

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO



**Escuela Superior de Apan**

**TESIS DE LICENCIATURA**

Caracterización bioquímica y estructural de variantes del dominio catalítico de  
MMP16 humana como base para la identificación de inhibidores selectivos

**Para obtener el título de**

Licenciada en Ingeniería en Biociencias

**PRESENTA**

María Fernanda Gutiérrez Ramírez

**Director de tesis.**

Dr. Armando Cruz Rangel

**Codirector de tesis**

Dr. Martin Peralta Gil

Julio, 2026

### **Lugar donde se realizó la tesis**

Este trabajo se realizó en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), en el Laboratorio de Bioquímica de Enfermedades Crónicas, con la asesoría del Dr. Armando Cruz Rangel.



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo  
Escuela Superior de Apan  
Campus Apan

Número de control: ESAP-Bio-034-2026  
Asunto: Autorización de impresión de tesis

**María Fernanda Gutiérrez Ramírez P.D.L.I.B.C.**  
**PRESENTE**

Por este medio le comunico que, el jurado asignado a la pasante de la licenciatura en Ingeniería en Biociencias, **María Fernanda Gutiérrez Ramírez (298531)**, a quien le presentó el trabajo para su titulación en la modalidad de tesis con el título **“Caracterización bioquímica y estructural de variantes del dominio catalítico de MMP16 humana como base para la identificación de inhibidores selectivos”**, después de la revisión, ha autorizado la impresión.

A continuación, se presentan las firmas de conformidad de los miembros de este jurado:

PRESIDENTE: Dr. Martín Peralta Gil

SECRETARIO: Dr. Armando Cruz Rangel

PRIMER VOCAL: Dr. Víctor Hugo Pérez España

SEGUNDO VOCAL: Dra. María Magdalena Armendáriz Ontiveros

TERCER VOCAL: Dr. Jaime Alioscha Cuervo Parra

SUPLENTE 1: Dra. Teresa Romero Cortes

SUPLENTE 2: Dra. Lis Tamayo Rivera

ATENTAMENTE  
“Amor, Orden y Progreso”  
Chimalpa, Apan, Hgo., México a 16 de junio de 2026.

Dra. María Magdalena Armendáriz Ontiveros  
Coordinador de Ingeniería en Biociencias



“Amor, Orden y Progreso”



Carretera Apan - Calpulapan Km. 8, Colonia Chimalpa  
Tlalayote, Apan, Hidalgo, México C.P. 43000  
Teléfono: 7717172000 Ext. 50900  
esap@uaeh.edu.mx

uaeh.edu.mx



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo  
Escuela Superior de Apan  
Campus Apan

**Asunto:** Líder del laboratorio donde se desarrolló el proyecto de investigación.

**A quien corresponda  
P R E S E N T E**

Por medio de la presente, se hace constar la valiosa contribución del **Dr. Juan Pablo Reyes Grajeda**, investigador titular del Laboratorio de Estructura de Proteínas Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), en el desarrollo del proyecto de investigación titulado **"Caracterización bioquímica y estructural de variantes del dominio catalítico de MMP16 humana como base para la identificación de inhibidores selectivos"**, realizado por la estudiante **María Fernanda Gutiérrez Ramírez** como requisito para obtener el grado de **Licenciada en Ingeniería en Biociencias** por la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

La participación del Dr. Reyes Grajeda fue fundamental para la ejecución del proyecto, al haber concebido la propuesta científica que dio origen a esta investigación dentro de las líneas de trabajo de su grupo de investigación. En su calidad de responsable del laboratorio en el que se desarrolló el proyecto, proporcionó acceso a la infraestructura especializada, al equipamiento y a los recursos necesarios para la realización de los experimentos. Asimismo, su asesoría científica permitió fortalecer la planeación experimental, el análisis de resultados y la interpretación de los hallazgos.

Gracias a su colaboración, fue posible garantizar el rigor metodológico, la calidad de los datos generados y la solidez científica del trabajo, lo que contribuyó de manera significativa al cumplimiento de los objetivos planteados y a la formación académica de la estudiante.

Se extiende la presente para los fines académicos y administrativos que al interesado convengan.

**ATENTAMENTE**

AMOR, ORDEN Y PROGRESO  
Apan, Hidalgo; 17 de junio de 2026

  
**M.C.E. Enrique Espinosa Aquino**  
Director de la Escuela Superior de Apan



"Amor, Orden y Progreso"



Carretera Apan - Calpulapan Km. 8, Colonia Chimalpa  
Tlalayote, Apan, Hidalgo, México C.P. 43000  
Teléfono: 7717172000 Ext. 50900  
esap@uaeh.edu.mx

uaeh.edu.mx

## DEDICATORIA

Este proyecto se lo dedico principalmente a mi familia.

A mi mami, Bertha, por ser el corazón de mi familia, gracias por amarme, cuidarme y ser un ejemplo de fortaleza, gracias por ser mi mamá y la mejor abuelita, no lo hubiéramos logrado sin ti, eres el pilar fundamental de mi vida. Este logro lleva una parte de todo tu esfuerzo y de tu amor.

A mi papi, Víctor, por impulsarme a crecer, confiar en mí y enseñarme a no rendirme y seguir mis sueños, gracias por enseñarnos a trabajar y por tus consejos siempre. Hoy puedo decir con orgullo que una parte de este logro te pertenece, porque siempre has sido uno de mis mayores motivos para seguir adelante.

A mi hermana, por ser mi compañera de vida y mi persona, porque tú hiciste de mi infancia, la mejor, gracias por demostrarme que las cosas se afrontan de la mejor manera siempre, por compartir conmigo alegrías y desafíos gracias por los consejos de mamá, es un orgullo poder maternar juntas. A mi sobrino, a mi pequeño Carlitos, llegaste a cambiarme la vida y darle ese toque de felicidad que le hacía falta, gracias por recordarme la emoción y alegría de conocer algo nuevo e impresionarme siempre por lo maravilloso que es vivir, lo divertido que es aprender y por el corazón tan lindo que tienes, siempre tendrás a una tía que te escuchará, te aconsejará, acompañará y amará incondicionalmente.

A mamá Adelita, por ser mi mayor ejemplo de amor, perseverancia y generosidad, gracias abuelita por cuidarnos tanto, te extraño todos los días.

Gracias familia por tanto amor, por sus enseñanzas y por ser parte fundamental de quien soy y hasta donde he llegado, con todo mi amor y gratitud, les dedico este trabajo, porque cada logro en mi vida tiene una parte de ustedes y son la razón por la que nunca dejé de creer.

A mi esposo, Cris, que bendición haberte conocido mi amor, gracias por caminar a mi lado con amor, paciencia y apoyo incondicional en cada etapa de este sueño. Gracias por ser mi lugar seguro, creer en mí, por crecer conmigo, por animarme, ser mi calma en los momentos difíciles y celebrar conmigo cada logro. Tu compañía y

amor ha sido fundamental para alcanzar esta meta. Te amo profundamente, para siempre.

Y de manera muy especial, a mi bebé, a mi pequeño Elías, al amorcito de mi vida, gracias por llenar mi vida de esperanza y amor incondicional. Eres mi mayor motivación para seguir creciendo y tratar de siempre mejorar y luchar para que tengas mi mejor versión cada día; llegaste en el momento menos esperado, pero el más oportuno, llegaste en el momento perfecto para cambiarnos nuestras vidas. Gracias por enseñarme tanto cada día, estoy asombrada de lo rápido que creces y aprendes, cómo miras con admiración todo, tu forma de aprender tan rápido, tu alegría y amor que transmites a todos, eres el más hermoso corazón, gracias mi niño. Tu sonrisa ilumina todos mis días, incluso los más difíciles y tu amor me dio la fuerza para continuar cuando parecía imposible. Todo lo que hago y todo lo que sueño lleva implícito el deseo de ser un ejemplo para ti y enseñarte que, con dedicación, perseverancia y amor, no existen metas inalcanzables. Todo esto también es para ti y por ti.

Y a mí misma, por no rendirme, por seguir adelante a pesar del miedo, por confiar y creer en mí, por siempre dar lo mejor de mí. Por cada noche de desvelo, por los sacrificios realizados y por la perseverancia que me permitió seguir adelante incluso en los momentos de mayor incertidumbre.

Hoy celebro este logro con orgullo, porque representa años de esfuerzo, aprendizaje y crecimiento. Que este sea un recordatorio permanente de que soy capaz de alcanzar todo aquello que me proponga y de que los sueños, cuando se persiguen con amor y determinación, siempre encuentran el camino para hacerse realidad. Me abrazo con orgullo y gratitud por llegar hasta aquí.

Gracias Dios por las personas maravillosas que has puesto en mi vida, por las bendiciones recibidas y las enseñanzas en todo este camino, gracias por permitirme culminar este sueño. A ti sea la honra y la gloria por este logro.

Gracias Dios por todo tu amor.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco profundamente a mis padres por confiar en mí y motivarme a seguir superándome cada día.

A mis profesores, por compartir sus conocimientos, cuestionarme y enseñarme a ver el mundo desde nuevas perspectivas, fundamentales para mi formación, gracias por cada clase que hacían que me enamorara de mi carrera y de aprender más cada día, que nos enseñaron más de lo que podía entender en su momento, por retarnos, cuestionarnos y compartir todos sus conocimientos con nosotros.

Al Dr. Juan Pablo Reyes, por brindarnos la oportunidad de realizar nuestra tesis en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), por su tiempo y apoyo siempre, gracias por contestar nuestros correos y permitirnos cumplir un sueño y una meta al poder estar en el instituto, por toda su experiencia y conocimientos que nos compartió, por el amor y dedicación con el que nos emocionaba y nos alentaba a mejorar gracias a su experiencia y habilidad con las proteínas

A mis tíos, por abrirme las puertas de su casa y facilitar mi estancia durante este proceso, me enseñaron bastante de la vida y como disfrutarla en ese tiempo.

A mis amigos, por las aventuras y los momentos divertidos que compartimos, que hicieron mi estancia en la universidad más bonita y a mis suegros por su hospitalidad y amor siempre.

Agradezco sinceramente a mi director de tesis, el Dr. Armando Cruz, por su guía constante, por compartir conmigo su conocimiento, experiencia y por su paciencia en cada etapa del proceso. Su acompañamiento fue fundamental para el desarrollo de este trabajo y para mi crecimiento académico y personal. Gracias por confiar en mí y por impulsarme a dar siempre lo mejor. Sin duda, aprendí demasiado.

A mi codirector, el Dr. Martin Peralta, por su apoyo, su disposición para orientarme y por sus valiosas observaciones que enriquecieron este proyecto. Agradezco su tiempo, su cercanía y su compromiso con mi formación. Fue un verdadero privilegio contar con su acompañamiento desde el primer día de universidad.

## Tabla de contenido

|                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| RESUMEN.....                                                                            | 3  |
| 1. INTRODUCCIÓN .....                                                                   | 5  |
| 1.1 Generalidades de la matriz extracelular .....                                       | 5  |
| 1.2 Metaloproteasas de matriz (MMPs). ....                                              | 6  |
| 1.2.1 Clasificación .....                                                               | 7  |
| 1.2.2 Contexto celular de la actividad de las MMPs .....                                | 10 |
| 1.2.3 Funciones fisiológicas.....                                                       | 11 |
| 1.2.4 Funciones patológicas.....                                                        | 13 |
| 1.2.5 Estructura general de las MMPs.....                                               | 14 |
| 1.2.6 Arquitectura de los dominios catalíticos.....                                     | 15 |
| 1.2.7 Especificidad de sustrato .....                                                   | 16 |
| 1.2.8 Ciclo catalítico.....                                                             | 18 |
| 1.2.9 Regulación de la actividad de las MMPs por proteínas TIMPs.....                   | 20 |
| 1.3 Planteamiento del problema.....                                                     | 22 |
| 1.4 Antecedentes de estudio .....                                                       | 25 |
| 2. Justificación.....                                                                   | 31 |
| 3. Hipótesis.....                                                                       | 33 |
| 4. Objetivo general .....                                                               | 33 |
| 4.1 Objetivos específicos.....                                                          | 33 |
| 5. Materiales y métodos. ....                                                           | 34 |
| 5.1 Diseño y construcción .....                                                         | 34 |
| 5.2 Cultivo bacteriano y optimización de la expresión recombinante.....                 | 35 |
| 5.2.1 Preinóculo. ....                                                                  | 35 |
| 5.2.2 Inóculo y monitoreo de crecimiento.....                                           | 36 |
| 5.2.3 Inducción con IPTG. ....                                                          | 36 |
| 5.2.4 Preparación de lisado y análisis por SDS- PAGE.....                               | 36 |
| 5.2.5 Expresión con condiciones optimizadas y lisis bacteriana por sonicación.<br>..... | 37 |
| 5.3 Purificación .....                                                                  | 37 |
| 5.3.1 Purificación por afinidad a níquel. ....                                          | 37 |

|       |                                                   |    |
|-------|---------------------------------------------------|----|
| 5.3.2 | Desalado.....                                     | 38 |
| 5.3.3 | Cromatografía por exclusión molecular (SEC).....  | 39 |
| 5.4   | Evaluación final.....                             | 41 |
| 5.4.1 | Evaluación de la actividad autoproteolítica ..... | 42 |
| 5.4.2 | Inhibición con Batimastat. ....                   | 42 |
| 6     | RESULTADOS.....                                   | 43 |
| 7     | DISCUSIÓN .....                                   | 58 |
| 8     | CONCLUSIÓN.....                                   | 63 |
| 9     | BIBLIOGRAFÍA .....                                | 65 |
| 10    | LISTA DE FIGURAS.....                             | 77 |
| 11    | LISTA DE TABLAS .....                             | 77 |
|       | Abreviaturas .....                                | 78 |
|       | Anexos... ..                                      | 81 |

## RESUMEN

Las metaloproteasas de matriz (MMPs de *matrix metalloproteinases*) son enzimas dependientes de zinc que participan en la degradación y remodelación de la matriz extracelular, desempeñando funciones relevantes en diversos procesos fisiológicos y patológicos, incluyendo desarrollo tisular, embrionario, cicatrización, angiogénesis, invasión tumoral y metástasis. Entre ellas, la metaloproteasa de matriz 16 (MMP16 o MT3-MMP) pertenece al subgrupo de MMPs de membrana y presenta un dominio catalítico que contiene residuos conservados responsables de la coordinación de iones metálicos esenciales para su actividad proteolítica. A pesar de su relevancia biológica, los determinantes estructurales responsables de su actividad catalítica y estabilidad conformacional aún están poco caracterizados.

El objetivo de este trabajo fue expresar, purificar y caracterizar bioquímica y funcionalmente el dominio catalítico recombinante de MMP16 humana en su forma silvestre (WT) y dos variantes obtenidas por mutagénesis dirigida en residuos clave del sitio catalítico Glu- Ala y Asp-Ala (E<sub>247</sub>A y D<sub>81</sub>A), con la finalidad de evaluar la contribución de estos residuos a la actividad enzimática y a la estabilidad estructural de la proteína.

Las proteínas recombinantes se expresaron en *Escherichia coli* BL21 (DE3) y se optimizaron las condiciones de cultivo hasta alcanzar una densidad óptica de DO<sub>600</sub>= 0.8-1.0, seguida de la inducción con IPTG a una concentración final de 1 mM. Posteriormente, las proteínas fueron purificadas mediante cromatografía de afinidad a níquel y cromatografía de exclusión molecular, y analizadas por SDS-PAGE al 15%. Asimismo, se analizaron los perfiles cromatográficos para estimar el estado oligomérico de las proteínas purificadas, la actividad autoproteolítica y estudios de inhibición utilizando Batimastat para evaluar la funcionalidad de las variantes.

Los resultados demostraron que la MMP16 tipo silvestre y la mutante E<sub>247</sub>A presentaron niveles de expresión y solubilidad comparables. Sin embargo, la sustitución del residuo glutámico catalítico provocó la pérdida de la actividad autoproteolítica y abolió la respuesta funcional al proceso catalítico, lo que confirma

el papel esencial de este residuo en la activación de la molécula de agua responsable de la hidrólisis peptídica. Por otro lado, la variante D<sub>81</sub>A mostró una marcada tendencia a la agregación y dificultades en la purificación, lo que sugiere una alteración de la estabilidad conformacional del dominio catalítico. Los análisis cromatográficos indicaron, además, diferencias en el comportamiento estructural de las variantes, lo que evidencia que modificaciones puntuales en residuos conservados pueden afectar propiedades relevantes para la función enzimática.

En conjunto, los resultados obtenidos demuestran que los residuos E<sub>247</sub> y D<sub>81</sub> desempeñan funciones complementarias dentro de MMP16: el primero participa directamente en la catálisis dependiente de zinc, mientras que el segundo contribuye principalmente a la integridad estructural del dominio catalítico. Estos hallazgos amplían el conocimiento sobre la relación estructura-función en MMP16 y proporcionan información experimental valiosa para futuros estudios estructurales, funcionales y de diseño racional de inhibidores selectivos dirigidos a esta metaloproteasa

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Generalidades de la matriz extracelular.

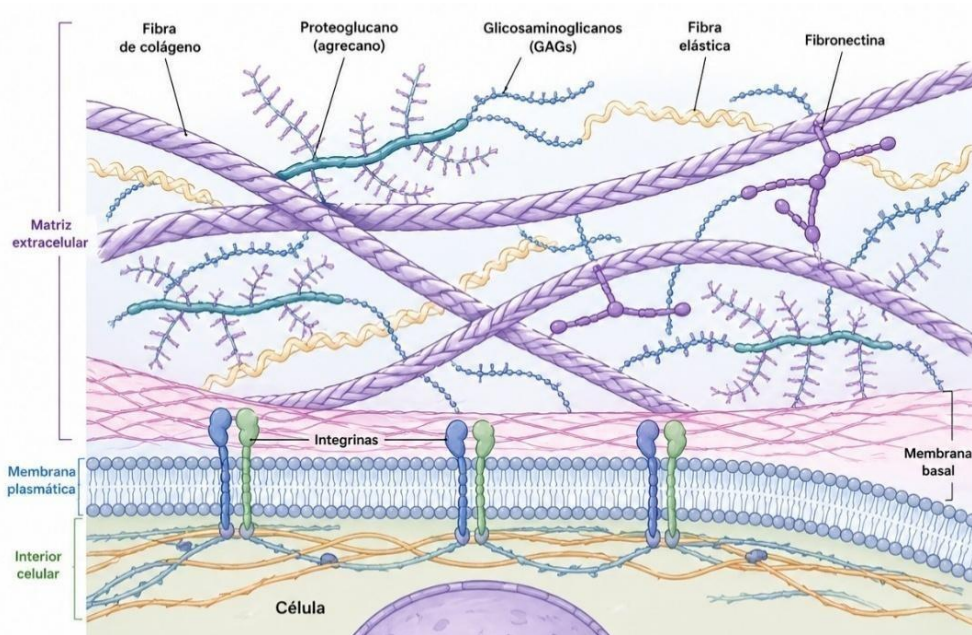
La matriz extracelular (MEC) es una red tridimensional compleja compuesta principalmente por proteínas estructurales, glicoproteínas y proteoglicanos que rodean a las células en los tejidos. Entre sus componentes principales se encuentran el colágeno, la elastina, laminina y fibronectina, que proporcionan soporte mecánico a las células y contribuyen a la organización estructural de los tejidos (Frantz, Stewart, & Weaver, 2010; Fig. 1).

Además de su función estructural, la MEC desempeña un papel fundamental en diversos procesos biológicos, como la adhesión celular, migración, proliferación y diferenciación celular. Asimismo, actúa como un reservorio de moléculas señalizadoras que participan en la comunicación celular y en la regulación de la homeóstasis tisular (Hynes, 2009).

La matriz extracelular es una estructura altamente dinámica que se encuentra en constante remodelación. Este proceso es esencial para fenómenos fisiológicos como el desarrollo embrionario, la cicatrización de heridas y la angiogénesis. La remodelación de la MEC depende de un equilibrio entre la síntesis de sus componentes y su degradación por enzimas proteolíticas especializadas (Page-McCaw, Ewald & Werb, 2007).

Entre las enzimas responsables de la degradación de los componentes de la matriz extracelular destacan las metaloproteasas de matriz (MMPs, de *matrix metalloproteinases*), una familia de proteasas dependientes de zinc capaces de degradar una amplia variedad de proteínas de la MEC (Fig. 1).

En el contexto oncológico, las MMPs favorecen la invasión tumoral al degradar la MEC, facilitando la migración celular y la metástasis (Coussens *et al.*, 2002). Esto ha convertido a las MMPs en blancos estratégicos de la investigación farmacológica.



**Figura 1** Matriz extracelular o MEC, definida como una red tridimensional dinámica de proteínas fibrosas, glicoproteínas y polisacáridos bioactivos que rodea y regula a las células. Nota: Adaptado de Hynes, (2009).

## 1.2 Metaloproteasas de matriz (MMPs).

Las metaloproteasas de matriz (MMPs) constituyen una familia de endopeptidasas dependientes de zinc que participan en la degradación y remodelación de los componentes de la matriz extracelular. Las MMPs fueron descritas por primera vez en 1949, como enzimas depolimerizantes que facilitan el crecimiento tumoral al degradar el estroma del tejido conectivo, incluidos los pequeños vasos sanguíneos. En 1962, Jerome Gross y Charles M. Lapière aislaron y caracterizaron la primera collagenasa de origen animal a partir de tejidos de renacuajo durante la metamorfosis, demostrando su participación en la degradación del colágeno durante la reabsorción de la cola (Gross & Lapiere, 1962). Durante los siguientes 20 años, se purificaron y caracterizaron varias enzimas, pero fue a partir de 1985 cuando el campo se desarrolló significativamente impulsado por los avances en biología molecular que permitieron la clonación y secuenciación de sus genes, la identificación de nuevos miembros, la comprensión de sus mecanismos de regulación y activación. Estos avances revelaron que las MMPs constituyen una

familia ampliamente distribuida en la naturaleza, encontrándose en virus, arqueobacterias, bacterias, plantas, nematodos y animales (Laronha, 2020)

El interés en estas enzimas se debe a su papel fundamental en numerosos procesos fisiológicos, incluyendo el desarrollo embrionario, la reparación de tejidos, la angiogénesis y la cicatrización, así como en diversas patologías, incluyendo enfermedades cardiovasculares, artritis, la invasión tumoral y metástasis (Nagase, & Murphy, 2006).

### **1.2.1 Clasificación**

Las MMPs constituyen una subfamilia de endopeptidasas dependientes de  $Zn^{2+}$  pertenecientes a la superfamilia de las metzincinas y clasificadas en la familia M10 de la base de datos MEROPS (Rawlings, 2017). Estas enzimas se caracterizan por la presencia de un ion  $Zn^{2+}$  en su sitio activo y por una metionina conservada en toda la familia de estas enzimas y que se localiza hacia el extremo C-terminal del motivo de unión al zinc, la cual forma una estructura característica denominada "Met-turn (Gomis- Ruth, 2019). En vertebrados, existen 28 tipos diferentes de MMPs, al menos 24 se expresan en tejido humano incluyendo dos equivalentes (González, 2019), las cuales se clasifican de acuerdo con su estructura y especificidad de sustrato en distintos subgrupos, entre ellos colagenasas, gelatinasas, estromelisininas, matrilisininas y metaloproteasas tipo membrana (MT-MMPs). Esta clasificación refleja las diferencias funcionales y estructurales entre los miembros de esta familia de enzimas (Tabla 1).

**Tabla 1 Clasificación de las metaloproteasas de matriz humanas.**

| <b>Grupo de MMPs</b>                            | <b>Miembros</b>                                         | <b>Características principales</b>                                             |
|-------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Colagenasas.</b>                             | MMP-1, MMP-8, MMP-13                                    | Degradan colágeno fibrilar (tipo I, II y III).                                 |
| <b>Gelatinasas.</b>                             | MMP-2, MMP-9.                                           | Degradan gelatinasa y colágeno tipo IV: poseen dominios tipo fibronectina.     |
| <b>Estromelisin.</b>                            | MMP-3, MMP-10, MMP-11                                   | Degradan componentes de la matriz extracelular como proteoglicanos y laminina. |
| <b>Matrilisin</b>                               | MMP-7, MMP-26.                                          | Carecen de dominio hemopexina; proteínas más pequeñas.                         |
| <b>Metaloproteasas tipo membrana (MT-MMPs).</b> | MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-24, MMP-17, MMP-25.         | Asociadas a membrana celular; activan otras MMPs.                              |
| <b>Otras MMPs.</b>                              | MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-23, MMP-27, MMP-28. | Funciones especializadas o menos caracterizadas.                               |

Nota: Adaptado de Nagase *et al.*, 2006.

