



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA CELULAR Y BIOCÁTALISIS

**DISEÑO DE UNA PARTÍCULA CATALÍTICAMENTE
ACTIVA E INMUNOGÉNICAMENTE INERTE BASADA EN LA
FOSFOTRIESTERASA**

T E S I S

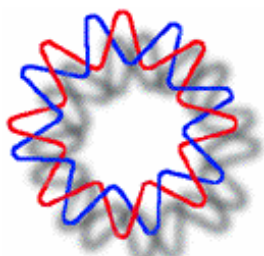
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Biól. Lorena Paulina Sánchez Sánchez

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Rafael Vázquez Duhalt





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, el Dr. Rafael Vázquez, por el apoyo, las buenas ideas y la paciencia durante el desarrollo de mi proyecto.

A los miembros del comité tutorial, la Dra. Yvonne Rosenstein y el Dr. Jean Louis Charli, por sus aportaciones cada semestre para mejorar el proyecto.

A los miembros del jurado, la Dra. Laura Palomares, la Dra. Alejandra Bravo, el Dr. Jordi Folch y el Dr. Joseph Dubrovsky por enriquecer con sus comentarios el trabajo escrito.

A la Dra. Lucía, la Dra. Marcela, el M. en C. Raunel y al Dr. Ismael por su apoyo experimental en el proyecto.

A la Biól. Rosa Roman y a Erika Melchy por el apoyo técnico.

A Gianfranco Pasut y Anna Mero por todo lo enseñado durante la estancia, así como por su hospitalidad.

A CONACYT por la beca otorgada durante la maestría.

A mi mamá, por darme ánimos y apoyarme siempre.

A mi familia, en especial a mi hermano César y mis abuelos Rogelio, Manuel, Gloria y Lupe.

A mis amigos, Pancho, Adri, Rau, Cris, Viri, Abraham, Diego y Marco por hacerme pasar muy buenos momentos.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN.....	2
1. PROBLEMÁTICA GENERADA POR LOS COMPUESTOS ORGANOFOSFORADOS	2
2. ESTRUCTURA DE LOS COMPUESTOS ORGANOFOSFORADOS.....	3
3. TOXICIDAD DE LOS COMPUESTOS ORGANOFOSFORADOS EN MAMÍFEROS.....	3
4. FOSFOTRIESTERASA	5
5. BIOFARMACEÚTICOS Y PEGILACIÓN.....	8
ANTECEDENTES	11
HIPÓTESIS	13
OBJETIVOS	13
MATERIALES Y MÉTODOS	14
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	14
PLÁSMIDOS Y CEPAS	14
1. Clonación del gen <i>opd</i> en <i>E. coli</i>	15
1.1 Inserto: gen <i>opd</i>	15
1.2 Vectores: <i>pT4</i> y <i>pET24a</i>	16
1.3 Obtención de <i>pT4-opd</i> Y <i>pET24-opd</i>	17
1.4 Evaluación de la actividad <i>pT4-opd</i> Y <i>pET24-opd</i>	20
2. Manipulación del gen de la PTE para obtener un monómero con actividad catalítica ..	20
2.1 Mutagénesis sitio dirigida.....	20
2.2 Western Blot	21
2.3 Cromatografía de filtración en gel.....	21
3. Purificación de la PTE.....	21
4. Modificación química de PTE con polietilenglicol (PEG).....	23

4.1 Identificación in silico de los residuos de lisina en la PTE.....	23
4.2. Medición del porcentaje de activación del PEG-NHS lineal de 10 kD (Nektar®).....	23
4.3 Reacción de PEGilación con PEG-NHS lineal de 10kD	24
4.4 Determinación de los parámetros cinéticos (kcat y KM) de la proteína PEGilada...	24
4.5. Caracterización de los conjugados PTE-PEG	24
5. Estabilidad a degradación por proteasas.....	25
6. Inmunoensayos	25
6.1. Inmunización de conejos.....	25
6.2. Medición de títulos por ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay).	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
1. CLONACIÓN DEL GEN <i>opd</i> EN <i>E. coli</i>	28
2. OBTENCIÓN DEL MONÓMERO.....	29
3. PURIFICACIÓN DE LA PTE silvestre.....	33
4. MODIFICACIÓN QUÍMICA CON PEG DE LA PTE silvestre	34
5. ESTABILIDAD A DEGRADACIÓN POR PROTEASAS	39
6. EVALUACIÓN IN VITRO DE LA INMUNOGENICIDAD DE LA PTE PEGILADA	40
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	43
BIBLIOGRAFÍA	45

ABREVIATURAS

ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
HuBuChE	Butirilcolinesterasa Humana
HuPON	Paraxonasa Humana
mPEG-NHS	metoxiPolietilenglicol activado con N-hidroxisuccinimida
NTE	Esterasa Blanco de Neuropatía
O/N	Periodo de tiempo que abarca toda la noche (over night)
OP	Organofosforado
OPA	o-ftaldehído
OPIDP	Polineuropatía Retrasada Inducida por Organofosforados
PEG	Polietilenglicol
PTE	Fosfotriesterasa
PNPP	p-nitrofenil fosfato
SDS-PAGE	Electroforésis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
TNBS	Ácido Trinitrobencenosulfónico

RESUMEN

Los compuestos organofosforados constituyen el grupo de plaguicidas más usados a nivel mundial. Sin embargo, presentan una alta toxicidad en mamíferos, por lo que el envenenamiento con estos compuestos ha generado un grave problema de salud a nivel global. Hasta la fecha no existen tratamientos efectivos contra la intoxicación por compuestos organofosforados; por lo que es necesario encontrar nuevas alternativas que mejoren el desempeño de los tratamientos existentes. Se han encontrado en la naturaleza una variedad de enzimas que son capaces de degradar estos compuestos organofosforados. En particular, se ha puesto especial atención a la fosfotriesterasa (PTE) de *Flavobacterium sp.* ya que es capaz de hidrolizar una gran variedad de plaguicidas con una alta eficiencia. Es por lo antes mencionado que para este proyecto nos planteamos el objetivo de generar una partícula basada en la fosfotriesterasa, que sea catalíticamente activa y no inmunogénica, con el fin de tratar envenenamientos por plaguicidas organofosforados.

Se logró expresar la PTE de manera heteróloga en *E. coli* y purificarla de manera exitosa, obteniendo alrededor de 1.5 mg por litro de cultivo. Con el fin de contener con la degradación de la PTE dentro del organismo, así como a la generación de una respuesta por parte del sistema inmune, se recurrió a la modificación química de la proteína con polietilenglicol (PEG) lineal de 10 kDa. Se recurrió a la monomerización de la PTE como una estrategia para incrementar la relación del volumen del PEG respecto al de la proteína; sin embargo, la disrupción de puentes de hidrógeno entre las dos subunidades no fue suficiente para disociar el dímero y obtener un monómero con actividad catalítica, por lo que se continuó trabajando con la PTE en su forma dimérica. La relación molar utilizada para PEGilar la PTE fue de 1:15, suficiente para conjugar la totalidad de la enzima con el polímero, uniéndose en promedio 10 cadenas de PEG por dímero. Se encontró que la mayor parte de la actividad, el 80%, se retuvo en la proteína modificada.

Finalmente, como una aproximación para determinar la inmunogenicidad de la partícula se llevaron a cabo una serie de ELISAS utilizando anticuerpos anti-PTE y anti-PTE.PEG generados en conejos, encontrando que la PTE-PEG es alrededor de un 20% menos inmunogénica (*in vitro*) que la enzima sin modificar; sin embargo, aun sigue siendo reconocida por el sistema inmune. En un futuro habrá que explorar otras formulaciones PTE-PEG así como otros polímeros de distinta naturaleza para contener con la inmunogenicidad de la PTE y poder obtener un fármaco eficiente para contener con la intoxicación por organofosforados.

INTRODUCCIÓN

1. PROBLEMÁTICA GENERADA POR LOS COMPUESTOS ORGANOFOSFORADOS

En la actualidad se ha generado un gran número de problemas ambientales y de salud debido al uso excesivo de los recursos naturales así como a la producción masiva de una variedad de compuestos xenobióticos. Dentro de estos compuestos se encuentra el grupo de los organofosforados (OP's), los cuales son utilizados a nivel mundial como aditivos para el petróleo, armas químicas y plaguicidas, siendo éstos últimos en donde se encuentra su mayor aplicación.

Los compuestos organofosforados han sido utilizados desde finales de los años treinta para el control de plagas en la agricultura y en el hogar, así como para el control de enfermedades transmitidas por insectos, constituyendo hoy en día el grupo de plaguicidas que más se consume al ocupar el 34% del mercado mundial. Este uso preferente se debe a que son compuestos biodegradables y altamente eficientes; sin embargo, el uso excesivo y continuo de estos productos ha dado lugar a la contaminación de varios ecosistemas en distintas partes del mundo. Aunado a lo anterior, los organofosforados presentan una alta toxicidad en mamíferos, por lo que el envenenamiento con estos compuestos presenta un problema de salud pública a nivel mundial. Anualmente ocurren alrededor de 3 millones de envenenamientos y 200 mil muertes; la mayoría de éstas se presentan en países en vías de desarrollo donde los organofosforados, además de ser ampliamente usados en la agricultura, se utilizan como método de suicidio en el medio rural (Karalliede y Senanayake, 1999).

En particular en México, la problemática es grave ya que existe un gran número de intoxicaciones en el país; tan solo en el 2008 se reportaron 3049 casos de intoxicación por plaguicidas (Dirección General de Epidemiología, 2009). Esta situación se debe a la falta de información para el manejo de los compuestos en el sector agrícola, un sector productivo importante en el país; así como a que existe también una población ocupacionalmente expuesta a los compuestos organofosforados (López-Flores, et al., 2009; Palacios-Nava, et al., 1999). Es importante hacer notar que estas cifras están por debajo de la realidad ya que es muy probable que existan muchos más casos de intoxicación en el medio rural, en donde los intoxicados no hacen uso de los centros de salud y quedan fuera de las estadísticas.

2. ESTRUCTURA DE LOS COMPUESTOS ORGANOFOSFORADOS

Los compuestos organofosforados son ésteres o tioles derivados del ácido fosfórico, fosfónico o fosforamídico. La estructura general de los compuestos organofosforados se muestra en la Figura 1.

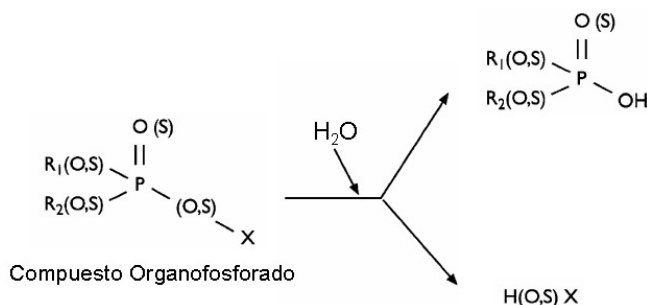


Fig. 1. Estructura general de los compuestos organofosforados y sus productos de hidrólisis (Singh y Walker, 2006).

Los sustituyentes R_1 y R_2 generalmente son grupos alquilo o arilo que están unidos al átomo de fósforo ya sea directamente o a través de un oxígeno o un de un átomo de azufre; mientras que el grupo X puede ser un grupo halógeno, alifático, aromático o heterocíclico, siendo éste el que se libera al hidrolizar al compuesto organofosforado. El átomo unido al fósforo por un doble enlace puede ser un oxígeno o un azufre. Los compuestos organofosforados con el enlace $P=O$ se conocen como "oxones", lo que se ve reflejado usualmente en el nombre comercial del producto; de esta manera el paraxon es la forma con el enlace $P=O$ y el paratión es la forma $P=S$. Cabe mencionar que muchos de los compuestos organofosforados son sintetizados con el enlace $P=S$; sin embargo, éstos al ser metabolizados son convertidos en la variante "oxo" generándose un compuesto aun más tóxico (Vilanova y Sogorb, 1999).

3. TOXICIDAD DE LOS COMPUESTOS ORGANOFOSFORADOS EN MAMÍFEROS

La ruta de ingreso de los organofosforados al organismo puede ser vía inhalación, ingestión o absorción a través de la piel. Posteriormente estos compuestos entran al torrente sanguíneo y son distribuidos a todo el organismo, almacenándose una buena porción de ellos en los tejidos grasos, de donde después pueden ser liberados paulatinamente. Así mismo una parte de ellos puede ser degradada (vía paraxonasas) y eliminada vía la orina (Sogorb et al., 2004). Aunado a la anterior, los compuestos organofosforados circulantes en la sangre son capaces de alcanzar rápidamente las

sinapsis colinérgicas del sistema nervioso, sitio en el que ejercen su mayor toxicidad (Masson et al., 1998).

Los OP's inhiben la actividad de la acetilcolinesterasa al fosforilar el sitio activo de la enzima al reaccionar con el grupo hidroxilo de la serina 203, de esta manera impidiendo que la enzima actúe sobre su sustrato fisiológico, la acetilcolina. La acetilcolinesterasa es la enzima encargada de degradar la acetilcolina, un neurotransmisor requerido para transmitir los impulsos nerviosos en el sistema nervioso central y periférico (somático y autónomo).

El recambio de la enzima en la hidrólisis del enlace fosfato de un organofosforado puede tomar varias horas o hasta días dependiendo de la estructura química del plaguicida, debido a que es un enlace mucho más estable que el del acetato (proveniente de la acetilcolina), que se hidroliza por acción del agua en unos pocos microsegundos (Fig. 2).

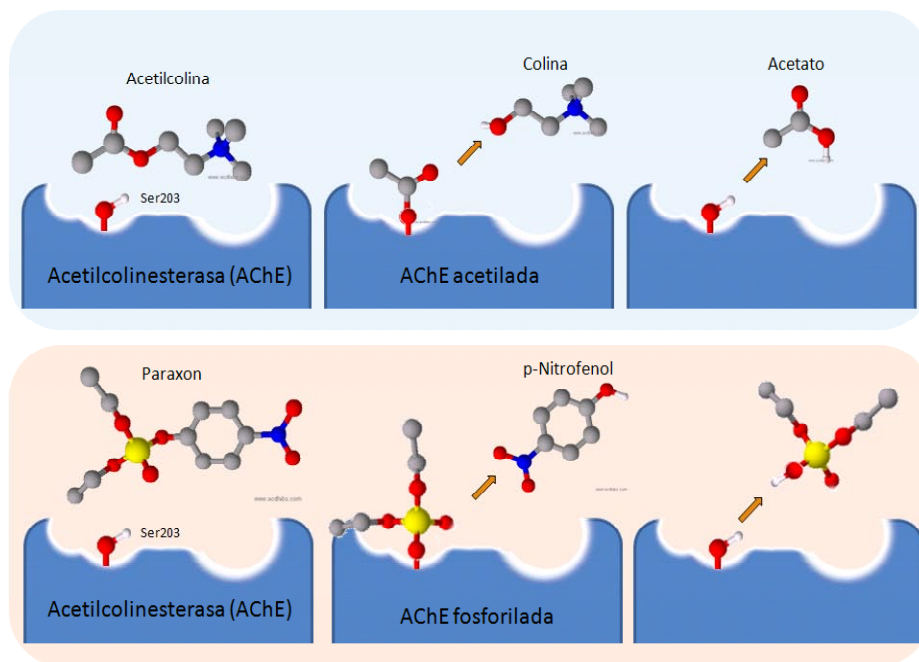


Fig 2. Representación esquemática del sitio activo de la acetilcolinesterasa en presencia de acetilcolina y de paraxon (inhibidor)

De esta manera la acetilcolinesterasa fosforilada queda inhibida por un largo tiempo, originando la sobre-estimulación de los receptores nicotínicos y muscarínicos; dando lugar a los siguientes síntomas: agitación, debilidad muscular, fasciculación muscular, miosis, hipersalivación y sudoración. En casos graves de intoxicación se pueden presentar convulsiones, parálisis, falla respiratoria y finalmente la muerte (Vilanova y Sogorb, 1999).

