal y estimando entre 10 a 30% de personas que fallecen dentro de los 30 días de ocurrido [13,15]. Se estima que el tromboembolismo venoso tiene una incidencia en el rango de 1 y 2 casos por cada 1,000 personas o 300,000 a 600,000 casos anuales en Estados Unidos; la tasa de incidencia del tromboembolismo venoso varía por la edad, la raza y el género [13, 15,16]. La incidencia estimada es de 1 por cada 100,000 en los jóvenes e incrementa a 1 por cada 100 en personas mayores a 80 años.

1.3 Justificación del estudio

Trombosis es una enfermedad causada por la presencia de trombos en los vasos sanguíneos (coágulos). El efecto de los trombos sobre la salud del paciente depende del lugar de generación; la trombosis venosa profunda (TVP), embolia pulmonar (EP), y tromboembolismo venoso (TVP+EP=TEV) son los tipos de trombosis que causan un efecto mayor sobre la salud de las personas según la Organización Mundial de Salud (OMS) [27]. Por ejemplo, a nivel mundial, anualmente se diagnostica 400 - 530 casos de TEV por 1000,000 personas, y se estima que causará aproximadamente 23.6 millones de muertes en el año 2030 (OMS). En Estados Unidos se estima 600,000 casos por año con al menos 250,000 personas que fallecen cada año por esta causa [28]. La incidencia de trombosis aumenta por año en tasas similares en mujeres y varones; se estima que la probabilidad de trombosis está correlacionada con la hospitalización por periodo prolongado, pacientes con cáncer (son lo que presentan un riesgo más elevado) y la inmovilización prolongada ya sea por reposo o viaje [29]. Los riesgos moderados son relacionados con la edad de la persona (mayor a 45 años), uso de medicamentos a base de estrógenos, trauma, obesidad, embarazo, etc [29]. Finalmente, en estos últimos años el riesgo a desarrollar trombosis ha aumentado en pacientes con COVID-19 teniendo una tasa de 30.9% de probabilidad respecto al paciente no infectados [30].

La terapia trombolítica juega un rol importante en el manejo de enfermedades cardiovasculares ocasionadas por trombosis. Una terapia efectiva está direccionada a la rápida disolución de coágulo, con el mínimo daño del tejido y el aumento de la tasa de supervivencia [4]. De forma general, existen 4 tratamientos trombolíticos:

La terapia clásica que se basa en la administración de anticoagulantes y drogas antiplaquetarias. Los anticoagulantes usados son la warfarina, heparina, ticlopidina, aspirina las cuales previenen la formación de trombos y desestabilizan su estructura haciendo más permeable y accesible a la degradación por el sistema de fibrinólisis. El paso final de esta dirección es la intervención quirúrgica para eliminar el trombo, en ella se realiza en condiciones de oclusiones vasculares masivas y es donde los tratamientos farmacológicos han fracasado o están contraindicados [10,31]. En consecuencia, surgió el tratamiento trombolítico que se basa en el uso de enzimas para degradar el coágulo de forma directa o indirecta. A partir de ello, los agentes trombolíticos de primera generación como estreptoquinasa y uroquinasa fueron desarrollados; sin embargo, su baja especificidad y su elevado costo de aplicación genera su deficiencia como buen agente terapéutico [10, 27,28 y 31]. Posteriormente se desarrollaron agentes de segunda generación (Prouroquinasa, activador de plasminógeno tisular- t-PA), tercera generación (reteplasa, tenecteplasa, Duteplasa, amideplase, desmoteplase, etc); sin embargo, su baja especificidad, sus efectos inmunológicos y su alto costo de aplicación conllevaron a su deficiencia en su aplicación como terapia [10, 27,28 y 31]. Debido a las deficiencias resaltadas, se busca generar un agente trombolítico capaz de degradar el trombo de forma directa en un tiempo menor, con una especificidad alta y con bajo costo de tratamiento.

La familia de catepsinas humanas, una subfamilia de cisteína proteasas, las catepsinas tipo L, S y K tienen capacidad fibrinolítica *in vitro* [32]. Así mismo, se ha descrito que variantes de catepsinas presentan habilidades fibrinolíticas *in vitro* [33]. A partir de lo mencionado, estudios de caracterización de FhT nativo,

perteneciente a la familia de catepsinas, realizados en la Unidad de Biotecnología Molecular de UPOCH han mostrado que esta es una enzima capaz de degradar coágulos de fibrina *in vitro*. Sin embargo, purificar FhT del agente biológico demanda tiempo y costo, es por ello por lo que el objetivo es la producción de la proteína recombinante FhT (rFhT) y evaluar su capacidad fibrinolítica *in vitro* en comparación a la nativa.

Debido a que FhT es expresada por un organismo eucariota, para la generación de la recombinante es necesario el uso de un sistema de expresión eucariota que pueda simular las modificaciones pos-traduccionales ocurridas en la nativa. La importancia de las modificaciones pos-traduccionales se basan en direccionar el correcto ensamblaje de la proteína, contribuir significativamente a su estabilidad y solubilidad y, además, la modificación en un grupo funcional de ciertos residuos de aminoácidos específicos de la proteína podría ser importante para alterar sus propiedades cinéticas [34]. Adicionalmente, la oxidación de la cisteína es un proceso muy importante para las cisteínas proteasas ya que media la formación de enlaces disulfuros y crea un ambiente favorable para el ensamblaje de la estructura y estabilizar la proteína [34]. Hasta el momento no existe una caracterización de las modificaciones pos-traduccionales ocurridas en FhT; sin embargo, es necesario tener cuidado en la elección del sistema de expresión. A partir de ello, el sistema elegido para la expresión de la recombinante es *Pichia pastoris* X-33; la elección se basa en que el patrón de modificaciones postraduccionales ocurridos en estos sistemas son cercanos al organismo de origen y por se espera que la recombinante generada tenga las mismas propiedades estructurales y funcionales que FhT nativa.

II OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Expresar, caracterizar bioquímicamente y determinar la actividad fibrinolítica de la proteína recombinante FhT (rFhT).

2.2 Objetivos específicos

- Clonar y expresar la proteína Pro-FhT en *Saccharomyces cerevisiae*.
- Clonar y expresar la proteína Pro-FhT en *P. pastoris*.
- Caracterización de la cinética de la activación de Pro-FhT recombinante.
- Evaluar los parámetros cinéticos de la proteína rFhT: Km, Vmax con el sustrato Z- Phe-Arg-p-nitroanilida dihidrocloruro.
- Determinar el pH óptimo de actividad y efecto de inhibidores sobre la proteína recombinante FhT.
- Evaluar de la actividad fibrinolítica de la proteína rFhT en la disolución de coágulos *in vitro*
- Determinar la estructura tridimensional de Pro-FhT mediante modelamiento por homología
- Evaluar la interacción de FhT con la fibrina mediante docking molecular.

III METODOLOGÍA

La parte experimental del estudio incluye la expresión de forma secretada e intracelular. Posteriormente se caracteriza los parámetros cinéticos como V_{max} , y K_m . Finalmente analizar la actividad fibrinolítica en coágulos de sangre total y de fibrina. La aproximación computacional incluye el modelamiento estructural de FhT, corrección de la estructura mediante minimización de energía, luego se evalúa la estabilidad de la proteína mediante dinámica molecular y finalmente se realiza el docking molecular de FhT con la fibrina para evaluar las posibles secuencias cortadas por FhT.

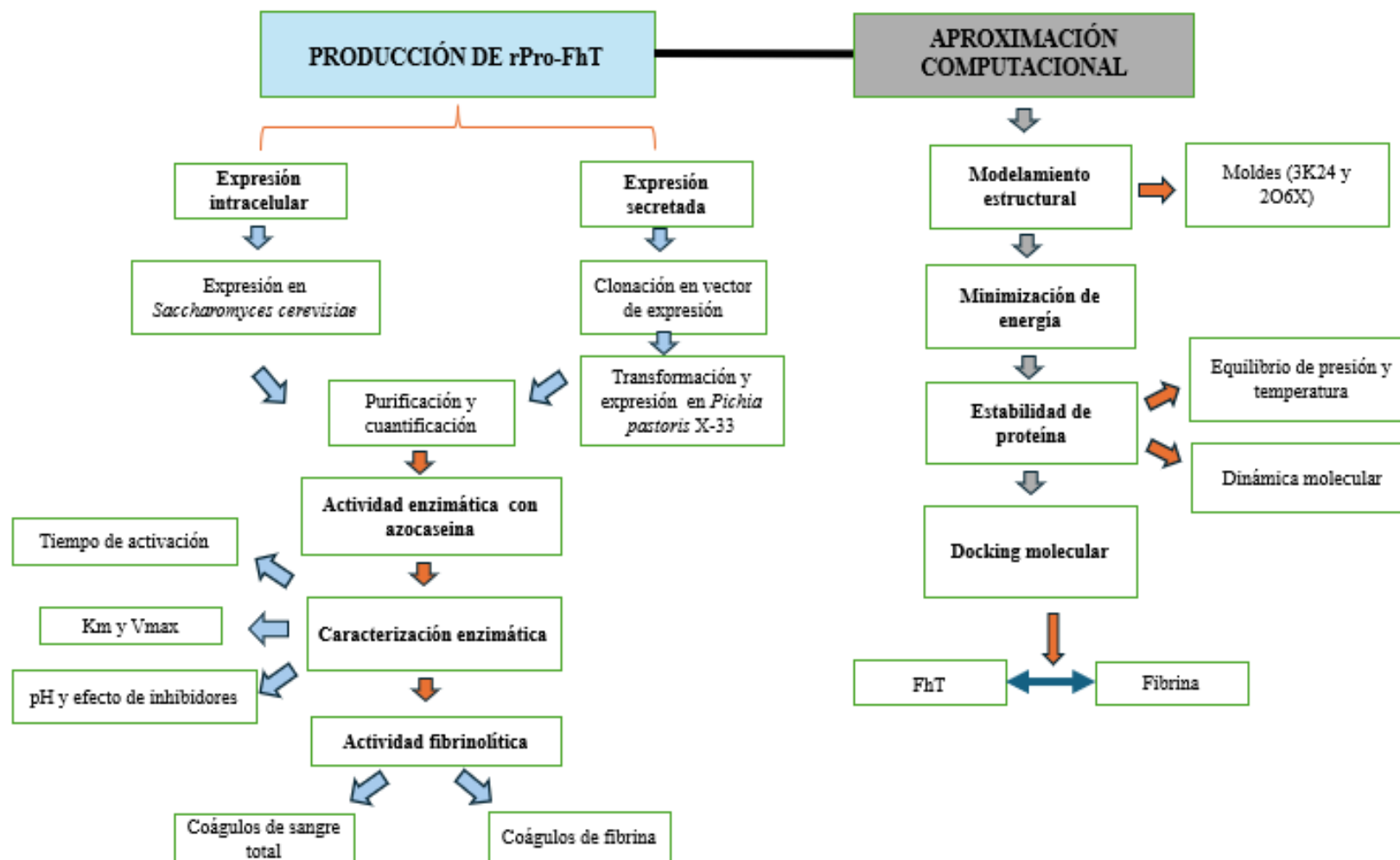


Figura 5. Flujograma de investigación,

3.1 EXPRESIÓN DE rPro-FhT EN *Saccharomyces cerevisiae*

La secuencia de rPro-FhT (AF271385.1) fue clonada en *S. cerevisiae* con la colaboración del Dr Geymonat, del departamento de genética de la Universidad de Cambridge. La expresión de la enzima recombinante fue de manera intracelular.

Para la expresión de la recombinante, se sembró *S. cerevisiae* recombinante en placas YPD y se incubó por 48 horas a 30 °C. Una colonia fue inoculada en 20 mL de YPD e incubada toda la noche (O/N) a 30 °C 200 rpm. El cultivo fue diluido 1:300 utilizando el medio YPS (concentración final de sucrosa 1%) y la misma fue incubada O/N 30 °C a 200 rpm. Luego, se agregó 2 volúmenes de medio YPG (1% de galactosa concentración final) y se incubó entre 6-8 horas a 30 °C. Cumplido el tiempo, se cosechó las células por centrifugación a 3500 rpm por 5 minutos.

Para la purificación de rPro-FhT, las células fueron suspendidas en 7 mL de Breaking Buffer (50 mM Tris pH 7.5, 250 mM NaCl, 10% glicerol, 0.2% NP-40, 20 mM imidazol, 5 mM β -mercapto-OH e inhibidor de proteasa) y 500 μ L fueron alícuotados en tubos de 2 mL. Se agregó perlas de vidrio (diámetro 0.5 mm) hasta que el nivel del buffer sea igual que las perlas. Se realizó la lisis celular utilizando FastPrep con 40 segundos de agitación por tres veces y con 5 minutos de incubación en hielo por cada agitación. El sobrenadante se incubó 2 horas a 4 °C en una matriz de NTA-Ni equilibrado con buffer de equilibrio (50 mM Tris pH 7.5, 250 mM NaCl y 20 mM imidazol). Se realizó el lavado de la columna dos veces con 10 mL de buffer de lavado (50 mM Tris pH 7.5, 250 mM NaCl, 0.2% NP-40, 20 mM imidazol y β -mercapto-OH). La rPro-FhT fue eluida con 5 mL de buffer de elución (30 mM Tris pH 7.5, 200 mM NaCl, 0.1 % NP-40 y 200 mM imidazol) y la pureza fue evaluada mediante SDS-PAGE. Se realizaron pools de las fracciones puras.

3.2 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA rPro-FhT EN *Pichia pastoris*

3.2.1 Secuencia de la proteína FhT

La secuencia de Pro-FhT fue adquirida de la base de datos GenBank (AF271385.1). Se consideró los nucleótidos que codifican el dominio maduro y el pro-dominio, 948 pares de bases. El diseño de la secuencia de Pro-FhT, incluidos los sitios de restricción, indica la figura 5; esta nos permitió clonar la secuencia de Pro-FhT en el vector pPICZ α C y que la expresión sea en la forma de proteína secretada, debido a la secuencia α factor. Previo a la síntesis de la secuencia, se realizó la optimización de codones para *P. pastoris* con el servidor online Codon optimization GenScript. El constructo fue sintetizado con la empresa GenScript.

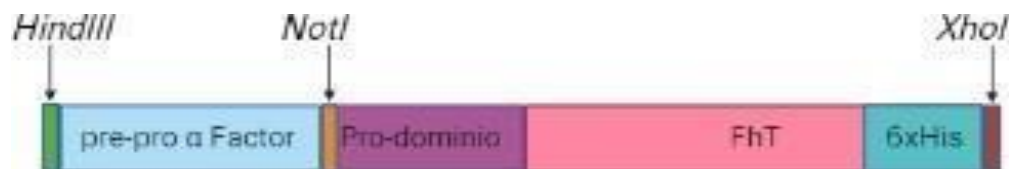


Figura 6. Constructo de Pro-FhT con sitios de restricción *HindIII* y *XhoI* que permiten la clonación en el vector de expresión.

3.2.2 Clonación de Pro-FhT en pYES2/NT/B

GenScript proporcionó el constructo Pro-FhT en pUC57 (pUC57_ProFhT) (Tabla 1, figura 6). Previo a la clonación, se transformó pUC57-proFhT y pYES2/NT/B (Tabla 1, figura 7) en *E. coli* TOP10 y DH5 α , respectivamente. Se corroboró la transformación mediante PCR de colonias utilizando el siguiente par de primers: pUC57_Forward (5' GTAAAACGACGGCCAGTG 3'), pUC57_Reverse (5' GGAAACAGCTATGACCATG 3'). Cada plásmido fue producido en sus respectivos hospederos y purificados usando Wizard plus Miniprep®-Promega. Para realizar la clonación, ambos plásmidos se digirieron con *Hind*III y *Xho*I y los fragmentos fueron visualizados en gel de agarosa 1 %. El inserto (Pro-FhT) y el vector digerido (pYES2/NT/B) se purificaron utilizando el kit Wizard Plus gel and PCR system purification Promega y los fragmentos fueron ligados considerando la ratio 12:1 inserto – vector.