Otra clasificación divide a las MMPs en tres grupos principales de acuerdo con su localización celular:

**1) Secretadas al espacio extracelular como enzimas solubles:**

Estas MMPs son sintetizadas como zimógenos inactivos y se secretan al espacio extracelular, donde son activadas por proteólisis. Una vez activas, difunden por la matriz extracelular y degradan componentes estructurales como el colágeno, la gelatina y la elastina. Ejemplos de este grupo incluyen MMP-1, MMP-2 y MMP-9

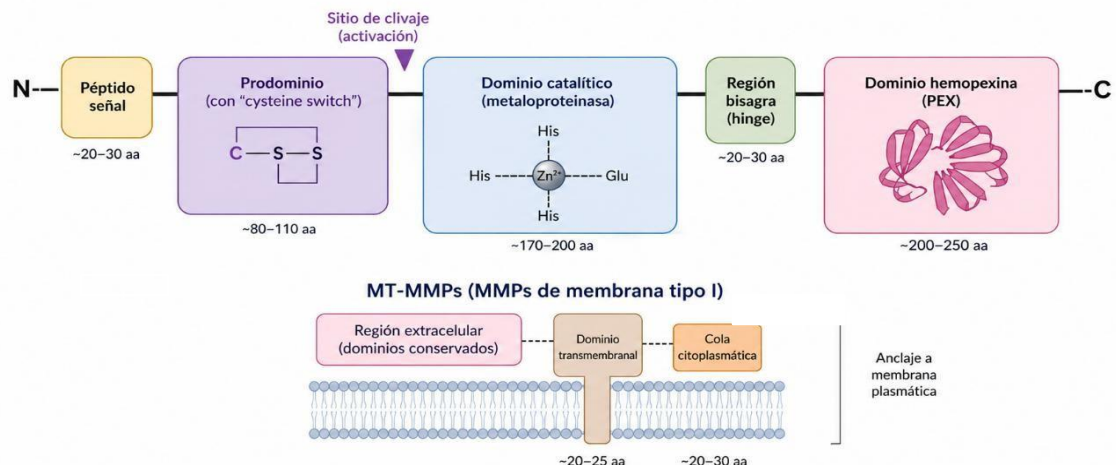
(Nagase *et al.*, 2006). Su función principal es la remodelación global de la matriz extracelular durante procesos fisiológicos como cicatrización, desarrollo embrionario y angiogénesis.

## 2) Asociadas a la superficie celular mediante interacciones con receptores o glicoproteínas:

Algunas MMPs, aunque son secretadas, pueden permanecer asociadas a la superficie celular mediante interacciones con receptores, integrinas o proteoglicanos. Esta asociación limita su difusión y permite una actividad proteolítica más localizada en el entorno pericelular (Itoh, 2015). Estas MMPs participan en procesos donde se requiere degradación dirigida, como la migración celular.

## 3) Ancladas a la membrana plasmática:

Las metaloproteasas tipo membrana (MT. MMPs), se encuentran ancladas directamente a la membrana plasmática mediante dominios transmembrana o anclajes GPI. Este grupo incluye enzimas como MMMP14, MMP15, MMP16 y MMP17. Esta localización es fundamental, ya que permite que la actividad proteolítica ocurra de manera focalizada en sitios de adhesión célula-matriz o estructuras especializadas de invasión celular (Itoh, 2015; Fig. 2).



**Figura 2 Estructura general de las metaloproteasas de matriz.** Organización estructural de las metaloproteasas de matriz (MMPs) y de las metaloproteasas de membrana tipo I (MT-MMPs). Las MMPs están constituidas por un péptido señal, un prodominio con el mecanismo de cysteine switch, un dominio catalítico, una región bisagra (hinge) y un dominio hemopexina (PEX). Las MT-MMPs

conservan estos dominios y presentan, además, un dominio transmembranal y una cola citoplasmática que permiten su anclaje a la membrana plasmática. Nota: Adaptada de *Overall (2002)* y *Visse (2003)*.

### **1.2.2 Contexto celular de la actividad de las MMPs**

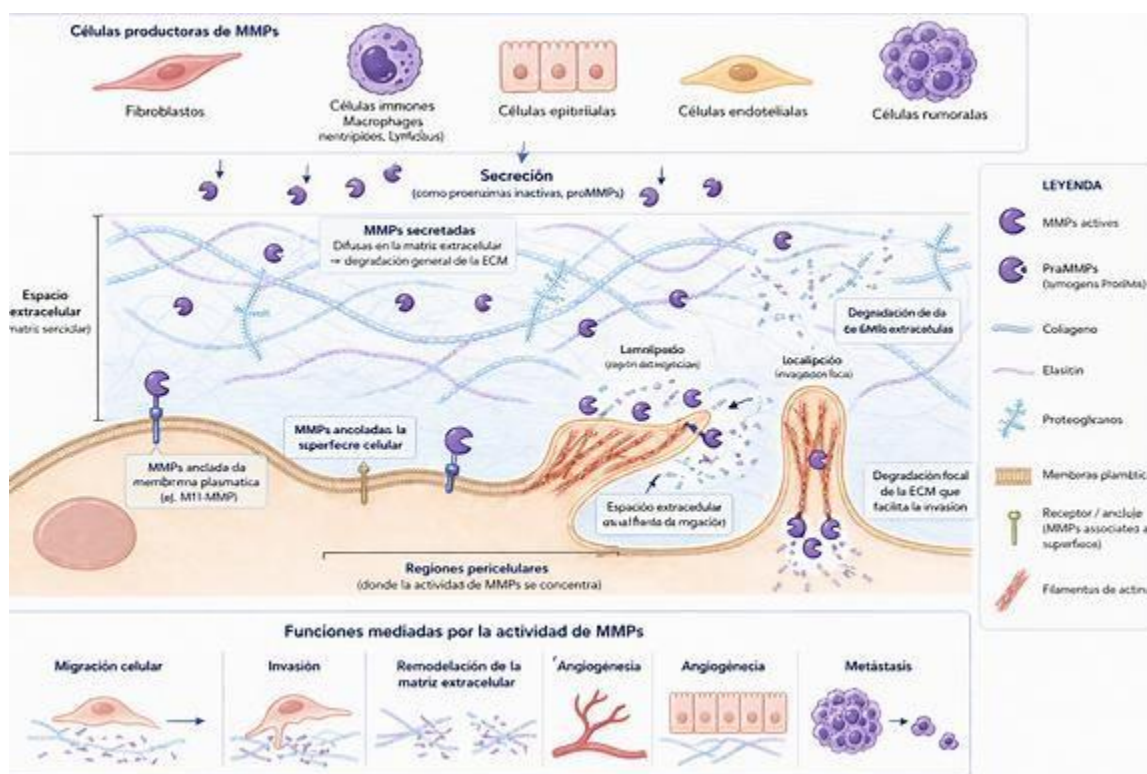
Las metaloproteasas de matriz ejercen su actividad dentro de un contexto celular altamente organizado, la actividad de las metaloproteinasas debe entenderse dentro de un contexto celular dinámico en que su localización y regulación espacial determinan su función biológica. Estas enzimas son sintetizadas por diversos tipos celulares, incluyendo fibroblastos, células epiteliales, endoteliales, inmunes y tumorales, donde su actividad no ocurre de manera difusa, sino que se concentran en microambientes específicos del entorno celular, conocidos como regiones peri celulares, donde la célula interactúa directamente con la matriz extracelular (Fig. 3). En estos sitios, las MMPs participan en la degradación dirigida de componentes de la MEC permitiendo la remodelación tisular de forma controlada (Abitha,2015).

A nivel subcelular, la actividad de las MMPs se concentra en regiones altamente dinámicas, entre ellas, la membrana plasmática (principal sitio funcional de las MT-MMPs), el espacio extracelular (MMPs solubles), las vesículas intracelulares (tráfico y reciclaje), los lamelipodios y filopodios (migración celular) e invadopodios (células tumorales).

Los invadopodios son estructuras ricas en actina donde se concentra la actividad de MMPs, lo que permite la degradación localizada de la matriz extracelular y facilita la invasión celular (Coussens *et al.*, Eddy *et al.*, 2017).

En condiciones fisiológicas, la actividad de las MMPs está finamente regulada por mecanismos como la activación controlada de zimógenos y la inhibición por TIMPs (del inglés, *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*), lo que mantiene el equilibrio en la remodelación tisular. Sin embargo, en condiciones patológicas como el cáncer, este equilibrio se pierde, resultando en una actividad proteolítica desregulada.

La sobreexpresión de MMPs y su acumulación en regiones específicas como los invadopodios, favorecen la degradación localizada de la matriz extracelular y de la membrana basal, facilitando la invasión de células tumorales hacia tejido adyacentes. Este proceso constituye un paso crítico en la progresión tumoral y la formación de metástasis (Coussens *et al.*, 2002). La organización espacial y regulación de la actividad de las MMPs en el microambiente celular constituye la base para comprender su doble papel en la fisiología y la patología (Fig. 3).



**Figura 3 Localización de las metaloproteasas de matriz (MMPs).** Las MMPs pueden encontrarse como enzimas secretadas en el espacio extracelular, asociadas a la superficie celular o ancladas a la membrana plasmática. Su distribución en regiones pericelulares, como lamelipodios e invadopodios, permite la degradación localizada de la matriz extracelular y la regulación de procesos como migración, invasión y remodelación tisular. Nota: Adaptado de Page-McCaw *et al.* (2007).

### 1.2.3 Funciones fisiológicas

Las MMPs desempeñan un papel esencial en procesos fisiológicos clave mediante una regulación estricta de su actividad. Estas enzimas permiten la

reorganización controlada de la matriz extracelular, facilitando la migración celular y la comunicación intracelular (Tabla 2).

*Tabla 2 Participación de las MMPs en procesos fisiológicos basada en Cui et al., 2017.*

| <b>Proceso fisiológico</b>       | <b>Descripción</b>                                                                                                                                                  | <b>MMPs involucradas</b>             |
|----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| <b>Apoptosis celular.</b>        | Regulación de la muerte celular programada mediante la escisión de componentes de la MEC y moléculas de señalización facilitando la eliminación de células dañadas. | MMP-7, -9, -10, -14, -23, -25.       |
| <b>Embriogénesis.</b>            | Participación en migración, diferenciación y organización tisular durante el desarrollo embrionario mediante remodelación de la MEC.                                | MMP-21, -27, -28.                    |
| <b>Respuesta inmune.</b>         | Modulación de citocinas, quimiocinas y migración de células inmunes, contribuyendo a la respuesta inflamatoria controlada.                                          | MMP-1, -12, -13, -14, -24, -25.      |
| <b>Morfogénesis.</b>             | Remodelación estructural de tejidos y cambios en la arquitectura celular durante el desarrollo y mantenimiento tisular.                                             | MMP-14, -15.                         |
| <b>Remodelación tisular.</b>     | Degradación y reorganización continua de la matriz extracelular para mantener la homeostasis tisular.                                                               | MMP-3, -10, -13, -14, -22, -26, -28. |
| <b>Angiogénesis</b>              | Degradación de la membrana basal y facilitación de la migración de células endoteliales para formación de nuevos vasos.                                             | MMP-2, -26, -29.                     |
| <b>Cicatrización de heridas.</b> | Eliminación de tejido dañado, migración celular y formación de nueva matriz durante la reparación tisular.                                                          | MMP-1, -8, -10, -11, -19.            |
| <b>Reproducción/menstruación</b> | Degradación cíclica del endometrio y su regeneración durante el ciclo menstrual.                                                                                    | MMP-23, -27.                         |

|                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                 |                |
|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| <b>Crecimiento axonal</b>                               | Modulación del entorno extracelular para permitir la extensión de neuritas y plasticidad neuronal.                                                                                                                                                              | MMP-18         |
| <b>Embarazo (implantación y desarrollo placentario)</b> | Regulan la invasión del trofoblasto, la remodelación de arterias espirales y la formación de la placenta mediante degradación controlada de la matriz extracelular. Este proceso es esencial para una adecuada perfusión uteroplacentaria y el desarrollo feta. | MMP-3, -9, -14 |

#### 1.2.4 Funciones patológicas

La desregulación de la actividad de las MMPs se asocia con diversas enfermedades, como el cáncer, la artritis, las enfermedades cardiovasculares y la fibrosis. En particular, su sobreexpresión contribuye a la degradación excesiva de la matriz extracelular, lo que promueve la invasión tumoral, la metástasis y las alteraciones en la arquitectura tisular (Tabla 3).

**Tabla 3 Participación de las MMPs en procesos patológicos.**

| <b>Proceso patológico</b>            | <b>Descripción</b>                                                                                                                           | <b>MMPs involucradas</b>        |
|--------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| <b>Cáncer</b>                        | Degradación de la membrana basal y la MEC, facilitando invasión, metástasis y angiogénesis tumoral. (Kessenbrock <i>et al</i> , 2010)        | MMP-1, -2, -3, -7, -9, -14.     |
| <b>Enfermedades cardiovasculares</b> | Remodelación vascular, degradación de elastina y colágeno, contribuyendo a aterosclerosis y formación de aneurismas (Newby, 2016).           | MMP-1, -2, -3, -7, -9, -14, -28 |
| <b>Infecciones virales</b>           | Inducción por citocinas inflamatorias, aumento de permeabilidad tisular y contribución al daño inflamatorio (Elkington <i>et al.</i> , 2005) | MMP-2, -10, -12, -13            |
| <b>Osteoartritis</b>                 | Degradación de cartílago articular (colágeno tipo II y agregano), provocando degeneración progresiva (Murphy & Nagase, 2008)                 | MMP-3, -9, -13, -19             |

|                                  |                                                                                                                              |                                    |
|----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| <b>Enfermedades neurológicas</b> | Alteración de la barrera hematoencefálica, facilitando neuroinflamación y disminución de plasticidad neuronal (Yong, 2005)   | MMP-2, -9, -12, -24                |
| <b>Enfermedades pulmonares</b>   | Remodelación de vías respiratorias, inflamación crónica y degradación de la MEC en asma y EPOC (Churg <i>et al.</i> , 2012). | MMP-7, -9, -10, -12, -14, -19, -25 |
| <b>Enfermedades hepáticas</b>    | Participación en fibrosis y cirrosis mediante remodelación de la MEC y activación de células estrelladas (Iredale, 2003)     | MMP-3, -10, -19                    |
| <b>Inflamación</b>               | Regulación de citocinas, quimiocinas, amplificando la respuesta inflamatoria y el daño tisular (Van Lint & Libert, 2007).    | MMP-1, -2, -7, -8, -13             |
| <b>Trastornos fibróticos</b>     | Desequilibrio MMPs/TIMPs que favorece acumulación excesiva de matriz extracelular (Wynn, 2008)                               | MMP-1, -3.                         |
| <b>Enfermedad venosa crónica</b> | Degradación excesiva de la MEC y alteración en la cicatrización, contribuyendo a úlceras venosas (Ruffetto & Khalil, 2008)   | MMP-2, -3, -9, -10, -26            |

### 1.2.5 Estructura general de las MMPs

En general, la familia de las MMPs presenta una estructura constituida por cinco dominios: péptido señal, prodominio, dominio catalítico y dominio hemopexina; además, en el caso específico de las MMPs de membrana, contienen un segmento transmembranal (Fig. 2). Cada uno de estos dominios presenta características estructurales y funcionales particulares (Visse & Nagase, 2003).

- **Péptido señal (N- terminal):** Es péptido que permite la secreción del zimógeno hacia el espacio extracelular.
- **Prodominio:** Corresponde a un péptido de aproximadamente 80 residuos cuya función es mantener inactivo al dominio catalítico por medio de un motivo conservado PRCXXPD. Este motivo presenta un residuo de cisteína

que coordina el ion  $\text{Zn}^{2+}$  del sitio activo. Cuando el predominio es removido por acción proteolítica, el sitio activo queda catalíticamente activo.

- **Dominio catalítico:** Contiene el motivo **HEXXHXXGXXH**, en el que tres residuos de histidina coordinan el  $\text{Zn}^{2+}$  catalítico. Un residuo de glutamato adyacente actúa como base general durante la hidrólisis.

Durante la catálisis, este glutamato activa una molécula de agua, la cual actúa como nucleófilo atacando el enlace peptídico del sustrato, lo que conduce a su hidrólisis y a la degradación de componentes de la matriz extracelular (Fig. 2).

- **Dominio hemopexina (C- terminal).** Regula la especificidad de sustrato y participa en interacciones proteína- proteína, incluyendo procesos de dimerización.
- **Dominio transmembranal:** Es un péptido presente solo en las MMPs de membrana tales como: MMPs-14, 15, 16 y 24.

### 1.2.6 Arquitectura de los dominios catalíticos

En general, todos los dominios catalíticos de las MMPs presentan una estructura globular con un diámetro aproximado de  $\sim 40 \text{ \AA}$  y están constituidos por entre 160 y 170 aminoácidos. Su plegamiento se compone de tres hélices  $\alpha$  ( $\alpha\text{A}$ ,  $\alpha\text{B}$  y  $\alpha\text{C}$ ), cinco láminas  $\beta$  (I–V) y 8 asas variables que conectan distintos elementos estructurales ( $\text{L}\beta\text{II}-\beta\text{III}$ ,  $\text{L}\beta\text{III}-\beta\text{IV}$ ,  $\text{L}\beta\text{IV}-\text{BV}$ ,  $\text{L}\alpha\text{A}-\beta\text{I}$ ,  $\text{L}\alpha\text{A}-\alpha\text{C}$ ). Estas regiones representan elementos distintivos de las MMPs y desempeñan funciones relevantes en la actividad catalítica y el reconocimiento de sustratos. De manera particular, el loop  $\text{L}\beta\text{III}-\beta\text{IV}$ , denominado loop S (*specificity*), conforma parte del sitio de unión a ligandos y constituye la región de mayor variabilidad estructural entre las distintas MMPs. Esta variabilidad les proporciona las diferencias en especificidad por sustratos y, por tanto, a las funciones biológicas particulares de cada miembro de la familia (Tallant *et al.*, 2010).

Por otro lado, todas las estructuras cristalográficas de los dominios catalíticos de las MMPs muestran densidad electrónica correspondiente a cuatro átomos

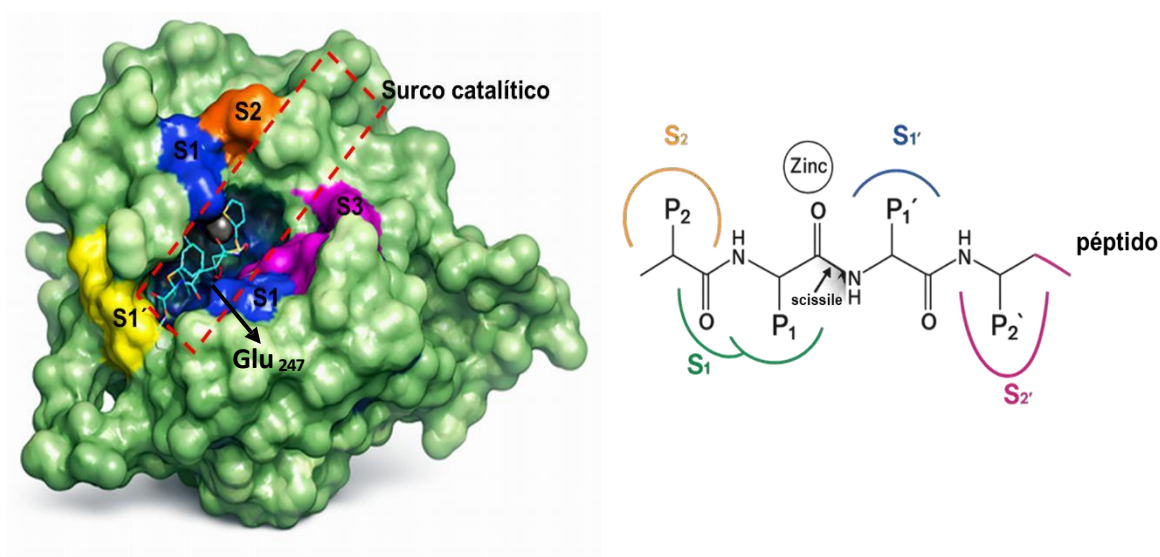
metálicos: dos iones  $\text{Zn}^{2+}$  y dos iones  $\text{Ca}^{2+}$  (PDBs: 1RM8, 3KRI, 3SHI, 6ESM, 5I12 y 1A85). En el caso de los iones  $\text{Zn}^{2+}$ , ambos presentan una coordinación tridentada mediada por residuos de histidina. El ión  $\text{Zn}_1$  se localiza en el sitio activo y desempeña un papel esencial en el ciclo catalítico, mientras que el ión  $\text{Zn}_2$  cumple una función estructural, contribuyendo a la estabilización de regiones adyacentes al sitio activo. Por su parte, los iones  $\text{Ca}^{2+}$  contribuye a la estabilidad estructural de todo el dominio y están coordinados por residuos de aspártico.

### **1.2.7 Especificidad de sustrato.**

Como ya se comentó, la especificidad de las MMPs está determinada por residuos de la hélice  $\alpha\text{B}$  y por residuos del loop-S, los cuales contribuyen a la formación del surco catalítico. Esta región comprende los sitios catalíticos y de reconocimiento de sustratos, este último, organizado en seis subsitios denominados S1, S2, S3, S1', S2' y S3', de acuerdo con la nomenclatura de Schechter y Berger (1967). Cada uno de estos subsitios reconoce y posiciona diferentes regiones del péptido que se hidrolizará. De manera complementaria, los residuos del sustrato se designan como P3, P2, P1, P1', P2' y P3', donde cada posición P interactúa con su subsitio S correspondiente. Sin embargo, el bolsillo S1' destaca por presentar la mayor variabilidad estructural entre las MMPs (Fig. 4). Esta variabilidad se traduce en cambios en la geometría del sitio, así como en sus propiedades de carga e hidrofobicidad, por lo que constituye el principal determinante de la preferencia y especificidad de sustrato en esta familia de proteasas (Visse & Nagase, 2003; Overall, 2002). Por ejemplo, en MMP-1 y MMP-7, las características estructurales del bolsillo S1' dan lugar a cavidades poco profundas, mientras que en MMP-2, MMP-8 y MMP-9 este bolsillo presenta una profundidad intermedia. En contraste, MMP-3, MMP-11, MMP-12, MMP-13 y MMP-14 poseen bolsillos S1' más profundos y extendidos (Laronha, 2020) (Tabla 4).

**Tabla 4 Bolsillos de reconocimiento del sustrato en MMPs (basado en Maskos, Bode, 2006)**

| Sitio      | Interacción con el sustrato            | Composición general                                                   |
|------------|----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| <b>S1</b>  | Lado no primario del enlace peptídico. | Variable, dependiente del sustrato                                    |
| <b>S1'</b> | Lado primario del enlace peptídico     | Crucial para especificidad; en MMP16 incluye Met27, Ile 263 y Gln 269 |
| <b>S2'</b> | Ayuda en el posicionamiento            | Menos conservado                                                      |
| <b>S3'</b> | Interacción lateral                    | Variable                                                              |



**Figura 4 Representación de los bolsillos de reconocimiento del sustrato en las MMPs.** A la izquierda, superficie molecular del dominio catalítico donde se identifican los bolsillos de unión al sustrato que conforman el surco catalítico. A la derecha esquema de la interacción entre los residuos del sustrato (P<sub>2</sub>, P<sub>1</sub>, P<sub>1</sub>' y P<sub>2</sub>') y los respectivos subsitos de reconocimiento de la enzima, donde el ion Zn<sup>2+</sup> catalítico participa en la hidrólisis del enlace peptídico. El bolsillo S1' constituye el principal determinante de la especificidad de sustrato e inhibidores en las MMPs.