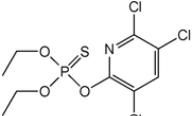
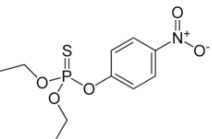
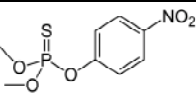
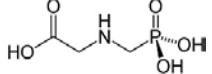
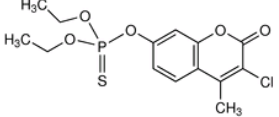
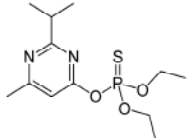
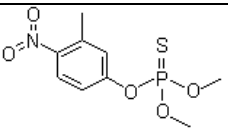
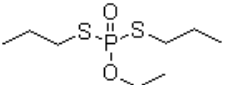
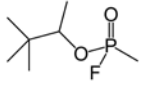
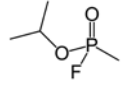
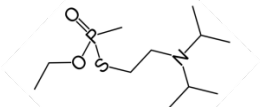
Ciertos compuestos llamados oximas (nucleófilos fuertes) contienen un átomo cargado positivamente capaz de unirse al sitio aniónico de la acetilcolinesterasa, lo que facilita la defosforilación de la enzima; estos reactivadores son utilizados para combatir la intoxicación por OP's. Sin embargo, cuando alguno de los dos grupos sustituyentes (R) del organofosforado se pierde mientras que está el plaguicida unido a la enzima (proceso llamado envejecimiento), la acetilcolinesterasa se puede considerar inhibida irreversiblemente, siendo la síntesis de nueva enzima el único proceso por el que se puede reemplazar la actividad. Además de las oximas antes mencionadas, la atropina también es utilizada para contender con la intoxicación por OP's, ya que este compuesto funciona como un antagonista de la acetilcolina previniendo la unión de este neurotransmisor a los receptores muscarínicos (Costa, 2006). Generalmente estos tratamientos son insuficientes para contender con la intoxicación por OP's, encontrándose una tasa de mortalidad del 40% (Eyer, 2003).

La exposición aguda o crónica a los compuestos organofosforados está implicada en una variedad de desórdenes nerviosos y musculares, que tienen efectos a corto, mediano y largo plazo. Un ejemplo de ello es el desorden conocido como polineuropatía retrasada inducida por organofosforados (OPIDP), los síntomas incluyen temblor en las manos y pies, seguido de pérdida de sensibilidad, debilidad muscular en las extremidades y ataxia. Estos síntomas aparecen entre dos y tres semanas después de la exposición al OP's, cuando los síntomas colinérgicos han desaparecido. Se ha observado que la lesión se presenta en los axones mielinizados del sistema nervioso central y periférico. En este caso se ha identificado que el blanco de los OP's es otra esterasa llamada Esterasa Blanco de Neuropatía (NTE) (Masoud et al., 2009).

4. FOSFOTRIESTERASA

Se ha observado que los compuestos organofosforados pueden ser transformados por una variedad de enzimas que se encuentran distribuidas a lo largo de la escala filogenética desde las bacterias hasta los mamíferos (exceptuando los insectos). Sin embargo, se ha puesto especial atención en la fosfotriesterasa (PTE) perteneciente a la bacteria *Flavobacterium sp.*, ya que es capaz de hidrolizar una gran variedad de compuestos organofosforados pudiendo romper enlaces P-O, P-F, P-CN y P-S con una alta eficiencia (Tabla 1) (Singh y Walker, 2006).

Tabla 1. Compuestos organofosforados capaces de ser degradados por la PTE

Compuesto	Estructura	Tipo	Toxicidad en Mamíferos*	Vida media en suelo (días)
Clorpirifos		Insecticida	135-163	10-120
Paratión		Insecticida	2-10	30-180
Metil paratión		Insecticida	3-30	25-130
Glifosato		Herbicida	3530-5600	30-174
Coumafos		Acaricida	16-41	24-1400
Diazinon		Insecticida	80-300	11-21
Fenitrotion		Insecticida	1700	12-28
Etoprofos		Nematicida	146-170	3-30
Soman		Arma química	75-100**	1.5-2.5
Sarin		Arma química	35-50**	1.5-2.5
VX		Arma química	10**	4-42

*El valor LD₅₀ (mg kg⁻¹) se refiere a la dosis ingerida en la cual la mitad de los animales utilizados en el ensayo muere.
 **En estos casos se refiere a la dosis letal por inhalación (mg min⁻¹ por m³).

La PTE de esta bacteria que habita en el suelo, está codificada por el gen *opd* de origen plasmídico formando parte de un transposon (Siddavattam et al., 2003). Es un dímero de 72 kD con dos

subunidades idénticas, cada una de 336 residuos de aminoácidos que se pliegan como barriles (β/α)₈, al igual que los demás miembros de la superfamilia de las amidohidrolasas a la cual pertenece.

El sitio activo contiene dos iones zinc, habiendo cinco aminoácidos en coordinación directa con éstos: His55, His57, His201, His230 y Asp301. Los metales están puenteados por una lisina carboxilada (Lys169) y un hidroxilo (Aubert et al., 2004) (Fig 3).

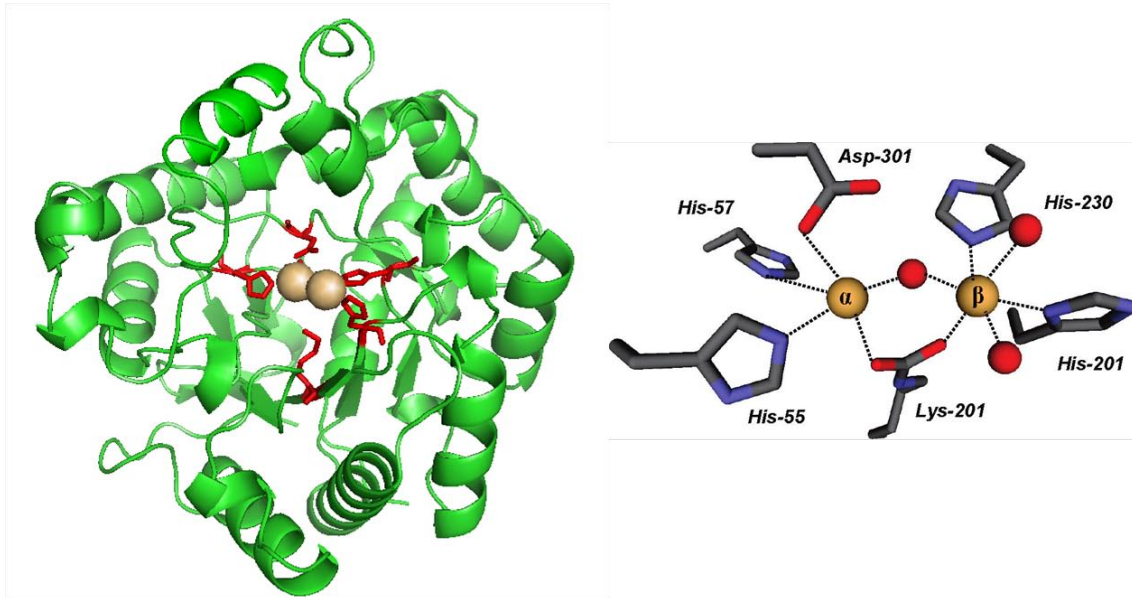


Fig 3. Estructura tridimensional de la PTE de *Flavobacterium sp.* Sitio activo de la PTE (Benning et al., 2001).

El par de iones metálicos se utilizan para activar una molécula de agua que iniciará el ataque nucleofílico al sustrato. Así mismo incrementan el carácter electrofílico del organofosforado al polarizar el enlace P=O o P=S y de esta manera hacer al fósforo más susceptible al ataque por el hidroxilo. El mecanismo de reacción propuesto para la degradación de plaguicidas por la PTE comienza cuando el sustrato organofosforado se une al sitio activo desplazando una molécula de agua del ion metálico β (Fig. 4). La interacción del sustrato con este ion debilita la coordinación del hidroxilo unido al ion metálico β , lo que facilita el ataque nucleofílico de este hidroxilo al fósforo del sustrato en una reacción de tipo S_N2. El enlace del grupo saliente del fenol se rompe, mientras que el único protón del hidroxilo nucleofílico se transfiere al Asp-301. El dietilfosfato aniónico ahora se encuentra puenteadando a los dos cationes divalentes para finalmente dissociarse del sitio activo, de manera que el centro metálico binuclear es recargado para la siguiente ronda (Kim et al., 2008).

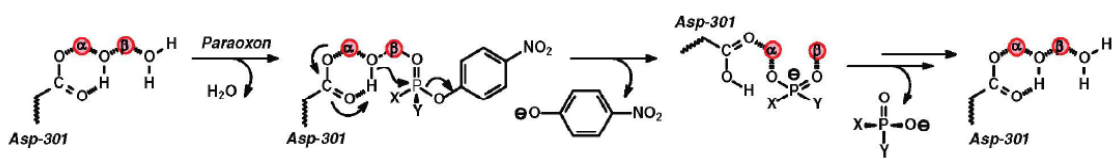


Fig 4. Mecanismo catalítico de la hidrólisis de organofosforados (paraoxon) por la PTE (Kim et al., 2008).

Es importante mencionar que el zinc puede ser reemplazado por otros iones divalentes como el Cd^{2+} , Ni^{2+} o Mn^{2+} , observándose que la enzima sustituida con Co^{2+} es la isoforma más activa (Omburo et al., 1992).

Existe un cierto grado de especulación sobre el origen evolutivo de la PTE debido a que no se ha encontrado un sustrato natural para la enzima. Se cree que la actividad de fosfotriesterasa debió de haber evolucionado durante los últimos 60 años, ya que antes de este tiempo no existían los compuestos organofosforados en el ambiente. La PTE probablemente evolucionó rápidamente para hidrolizar estos compuestos en respuesta a una limitación en la cantidad de fosfato inorgánico, un factor limitante en el crecimiento de bacterias del suelo (Buchbinder et al., 1998). Recientemente se ha descubierto que la PTE pudo haber evolucionado a partir de otras enzimas existentes ya que se encontró para esta enzima una actividad promiscua de lactonasa. A partir de este resultado se llevó a cabo una búsqueda de homólogos en distintos genomas bacterianos encontrándose 3 genes que codifican para proteínas con una alta actividad de lactonasa y una baja actividad promiscua para fosfotriesterasa, llamadas lactonasas tipo PTE (PLLs). Se cree que estas proteínas fueron el punto de divergencia para la posterior evolución y aparición de las PTE (Afriat et al., 2006).

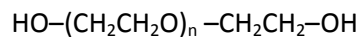
5. BIOFARMACEÚTICOS Y PEGILACIÓN

Las enzimas como agentes terapéuticos se distinguen de otro tipo de fármacos por su capacidad de unirse y actuar sobre sus moléculas blanco con una gran afinidad y especificidad. Hoy en día, más de 80 fármacos basados en polipéptidos circulan en el mercado y se estima que alrededor de una tercera parte de los medicamentos que están en fase de pruebas clínicas son proteínas. Sin embargo, estas proteínas terapéuticas presentan ciertas desventajas que han limitado su uso, dentro de las que se encuentran la susceptibilidad a la degradación por enzimas proteolíticas, la

baja solubilidad, la rápida remoción por parte del riñón y la capacidad de generar una respuesta inmune (Harris y Chess, 2003).

Con el fin de superar estas desventajas se han adoptando distintas estrategias, siendo una de las más efectivas la modificación química de proteínas con polietilenglicol (PEG) (*Tabla 2*). La PEGilación enmascara los epítopes de la proteína reduciendo así su inmunogenicidad, impide la entrada de enzimas proteolíticas y aumenta el tamaño aparente del polipéptido reduciendo la filtración renal (las partículas más grandes se filtran más lentamente); todo lo mencionado anteriormente resulta en el incremento de la vida media de la proteína dentro del organismo (Caliceti y Veronese, 2003).

El PEG es un polímero anfifílico lineal o ramificado que tiene la siguiente estructura:



La habilidad del PEG de ser soluble tanto en soluciones acuosas como en solventes orgánicos lo hace apto para la derivatización de grupos terminales así como para la conjugación química con moléculas biológicas bajo condiciones fisiológicas. El PEG es capaz de unir entre dos y tres moléculas de agua por unidad de óxido de etileno, lo que le confiere de cinco a diez veces mayor tamaño que el que tendría una proteína del mismo peso molecular. Tanto el polímero como las moléculas de agua asociadas a él actúan como un escudo para proteger a la proteína de la degradación por proteasas y de la interacción con el sistema inmune (Roberts et al., 2002). Como ya se ha mencionado, una de las propiedades más importantes de una proteína PEGilada es el incremento en su tamaño molecular resultado del gran volumen hidrodinámico del PEG. El volumen efectivo del PEG tiene un efecto más significativo en proteínas pequeñas, ya que a nivel macromolecular serán las propiedades del PEG las que se vuelvan dominantes (Morar, 2006).

El PEG se ha utilizado por un largo tiempo en la industria farmacéutica como excipiente debido a su carácter no tóxico dentro del organismo (Webster, 2007); sin embargo, fue tan solo hace 19 años que el primer medicamento de origen proteico conjugado con PEG salió al mercado (*Tabla 2*). Hoy en día distintas clases de proteínas tales como enzimas, hormonas, citocinas y anticuerpos, están siendo PEGiladas con el fin de mejorar su capacidad como biofármacos. Desgraciadamente

este tipo de modificación química viene acompañada en muchos casos por pérdidas en la actividad biológica de las proteínas (Pasut y Veronese, 2007); aunque cabe destacar que se han encontrado ejemplos donde la PEGilación da como resultado un aumento en la actividad de algunas enzimas (Tinoco y Vazquez-Duhalt, 1998).

Tabla 2. Fármacos basados en proteínas modificadas con PEG que se encuentran hoy en día en el mercado (Veronese y Pasut, 2005).