El producto de ligación (pYES2/NT/B_ProFhT) fue purificado por precipitación etanólica y transformada en *E. coli* DH5 α electrocompetentes. Se verificó la clonación y transformación mediante PCR de colonias utilizando dos pares de primers; T7F (5' TAATACGACTCACTATAGGG 3') con CYC1 (5' GCGTGAATGTAAGCGTGAC 3') y ProFhTF (5' TGCCATGGAAGCGAATTTACAAT 3') con ProFhTR (5' TCAGATCTCCTCTTTTCCTAACCA 3'). Las colonias positivas fueron inoculadas en 10 mL de LB conteniendo 100 μ g/mL de ampicilina e incubados a 37 °C por 16 horas, 250 rpm. El cultivo fue criopreservado con 15 % de glicerol a -80 °C.

3.2.3 Sub Clonación del conspucto Pro-FhT en pPICZ α C

El vector pPICZ α C (Tabla 1, figura 8) fue transformado en *E. coli* DH5 α y verificado mediante PCR de colonias utilizando el par de primers AOX1_5' (5' GACTGGTTCCAATTGACAAGC 3') y AOX1_3' (5' GCAAATGGCATTCTGACATCC 3'). pPICZ α C y pYES2/NT/B-ProFhT fueron fermentados en *E. coli* DH5 α y purificados mediante Wizard plus miniprep. Se digirió ambos plásmidos con NotI y XbaI y se purificó el producto de digestión utilizando el kit Wizard Plus gel and PCR system purification Promega. La ligación de Pro-FhT y pPICZ α C fue mediante el ratio 12:1 inserto vector y el producto de la reacción fue purificado por precipitación etanólica y transformado en *E. coli* DH5 α por electroporación. La clonación y transformación fueron verificados mediante PCR de colonias utilizando los pares de primers AOX1_5' con AOX1_3' y ProFhT_F con ProFhT_R. Las colonias positivas fueron inoculadas e incubadas a 37 °C, 250 rpm en medio LB bajo en sales pH 7.5 conteniendo 200 μ g/mL de Zeocina. Se crio-preservó 1 mL de cultivo con 15% de glicerol a -80°C.

3.2.4 Transformación de pPICZ α C-ProFhT en *P. pastori* X-33

P. Pastori X-33 quimiocompetente fue preparado de acuerdo con el protocolo de Pichia easy compTM transformation kit - Invitrogen. Brevemente, el stock de X-33 fue sembrado en agar YPD con incubación a 30 °C por 96 horas. Se picó una colonia y se inoculó en 10 mL de medio YPD con incubación 16 horas a 30°C y en agitación 250 rpm. El cultivo fue diluido a un OD600 de 0.1 a 0.2 para un volumen de 10 mL en medio YPD. Se cultivaron las células a 30°C, con agitación de 250 rpm hasta un OD600 entre 0.6 a 1 (aproximadamente 4 a 6 horas). Se centrifugó el cultivo a 500

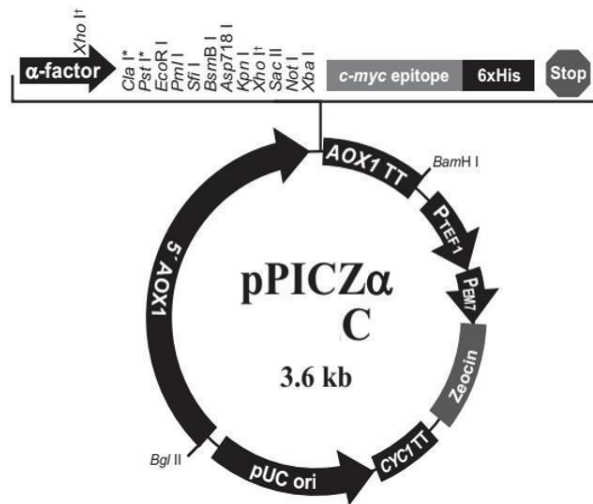
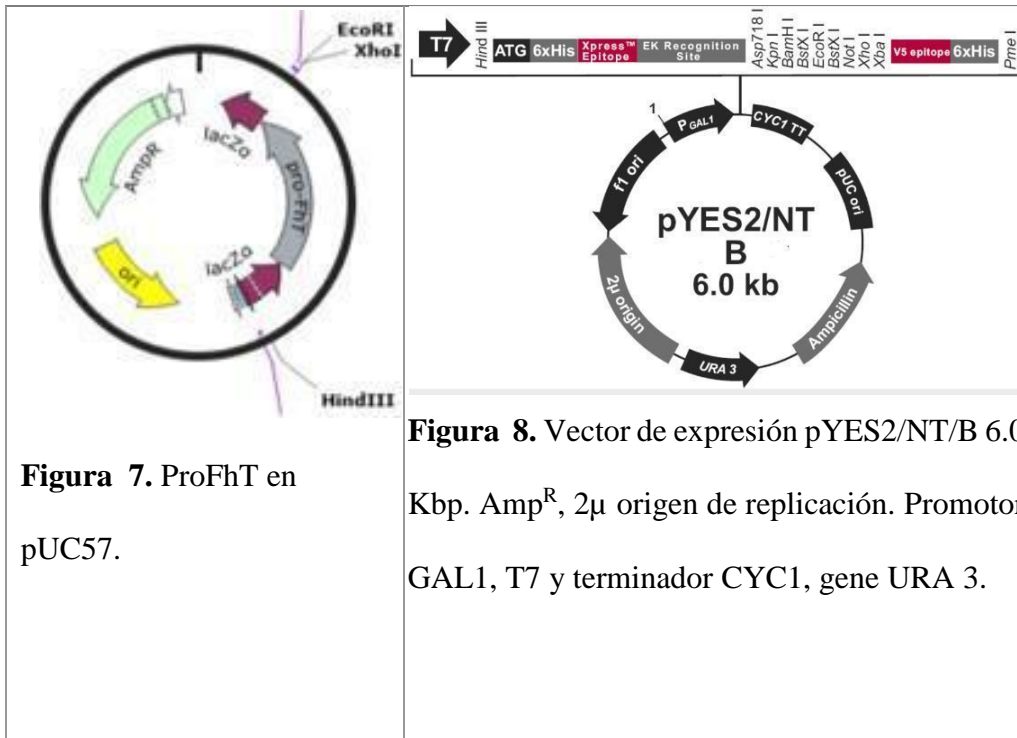
xg por 5 minutos a temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante y suspendió las células en 10 mL de solución I (solución de sorbitol conteniendo etilenglicol y DMSO) atemperado a temperatura ambiente por 1 hora. Las células quimiocompetentes de *P. pastoris* X-33 fueron separadas en alícuotas de 50 μ L en tubos de 1.5 mL estéril y se colocó en la caja poliestireno y se almacenó a -80°C .

Para la transformación, se atemperó a temperatura ambiente los 50 μ L de células X-33 quimio y se agregaron 3 μ g de pPICZ α C-Pro-FhT linealizado con *SacI*. Luego, se adicionó 1 mL de Solución II (solución PEG) y se mezcló mediante el uso de vórtex. La reacción fue incubada por 1 hora a 30°C con cada 15 minutos de mezcla mediante vórtex. La mezcla fue sometida a un golpe de calor por 10 minutos a 42°C y luego fue dividida en dos alícuotas en tubos de microcentrífuga (525 μ L cada uno) a la cual se le agregó 1 mL de medio YPD. Se incubó 1 hora a 37°C para permitir la expresión del gen de resistencia a zeocina. Se centrifugó la mezcla a 3,000 xg por 5 minutos y las células de cada tubo fueron suspendidas en 500 μ L de Solution III. Se mezcló los dos tubos en uno solo. Nuevamente se centrifugó a las mismas condiciones y las células fueron suspendidas en 100 μ L de Solution III. 20 μ L de la reacción de transformación fueron plaqueados en agar YPD conteniendo 200 μ g/mL de zeocina e incubadas a 30°C por 4 días.

Tabla 1. Lista de plásmidos usados

| Nombre | Descripción/genotipo | Fuente |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| pUC57 | 2.7 Kbp, plásmido de clonamiento, Amp ^R , LacZ. | GenScript, USA (Figura 6) |
| pYES2/NT/B | Plásmido lanzadera de 6.0 Kbp entre bacteria y levadura (<i>S. cerevisiae</i>), Amp ^R , 2 μ origen de replicación, secuencia CEN6/ARSH4, polihistidina (6xHis), epítoto Xpress TM y sitio de corte enteroquinasa en el N terminal. V5 epítoto y 6xHis en el C terminal. Promotor GAL1, T7 y terminador CYC1, gene URA 3 | Invitrogen (Figura 7) |
| pPICZ α C | 3.6 kb, Vector de expresión de levadura conteniendo el promotor AOX1 que permite inducir con metanol en <i>Pichia</i> . Secuencia señal de factor de secreción alfa factor. Epítotos en el C terminal (<i>myc</i> y poli His). Promotor EM7 y TEF1 que conduce la expresión del gen sh <i>ble</i> para resistencia a zeocina en bacterias y levaduras. Terminador de transcripción CYC1. Único sitio de restricción (<i>sacI</i> , <i>pmeI</i> , <i>BstX I</i>) para linealizar el vector y aumentar eficiencia de integración al genoma de <i>P. pastoris</i> . | Invitrogen (Figura 8) |

Se comprobó la clonación y transformación del inserto mediante PCR de colonias utilizando los dos pares de primers: AOX1_5' con AOX1_3' y ProFhT_F con ProFhT_R. Para la PCR, se picó media colonia y se inoculó en 50 µL de H₂O PCR. Se mezcló por vórtex y las células se lisaron a 99 °C por 5 minutos. 2 µL de la muestra fueron agregados al mix de PCR y el producto de amplificación fue verificado en 1% de agarosa. Las colonias positivas fueron inoculadas en 10 mL de medio YPD/zeocina 200 µg/mL e incubadas a 30 °C con 200 rpm por 16 horas. Un mL del cultivo fue criopreservado con 15 % de glicerol a -80 °C.



3.2.5 Expresión de la proteína rPro-FhT

P. pastoris X-33 transformadas fueron plaqueadas en YPD/zeocina 100 µg/mL e incubada a 30°C entre 2 a 4 días. Se picó una colonia e inoculó en 50 mL de BMGY pH 6 (Medio de complejo de glicerol tamponado) en un matraz de 250 mL y se incubó 24 horas a 30 °C con agitación de 250 rpm hasta alcanzar un OD600 entre 2 - 6. El cultivo fue centrifugado 3,000 xg por 5 minutos a temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante y el pellet fue suspendido en medio de inducción BMMY pH 6 (Medio de complejo de metanol tamponado) hasta alcanzar OD600 de 1 (aproximadamente 100 – 170 mL de medio) en matraz de 1 L. El cultivo fue incubado a 30 °C por 96 horas a 250 rpm. Cada 24 horas se agregó 100% de metanol a una concentración final de 0.5%.

Se determinó el nivel de expresión de rPro-FhT en función del tiempo de incubación mediante SDS-PAGE 12 % colectando 1 mL de muestra cada 24 horas. Cada muestra fue centrifugada a 10000 rpm por 10 minutos a 4 °C y la expresión fue analizada tanto en el precipitado como el sobrenadante.

3.2.6 Purificación de la proteína rPro-FhT

El cultivo de *P. pastoris* X-33 transformada en BMMY fue centrifugado a 1,0000 rpm por 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue filtrado con filtro de 0.22 µM de tamaño de poro y equilibrado a pH 7.4 con los siguientes componentes conteniendo concentraciones finales de 20 mM de NaH₂PO₄ pH 7.4, 300 mM de NaCl y 10 mM imidazol.

Para la purificación, la columna de Ni-NTA agarosa fue equilibrado con buffer de equilibrio pH 7.4 (20 mM NaH₂PO₄ pH 7.4, 300 mM NaCl y 10 mM imidazol) y luego se pasó por la columna el sobrenadante de cultivo equilibrado. Se lavó la columna con buffer de lavado pH 7.4 (20 mM NaH₂PO₄ pH 7.4, 300 mM NaCl y 15 mM imidazol) hasta llegar a un OD_{280 nm} inferior a 0.2. Finalmente, rPro-FhT fue eluida con buffer de elución pH 7.4 (20 mM NaH₂PO₄ pH 7.4, 300 mM NaCl y 300 mM imidazol). Durante la elución se colectaron fracciones de 1 mL para evaluar la pureza de rPro-FhT mediante SDS-PAGE al 12 %. Se realizó un pool de las fracciones puras y se concentró con una membrana de ultrafiltración de 3kDa de punto de corte.

3.2.7 Cuantificación de rPro-FhT

La cuantificación de la proteína rFhT fue realizada mediante el método de Bradford. Para generar la curva estándar se emplearon 7 puntos con concentraciones conocidas de BSA.

3.3 CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA

3.3.1 Tiempo de activación y actividad enzimática de rFhT

Se evaluó el tiempo de activación y actividad enzimática de rPro-FhT utilizando el sustrato azocaseína; 231 µg de rPro-FhT fue activada en 0.5 M de citrato de sodio pH 5, 1 mM EDTA y 10 mM de DTT para un volumen final de 350 µL. La solución fue incubada por 16 horas a 37 °C y se colectaron 30 µL para evaluar la actividad enzimática por duplicado y 15 µL (10 µg de enzima) fue mezclado con E-64 1 mM para evaluar la activación en SDS-PAGE 12% a los 0, 2, 4, 8, 12 y 16 horas. De los

30 μL , se dividió la muestra a la mitad (10 μg de enzima cada uno) y se evaluó la actividad enzimática en 0.1 M citrato de sodio pH 5, 1 mM EDTA, 10 mM DTT y 1.75 mg de azocaseína en un volumen final de 700 μL . La reacción fue incubada a 37 °C por 4 horas y cumplido el tiempo se le adicionó 300 μL de TCA 80 % para detener la reacción. Se midió la absorbancia a una densidad óptica de 440 nm.

La actividad enzimática de FhT nativa se determinó bajo las mismas condiciones que la rFhT. FhT nativa se purificó en su estado activado del agente biológico y en este experimento se usó como control positivo de actividad bajo las mismas condiciones que la recombinante.

3.3.2 Parámetros cinéticos (K_m y V_{max}) de rFhT y nativa

Para evaluar los parámetros cinéticos, se activó 25 μg de rPro-FhT y FhT nativa a 37 °C incubados al tiempo determinado en el punto anterior en buffer de activación conteniendo 0.3 M de citrato de sodio, 1 mM EDTA y 10 mM DTT en un volumen final de 150 μL .

Los 150 μL de la reacción de activación fueron agregados al buffer de actividad conteniendo 0.1 M de citrato de sodio pH 5, 1 mM EDTA, 10 mM DTT y diferentes concentraciones de sustrato Z-Phe-Arg-pNA; 0, 5, 10, 20, 50, 75, 100, 200 y 400 μM en un volumen final de 300 μL . La reacción fue incubada a temperatura ambiente por 10 minutos y la liberación de p-nitroanilina (pNA) fue medida por absorbancia a 410 nm cada 45 segundos usando el espectrofotómetro (tecan infinite 200 PRO, Mannedorf, Switzerland). Los valores de la V_{max} y K_m fueron calculados con el programa GraphPad Prism 9.5.1.