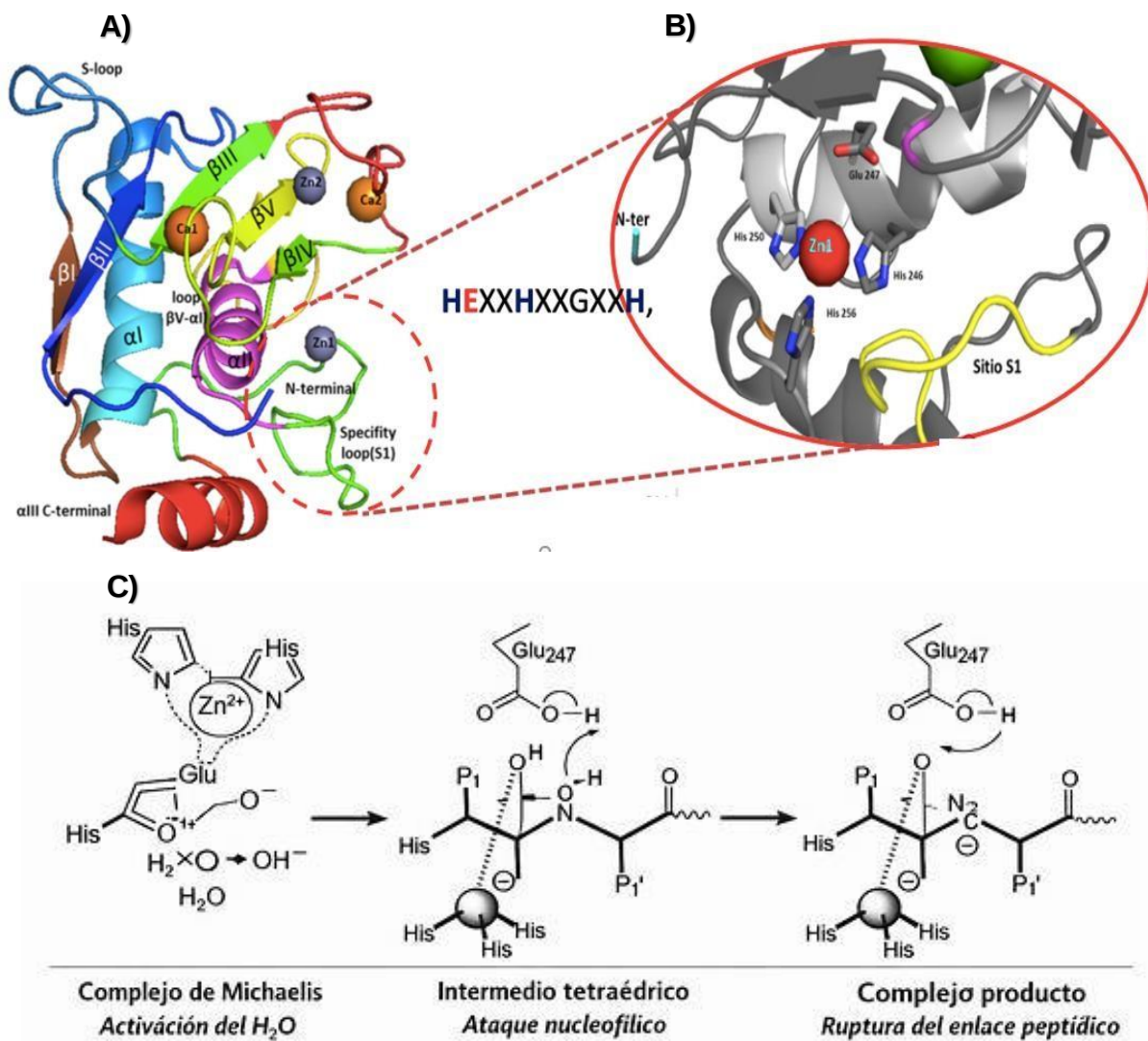
### 1.2.8 Ciclo catalítico

El mecanismo catalítico de las MMPs depende de la acción concertada del ión zinc catalítico ( $Zn_1$ ), del residuo conservado Glu<sub>247</sub> y de una molécula de agua coordinada al metal. Además, el  $Zn_1$  se encuentra coordinado por tres residuos de histidina conservados que constituyen la secuencia consenso HEXXHXXGXXH, mientras que la molécula de agua completa una esfera de coordinación pentacoordinada (Bertini *et al.*, 2006).

En la primera etapa del ciclo, el sustrato ingresa al surco catalítico mediante su reconocimiento por S1' y residuos de la hebra  $\beta IV$ , lo que permite el acomodo del grupo carbonilo del enlace peptídico que será hidrolizado (*cisile bond*) dando lugar a un complejo de Michaelis.

El Glu<sub>247</sub> actúa como una base general, activa a la molécula de agua mediante desprotonación generando un hidróxido nucleófilo capaz de atacar el carbono carbonílico del enlace peptídico lo que favorece la formación de un intermediario gem-diolato con geometría tetraédrica.

Tras la formación y colapso del intermediario tetraédrico, Glu<sub>247</sub> dona el protón al N del grupo amino previamente capturado de la molécula de agua, actuando como ácido general y regenerando su estado desprotonado original. Para finalizar, los productos de reacción se disocian del sitio activo y una nueva molécula de agua proveniente del solvente se coordina al ion  $Zn^{2+}$  catalítico, restableciendo la configuración inicial del centro catalítico para un nuevo ciclo de hidrólisis (Laronha, 2020; Fig. 5).



**Figura 5 Estructura tridimensional de la estructura cristalina del dominio catalítico de MMP-16 (PDB: 1RM8) y su ciclo catalítico.** A) Se muestra el plegamiento conformado por cinco láminas  $\beta$  (flechas), tres hélices  $\alpha$  (cintas en espiral) y los iones metálicos estructurales y catalíticos ( $Zn^{2+}$  y  $Ca^{2+}$ ). B) Acercamiento y cambio de orientación del sitio catalítico que muestra los tres residuos de histidina que participan en la coordinación tetraédrica del ion  $Zn1$  y el residuo E247 catalítico. En amarillo se muestra el asa de especificidad  $S1'$ . Estructura tomada de PDB: 1RM8. C) Mecanismo catalítico dependiente de  $Zn^{2+}$  en las metaloproteasas de matriz. El ion  $Zn^{2+}$  es coordinado por tres residuos de histidina del motivo conservado HEXXHXXGXXH. Un residuo de glutamato actúa como base general, activando una molécula de agua que funciona como nucleófilo para atacar el enlace peptídico del sustrato, dando lugar a su hidrólisis. *Nota: Adaptado de Tallant et al. (2010).*

### 1.2.9 Regulación de la actividad de las MMPs por proteínas TIMPs

Debido a su papel central en la remodelación de la matriz extracelular y la arquitectura tisular (Tabla 3), la actividad de las metaloproteinasas de matriz (MMPs) debe mantenerse bajo estricto control. Alteraciones en sus niveles de expresión, activación o inhibición pueden alterar la homeostasis tisular y contribuir al desarrollo y progresión de múltiples patologías (Tabla 4). En condiciones fisiológicas, esta regulación está mediada principalmente por los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs), una familia de proteínas encargada de modular la actividad proteolítica de las MMPs, así como de otras metaloproteasas de la matriz extracelular como las ADAM (*A Disintegrin and Metalloproteinase*) y ADAMTS (*A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs*) (Hartland *et al.*, 2017).

La familia de los TIMPs está constituida por cuatro miembros: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4. Estas proteínas presentan entre 184 y 194 aminoácidos de longitud y un peso molecular aproximado de 21 kDa. Su principal función consiste en inhibir la actividad de las MMPs mediante la formación de complejos no covalentes con una estequiometría 1:1, mediante el bloqueo de todos los subsitios dentro del surco catalítico de las MMPs (Brew & Batra, 2013)

Aunque todos los TIMPs comparten este mecanismo general de inhibición cada miembro exhibe afinidades y especificidades relativas hacia diferentes MMPs, permitiendo un control selectivo de la actividad proteolítica. Asimismo, su expresión está regulada por diversos estímulos extracelulares, que añade un nivel adicional de control sobre la remodelación de la matriz extracelular (Tabla 5).

**Tabla 5 Principales inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs) y su especificidad relativa hacia diferentes MMPs**

| <b>TIMP</b>   | <b>Características principales</b>                                                                                                                                                                        | <b>MMPs reguladas preferentemente</b>                                                                                |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>TIMP-1</b> | Inhibidor soluble ampliamente distribuido. Presenta menor afinidad por algunas MT- MMPs.<br>Forma complejos estables con proMMP-9. Participa además en procesos de proliferación y supervivencia celular. | MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-13. Inhibe débilmente MMP-14 (MT1-MMP).                               |
| <b>TIMP-2</b> | Inhibidor universal de numerosas MMPs. Participa en la regulación de la activación de pro MMP-2 mediante un complejo con MT1-MMP.                                                                         | MMP-2, MMP-9, MMP-13, MMP-14 (MT1-MMP), MMP-15 (MT2-MMP), MMP-16 (MT3-MMP), y otras MT-MMPs.                         |
| <b>TIMP-3</b> | Único miembro fuertemente asociado a la matriz extracelular. También inhibe proteasas de las familias ADAM y ADAMTS.                                                                                      | MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-16 y MMP-19. Además, inhibe ADAM17 (TACE) y diversas ADAMTS. |
| <b>TIMP-4</b> | Expresión predominante en tejidos cardiovasculares y reproductivos. Comparte similitud estructural con TIMP-2                                                                                             | MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-14, MMP-26.                                                                                 |

### **1.3 Planteamiento del problema**

El Cáncer representa uno de los principales desafíos de salud pública a nivel mundial debido a su elevada incidencia, prevalencia y mortalidad. De acuerdo con las estimaciones más recientes de la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC), durante 2022 se registraron aproximadamente 20 millones de nuevos casos de cáncer en todo el mundo, lo que refleja una elevada incidencia de la enfermedad, mientras que cerca de 9.7 millones de personas fallecieron por esta misma causa (IARC, 2022). Asimismo, se estima que más de 53 millones de individuos vivían con un diagnóstico de cáncer dentro de los cinco años posteriores a su detección, evidenciando la alta prevalencia de esta patología nivel global.

A pesar de los importantes avances en el diagnóstico temprano, la cirugía, la radioterapia, la quimioterapia, las terapias dirigidas y la inmunoterapia, la mortalidad asociada al cáncer continúa siendo elevada. Diversos estudios han demostrado que aproximadamente el 90% de las muertes relacionadas con cáncer no son consecuencia del tumor primario, sino del desarrollo de metástasis (Bray *et al.*, 2018). Este proceso implica la diseminación de células tumorales desde el sitio original hacia órganos distantes, donde establecen tumores secundarios capaces de comprometer funciones fisiológicas esenciales. Debido a ello, la presencia de metástasis constituye uno de los principales indicadores de mal pronóstico y una de las mayores limitaciones para el éxito terapéutico.

La metástasis es un fenómeno biológico complejo que involucra múltiples etapas coordinadas, incluyendo la pérdida de adhesión celular, la degradación de la membrana basal y de la matriz extracelular, la invasión de tejidos circundantes, la intravasación a vasos sanguíneos o linfáticos, la supervivencia en circulación, la extravasación y, finalmente, la colonización de órganos distantes. Para llevar a cabo estos procesos, las células tumorales deben adquirir capacidades invasivas que les permiten remodelar activamente su microambiente y superar diversas barreras biológicas. En este contexto, la degradación de la matriz extracelular constituye un factor clave en la progresión tumoral y la formación de metástasis (Mustafa *et al.*, 2022).

Entre los principales reguladores de la remodelación de la MEC como ya se mencionó, están las MMPs, además de su función proteolítica, estas enzimas participan en la regulación de factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión celular, influyendo en procesos fundamentales como proliferación, migración, invasión, angiogénesis, inflamación y transición epitelio-mesénquima.

La actividad de las MMPs se encuentra regulada por diversas vías de señalización intracelular, incluyendo MAPK/ERK, PI3K/Akt, NF- $\kappa$ B, JAK/STAT y TGF- $\beta$ , las cuales son frecuentemente alteradas durante la progresión tumoral. La activación de estas rutas promueve la expresión de genes asociados con invasión y metástasis, favoreciendo la adquisición de fenotipos celulares más agresivos. En particular, se ha observado que la sobreexpresión de diversas MMPs se correlaciona con una mayor capacidad metastática, resistencia terapéutica y una disminución en la supervivencia de los pacientes.

Numerosos estudios han demostrado que la sobreexpresión de distintas MMPs se asocia con una mayor agresividad tumoral y una reducción en la supervivencia de los pacientes. MMP-2 y MMP-9 participan en la degradación de membranas basales favorecen la invasión tumoral, mientras que MMP-7 facilita la pérdida de adhesión celular mediante el procesamiento de E-cadherina (González-Avila, *et al.*, 2019).

Dentro de esta familia, las metaloproteasas de tipo membrana (MT-MMPs) han adquirido especial relevancia debido a su localización en la superficie celular y a su participación directa en la degradación localizada de la matriz extracelular. Estas enzimas intervienen en la formación de invadopodios, estructuras especializadas que permiten la invasión tisular y la migración celular (como MMP-14 o MT1-MMP). Asimismo, participan en la activación de otras metaloproteinasas pro-MMP-2 y en la modulación de múltiples vías de señalización implicadas en la progresión tumoral.

La importancia biológica y clínica de las MMPs ha impulsado su estudio como posibles blancos terapéuticos. Sin embargo, los inhibidores desarrollados hasta

ahora han mostrado resultados limitados debido a problemas de especificidad y toxicidad sistémica. Recientemente, el desarrollo de sistemas de liberación dirigida basados en sistemas de nanoliberación dirigidos (nanodelivery systems), los cuales aprovechan la sobreexpresión de MMPs en el microambiente tumoral para liberar de manera específica, fármacos, moléculas terapéuticas únicamente en el sitio tumoral. No obstante, el éxito de estas estrategias depende de una comprensión más profunda de la estructura, regulación y función de las diferentes MMPs, cuyo papel en la progresión tumoral continúa siendo objeto de intensa investigación (Mustafa *et al.*, 2022).

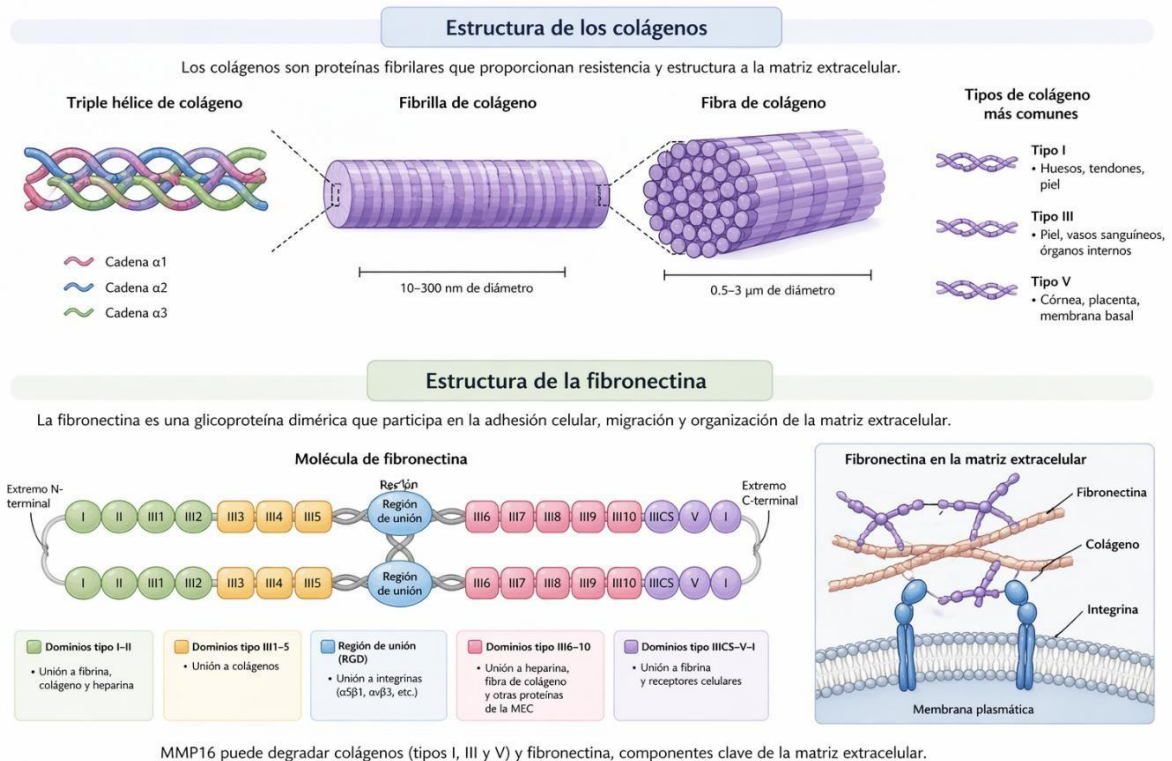
En este contexto, resulta fundamental profundizar en el estudio de metaloproteinasas específicas, como MMP16, una enzima del grupo de las MT-MMPs, asociada a procesos de remodelación de la matriz extracelular, invasión celular y progresión tumoral. La caracterización de los determinantes estructurales y funcionales que regulan su actividad permitirá ampliar el conocimiento sobre los mecanismos moleculares implicados en la metástasis y contribuirá al desarrollo futuro de estrategias terapéuticas más selectivas y efectivas.

#### 1.4 Antecedentes de estudio

Los estudios realizados sobre MMP16 se han centrado principalmente en comprender las características estructurales y funcionales de su sitio catalítico. Uno de los primeros trabajos enfocados en la caracterización bioquímica de esta metaloproteasa fue realizado por Shimada *et al.* (1999), lo que constituyó una de las primeras evidencias experimentales sobre la función catalítica de MMP16. Posteriormente, Lang *et al.* (2004) resolvieron la estructura cristalográfica del dominio catalítico de MMP16, identificando características estructurales distintivas de las metaloproteasas de tipo membrana (MT-MMPs) particularmente en la conformación del bolsillo de especificidad S1' y en regiones superficiales cercanas al sitio activo involucradas en el reconocimiento de sustratos y la selectividad catalítica. Estas variaciones se han asociado con cambios en la selectividad de sustrato y en el reconocimiento de inhibidores, sugiriendo que el bucle podría desempeñar un papel importante en la regulación de la actividad enzimática (Gomis-Ruth, 2009).

Diversos estudios sobre metaloproteasas de matriz han demostrado que, además de los residuos que conforman directamente el motivo catalítico, existen aminoácidos conservados que contribuyen a la estabilidad estructural del sitio activo y al correcto posicionamiento de los sustratos durante la catálisis. Las alteraciones en estos residuos pueden modificar la geometría del sitio activo y reducir significativamente la actividad enzimática, incluso cuando no forman parte directa del motivo catalítico.

Funcionalmente, MMP16 participa en la degradación de diversos componentes de la matriz extracelular, incluyendo, colágeno tipo I, III y V, fibronectina y gelatina (Fig. 6). Asimismo, puede contribuir a la activación de otras metaloproteasas (proMMP-2), amplificando la capacidad proteolítica del entorno pericelular (Fang *et al.*, 2013). Procesos fundamentales tanto en condiciones fisiológicas como en diversas patologías (Itoh, 2015).

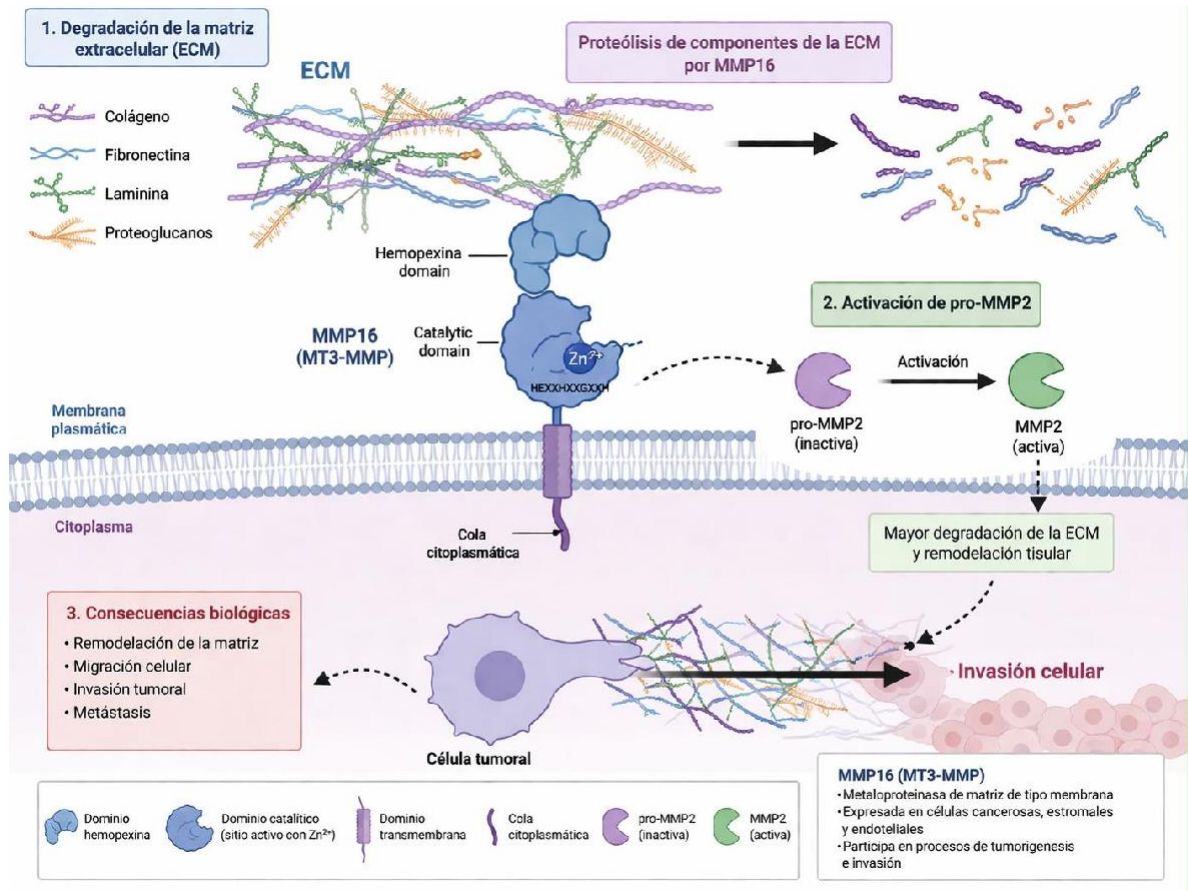


**Figura 6. Estructura de colágenos y fibronectina como componentes de la matriz extracelular.** El colágeno forma estructuras fibrilares de triple hélice formada por tres cadenas polipeptídicas, que se ensamblan en fibrillas y fibras proporcionando resistencia y soporte estructural a la MEC. Los tipos de colágeno I, III y V son componentes clave en tejidos conectivos y constituyen sustratos importantes para la actividad proteolítica de las metaloproteasas de matriz. Mientras que, la fibronectina es una glicoproteína dimérica formada por múltiples dominios funcionales que permiten su interacción con integrinas, colágeno y otros componentes de la MEC, esta proteína desempeña un papel fundamental en la adhesión celular, migración y organización de la matriz extracelular. Ambas moléculas representan sustratos relevantes para MMP16, cuya actividad contribuye a la degradación y remodelación de la MEC en procesos fisiológicos y patológicos (Shoulders & Raines, 2009; Pankov & Yamada, 2002).

Además de su participación en la remodelación de la matriz extracelular, MMP16 se ha asociado con diversos procesos relacionados con progresión tumoral. La degradación localizada de componentes de la matriz y la activación de otras proteasas favorecen la migración celular, la invasión tisular y la formación de metástasis (Fig. 7). Estudios recientes han demostrado que las metaloproteasas de tipo membrana también pueden modular procesos de señalización celular.

Una vez sintetizada, MMP16 es activada por convertasas tipo furina mediante el reconocimiento de una secuencia consenso (RX[K/R]R) localizada en su

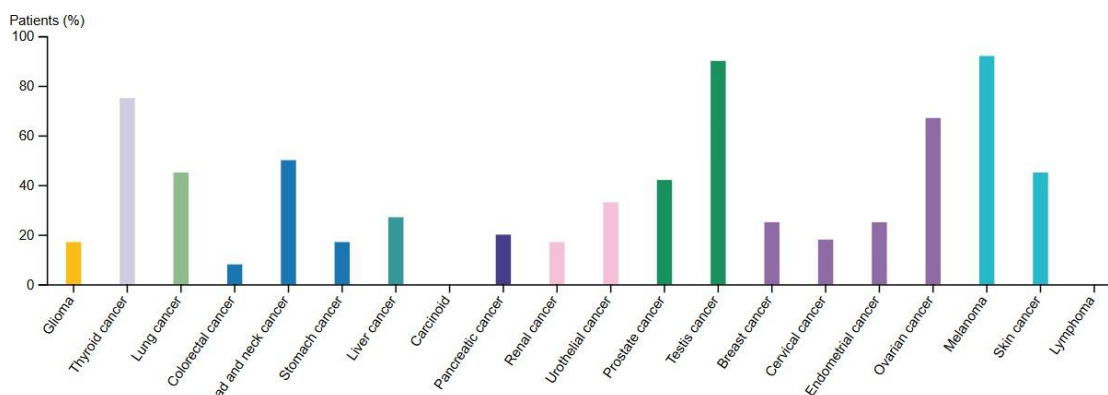
propéptido. Este procesamiento ocurre durante su tránsito por el aparato de Golgi y permite que MMP16 puede ser transportada hacia la superficie celular ya en una conformación catalíticamente activa, lo cual representa una ventaja funcional al permitir una respuesta proteolítica rápida y localizada en regiones específicas de interacción célula-matriz (Seiki, 1999).