Proteínas PEGiladas	Tipo de PEGilación	Año de comercialización	Enfermedad
PEG-asparaginasa (Oncaspar®)	Azarosa, PEG lineal	1994	Leucemia linfoblástica aguda
PEG-Adenosina deaminasa (Adagen®)	Azarosa, PEG lineal	1990	Inmunodeficiencia combinada severa
PEG-interferón α 2a (Pegasy®)	Azarosa, PEG ramificado 40 kDa	2002	Hepatitis C
PEG-interferón α 2a (PEG-Intron®)	Azarosa, PEG lineal 12 kDa	2000	Hepatitis C, y ensayos clínicos para cáncer, esclerosis múltiple, VIH/SIDA
PEG-G-CSF (Pegfilgrastim, Neulasta®)	Selectiva, PEG lineal 20 kDa	2002	Tratamiento contra neutropenia durante quimioterapia
PEG-antagonista del receptor para la hormona del crecimiento (Pegvisomant, Somavert®)	Azarosa, PEG lineal	2002	Acromegalia

En la actualidad existen varias estrategias para conjugar el PEG a las proteínas que dependen del grupo químico con el que es activado el polímero. Generalmente la modificación va dirigida a los grupos amino libres de las lisinas y el N-terminal pudiéndose llevar a cabo una reacción de alquilación, en donde se mantiene la carga positiva del grupo amino al formarse una amina secundaria, o una reacción de acilación en donde se pierde la carga positiva del grupo amino. También es posible modificar químicamente el grupo tiol de las cisteínas no involucradas en puentes disulfuro, lo cual ha dado lugar a una PEGilación más selectiva ya que este aminoácido tiene una frecuencia de aparición en las proteínas mucho menor que la de las lisinas (Veronese y Pasut, 2005). De manera más reciente se ha encontrado la posibilidad de modificar el grupo amida de los residuos de glutamina de manera enzimática gracias a la transglutaminasa (Mero, 2009).

En cuanto al tipo de PEGilación, consideramos que es azarosa cuando no va dirigida al grupo amino de alguna lisina u N-terminal en particular; mientras que en una modificación selectiva la conjugación con el PEG va dirigida al grupo amino (generalmente el N-terminal) o tiol de un aminoácido en especial en la proteína.

ANTECEDENTES

Posterior a numerosas investigaciones militares y confidenciales sobre la protección contra las armas químicas, se ha planteado desde la década de los años noventa la posibilidad de utilizar a la PTE como agente terapéutico contra la intoxicación por plaguicidas organofosforados. La protección contra el envenenamiento por estos plaguicidas está dada por la remoción del organofosforado por la PTE en el torrente sanguíneo antes de que inhiba a la acetilcolinesterasa (Vilanova y Sorgob, 1999).

En una primera aproximación, la PTE fue inyectada de manera intravenosa a ratones previamente intoxicados con paraoxon, encontrándose una disminución de la inhibición de la acetilcolinesterasa, así como un incremento de cinco veces de la hidrólisis del plaguicida en el suero de los ratones tratados con la enzima (Kaliste-Korhonen et al., 1993). Sin embargo se ha observado que la PTE es eliminada relativamente rápido del organismo, calculándose un tiempo de vida media de 100 min en un modelo murino (Masson et al., 1998). Es por esta razón que para reducir una posible respuesta inmunológica y la degradación de la enzima por proteasas se han explorado distintas estrategias entre las que se encuentran la encapsulación de la PTE en eritrocitos (Pei et al., 1994) y en liposomas (Petrikovics et al., 1999), así como la terapia extracorporal (Masson, et al., 1998). Sin embargo, como se explicará a continuación, estas estrategias presentan ciertas desventajas, y se han quedado en fase experimental.

El problema al utilizar eritrocitos es que se presentan bajas eficiencias en la encapsulación de la proteína (alrededor del 30%), no pueden ser almacenados por mucho tiempo y requieren, previo a ser inyectados, que se corrobore el tipo de sangre o de la realización de transfusiones autólogas (Sogorb et al., 2004). En el caso de los liposomas éstos son vehículos susceptibles a cambios en el pH, temperatura y a degradación por lipasas, además de presentarse una limitación en cuanto a la transferencia de masa (entrada del plaguicida a la vesícula). Así mismo los liposomas circulantes en la sangre, además de presentar cierta fuga de la droga que encapsulan, entran rápidamente a ciertos órganos como el hígado, los riñones, el vaso y los nódulos linfáticos. Se ha observado también que estos vehículos son capaces de activar proteínas del complemento, causando reacciones pseudoalérgicas que pueden dañar las células del corazón y del hígado (Harris y Chess, 2003).

En cuanto a la terapia extracorporal como alternativa para contender con el envenenamiento con OP's, en donde la PTE es inmovilizada dentro de un cartucho al que se le hace circular la sangre del organismo intoxicado (Masson, et al., 1998), es poco viable debido a los costos y a la implementación de estos aparatos en clínicas pequeñas en donde se tratan la mayoría de las intoxicaciones por plaguicidas.

Existen también trabajos en donde se han ocupado otras enzimas, además de la PTE, capaces de hidrolizar compuestos organofosforados, tal es el caso de la enzima paraxonasa humana (HuPON) y la butirilcolinesterasa humana (HuBuChE); sin embargo, estas enzimas presentan una baja actividad y son insuficientes para desintoxicar a un organismo (Vilanova y Sogorb, 1999).

HIPÓTESIS

A partir de la modificación química de la PTE se generará una partícula catalíticamente activa y no inmunogénica, como alternativa para contender con la intoxicación por compuestos organofosforados.

OBJETIVOS

Objetivo General

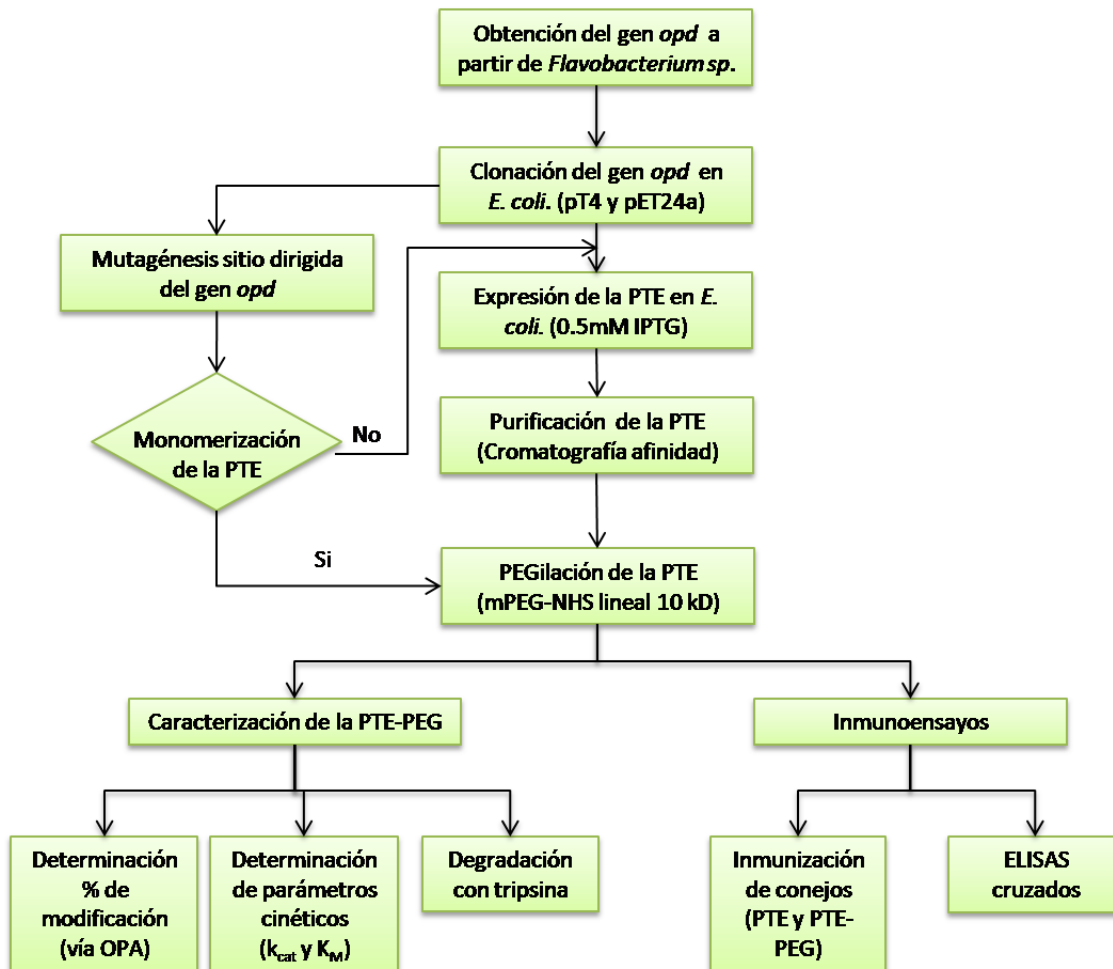
Obtener y caracterizar una partícula de fosfotriesterasa modificada químicamente, que sea catalíticamente activa e inmunológicamente inerte.

Objetivos Particulares

1. Expresar heterológamente el gen *opd* que codifica para la fosfotriesterasa de *Flavobacterium sp.* en *E. coli*.
2. Manipular el gen de la PTE para obtener un monómero con actividad catalítica.
3. Clonar el gen en un vector de expresión con el fin de purificar la PTE y obtenerla en cantidades suficientes.
4. Estudiar el comportamiento catalítico de la PTE modificada superficialmente con polietilenglicol (PEG).
5. Estudiar la actividad inmunogénica de la partícula catalítica.

MATERIALES Y MÉTODOS

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



PLÁSMIDOS

- pT4 (resistencia a kanamicina, promotor Ptrc, inducible por IPTG)
- pET24a (Novagen®, resistencia a kanamicina, promotor T7, inducible por IPTG, His-tag)

CEPAS (*E. coli*)

- DH5 α
- BL21 (DE3)
- C41 (DE3)

1. Clonación del gen *opd* en *E. coli*.

1.1 Inserto: gen *opd*

Flavobacterium sp. ATCC® #27551

A la cepa liofilizada se le añadieron 5 mL de medio TS_{líquido} (Bacto™ Tryptic Soy Broth). Se tomaron 300 μ L de la cepa resuspendida para inocular 3mL de medio TS y se dejó crecer por 16 h a 30 °C con agitación constante. Posteriormente se tomó una asada del cultivo para estriar en una caja de Petri con medio TS_{sólido} y se dejó crecer por 16 h a 30 °C. Se obtuvieron colonias aisladas.

Purificación de plásmido

Se inoculó una colonia de *Flavobacterium sp.* en 3 mL de TS y se incubó a 30 °C durante 16 h. Posteriormente se colectaron las células por centrifugación y se purificó el plásmido por lisis alcalina, con soluciones y columnas de Roche® (High Pure Plasmid Isolation Kit), obteniéndose el plásmido a una concentración de 65 ng/ μ L.

Amplificación del gen *opd*

Se diseñaron los siguientes oligonucleótidos para amplificar el gen *opd* sin la secuencia que codifica para el péptido señal y con la inserción de sitios de restricción para permitir la posterior ligación del gen en el vector.

Nde5'opd	5' AGA TAT ACA TAT GTC GAT CGG CAC AGG C 3'
Xho3'opd	5' GGT GCT CGA GTG ACG CCC GCA AGG T 3'

Los oligonucleótidos fueron sintetizados en la Unidad de síntesis del Instituto de Biotecnología, UNAM.

Posteriormente se llevó a cabo una reacción de PCR con gradiente de temperatura utilizando como templado el plásmido de *Flavobacterium sp.* purificado anteriormente. Se llevó a cabo la reacción en el equipo “iCycler” de Bio-Rad® bajo el siguiente programa.

No. Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	94 °C	2'
5	94 °C	40''
	41 – 47 °C	40''
	72 °C	1:30''
20	94 °C	40'
	55 °C	40'
	72 °C	1:30''
1	72 °C	10'

La temperatura a la cual se obtuvo una mayor producción de inserto sin la amplificación de otras secuencias que no fueran el gen en cuestión fue la correspondiente a la temperatura de 46 °C. La reacción se limpió utilizando las soluciones y columnas de Roche® para purificación de productos de PCR (High Pure PCR Product Purification Kit).

Digestión del producto de PCR con NdeI/XhoI

El producto de PCR fue digerido con 30 unidades de enzima NdeI y 30 unidades de enzima XhoI (New England Biolabs®) en la solución amortiguadora indicada por el proveedor (Buffer 2). El volumen total de la reacción se llevó a 50 µL y se incubó a 37 °C por 16 h.

La digestión se corrió en un gel de agarosa grado DNA (Bio-Rad®) al 1% en solución amortiguadora TAE. Se cortó la banda correspondiente a 1 kb y se hizo la extracción de DNA del gel de agarosa utilizando soluciones y columnas de Roche® para purificación de productos de PCR (High Pure PCR Product Purification Kit). Se recuperaron 30 µL de producto a una concentración de 75 ng/µL.

1.2 Vectores: pT4 y pET24a

Para poder llevar a cabo la ligación del gen *opd* con el vector se procedió a linearizar los dos plásmidos con los que se cuentan.

Digestión de pT4

El plásmido pT4-PRAI-CAT (Farias Rico, 2005) se digirió con 30 unidades de enzima NdeI y 30 unidades de enzima XhoI (New England Biolabs®) en la solución amortiguadora indicada por el proveedor (Buffer 2). El volumen total de la reacción se llevó a 50 µL y se incubó a 37 °C por 16 h.

La digestión se corrió en un gel de agarosa grado DNA (Bio-Rad®) al 1% en solución amortiguadora TAE. Se cortó la banda correspondiente a 2 kb y se hizo la extracción de DNA del gel de agarosa utilizando soluciones y columnas de Roche® para purificación de productos de PCR (High Pure PCR Product Purification Kit), se recuperaron 30 µL a una concentración de 25 ng/µL.

Digestión de pET24a

Se digirió también el vector pET24a (Novagen®) con 25 unidades de enzima NdeI y 25 unidades de enzima XhoI (New England Biolabs®) en la solución amortiguadora indicada por el proveedor (Buffer 2). El volumen total de la reacción se llevó a 40 µL y se incubó a 37 °C por 16 h.

La digestión se corrió en un gel de agarosa grado DNA (Bio-Rad®) al 1% en solución amortiguadora TAE. Se cortó la banda correspondiente a 5.3 kb y se hizo la extracción de DNA del gel de agarosa utilizando soluciones y columnas de Roche® para purificación de productos de PCR (High Pure PCR Product Purification Kit), se recuperaron 30 µL. Se recuperó en una concentración de 25 ng/µL.

1.3 Obtención de pT4-opd Y pET24-opd

Ligación pT4/pET24 con el gen *opd*

La ligación se realizó con la enzima T4-DNA ligasa (New England Biolabs®) en la solución amortiguadora indicada por el proveedor incubando a 16 °C durante 16 h. La reacción se llevó a cabo en una relación molar vector:inserto de 1:3.

Para concentrar los productos de la reacción y eliminar el alto contenido de sales de la solución amortiguadora se realizó una extracción con butanol, posteriormente se lavó con etanol al 100% y finalmente se resuspendió en 10 µL de agua tetradestilada.