3.3.3 Determinación del pH óptimo de rFhT y nativa

Para determinar el pH óptimo de la actividad enzimática de rFhT, se activó 25 µg de rPro-FhT y FhT nativa a 37 °C e incubados por el tiempo determinado en el punto 4.1 en buffer de activación conteniendo 0.3 M de citrato de sodio, 1 mM EDTA y 10 mM DTT en un volumen final de 70 µL.

Para determinar el pH óptimo, los 70 µL de la reacción de activación fue añadido al buffer de actividad conteniendo 200 µM de Z-Phe-Arg-pNA, 1 mM EDTA, 10 mM DTT y 0.3 M de diferentes buffers con pH de 4, 5, 5.5, 7.4 y 8 para un volumen final de 300 µL. La reacción fue incubada por 5 minutos a temperatura ambiente y la liberación de pNA fue medida a 410 nm usando el equipo Infinite® 200 Pro - Tecan. Las reacciones fueron trabajadas por duplicado.

3.3.4 Efecto de los inhibidores naturales sobre la actividad de rFhT y FhT

Se activó 25 µg de rPro-FhT y FhT nativa a 37 °C e incubados por 8 horas a 37 °C en buffer de activación conteniendo 0.3 M de citrato de sodio, 1 mM EDTA y 10 mM DTT en un volumen final de 150 µL.

Los 150 µL de la reacción de activación fue agregada al buffer de actividad conteniendo 0.1 M citrato de sodio pH 5, 1 mM EDTA, 10 mM DTT, 200 µM de Z-phe-arg-pNA y los inhibidores: 1 mM PMSF, 100 mM CaCl₂, 1 mM leupeptin, 10 µM de antitripsina y 1mM de E-64 para un volumen final de reacción de 300 µL. La reacción fue incubada por 5 min a temperatura ambiente y la liberación de pNA fue registrado a 410 nm usando el espectrofotómetro Infinite ® 200 Pro - Tecan.

3.4 ACTIVIDAD FIBRINOLÍTICA

3.4.1 Evaluación fibrinolítica en coágulos

Se colectó sangre venosa de un donante con su consentimiento informado en tubos de vidrio sin anticoagulantes. Una alícuota de 250 μ L de la muestra fue transferida en tubos de 1.5 mL estéril y se incubó a 37 °C por 3 horas para permitir la coagulación. Los coágulos fueron lavados con 0.9 % de NaCl y pesados en balanza analítica antes y después del tratamiento.

Alícuotas de 150 μ g de FhT y rPro-FhT fueron incubados en buffer de activación 0.3 M citrato de sodio pH 5, 1 mM EDTA y 10 mM DTT a 37 °C por el tiempo determinado en el inciso 4.1 en un volumen de reacción de 550 μ L. El coágulo generado anteriormente fue añadido a la reacción de actividad y el peso de esta fue evaluado antes, 24 horas y 48 horas de incubación. La degradación fibrinolítica fue expresada en porcentaje de los pesos conservado de coágulo inicial y final luego de la incubación.

3.4.2 Evaluación fibrinolítica en coágulos de fibrina

Se colectó sangre venosa en tubos con anticoagulantes 3.2% citrato de sodio. Se invirtió de 2 a 5 veces para mezclar bien. Se centrifugó la muestra a 1800 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente y el plasma fue separado. Para permitir la formación de coágulo de fibrina, en un tubo estéril se mezcló 500 μ L de plasma, 500 μ L de NaCl 0.9 % y 250 μ L de CaCl₂ 2 %. La reacción fue incubada por 2 horas a 37 °C y el coágulo formado se lavó dos veces con NaCl 0.9% y mediante centrifugación a 3500 rpm por 5 minutos.

Alícuotas de 100 µg de FhT y rPro-FhT fueron incubados en buffer de activación 0.3 M citrato de sodio pH 5, 1 mM EDTA y 10 mM DTT a 37 °C por 8 horas a 37 °C en un volumen de reacción de 550 µL. El coágulo de fibrina generado anteriormente fue añadido a la reacción de activación y la degradación fue registrada mediante fotografías por reducción del tamaño y los productos de degradación en 15 µL del sobrenadante tomadas a los 0, 16, 24 y 48 horas fueron resueltos mediante SDS-PAGE al 12%.

3.5 APROXIMACIÓN COMPUTACIONAL DE LA ESTRUCTURA Y LA INTERACCIÓN CON SUS SUSTRATO DE LA PROTEÍNA rFhT

3.5.1 Predicción de la estructura tridimensional de la proteína Pro-FhT y FhT mediante modelamiento por homología.

Existen dos estructuras de alta calidad en la base de datos de PDB los cuales fueron usados como molde para modelar Pro-FhT: la estructura 3K24 y PDB 2O6X [35,36]. Ambas proteínas moldes tienen un porcentaje de identidad mayor a 75 % con Pro-FhT evaluados mediante el análisis de alineamiento de secuencias utilizando la herramienta ClustalW-Tools - Pairwise Sequence Alignment. En el caso del molde 3K24 es más representativo para el modelamiento del dominio maduro; mientras que el molde 2O6X es representativo para modelar el pro péptido y el dominio maduro de la enzima. La estructura de Pro-FhT fue modelada usando el programa SWISS-MODEL y la misma fue visualizada con el programa VMD (Visual Molecular Dynamics).

3.5.2 Dinámica molecular

La estabilidad de la estructura generada fue analizada mediante dinámica molecular con un tiempo de simulación de 20 ns. En primer lugar, se buscó el mejor arreglo estructural mediante minimización de energía utilizando el algoritmo steepest descent en 1500 pasos hasta encontrar una fuerza máxima baja y estable. La minimización fue realizada utilizando el campo de fuerza OPLS (Optimized Potential for liquid simulation) en una caja neutra conteniendo moléculas de agua tipo SPC/E (Extended simple point charge model), Na⁺ y Cl⁻; la proteína fue centrada de manera que los extremos queden a 1.5 nm desde la cara de la caja. En segundo lugar, se equilibró el sistema a una temperatura constante de 310.15 K y a una presión constantes de 4.5×10^{-5} bar⁻¹. Se realizó la simulación por 100 picosegundos. Finalmente, para análisis de las coordenadas de la trayectoria se realizó la dinámica molecular por 20 nanosegundos y se evaluó el RMSD (Desviación cuadrática media de la raíz) para determinar la estabilidad de la estructura en el tiempo. Se consideró PME para las interacciones electrostáticas, el punto de corte de fuerza electrostática y de Van der Waals fue de 1 y se especificó condiciones de límites en las 3 dimensiones.

3.5.3 Interacción de FhT con fibrinógeno y fibrina mediante “Docking” molecular.

3.5.3.1 Modificación de la estructura de la molécula de Fibrinógeno

Fibrinógeno está formado por dos dominios idénticas donde cada una tiene tres cadenas polipeptídicas ($A\alpha$, $B\beta$, γ) (PDB 3GHG) [38]. A partir de 3GHG, mediante alineamiento estructural con estructuras resueltas de fragmentos de fibrina (PDB: 2HLO) se generó la estructura de fibrina eliminando secuencias pertenecientes a la estructura de fibrinógeno utilizando el programa VMD (<https://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>). Las estructuras de los 3 polipéptidos de manera independiente fueron obtenidas mediante limpieza de secuencias a partir del modelo 3GHG.

3.5.3.2 “Docking” molecular entre FhT con fibrinógeno y fibrina

Se evaluó la interacción de FhT con fibrinógeno, fibrina y con cada polipéptido ($A\alpha$, $B\beta$, γ independientemente) usando el servidor “online” ClusPro (<https://cluspro.bu.edu/>). Para realizar el docking en ClusPro, se consideró fibrinógeno y derivados como receptor o como cuerpo estático y FhT maduro como ligando. El servidor online simula la interacción colocando el ligando en diferentes posiciones alrededor del receptor y calcula scores de energía de interacción entre ligando receptor [37-39].

Cluspro genera varios modelos de interacción, pero solo se considera los “scores” de energías más bajo y que la distancia de los 3 aminoácidos del sitio activo, o principalmente la cisteína sea menor a 3.2 Amstrong de los aminácidos del sustrato.

IV RESULTADOS

4.1 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA rPro-FhT

4.1.1 Expresión de la proteína rPro-FhT en *Saccharomyces cerevisiae*

Se logró expresar y purificar rPro-FhT a 37 kDa de forma intracelular. Se realizó dos pools de las fracciones de purificación y se evidencia la pureza a 37 kDa (Figura 9). Se evaluó la actividad enzimática de los pools mediante dos métodos: activación de la enzima mediante SDS-PAGE y actividad enzimática usando el sustrato Azocaseína. En la figura 10 se evidencia que no hay activación de la enzima a pesar de incubar a diferentes tiempos en condiciones óptimas de activación. Este resultado refleja en la no actividad de la enzima contra su sustrato (resultado no presentado) ya que el pro péptido aún está unido al dominio maduro como se observa en la figura 10, las bandas se encuentran a 37 kDa.

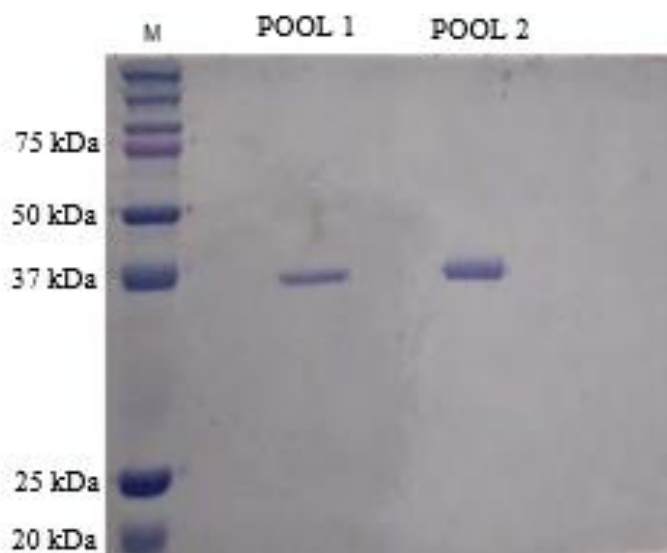


Figura 10. Pools de las fracciones de purificación de rPro-FhT. Carril M, marcador de peso molecular.

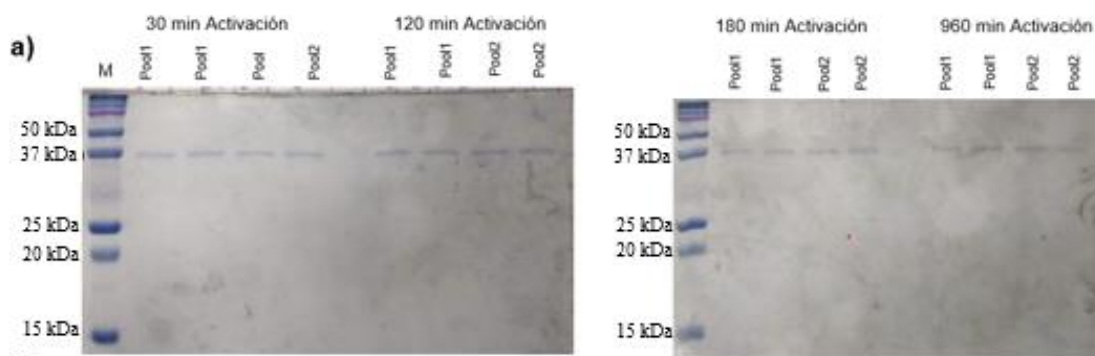


Figura 11 . Activación de rFhT a pH 5 en diferentes tiempos de incubación (30, 120, 180 y 960 minutos). Carril M, marcador de peso molecular. Las muestras fueron trabajadas por duplicado. Se esperaba un tamaño de 25 kDa para rFhT activa o madura.

4.1.2 Expresión de la proteína rPro-FhT en *Pichia pastoria*

4.1.2.1 Clonación de la secuencia de Pro-FhT en pPICZ α C y transformación en *Pichia pastoris* X-33

La secuencia de Pro-FhT fue sintetizado y clonado en el vector pUC57 (pUC57_ProFhT). Tanto pUC57_ProFhT como pYES2/NT/B fueron transformados en *E. coli* TOP10 y DH5 α respectivamente. La verificación de transformación de ambos plásmidos fue de acuerdo con el marcador de selección ampicilina adicionado a la placa de agar; en caso Pro-FhT, se corroboró la transformación mediante PCR de colonias usando los primers que flanquean pUC57 y se observa las bandas a un tamaño alrededor de 1260 pares de bases lo que corresponde al tamaño del inserto (Figura 11).

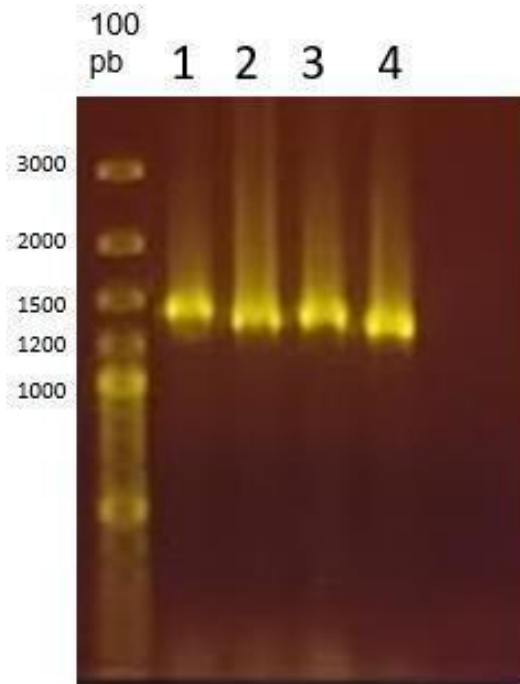


Figura 12. Gel de agarosa de los productos de amplificación de PCR de colonias conteniendo Pro-FhT obtenida con los primers que flanquean pUC57. El tamaño esperado es de 1260 pb. El gel fue teñido con *SafeGreenT^M*.

Se realizó la ligación de Pro-FhT en pYES2/NT/B y el producto de ligación fue transformado en *E. coli* DH5 α . La clonación se verificó utilizando los pares de primers T7F - CyC1 y ProFhT_R y F (Figura 12). Para las 5 colonias seleccionadas, se observa bandas alrededor de 1280 pares de bases con el primer T7F - CyC1 y 980 pares de bases con el primers específico para el inserto, indicando la correcta clonación del gen de Pro-FhT.

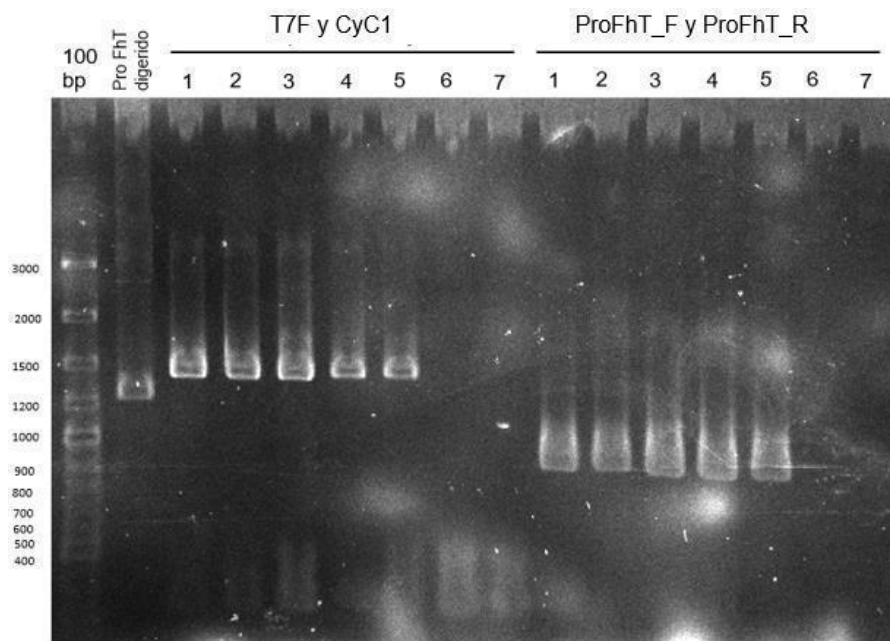


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR de colonias de DH5 α teñidas con bromuro de etidio. Carril 1, 2, 3, 4 y 5 son colonias transformadas con el producto de ligación pYES2/NT/B-ProFhT. Carril 6 y 7 son las colonias transformadas con pYES2/NT/B.