**Figura 7 Contexto celular de la actividad de MMP16 en la remodelación de la MEC.** Representación esquemática de MMP16 en el microambiente celular. Participa en la degradación de componentes de la MEC y la activación de otras proteasas, favoreciendo procesos como migración celular e invasión tumoral incluyendo la activación de porMMP-2 en la superficie celular.

Los análisis transcriptómicos y proteómicos indican que MMP16 presenta una expresión diferencial entre tejidos y tipos de cáncer. Datos del Human Protein Atlas reportan niveles elevados de expresión en melanoma, glioma, ovario, testículo y tiroides, mientras que otros tumores presentan una expresión baja o indetectable

(Fig. 8). Esta distribución sugiere que la participación de MMP16 en la progresión tumoral depende del contexto biológico específico de cada neoplasia; sin embargo, su asociación con procesos invasivos la posiciona como un posible biomarcador de agresividad tumoral y una potencial diana terapéutica.



**Figura 8 Expresión de MMP16 en distintos tipos de cáncer (Human Protein Atlas).** Los melanomas, así como los cánceres de ovario, testículo y tiroides, mostraron positividad citoplasmática de moderada a fuerte. Los demás tipos de cáncer generalmente mostraron tinción débil o fueron negativos.

La mutagénesis dirigida constituye una de las herramientas más utilizadas para investigar la relación entre estructura y función en proteínas. Mediante la sustitución específica de aminoácidos, es posible evaluar la contribución individual de residuos conservados a procesos como catálisis, el reconocimiento de sustratos, la estabilidad conformacional y la regulación estructural. En las MMPs, esta estrategia ha permitido identificar elementos moleculares involucrados en la coordinación del ion  $Zn^{2+}$ , la activación catalítica y la especificidad de sustrato.

En el presente trabajo se emplearon dos variantes mutantes de MMP16 con objetivos funcionales complementarios. La variante E<sub>247</sub>A fue diseñada para abolir la actividad catalítica mediante la sustitución del residuo de glutamato que activa la molécula de agua, directamente implicada en la hidrólisis del enlace peptídico. Debido a que este residuo forma parte del mecanismo catalítico conservado de las metaloproteasas, su sustitución por alanina genera una variante catalíticamente

inactiva que puede utilizarse como control funcional para evaluar procesos dependientes de la actividad proteolítica.

Por otro lado, la mutación D<sub>81</sub>A fue diseñada para evaluar la contribución de un residuo altamente conservado cercano al sitio activo de MMP16. Asp<sub>81</sub> se encuentra fuera del motivo catalítico canónico; sin embargo, forma parte de la esfera de coordinación de un segundo ion Zn<sup>2+</sup>, que también está coordinado por dos residuos de histidina. Debido a la naturaleza química de su cadena lateral cargada negativamente, este residuo podría participar tanto en la estabilización del ion metálico como en el establecimiento de interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno que contribuyan al mantenimiento de la arquitectura tridimensional de la proteína.

Desde el punto de vista estructural, este segundo sitio de unión a Zn<sup>2+</sup> se localiza en una región conformada por la lámina  $\beta$  integrada por las hebras  $\beta$ 3,  $\beta$ 4 y  $\beta$ 5, así como por el asa que conecta las hebras  $\beta$ 3 y  $\beta$ 4 (Fig. 5). Una característica notable de esta región es la disposición de dicho loop, cuya geometría sugiere la posible existencia de movimientos conformacionales asociados a mecanismos de apertura y cierre. Esta observación plantea la hipótesis de que el sitio podría desempeñar una función adicional a la meramente estructural e, incluso, participar en procesos relacionados con el reconocimiento de sustratos o con la actividad catalítica de la enzima.

La relevancia de Asp<sub>81</sub> se ve reforzada por estudios realizados en distintos miembros de la familia de las MMPs, en los que se ha demostrado que residuos de ácido aspártico conservados pueden contribuir indirectamente a la correcta orientación de elementos estructurales involucrados en la coordinación de iones Zn<sup>2+</sup> y en la preservación de la integridad del dominio catalítico. En este contexto, la generación de la variante D<sub>81</sub>A permitirá evaluar experimentalmente si Asp<sub>81</sub> participa en el mantenimiento de la arquitectura funcional de MMP16 y determinar su contribución a la estabilidad estructural, la actividad enzimática y el reconocimiento de sustratos.

En este sentido, el análisis de como las mutantes catalíticas como E<sub>247</sub>A y D<sub>81</sub>A constituye una estrategia útil para evaluar el impacto de estos residuos sobre la actividad enzimática, la estabilidad estructural, la autoproteólisis y la sensibilidad a inhibidores, aportando información relevante para el desarrollo de inhibidores selectivos (Tallant *et al.*, 2010).

Como antecedente directo del presente trabajo, una parte fundamental proviene de la investigación realizada por Santiago-Rubio (2018), quien logró la sobreexpresión, la purificación y la caracterización bioquímica del dominio catalítico de la MMP16 humana. En dicho estudio se estableció la estrategia inicial para la obtención de la enzima recombinante mediante expresión en *Escherichia coli*, seguida de procesos de purificación cromatográfica que permitieron recuperar proteína en cantidades suficientes para su análisis estructural y funcional (Santiago-Rubio, 2018).

Los resultados obtenidos demostraron que la proteína conserva actividad de autoprocesamiento como en presencia de un sustrato modificado. Estos hallazgos evidenciaron que la región catalítica mantiene su funcionalidad incluso en ausencia de los demás dominios de la proteína. Sin embargo, la elevada actividad de la enzima también provocó una degradación progresiva de las muestras, comprometiendo su estabilidad y limitando la realización de estudios estructurales y funcionales más exhaustivos.

A partir de estas observaciones surge el presente trabajo, en el que se plantea la generación de las variantes E247A y D81A con el propósito de evaluar la contribución de estos residuos a la actividad y estabilidad de MMP16. En particular, se busca determinar si dichas mutaciones permiten obtener proteínas más estables y adecuadas para su caracterización bioquímica y estructural. Asimismo, este estudio pretende establecer las bases experimentales para futuras investigaciones orientadas a la identificación de ligandos con actividad inhibitoria y al análisis de los mecanismos moleculares que regulan la función de la MMP16.

## 2. Justificación

A pesar de los avances en la comprensión del mecanismo catalítico de las metaloproteasas de matriz (MMPs), aún persisten vacíos importantes respecto de los detalles estructurales y funcionales específicos de algunas enzimas particulares, como la MMP16 (MT3-MMP). En general, las MMPs son endopeptidasas dependientes de  $Zn^{2+}$  que participan en la degradación y remodelación de la matriz extracelular, desempeñando un papel fundamental en procesos fisiológicos y patológicos como la migración celular, la angiogénesis y la progresión tumoral (Nagase, *et al.*, 2006).

En el caso específico de las metaloproteasas tipo membrana (MT-MMPs), su localización en la superficie celular les confiere una función clave en la remodelación del microambiente pericelular y en la activación de otras MMPs, como proMMP-2 (Itoh, 2015). Sin embargo, a pesar de su relevancia biológica, la caracterización estructural y funcional detallada de MMP16 continúa siendo limitada en comparación con otras MMPs ampliamente estudiadas.

Uno de los aspectos menos comprendidos en MMP16 es la naturaleza y función de los sitios de unión a  $Zn^{2+}$ . Estudios previos sugirieron la posible existencia de un segundo sitio de unión metálica con implicaciones catalíticas (Itoh *et al.*, 1999); no obstante, análisis estructurales posteriores han propuesto que este sitio podría desempeñar principalmente un papel estructural o regulador, más que catalítico (Gomis-Rüth, 2009). A pesar de estas observaciones, la evidencia experimental directa sobre la función de este sitio en MMP16 sigue siendo limitada.

La actividad catalítica de las MMPs depende críticamente de la conservación de residuos clave en el sitio activo. En particular, el residuo de glutamato presente en el motivo conservado HEXXH actúa como base general en la activación de la molécula de agua nucleofílica, mientras que otros residuos ácidos, como el aspartato, contribuyen a la estabilización del entorno catalítico y a la coordinación de iones metálicos. La alteración de estos residuos mediante mutagénesis ha demostrado afectar significativamente la actividad enzimática, modificando la geometría del sitio activo y la eficiencia catalítica (Whittaker *et al.*, 1999).

En este contexto, resulta relevante evaluar el papel específico de residuos ácidos, como glutamato (Glu) y aspartato (Asp), en MMP16, dado que su carga negativa a pH fisiológico puede ser determinante tanto para la coordinación del  $\text{Zn}^{2+}$  como para el mantenimiento de la arquitectura del sitio activo. Para ello, en el presente trabajo se empleó una estrategia de mutagénesis dirigida, sustituyendo dichos residuos por alanina (Ala), un aminoácido pequeño y neutro que permite eliminar selectivamente la carga sin alterar de manera significativa la estructura global de la proteína, (E<sub>247</sub>A y D<sub>81</sub>A).

Adicionalmente, se evaluaron la actividad enzimática y el comportamiento autoproteolítico de MMP16 en presencia del inhibidor Batimastat, un inhibidor de amplio espectro que actúa mediante la quelación del  $\text{Zn}^{2+}$  catalítico. El uso de este compuesto permite analizar la relación entre la integridad del sitio activo, la actividad enzimática y la sensibilidad a inhibidores, lo cual es relevante en el contexto del desarrollo de estrategias terapéuticas (Zhan *et al.*, 2020).

Asimismo, estudios recientes han destacado la importancia de desarrollar inhibidores más selectivos de MMPs, debido a los efectos adversos asociados con inhibidores de amplio espectro, lo que resalta la necesidad de comprender con mayor precisión los determinantes estructurales de cada enzima en particular (Hayn *et al.*, 2023).

De esta manera, la relevancia de este trabajo radica en que contribuye al entendimiento de la relación estructura- función en el dominio catalítico (dcMMP16), proporcionando evidencia experimental sobre el papel de residuos catalíticos en la regulación de su actividad autoproteolítica y estado oligomérico, mediante el análisis de variantes mutadas en residuos catalíticos clave. Este enfoque permitirá profundizar en la comprensión de su función biológica, y como base para el diseño racional de inhibidores selectivos, con potencial aplicación en enfermedades donde las MMPs desempeñan un papel clave, como el cáncer y procesos inflamatorios.

### **Pregunta de investigación**

¿Las mutaciones en residuos clave en el dominio catalítico de MMP16 afectan su actividad enzimática, su autoproteólisis y su estado oligomérico?

### **3. Hipótesis**

Las mutaciones E<sub>247</sub>A y D<sub>81</sub>A en el dominio catalítico de MMP16 reducen su actividad autoproteolítica y alteran su estado oligomérico.

### **4. Objetivo general**

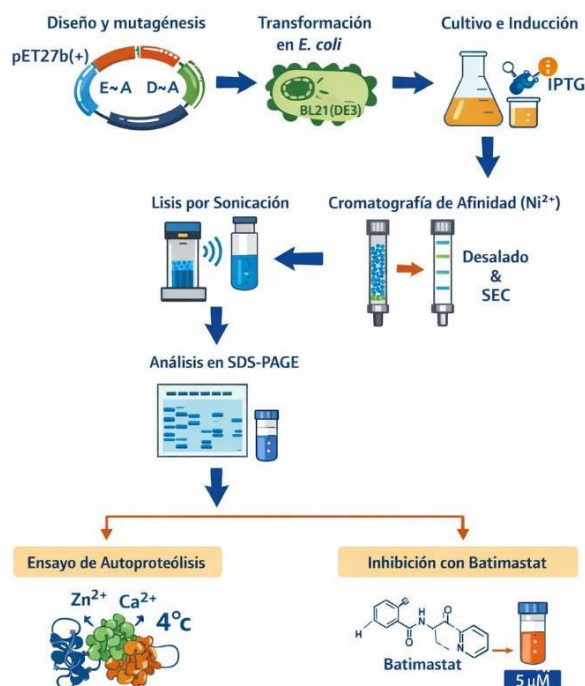
Obtener, expresar y purificar el dominio catalítico de la MMP16 en su forma silvestre, y en las mutantes E<sub>247</sub>A y D<sub>81</sub>A, para determinar su efecto sobre la actividad enzimática autoproteolítica y el estado oligomérico.

#### **4.1 Objetivos específicos**

1. Expresar los dominios catalíticos de MMP16 en su forma silvestre y en las mutantes E<sub>247</sub>A y D<sub>81</sub>A en un sistema de expresión bacteriano.
2. Purificar los dominios catalíticos de MMP16 en su forma silvestre y en sus respectivas mutantes E<sub>247</sub>A y D<sub>81</sub>A.
3. Determinar el impacto de las mutaciones E<sub>247</sub>A y D<sub>81</sub>A sobre las características estructurales del dominio catalítico de la MMP16.
4. Determinar el efecto de las mutaciones E<sub>247</sub>A y D<sub>81</sub>A en la actividad autoproteolítica de la MMP16.

## 5. Materiales y métodos.

A continuación se describe la metodología empleada para alcanzar los objetivos experimentales del presente trabajo, incluyendo la expresión, purificación y análisis funcional de la metaloproteasa MMP16 tipo silvestre y sus variantes mutadas E<sub>247</sub>A y D<sub>81</sub>A (Fig. 9).



**Figura 9 Esquema general de la estrategia experimental empleada en este estudio.** Esquema general de la estrategia experimental empleada en este estudio. Se muestran el diseño y la mutagénesis del plásmido pET27b(+) para generar las mutantes E247A y D81A de MMP16, seguidos de su transformación en *Escherichia coli* BL21(DE3), expresión inducida con IPTG, lisis celular mediante sonicación, purificación mediante cromatografía de afinidad a Ni<sup>2+</sup>, desalado y cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), análisis por SDS-PAGE y evaluación de la actividad mediante ensayos de autoproteólisis e inhibición con batimastat.

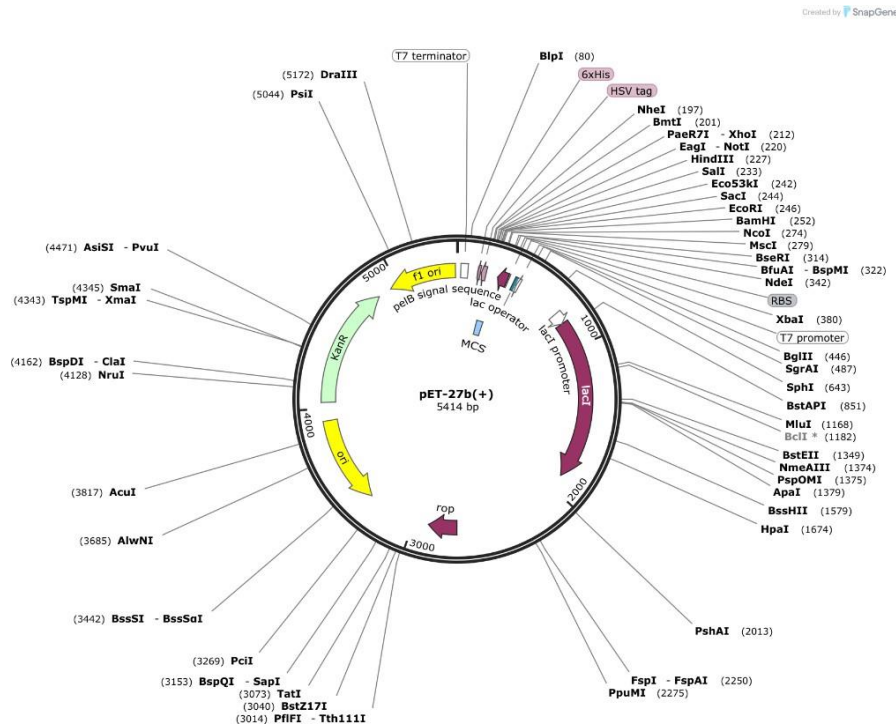
### 5.1 Diseño y construcción

Se utilizó un vector derivado de pET27b (+) que contiene la región catalítica de la metaloproteasa MMP16, fusionada a una etiqueta His6 para facilitar su purificación mediante cromatografía de afinidad (fig.10)

Las variantes mutantes E<sub>247</sub>A y D<sub>81</sub>A fueron generadas mediante mutagénesis dirigida, sustituyendo los residuos catalíticos correspondientes por alanina con el fin de evaluar su papel en la actividad autoproteolítica y estado

oligomérico. Las secuencias completas utilizadas para los análisis se presentan en el Anexo A.

Los plásmidos recombinantes fueron transformados en células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) para la expresión heteróloga de las proteínas recombinantes.



**Figura 10** Esquema del vector *peT27b+*. Mapa del vector de expresión *pET-27b(+)* (5414 pb) utilizado para la clonación y la expresión recombinante de *MMP16*. Se muestran los principales elementos del plásmido, incluyendo el promotor T7, el sitio de clonación múltiple (MCS), la etiqueta 6xHis, el origen de replicación (*ori*), el gen de resistencia a kanamicina (*KanR*) y los principales sitios de restricción.

## 5.2 Cultivo bacteriano y optimización de la expresión recombinante.

### 5.2.1 Preinóculo.

Las construcciones plasmídicas fueron introducidas en *E. coli* mediante transformación química, posteriormente las células transformadas se sembraron en placas de agar LB Agar suplementado con kanamicina a una concentración de 100 µg/ml y se incubaron a 37 °C durante 12 horas. Posteriormente, se seleccionaron colonias individuales y se inocularon en 5 ml de medio líquido 2xYT (Sigma-Aldrich), suplementado con kanamicina (100 µg/ml). Los cultivos se incubaron con las colonias de tipo silvestre, E<sub>247</sub>A y D<sub>81</sub>A a 37 °C con agitación constante (150 rpm) durante 12 horas.

### **5.2.2 Inóculo y monitoreo de crecimiento.**

Los preinóculos fueron utilizados para inocular 500 ml de medio 2xYT /kanamicina (100 µg/ml) previamente esterilizado. Los cultivos fueron incubados a 37 °C, 150 rpm. El crecimiento celular fue monitoreado mediante mediciones de absorbancia a 600 nm, en alícuotas de 1 ml en cubetas plásticas desechable cada hora, utilizando un espectrofotómetro UV/Vis (Ultrospec2100 pro), de la unidad de proteómica médica del INMEGEN, hasta alcanzar su fase logarítmica de una OD<sub>600</sub> entre 0.8 y 1.0, como medio blanco, se utilizó el 2xYT estéril.

Posteriormente se elaboraron curvas de crecimiento independientes para cada variante (Fig. 16). Al finalizar la medición, las muestras, incluyendo las cubetas, se descartaron en vaso de precipitado conteniendo una solución de hipoclorito de sodio. Se dejó reposar el contenido del vaso por 30 minutos y luego se desechó adecuadamente.

### **5.2.3 Inducción con IPTG.**

Una vez alcanzada la densidad deseada, la expresión de la proteína recombinante se indujo mediante la adición de isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 1mM, según protocolos ampliamente reportados para sistemas pET en *E. coli*, permitiendo una inducción eficiente del promotor T7. Los cultivos se mantuvieron a temperatura ambiente (~25 °C), con agitación constante. Se tomaron alícuotas cada 2 horas postinducción, hasta completar 8 horas. Cada muestra (50 ml) se centrifugó a 5,500 rpm por 15 min, se descartó el sobrenadante y las pastillas celulares se almacenaron a -70 °C hasta su procesamiento. Una muestra previa a la inducción se conservó como control negativo.

### **5.2.4 Preparación de lisado y análisis por SDS- PAGE.**

Las pastillas celulares fueron resuspendidas en 500 µl de amortiguador de lisis (Buffer A), compuesto por Tris-HCl 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 25 mM, Betaina 250 mM, pH 7.5.

La suspensión celular fue sometida a sonicación en ciclos controlados (pulsos de 30 s y 1 minuto de descanso), hasta que la muestra se aclaró. Posteriormente, el lisado celular se centrifugó a 14,000 rpm durante 25 minutos a 4 °C para separar las fracciones solubles e insolubles. El sobrenadante fue recuperado para su purificación y se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE), en condiciones reductoras.

#### **5.2.5 Expresión con condiciones optimizadas y lisis bacteriana por sonicación.**

Una vez determinadas las condiciones óptimas de expresión para cada variante, se repitieron los cultivos a gran escala (1 L en medio 2xYT suplementado con kanamicina). Tras la inducción con IPTG, las células fueron cosechadas por centrifugación a 5,500 rpm por 15 minutos y posteriormente por 10 minutos adicionales a 4 °C. Las pastillas celulares obtenidas se resuspendieron cuidadosamente en Buffer A.

La lisis celular se realizó mediante sonicación automática, con 30 segundos por 1 minuto de descanso, manteniendo la muestra en hielo durante todo el procedimiento. La sonicación se prolongó hasta observar una disminución en la turbidez del lisado. Posteriormente, el lisado fue centrifugado a 16,000 rpm por 40 minutos a 4 °C en una ultracentrífuga. El sobrenadante fue filtrado mediante una jeringa y un filtro de 0.45 µm y se reservó para las etapas de purificación

### **5.3 Purificación**

La purificación de la proteína se realizó a través de una estrategia secuencial que incluyó la cromatografía de afinidad a níquel, desalado, y cromatografía por exclusión molecular, con el objetivo de obtener una muestra homogénea y funcional.

#### **5.3.1 Purificación por afinidad a níquel.**

Inicialmente, el sobrenadante soluble previamente filtrado, fue sometido a cromatografía de afinidad a níquel utilizando una columna HisTrap FF 5 ml, (GE Healthcare) en sistema AKTA Start, permitiendo la interacción específica entre la etiqueta His<sub>6</sub> de la proteína recombinante y los iones Ni<sup>2+</sup> inmovilizados en la matriz. Para esto, se utilizaron amortiguadores previamente filtrados (0.22 µm) y desgasificados: un amortiguador de equilibrio y lavado compuesto por Tris-HCl 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 25 mM, Betaina 250 mM ajustado a pH 7.5 (Buffer A), y un amortiguador de elución que contenía imidazol 500mM y Betaina 50 mM, a un pH 7.5 (Buffer B).

La columna se equilibró con 5 volúmenes de columna (CV) de Buffer A, a un flujo constante de 1 ml/ min. Posteriormente, la muestra fue cargada sobre la columna bajo las mismas condiciones de flujo, permitiendo la retención de las proteínas. Una vez concluida la carga, se realizó un lavado exhaustivo con 15 CV de Buffer A con la finalidad de eliminar proteínas unidas de forma inespecífica y estabilizar la línea basal de absorbancia.

La elución de la proteína se efectuó mediante un gradiente escalonado de imidazol de Buffer B, incrementando secuencialmente la concentración de imidazol hasta alcanzar concentraciones 15%, 35%, 50% y 100% del amortiguador de elución. Durante este proceso se recolectaron fracciones de 5 ml, monitoreando continuamente la absorbancia a 280 nm para identificar los picos correspondientes a las proteínas eluídas.

Las fracciones con mayor absorbancia, correspondientes a los picos principales, particularmente aquella eluídas durante el primer escalón de Buffer B al 15% , fueron analizadas por SDS-PAGE para corroborar la presencia de la proteína de interés. Por último, las fracciones seleccionadas se reconcentraron mediante dispositivos de ultrafiltración por centrifugación (3700 rpm, 15 minutos, 4°C), para pasos posteriores.

### **5.3.3 Desalado**

Posteriormente, las muestras obtenidas se sometieron a un proceso de desalado para eliminar el imidazol residual y realizar el intercambio hacia un

amortiguador compatible para etapas posteriores. Para ello se usó una columna HiPrep 26/10 Desalting (Ge Healthcare), previamente equilibrada con tres volúmenes de columna de amortiguador de intercambio compuesto por Tris 10 mM y NaCl 10 mM, a un flujo de 2.5 ml/ min. Una vez equilibrada la columna, las muestras fueron cargadas manualmente a un flujo de 1.0 ml/ min, recolectándose fracciones de 5 ml correspondientes al volumen de elución de cada muestra. Las fracciones obtenidas fueron concentradas nuevamente bajo las mismas condiciones previamente descritas. Como resultado, se obtuvieron volúmenes finales entre 7-8 ml, para las variantes silvestre y E<sub>247</sub>A respectivamente, mientras que para la variante D<sub>81</sub>A se recuperó volumen final cercano a 5 ml.