Transformación de células por electroporación

Con el fin de corroborar la inserción del gen en el vector se procedió a transformar *E. coli* para la producción de plásmido y su posterior secuenciación. Para ello se mezclaron 60 μ L de células competentes *E. coli* DH5 α con 2 μ L de la ligación, ya sea del plásmido pT4-opd o del pET24-opd. Las células se pasaron a una celda de 0.1 cm y se sometieron a un choque eléctrico de 1.8 V, para posteriormente ser recuperadas en medio SOC con agitación constante durante 1 h a 37 °C.

Se plaquearon 300 μ L de las electroporaciones en cajas con LB con kanamicina y se dejó crecer por 16 h a 37 °C.

Se verificó la presencia del inserto (gen *opd*) por una reacción de PCR de colonia con los siguientes oligonucleótidos.

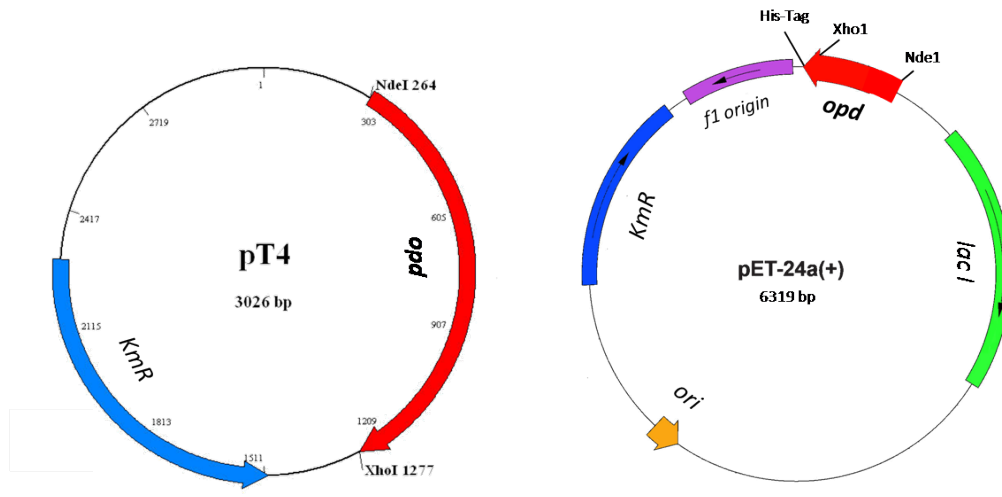
pT4	pT4fw	5' GAC ATA TAA ACG GTT CTG GCA 3'
	pT4rev	5' GCC AGT GAA TTG TAA TAC GAC 3'
pET24	T7primer	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3'
	pET24rv	5' GCT AGT TAT TGC TCA GCG GTG 3'

Se llevó a cabo la reacción en el equipo "iCycler" de Bio-Rad bajo el siguiente programa.

No. Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	94 °C	4'
25	94 °C	1'
	55 °C	1'
	72 °C	1:15''
1	72 °C	10'

Secuenciación

Se pusieron a crecer 2 clonas al azar de cada uno de los vectores para purificar plásmido por lisis alcalina, con soluciones y columnas de Roche® (High Pure Plasmid Isolation Kit). Finalmente se mandaron a secuenciar los plásmidos en la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM.



Transformación de las cepas BL21(DE3) y C41 con plásmido pET24-opd

Con el fin de obtener expresión de las proteínas de interés cuyos genes están clonados en el sistema pET es necesario utilizar cepas BL21 o sus derivados, como es el caso de la cepa C41, ya que cuentan en el cromosoma con una copia de la T7 RNA polimerasa, indispensable para transcribir genes bajo el control del promotor T7. Es por ello que se procedió a insertar el plásmido pET24-opd en estas cepas.

Se mezclaron 60 μ L de células quimiocompetentes *E. coli* BL21 (DE3) con 1 μ L de plásmido pET24-opd. Las células se incubaron en hielo por 30 min, posteriormente se dio un pulso de calor a 42 $^{\circ}$ C por 1:30 y finalmente se incubaron otros 2 min en hielo. Se recuperaron las células en medio SOC con agitación constante durante 1 h a 37 $^{\circ}$ C.

Se sembraron 300 μ L de la transformación en cajas con LB con kanamicina. Se dejó crecer por 16 h a 37 $^{\circ}$ C.

Expresión de la PTE y extracción total de proteínas

Se hizo la extracción de proteínas totales para los siguientes cultivos: pET24opd (BL21); pET24opd (C41); pT4opd (DH5 α); cepa DH5 α ; BL21 y C41.

Se inocularon 50 mL de medio LB más kanamicina con 0.5 mL del precultivo correspondiente. Los cultivos se dejaron crecer a 37 $^{\circ}$ C hasta alcanzar una OD de 1.3. En este punto los cultivos se

indujeron con 0.5 mM de IPTG y se agregó 0.5 mM de ZnCl₂. Los cultivos se dejaron crecer por 12 h más a 20 °C.

Posteriormente se centrifugaron los cultivos en frío a 5000 rpm por 5 min, se resuspendió el precipitado obtenido con 2 mL de buffer de fosfatos 10 mM pH 7 para después centrifugar nuevamente. Se resuspendió el precipitado en 2 mL de agua destilada para después sonicar 2 min (6 s de pulso con 6 s de descanso) en frío. A continuación se centrifugó en frío a 10 000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se consideró el extracto enzimático con el que se trabajará posteriormente.

1.4 Evaluación de la actividad en pT4-opd y pET24-opd

Ensayo de actividad

Se midió en el espectrofotómetro la aparición del producto (p-nitrofenol) de la hidrólisis del metil paratión a 400 nm por 3 min ($\epsilon_{400} = 1.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Aubert, 2004). La reacción se llevó a cabo de la siguiente manera:

Buffer Tris-HCl (pH 9 , 10 mM)	782 μL
Metil Paratión (40 μM)	8 μL
Extracto enzimático	200 μL

Medición de concentración de proteína por Bradford

La proteína se determinó con el reactivo de BioRad® (Protein Reagent Assay) espectrofotométricamente a 595 nm usando albumina de suero bovino como estándar.

Reactivo de Bradford	200 μL
Agua destilada	800 μL
Extracto enzimático	2 μL

2. Manipulación del gen de la PTE para obtener un monómero con actividad catalítica

2.1 Mutagénesis sitio dirigida

La mutagénesis sitio dirigida se llevó a cabo utilizando el protocolo del QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene).

Los siguientes oligos fueron diseñados:

R152Afw	5' CAC ACA GTT CTT CCT GGC TGA GAT TCA ATA TGG C 3'
R152Arv	5' GCC ATA TTG AAT CTC AGC CAG GAA GAA CTG TGT G 3'
S137Afw	5' GTT CGA CCC GCC ACT TGC GAT GCG ATT GAG G 3'
S137Arv	5' CCT CAA TCG CAT CGC AAG TGG CGG GTC GAA C 3'
R142Afw	5' CTT GCG ATG CGA TTG GCG AGT GTA GAG GAA CTC 3'
R142Arv	5' GAG TTC CTC TAC ACT CGC CAA TCG CAT CGC AAG 3'

2.2 Western Blot

Para evaluar la producción de PTE soluble de las distintas mutantes se procedió a hacer un western blot. En primera instancia se cargaron y corrieron en un gel de acrilamida al 12% los extractos enzimáticos de las siguientes clonas: S137A, R152A, S137A/R152A, S137A/R141A/R152A. También se cargó en el gel la PTE silvestre purificada y el extracto protéico de la cepa C41 como controles.

Para llevar a cabo el western blot primero se transfirieron las proteínas separadas por SDS-PAGE a una membrana de nitrocelulosa que posteriormente fue bloqueada con una solución de BSA al 5% en PBST O/N a 4° C. A continuación se lavó 3 veces con PBST por 10 min y se le agregó el anticuerpo monoclonal Anti-poliHistidina-Fosfatasa alcalina (Sigma) en una relación 1:2000 en solución PBST con 0.1% de leche, se incubó durante 1 h y se lavó 3 veces con PBST. Finalmente se adicionó a la membrana reactivo BM Purple (NBT/BCIP ready-to-use) (Roche) hasta observar la aparición de bandas.

2.3 Cromatografía de filtración en gel

Con el fin de comparar el tamaño de la PTE S137A con el de la PTE silvestre se llevó a cabo una cromatografía de filtración en gel cuyo principio es la separación de moléculas en base a su peso molecular. Se utilizó una columna TSK-G3000PW_{XL} con un flujo de 0.4 mL por minuto con una duración por corrida de 25 min, en un equipo de HPLC. Se inyectaron las muestras de proteínas de la PTE silvestre y la PTE S137A, el buffer de corrida fue buffer de fosfatos 20 mM pH 8. Se colectaron las fracciones cada minuto y se midió la actividad enzimática.

3. Purificación de la PTE

Se puso un precultivo O/N de 3 mL de LB con Km, se tomaron 500µL para inocular un cultivo de 50 mL (LB con Km) el cual se dejó crecer a 37 °C hasta que alcanzara una densidad óptica de 2 OD. A continuación se inoculó 1L de LB (con Km) con los 50 mL del cultivo anterior y se dejó crecer hasta alcanzar entre 0.4-0.6 OD. En este punto se indujo con 0.5 mM de IPTG y se le adicionó 0.5 mM de ZnCl₂. Se dejó crecer por 14 h a 25 °C.

Posteriormente el cultivo se centrifugó a 3840 x *g* por 5 min, se resuspendieron las células en buffer A y se sonicó la muestra. Se centrifugó a 22100 x *g* por 20 min a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se pasó por un filtro de 0.22 µm.

La purificación se llevó a cabo en un sistema de cromatografía atmosférica EconoSystem de Bio-Rad® utilizando una columna HiTrap Chelating HP (Amersham Biosciences®) de 5 mL cargada con níquel. Se siguieron los siguientes pasos:

- 1) Se equilibró la columna con Buffer A con un flujo de 3 mL/min con 10 volúmenes de columna.
- 2) Unión de la PTE a la columna haciendo pasar el extracto enzimático filtrado a una velocidad de 1.5 mL/min.
- 3) Elución de proteínas con pegado inespecífico con 10% de Buffer B con un flujo de 3 mL/min por 10 min.
- 4) Gradiente de imidazol llevado a cabo con Buffer B del 10% al 60% con un flujo de 3 mL/min durante 20 min. Las fracciones se colectaron cada minuto.

Buffer A (Unión)	50 mM Boratos 300 mM NaCl 1 mM Imidazol pH 8.5
Buffer B (Elución)	50 mM Boratos 300 mM NaCl 500 mM Imidazol pH 8.5

Se corroboró la eficiencia de la purificación por medio de una electroforesis SDS-PAGE al 12%.

Las fracciones que contenían la proteína de interés se concentraron utilizando un AMICON con una membrana de corte molecular de 3000 daltones. Posteriormente se hicieron varios lavados con un buffer de boratos 50 mM pH 8.5, 200 mM de NaCl y 100 mM de sacarosa con el fin de ir disminuyendo el porcentaje de imidazol en la muestra y que ésta no se precipitara. Se redujo el volumen de la muestra usando centricones VIVASPIN (Sartorius®) de corte molecular de 10 000 daltones.

Finalmente se midió la concentración de proteína por el método de Bradford, usando los reactivos de Bio-Rad® como se describió anteriormente.

4. Modificación química de PTE con polietilenglicol (PEG).

4.1 Identificación in silico de los residuos de lisina en la PTE

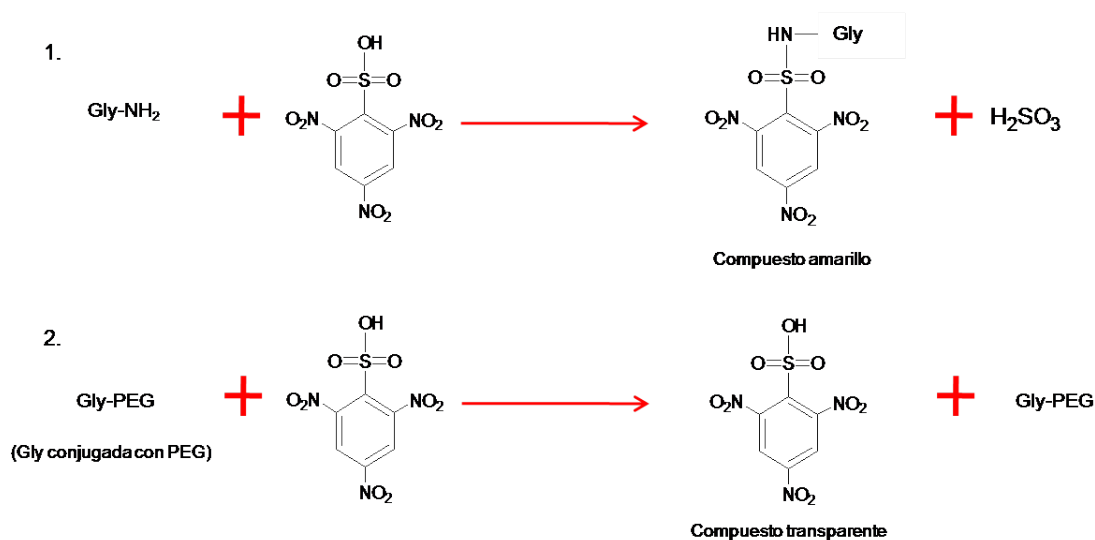
Con la ayuda del programa PyMOL se identificaron los residuos de lisina que se encuentran expuestos en la superficie de la PTE, ya que éstos son los residuos de aminoácidos que serán modificados al unirse covalentemente con el PEG.

4.2. Medición del porcentaje de activación del PEG-NHS lineal de 10 kD (Nektar®)

Para determinar qué porcentaje del PEG seguía activado con NHS se llevó a cabo una reacción con glicina y TNBS, este último compuesto reacciona con los grupos amino libres.

Se preparó una solución de glicina de 0.2 mg/mL, así como una solución de concentraciones equimolares de PEG y glicina disueltos en buffer de boratos 0.2 M pH 8, esta última se dejó reaccionar por 30 min a temperatura ambiente.

	Blanco (μL)	Gly (μL) ¹	Mezcla (μL) ²
B. Boratos (0.2M pH 9)	950	950	950
B. Boratos (0.2M pH 8)	25	25 (de la solución 0.2 mg/mL)	25 (de la mezcla de reacción PEG-Gly)
TNBS (concentrado)	1.25	1.25	1.25



Después de transcurrido el tiempo, se leyó en el espectrofotómetro a una $\lambda=420$ la absorbancia de las distintas preparaciones y se calculó el porcentaje de activación de la siguiente manera:

$$\% \text{ Activación} = \frac{\text{Abs mezcla}}{\text{Abs Gly}} \times 100$$

4.3 Reacción de PEGilación con PEG-NHS lineal de 10kD

Para llevar a cabo la modificación química la PTE se utilizó metoxiPolietilenglicol (mPEG) de 10kD activado con N-hidroxisuccinimida. Por cada lisina y N-terminal presente en la PTE se agrega un exceso de 15 moles de PEG. La reacción se llevó a cabo en Buffer de boratos (pH 8.5 50 mM, 200 mM de NaCl) y se dejó agitando a temperatura ambiente durante 4 h.

Posteriormente se eliminó el PEG que no reaccionó con los residuos de lisina de la PTE utilizando centrífugas VIVASPIN de un corte de 30kD haciendo varios lavados.