El producto de ligación pPICZ α C_ProFhT fue transformada en DH5 α y la misma fue verificada por PCR de colonias (resultado no presentado). pPICZ α C_ProFhT fue producido y transformado en *Pichia pastoris* X-33 quimio competentes y la inserción del gen al genoma de X-33 fue evaluado por PCR de colonias utilizando el par de primers AOX1_5' con AOX1_3' y ProFhT_F con ProFhT_R (Figura 13). Todas las colonias seleccionadas fueron positivas para la clonación del gen ya que se observan bandas alrededor de 1480 para los primers flanqueando el vector y 980 para los primers específicos para el gen de interés.

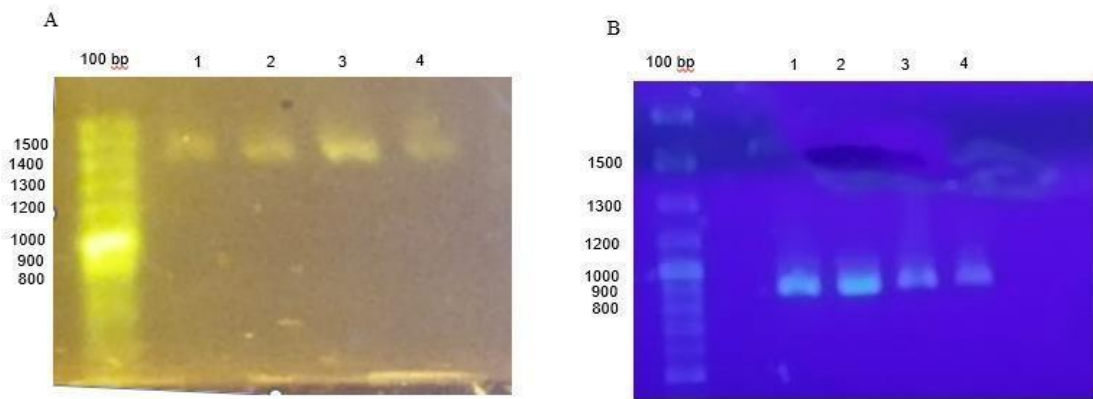


Figura 14 . Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de colonias de *Pichia pastoris* X-33 utilizando el par de primers **A)** AOX1_5' con AOX1_3' y **B)** ProFhT_F con ProFhT_R.

4.1.2.2 Expresión y purificación de rPro-FhT expresado en *Pichia pastoris*

X-33

La expresión de rPro-FhT fue evaluada en diferentes tiempos 0, 12, 24, 36, 48, 60 y 72 horas a 30 °C. El análisis de expresión se realizó mediante SDS-PAGE al 12 % del sobrenadante del cultivo y el pellet celular después de centrifugar a 10000 rpm por 10 minutos.

En el pellet celular, se identificó un aumento de la intensidad de bandas a la altura de 47 kDa desde los 12 a 72 horas, lo que pertenece a rPro-FhT unido al dominio alfa factor (Figura 14 A); en el sobrenadante del cultivo, se ve un incremento de bandas desde las 12 a 76 horas lo que evidencia la expresión de rPro-FhT ya que está a la altura de 38 kDa como se espera en su forma zimógena (Figura 14 B). Para las expresiones de los siguientes lotes solo se consideró la expresión con incubación de 72 horas.

Se evaluó también el crecimiento de la levadura recombinante durante las 96 horas (Figura 15) de incubación y se determinó que a las 60 horas alcanza la fase estacionaria.

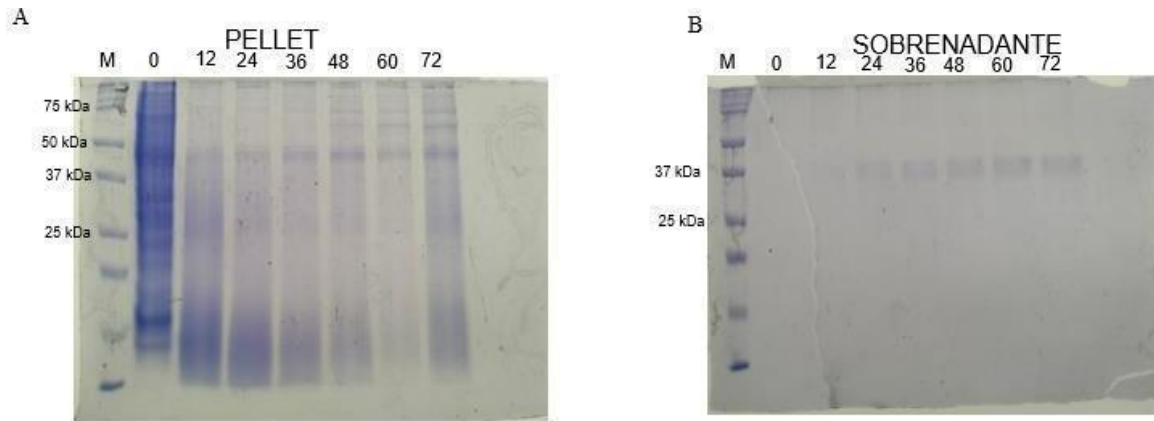


Figura 15. SDS-PAGE 12% de la expresión de rPro-FhT en muestras de **A)** pellet celular **B)** sobrenadante del cultivo.

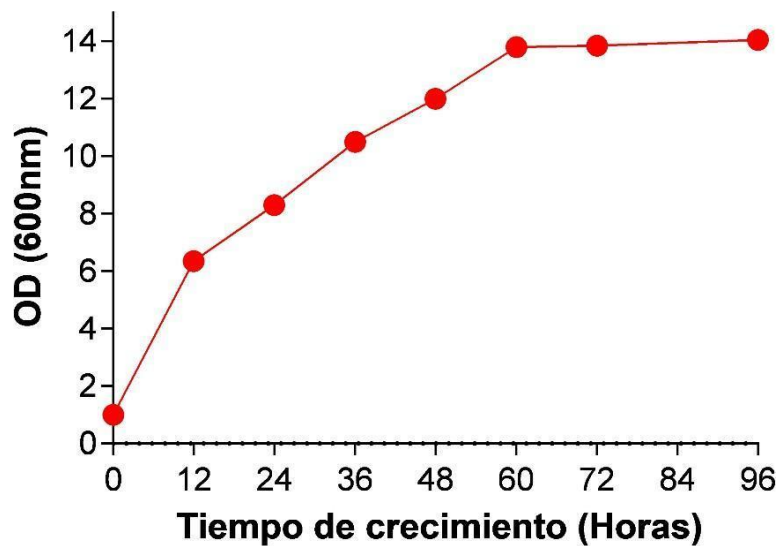


Figura 16. Crecimiento de X-33 recombinante a 30 °C con movimiento de 200 rpm.

La purificación de rPro-FhT fue realizada utilizando columnas de Ni-NTA agarosa con buffer de elución a pH 7.4. Las fracciones de 1 mL colectadas fueron concentradas con amicon 3 kDa y la pureza de la recombinante fue evaluada mediante SDS-PAGE al 12 %. En la figura 16 se muestra la proteína purificada a 38 kDa en su forma zimógena o inactiva. Se cuantificó la muestra purificada por el método de Bradford y el rendimiento de la expresión de rPro-FhT es alrededor de 20 mg por cada 1 L de cultivo.

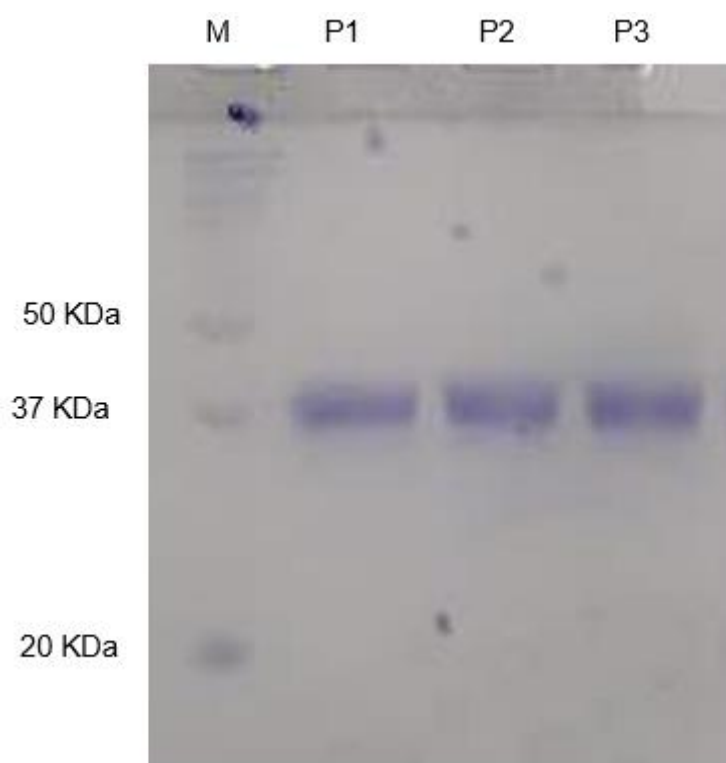


Figura 17. SDS-PAGE al 12 % del concentrado de las purificaciones de rPro- FhT. P1, P2 y P3 corresponden a fracciones concentradas del mismo lote de purificación. M, marcador de peso molecular de proteína.

4.2 CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE rPro-FhT

La activación de la enzima fue evaluada mediante actividad enzimática y cambio de tamaño de los péptidos en SDS-PAGE a los 0, 2, 4, 6, 8, 12 y 16 horas de incubación (figura 17A y B). En caso de la recombinante, mientras más es el tiempo de incubación para la activación, mayor es la actividad sobre su sustrato azocaseína, pero a las 8 horas de incubación llega a un nivel máximo y tiene una similitud de actividad con la nativa. Pasado las 8 horas de activación, se mantiene la actividad máxima tanto para la recombinante (línea azul) como para la nativa (línea roja). La activación de la enzima se refleja también en el cambio de tamaño de 37 kDa su forma inactiva (zimógena) a 25 kDa su forma activa. De acuerdo con las condiciones detalladas, en la figura 17B a las 0 horas de activación, la proteína está en su forma inactiva, pero a las 2 horas de activación la mayor parte de proteína está en su forma activa y mientras más tiempo de incubación, es más probable que se active toda la enzima. Sin embargo, a las 16 horas de activación la intensidad de la banda disminuye, eso podría reflejar una autodegradación o la posibilidad de tener menos muestra en el análisis. Cabe recalcar que FhT nativo es purificada en su forma activa y es por ello por lo que la actividad específica se mantiene en el máximo durante las incubaciones de la activación. Para los siguientes experimentos se consideró 8 horas de activación.

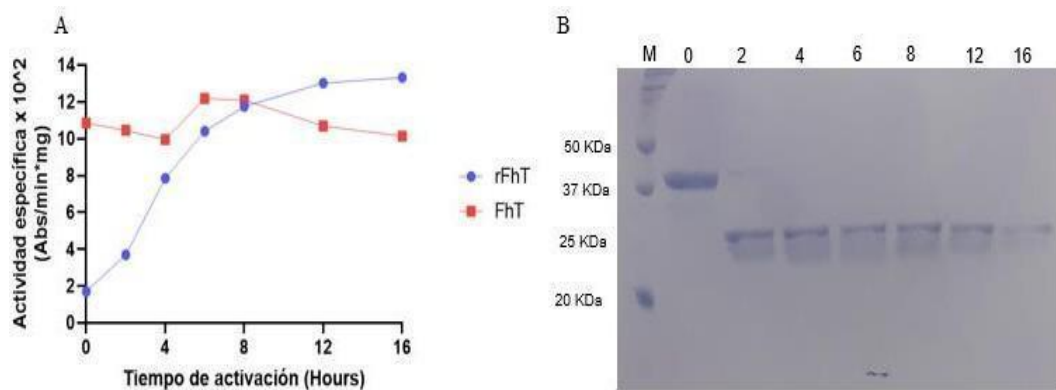


Figura 18. A) Actividad específica de rPro-FhT (azul) y FhT (rojo) activadas en diferentes tiempos. **B)** Activación de rPro-FhT. 0, 2, 4, 6, 8, 12 y 16 son los tiempos de incubación en buffer de activación.

Los parámetros cinéticos de la proteína FhT recombinante y nativa fueron evaluadas utilizando 25 µg de enzima activada por 8 horas y contra diferentes concentraciones de sustrato Z-phe-Arg-pNA. La figura 18A y B muestra que tanto la recombinante como la nativa presentan el comportamiento de la cinética de Michaelis-Menten y Lineweaver-burk, se observa que mientras se aumenta la concentración de sustrato, hay un incremento en la velocidad de la reacción. La velocidad máxima de rFhT y el Km fue de 1.79×10^{-3} µmoles/min y 76.67 µM respectivamente; en caso de la nativa, la velocidad máxima 1.15×10^{-3} µmoles/min y el Km fue de 94.14 µM.

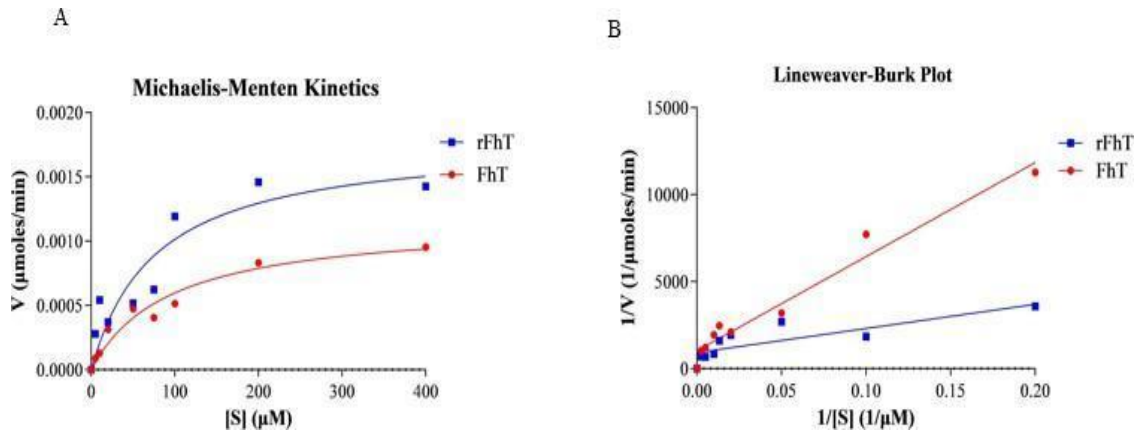


Figura 19. Cinética enzimática. A) Michaelis-Menten para rFhT y FhT B) Lineweaver-Burk para rFhT y FhT.