### **5.3.3 Cromatografía por exclusión molecular (SEC).**

Como etapa final de purificación, las muestras fueron sometidas a cromatografía de exclusión molecular (SEC) para evaluar su estado oligomérico aparente y el grado de homogeneidad en solución. Para ello, se utilizó una columna HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR (GE Healthcare), previamente equilibrada con un amortiguador compuesto por Tris 10 mM y NaCl 10 mM a pH 7.5. La equilibración de la columna se realizó durante 12 horas a un flujo constante de 0.5 ml /min. Posteriormente, se inyectaron 5 ml de muestra previamente filtrada (0.22 µm), y la elución se llevó a cabo en condiciones isocráticas utilizando un volumen de columna. Las fracciones recolectadas fueron analizadas por SDS-PAGE para evaluar su pureza, y aquellas con mayor homogeneidad se reconcentraron y se sometieron a una segunda ronda de cromatografía de exclusión molecular (SEC) con la finalidad de mejorar la uniformidad de la muestra eliminar poblaciones proteicas residuales, este procedimiento se realizó para las variantes silvestre y E<sub>247</sub>A, con excepción de la variante D<sub>81</sub>A.

Durante todo el proceso, el sistema fue monitoreado mediante el software Unicorn, registrando parámetros como presión, conductividad y absorbancia en tiempo real, lo que permitió evaluar la eficiencia de cada etapa de purificación.

#### 5.3.3.1 Cálculo de la masa molecular del dcMMP16 silvestre y mutante E<sub>247</sub>A mediante cromatografía de exclusión molecular.

Con los tiempos de retención de cada pico correspondientes a MMP16 silvestre y a la mutante E<sub>247</sub>A, obtenidos mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), se estimó su peso molecular de cada proteína. Para ello, previamente se construyó una curva de calibración de la columna empleando proteínas estándar de masa molecular conocida: citocromo (12 kDa), mioglobina (17 kDa), peroxidasa (44 kDa) y albúmina (130 kDa).

El volumen de elución máximo ( $V_e$ ) de cada pico se utilizó para calcular el coeficiente de partición ( $K_{av}$ ) mediante la siguiente ecuación:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

- $V_e$  corresponde al volumen de retención específico de la molécula de interés.
- $V_0$  corresponde a el volumen muerto de la columna, el cual se define como el volumen externo al poro de matriz.
- $V_t$  es el volumen total accesible al solvente, definido como la suma del

Con los valores de  $K_{av}$  de las proteínas calibrantes, se construyó una gráfica en la que se representó  $K_{av}$  en función del logaritmo de la masa molecular teórica. A partir del ajuste lineal de estos datos, se obtuvo la ecuación de la recta, la cual se empleó para interpolar los valores de  $K_{av}$  de la proteína silvestre y de la mutante E<sub>247</sub>A, permitiendo así determinar su masa molecular experimental.

#### 5.3.3.2 Cuantificación de proteínas

- **Determinación de la concentración proteica mediante absorbancia a 280 nm.**

La concentración de las proteínas purificadas se determinó mediante espectrofotometría UV utilizando un espectrofotómetro UV/Vis (Ultrospec2100 pro),

de la unidad de proteómica médica del INMEGEN. La absorbancia fue registrada a 280 nm, una longitud de onda en la que los residuos aromáticos presentes en las proteínas absorben radiación ultravioleta.

La concentración teórica de las proteínas se estimó mediante la herramienta informática Protein Concentration Calculator-A280, de Thermo Fisher Scientific, la cual utiliza la composición de aminoácidos de la proteína y la ley de Beer- Lambert  $A = \epsilon lc$  donde  $A$  corresponde a la absorbancia medida a 280 nm,  $\epsilon$  al coeficiente de extinción molar de la proteína ( $M^{-1}cm^{-1}$ ),  $l$  a la longitud del paso óptico (cm) y  $c$  a la concentración molar (M). Despejando la concentración:  $c = \frac{A}{\epsilon l}$

- **Determinación del coeficiente de extinción molar**

El coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) de dcMMP16 silvestre y la mutante E<sub>247</sub>A se estimó a partir de sus secuencias utilizando la herramienta informática ProtParam del servidor ExPASy. Esta herramienta calcula el coeficiente de extinción teórico considerando la contribución de los residuos aromáticos triptófano (Trp), tirosina (Tyr) y los puentes disulfuro formados por residuos de cisteína (Cys), los cuales absorben radiación ultravioleta a 280 nm. El valor obtenido permite estimar la concentración proteica mediante espectrofotometría aplicando la ley de Beer- Lambert.

Adicionalmente, se determinó el peso molecular teórico de cada construcción para convertir la concentración molar obtenida a unidades de masa por volumen (mg/ml) (Tabla 6).

**Tabla 6 Coeficiente de extinción molar teórico.**

| Proteína dcMMP16   | Peso molecular (Da) | Coeficiente de extinción molar ( $M^{-1}cm^{-1}$ ) |
|--------------------|---------------------|----------------------------------------------------|
| Silvestre          | 20190.24            | 26930                                              |
| E <sub>247</sub> A | 20132.21            | 26930                                              |
| D <sub>81</sub> A  | 20146.23            | 26930                                              |

#### **5.4.1 Evaluación de la actividad autoproteolítica.**

Se evaluó la capacidad de autoproteólisis de las muestras purificadas (silvestre y E<sub>247A</sub>) en presencia de cofactores metálicos y como indicio indirecto de su actividad enzimática se preparó una muestra de enzima a una concentración de 0.15 mg/ml en buffer C (Tris HCl 25 mM, NaCl 50 mM, pH= 7.5) y se le agregó el volumen necesario a partir de un stock de ZnSO<sub>4</sub> 1mM/CaCl<sub>2</sub> 625mM; para determinar el tiempo en el que se muestra dicha actividad se monitoreo durante 24 h y 48 h posteriores a la adición de sus cofactores y se incubó a 4 °C. Posterior a los tiempos de incubación se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción con Azul de Coomassie.

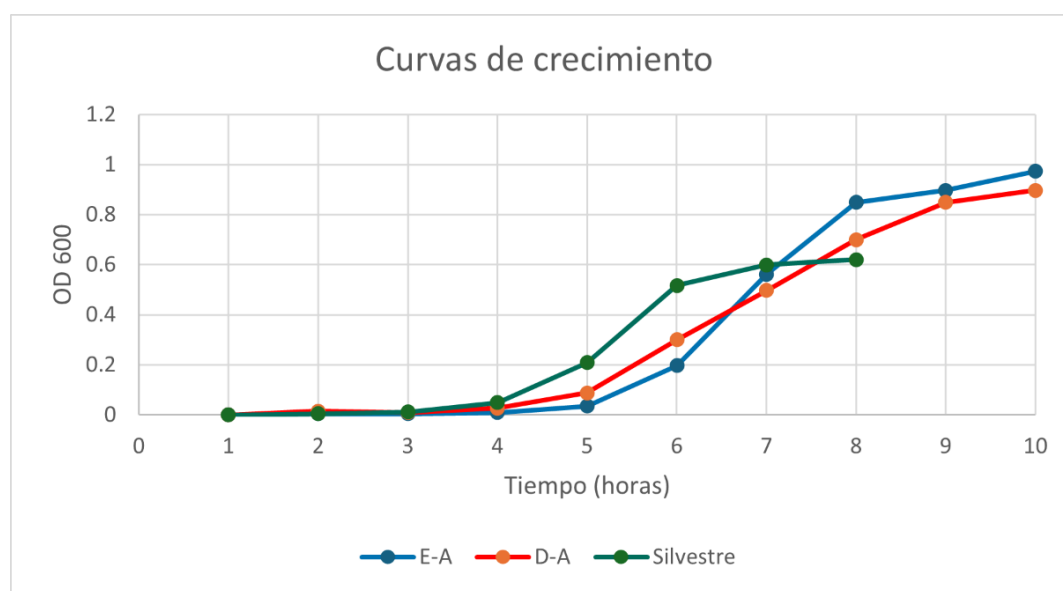
#### **5.4.2 Inhibición con Batimastat.**

Para determinar la capacidad de inhibición y concentración de Batimastat de la actividad autoproteolítica, una muestra de enzima (silvestre y E<sub>247A</sub>), fue llevada a una concentración de 0.15 mg/ ml en buffer C (Tris HCl 25 mM, NaCl 50 mM, pH= 7.5) y puesta en presencia de una concentración de 5μM de Batimastat (Sigma Aldrich) (Santiago Rubio, 2018) resuspendido en Dimetilsulfóxido (DMSO) absoluto [3mM]. Después de 24 y 48 horas de incubación a 4 °C sin agitación, se una electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción con Azul de Coomassie.

## 6 RESULTADOS

### Sobrexpresión de las proteínas recombinantes del dominio catalítico de MMP16 silvestre y mutantes E<sub>247</sub>A y D<sub>81</sub>A

Para determinar si las bacterias transformadas con las construcciones de MMP16 afectan su crecimiento, se siguió la densidad óptica a 600 nm (DO<sub>600</sub>) durante 24 horas (ver anexo, Tabla A1). Las curvas de crecimiento obtenidas mostraron diferencias en la cinética de crecimiento entre las variantes (Fig. 11). Durante las primeras horas de cultivo (0-4 h), las tres variantes se mantienen en fase latente de crecimiento, en la que las bacterias inician una adaptación metabólica previa al inicio de la división celular la cual es exponencial, que comienza a partir de las 5-6 horas.



**Figura 11. Curvas de crecimiento de las cepas silvestres (*E. coli* BL21), D81A (D-A) y E247A (E-A) monitoreadas a 600 nm durante la inducción con IPTG (1 mM).** La tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) se calculó a partir de la fase exponencial, utilizando los intervalos de 4–7 h para la cepa silvestre, 5–9 h para D81A y 5–8 h para E247A, seleccionados mediante la inspección de las curvas.

La cepa silvestre mostró un crecimiento más acelerado durante la fase exponencial alcanzando DO de ~0.5 a las 6 horas de crecimiento en comparación

con las mutantes, que iniciaron su crecimiento exponencial una hora después de la silvestre. Para cuantificar estas diferencias se calculó la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) utilizando los valores de  $DO_{600}$  correspondientes a la fase exponencial mediante la ecuación:

$$\mu = \frac{[\ln(OD_2) - \ln(OD_1)]}{(t_2 - t_1)}$$

Este parámetro permite cuantificar la velocidad de proliferación celular y comparar el desempeño de las variantes, valores altos de  $\mu$  indican crecimiento rápido y los valores bajos crecimiento lento.

Para la tasa específica de crecimiento  $\mu$ , se utilizó únicamente los intervalos correspondientes a la fase exponencial de cada variante. Para silvestre se consideró el intervalo comprendido entre las 5 y 2 horas, para D<sub>81</sub>A entre las 5 y 2 horas y para E<sub>247</sub>A entre las horas 6 y 8. La selección de estos intervalos se realizó a partir de la inspección de las curvas de crecimiento y de la región que presentó el comportamiento más cercano a un crecimiento exponencial

Como ejemplo, para la mutante E<sub>247</sub>A se utilizaron los valores registrados a las 3 y 6 horas de cultivo ( $DO_1=0.197$  y  $DO_2=0.897$ ), obteniendo:

$$\mu = \frac{[\ln(0.897) - \ln(0.197)]}{(8 - 5)} = \frac{-0.109 - (-1.624)}{(3)} = 0.505h^{-1}$$

Los cálculos completos de cada variante se presentan en la Tabla A3 del Anexo A. Los valores de  $\mu$  obtenidos para silvestre, D<sub>81</sub>A y E<sub>247</sub>A fueron 0.362, 0.274 y 0.505  $h^{-1}$ , respectivamente, lo que indica que la variante E<sub>247</sub>A presentó la mayor velocidad de crecimiento durante la fase exponencial (Tabla 7).

**Tabla 7 Parámetros cinéticos de crecimiento.**

| VARIANTE | $\mu(H^{-1})$ | TIEMPO DE DUPLICACIÓN (H) |
|----------|---------------|---------------------------|
|----------|---------------|---------------------------|

|                         |       |      |
|-------------------------|-------|------|
| <b>SILVESTRE</b>        | 0.362 | 1.91 |
| <b>D<sub>81</sub>A</b>  | 0.274 | 2.53 |
| <b>E<sub>247</sub>A</b> | 0.505 | 1.37 |

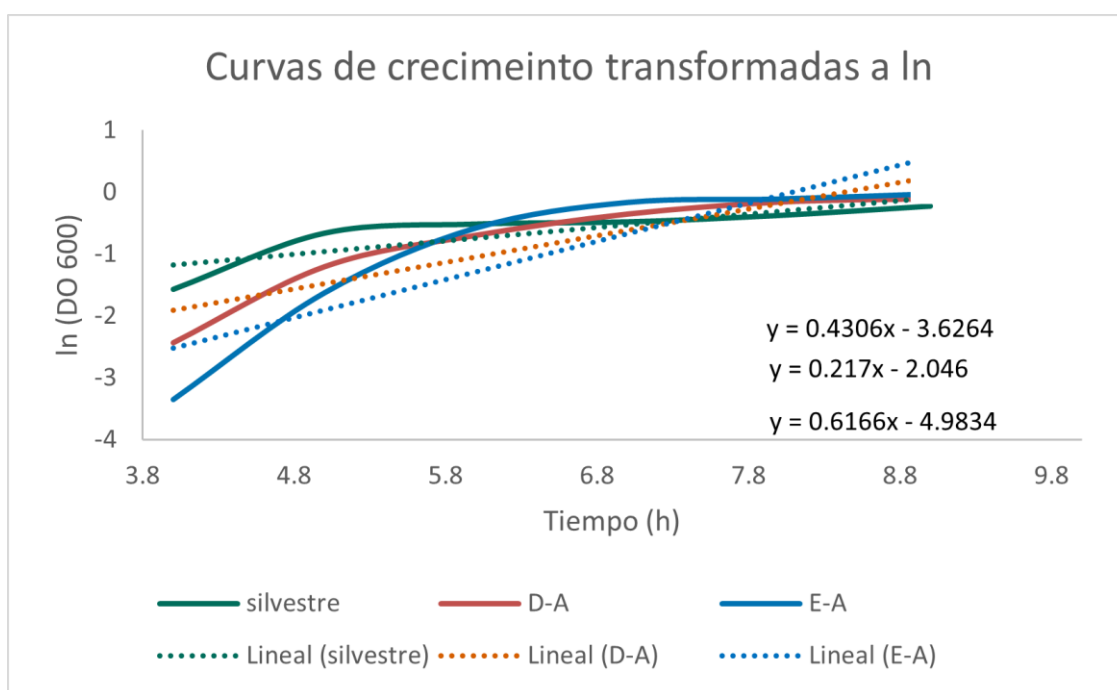
A partir de los valores obtenidos se calculó el tiempo de duplicación celular utilizando la ecuación  $g = \frac{\ln(2)}{\mu}$ , este parámetro representa el tiempo necesario para que la población bacteriana duplique su tamaño. La variante E<sub>247</sub>A presentó la mayor capacidad proliferativa durante la fase exponencial, con un tiempo de duplicación de 1.37 h, seguida por silvestre con 1.91h, mientras que D<sub>81</sub>A, presentó la menor velocidad de crecimiento, con 2.53h, bajo las condiciones experimentales evaluadas. Además, se calculó la velocidad instantánea de crecimiento mediante la derivada de  $\ln(DO_{600})$  respecto al tiempo (Tabla A2).

Este análisis permitió identificar los intervalos en los que las células crecieron más rápidamente y determinar el punto de máxima aceleración del crecimiento. El análisis mostró que las tres variantes alcanzaron su máxima velocidad de crecimiento entre las 4 y 5 horas de cultivo (Fig. 12). Posteriormente, la velocidad disminuyó progresivamente a medida que las poblaciones avanzaron hacia etapas posteriores del crecimiento. Este comportamiento es consistente con la transición desde la fase de adaptación a la fase exponencial observada en las curvas de crecimiento. Los valores completos de las derivadas calculadas se presentan en el Anexo A (Tabla A4).

Estas diferencias en la cinética de crecimiento podrían estar relacionadas con el impacto de las mutaciones en la fisiología celular, en particular el retraso inicial observado en E<sub>247</sub>A, sugiere mayor estrés celular durante las primeras etapas de expresión, pero un incremento acelerado de adaptación que le permitió alcanzar un mayor rendimiento final (mayor biomasa, ~1.0 DO); silvestre por otro lado, muestra un crecimiento temprano más eficiente, generando menor estrés celular inicial pero

alcanza una meseta más baja (0.6 DO), lo que podría estar relacionado con limitaciones metabólicas, por su parte, la mutante D<sub>81</sub>A mostró una cinética de crecimiento intermedia, con un incremento gradual, los valores finales de densidad celular fueron menores a los registrados para E<sub>247</sub>A (~0.9 DO).

Las diferencias observadas sugieren que las mutaciones en el sitio catalítico no solo afectan la actividad enzimática, sino que también pueden influir en la dinámica de crecimiento celular durante la sobreexpresión, lo cual es un factor relevante a considerar para la optimización de las condiciones de producción de la proteína.

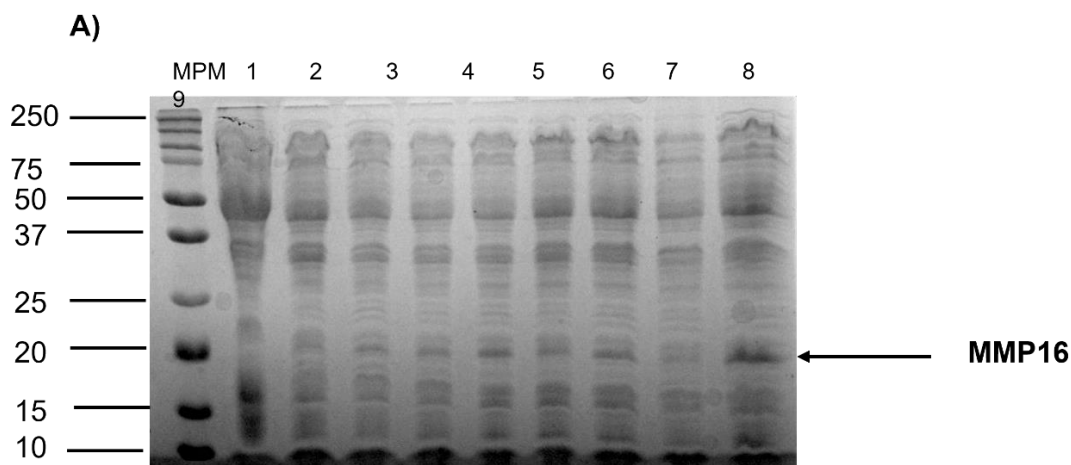


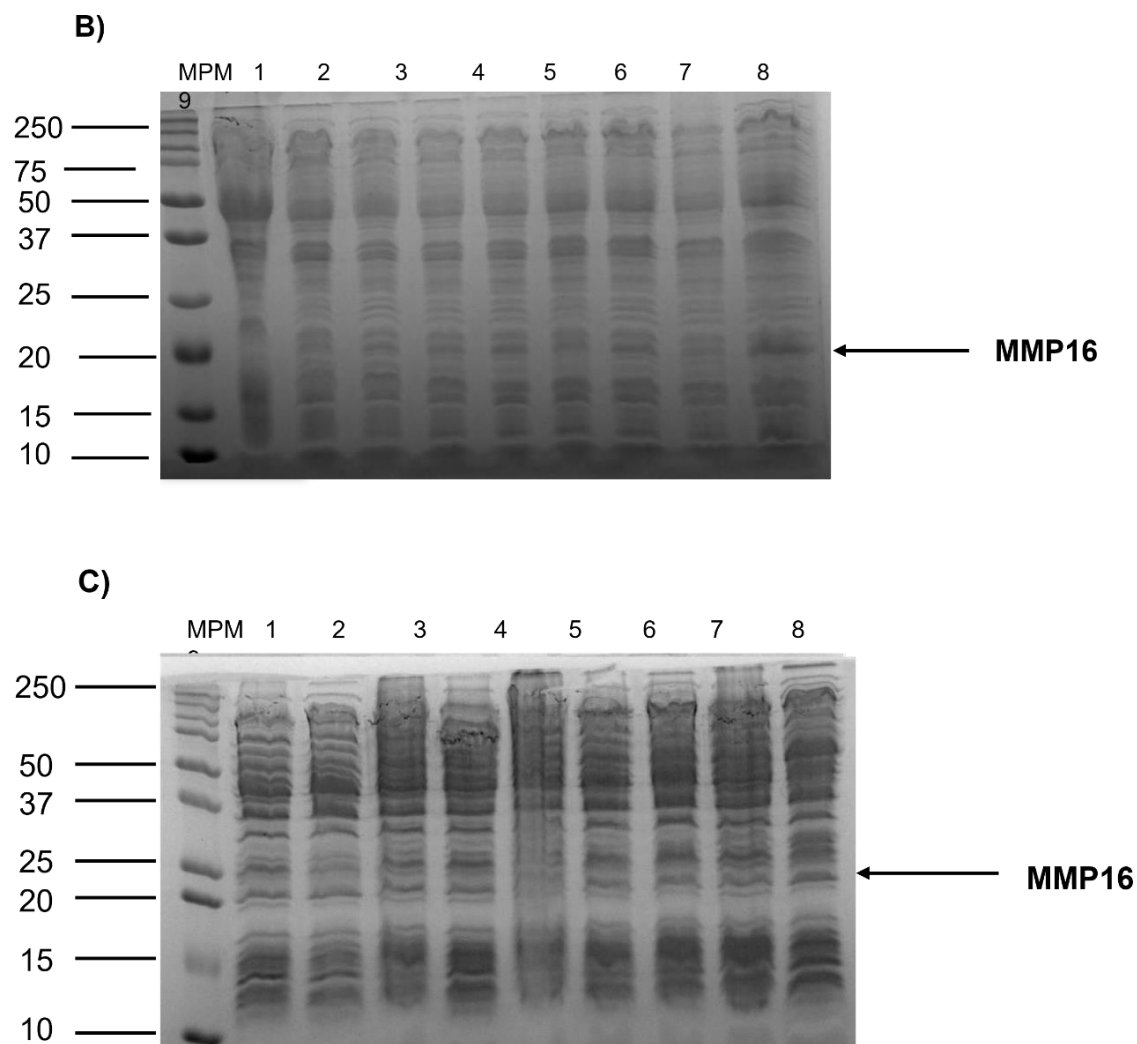
**Figura 12. Curvas de crecimiento transformadas a ln (DO600) de las variantes durante la fase exponencial.** La linealización de los datos permitió evaluar cuantitativamente la cinética de crecimiento bacteriano mediante el cálculo de la tasa específica de crecimiento. La pendiente de cada ajuste lineal corresponde a la velocidad de crecimiento promedio de cada construcción durante la fase exponencial.

- **Comprobación de la inducción**

Posterior a la optimización de los tiempos y crecimiento en medio líquido suplementado con Kanamicina, se procedió a inducir la sobreexpresión de MMP16

y sus variantes mutantes mediante la adición de IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido). Este compuesto actúa como un análogo no metabolizable de la lactosa que se une al represor Lac I<sup>+</sup>, permitiendo la activación del promotor y la transcripción del gen de interés. La inducción se realizó una vez alcanzada la fase exponencial de crecimiento bacteriano, ya que en esta etapa las células presentan una elevada actividad metabólica, lo que favorece una mayor producción de proteína recombinante. Sin embargo, la expresión heteróloga puede representar una carga metabólica para las bacterias, lo que afecta su velocidad de crecimiento y viabilidad celular. Por ello, la optimización previa de las condiciones de cultivo resultó fundamental para equilibrar el crecimiento bacteriano y la producción de proteína recombinante. La sobreexpresión de MMP16 y sus mutantes inducidas con IPTG se comprobó mediante una SDS-PAGE al 15% y tinción con azul de Comassie. La banda señalada corresponde al peso molecular teórico esperado (~21 KDa) (Fig. 13).