La concentración final de la proteína PEGilada se midió por el método de BCA utilizando el kit de Pierce® (*BCA Protein Assay Kit*).

4.4 Determinación de los parámetros cinéticos (k_{cat} y K_M) de la proteína PEGilada

Los ensayos de actividad se llevaron a cabo midiendo en el espectrofotómetro la aparición del producto de hidrólisis (p-nitrofenol) del metil paratión a 400 nm por 1 min ($\epsilon_{400} = 1.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Aubert, 2004) con distintas concentraciones de sustrato: 0, 40, 60, 100, 150, 200, 300, 400 μM . La reacción se llevó a cabo en buffer de Boratos (pH 8.5, 50 mM) en un volumen total de 0.5 mL.

Los valores de K_M y k_{cat} fueron obtenidos por medio del programa Enzyme Fitter (Biosoft, Cambridge UK).

4.5. Caracterización de los conjugados PTE-PEG

Cromatografía de filtración en gel

Se utilizó una columna TSK-G3000PW_{XL} con un flujo de 0.4 mL por minuto con una duración por corrida de 25 min, en un equipo de HPLC Perkin Elmer. El buffer de corrida fue buffer de fosfatos 0.1 M, NaCl 0.2 M pH 7.2 con 20% de acetonitrilo.

SDS-PAGE

Se preparó un gel de acrilamida al 12% en donde se cargaron 10 μg de la enzima nativa así como de la PTE PEGilada.

Porcentaje de modificación vía OPA

Se calculó el porcentaje de modificación de la PTE por el PEG haciendo una cuantificación de aminos primarios. El procedimiento se realizó utilizando o-ftaldehído (OPA) en medio alcalino y en

presencia de un agente reductor para producir un compuesto fluorescente. La reacción se llevó a cabo de la siguiente manera:

Solución 1	0.15 mL (10 mg OPA/mL etanol)
	0.15 mL (5 μ L β -mercaptoetanol/mL etanol)
	9 mL (Buffer de boratos 40 mM pH 10)

Se añadieron 5 μ L de una solución de Brij 35 (100 mg/mL) a 500 μ L de la solución 1 más 0.068 nmoles de PTE o de PTE PEGilada. Después de 3 min de reacción, se leyó la intensidad de la fluorescencia usando una longitud de excitación de 335 nm y una longitud de emisión de 440 nm. Se utilizó un slit de 2.5. (Ayala, M., 2002)

5. Estabilidad a degradación por proteasas

Tanto la PTE sin modificar (3.4 μ g) como la PTE PEGilada (3.4 μ g) se incubaron a 37 °C con tripsina (0.1 mg/mL) en buffer de boratos 50 mM pH 8.5. Se fue tomando muestra a los 30, 60 y 90 min para posteriormente medir el porcentaje de retención de actividad.

6. Inmunoensayos

6.1. Inmunización de conejos

Se utilizaron dos conejos (New Zealand, hembras) para llevar a cabo las inmunizaciones. A uno de ellos se le inyectó la PTE nativa, mientras que al segundo se le inyectó la PTE PEGilada. El esquema de inmunización fue el mismo para los dos conejos.

<i>Inmunización</i>	<i>Dosis antígeno (μg) / conejo</i>	<i>Tipo de adyuvante</i>	<i>Volumen inyectado por conejo (μL)</i>
1	20	CF	500
2	20	IF	500
3	20	IF	500
4	50	IF	500

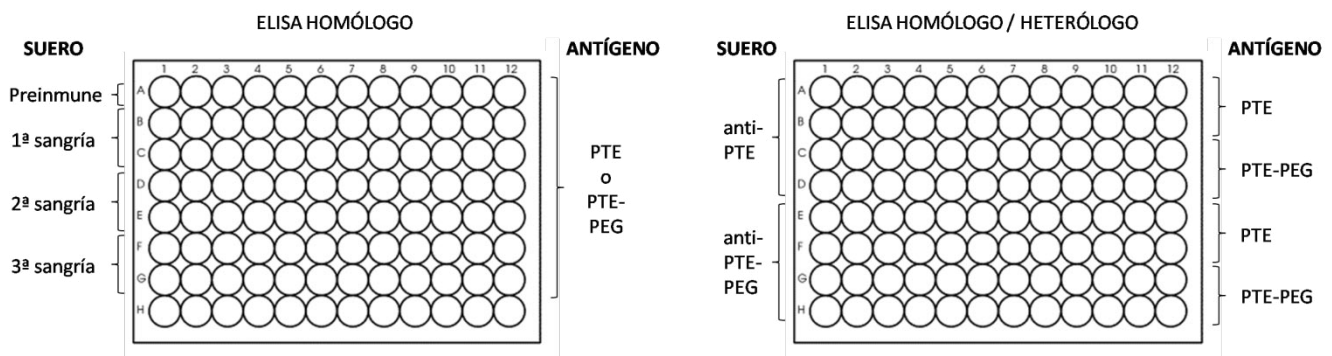
El antígeno (en 250 μ L de PBS), se mezcló a partes iguales con el adyuvante de Freund (Rockland). Cada inmunización fue espaciada por 10 días. Antes de la primera inmunización de los conejos se llevó a cabo una sangría preinmune (control). A la segunda inmunización se extrajeron 2 mL de sangre, por conejo, para monitorear títulos por ELISA. A partir de esa inmunización y hasta la cuarta se procedió de la misma manera. Veinte días después de la cuarta inmunización, los conejos se sangraron a blanco. Se extrajo suero crudo y se almacenó a -20° C hasta su uso.

6.2. Medición de títulos por ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay).

La titulación de los anticuerpos a partir de sueros se llevó a cabo por Inmunoensayos enzimáticos. Los títulos se definieron como la dilución del suero hiperinmune, en la cual se encuentra la mitad de la absorbancia máxima.

La prueba de ELISA consistió en (González-Juárez, 1997):

a) Sensibilizar placas de 96 pozos para ELISA (NUNC™ *Brand products*) con una solución de antígeno (PTE o PTE-PEG) a una concentración de 1 μ g/ml reconstituida en una solución 100 mM carbonato/bicarbonato pH 9.5. Por cada pozo se colocaron 100 μ l hasta la columna 11, ya que el carril 12 fue el control negativo. La placa se incubó toda la noche a 4° C.



b) Una vez concluida la incubación, la placa se lavó tres veces con 200 μ l de solución de lavado (0.05 M Tris/HCl pH 8 + 0.15 M NaCl + 0.05% Tween 20). Este proceso se repitió entre cada paso a lo largo de todo el protocolo.

c) Posteriormente se bloquearon las uniones inespecíficas con 200 μ l de solución de bloqueo (0.05 M Tris/HCl pH 8 + 0.5% gelatina + 0.2% Tween 20), durante dos horas a 37° C.

d) Se hicieron diluciones seriadas de los sueros, comenzando con una dilución 1:30 en buffer de reacción para ELISA (0.05 M Tris/HCl pH 8 + 0.5 M NaCl + 0.1% de gelatina + 0.05% Tween 20). En cada pozo se adicionaron 100 μ l de la solución de reacción para ELISA y se mezclaron 50 μ l/pozo de la dilución del suero en la columna 1, para proceder a las diluciones seriadas hasta la columna 10 dejando la 11 y 12 como controles. Se incubó por una hora a temperatura ambiente.

e) Después se incubó el segundo anticuerpo anti-conejo (goat anti-rabbit IgG 1mg/mL, Zymed®) acoplado a fosfatasa alcalina usando una dilución 1:750 en solución de reacción para ELISA, poniendo 100 μ l/pozo. Se incubó una hora a temperatura ambiente.

f) La reacción se reveló con 100 μ l/pozo de sustrato PNPP (100x), incubándose por 15, 30 y 60 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido cada uno de los tiempos se procedió a leer la placa en un lector de ELISA (modelo Bio-Rad 550) a 405 nm.

Para determinar los títulos de las lecturas obtenidas, las curvas sigmoideas se generaron con el programa GraphPad Prism (Versión 2; GraphPad Software, Inc. San Diego, CA). El punto de inflexión se calculó ajustando los datos experimentales para cada antígeno y cada suero por regresión no-lineal de las curvas sigmoideas.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

1. CLONACIÓN DEL GEN *opd* EN *E. coli*

Se decidió clonar el gen que codifica para la fosfotriesterasa de *Flavobacterium sp.* en *Escherichia coli* debido al fácil manejo de esta bacteria en el laboratorio, así como a las altas tasas de crecimiento que presenta. El gen *opd* fue amplificado a partir de uno de los plásmidos presentes en *Falvobacterium sp.* por medio de un PCR dando lugar a un fragmento de alrededor de 1 kb, resultado congruente con lo esperado (Fig 5).

Con el fin de encontrar el vector en el que la expresión de la proteína fuera más eficiente se introdujo el gen *opd* de manera satisfactoria en dos plásmidos con características distintas. En ambos casos, el gen fue clonado sin los nucleótidos que codifican para los primeros 29 aminoácidos, correspondientes a un péptido señal, necesario en el organismo nativo para dirigir la proteína a la membrana, pero que en *E. coli.* genera una reducción en la expresión de la proteína (Mulbry y Karns, 1989).

El plásmido pET24a es un vector diseñado específicamente para la expresión de proteínas recombinantes, en donde se produce la proteína de interés exclusivamente cuando se induce con IPTG. Además, cuenta con una secuencia que codifica para un HisTag que se encontrará en el extremo carboxilo de la proteína a expresar. Por otro lado en el vector pT4, la proteína de interés está bajo el control del promotor Ptrc que aunque también es inducible por IPTG se presenta cierta expresión basal de la proteína.

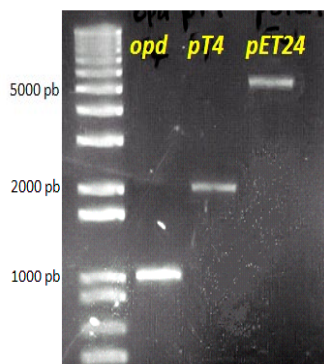


Fig. 5. Gel de agarosa (1%) en donde se muestran los vectores pT4 / pET24 linearizados y el inserto (gen *opd*)

Posteriormente, para corroborar que el gen *opd* se expresa de manera correcta en *E. coli*, se hicieron ensayos de actividad utilizando extractos enzimáticos de las distintas construcciones y en distintas cepas. Como se observa en la Fig. 6, se encontró una mayor actividad cuando el gen está clonado en el vector pET24 comparado con la que se logra en el vector pT4; debido posiblemente a que el gen de interés se encuentra bajo el control de un promotor transcripcional más fuerte o a que las cepas BL21 y C41 presentan una mayor tasa de crecimiento que la DH5 α . También se observa un pequeño incremento en la actividad cuando el vector pET24*opd* es crecido en la cepa C41. Esta cepa es derivada de la BL21 y se ha utilizado principalmente para expresar proteínas que son tóxicas para *E. coli*, debido a que presenta una mutación (no caracterizada) que previene la muerte de la célula (Miroux y Walker, 1996). A pesar de que la PTE no presenta toxicidad, el utilizar esta cepa tiene un efecto favorable en la expresión de la proteína. Es por lo antes mencionado que se utilizará el vector pET24*opd* en la cepa C41 para la expresión de la PTE.

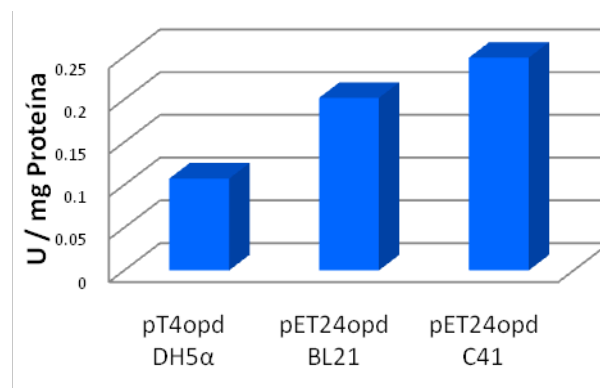


Fig. 6. Actividad específica de los extractos enzimáticos. Condiciones: 12h a 25° C, 0.5 mM de ZnCl₂.

Otros factores importantes que se tomaron en cuenta para una mejor expresión de la PTE fueron la temperatura de crecimiento y la inclusión de zinc en el medio de cultivo. Se decidió crecer las células a una temperatura de 25 °C, ya que fue encontrado por Kang y colaboradores (2006) que es la temperatura óptima para obtener una mayor expresión de la proteína. A pesar de que a temperaturas más altas se favorece una mayor tasa de transcripción, se puede promover también el mal plegado de las proteínas que en última instancia generará cuerpos de inclusión. Por otro lado, y debido a que la PTE necesita de iones metálicos para llevar a cabo la catálisis, se agregó 0.5 mM de zinc al medio de cultivo para promover la formación de una mayor proporción de enzima activa (Kang et al., 2006).

2. OBTENCIÓN DEL MONÓMERO

Con el fin de producir una partícula catalítica pequeña y con una mejor relación PEG-Proteína que pudiera presentar una menor inmunogenicidad, se procedió a generar la fracción monomérica de la PTE disociada. Si logramos obtener una reducción en el peso molecular de la proteína al monomerizarla (de 72 kD a 36 kD), haremos más significativo el efecto del volumen hidrodinámico del PEG, por lo que a nivel macromolecular serán las propiedades del polímero las dominantes en la partícula.

Para conocer cuáles son los aminoácidos implicados en la formación del dímero, se recurrió una base de datos llamada pdbsum, en donde se muestran los 28 aminoácidos involucrados en la dimerización de la PTE (Fig 7).