Se evaluó la actividad enzimática de FhT y rFhT a diferentes pH usando como sustrato Z-phe-arg-pNA. En la figura 19 se representa el perfil de actividad de las enzimas. FhT muestra mayor actividad enzimática pH 5.5, mientras que rFhT tiene una actividad máxima a pH 5. A pH 7, FhT muestra una actividad enzimática que es 5% de la actividad a pH 5.5, mientras que rFhT tiene una actividad que es 40% de la actividad a pH 5.5. De manera general, tanto rFhT y FhT presentan un perfil similar de pH característico de las catepsinas, con una mayor actividad a pH alrededor de 5.

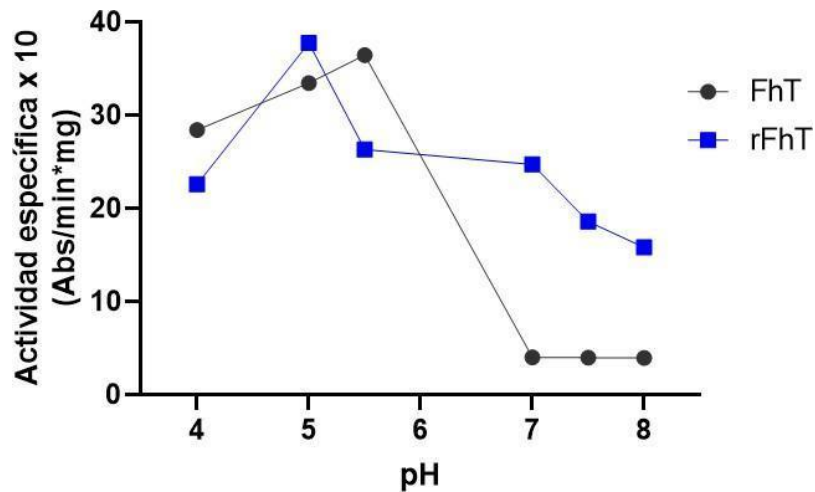


Figura 20 . Actividad de proteínasa a diferentes pHs. rFhT (azul) presentó mayor actividad a pH 5, mientras que FhT (negro) a 5.5.

El inhibidor natural de cisteína proteasas E-64 inhibe el 100 % de la actividad de rFhT y FhT nativa (figura 20). La leupeptina es un inhibidor de cisteínas, serinas y treoninas y presenta un similar porcentaje de inhibición menor al 50 % para FhT y rFhT. PMS y antitripsina son inhibidores para serinas y tripsina respectivamente. El porcentaje de inhibición de ambos para FhT y rFhT fue menor al 50 %; sin embargo; el comportamiento de inhibición difiere para la nativa y recombinante siendo antitripsina con mayor inhibición para la recombinante y PMSF para la nativa. En caso de CaCl_2 el porcentaje de inhibición es menor al 50 % y el patrón es similar para la nativa y recombinante. De forma general, el patrón de inhibición es similar para las enzimas, pero las pequeñas variaciones con los inhibidores no específicos como antitripsina y PMSF podrían reflejar las diferencias estructurales mínimas entre ambas enzimas.

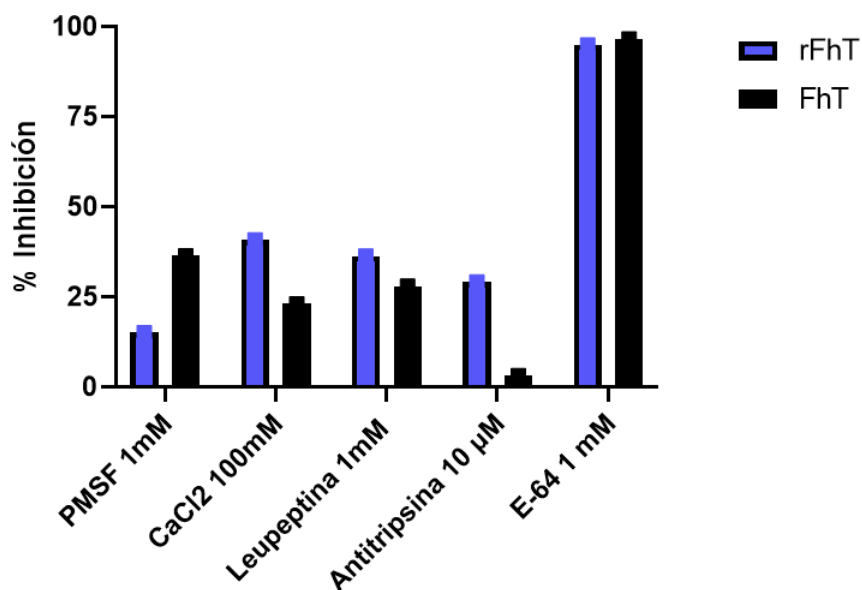


Figura 21. Porcentaje de inhibición de la actividad rFhT (azul) y FhT (negro) sobre el sustrato Z-phe-Arg-pNA.

4.3 ACTIVIDAD FIBRINOLÍTICA

4.3.1 fibrinólisis de coágulos de sangre total

La degradación de los coágulos fue evaluada por el porcentaje de peso conservado en las 24 y 48 horas de reacción. En la figura 21 se muestra el peso promedio conservado, en el caso del control negativo hay una disminución del peso conservado hasta el 75 %, pero para los tratamientos con FhT nativo y recombinante, a las 24 horas de incubación, el coágulo conserva 25 % de su peso inicial y a las 48 horas de incubación se evidencia una degradación completa con FhT y rFhT ya que el coágulo no presenta peso conservado. El comportamiento fibrinolítico es similar para la proteína nativa y recombinante.

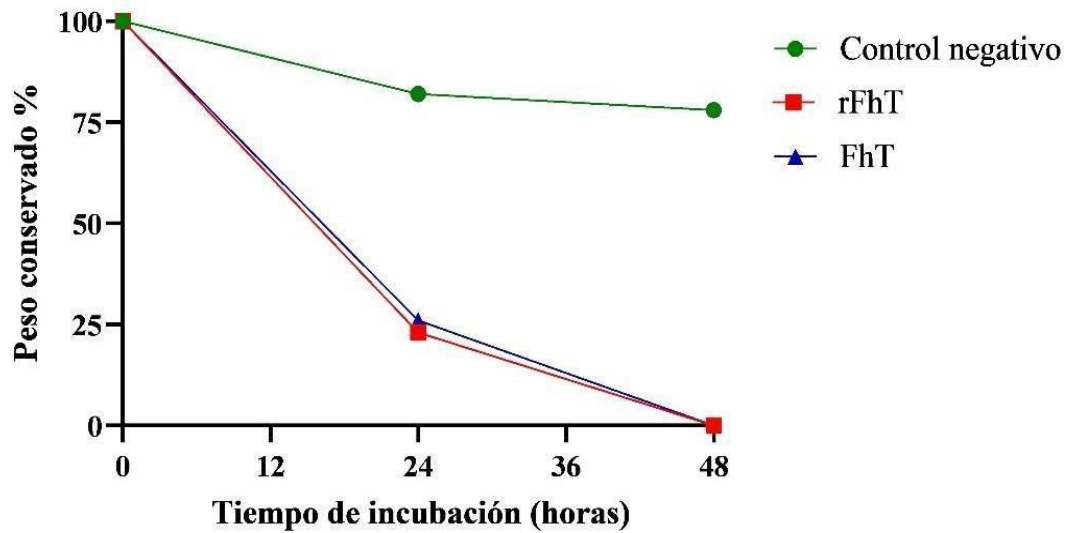


Figura 22. Peso conservado de coágulos de sangre total incubados durante 24 y 48 horas a 37°C con rFhT y FhT.

4.3.2 Fibrinólisis de coágulos de fibrina

En la figura 22 se muestra que el coágulo (estructura blanca) del control conserva su estructura hasta 48 horas de incubación, pero los tratamientos con FhT nativo y recombinante van perdiendo la estructura a mayor tiempo de incubación y que a las 48 horas rFhT degrada completamente el coágulo, pero para la nativa la estructura del coágulo es pequeño a las 48 horas la cual podría deberse al propio mecanismo de la nativa. Sin embargo, el comportamiento es similar entre ambas enzimas.

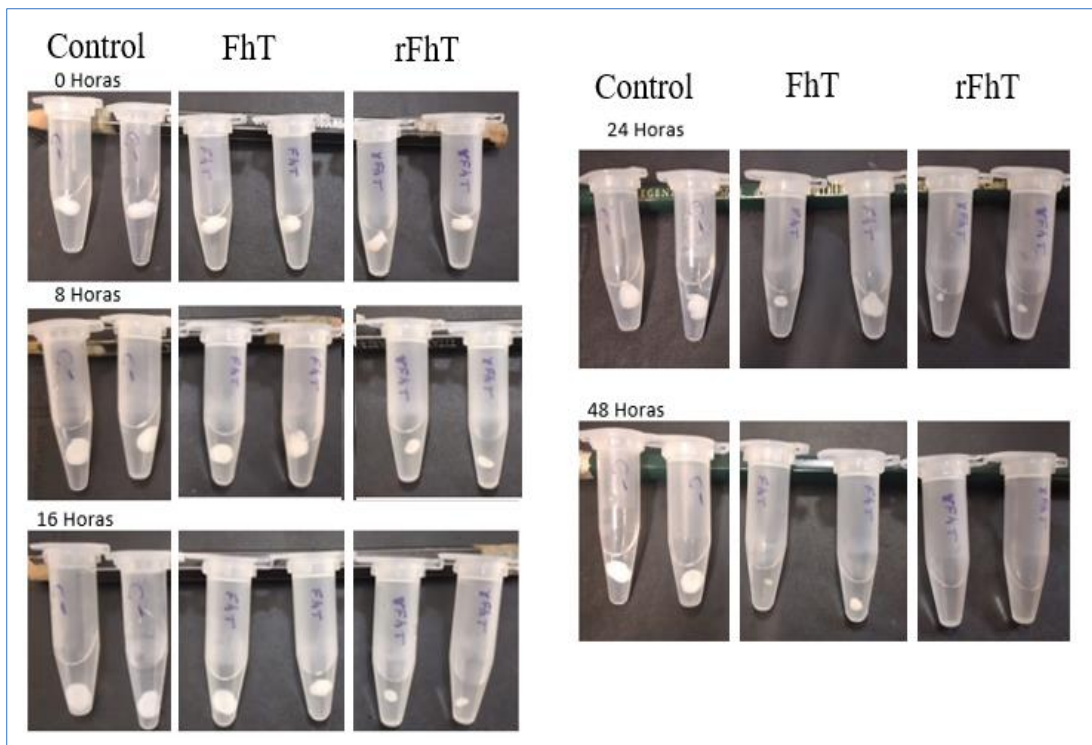


Figura 23. Degradación de coágulos de fibrina con rFhT y FhT a los 0, 8, 16, 24 y 48 horas. La estructura blanca dentro de los tubos es el coágulo de fibrina

De la reacción anterior (figura 22), se analizó las muestras de sobrenadante de 0, 16, 24 y 48 horas. Para la figura 23A, que son los controles, a las 0 horas se evidencian bandas con mayor intensidad a los 63 kDa lo que corresponde al péptido alfa de la fibrina y a 47 kDa del péptido gamma. Estos péptidos se encuentran en el sobrenadante probablemente por los movimientos durante el experimento, además hay un aumento de la intensidad de las mismas bandas a las 16 horas y se mantiene hasta las 48 horas de reacción. Sin embargo, para los tratamientos, a las 0 horas el patrón es similar al del control, a las 16 horas se evidencia la aparición de fracciones

de bandas alrededor de 25 kDa pero a los 24 y 48 horas, las bandas de todos los tamaños presentan poca intensidad, esto podría representar que tanto la nativa como la recombinante degradan completamente las redes de fibrina y que se está generando pequeños péptidos no evidenciables en el gel de electroforesis.

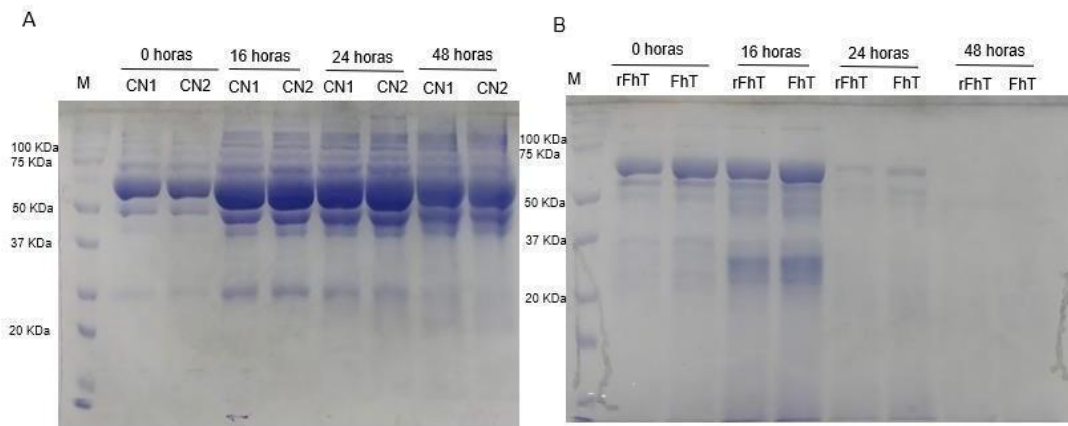


Figura 24. Fibrinólisis de coágulos de fibrina con rFhT y FhT. **A)** SDS PAGE de las muestras del control negativo por duplicado (CN1, control negativo 1 y CN2, control negativo 2). **B)** SDS PAGE al 12 % de la fibrinólisis del coágulo con la enzima nativa y recombinante.

4.4 APROXIMACIÓN COMPUTACIONAL DE LA ESTRUCTURA Y LA INTERACCIÓN CON SUS SUSTRATO DE LA PROTEÍNA rFhT

4.4.1 Modelamiento estructural de la proteína Pro-FhT

La estructura tridimensional de Pro-FhT fue resuelta mediante modelamiento por homología utilizando como molde dos proteínas: 3K24, una catepsina tipo L de humanos resuelta mediante difracción de rayos X a una resolución de 2.5 Å; y 2O6X, una pro-catepsina tipo L de F. hepatica resuelta por el mismo método a una resolución de 1.4 Å. El alineamiento de secuencias de Pro-FhT con 3K24 y Pro-FhT con 2O6X resultó en 51.87 % y 80 % de identidad, respectivamente, siendo más representativo 2O6X (Figura 24).

El modelamiento estructural de Pro-FhT con 3K24 permitió generar la estructura del dominio maduro en la cual el indicador QMEAN global fue de 0.85, lo que indica que los aminoácidos de Pro-FhT iguales al molde fueron resueltos muy bien en el espacio tridimensional; sin embargo, la calidad local estimada presentó un alto porcentaje de aminoácidos que estructuralmente no fueron bien resueltos y que estas pertenecen a los residuos que presentan baja o nula similitud fisicoquímica con el molde (Cobertura 68 %). La figura 25A presenta la estructura del dominio maduro generada con el molde 3K24.