**Figura 13 Análisis por SDS- PAGE de la sobreexpresión de dcMMP16, silvestre,  $E_{247}A$  y  $D_{81}A$ .**  
 A) Proteína silvestre, B) mutante  $E_{247}A$ , C) mutante  $D_{81}A$ . Se muestran los perfiles electroforéticos de las muestras recolectadas en los distintos tiempos postinducción (24 horas). La banda señalada alrededor de ~21 kDa corresponde a dcMMP16 recombinante.

- **Purificación del dcMMP16 humano y sus variantes**

Con el objetivo de obtener proteínas homogéneas, evaluar su estabilidad y estado oligomérico, las fracciones solubles obtenidas tras la sonicación de la silvestre y de sus mutantes (E<sub>247A</sub>) fueron purificadas mediante cromatografía de afinidad a níquel (Ni<sup>2+</sup>) seguida de cromatografía de exclusión molecular (SEC).

### **Purificación por cromatografía de afinidad a níquel**

La primera etapa consistió en la separación de las proteínas recombinantes mediante cromatografía de afinidad a Ni<sup>2+</sup>, aprovechando la interacción específica entre la etiqueta His<sub>6</sub> recombinante y la resina cargada con iones metálicos. Inicialmente, la muestra se cargó en condiciones de baja concentración de imidazol para favorecer la unión de las proteínas de interés a la matriz, mientras que las proteínas inespecíficas fueron eliminadas en las etapas de lavado. Posteriormente, la elución se llevó a cabo incrementando la concentración de imidazol en la fase B, lo que permitió la recuperación de las proteínas recombinantes. La elución se indujo mediante un amortiguador que contenía imidazol, lo que permitió recuperar las fracciones con mayor contenido de dcMMP16.

En el caso de silvestre dcMMP16, se partió de un volumen inicial de 37 ml de extracto soluble clarificado, del cual se recuperaron 20 ml de muestra eluída. El análisis por SDS- PAGE reveló una banda de mayor intensidad en las fracciones 4 y 6. De manera consistente, el cromatograma mostró un pico de elución bien definido entre 4.8- 5.0 ml de volumen de retención, lo que indica una recuperación eficiente de las proteínas de interés.

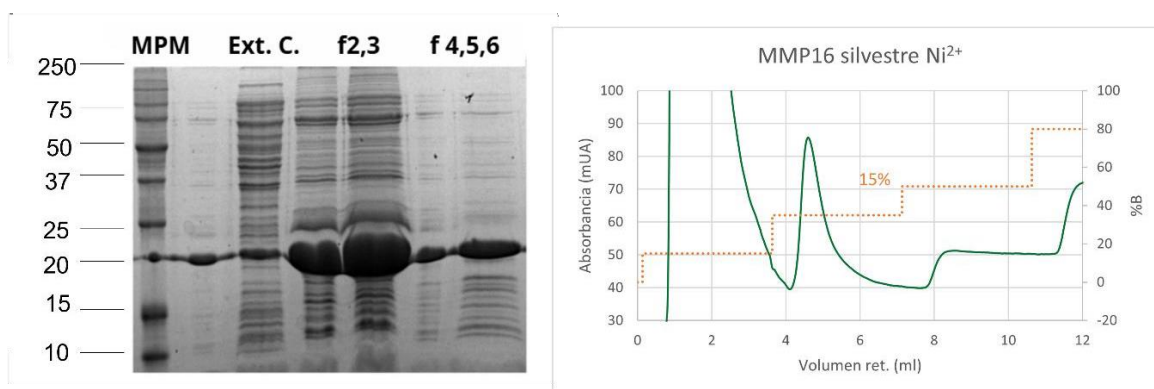
Para la mutante catalítica E<sub>247A</sub> se procesó igualmente un volumen inicial de 37 ml, recuperándose 20 ml posteriores a la elución. En este caso, las fracciones 2, 3 y 4, así como la fracción 5 individual, mostraron una banda intensa y una menor presencia de proteínas contaminantes en comparación con el extracto crudo. El cromatograma correspondiente presentó un pico principal de absorbancia de 17.5- 18 ml, seguido de una cola de elución decreciente, lo que sugiere una adecuada

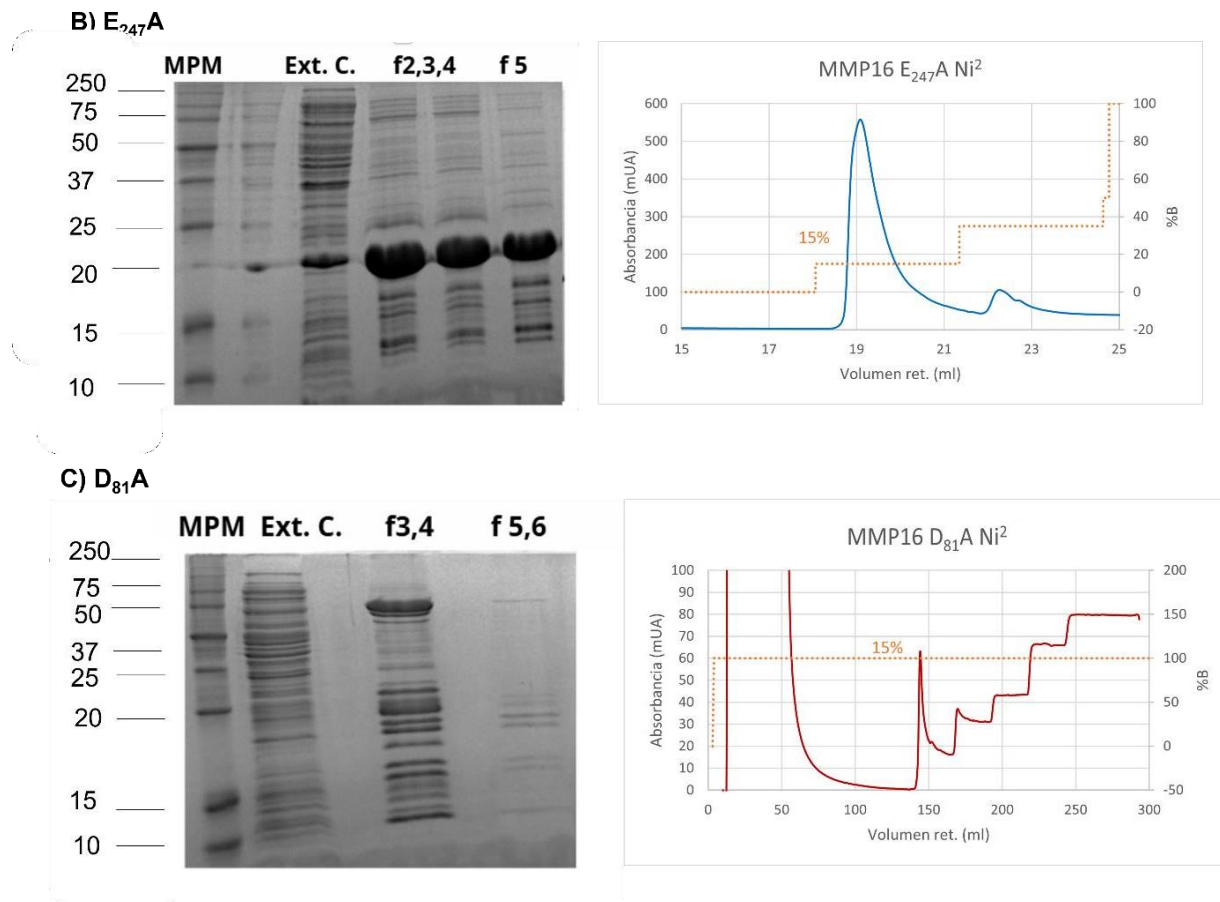
interacción de la proteína con la resina y una liberación concentrada a lo largo del gradiente de imidazol.

En contraste, la variante D<sub>81</sub>A mostró un comportamiento menos favorable durante esta etapa. A partir de un volumen inicial de 14 ml de extracto soluble se obtuvieron 10 ml de fracción eluída. Aunque en el SDS-PAGE fue posible identificar una banda en el intervalo esperado para dcMMP16 en las fracciones 3,4 y 5,6, la intensidad de dicha banda fue considerablemente menor. Adicionalmente, el cromatograma presentó un pico ancho y de baja amplitud, lo que refleja una recuperación reducida y, posiblemente, una menor estabilidad de la proteína durante el proceso cromatográfico (Fig. 14).

La composición de imidazol correspondiente al punto de elución de las proteínas recombinantes se estimó a partir de la composición de los amortiguadores empleados en la cromatografía de afinidad a níquel. Considerando una concentración de 25 mM de imidazol en el Buffer A y 500 mM en el Buffer B, la elución observada al 15% de Buffer B corresponde a una concentración de 96.25 mM de imidazol. Tanto la proteína silvestre como las variantes fueron recuperadas en este intervalo de concentración, lo que indica que las tres conservan una afinidad comparable por la resina de níquel mediada por la etiqueta de His<sub>6</sub>.

#### A) Silvestre





**Figura 14 Perfil cromatográfico y análisis electroforético (SDS-PAGE 15%) de la purificación por afinidad a níquel de dcMMP16 silvestre, E<sub>247</sub>A y D<sub>81</sub>A.** (A) MMP16 silvestre, (B) mutante E<sub>247</sub>A y (C) mutante D<sub>81</sub>A. En cada panel se muestra el cromatograma de elución (derecha), donde la línea continua representa la absorbancia a 280 nm y la línea punteada el porcentaje de fase B (%B) empleado durante el gradiente de elución con imidazol. A la izquierda se presentan los geles SDS-PAGE correspondientes a las muestras obtenidas durante el proceso de purificación: marcador de peso molecular (MPM), extracto crudo (Ext.) y las fracciones de elución indicadas (f). Las fracciones con mayor enriquecimiento de la proteína recombinante fueron seleccionadas para los experimentos posteriores.

## Purificación por cromatografía de exclusión molecular

La cromatografía de exclusión molecular (SEC, por sus siglas en inglés) es una técnica de separación que discrimina moléculas en función de su radio hidrodinámico. A diferencia de otros métodos cromatográficos, las moléculas no interactúan específicamente con la matriz de la columna, sino que se separan según su capacidad para difundir a través de los poros de una resina constituida por

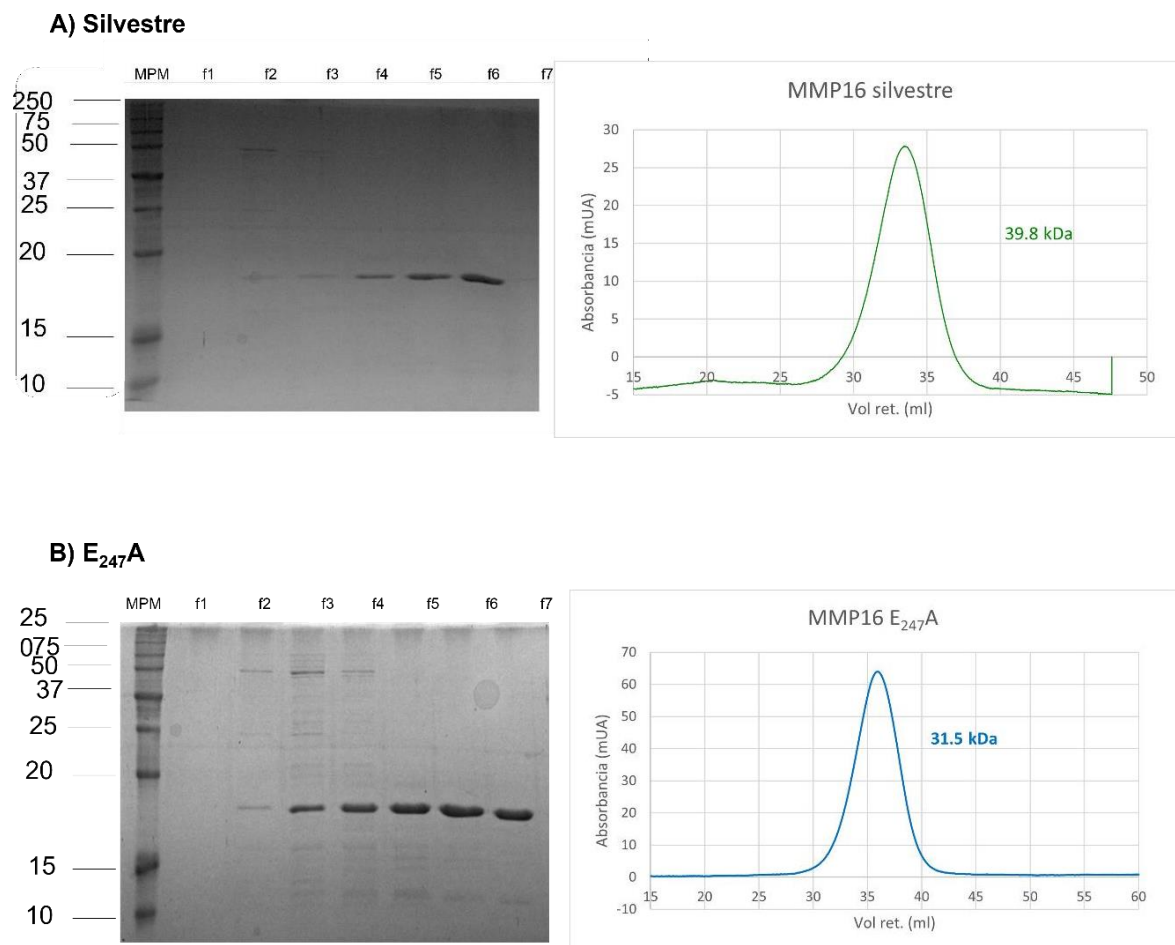
partículas esféricas porosas químicamente y físicamente estables, diseñadas para minimizar la adsorción inespecífica de proteínas. Como consecuencia las moléculas de mayor tamaño tienen un acceso limitado a los poros de la matriz cromatográfica y eluyen primero, mientras que las moléculas más pequeñas penetran en dichos poros y presentan tiempos de retención mayores. Esta estrategia permite separar proteínas monoméricas de agregados, oligómeros o contaminantes de diferentes pesos moleculares, lo que permite obtener poblaciones más homogéneas.

Debido a la estabilidad dcMMP16 silvestre y E<sub>247A</sub> tras la purificación por afinidad, ambas preparaciones fueron reconcentradas hasta un volumen de 10 ml y sometidas a cromatografía de exclusión molecular con el objetivo de obtener poblaciones más homogéneas y eliminar posibles especies de agregados o contaminantes de distinto tamaño molecular.

Para dcMMP16 silvestre, el análisis electroforético de las fracciones obtenidas en la primera corrida de SEC mostró una banda tenue en las primeras fracciones, mientras que se intensificó notablemente en las fracciones 4, 5 y 6, lo que indica que estas contenían la mayor proporción de proteína de interés. El cromatograma correspondiente mostró dos poblaciones de elución: un hombro o pico secundario entre 24-28 ml, seguido de un pico principal centrado entre 34-36 ml. Con base en ello, las fracciones enriquecidas fueron reconcentradas y sometidas a una segunda corrida de SEC, en la cual se observó un único pico estrecho y simétrico alrededor de 34 ml, consistente con una preparación significativamente más homogénea.

En el caso de la mutante E<sub>247A</sub>, el SDS- PAGE de la primera corrida mostró que las fracciones 1-4 contenían escasa proteína detectable, mientras que las fracciones 5,6 y 7 se mostró claramente definida e intensa. Estas fracciones fueron seleccionadas para reconcentración y análisis posterior. El cromatograma de la primera SEC mostró igualmente la presencia de dos poblaciones: una señal de menor intensidad entre ~24 y 30 ml y un pico principal de mayor absorbancia alrededor de 34-36 ml, lo que indicó heterogeneidad en la muestra inicial. Tras la reconcentración de las fracciones 5-7 y su reinyección en la columna, la segunda

corrida presentó un solo pico cromatográfico predominante, estrecho y simétrico, indicando el enriquecimiento de una población proteica uniforme y la eliminación de especies de distinto tamaño (Fig. 15).



**Figura 15 Análisis por SDS- PAGE y cromatografía de exclusión molecular dcMMP16 silvestre y mutante E<sub>247</sub>A.** A) Fracciones obtenidas durante la purificación de dcMMP16 silvestre por SEC y su cromatograma correspondiente. B) Fracciones obtenidas para la mutante E<sub>247</sub>A y su cromatograma correspondiente. En ambos casos, las fracciones asociadas al pico principal de absorbancia presentaron una banda predominante cercana a 25kDa. Las fracciones enriquecidas fueron empleadas en los experimentos subsecuentes.

En conjunto, la estrategia secuencial de purificación permitió recuperar de manera eficiente las variantes dcMMP16 silvestre y E<sub>247</sub>A, ambas con una masa aparente cercana a ~21 kDa y con perfiles cromatográficos consistentes con la obtención de especies solubles y homogéneas tras la segunda corrida de SEC.

En contraste, la variante D<sub>81</sub>A mostró una migración electroforética retardada acompañada de una banda enriquecida por encima de los 100 kDa, lo que sugiere la posible formación de especies oligoméricas o agregados de alto peso molecular. Este comportamiento se correlacionó durante la reconcentración de la muestra. De hecho, la proteína adquirió progresivamente una apariencia turbia y de aspecto lechoso, compatible con procesos de agregación, lo que imposibilitó su procesamiento y posterior caracterización. Estos resultados sugieren que la sustitución de Asp<sub>81</sub> compromete significativamente la estabilidad estructural.

- **Determinación del peso molecular aparente y estado oligomérico de dcMMP16 silvestre y E<sub>247</sub>A.**

Con el fin de estimar el peso molecular aparente de las proteínas purificadas y establecer su estado oligomérico predominante en solución, se calibró la columna de exclusión molecular con proteínas estándar de masa molecular conocida: albúmina (130 kDa), peroxidasa (44 kDa), mioglobina (17 kDa) y citocromo (12 kDa). A partir de los valores de volumen muerto ( $V_0 = 36$  ml) y volumen total de la columna ( $V_t = 120$  ml); se calculó para cada estándar el coeficiente de partición cromatográfica ( $K_{av}$ ), obteniéndose valores de 0.45 para albúmina, 0.27 para peroxidasa, 0.35 para mioglobina y 0.12 para citocromo (Fig. 16A).

A partir de los valores de coeficiente de partición cromatográfica obtenidos para cada estándar, se generó la relación lineal entre  $K_{av}$  y el logaritmo del peso molecular ( $\lg M_w$ ), obteniéndose la ecuación de regresión  $y = -0.2886x + 1.6028$  con un coeficiente de correlación  $R^2 = 0.9674$ . La cual permitió interpolar los coeficientes correspondientes a dcMMP16 silvestre y a la mutante E<sub>247</sub>A a partir de sus volúmenes de elución registrados en la segunda corrida cromatográfica.

Para la variante dcMMP16 silvestre se obtuvo un volumen de elución ( $V_e$ ) de 59.084 ml, mientras que para la mutante E<sub>247</sub>A el máximo de elución se registró en 61.55 ml. Sustituyendo estos valores en la ecuación de partición cromatográfica:

$$K_{av} (WT) = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} = \frac{59.084 \text{ ml} - 36 \text{ ml}}{120 \text{ ml} - 36 \text{ ml}} = \mathbf{0.275}$$

$$K_{av} (E - A) = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} = \frac{61.55 \text{ ml} - 36 \text{ ml}}{120 \text{ ml} - 36 \text{ ml}} = \mathbf{0.304}$$

Interpolar

$$y = -0.2886x + 1.6028$$

Donde:  $y = K_{av}$

$$X = \lg M\omega$$

$$K_{av} = -0.2886(\lg M\omega) + 1.6028$$

Sustituyendo:

$$(WT) 0.275 = -0.2886(x) + 1.6028$$

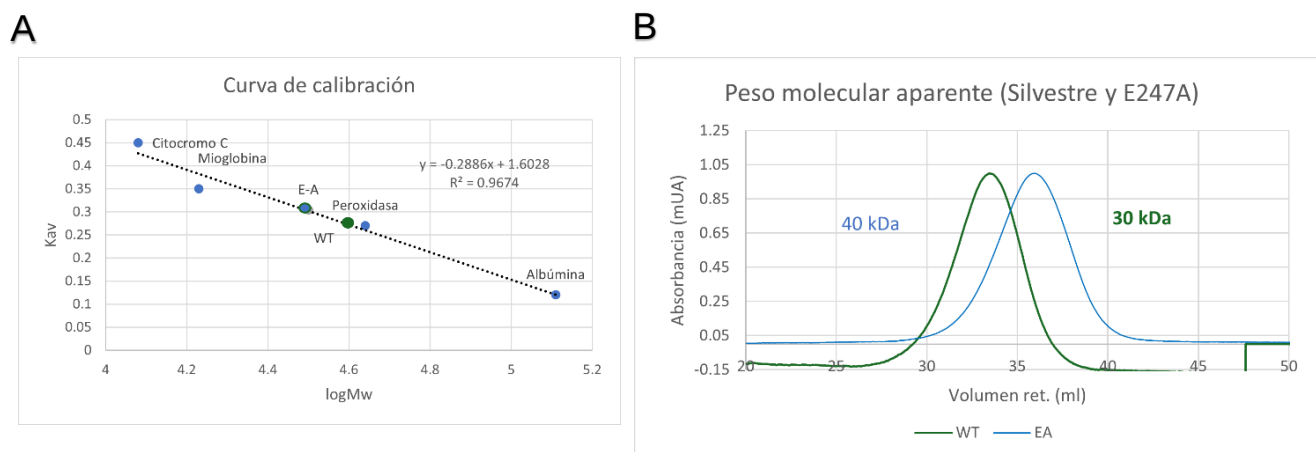
$$(E - A) 0.304 = -0.2886(x) + 1.6028$$

Despejamos:

$$(WT) x = \frac{0.275 - 1.6028}{-0.2886} = 4.6$$

$$(E - A) x = \frac{0.304 - 1.6028}{-0.2886} = 4.5$$

La interpolación de dichos valores de  $\lg M\omega$  de 4.6 para silvestre y 4.5 para E<sub>247</sub>A, correspondientes a pesos moleculares aparentes de 40 kDa y 30kDa, respectivamente (Fig. 16B).



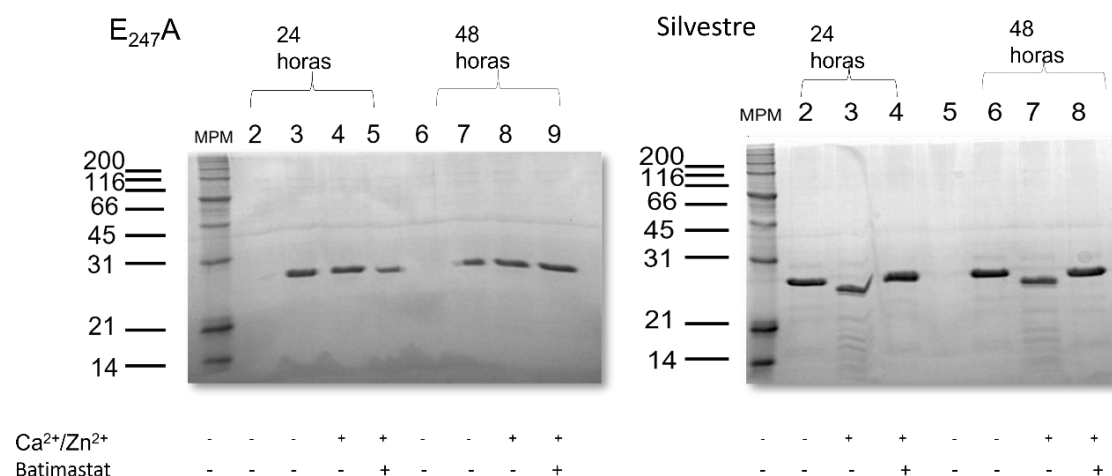
**Figura 16 Determinación del peso molecular aparente y estado oligomérico.** A) Curva de calibración de la columna de exclusión molecular construida a partir de proteínas estándar y utilizada para interpolar los valores de  $K_{av}$  obtenidos para dcMMP16 silvestre y E<sub>247</sub>A. B) Cromatogramas de la segunda corrida de exclusión molecular de ambas proteínas, los volúmenes permitieron estimar pesos moleculares aparentes de 40 para el dominio silvestre y 30 kDa para el dominio E<sub>247</sub>A respectivamente.