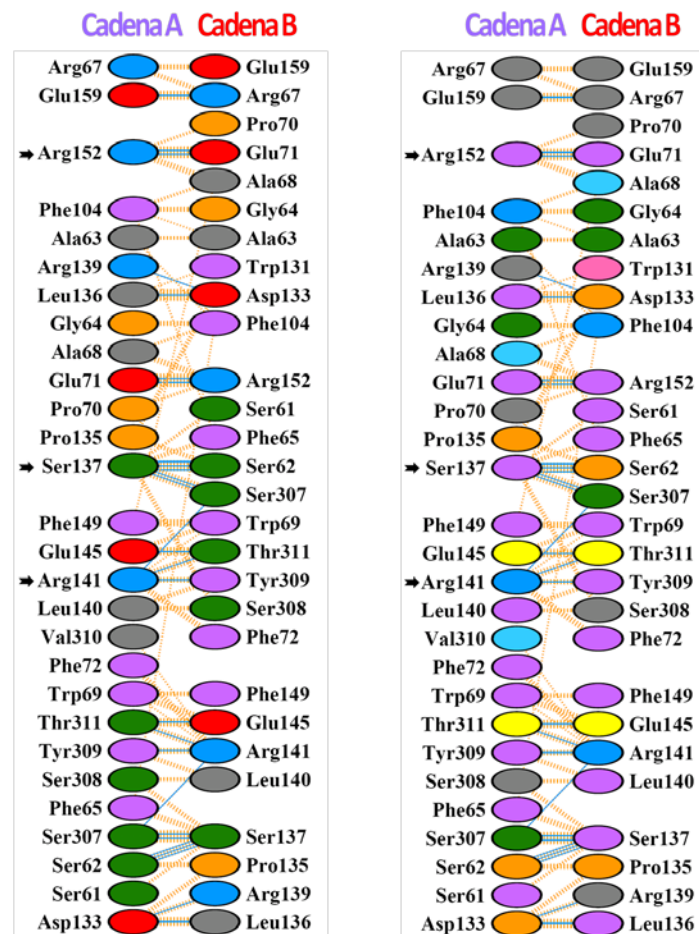


Fig 7. Esquema en donde se ilustran los aminoácidos que participan en la formación del dímero. De color azul se representan los puentes de hidrógeno y de naranja interacciones hidrofóbicas. De lado izquierdo los colores indican el tipo de aminoácido y de lado derecho los colores indican el grado de conservación de ese aminoácido. **Características del residuo:** Positivo; negativo; neutral; alifático; aromático; P,G; C. **Conservación del residuo:** Bajo 1 2 3 4 5 6 7 8 9 Alto

Se escogieron 3 posibles aminoácidos a ser mutagenizados por alaninas con el fin disminuir las interacciones entre las dos cadenas de la proteína, los aminoácidos con mayor número de interacciones y menor conservación son: S137, R141 y R152 (Fig. 8). La razón por la que se escogió alanina para la sustitución se debe a que este es un aminoácido no polar, lo que disminuirá principalmente la formación de puentes de hidrógeno; además de contar con una cadena lateral pequeña que no contribuirá de manera importante a la formación de interacciones hidrofóbicas. Es de esta manera como se pretende desestabilizar la formación del dímero.

Se llevaron a cabo satisfactoriamente las siguientes mutaciones en el vector pET24-opd:

- S137A
- R152A
- S137A, R152A
- S137A, R141A, R152A

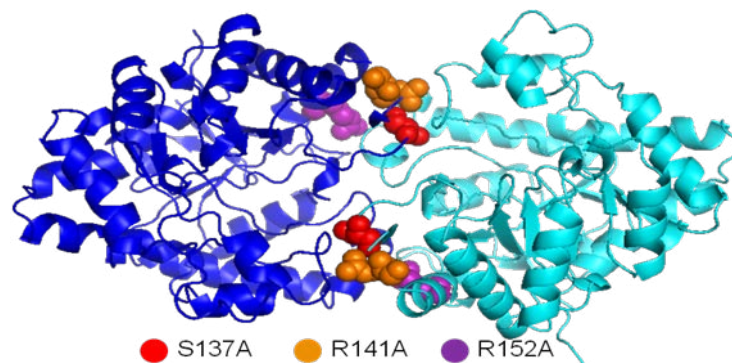


Fig 8. Ubicación de los tres aminoácidos que serán mutagenizados por alaninas.

Se hicieron los ensayos de actividad con los extractos enzimáticos provenientes de las mutantes sencillas, la doble y la triple (Fig. 9). A continuación se muestra una gráfica en donde puede observarse que tanto la mutante doble como la triple no presentan ninguna actividad de fosfotriesterasa detectable, y en donde la mutante sencilla R152A lleva a cabo una degradación mínima del plaguicida. Sin embargo, la mutante S137A presenta una actividad aceptable, aunque alrededor del 40% menor que la que presenta la enzima silvestre. Para este caso, teóricamente, habría en total la disrupción de 5 puentes de hidrógeno.

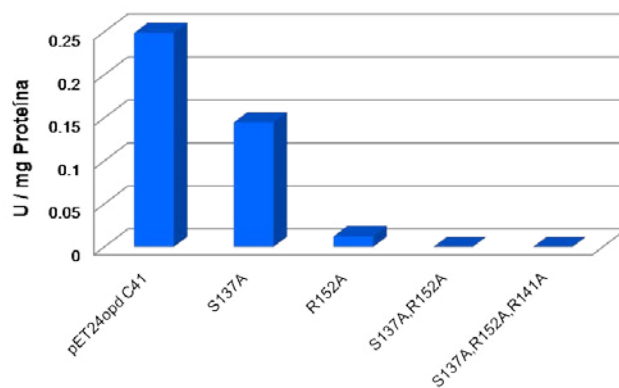


Fig. 9. Actividad específica de los extractos enzimáticos de las distintas mutantes. Condiciones: 12h a 20° C, 0.5 mM de ZnCl₂.

Así mismo se llevó a cabo un western blot, en donde con un anticuerpo anti-histidinas, se logró detectar la PTE en la fracción soluble únicamente para la mutante que presentaba actividad, la S137A (Fig. 10). Esto nos habla de que en el resto de las mutantes no se produce proteína soluble debido, probablemente, a que las mutaciones interfirieron con el plegado adecuado de la proteína. La banda (de alrededor de 34 kD) que se logra apreciar en todos los extractos se debe al reconocimiento por el anticuerpo de alguna otra proteína presente en *E. coli*, ya que inclusive se encuentra presente en la cepa C41 sin ningún plásmido (control negativo).

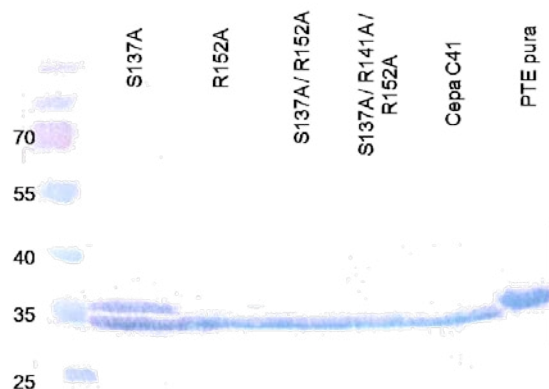


Fig. 10. Western Blot de la fracción soluble procedente de las distintas mutantes.

Posteriormente se procedió a purificar la PTE con la mutación S137A por medio de cromatografía de filtración en gel con el fin de evaluar si se trataba de un dímero o de un monómero. Se colectaron las distintas fracciones y se les midió la actividad enzimática, encontrándose que la PTE

nativa y la PTE S137A tienen el mismo tiempo de retención (16 min), de manera que la PTE con la mutación sigue siendo una proteína dimérica al igual que la PTE silvestre (Fig 11).

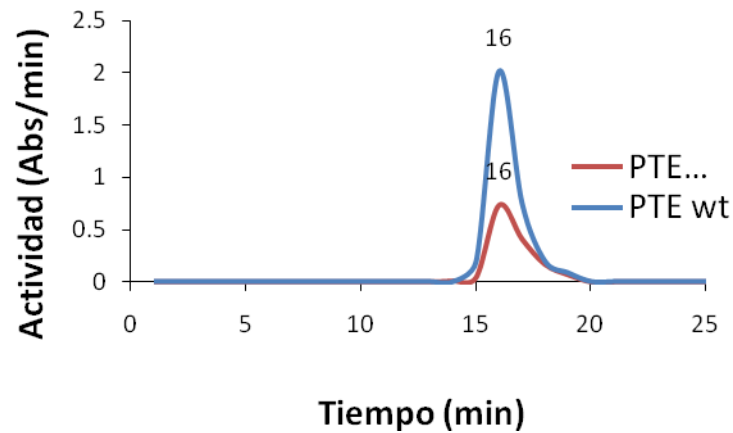


Fig. 11. Evaluación del peso molecular de la PTE S137A por cromatografía de filtración en gel.

3. PURIFICACIÓN DE LA PTE silvestre

Para la purificación de la PTE se escogió una cromatografía de afinidad aprovechando el HisTag, codificado en el vector, ahora presente en el extremo carboxilo terminal de la proteína. Este método cromatográfico nos permite obtener la proteína pura en un solo paso, a diferencia de los tres o cuatro pasos necesarios, reportados anteriormente para la purificación de esta enzima (Rochu, 2002; Grimsley, 1997)

La columna de afinidad fue cargada con níquel para permitir la unión selectiva de la cola de histidinas fusionada a la PTE. Como se puede observar en el gel de acrilamida (Fig. 12), se logró obtener la proteína con un 95% de pureza, siendo la banda mayoritaria de alrededor de 36 kD la que corresponde al peso molecular de la PTE (en su forma monomérica ya que se trata de un gel desnaturizante).



Fig 12. A. Gel de acrilamida SDS-PAGE (al 12%) en donde se muestran la PTE purificada

Se lograron obtener 1.45 mg de proteína pura por litro de cultivo, cantidad suficiente para llevar a cabo los ensayos de PEGilación e inmunológicos (*Tabla 3*). Cabe mencionar que se ha reportado que la sobreexpresión de la PTE en *E.coli* es poco eficiente ya que la mayor parte de la proteína (más de 95%) se encuentra inactiva formando cuerpos de inclusión (Roodveldt, 2005).

Tabla 3. Purificación de la PTE silvestre expresada a partir del vector pET24-opd

	Volumen	Actividad U/mL	Unidades totales	Rendimiento
Extracto total	130 mL	2.99	384.04	1
Fracción Purificada	2 mL	41.33	82.66	0.21

A pesar de la facilidad y rapidez del método escogido para la purificación de la PTE, se presentaron ciertas complicaciones durante el proceso, siendo la más crítica de ellas la precipitación de la proteína pura al remover el imidazol de la muestra. Para contender con este problema fue necesario ir reemplazando de manera gradual el buffer con imidazol en donde se encontraba la PTE pura por el mismo buffer pero sin este componente y que ahora incluía sacarosa, reduciendo así la cantidad de proteína que se precipitaba en un principio. Otro de los inconvenientes fue la pérdida de cantidades importantes de proteína que no se unían a la columna de afinidad o se eluían a bajas concentraciones de imidazol, por lo que se obtuvo un rendimiento bajo en la purificación perdiéndose alrededor de un 79% de las unidades con las que se contaban en un principio.

4. MODIFICACIÓN QUÍMICA CON PEG DE LA PTE silvestre

La PTE cuenta con 8 lisinas por monómero en su secuencia, de las cuales 7 podrán participar en la reacción de acoplamiento con PEG (Fig. 13), ya que se encuentran expuestas en la superficie; la octava lisina no será capaz de unirse con el polímero ya que se encuentra carboxilada. Aunado a las lisinas también estarán sujetos a reaccionar con el PEG los aminos terminales de las dos

cadena polipeptídica que conforman a la proteína, por lo que en total habrá 16 posibles sitios de unión por dímero.

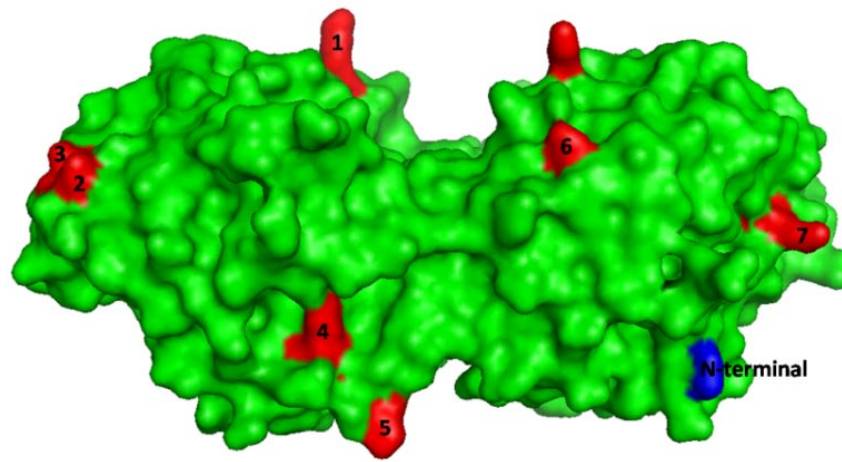


Fig 13. Representación tridimensional de la PTE en su forma dimérica, en donde se representan las 7 Lys y el N-terminal por monómero que serán blanco de unión covalente con PEG.

La importancia de los residuos de lisina radica en que el grupo ϵ -amino de éstas llevara a cabo un ataque nucleofílico sobre el PEG activado para formar un enlace covalente, dando lugar a la modificación química de la proteína (Fig 14).

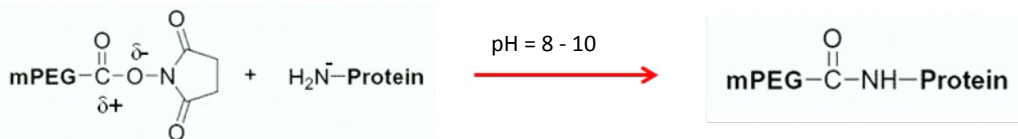


Fig 14. Reacción de acoplamiento del PEG activado con N-hidroxisuccinimida con el grupo amina de alguna Lys.

Para este proyecto se utilizó un metoxiPEG lineal de 10kD activado con N-hidroxisuccinimida (mPEG-NHS). Este compuesto es ampliamente utilizado en la derivatización de PEGs que se usarán para la modificación de proteínas con fines terapéuticos ya que produce enlaces amida fisiológicamente estables, es altamente reactivo y no presenta toxicidad. Se midió el porcentaje de activación del PEG activado vía TNBS, obteniéndose un valor de 84% de activación, dato importante para calcular la cantidad exacta de polímero que tendrá que utilizarse para la reacción con la proteína.

Posteriormente se llevó a cabo la modificación química de la enzima con el polímero, en donde se necesitó de un exceso molar de 15 veces de PEG por cada lisina y N-terminal de la proteína para que la totalidad de la PTE fuera modificada. De esta manera se evitó un paso cromatográfico para separar la proteína PEGilada de la no modificada.

Al cabo de las cuatro horas de reacción, se encontró la formación de conjugados PTE-PEG al observarse, por una cromatografía de filtración en gel, la aparición de un pico con un tiempo de retención menor al correspondiente a la PTE silvestre (Fig. 15A). Así mismo se corroboró por medio de un gel SDS-PAGE y un Western Blot que la totalidad de la proteína estuviera modificada, al no observarse más la banda correspondiente a la proteína nativa (alrededor de 36 kD), y pudiéndose distinguir la aparición de bandas de mayor peso molecular, correspondientes a la proteína con distintos grados de PEGilación (Fig. 15B, C).