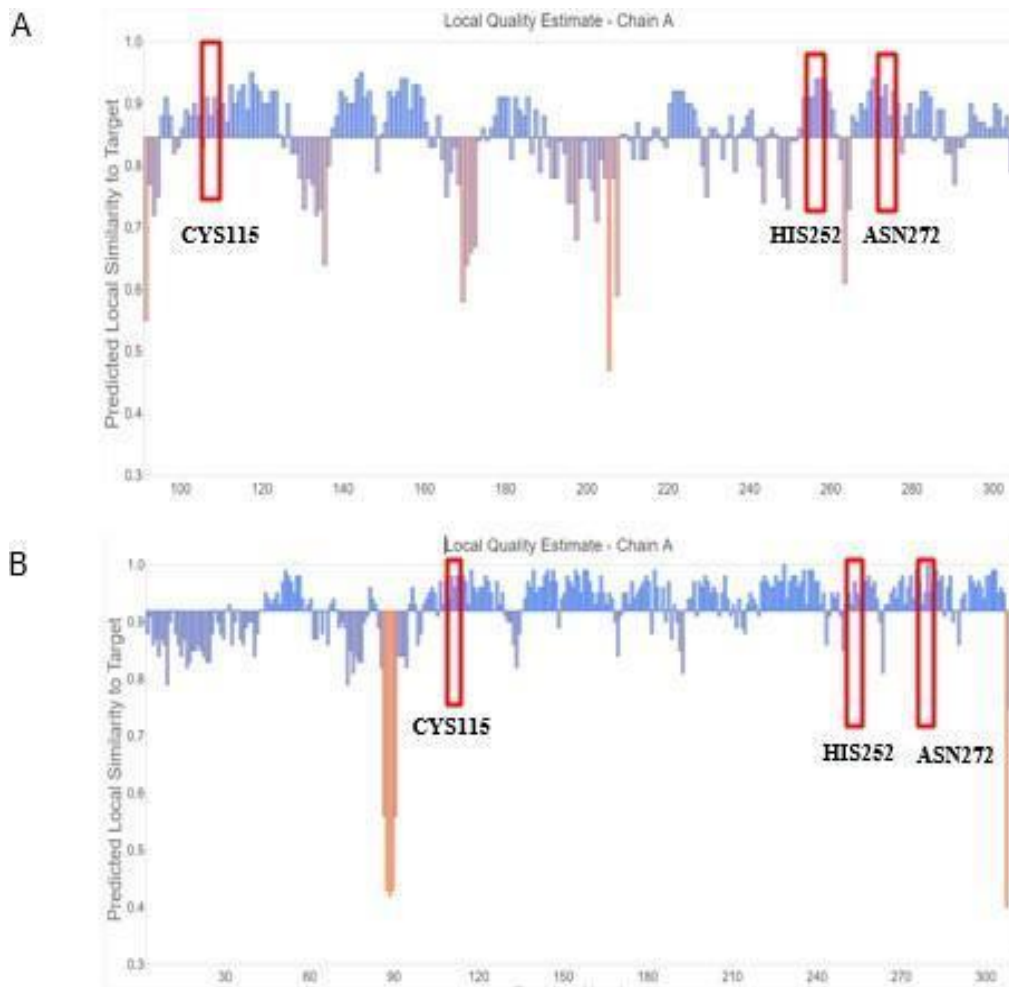


Figura 25. Estimado de calidad local de la secuencia de Pro-FhT alineadas con **A)** 3K24 y **B)** 2O6X. Cys115, His252 y Asn272 son los aminoácidos del sitio activo. Las barras en azul indican una alta similitud esperada entre el residuo de Pro-FhT con el molde. Las barras en naranja representan la baja similitud esperada entre la secuencia Pro-Fht con el molde.

Por otro lado, la estructura del pro-dominio y del dominio maduro de Pro-FhT modelada con el molde 2O6X presentó un QMEAN global de 0.92 y una cobertura de 97 %, lo que indica que hay un alto porcentaje de los aminoácidos de Pro-FhT fisicoquímica y estructuralmente iguales al molde y por ende cada uno fueron resuelto en el espacio tridimensional con mayor precisión. La figura 25B presenta la estructura del pro-dominio y fracción madura generada con el molde 2O6X.

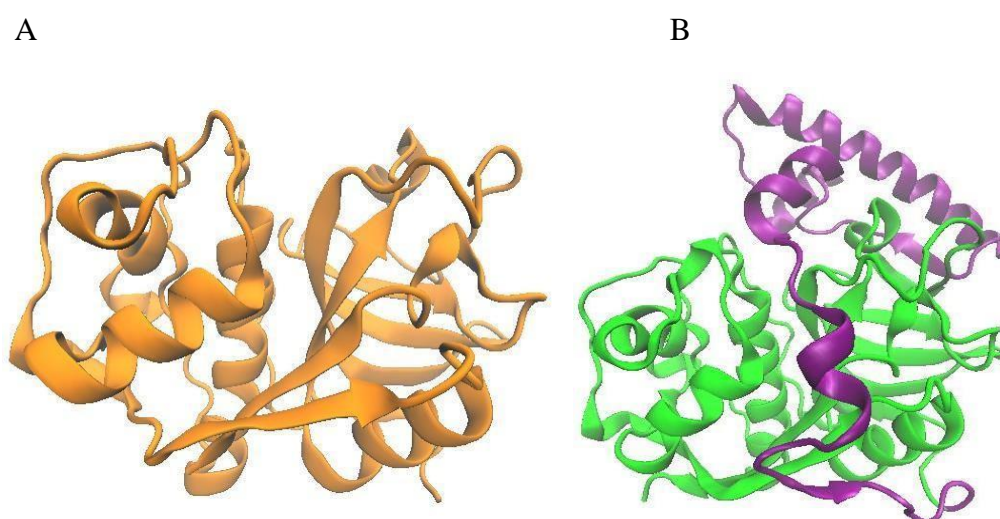


Figura 26. Estructura tridimensional en representación NewCartoon de **A)** dominio maduro FhT generado con el molde 2K24 y **B)** Pro-FhT generado con el molde 2O6X. Color morado representa la estructura del pro-dominio.

Para determinar la diferencia entre las dos estructuras del dominio maduro modelados, se realizó un alineamiento estructural considerando a los carbonos alfa como punto de comparación. El RMSD calculado por el alineamiento resultó en 0.91 Å, esto indica que en las dos estructuras modeladas gran porcentaje del arreglo estructural de cada átomo coinciden entre ellas. Además, en la figura 26 se aprecia que los tres aminoácidos del sitio activo presentan un arreglo estructural idéntico. Debido a ello, para los siguientes análisis solo se consideró la estructura generada con el molde 2O6X ya que presenta mayor porcentaje de identidad y cobertura la cual generó que las estructuras secundarias de Pro-FhT fueran mejor resueltas.

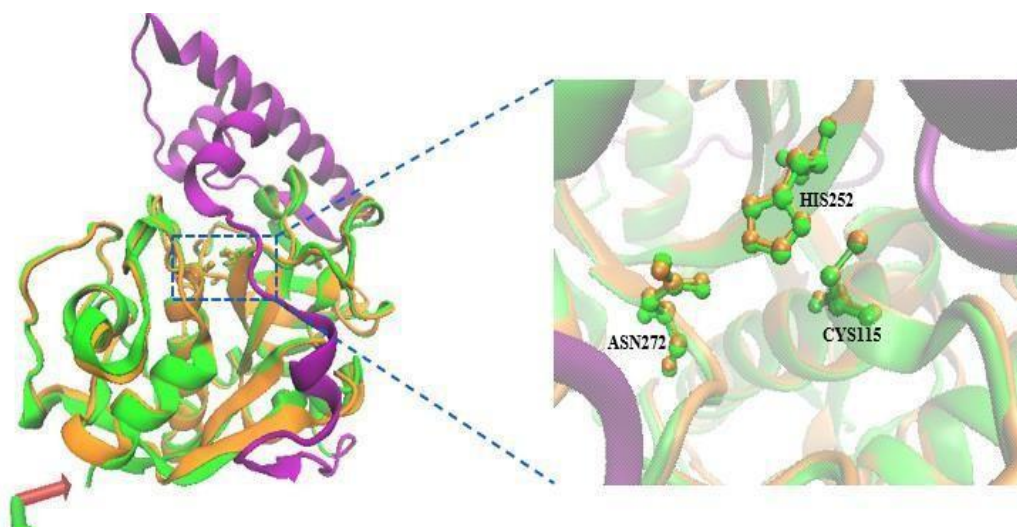


Figura 27. Alineamiento estructural de FhT generado con los moldes 3K24 (naranja) y 2O6X (Verde). El pro-péptido generado con el molde 2O6X está representado en color morado. En la derecha se muestra el arreglo estructural de los 3 aminoácidos del sitio activo (Asparagina 272, histidina 252 y cisteína en la posición 115).

4.4.2 Dinámica molecular de Pro-FhT y FhT

La estabilidad de la estructura generada fue determinada mediante dinámica molecular. Para ello, se realizó la minimización de energía tanto de la enzima inmadura (Pro-FhT) como madura (FhT) y se encontró que FhT requiere de muchos más pasos para obtener una estructura con menor energía potencial (Figura 27). Para simular la estabilidad proteica, el sistema fue equilibrado a 310.15 K y 4.5×10^{-5} bar-1 y tanto el zimógeno como la madura conservaron sus estructuras en dichas condiciones durante los 100 ps de simulación (Figura 28 A y B).

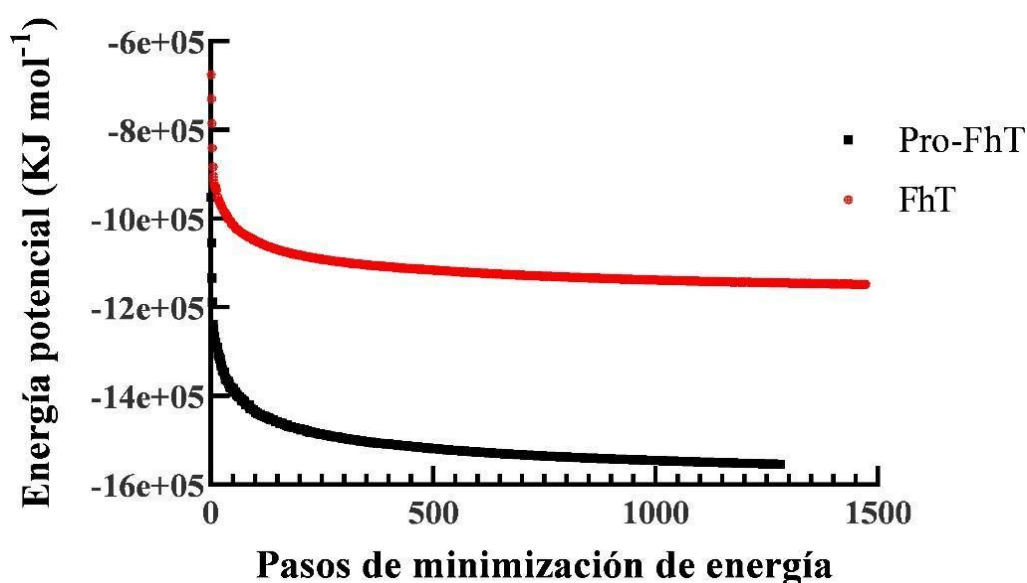


Figura 28. Minimización de energía de FhT (naranja) y Pro-FhT (negro) en un sistema de caja de agua con carga neta cero.

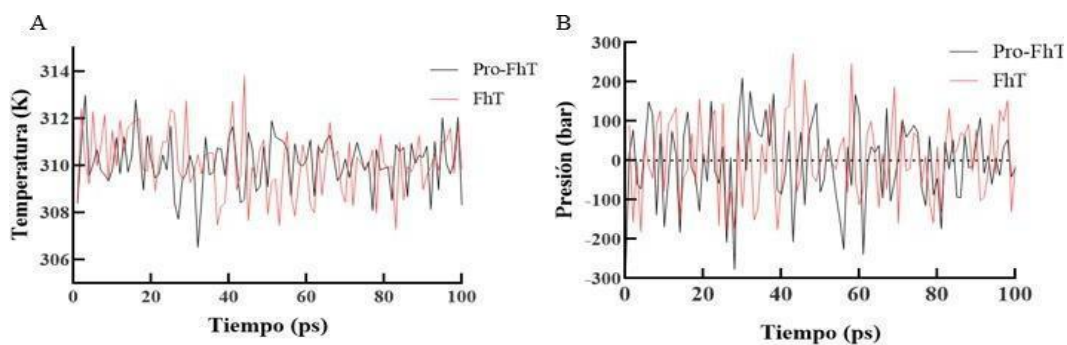


Figura 29. Equilibrio del sistema en **A)** temperatura constante de 310.15 K y **B)** presión constante 4.5×10^{-5} bar-1 de Pro-FhT (negro) y FhT (rojo).

Finalmente, se evaluó la estabilidad de la proteína en su estado maduro e inmaduro durante 20 ns en las condiciones establecidas anteriormente. En la figura 29 se muestra que ambos estados de la proteína se comportan de manera similar en el cual se estabilizan rápidamente a partir de los 1 ns de simulación. A partir de los 1 ns la variación estructural es menor a 0.1 nm lo que indica que la proteína es estable en el tiempo en las condiciones fisiológicas evaluadas.

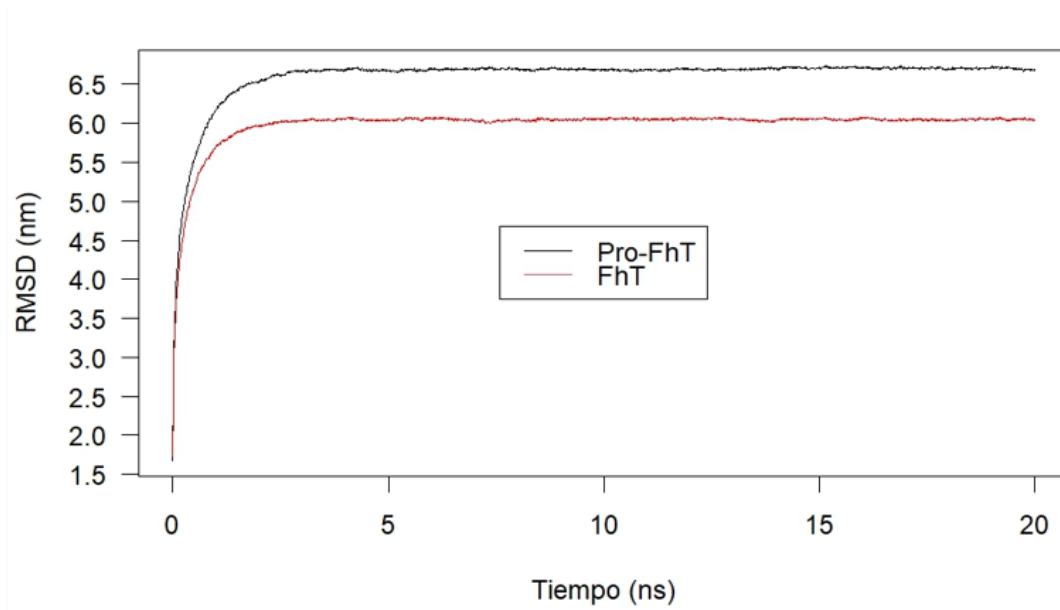


Figura 30. Dinámica molecular. Trayectoria de FhT (rojo) y Pro-FhT (Negro) durante 20 ns en una caja de agua neutra a 310 K.

4.4.3 “Docking” molecular

4.4.3.1 Interacción FhT – fibrina

Se evaluó el modelamiento de la interacción entre fibrina y FhT utilizando el programa ClusPro. El programa generó 120 modelos considerando la interacción balanceada, electrostática, hidrofóbica y Van der Waals. Del total del modelo generado, se filtraron 10 interacciones que presentaron las energías más bajas y que representan las interacciones más probables entre FhT y los sustratos. De los 10 modelos, se predice que 3 regiones de la fibrina son las más probables a ser reconocidos por FhT en este modelo (figura 15); además, los aminoácidos del sitio activo y los aminoácidos de la fibrina se encontraron a distancias menores que 1 nm, sugiriendo actividad proteolítica de FhT en dicha región (Figura 30) y cortando en la secuencia detalla en la tabla 2.