- **Rendimiento de proteína** La concentración final de las proteínas purificadas se determinó mediante absorbancia a 280 nm utilizando los coeficientes de extinción teóricos calculados a partir de las secuencias de aminoácidos. Para la obtención de cada proteína se partió de 1L de medio LB bajo las condiciones de expresión previamente optimizadas. La proteína silvestre presentó una concentración final de 0.163 mg/ml, mientras que la variante E<sub>247</sub>A 1.61mg/ml.
- **Evaluación de la actividad autoproteolítica de dcMMP16 silvestre y E<sub>247</sub>A en presencia de cofactores metálicos e inhibidor.**

Con el objetivo de determinar si la sustitución del residuo E<sub>247</sub> afecta la funcionalidad del dcMMP16, ambas proteínas fueron incubadas en presencia de presencia de sus cofactores Ca<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup> durante 24 y 48 horas. Posterior al periodo de incubación, se determinó su actividad autoproteolítica mediante SDS-PAGE; como se aprecia en la figura 17, la proteína silvestre presenta bandas de bajo peso molecular las cuales son producto de su actividad autoproteolítica. En contraste, en los carriles correspondientes a la mutante E<sub>247</sub>A no se observó autoproteólisis de la

proteína en ninguno de los tiempos de incubación. Este experimento demuestra que la proteína silvestre conserva un sitio activo funcional después del proceso de expresión y purificación, mientras que la ausencia de fragmentación visible en E<sub>247</sub>A, sugiere que la sustitución de glutámico 245 es relevante para la catálisis de la MMP16. En paralelo, se evaluó el efecto inhibitorio de Batimastat, el cual es un inhibidor hidroxamato de amplio espectro cuyo mecanismo de acción se basa en la coordinación directa de su grupo hidroxamato con el ion Zn<sup>2+</sup> presente en el sitio activo de las metaloproteasas (Fig. 17). Para estos experimentos, se empleó una concentración de 5μM de inhibidor la cual es una concentración ya estandarizada en el laboratorio para inhibir la actividad de la MMP16.

El tratamiento mostró como Batimastat inhibe la autoproteólisis de la proteína silvestre manteniendo su integridad igual que la proteína en ausencia de sus cofactores. En contraste, no se observó efecto en la mutante E<sub>247</sub>A lo cual es coherente con su estado catalíticamente inactivo.



**Figura 17 Análisis del comportamiento proteolítico de la proteína dcMMP16 silvestre y la mutante E<sub>247</sub>A**, incubadas durante 24 y 48 horas bajo diferentes condiciones. Las muestras fueron evaluadas mediante SDS- PAGE al 15% bajo condiciones desnaturalizantes. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular (kDa). En ambos casos, las muestras se evaluaron en ausencia (-) o presencia (+) de cofactores metálicos (Ca<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup>), así como en ausencia (-) o presencia de Batimastat (5μM)). La proteína silvestre mostró fragmentación compatible con autoproteólisis en presencia de cofactores, la cual disminuye con el inhibidor. A diferencia, la mutante E<sub>247</sub>A presenta una banda predominante sin fragmentación, independientemente de las condiciones evaluadas, lo que confirma la pérdida de actividad enzimática y la ausencia de autoproteólisis.

## 7 DISCUSIÓN

La progresión tumoral depende de una compleja interacción entre las células cancerosas y los distintos componentes de su microambiente (Kessenbrock et al., 2010). En este contexto, la MMP16 ha sido asociada con diversos tipos de cáncer, incluidos los de piel, hígado, pulmón, ovario, hueso, endometrio y páncreas, así como con melanoma. En muchos de estos tumores, la sobreexpresión de MMP16 se correlaciona con un pronóstico desfavorable y una menor supervivencia de los pacientes, atribuyendo su participación en procesos relacionados con la proliferación celular y la metástasis (Fig. 8). Al respecto, diversos estudios han demostrado que distintas especies de microARN regulan negativamente la expresión de MMP16, reduciendo con ello la capacidad proliferativa y migratoria de las células tumorales. Por ejemplo, en líneas celulares de cáncer pancreático, el miR-146b-5p disminuye la expresión de MMP16, lo que se traduce en una reducción significativa de la migración celular (Lin et al., 2011). De manera similar, en células SKOV3 de cáncer de ovario resistentes a cisplatino, un fármaco ampliamente utilizado en quimioterapia, el miR-145 suprime la expresión de MMP16, inhibiendo tanto la proliferación como la migración celular (Chen, 2021).

Asimismo, en líneas celulares de hematoma, el eje Circ\_0013290/miR-139-5p regula la expresión de MMP16 y limita la migración celular (Chang et al., 2021). De forma análoga, en células MKN-45 derivadas de cáncer gástrico, las transfectadas con el miR-193a-5p y tratadas con 5-fluorouracilo (5-FU) mostró la reducción en la expresión de la MMP16 disminuyendo la capacidad invasiva de estas células (Almatrafi et al., 2024).

Por otro lado, el análisis comparativo de la expresión de diferentes MMPs en muestras de pacientes con melanoma de distintos estadios mostró que los niveles de ARNm de MMP16 se incrementan más de ocho veces en melanomas metastásicos respecto a tejidos normales y a lesiones en estadios tempranos, lo que sugiere una posible asociación entre la sobreexpresión de esta metaloproteinasa y la progresión tumoral (Tatti et al., 2011).

La relevancia clínica de MMP16 también ha sido documentada en el carcinoma renal de células claras (KIRC, por sus siglas en inglés). Mediante análisis de redes de interacción génica, secuenciación y validación por PCR, se observó que las MMP2, MMP9, MMP12 y MMP16 presentan niveles elevados de expresión, por lo que fueron propuestas como biomarcadores potenciales de este tipo de cáncer (Li et al., 2025).

Considerando la evidencia que identifica a MMP16 como un marcador asociado con la progresión tumoral y la metástasis, resulta pertinente profundizar en su caracterización bioquímica y estructural. Estos estudios podrían proporcionar las bases para el desarrollo racional de moléculas dirigidas contra esta proteína, con el objetivo de limitar la progresión del cáncer y mejorar el pronóstico y la supervivencia del paciente.

Con el fin de evaluar el posible efecto de las mutaciones E<sub>247</sub>A y D<sub>81</sub>A sobre las características bioquímicas de la MMP16, se monitorizaron las curvas de crecimiento de los cultivos bacterianos que expresaban la proteína silvestre y sus variantes. Dado que la expresión de proteínas mal plegadas puede comprometer el crecimiento celular al favorecer la agregación proteica y generar estrés metabólico (Baneyx & Mujacic, 2004), las alteraciones observadas en la cinética de crecimiento se consideraron un indicador indirecto de posibles cambios en el plegamiento y la estabilidad de las proteínas. Tanto las curvas de crecimiento como las tasas de crecimiento calculadas sugieren que las mutaciones evaluadas imponen un costo fisiológico asociado a su expresión. Este efecto fue más evidente en la variante D<sub>81</sub>A, que mostró una fase exponencial prolongada antes de alcanzar la fase estacionaria. Por su parte, la mutante E<sub>247</sub>A también presentó una fase exponencial más extensa que la proteína silvestre; sin embargo, su velocidad de crecimiento fue mayor que la observada para D<sub>81</sub>A, lo que sugiere un menor impacto sobre la fisiología celular y, por tanto, un menor estrés metabólico asociado a su expresión. Estos resultados son consistentes con los análisis por SDS-PAGE, en los que tanto la proteína silvestre como la variante E<sub>247</sub>A mostraron una expresión clara en los extractos crudos, evidenciada por la presencia de una banda correspondiente al

peso molecular esperado. En contraste, la variante D<sub>81</sub>A presentó una intensidad de banda mucho menor que indica que la proteína tiene bajos niveles de expresión. Sin embargo, en este estudio fue posible obtener las tres proteínas en estado soluble sin necesidad de un proceso de replegamiento. Cabe destacar que, en las fracciones de elución con imidazol de la variante D<sub>81</sub>A, se detectó una banda enriquecida de mayor peso molecular que no fue observada en las preparaciones de la proteína silvestre ni de la variante E<sub>247</sub>A. Este comportamiento sugiere que la mutación D<sub>81</sub>A podría reducir la estabilidad de la proteína y promover su agregación durante o después del proceso de purificación.

Por otra parte, la obtención de la proteína silvestre y de la variante E<sub>247</sub>A en estado soluble resulta de particular interés, ya que contrasta con lo reportado para otros dominios catalíticos recombinantes de metaloproteinasas, en dichos estudios reportaron que las proteínas se recuperaron a partir de cuerpos de inclusión con subsecuentes métodos de solubilización y replegamiento para obtener proteína funcional (Parkar et al., 2000), (Zhang et al., 2023), (English et al., 2001), (Li et al., 2014). Además, en los dos estudios de caracterización estructural y bioquímica del dominio catalítico de MMP16 humana, la proteína recombinante fue obtenida mediante procedimientos de solubilización y replegamiento (Lang et al., 2004), (Meng et al., 2016). Esta diferencia podría estar relacionada con el diseño de las construcciones empleadas en el presente trabajo, las cuales siempre mantuvieron en el extremo N-terminal la etiqueta de His<sub>6</sub> y el sitio de corte de la proteasa TEV los cuales no fueron removidos durante la purificación. La presencia de estos elementos podría contribuir a la solubilidad observada.

Con respecto al estado oligomérico de las MMPs y la comparación con nuestros datos obtenidos mediante SEC, 13 de las 26 MMPs ya han sido cristalizadas en forma apo o en presencia de ligandos, y en todos los casos el ensamble biológico corresponde a una especie monomérica (PDB: 3SHI, 3AYU, 4JA1, 7WXX, 3DPF, 1L6J, 9CSX, 5D3C, 2OZR, 5H0U, 1RM8 y 2JSD). Así mismo el dominio catalítico de MMP16 ha sido purificado como un monómero de 19 kDa

que es catalíticamente activo (Meng et al., 2016). En conjunto, estas observaciones sugieren que cada monómero constituye una unidad catalítica funcional.

No obstante, diversos estudios han mostrado que algunas metaloproteinasas de membrana (MT-MMPs) pueden formar homodímeros y heterodímeros con otras MMPs. Por ejemplo, en el caso de MT1-MMP (MMP14), se ha descrito la dimerización en la superficie celular para llevar a cabo la activación de la proMMP2, así como para la degradación de colágeno. Por lo tanto, aunque el monómero parece ser suficiente para la actividad catalítica, la capacidad de oligomerización podría desempeñar funciones regulatorias relacionadas con la localización, activación y actividad fisiológica de estas enzimas (Itoh et al., 2006), (Itoh, 2015).

En este contexto, los resultados obtenidos de masa molecular aparente medida en SEC, sugieren que el dominio catalítico de la MMP16 silvestre tiende a una forma dimérica. En contraste, la variante E<sub>247</sub>A presentó una masa aparente cercana a la esperada para el monómero, lo que sugiere que esta mutación podría favorecer el desplazamiento del equilibrio hacia la forma monomérica. Sin embargo, debido a que no se realizaron experimentos de cromatografía de exclusión molecular en función de la concentración de proteína, no fue posible descartar que las diferencias observadas reflejen en parte, un efecto dependiente de la concentración sobre el estado de oligomerización. En este sentido, se deberán realizar en subsecuentes estudios, experimentos de cromatografía de exclusión molecular acoplada a dispersión de luz multiángulo (SEC-MALS) que permitirán determinar con mayor precisión la masa molecular de las especies presentes en solución y establecer su estado oligomérico. Así mismo, la comparación entre las proteínas con y sin la etiqueta de His<sub>6</sub> proporcionará información sobre la posible influencia de este segmento en su comportamiento hidrodinámico y en su tendencia a oligomerizarse.

Por otro lado, en el laboratorio, se estandarizaron las condiciones experimentales para evaluar tanto la actividad autoproteolítica como la actividad catalítica de MMP16 utilizando el péptido modificado SF-6 como sustrato (Santiago-Rubio,

2018). Las constantes cinéticas obtenidas fueron consistentes con las previamente reportadas por Meng y colaboradores, lo que valida el sistema experimental utilizado y confirma que la proteína silvestre purificada conserva las propiedades catalíticas (Meng et al., 2016).

Sin embargo, debido al objetivo de realizar estudios estructurales de complejos proteína-ligando, la actividad autoproteolítica representó un reto para mantener la integridad de la muestra. Con base en estrategias previamente empleadas en otras metaloproteinasas de matriz, se consideró la sustitución del glutámico catalítico por alanina como una alternativa para inactivar la enzima sin comprometer su estructura. De hecho, la estructura cristalográfica del dominio catalítico de la MMP2 (PDB: 3AYU) fue resuelta con esta mutación (Hashimoto *et al.*, 2011). En este sentido, no existen reportes que describan el efecto de la sustitución del glutámico catalítico sobre la actividad autoproteolítica de alguna MMP. Tampoco se han realizado estudios que evalúen el efecto de un inhibidor no selectivo, como Batimastat, sobre este proceso. En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo respaldan la hipótesis de que la autoproteólisis de MMP16 es un mecanismo mediado por su propio sitio activo. Por el momento, este es el primer estudio en el que se modifica racionalmente el sitio activo de MMP16 con el propósito de incrementar la estabilidad de la proteína y facilitar su producción recombinante. Por ello, los hallazgos aquí presentados no solo contribuyen a la comprensión de los mecanismos que regulan la estabilidad de esta metaloproteinasa, sino que también proporcionan una plataforma experimental para futuros estudios bioquímicos, estructurales y funcionales orientados a la caracterización de MMP16 y al desarrollo de estrategias dirigidas a su inhibición.

## 8 CONCLUSIÓN

En este trabajo se logró expresar, purificar y caracterizar funcionalmente la metaloproteasa MMP16 humana y sus mutantes catalíticos E→A y D→A, cumpliendo con los objetivos planteados.

Los resultados obtenidos sugieren:

1. La sustitución del residuo Glu<sub>247</sub> no produce cambios evidentes en los niveles de expresión, la solubilidad ni el comportamiento cromatográfico de la proteína; sin embargo, se asocia con la pérdida de la actividad autoproteolítica, lo que respalda la participación de este residuo en el mecanismo catalítico de la enzima.
2. La variante D<sub>81</sub>A mostró una marcada tendencia a la agregación y un comportamiento diferente durante los procesos de purificación, lo que sugiere que Asp<sub>81</sub> desempeña un papel importante en el mantenimiento de la arquitectura tridimensional del dominio catalítico y en la correcta organización de elementos estructurales cercanos al sitio activo.
3. Los resultados obtenidos apoyan la existencia de una contribución funcional diferenciada de los residuos estudiados: Glu<sub>247</sub> participa directamente en la catálisis, mientras que Asp<sub>81</sub> contribuye principalmente a la estabilidad estructural necesaria para mantener una conformación catalíticamente competente.
4. Los ensayos realizados con Batimastat indican diferencias en la respuesta entre la proteína silvestre y la variante mutante E<sub>247</sub>A, aportando información adicional sobre el efecto de esta modificación en el sitio activo.
5. Este trabajo proporciona evidencia experimental sobre la relación estructura - función en MMP16 humana y amplía el conocimiento que existe de esta metaloproteasa para futuras investigaciones orientadas a la identificación y el diseño racional de inhibidores más selectivos.

## **Perspectivas**

El conocimiento generado representa una base experimental para futuros análisis cinéticos con el fin de cuantificar parámetros catalíticos como  $k_m$ ,  $V_{max}$  y  $k_{cat}$ , permitiendo evaluar de manera más precisa el efecto de las mutaciones sobre la actividad enzimática, determinar las consecuencias estructurales de las mutaciones mediante dicroísmo circular (CD), para confirmar experimentalmente el papel de ASp81 en la estabilidad conformacional de la proteína, desarrollar estudios estructurales mediante cristalografía de rayos X o modelado computacional que permitan visualizar los cambios producidos en el sitio activo y en la geometría global del dominio catalítico y desarrollo de inhibidores selectivos dirigidos contra MMP16, una enzima de interés biomédico debido a su participación en remodelación de matriz extracelular, invasión celular, progresión tumoral y metástasis.

## 9 BIBLIOGRAFÍA

- 10 Abitha J., R. P. (2015). The regulation of MMP targeting to invadopodia during cancer metastasis. *PubMed*  
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4313772/>
- 11 Almatrafi, T. A., Lakshmaiya, N., Almaohaimeed, H. M., Chakravarthi, S., Amin, A. H., Jafer, A., Almars, A. I., Basabrain, A. A., Alghamdi, Y. S., Saadh, M. J., & Akhavan-Sigari, R. (2024). Reducing metastasis ability of gastric cancer cell line by targeting MMP16 using miR-193a-5p and 5-FU. *Advances in Medical Sciences*, 69(2), 463-473. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2024.09.008>
- 12 Anna T. (2011). The Dimer Interface of the Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase Hempekin Domain: Crystal Structure and Biological Functions. *Journal of Biological Chemistry*, 286(9), 7587-7600. Doi: 10.1074/jbc.M110.178434
- 13 Baneyx, F., & Mujacic, M. (2004). Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*, 22(11), 1399-1408. <https://doi.org/10.1038/nbt1029>
- 14 Batra, J., Soares, A. S., Mehner, C., & Radisky, E. S. (2013). Matrix metalloproteinase. -10/TIMP-2 structure and analyses define conserved core interactions and diverse exosite interactions in MMP/TIMPS complexes. *Plos ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075836>
- 15 Beata R., D. M. (2017). Post-transcriptional Regulation of MMP16 and TIMP2 Expression via miR-382, miR-410 and miR-200b in Endometrial Cancer: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5611525>
- 16 Bertini, I., Calderone, V., Fragai, M., Luchinat, C., Maletta, M., & Yeo, K. J. (2006). Snapshots of the reaction mechanism of matrix metalloproteinases. *Angewandte Chemie International Edition*  
<https://doi.org/10.1002/anie.200603100>
- 17 Bode, W., Fernandez-Catalan, C., Tschesche, H., Grams, F., Nagase, H., & Maskos, K. (1999). Insights into MMP-TIMP interactions. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55, 639–652. [Insights into MMP-TIMP interactions - PubMed](#)

- 18 Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. A Cancer Journal for Clinicians*. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- 19 Brew, K., & Nagase, H. (2010). The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Molecular Cell Research*, 1803(1), 55-71. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.01.003>
- 20 Butler, S, B. M. (s.f.). The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase receptor regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A doi: 10.1074/jbc.273.2.871
- 21 Cathcart J., Pulkoski-Gross A. & Cao J. (2015). Targeting matrix metalloproteinases in cancer: bringing new life to old ideas. *Genes & Diseases* 2(1) 26-34.
- 22 Chang, X., Huang, Z., Zhang, Z., Pan, W., & Song, C. (2021). Matrine inhibits hepatic carcinoma cell malignancy through the circ\_0013290/miR-139-5p/MMP16 pathway. *Health and Hematology*, 18, 574-584. <https://doi.org/10.14670/HH-18-574>
- 23 Chen, X. (2021). Barberine inhibited metastasis through miR-145/MMP16 axis in vitro. *Journal of Food Biochemistry*, 45(2), 13652. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13652>
- 24 Chun, T. H., Sabeh, F., Ota, I., Murphy, H., McDonagh, K. T., Holmbeck, K., & Weiss, S. J. (2004). MT1-MMP-dependent neovessel formation within the confines of the three-dimensional extracellular matrix. *The Journal of Cell Biology*, 167(4), 757–767. <https://doi.org/10.1083/jcb.200408028>
- 25 Churg, A., Chou, S., & Wright, J. L. (2012). Matrix metalloproteinases in COPD. *The European Respiratory Journal*, 39(1), 197-209. <https://doi.org/10.1183/09031936.00121611>
- 26 Coronato, S., Laguens, G., & Di Girolamo, V. (2012). Rol de las metaloproteinasas y sus inhibidores en patología tumoral. *Medicina (Buenos Aires)*, 72(6), 541–548.

- 27 Coussens, L. M., Fingleton, B., & Matrisian, L. M. (2002). Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science*, 295(5564), 2387–2392. <https://doi.org/10.1126/science.1067100>
- 28 Cui, N., Hu, M., & Khalil, R. A. (2017). Biochemical and biological attributes of matrix metalloproteinases. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 147, 1-73. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.02.005>
- 29 Cytiva. (s.f). Size exclusion chromatography: Principles and methods. Cytiva
- 30 Dmitry R.. (2002). Oligometization through Hemopexin and Cytoplasmic Domains Regulates the Activity and Turnover of Membrane- type 1 Matrix Metalloproteinase. *Journal of Biological Chemistry*, 277(10), 8440-8448. Doi: 101074/jbv.M109128200
- 31 English, W. R., Velasco, G., Stracke, J. O., Knäuper, V., & Murphy, G. (2001). Catalytic activities of membrane-type 6 matrix metalloproteinase (MMP25). *FEBS Letters*, 491(1-2), 137-142- [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02150-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02150-0)
- 32 Elkington, P. T. G., O’Kane, Clodna M., & Friedland, Jon S. (2005). The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease. *Clinical and Experimental Immunology*, 142(1), 12-20. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2005.02840.x>
- 33 Fang, C., Zhang, Q., Wang, Q., Lin, Y., Gu, Y., & Wei, W. (2013). MT3-MMP promotes tumor invasion and metastasis by targeting MMP2 and MMP9. *Cancer Letters*, 337(1), 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.05.010>
- 34 Frantz, Ch., Stewart, K. M., & Weaver, V. M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *Journal of Cell Science*, 123(24), 4195-4200. <https://doi.org/10.1242/jcs.023820>
- 35 Gimeno, A., Ojeda- Montes, M. J. Tomás- Henández, S., Cereto. Massagué, A., Beltrán- Debón, R., Mulero, M., Pujadas, G., & Garcia- Valvé, S. (2020). The light and dark sides of matrix metalloproteinases in cancer: *A patent overview. Drug Discovery Today*, 25 (1), 38-57. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.09.011>

- 36 Gomis-Rüth, F. X. (2009). Catalytic domain architecture of metzincin metalloproteases. *Journal of Biological Chemistry*, 284(23), 15353–15357. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800062200>
- 37 Gonzalez-Avila, G., Sommer, B., Mendoza- Posada, D.A., Ramos, C., Garcia-Hernandez, A.A., & Falfan-Valencia, R. (2019). Matrix metalloproteinases participation in the metastatic process and their diagnostic and therapeutic applications in cancer. *Critical Reviews in Oncology/hematology*. 137, 57-83. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2019-02-010>
- 38 Gross J. & Lapiere CM. (1962) Collagenolytic activity in amphibian tissues culture assay. *Proc Natl Acad Sci USA*. Doi: 10.1073/pnas.48.6.1014.
- 39 Hayun, M. E. (2023). Engineering TIMP inhibitors. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2023.1321956>
- 40 Hao Cheng, M. X. (2015). Mechanisms of matrix metalloproteinase 16 in development and cancer: *Elsevier*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378111925004469>
- 41 Hao-Cheng, M. X. (2025). Mechanisms of matrix metalloproteinase 16 in development and cancer. *Elsevier* <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378111925004469>
- 42 Hartland W. Jackson, Virginie Defamie, Paul Waterhpuse & Rama Khokha. (2017). TIMPs: versatile extracellular regulators in cancer. *Nature Review Cancer*. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.115>
- 43 Hayun, M. E. (2023). Engineering TIMP inhibitors. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2023.1321956>
- 44 Hideaki N., K. B. (2003). Designing TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases) variants that are selective metalloproteinase inhibitors: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14587293/>
- 45 Human Protein Atlas, (2025). MMP16 protein expression summary. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000156103-MMP16>
- 46 Hynes, R. O. (2009). The extracellular matrix: not just pretty fibris. *10.1126/science.1176009*

- 47 International Agency for Research on Cancer. (2022). WHO Classification of Tumours: Thoracic Tumours (5th ed., Vol. 5). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
- 48 Iredale, M. John O, (2003). Cirrhosis: New research provides a basis for rational and targeted treatments. *BMJ*, 327(7407), 143-147. <https://doi.org/10.1136/bmj.327.7407.143>
- 49 Itoh, Y., Takamura, A., Itoh, N., Maru, Y., Sato, H., Suenaga, N., & Seiki, M. (1999). Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface. *Journal of Biological Chemistry*, 274(48), 34398–34402. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.48.34398>
- 50 Itoh, Y. (2015). Membrane-type matrix metalloproteinases: Their functions and regulations. *Matrix Biology*, 44-46, 207-223. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.03.0004>
- 51 Jacob A, P. R. (2015). National Library of Medicine. Obtenido de <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4313772>
- 52 K Brew, D. D. (2000). Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10708863/>
- 53 Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumors microenvironment. *Cell*. 2010;141(1):52-67
- 54 Laronha H, C. J. (2020). Structure and Function of Human Matrix Metalloproteinases. *Cells*. Obtenido de <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7290392>.
- 55 Lang, R, Braun, M., Sounni, N. E., Noel, A., Frankenhe, F., Foidart, J. M., Bode, W., & Maskos, K. (2004). Crystal structure of the catalytic domain of MMP16/MT3-MMP: Characterization of MT-MMP specific features. *Journal of Molecular Biology*, 336(1), 213-225. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.12.020>
- 56 Lee Roth, R. K.-A.-O.-D. (2017). A new role of the membrane-type matrix metalloproteinase 16 (MMP16/MT3-MMP) in neural crest cell migration. PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28621422/>
- 57 Li, C., Zhang, R., Chen, B., Li, Q., Fang, X., & Shen, Y. (2014). Purification of recombinant histidine-tagged catalytic domain of MMP-13 in one-step using