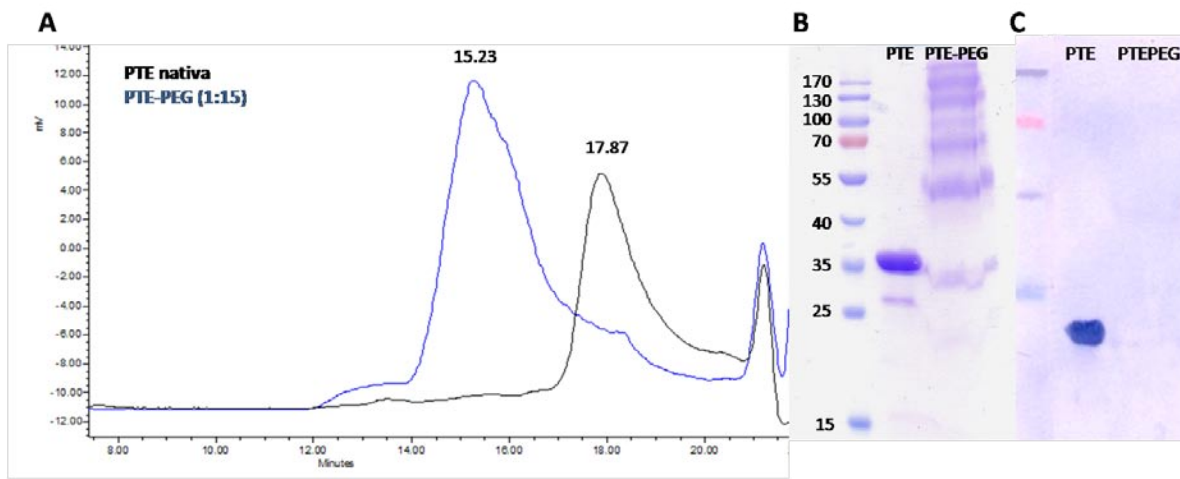


Fig. 15. Análisis de la reacción de PEGilación. A) Cromatografía de filtración en gel, en donde se muestra el tiempo de retención para la PTE nativa (17.87 min) y el de la PTE-PEG 1:15 (15.23 min). B) Gel de acrilamida SDS-PAGE al 12%, donde se muestra la PTE PEGilada con distintos grados de modificación. C) Western Blot anti-His.

Con el fin de determinar el grado de modificación de la PTE PEGilada se llevó a cabo un ensayo de fluorescencia con OPA. Este compuesto se une a los grupos amino libres y emite fluorescencia a una cierta longitud de onda, de tal forma que al comparar la emisión de fluorescencia de la proteína sin modificar con la PEGilada, cuyos aminos libres disminuyen, se puede calcular el grado de modificación de la proteína por el PEG. En el caso de la partícula PTE-PEG obtenida (relación molar 1:15), encontramos que el grado de modificación de la proteína fue de un 62.6% (Fig. 16), lo que se traduce en que en promedio se unieron 10 cadenas de PEG por dímero.

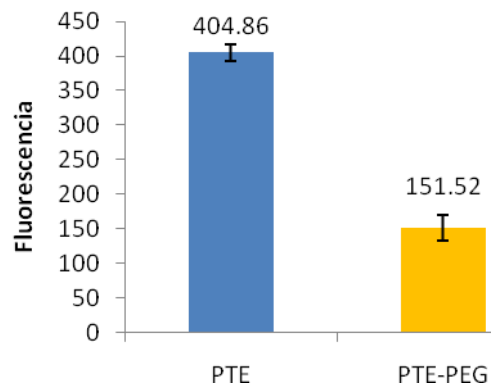


Fig 16. Intensidad de fluorescencia generada por la reacción del OPA con los grupos amino libres de la PTE y la PTE PEGilada.

Es importante mencionar que la cantidad de cadenas de PEG que se unen a cada proteína es variable (como se puede observar en la Fig. 15B); esto se debe a que la reacción de acoplamiento del PEG con la proteína es al azar. De esta manera si existen dos lisinas que estén muy próximas una de la otra, probablemente sólo una de ellas será capaz de reaccionar con el PEG generándose un impedimento estérico para que la otra cadena de PEG pueda acoplarse con la segunda lisina. Además cabe resaltar que no todos los grupos amino de las lisinas tienen la misma reactividad, esto debido a que los aminoácidos vecinos alteran su nucleofilicidad, por lo que los grupos amino más nucleofílicos se conjugarán más rápido con el PEG.

Una vez obtenida la PTE modificada con el polímero, se llevaron a cabo los ensayos de actividad para determinar en qué medida se alteraron los parámetros cinéticos de la enzima PEGilada. Se encontró que la k_{cat} para la enzima sin modificar fue de $698.5 \text{ s}^{-1} (\pm 55.7)$, mientras que para la PTE PEGilada fue de $552.6 \text{ s}^{-1} (\pm 49.5)$, lo que corresponde a una disminución en la velocidad para catalizar la reacción del 21%. En el caso de la K_M la diferencia en los valores encontrados para la PTE nativa ($207.7 \text{ } \mu\text{M} \pm 34.4$) y la PTE modificada $233.4 \text{ } \mu\text{M} (\pm 41.5)$ no fueron significativos, por lo que podemos considerar que la PEGilación no cambió la afinidad de la enzima por su sustrato.

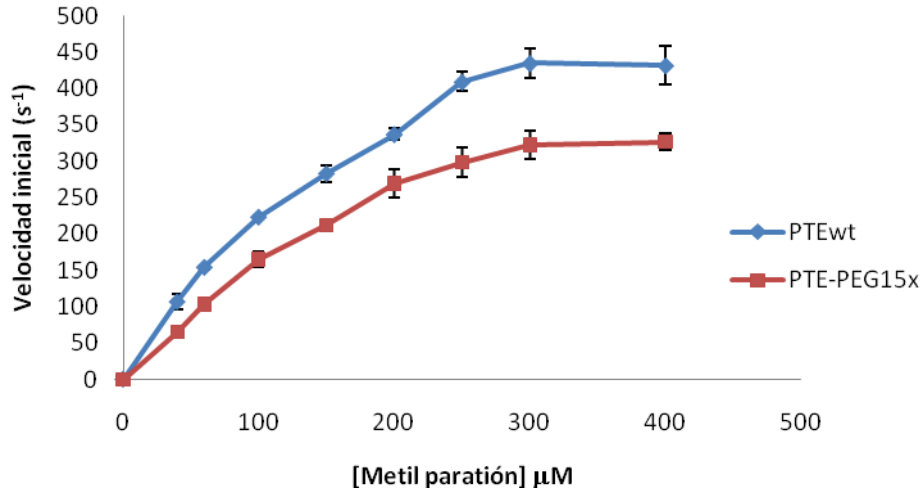


Fig 17. Cinética de Michaelis-Menten de la PTE silvestre y la PTE modificada con PEG.

Tanto la disminución de la k_{cat} como el aumento de la K_{M} en la PTE modificada podrían ser el reflejo de un decremento en la accesibilidad del sustrato al sitio activo de la enzima, ya que ahora su superficie se encuentra recubierta por PEG (Cuadro 1).

Cuadro 1. Cuadro comparativo entre la PTE nativa y la PTE PEGilada

	k_{cat} (s^{-1})	K_{M} (μM)	Actividad Relativa	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ ($\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$)	Modificación PEG (%)
PTE	698.45	207.6	1	3.36×10^6	0
PTE-PEG (1:15)	552.6	233.4	0.79	2.37×10^6	62.6

Si bien para determinar la dosis de proteína que debe ser administrada para desintoxicar a un organismo depende de muchos parámetros, haciendo un cálculo teórico y tomando en consideración que la actividad de la enzima nativa en casos graves de intoxicación con OP's (400nM) (Masson, et al, 1998) es de 1.34 s^{-1} , se estimó que se deberán inyectar en un humano adulto alrededor de 60 μg de proteína nativa mientras que de la PTE PEGilada deberán inyectarse alrededor de 85 μg . A pesar de tener que utilizar una dosis 30% mayor para el caso de la PTE modificada, tan sólo el hecho de incrementar el volumen hidrodinámico de la partícula con el PEG aumentará la vida media de ésta, ya que se evitará la filtración y eliminación de la PTE-PEG por parte del riñón cuyo límite de exclusión es de alrededor de 72 kD (Knauf, et al., 1988).

5. ESTABILIDAD A DEGRADACIÓN POR PROTEASAS

Una de las propiedades que confiere el PEG a las proteínas a las cuales está conjugado es la de reducir la susceptibilidad de éstas a la degradación por proteasas, ya que impide la interacción de la enzima proteolítica con el polipéptido de interés. De esta manera y con la finalidad de evaluar la capacidad de recubrimiento del PEG usado para la modificación de la PTE, llevamos a cabo la degradación de la enzima con tripsina. El sitio de corte de esta enzima proteolítica se da del lado carboxilo de las lisinas y argininas (Fig 18 A); en total existen 35 posibles sitios de hidrólisis en la PTE por monómero.

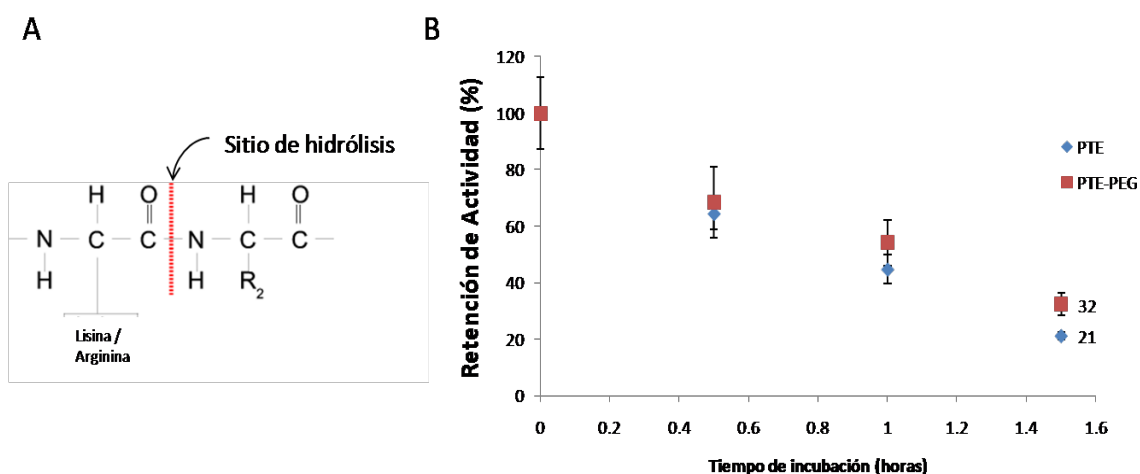


Fig. 18. A) Sitio de corte para la tripsina. B) Gráfica en donde se muestra la retención de la actividad de la PTE en presencia de tripsina a distintos tiempos.

Como se puede observar en la Fig 18 B. después de 1:30 h de incubación con tripsina, la PTE PEGilada retuvo el 32% de la actividad, mientras que la PTE sin modificar retuvo el 21 %. Esta pequeña diferencia del 10% entre una y otra proteína puede ser un indicativo de que las cadenas de PEG, aunque unidas de manera covalente a la PTE, no están recubriendo la superficie de la proteína de manera completa, por lo que prácticamente no existe ningún impedimento estérico que impida a la tripsina alcanzar sus sitios de corte e hidrolizar la cadena polipeptídica. Otro punto desfavorable es la gran cantidad de posibles sitios de corte en la PTE, pudiendo ser que aunque quedaran pocos de ellos al descubierto fueran suficientes para que al ser hidrolizados se abatiera la actividad de la proteína.

6. EVALUACIÓN IN VITRO DE LA INMUNOGENICIDAD DE LA PTE PEGILADA

Una vez caracterizada la PTE PEGilada se procedió a evaluar la inmunogenicidad de la partícula. Primeramente, se llevó a cabo un protocolo de inmunización en conejos con la finalidad de obtener anticuerpos contra la PTE nativa y la modificada con el polietilenglicol; para ello se monitorearon los títulos a lo largo de 40 días (Fig. 19), al cabo de los cuales se observó un título adecuado para sangrar a blanco y obtener los anticuerpos específicos para las dos proteínas.

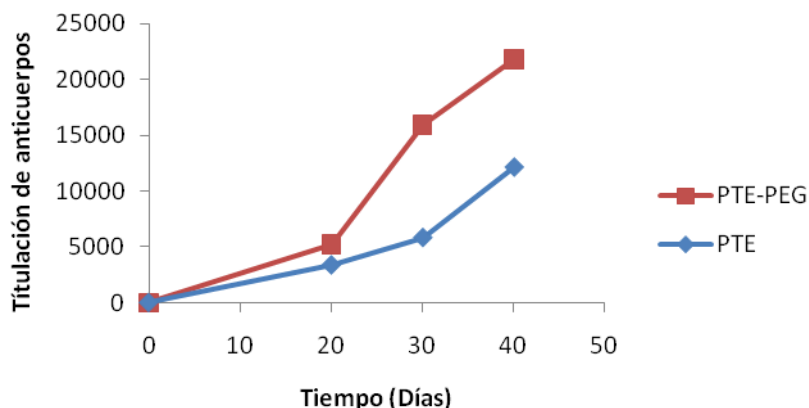


Fig. 19. Respuesta a la inmunización de conejos con la PTE nativa y la PTE PEGilada.
Errores estándar mínimos (± 1.3 a 1.5)

Es claro que bajo las condiciones en que se llevó a cabo la inmunización de los conejos ($80 \mu\text{g}$ antígeno/mL sangre y adyuvante completo de Freund) tanto la PTE sin modificar como la PTE PEGilada son proteínas capaces de ser detectadas por el sistema inmunológico, habiéndose producido en los conejos anticuerpos específicos contra estas dos proteínas. El hecho de haber encontrado un mayor número de títulos para la PTE modificada no refleja necesariamente una mayor inmunogenicidad de la partícula PEGilada, debido a que los ensayos fueron llevados a cabo con un solo conejo para cada proteína, y cada conejo puede responder de manera diferente a un estímulo (Cooper, H. y Patterson, Y., 2008). Otro factor importante, es el haber utilizado para la primera inmunización adyuvante completo de Freud, cuya función es justamente la de activar la población de linfocitos T y en consecuencia la estimulación y maduración de linfocitos B, lo que pudo haber potenciado la inmunogenicidad de la partícula PEGilada y la no modificada. En un estudio realizado en conejos se observó que en presencia de este adyuvante se generaron anticuerpos contra proteínas PEGiladas, mientras que cuando se inmunizó sin el adyuvante

completo de Freund no se generaron anticuerpos contra estas proteínas (Richter y Akerblom, 1983).

Gracias a que ahora se contaba con anticuerpos específicos contra la PTE nativa y la PTE PEGilada, se procedió a evaluar si la modificación química de la proteína con el polímero había resultado en una reducción de la inmunogenicidad en la PTE PEGilada comparada con la de la PTE sin modificar, por lo que se llevaron a cabo una serie de ELISAS cuya información resumida se presenta a continuación (*Cuadro 2*).

Cuadro 2. Porcentajes de reconocimiento entre el suero anti-PTE contra la PTE PEGilada y el suero anti-PTEPEG contra la PTE nativa.

	Antígeno PTE	Antígeno PTE-PEG
<i>Suero α-PTE</i>	100% ($\pm 0.01\%$)	82% ($\pm 0.02\%$)
<i>Suero α-PTE-PEG</i>	90% ($\pm 0.01\%$)	100% ($\pm 0.02\%$)

Como se puede apreciar en el recuadro, existe un decremento en el porcentaje con el que es reconocida la PTE PEGilada por los anticuerpos generados contra la PTE nativa, esta ligera disminución debe de estar dada por el enmascaramiento de ciertos epítopes por las cadenas de PEG, generándose una partícula ligeramente menos inmunogénica comparada con la que presenta la PTE sin modificar. Es importante hacer notar que pudieron haber aparecido nuevos epítopes en la PTE-PEG, que no presenta la proteína nativa, ya que no todos los anticuerpos generados contra la PTE modificada son capaces de reconocer a la enzima sin PEG.