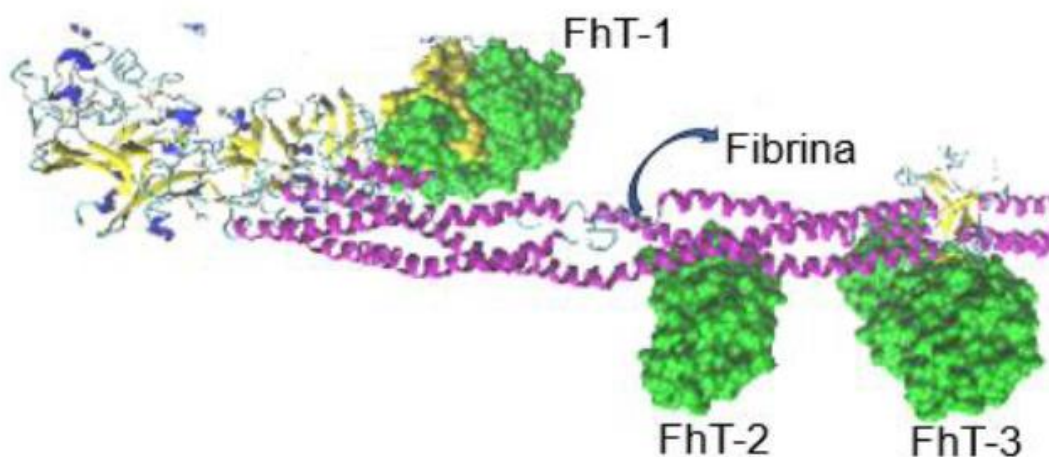


Figura 31. Interacción molecular de FhT (Surface - verde) y fibrina (newcartoon - morado) resuelta mediante el programa cluspro.

Tabla 2. Secuencia probable de los péptidos alfa, beta y gama a ser reconocidos por FhT.

| MODELO | SCORD | SECUENCIA |
|--------------|--------|------------------|
| FhT3 - gamma | -841.7 | TTC G IAN |
| FhT2- beta | -888.5 | TSS S SFG |
| FhT1- alfa | -882.4 | KNV R AQL |

Secuencia encontrada a partir de la interacción FhT – fibrina. El ‘scord’ es generado por el programa en línea ClusPro.

4.4.3.2 Interacción FhT con los polipéptidos alfa, beta y gama.

La interacción de FhT con los polipéptidos ($A\alpha$, $B\beta$, γ) usando el programa ClusPro generaron 90 modelos de los cuales 10 presentaron las interacciones con menor score de energía indicando mayor probabilidad de interacción. En caso del polipéptido $A\alpha$ y γ se encontró que tres regiones son reconocidas por la enzima FhT y además los aminoácidos del sitio activo se predicen ocupar posiciones a una distancia menor a 1 nm de los aminoácidos en esa región de la fibrina. En el caso del modelo con el polipéptido $B\beta$, se predicen dos regiones con mayor probabilidad de ser reconocidos por FhT (Figura 16A, B y C). En la tabla 3, 4 y 5 se detallan las secuencias probables a ser digeridos. Los aminoácidos en color celeste son los más probables a que sean cortados ya que la distancia es menos 1 nm con la cisteína del sitio activo.

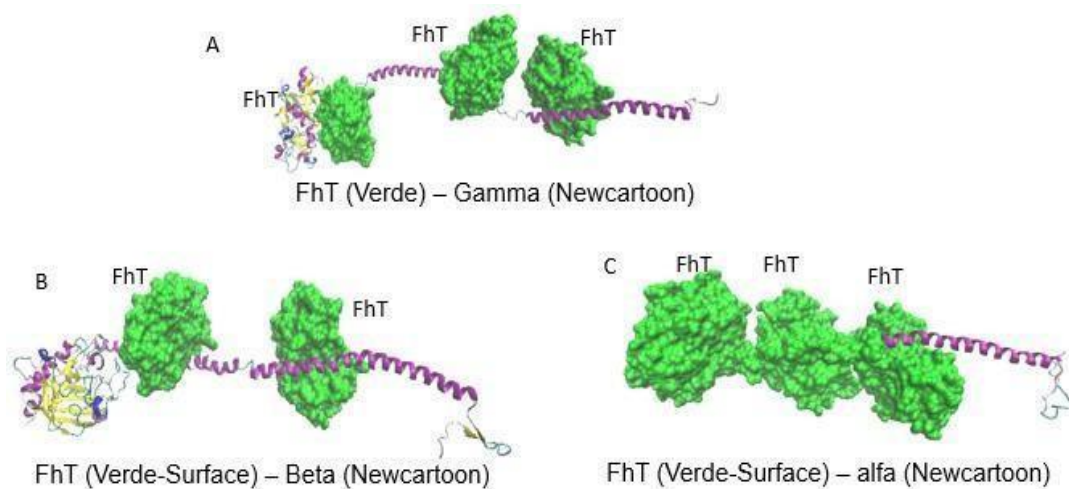


Figura 32. Interacción de FhT (Surface verde) con los péptidos de la fibrina **A)** Gamma, **B)** Beta y **C)** Alfa en representación Newcartton - morado. FhT interacciona con 3 regiones de la secuencia gamma y alfa. En caso de beta, interacciona en dos regiones.

Tabla 3. Secuencia probable del péptido alfa a ser reconocido por FhT.

| MODELO | SCORD | SECUENCIA |
|-------------|--------|-----------|
| FhT2 – alfa | -902.9 | NRVSEDL |
| FhT3- alfa | -914.8 | NKDSHSL |
| FhT1- alfa | -907.6 | IQLLQKN |

Secuencia encontrada a partir de la interacción FhT – alfa. El ‘scord’ es generado por el programa en línea ClusPro. FhT1, 2 y 3 representa la interacción de FhT de izquierda a derecha en la figura 31C. El aminoácido resaltado con celeste es el más probable a ser cortado por la cisteína del sitio activo de FhT.

Tabla 4. Secuencia probable del péptido beta a ser reconocido por FhT

| MODELO | SCORD | SECUENCIA |
|-------------|---------|-----------|
| FhT1 - beta | -895.7 | SSSFQYM |
| FhT2 - beta | -1095.5 | LAVLRSI |

Secuencia encontrada a partir de la interacción FhT – beta. El ‘scord’ es generado por el programa en línea ClusPro. FhT1 y 2 representa la interacción de FhT de izquierda a derecha en la figura 31B. El aminoácido resaltado con celeste es el más probable a ser cortado por la cisteína del sitio activo de FhT.

Tabla 5. Secuencia probable del péptido gama a ser reconocido por FhT.

| MODELO | SCORD | SECUENCIA |
|--------------|-------|-----------|
| FhT1 - Gamma | -857 | SEVKQLI |
| FhT2 – gamma | -956 | YASILTH |
| FhT3 – gamma | -874 | PCKNTVQ |

Secuencia encontrada a partir de la interacción FhT – gama. El ‘scord’ es generado por el programa en línea ClusPro. FhT1, 2 y 3 representa la interacción de FhT de izquierda a derecha en la figura 31A. El aminoácido resaltado con celeste es el más probable a ser cortado por la cisteína del sitio activo de FhT.

V DISCUSIÓN

En el presente trabajo se logró clonar y expresar una enzima con actividad trombolítica rFhT en la levadura *P. pastoris*. El agente trombolítico se expresó en su forma zimógena rPro-FhT y se logró convertir el zimógeno en su forma activa rFhT mediante tratamiento con agentes reductores a pH ácido. La proteína rFhT muestra actividad proteolítica con sustrato de alto peso molecular como caseína y con sustratos peptídicos como Z-Phe-Arg-pNA, sustrato típico para determinar la actividad proteolítica en cisteína proteinasas. La expresión y conversión de rFhT en su forma proteolítica activa sugiere que se requiere el procesamiento durante el transporte de rPro-FhT a través del retículo endoplasmático y aparato de Golgi para adquirir la conformación y probables modificaciones post-traducción que permitan la activación de la enzima *in vitro*. Condiciones que no se pudo proveer al agente trombolítico producida en otros sistemas de expresión como *E. coli* y *S. cerevisiae* (Figura 9,10) [40].

Pro-FhT fue producido de manera recombinante en un sistema de expresión eucariota. Se tuvo dos estrategias de expresión: Intracelular y secretada. En caso de la expresión intracelular, la secuencia fue clonada en *S. cerevisiae* y la purificación de esta se realizó mediante lisis celular. La enzima rPro-FhT expresada no pudo ser activada y presentar actividad enzimática en este sistema; a partir de ello se sugirió el uso de vectores que contengan señales de secreción para que, durante la síntesis, el paso por el retículo endoplasmático y aparato de Golgi pueden ser importantes para el correcto plegamiento de la proteína con las modificaciones pos traduccionales suficientes para que la enzima pueda activarse en su forma madura

y presentar actividad enzimática. Para la estrategia de expresión secretada se optó por expresar la proteína en *P. pastoris*, en primer lugar, la secuencia del zimógeno FhT (Pro-FhT) fue clonado en el vector de expresión pPICZαC y posteriormente transformado en la cepa de *P. pastoris* X-33. Este vector se caracteriza por tener el péptido señal alfa factor la cual dirige la síntesis de la proteína hacia el retículo endoplasmático y aparato de Golgi con posterior secreción de la recombinante al medio extracelular. El sistema permite generar el correcto plegamiento de la proteína con las modificaciones post traduccionales suficientes, además el paso por el retículo endoplasmático ayuda a que los puentes disulfuros sean correctamente formados ya que FhT presenta un 2.2 % de la cantidad de cisteína lo cual indica que la formación de enlaces disulfuros son muy importantes para el plegamiento correcto de la enzima [41- 43]. La expresión de rPro-FhT de manera secretada fue evidenciada a partir de las 12 horas de fermentación; sin embargo, se estableció la expresión por 72 horas a 30 °C ya que se estima una mejor producción donde la fase estacionaria de crecimiento no es afectada ya sea por la producción de la enzima recombinante o la disminución de los nutrientes, cabe mencionar que el manual menciona una fermentación hasta las 96 horas. La expresión secretada de rPro- FhT en el medio de cultivo permitió purificar la proteína con alta pureza ya que existen pocas proteínas secretadas propias de *P. pastoris* X-33; además, rPro-FhT tiene una etiqueta de 6 histidinas que se utilizan para la purificación por cromatografía de afinidad en una columna de Ni-NTA agarosa. El rendimiento obtenido en el sistema de expresión X-33 fue de 20 mg/L en 72 horas de fermentación. Mientras que el rendimiento de purificación para la nativa es de 1.75 mg de proteína por cada lote de purificación [51].

La proteína rPro-FhT fue expresada de manera zimógena con un tamaño de 38 kDa similar al tamaño de las enzimas similares reportadas (Figura 20B). Las familias de catepsinas en su forma zimógena tienen un tamaño alrededor de 37 kDa, incluso FhT nativo. En nuestro caso esperamos 38 kDa ya que existe una secuencia propia del vector entre la secuencia señal y el aminoácido inicial de Pro-FhT. El pro péptido funciona como inhibidor de la enzima y previene la autocatálisis durante su producción. Para evaluar la actividad de FhT, en primer lugar, se activó la rPro-FhT con el agente reductor DTT a pH 5. Se encontró que, a las 4 horas, FhT se activó completamente ya que solo se observa la banda de 25 kDa lo que indica la liberación de la región pro-péptido y no la banda de 38 kDa. A las 8 horas de activación, la actividad proteolítica usando azocaseína fue máxima y se observaron similares valores de degradación de azocaseína a las obtenidas con FhT nativa. Los resultados difieren con el estudio de Smooker et al., en el cual determina la activación por 30 minutos a pH 5 con 1 mM de DTT [25], las diferencias pueden deberse a los diferentes sistemas de expresión usado, en su caso *S. cerevisiae*. Es interesante anotar que la mayoría de las catepsinas recombinantes producidas presentan activación en el rango de tiempo de incubación entre 2 a 10 horas; pero estas se basan en la activación observando únicamente el corte del pro péptido en SDS-PAGE [45,46]; Sin embargo, en este estudio además de la evidencia de activación en el cambio de las de 38 kDa a 25kDa en SDS-PAGE, se determinó actividad enzimática en función del tiempo de incubación para la activación. Por ello, puso en evidencia que rPro-FhT requiere una incubación para lograr la máxima activación de 8 horas, pH 5 con 10 mM DTT.

Se evaluaron los parámetros cinéticos de rFhT y FhT usando el sustrato específico Z-Phe-Arg-pNA. Los resultados de K_m y V_{max} fueron similares para ambas formas de la enzima, indicando que tienen un comportamiento cinético similar sobre el sustrato Z-Phe-Arg-pNA: rFhT con K_m de $1.79 \times 10^{-3} \mu\text{moles}/\text{min}$ y V_{max} de $76.67 \mu\text{M}$, mientras que el K_m de FhT fue de $94.14 \mu\text{M}$ y la velocidad máxima $1.15 \times 10^{-3} \mu\text{moles}/\text{min}$. Se evidencia una ligera diferencia en el perfil de la actividad en función del pH observándose mayor actividad de rFhT a pH 5, mientras que FhT muestra mayor actividad a pH 5.5. rFhT mantiene actividad proteolítica en el rango de pH fisiológico \sim pH 7, mientras que FhT muestra una mayor pérdida en la actividad proteolítica.

De manera general, rFhT presenta perfil de pH característico de las catepsinas L con mayor actividad entre pH 5 y 5.5 [47,48]. Norbury y colaboradores evaluaron los parámetros cinéticos de la enzima y encontraron una mejor afinidad sobre el sustrato (K_m 24.81), cabe mencionar que usaron el sustrato fluorescente Z-Phe-Arg-AMC, en este estudio se usó el correspondiente sustrato cromógeno [47,48]. rFhT es una cisteína proteinasa por ende es inhibida completamente por E-64, que es un inhibidor característico de esta familia de las catepsinas y no mostró efecto de inhibición significativo con los otros inhibidores ensayados específicos para otros tipos de proteinasas [49,50]. De manera general, el patrón de inhibición sugiere la similitud estructural entre la nativa y recombinante con ligeras variaciones que lo demuestran las inhibiciones con PMSF y antitripsina.

La actividad fibrinolítica de rFhT y FhT fue evaluada en coágulos de sangre total y de plasma. En ambos casos, la degradación del coágulo a 48 horas es completa; además, la evaluación de la fibrinólisis a partir de coágulos de plasma indicó que hay una digestión completa de la fibrina y de los péptidos como alfa, beta y gama (figura 29). Estos resultados concuerdan con la aproximación realizada mediante el estudio bioinformática. En caso de la plasmina, la evaluación por otros grupos concluye que degrada los coágulos de fibrina, pero solo libera los péptidos alfa, beta y gamma [32]. Se reportó otras catepsinas tipo K, L y S de humanos con capacidad fibrinolítica, además de las enzimas de *Bacillus subtilis*; todas estas enzimas al igual que la plasmina liberan los péptidos que conforman la fibrina, pero no los degradan completamente [32,48,49].