- affinity column and renaturation of it with histidine-tag. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 37(15), 2118-2130. <https://doi.org/10.1080/10826076.2013.825866>
- 58 Li Cao, C. C. (9 de 08 de 2016). MMP16 is a marker of poor prognosis in gastric cancer promoting proliferation and invasion. PubMed <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27340864/>
  - 59 Li, Y. (2025). Mechanisms of matrix metalloproteinase 16 in development and cancer. *Gene*, 938, 149657. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2025.149657>
  - 60 Li, J., Zhang, S., Wu, L., et al. (2021). Berberine inhibited metastasis through miR145/MMP16 axis in vitro. *Journal of Ovarian Research*, 14,4. <https://doi.org/10.1186/s13048-020-00752-2>
  - 61 Li, K., Li, D., Hafex, B., Salem Bekhit, M. M., Bin Jordan, Y. A., Alanazi, F. K., Taha, E. I., Auda, S. H., Ramzan, F., & Jamil, M. (2024). Identifying and validating MMP family members (MMP2, MMP9, MMP12, and MMP16) as therapeutic targets and biomarkers in kidney renal clear cell carcinoma (KIRC). *Oncology Research* 32(4), 737-752. <https://doi.org/10.32604/or.2023.042925>
  - 62 Lin, F., Wang, X., Jie, Z. (2011). Inhibitory effects of miR-146b-5p on cell migration and invasion of pancreatic cancer by targeting MMP16. *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical Sciences*, 31(4), 509-514. <https://doi.org/10.1007/s11596-011-0481-5>
  - 63 Lovejoy B. 1994. Structure of the catalytic domain of human fibroblast collagenase complexed with inhibitor. *Science*.
  - 64 Maskos, K. (2005). Crystal structures of MMPs in complex with physiological and pharmacological inhibitors. *Biochimie*, 87(3-4), 249-263. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.12.010>
  - 65 Massova, I., & Mobashery, S. (1998). Structural insights into the mechanism of matrix metalloproteinases. *\*FASEB Journal\**, 12(12), 1075–1095. <https://doi.org/10.1096/fasebj.12.12.1075>
  - 66 Meng, F., Yang, H., Aitha, M., George, S., Tierney, D. L., & Crowder, M. W. (2016). Biochemical and spectroscopic characterization of the catalytic domain

- of MMP16 (cdMMP16). *\*Journal of Biological Inorganic Chemistry\**, 21(4), 523–535. <https://doi.org/10.1007/s00775-016-1362-y>
- 67 Murphy, Gillian, & , Nagase Hideaki. (2008). Reappraising metelloproetinasen in rheumatoid arthritis and osteroarthritis: destruction or repair? *Natura Clinical Practice Rheumatology*. <https://doi.org/10.1016/j.ma>  
<https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.05.002m.2008.05.002>
  - 68 Mustafa, S., Koran, S., & Alomair, L. (2002). Insights into the role of matrix matelloproteinases in cancer and its various therapeutic aspects: A review. *Frontiers in Molecular Biosciences*. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.896099>
  - 69 Nagase, H., & Woessner, J. F. (1999). Matrix metalloproteinases. *\*Journal of Biological Chemistry\**, 274(31), 21491–21494.
  - 70 Nagase, H., Visse, R., & Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *\*Cardiovascular Research\**, 69(3), 562–573. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.12.002>
  - 71 Neil D Rawlings, Alan J Barret, Paul D Thomas, Xiaosong Huang, Alex Bateman, Rober D Finn, (2017) The MEROPS database of proteolitic enzymes, thir substrates and inhibitor in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database, *Nucleic Acids Research*, Volume 46, Issue D, <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1134>
  - 72 Newby, Andrew C. (2016). Matrix metalloproteinase inhibition therapy for vascular diseases. *Vascular Pharmacology*, 72, 13-18. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2015.09.007>
  - 73 Nuria C, F. G. (2013). Architecture and function of metallopeptidase catalytic domains. Obtenido de The protein Society: <https://digital.csic.es/handle/10261/101850#:~:text=These%20ubiquitous%20enzymes%20participate%20in%20allmajor%20physiological%20processes%20C,they%20are%20grouped%20into%20the%20zincin%20tribe%20ofMPs>
  - 74 Olivia R. Grafinger, J. J.-M. (5 de 07 de 2024) Cancer cell extravasation requires plectin-mediated delivery of MT1-MMP at invadopodia. *Nature*. <https://www.nature.com/articles/s41416-024-02782-9>

- 75 Overall, C. M.-O. (2002). Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nature*: <https://www.nature.com/articles/nrc88>
- 76 Overall, C. M., & Kleinfeld, O. (2006). Tumour microenvironment—opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. *\*Nature Reviews Cancer\**, 6(3), 227–239.
- 77 Page-McCaw, A., Ewald, A. J., & Werb, Z. (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *\*Nature Reviews Molecular Cell Biology\**, 8(3), 221–233. <https://doi.org/10.1038/nrm2125>
- 78 Pankov, R. & Yamada, K. M. (2002). Fibronectin at a glance. *Journal of Cell Science*, 115(20), 3861-3863.
- 79 Parkar, A. A., Stow, M. D., Smith, K., Panicker, A. K., Guilloteau, J.- P., Jupp, R., & Crowe, S. J. (2000). Large-scale expression, refolding, and purification of the catalytic domain of human macrophage metalloelastase (MMP-12) in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 20(2), 152-161. <https://doi.org/10.1006/prep.2000.1280>
- 80 Parks, W. C., Wilsonm Carol L., & López-Boado, Yolanda S. (2004). Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Natura Reviews Immunology*, 4(8), 617-629. <https://doi.org/10.1038/nri1418>
- 81 Pei D. (1999) Identification and characterization of the fifth membrane. Type matrix metalloproteinase MT3-MMP. *Journal of Biological Chemistry*.
- 82 Radisky, E. S.-S. (2020). MMP regulation and function. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7290392/>
- 83 Radnikov, B. I., Rozanov, D. V., Postnova, T. I., Baci, P. G., Zhang, H., Discipio, R., G., & Strongin, A. Y. (2014). An alternative pathway of human MT1-MMP activation by a furin. Independent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111 (40), E4148-E4155. <https://doi.org/10.1073/pnas.1408100111>
- 84 Raffetto, Joseph D., & Khalil, Raouf A. (2008). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochemical Pharmacology*, 75(2), 346-359. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.07.004>

- 85 Richard, L. (2004). Crystal Structure of the Catalytic Domain of MMP-16/MT3-MMP: Characterization of MT-MMP Specific Features. *Journal of Molecular Biology*, 336(1), 213-225. Doi: 10.1016/j.jmb.2003.12.022
- 86 Robert Visse, H. N. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12730128/>
- 87 Rodríguez, D., Morrison, C. J., & Overall, C. M. (2010). Matrix metalloproteinases: What do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1803(1), 39–54
- 88 Salvatore, M. A. (2022). Evolution, Regulation of Extracellular Matrix Proteolysis, Engineering and Therapeutic Challenges. *The Repertoire of Tissue Inhibitors of Metalloproteases*: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9409782/>
- 89 Santiago-Rubio, E. P. (2018). Purificación y caracterización del dominio catalítico de la metaloproteasa de matriz 16 (MT3-MMP). *Tesis de Licenciatura, UNAM, Facultad de Química Repositorio de Tesis Digitales UNAM*.
- 90 Sato H. A matrix metalloproteinase expressed on the Surface of invasive tumour cells. *Nature*. 1994;370;61-65
- 91 Schechter, I., & Berger, A. (1967). On the size of the active site in proteases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(67\)80055-X](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(67)80055-X)
- 92 Seinkij, M. (1999). Membrane- type matrix metalloproteinases. *APMIS*: DOI: 10.1111/j.1699-0463.1999.tb01540.x
- 93 Shimada, T., Nakamura, H., Ochuchi, E., Fuji, Y., Murakami, Y., Sato, H., Seiki, M., & Okada, Y. (1999). Characterization of truncated recombinant form of human membrane type 3 matrix metalloproteinase. *European Journal of Biochemistry*, 262(3), 907-914. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00469.x>.

- 94 Shoulders, M. D., & Raines, R. T. (2009). Collagen structure and stability. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 929-958. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.032207.120822>
- 95 Tallant C., Norrero Aniebrys, Gomis Ruth, F. Xavier. (2010). Matrix metalloproteinases: Fold and function of their catalytic domains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.04.003>
- 96 Tallant, C., Marrero, A., & Gomis-Rüth, F. X. (2010). Structural activation of pro-matrix metalloproteinases and the role of the cysteine-switch. *\*Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research\**, 1803(1), 20–28.
- 97 Tallant, C., García-Castellanos, R., & Gomis-Rüth, F. X. (2010). Structural activation of pro-matrix metalloproteinases and the role of the cysteine-switch. *\*Frontiers in Bioscience\**, 15, 964–982. <https://doi.org/10.2741/3647>
- 98 Tatti, O., Arjama, M., Ranki, A., Weiss, S. J., Keski-Oja, J., & Lehti, K. (2011). Membrane-type-3 matrix metalloproteinase (MT3-MMP) functions as a matrix composition-dependent effector of melanoma cell invasion. *Plos one*, 6(12), e28325. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028325>
- 99 Thermo Fisher Scientific. (s.f). Protein concentration calculator-A280, extinction coefficient and standard curve. [Protein Concentration Calculator – A280, Extinction Coefficient And Standard Curve](#)
- 100 Van Lint, Peter, & Libert, Claude (2007). Matrix metalloproteinase-8: Cleavage can be decisive. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 18(3-4), 267-273. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2007.04.008>
- 101 Visse, Robert, & Nagase, Heideaki (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, and biochemistry. *Circulation Research* 92(8), 827-839. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D>
- 102 Wang, Y., (2023). Membrane-type matrix metalloproteinases in physiology and disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 278
- 103 . Whittaker, M., Floyd, C. D., Brown, P., & Gearing, A. J. H. (1999). Design and therapeutic application of matrix metalloproteinase inhibitors. *\*Chemical Reviews\**, 99(9), 2735–2776. <https://doi.org/10.1021/cr980454>

- 104 Wynn, Thomas A. (2008). Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *The Journal of Pathology*, 214(2), 199-210. <https://doi.org/10.1002/path.227>
- 105 Yongm V. Wee (2005). Metalloproteinases: Mediators of pathology and regeneration in the CNS. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(12), 931-944. <https://doi.org/10.1038/nrn1807>
- 106 Yu, Q. (2020). MT3-MMP/MMP16 in tumor progression and invasion: emerging therapeutic target. *\*Frontiers in Oncology\**, 10, 1356. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01356>
- 107 Zhen Chen, H.-S. D.-J.-X. (2018). MiR33 promotes myocardial fibrosis by inhibiting MMP16 and stimulating p38 MAPK signaling. Obtenido de <https://www.oncotarget.com/article/25173>
- 108 Zhenghai Shen, X. W. (2017). MMP16 promotes tumor metastasis and indicates poor prognosis in hepatocellular carcinoma. Obtenido de <https://www.oncotarget.com/article/20060>
- 109 Zhang, X. e. (2020). MMPs in disease and therapy. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725819302177>
- 110 Zhang, Y. N., Liu, J. J., Zhang, W., Qin, H. Y., Wang, L. T., Chen, Y. Y., Yuan, L., Yang, F., Cao, R. Y., & Wang, X., J (2023). Expression, purification and refolding of pro-MMP-2 from inclusion bodies of E.coli. *Protein Expression and Purification*, 208-209, 106278. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2023.106278>

## 111 Lista de figuras

|                                                                                                                                                                           |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 1 Matriz extracelular .....                                                                                                                                        | 6   |
| Figura 2 Estructura general de las metaloproteasas de matriz .....                                                                                                        | 9   |
| Figura 3 Localización de las metaloproteasas de matriz (MMPs) .....                                                                                                       | 111 |
| Figura 4 Representación de los bolsillos de reconocimiento del sustrato en las MMPs ....                                                                                  | 117 |
| Figura 5 Estructura tridimensional de la estructura cristalina del dominio catalítico de<br>MMP-16 (PDB: 1RM8) y su ciclo catalítico .....                                | 119 |
| Figura 6. Estructura de colágenos y fibronectina como componentes de la matriz<br>extracelular .....                                                                      | 26  |
| Figura 7 Contexto celular de la actividad de MMP16 en la remodelación de la MEC.....                                                                                      | 27  |
| Figura 8 Expresión de MMP16 en distintos tipos de cáncer (Human Protein Atlas).....                                                                                       | 28  |
| Figura 9 Esquema general del trabajo.....                                                                                                                                 | 34  |
| Figura 10 Esquema del vector peT27b+ .....                                                                                                                                | 35  |
| Figura 11 Curva de crecimiento bacteriano .....                                                                                                                           | 46  |
| Figura 12 Curvas de crecimiento transformadas a $\ln(\text{DO600})$ de las variantes durante la<br>fase exponencial.....                                                  | 47  |
| Figura 13 Análisis por SDS- PAGE de la sobreexpresión de dcMMP16, silvestre, E <sub>247</sub> A y<br>D <sub>81</sub> A. ....                                              | 48  |
| Figura 14 Perfil cromatográfico y análisis electroforético de la purificación por afinidad a<br>níquel de dcMMP16 silvestre, E <sub>247</sub> A y D <sub>81</sub> A ..... | 50  |
| Figura 15 Análisis por SDS- PAGE y cromatografía de exclusión molecular dcMMP16<br>silvestre y mutante E <sub>247</sub> A .....                                           | 53  |
| Figura 16 Determinación del peso molecular aparente y estado oligomérico.A) .....                                                                                         | 55  |
| Figura 17 Análisis del comportamiento proteolítico de la proteína dcMMP16 silvestre y la<br>mutante E <sub>247</sub> A.....                                               | 57  |

## 11. Lista de tablas

|                                                                                                                                  |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabla 1 Clasificación de las metaloproteasas de matriz humanas.....                                                              | 8   |
| Tabla 2 Participación de las MMPs en procesos fisiológicos. ....                                                                 | 112 |
| Tabla 3 Participación de las MMPs en procesos patológicos.....                                                                   | 113 |
| Tabla 4 Bolsillos de reconocimiento del sustrato en MMPs.....                                                                    | 117 |
| Tabla 5 Principales inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs) y su especificidad<br>relativa hacia diferentes MMPs..... | 21  |
| Tabla 6 Coeficiente de extinción molar teórico.....                                                                              | 41  |
| Tabla 7 Parámetros cinéticos de crecimiento .....                                                                                | 46  |

## **Abreviaturas**

aa. aminoácido

ADAM A Disintegrin and Metalloproteinase

ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs)

ADN Ácido Desoxirribonucleico

APS Ammonium Persulfate (Persulfato de amonio)

BLAST Basic Local Alignment Search Tool

BCA Bicinchoninic Acid (ácido bicinconínico)

C- terminal Carboxilo terminal

ClustalW Herramienta de alineamiento múltiple de secuencias

Cm Centímetro

CV Volumen de columna

DA o D-A Matuación de ácido aspártico (D) a alanina (A)

Dc dominio catalítico

DMSO Dimetilsulfóxido

DO. Densidad óptica

DTT Ditioneitol

EA o E-A Mutación de ácido glutámico (G) a alanine (A)

EDTA Ethylenediaminetetraacetic acid (Ácido etilendiaminotetraacético)

FR Fase reversa

hB Hélice beta

FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography (Cromatografía líquida rápida de proteínas)

I-MMP Inhibidor de Metaloproteasa

IPTG Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (Inductor de expresión)

KDa Kilodalton

LB (agar) Luria-Bertani

M concentración molar

MEC Matriz extracelular

ml Mililitros

MMP Matrix Metalloproteinase (Metaloproteasa de matriz)

MMP16 Matrix Metalloproteinase-16 (Metaloproteasa de matriz 16)

N-terminal Amino terminal

Ni- NTA Níquel. Nitrilotriacetato

OD-DO<sub>600</sub> Optical Density at 600 nm (Densidad óptica a 600 nm)

Pb pares de bases

PDB Protein Data Bank

PyMOL Molecular visualization system

Rpm Revoluciones por minute

SDS Sodium Dodecyl Sulfate (Dodecil sulfato de sodio)

SDS-PAGE Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel electrophoresis

Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio

TEMED Tetramethylethylenediamine (Tetrametiletilendiamina)

TIMPs Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (Inhibidores tisulares de metaloproteinasas)

Tris-HCl Tris (hidrozimetil) aminometano en ácido clorhídrico

WT Wild Type (Tipo silvestre o nativa)

Zncat Zinc del dominio catalítico.

Zn<sup>2+</sup> Ion zinc

Ca<sup>2+</sup> Ion calcio

µg microgramo

## **Anexo A.**

### **Secuencias aminoacídicas de los constructos de dsMMP16**

- **dcMMP16 silvestre**

ENLYFQSGGGQKWQHKHITYSIKNVTPKVGDPETRKAIRRAFDVWQNVTPPLTFEE  
VPYSELENGKRDVDITIIIFASGFHGDSSPFDGEGGFLAHAYFPGPGIGGDTHFDSD  
EPWTLGNPNHDGNDLFLVAVHELGHALGLEHSNDPTAIMAPFYQYMETDNFKLP  
NDDLQGIQKIYGPPDK

- **dcMMP16 E<sub>247</sub>A**

ENLYFQSGGGQKWQHKHITYSIKNVTPKVGDPETRKAIRRAFDVWQNVTPPLTFEE  
VPYSELENGKRDVDITIIIFASGFHGDSSPFDGEGGFLAHAYFPGPGIGGDTHFDSD  
EPWTLGNPNHDGNDLFLVAVHALGHALGLEHSNDPTAIMAPFYQYMETDNFKLP  
NDDLQGIQKIYGPPDK

- **dcMMP16 D<sub>81</sub>A**

ENLYFQSGGGQKWQHKHITYSIKNVTPKVGDPETRKAIRRAFDVWQNVTPPLTFEE  
VPYSELENGKRDVDITIIIFASGFHGAASSPFDGEGGFLAHAYFPGPGIGGDTHFDSD  
EPWTLGNPNHDGNDLFLVAVHELGHALGLEHSNDPTAIMAPFYQYMETDNFKLP  
NDDLQGIQKIYGPPK

## Análisis cinético de crecimiento bacteriano.

**Tabla A1. Valores de DO<sub>600</sub>**

| <b>Tiempo (h)</b> | <b>Silvestre</b> | <b>DA</b> | <b>EA</b> |
|-------------------|------------------|-----------|-----------|
| <b>T0</b>         | 0                | 0         | 0         |
| <b>T1</b>         | 0.004            | 0.015     | 0.005     |
| <b>T2</b>         | 0.011            | 0.009     | 0.004     |
| <b>T3</b>         | 0.049            | 0.027     | 0.009     |
| <b>T4</b>         | 0.209            | 0.088     | 0.035     |
| <b>T5</b>         | 0.517            | 0.3       | 0.197     |
| <b>T6</b>         | 0.599            | 0.497     | 0.563     |
| <b>T7</b>         | 0.62             | 0.7       | 0.849     |
| <b>T8</b>         | 0.688            | 0.849     | 0.897     |
| <b>T9</b>         | 0.799            | 0.897     | 0.973     |

| <b>Tiempo (h)</b> | <b>Silvestre</b> | <b>DA</b> | <b>EA</b> |
|-------------------|------------------|-----------|-----------|
| <b>4</b>          | -1.565           | -2.431    | -3.352    |
| <b>5</b>          | -0.659           | -1.204    | -1.624    |
| <b>6</b>          | -0.513           | -0.699    | -0.576    |
| <b>7</b>          | -0.478           | -0.357    | -0.164    |
| <b>8</b>          | -0.364           | -0.164    | -0.109    |
| <b>9</b>          | -0.224           | -0.109    | -0.027    |

**Tabla A2 Valores ln (DO<sub>600</sub>).**

Nota: Los valores de densidad óptica fueron transformados mediante logaritmo natural para linealizar la fase exponencial de crecimiento y permitir la estimación de la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ).

### **Cálculos de la tasa específica de crecimiento.**

Durante la fase exponencial el crecimiento bacteriano puede describirse mediante  $N_t = N_0 e^{\mu t}$  donde:

$N_t$  = concentración celular en el tiempo  $t$

$N_0$  = concentración celular inicial

$\mu$  = tasa específica de crecimiento

Dado que la  $OD_{600}$  es proporcional al número de células:  $OD_t = OD_0 e^{\mu t}$  aplicando  $\ln$  a ambos lados  $\ln(OD_t) = \ln(OD_0) + \mu t$ , convirtiendo una curva exponencial en una recta.

La tasa específica de crecimiento se calculó utilizando:

$$\mu = \frac{[\ln(OD_2) - \ln(OD_1)]}{(t_2 - t_1)}$$

Para E<sub>247A</sub> (5-8h)

$$\mu = \frac{[\ln(0.897) - \ln(0.197)]}{(8 - 5)} = \frac{-0.197 - (-1.624)}{(3)} = 0.505h^{-1}$$

Para D<sub>81A</sub> (5-9h)

$$\mu = \frac{[\ln(0.897) - \ln(0.300)]}{(9 - 5)} = \frac{-0.109 - (-1.204)}{(4)} = 0.274h^{-1}$$

Para silvestre

$$\mu = \frac{[\ln(0.620) - \ln(0.209)]}{(7 - 4)} = \frac{-0.478 - (-1.565)}{(3)} = 0.362h^{-1}$$

**Tabla A3. Determinación de  $\mu$  mediante dos puntos**

| Cepa              | $\ln OD_1$ | $\ln OD_2$ | $t_1(h)$ | $t_2(h)$ | $\mu(h^{-1})$ |
|-------------------|------------|------------|----------|----------|---------------|
| Silvestre         | -1.565     | -0.478     | 4        | 7        | 0.362         |
| D <sub>81A</sub>  | -1.204     | -0.109     | 5        | 9        | 0.274         |
| E <sub>247A</sub> | -1.624     | -0.197     | 5        | 8        | 0.505         |

**Cálculo de la derivada**

$$\frac{d\ln(OD)}{dt}$$

Como los datos son discretos,

$$\frac{\ln(OD_{i+1}) - \ln OD_i}{t_{i+1} - t_i}$$

Esto permite conocer la velocidad de crecimiento en cada intervalo de tiempo. Cuando la derivada alcanza su valor máximo, la población se encuentra creciendo a la mayor velocidad posible.

Ejemplo para E<sub>247</sub>A entre 4 y 5 horas

De la tabla A2 usamos los datos para aplicar en la ecuación:

$$\frac{-1.624 - (-3 - 352)}{5 - 4} = \frac{1.728}{1} = 1.728 \text{ h}^{-1}$$

**Tabla A4. Derivadas discretas.**

| Intervalo (h) | $\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}_{\text{silvestre}}$ | $\mu \text{ a(h}^{-1}\text{)}_{\text{D-A}}$ | $\mu \text{ a(h}^{-1}\text{)}_{\text{E-A}}$ |
|---------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|
| 4-5           | 0.906                                            | 1.227                                       | 1.728                                       |
| 5-6           | 0.146                                            | 0.505                                       | 1.048                                       |
| 6-7           | 0.035                                            | 0.342                                       | 0.412                                       |
| 7-8           | 0.104                                            | 0.193                                       | 0.055                                       |
| 8-9           | 0.150                                            | 0.055                                       | 0.082                                       |

Nota: La velocidad instantánea de crecimiento se estimó mediante una aproximación discreta de la deriva de  $\ln(\text{DO}_{600})$  respecto al tiempo. Los valores obtenidos representan la velocidad de crecimiento en cada intervalo de tiempo analizado.

### Determinación del punto de inflexión

El punto de inflexión corresponde al momento en el cual la pendiente de la curva alcanza su valor máximo, biológicamente representa, la máxima actividad metabólica, tasa de división celular y el centro de la fase exponencial.