Es claro que la mayoría de los epítopes se conservan en la PTE PEGilada, debido a que son reconocidos por los anticuerpos generados contra la PTE sin modificar. Este mismo fenómeno se observa también en sentido contrario, ya que los anticuerpos generados contra la PTE PEGilada son capaces de reconocer a la enzima nativa.

Como ya se mencionó anteriormente el proceso de PEGilación se da de manera azarosa, lo que da como resultado una partícula con distintos grados de modificación. Pudiera ser que los anticuerpos encontrados para la PTE modificada se hayan generado en su mayoría contra las especies con menor grado de PEGilación, que sólo contaban con pocas cadenas del polímero para recubrir la superficie entera de la PTE.

El no haber encontrado una reducción importante en la inmunogenicidad de la PTE PEGilada con las cadenas lineales de PEG de 10 kD nos habla de que la superficie de la proteína no está siendo recubierta por el PEG, por lo que el sistema inmune puede interactuar con la PTE dando lugar a la producción de anticuerpos que en última instancia facilitarían la remoción de la partícula del organismo.

Desgraciadamente no se sabe mucho sobre la interacción de las cadenas de PEG con las proteínas, por lo que no es posible predecir qué tipo, tamaño y relación molar de PEG utilizar para una proteína dada con el fin de abatir su inmunogenicidad. En algunas ocasiones un PEG lineal pequeño (ej. 5 kD) utilizando una relación molar proteína:PEG alta pudiera ser más efectivo para recubrir una proteína que un PEG ramificado de alto peso molecular utilizando una relación molar más baja (Gámez, 2005). Este comportamiento representa una desventaja importante en la técnica de PEGilación ya que en muchas ocasiones se tienen que probar una gran cantidad de formulaciones para obtener el resultado deseado.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Hasta ahora, hemos logrado montar un protocolo de expresión y purificación de la PTE que nos permite obtener cantidades suficientes de enzima, alrededor de 1.5 mg/L de cultivo, para los ensayos que tuvieron que ser llevados a cabo dentro del proyecto. Aunque esta purificación requirió únicamente de un solo paso cromatográfico, se deberá poner especial atención en aumentar la eficiencia para la obtención de la PTE pura disminuyendo la pérdida de unidades a lo largo del proceso.

En cuanto a la reducción del tamaño de la PTE, las 3 mutaciones por alanina llevadas a cabo en la zona de interfase entre las dos subunidades, no dieron como resultado la monomerización de la PTE. Encontramos que esta disrupción en los puentes de hidrógeno solo nos llevó a pérdidas importantes en la actividad, en donde la única de las mutantes, la S137A, que retuvo parcialmente la capacidad de hidrolizar organofosforados siguió presentándose como un dímero. Se necesita más que la disrupción de puentes de hidrógeno para evitar la dimerización de la proteína, debido a que existen una gran cantidad de otras interacciones, probablemente en su mayoría de carácter hidrofóbico, involucradas en la formación del dímero. Pudiera ser que al tratar de monomerizar la proteína se estuviera comprometiendo gravemente la estabilidad y el plegamiento de la PTE, ya que en muchas ocasiones la oligomerización se usa como una estrategia para aumentar la estabilidad de las proteínas. Sería interesante mutagenizar otros aminoácidos involucrados en la interfase e inclusive reemplazarlos por aminoácidos que por su naturaleza (cargados positivamente o negativamente) repelan su contraparte en la otra subunidad de la PTE como una estrategia para evitar la dimerización.

Encontramos que la PTE modificada con PEG lineal de 10kD (1:15) retuvo el 79% de la actividad respecto a la de la enzima nativa; dato importante ya que nos muestra que la unión covalente de cadenas de PEG a la superficie de la PTE puede llevarse a cabo sin pérdidas importantes en la actividad.

La PEGilación de la PTE nos permitió obtener una proteína ligeramente menos inmunogénica que la proteína de la cual partimos, sin embargo sigue siendo reconocida fácilmente por el sistema inmunológico. Al parecer, la superficie de la PTE no está siendo recubierta por las cadenas lineales

del PEG utilizado, prueba de ello son los resultados obtenidos con la degradación por tripsina y los inmunoensayos, en donde encontramos un comportamiento similar de la PTE nativa y la PEGilada. Hasta la fecha no se conoce de manera precisa como es la interacción de las cadenas del polímero con las proteínas; pudiera ser que en el caso de la PTE, las características de la superficie de la proteína no permitieran que el PEG la envolviera, por lo que no se logró formar la barrera que evitara la interacción de la PTE con el sistema inmune y las proteasas.

En un futuro habrá que evaluar la capacidad *in vivo* de la partícula PEGilada para desintoxicar a un organismo, ya que podría esperarse un aumento en el tiempo de vida media de la PTE gracias a las propiedades farmacocinéticas que el PEG confiere a la proteína, tales como la reducción en la tasa de filtración por el riñón debido a un aumento en el peso molecular de la partícula, así como al leve incremento en la resistencia a la degradación por proteasas y la disminución en la inmunogenicidad.

En trabajos posteriores se deberán utilizar otros tipos de PEG, de distinto peso molecular con y sin ramificaciones, con la finalidad de encontrar el que proporcione a la PTE un mejor recubrimiento, y de esta forma prolongar el tiempo de vida media de la partícula dentro del organismo. También sería interesante utilizar otros polímeros para modificar químicamente a la PTE, ya sea naturales como el quitosano o sintéticos, para contender con la degradación y la inmunogenicidad de la PTE, y de esta manera poder generar un biofármaco altamente eficiente en la desintoxicación por compuestos organofosforados.

Finalmente, creemos que es necesario seguir en la búsqueda de una partícula basada en la PTE que sea capaz de destruir químicamente los compuestos organofosforados antes de que alcancen a sus sitios blanco; para que de manera conjunta con los procedimientos convencionales (atropina y oximas) se pueda generar un tratamiento altamente eficiente para contender con el envenenamiento por compuestos organofosforados.

BIBLIOGRAFÍA

- Afriat, L., Roodvelt, C., Manco, G y Tawfik, D. (2006). The latent promiscuity of newly identified microbial lactonases is linked to a recently diverged phosphotriesterase. *Biochemistry* **45**, 13676-13686.
- Aubert, S., Li, y Raushel, F. (2004). Mechanism for the hydrolysis of organophosphates by the bacterial phosphotriesterase. *Biochemistry* **43**, 5707-5715.
- Ayala, M. (2002). Obtención y caracterización de cristales catalíticos de cloroperoxidasa. Tesis de Doctorado en Ciencias, IBT-UNAM.
- Benning, M., Shim, H., Raushel, F. y Holden, H. (2001). High resolution X-ray structures of different metal-substituted forms of phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *Biochemistry* **40**, 2712-2722.
- Buchbinder, J., Stephenson, R., Dresser, M., Pitera, J., Scanlan, T y Fletterick, R. (1998). Biochemical characterization and crystallographic structure of an *Escherichia coli* protein from the phosphotriesterase gene family. *Biochemistry* **37**, 5096-5106.
- Caliceti, P y Veronese, F. (2003). Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates. *Advanced Drug Delivery Reviews* **55**, 1261-1277.
- Cooper, H. y Patterson, Y. (2008). Production of polyclonal antisera. *Current Protocols in Immunology* **2.4.9**.
- Costa, L. (2006). Current issues in organophosphate toxicology. *Clinica Chimica Acta*. **366**, 1-13.
- Dirección General de Epidemiología (2007). Cuadro 11.4. casos por entidad federativa de enfermedades no transmisibles hasta la semana epidemiológica 52 del 2006.
- Eyer, P. (2003). The role of oximes in management of organophosphorus pesticide poisoning. *Toxicology Reviews* **22**, 165-190.
- Farias Rico, JA. (2005). Generación de un andamiaje estable, diseño de un barril TIM consenso. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, UNAM, México D.F.
- Gámez, A., Sarkissian, C., Wang., Kim, W., Straub, M., Patch, M., Chen, L., Striepeke, P., Lemontt, J., O'Neill, Ch., Scriver, Ch. y Stevens, C. (2005). Development of pegylated forms of recombinant *Rhodospiridium toruloides* phenylalanine ammonia-lyase for the treatment of classical phenylketonuria. *Molecular Therapy* **11**, 986-989.

- Grimsley, J., Scholtz, M., Pace, N. y Wild, R. (1997). Organophosphorus hydrolase is a remarkably stable enzyme that unfolds through a homodimeric intermediate. *Biochemistry* **36**, 14366-14374.
- González-Juárez, C. (1997). Desarrollo de una prueba diagnóstico para la detección de hipotiroidismo congénito empleando anticuerpos monoclonales. Tesis de Maestría en Biotecnología, UACPyP-UNAM.
- Harris, J. y Chess, M. (2003). Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nature Reviews in Drug Discovery* **2**, 214-221.
- Kang, D., Choi, S. y Cha, H. (2006). Enhanced biodegradation of toxic organophosphate compounds using recombinant *Escherichia coli* with Sec pathway-driven periplasmic secretion of organophosphorus hydrolase. *Biotechnology Progress* **22**, 406-410.
- Kaliste-Korhonen, E., Ylitalo, P., Hänninen, O. y Raushel, F. (1993). Phosphotriesterase decreases paraoxon toxicity in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* **121**, 275-278.
- Knauf, M., Bell, D., Hirtzer, P., Luo, ZP., Young, J. y Katre, N. (1988). Relationship of effective molecular size to systemic clearance in rats of recombinant interleukin-2 chemically modified with water-soluble polymers. *Journal of Biological Chemistry* **263**, 15064-15070.
- Karalliede, L y Senanayake, N. (1999). Organophosphorus insecticide poisoning. *Journal of International Federation of Clinical Chemistry* **11**, 4-9.
- Kim, J., Tsai, PC., Chen, SL., Himo, F., Almo, S y Raushel, F. (2008). Structure of diethyl phosphate bound to the binuclear metal center of phosphotriesterase. *Biochemistry* **47**, 9497-9504.
- López-Flores, I., Lacasaña, M., Blanco-Muñoz, J., Aguilar-Garduño, C. y Sánchez-Villegas, P. (2009). Relationship between human paraoxonase-1 activity and PON1 polymorphisms in Mexican workers exposed to organophosphate pesticides. *Toxicology Letters* **188**, 84-90.
- Masoud, A., Kiran, R y Sandhir, R. (2009). Impaired mitochondrial functions in organophosphate induced delayed neuropathy in rats. *Cell Molecular Neurobiology*. [Epub ahead of print]
- Masson, P., Josse, D., Lockridge, O., Viguíé, N., Taupin, C. y Buhler, C. (1998). Enzymes hydrolyzing organophosphates as potential catalytic scavengers against organophosphate poisoning. *Journal of Physiology* **92**, 357-362.

- Mero, A., Spolaroe, B., Veronese, F. y Fontana, A. (2009). Transglutaminase-mediated PEGylation of proteins: direct identification of the sites of protein modification by mass spectrometry using a novel monodisperse PEG. *Bioconjugate Chemistry* **20**, 384-389.
- Miroux, B. y Walker, J. (1996). Over-production of proteins in Escherichia coli: mutant host that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *Journal of Molecular Biology* **260**, 289-298.
- Morar, S., Schrimsher, J. y Chavez, M. (2006). PEGylation of proteins: a structural approach. *BioPharm International* **19**, 34-50.
- Mulbry, W. y Karns, J. (1989). Parathion hydrolase specified by the *Flavobacterium opd* gene: relationship between the gene and protein. *Journal of Bacteriology* **171**, 6740-6746.
- Omburo, G. A., Kuo, J. M., Mullins, L. S. y Raushel, F. M. (1992) Characterization of the zinc binding site of bacterial phosphotriesterase. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 13278–13283.
- Pasut, G. y Veronese, F. (2007). Polymer-drug conjugation, recent achievements and general strategies. *Progress in Polymer Science* **32**, 933-961.
- Pei, L., Omburo, G., McGuinn, W.D., Petrikovics, I., Dave, K., Raushel, F.M., Wild, J.R., DeLoach, J.R. y Way, J.L. (1994). Encapsulation of phosphotriesterase within murine erythrocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology* **124**, 296–301.
- Palacios-Nava, M., Paz-Roman, P., Hernández-Robles, S. y Mendoza-Alvarado, L. (1999). Sintomatología persistente en trabajadores industrialmente expuestos a plaguicidas organofosforados. *Salud Pública de México* **41**, 55-61.
- Petrikovics, I., Hong, K., Omburo, G., Hu, Q.Z., Pei, L., McGuinn, W.D., Sylvester, D., Tamulinas, C., Papahadjopoulos, D., Jaszberenyi, J.C. y Way, J.L., (1999). Antagonism of paraoxon intoxication by recombinant phosphotriesterase encapsulated within sterically stabilized liposomes. *Toxicology and Applied Pharmacology* **156**, 56–63.
- Richter, A. y Akerblom, E. (1983). Antibodies against polyethylene glycol produced in animals by immunization with mono methoxy polyethylene glycol modified proteins. *Intentional Archives in Allergy and Applied Immunology* **70**, 124-131.
- Roberts, M., Bentley, M y Harris, J. (2002). Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Advanced Drug Delivery Reviews* **54**, 459-476.
- Rochu, D., Beaufet, N., Renault, F., Viguié, N y Masson, P. (2002). The wild type bacterial Co²⁺/Co²⁺-phosphotriesterase shows a middle-range thermostability. *Biochimica et Biophysica Acta* **1594**, 207-218.

- Roodveldt, C. y Tawfik, D. (2005). Directed evolution of phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta* for heterologous expression in *Escherichia coli* results in stabilization of the metal-free state. *Protein Engineering, Design & Selection* **18**, 51 – 58.
- Siddavattam, D., Khajamohiddin, S., Manavathi, B., Pakala, S y Merrick, M. (2003). Transposon-like organization of the plasmid-borne organophosphate degradation (*opd*) gene cluster found in *Flavobacterium sp.* *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 2533-2539.
- Singh, B y Walker, A. (2006). Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiology Review* **30**, 428 – 471.
- Sogorb, M., Vilanova, E. y Carrera, V. (2004). Future applications of phosphotriesterases in the prophylaxis and treatment of organophosphorus insecticide and nerve agent poisonings. *Toxicology Letters* **151**, 219-233.
- Tinoco, R. y Vazquez-Duhalt, R. (1998). Chemical modification of cytochrome C improves their catalytic properties in oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Enzyme and Microbial Technology* **22**, 8-12.
- Tuovinen, K., Kaliste-Korhonen, E., Raushel, FM., Hänninen, O. (1994). Phosphotriesterase – A promising candidate for use in detoxification of organophosphates. *Fundamental and Applied Toxicology* **23**, 578-584.
- Veronese, F y Pasut, G. (2005). PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discovery Today* **10**, 1451-1458.
- Vilanova, E. y Sogorb, MA. (1999). The role of phosphotriesterases in the detoxication of organophosphorus compounds. *Critical Reviews in Toxicology* **29**, 21-57.
- Webster, R., Didier, E., Harris, P., Siegel., Stadler, J., Tilbury, L. y Smith, D. (2007). PEGylated proteins: evaluation of their safety in the absence of definitive metabolism studies. *Drug Metabolism and Disposition* **35**, 9-16.