La estructura tridimensional de FhT fue modelada utilizando dos moldes, 3K24 y 2O6X. Ambas estructuras terciarias fueron obtenidas mediante difracción de rayos X con una resolución menor a 2.5 Å. 3K24 es una catepsina humana y a pesar de que el alineamiento de secuencias resultó en 51.87% de similitud, se evidenció que las regiones del sitio activo y de los subsitios presentaron un gran porcentaje de identidad (Figura 9). Se usó como primer molde esta enzima ya que su estructura cristalizada fue resuelta utilizando un sustrato; quiere decir que el arreglo tridimensional de los 3 aminoácidos y de los subsitios fueron acomodados de forma específica de tal manera que usarlo como molde podría generar un mejor arreglo tridimensional del sitio activo de FhT. Los indicadores del modelamiento presentaron un QMEAN de 0.86 y una cobertura de 68% mostrando que la estructura del sitio activo de FhT fue bien resuelta ya que los aminoácidos

coinciden con el molde, pero gran porcentaje de las regiones de FhT incluyendo los subsitios no presentaron coincidencias de aminoácidos y por ende las estructuras secundarias no fueron eficientemente resueltas.

A diferencia del molde 3K24, 2O6X permitió modelar la estructura del pro péptido y del dominio maduro. 2O6X al ser una catepsina homóloga a FhT con un porcentaje de identidad de 80 %, generó una estructura con QMEAN de 0.92 y 97% de cobertura. Estos parámetros indican que las estructuras secundarias del zimógeno fueron bien resueltas tanto del pro péptido como del dominio maduro en el que incluye el sitio activo y los subsitios. Finalmente se realizó un alineamiento estructural para determinar la variación en el arreglo estructural de los tres aminoácidos del sitio activo. El alineamiento realizado con el programa VMD resultó en 0.91 Å indicando que no hay variación estructural entre las dos proteínas. Los siguientes análisis fueron realizados usando la estructura generada con el molde 2O6X, a diferencia de Huang Yong en el que usa la estructura de FhT generada con 3K24 ya que considera un mejor arreglo de los aminoácidos del sitio activo [23].

La estabilidad de la estructura de FhT en su forma zimógena y madura fue evaluada y se encontró que Pro-FhT requiere de mucha más fuerza para obtener un mejor arreglo estructural o menor energía potencial, esto debido a la presencia del pro péptido que al interactuar con el sitio activo necesita una mayor fuerza para acomodar la interacción entre ambas. En el caso de FhT maduro, la energía potencial para el mejor arreglo estructural es mayor que el zimógeno, pero necesita

de muchos más pasos para encontrar el mejor arreglo ya que en este caso es probable que los aminoácidos del sitio activo y de los subsitios presentan mayor libertad de movimiento. Con las estructuras en su mínima energía, se evaluó el comportamiento estructural a 37 °C y 4.5×10^{-5} bar⁻¹. En ambos casos se evidencia que, a los 100 picosegundos de simulación, las estructuras tienden a estabilizarse indicando que la enzima es estable.

De acuerdo con la simulación por dinámica molecular, FhT es estable tanto en su forma zimógeno como también en su forma madura, sin variación entre ella (figura 29). Huang Yong también evaluó la estabilidad de FhT mediante dinámica molecular en las mismas condiciones y encontró que a los 10000 ns el promedio de variación de RMSD fue de 0.02. Este dato sería el indicador de la estabilidad estructural durante el tiempo en las condiciones enzimáticas *in vitro* que se evaluaron. A partir de ello, la estructura de FhT con menor energía potencial fue evaluada para su interacción con los sustratos de fibrinógeno, fibrina y sus péptidos mediante 'Docking' molecular.

La menor energía de interacción entre FhT y los sustratos predice que la enzima interactúa en tres regiones con la fibrina, péptido gamma y alfa; mientras que con beta solo presenta 2 regiones de interacción. Se postula que estas regiones son cortadas por FhT teniendo como productos péptidos pequeños que a diferencia de la plasmina que libera dímeros D. Se caracterizó las secuencias probables a ser cortadas y para las interacciones con la fibrina y sus péptidos, FhT interacciona con arginina, glicina, serina, lisina, isoleucina, asparagina, fenilalanina y leucina. De

acuerdo con las secuencias mencionadas, FhT no presenta preferencia por algunas características fisicoquímicas de las secuencias ya que tenemos aminoácidos neutros, con carga positiva y negativa; sin embargo, es importante evaluar la carga neta del grupo de aminoácidos presentados en la tabla 3, 4 y 5. Cabe mencionar que FhT presenta unos subsitios que también contribuyen a la afinidad por su sustrato.

VI CONCLUSIONES

El agente fibrinolítico rPro-FhT en su forma zimógeno fue expresado en *Pichia pastoris* de forma secretada con un rendimiento de 20 mg/L en 72 horas de fermentación a 30 °C.

El zimógeno rPro-FhT de 38 kDa fue convertido a su forma activa rFhT por incubación en 0.2M citrato pH 5 con 10 mM DTT, 1 mM EDTA por 8 horas a 37 °C.

rFhT mostró actividad proteolítica con azocaseína y con el péptido Z-Phe-Arg-pNA con los cuales se estimaron los parámetros cinéticos de V_{max} y K_m de 1.79×10^{-3} $\mu\text{moles}/\text{min}$ y 76.67 μM respectivamente.

Tanto rFhT y FhT presentaron patrones similares de fibrinólisis en sangre total y en coágulos de fibrina. Esta enzima disuelve completamente los coágulos de fibrina y no se observa las bandas correspondientes a los péptidos alfa, beta y gamma a las 48 horas de incubación en electroforesis de geles de poliacrilamida.

Se logró modelar la estructura de FhT sobre las estructuras terciarias 3K24 y 2O6X que permitió predecir regiones de interacción de FhT con el fibrinógeno y la fibrina donde ocurriría probablemente la actividad proteolítica.

VII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kattula S, Byrnes JR, Wolberg AS. Fibrinogen and Fibrin in Hemostasis and Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017;37(3):13–21.
2. Akhtar T, Hoq MM, Mazid MA. Bacterial proteases as thrombolytics and fibrinolytics. *Dhaka Univ J Pharm Sci.* 2017;16(2):255–69. 7
3. Shapiro S. Treating Thrombosis in the 21st Century. *N Engl J Med.* 2003;349(18):1762–4.
4. Ali M, Salim Hossain M, Islam MA, Saiful Islam Arman M, Sarwar Raju G, Dasgupta P, et al. Aspect of thrombolytic therapy: A review. *Sci World J.* 2014;2014(1).
5. Yakovlev S, Makogonenko E, Kurochkina N, Nieuwenhuizen W, Ingham K, Medved L. Conversion of fibrinogen to fibrin: Mechanism of exposure of tPA- and plasminogen-binding sites. *Biochemistry.* 2000;39(51):15730–41.
6. Cesarman-Maus G, Hajjar A. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol.* 2005;129(3):307–21.
7. Undas A, Celinska-Löwenhoff M, Löwenhoff T, Szczeklik A. Statins, fenofibrate, and quinapril increase clot permeability and enhance fibrinolysis in patients with coronary artery disease. *J Tissue Eng Regen Med.* 2006;4(5):1029–36.
8. Lippi G, Mattiuzzi C, Favaloro E. Novel and emerging therapies: Thrombus-targeted fibrinolysis. *Semin Thromb Hemost.* 2013;39(1):48–58.
9. Adivitiya, Khasa Y. The evolution of recombinant thrombolytics: Current status and future directions. *Bioengineered.* 2017;8(4):331–58.

10. Verstraete M. Third-generation thrombolytic drugs. *Am J Med.* 2000;109(1):52–8.
11. Delgado S. Determinación de la actividad fibrinolítica de la cisteína protease FhT [Tesis de Licenciatura]. [Lima]: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2001.
12. Verma S, Dixit R, Pandey K. Cysteine proteases: Modes of activation and future prospects as pharmacological targets. *Front Pharmacol.* 2016;7(APR):1– 12.
13. Beckman G, Hooper C, Critchley E, Ortel T. Venous Thromboembolism. A Public Health Concern. *Am J Prev Med.* 2010;38(4 SUPPL).
14. Cushman M. Epidemiology and Risk Factors for Venous Thrombosis. *Semin Hematol.* 2007;44(2):62–9.
15. Deitcher S, Jaff M. Pharmacologic and clinical characteristics of thrombolytic agent. *Med Exp Salud pública.* 2002;3(Mi):25–33.
16. American Heart Association. 2002 Heart and Stroke Statistical Update. Dallas, TX: American Heart Association, 2001.
17. Tennent G, Brennan S, Stangou A, O’Grady J, Hawkins P, Pepys M. Human plasma fibrinogen is synthesized in the liver. *Blood.* 2007;109(5):1971– 4.
18. Forman W, Barnhart M. Cellular site for fibrinogen synthesis. *MA-Mead Johnson.* 1963;168–72.
19. Parry DAD, Squire J. Fibrin Formation, Structure and Properties. Vol. 82, *Subcellular Biochemistry.* 2017. 405–456 p.
20. Yakovlev S, Makogonenko E, Kurochkina N, Nieuwenhuizen W, Ingham K, Medved L. Conversion of fibrinogen to fibrin: Mechanism of exposure of tPA-

- and plasminogen-binding sites. *Biochemistry*. 2000;39(51):15730–41.
21. Weisel J, Litvinov R. Mechanisms of fibrin polymerization and clinical implications. *Blood*. 2013;121(10):1712–9.
 22. Elsässer B, Zauner F, Messner J, Soh WT, Dall E, Brandstetter H. Distinct Roles of Catalytic Cysteine and Histidine in the Protease and Ligase Mechanisms of Human Legumain As Revealed by DFT-Based QM/MM Simulations. *ACS Catal*. 2017;7(9):5585–93.
 23. Yap H. Function and molecular interactions of the *Fasciola hepatica* cathepsin L5 protease. *Sch Sci*. 2018.
 24. Chowdhury S, Joseph L, Kumar S, Tulsidas S, Bhat S, Ziomek E, et al. Exploring Inhibitor Binding at the S' Subsites of Cathepsin L. *Am Chem Soc*. 2008;1361–8.
 25. Smooker P, Whisstock J, Irving J, Siyaguna S, Spithill T, Pike R. A single amino acid substitution affects substrate specificity in cysteine proteinases from *Fasciola hepatica*. *Protein Sci*. 2000;9(12):2567–72.
 26. Harper E, Berger A. On the size of the active site in proteases: Pronase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1972;46(5):1956–60.
 27. Wendelboe A, Raskob G. Global Burden of Thrombosis: Epidemiologic Aspects. *Circ Res*. 2016;118(9):1340–7.
 28. Limberth Machado Villarroel 1 Diamanti Abraham Dimakis Ramírez. Enfoque diagnóstico de la tromboembolia pulmonar. *Acta Médica Grup Ángeles*. 2017;15(1):36–46.

29. Van Korlaar I, Vossen C, Rosendaal F, Bovill E, Cushman M, Naud S, et al. The impact of venous thrombosis on quality of life. *Thromb Res.* 2004;114(1):11–8.
30. Chamorro, Martínez; Ostolaza R. Tromboembolismo pulmonar en pacientes con COVID-19: estudio de prevalencia en un hospital terciario. *Diabetes Metab Syndr.* 2020;14(4)(January):337–9.
31. Ouriel K. Safety and Efficacy of the Various Thrombolytic Agents. *Cardiovasc Med.* 2002;3:17–24.
32. Douglas, Simeone; Lamothe, Sarah; Singleton T. Human cathepsins K, L, and S: related proteases, but unique fibrinolytic activity. *Physiol Behav.* 2019;176(3):139–48.
33. Mebius M, Op Heij J, Tielens A, de Groot P, Urbanus R, van Hellemond J. Fibrinogen and fibrin are novel substrates for *Fasciola hepatica* cathepsin L peptidases. *Mol Biochem Parasitol.* 2018;221(February):10–3.
34. Ryšlavá H, Doubnerová V, Kavan D, Vaněk O. Effect of posttranslational modifications on enzyme function and assembly. *J Proteomics.* 2013;92:80– 109.
35. Adams-Cioaba, M, Krupa, J, Xu, C, Mort, J, & Min, J. Structural basis for the recognition and cleavage of histone H3 by cathepsin L. *Nature Communications.* 2011;2(1).
36. Stack, C, Caffrey, C, Donnelly, S, Seshadri, A, Lowther, J, Tort, J, Dalton, J. Structural and Functional Relationships in the Virulence-associated Cathepsin L Proteases of the Parasitic Liver Fluke, *Fasciola hepatica*. *Journal of Biological Chemistry.* 2007; 283(15), 9896–9908.

37. Kozakov, D., Hall, D., Xia, B., Porter, K. A., Padhorny, D., Yueh, C., Vajda, S. The ClusPro web server for protein–protein docking. *Nature Protocols*. 2017; 12(2), 255–278.
38. Desta, Israel T.; Porter, Kathryn A.; Xia, Bing; Kozakov, Dima; Vajda, Sandor. Performance and Its Limits in Rigid Body Protein-Protein Docking. *Structure*. 2020.
39. Kozakov, D., Beglov, D., Bohnuud, T., Mottarella, S. E., Xia, B., Hall, D. R., & Vajda, S. How good is automated protein docking? *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2017; 81(12), 2159–2166.
40. Buiza Y. Expresión, purificación y actividad enzimática de la proteína recombinante Catepsina L5 de *Fasciola hepatica* (rCatL5Fh) obtenida en un sistema de expresión procariota (*E. coli* BL21). [Tesis licenciatura]. Lima, Universidad Peruana Cayetano Heredia, 2021.
41. Feige, M., & Hendershot, L. Disulfide bonds in ER protein folding and homeostasis. *Current Opinion in Cell Biology*. 2011; 23(2), 167–175.
42. Hayato N., Mai K. et al. Cysteine-based protein folding modulators for trapping intermediates and misfolded forms. *RSC Advances*. 21 sept 2022.
43. Müller, M. Post-Translational Modifications of Protein Backbones: Unique Functions, Mechanisms, and Challenges. *Biochemistry*. 2017; 57(2), 177–185
44. McQueney, M, Amegadzie,, D’Alessio, K., Hanning, C, McLaughlin, M, McNulty, D, Jones, C. Autocatalytic Activation of Human Cathepsin K. *Journal of Biological Chemistry*. 1997; 272(21), 13955– 13960.

45. Kolli, N., & Garman, S. Proteolytic Activation of Human Cathepsin A. *Journal of Biological Chemistry*.2014; 289(17), 11592–11600.
46. Shah, P., Myers, M., Beavers, M., Purvis, J., Jing, H., Grieser, H. J., Diamond, S. Kinetic Characterization and Molecular Docking of a Novel, Potent, and Selective Slow-Binding Inhibitor of Human Cathepsin L. *Molecular Pharmacology*.2008; 74(1), 34–41.
47. Lowther, J., Robinson, M., Donnelly, S., Xu, W., Stack, C., Matthews, J. M., & Dalton, J. The Importance of pH in Regulating the Function of the *Fasciola hepatica* Cathepsin L1 Cysteine Protease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*.2009; 3(1).
48. Norbury, L, Hung, A., Beckham, S., Pike, R., Spithill, T., Craik, C. S., Smooker, P. Analysis of *Fasciola* cathepsin L5 by S2 subsite substitutions and determination of the P1–P4 specificity reveals an unusual preference. *Biochimie*, 2012;94(5), 1119–1127.
49. Matsumoto, K., Mizoue, K., Kitamura, K., Tse, W, Huber, C., & Ishida, T. Structural basis of inhibition of cysteine proteases by E-64 and its derivatives. *Biopolymers*.1999; 51(1), 99–107.
50. Matsumoto, K., Mizoue, K., Kitamura, K., Tse, W., Huber, C. & Ishida, T. Structural basis of inhibition of cysteine proteases by E-64 and its derivatives. *Biopolymers*.1999; 51(1), 99–107.
51. Pereda M. Modelo de trombosis en la cola de ratón inducido por k-carragenano para el estudio del agente fibrinolítico FhT *in vivo* [Tesis de licenciatura]. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2023.