

CREANDO UN FÁRMACO CONTRA LA INTOXICACIÓN POR PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS: UN DISEÑO BASADO EN LA FOSFOTRIESTERASA.

Lorena Sánchez-Sánchez, Lucía Perezgasga, Rafael Vázquez-Duhalt

Instituto de Biotecnología, UNAM, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, C.P. 62210. Cuernavaca, Morelos, México. Fax: (52 777) 3172388. lsanchez@ibt.unam.mx

Palabras clave: Fosfotriesterasa, organofosforados, biofarmacéuticos.

Introducción. 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 problema grave de salud a nivel global (1).

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 (2). Las enzimas, como biofarmacéuticos, parecen ser una buena opción ya que tienen la capacidad de unirse y actuar sobre sus moléculas blanco con una gran afinidad y especificidad.

Existen en la naturaleza una variedad de enzimas que son capaces de degradar los 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 estos compuestos con una alta eficiencia (3).

El objetivo de este proyecto es el de generar un fármaco basado en la fosfotriesterasa, que sea metabólicamente estable, no inmunogénico y catalíticamente activo, con el fin de tratar envenenamientos por plaguicidas organofosforados.

Metodología. Se clonó el gen *opd* que codifica para la PTE de *Flavobacterium sp.* en *E. coli*, utilizando el vector pET24a. Posteriormente se purificó la PTE fusionada a un HisTag con una columna de afinidad HiTrap. Se activó un polietilenglicol (PEG) lineal de 5 kD vía N-hidroxisuccinimida, el cual se utilizó para conjugarlo con los grupos amino de las lisinas de la PTE. Se puso un exceso molar de 9 veces de PEG por cada lisina de la proteína. Se llevaron a cabo los ensayos de actividad midiendo la hidrólisis del metil paratión. Se deberá determinar la estabilidad de la partícula en suero humano y la activación de linfocitos T *in vitro* después de haber sido expuestos a la PTE PEGilada.

Resultados y discusión. La PTE ha sido expresada de manera heteróloga y purificada de manera exitosa, obteniendo alrededor de 5 mg por litro de cultivo.

Con el fin de contender con la degradación de la PTE dentro del organismo, así como a la generación de una

respuesta por parte del sistema inmune, se ha recurrido a la modificación química de la proteína con PEG, un polímero ampliamente usado en la producción de proteínas con fines terapéuticos.

Se identificaron, en la PTE dimérica, 16 grupos amino (14 lisinas expuestas + 2 grupos N-terminal) que serán posibles sitios de unión de la proteína con el PEG (Fig 1).



Fig. 1. Reacción de unión del PEG con la proteína (PEGilación)

La relación molar utilizada PTE-PEG 1:9 fue suficiente para conjugar la totalidad de la enzima con el polímero. Encontramos también que la mayor parte de la actividad se retuvo en la proteína PEGilada, ya que solo hubo una pérdida del 18% de la actividad (Cuadro 1), debido probablemente a que el PEG interfiere con la entrada del sustrato al sitio activo de la enzima.

Cuadro 1. Comparación entre la PTE nativa y la PEGilada

| | Actividad específica ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) | Actividad Relativa |
|-------------|---|--------------------|
| PTE nativa | 25.19 | 1 |
| PTE-PEG 1:9 | 20.77 | 0.82 |

Conclusiones. Se ha logrado expresar y purificar satisfactoriamente la PTE de manera heteróloga en *E. coli*. Así mismo, se logró modificar químicamente la PTE con el PEG, encontrando solo una leve disminución en la actividad, lo que en última instancia se verá compensado por un mayor tiempo de vida media dentro del organismo, gracias a las propiedades que el PEG confiera la PTE.

Agradecimiento. Proyecto financiado SEP-CONACYT(59497)

Bibliografía.

- Karalliede, L y Senanayake, N. (1999). Organophosphorus insecticide poisoning. *J. Int. Fed. Clin. Chem.* 11: 4-9.
- Vellard, M. (2003). The enzyme as drug: application of enzyme as pharmaceuticals. *Curr. Opin. Biotech.* 14: 440-450.
- Aubert, S, Li, Y, y Raushel, F. (2004). Mechanism for the hydrolysis of organophosphates by the bacterial phosphotriesterase. *Biochemistry* 43: 5707-5715.