



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
FACULTAD DE FARMACIA

**“Hidrólisis de compuestos tiofosfatos con albúminas del suero
de mamíferos”**

TESIS

Que para obtener el grado de:

DOCTORA EN FARMACIA

Presenta:

M.C. Elizabeth Undiano Cicero

Director de tesis:

Dr. Antonio Monroy Noyola

Laboratorio 11

Cuernavaca, Morelos, 2023



Este trabajo se realizó en el laboratorio 11 de “neuroprotección” de la Facultad de Farmacia de la UAEM entre enero de 2019 y diciembre de 2022 como parte del programa de doctorado en Farmacia. Se llevó a cabo gracias al financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con la beca de doctorado número 663707 y con el proyecto CONACYT/F003 No. 840801. Además, el Laboratorio Nacional de Cómputo de Alto Desempeño (LANCAD) nos otorgó recursos computacionales en su nodo UNAM- Miztli como parte de los proyectos 83-2021 y 39-2022.

DEDICATORIA

A mi papá por darme las herramientas para convertirme en una persona exitosa, por aconsejarme en momentos difíciles y ser mi gurú de vida. Por templar mi carácter y ser mi ángel guardián, mi defensor incansable.

A mi mamá por ser mi confidente, mi compañera de aventuras, mi modelo a seguir, mi cocinera, psicóloga, maestra, alumna y sobre todo, mi mejor amiga.

A mis hermanos Jano, Pablo y Chucho que juntos somos Los Tres Mosqueteros... y Dartagnan

A mis abuelos desde el cielo Socorro y Jesús y a mi Bibio Sarita, desde la Tierra

A toda mi familia, por tantos momentos felices, por su apoyo y cariño.

Y por último, pero no menos importante: A mi esposo, Alejandro. Eres el amor de mi vida y te dedico este éxito, que es un paso más en nuestra carrera llamada vida. Hemos decidido correr juntos, de la mano y espero ser en tu vida una motivación, inspiración y una fuente de apoyo incondicional, así como tú lo eres en la mía.

AGRADECIMIENTOS

A la Biol. Rosa Román Miranda por su apoyo técnico para la purificación de albúmina de cabra y las mutantes de humano.

A los doctores Iván Flores y Claudia Hallal por la ayuda que nos brindaron para la obtención de muestras de cabra y en los experimentos *in vivo*.

A la MBB. Delia del Rosario Leyva Meza por su apoyo en los trámites administrativos durante los 4 años de posgrado.

Al doctor Sergio Alcalá Alcalá con quién compartí sesiones del Consejo Interno de Posgrado, la organización de los seminarios de posgrado, el XV encuentro de estudiantes de Posgrado de Farmacia, las comisiones para la revisión del plan de estudios del posgrado y las clases de bioestadística. Gracias también por prestarnos su espectrofotómetro UV-Vis cuando se descompuso el nuestro. Gracias por su labor administrativo en la Facultad de Farmacia. Es un gran coordinador y su organización es admirable.

A Laura y Yenni, mis compañeras de experimentos, de experiencias y preocupaciones. Sin ustedes no habría sido lo mismo el laboratorio.

Al doctor Eugenio Vilanova Gisbert por su amistad, sus consejos y su asesoría técnica en el congreso en Italia y durante su estancia en México. Gracias por compartirnos los conocimientos que con tantos años de experiencia ha adquirido.

Al doctor César Millán Pacheco. Por tus clases y apoyo en los experimentos computacionales. Gracias por mostrarme “el lado oscuro de la ciencia”, por tu contribución en los tutorales para armar discusiones enriquecedoras y sobre todo por tu buena actitud. Haces más divertido el “romper los paradigmas de Windows”.

A la doctora Marcela Ayala, cuya amistad, apoyo, dedicación y asesoría han contribuido con mi formación como investigadora, como mujer en la ciencia y como persona. Eres una de las mujeres más brillantes que conozco con una altísima calidad humana. Gracias, por tanto.

Finalmente, al doctor Antonio Monroy Noyola. Por su confianza, su asesoría y apoyo durante mis estudios de doctorado. Por abrirme las puertas del laboratorio 11 de la Facultad de Farmacia y darme carta abierta para realizar todos los experimentos que se me ocurrieron. Gracias por sus consejos, por su mentoría y por transmitirme su experiencia como investigador.

Un agradecimiento especial a los miembros del jurado por el tiempo y los consejos que le han dedicado a mi tesis y a los que estarán el día del examen Eugenio Vilanova, Damianys Almenares, Jaime Escalante, César Millán, Mayra Avelar, José Luis Montiel y Antonio Monroy.

ABSTRACT

Organophosphate (OP) compounds are considered a high concern due to their neurotoxicity. Current treatments of intoxication are inefficient. A-esterases are enzymes capable of hydrolyzing OP when activated by divalent metal cofactors. Our research group has specialized in the A-esterases search in sera of different species. The domestic and seabirds' serum albumin was found to show a Cu^{2+} -dependent A-esterase. This activity was detected only in birds but in 2017 our research group observed a Cu^{2+} -dependent activity in goat serum on the chiral insecticide trichloronate (TCN). The best-known A-esterase in mammalian serum (PON1) is activated by Ca^{2+} and does not hydrolyze TCN which suggests that one or more proteins in mammalian serum are capable of OP hydrolysis. Identifying and characterizing these enzymes is important for medical, veterinary, and environmental fields. In this work we did *ex vivo* studies of the TCN hydrolysis in serum and its albumins from humans and other domestic mammals (dogs, goats, pigs, sheep and bovine) in presence of Cu^{2+} , Ca^{2+} and EDTA using UV-Vis spectrophotometry and chiral chromatography for measuring the compound hydrolysis. Goat serum albumin (GSA) showed Cu^{2+} -dependent hydrolyzing activity on the insecticide TCN. 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of GSA reaches a substrate conversion greater than 75% after 60 min of reaction with 100 and 300 μM copper sulfate under physiological conditions of $\text{pH}=7.4$ and $37\text{ }^\circ\text{C}$. This activity was 38-58% higher than those observed in our laboratory for other mammals. At the tested conditions, GSA was significantly ($p < 0.05$) stereoselective (+)-TCN > (-)-TCN (45% vs. 33%). Ca^{2+} -dependent (2.5mM) and EDTA-resistant activities (5mM) (1-6%) were not significant ($p>0.05$). This suggests that GSA is the protein responsible for the Cu^{2+} -dependent TCNase activity in goat serum. To study Cu^{2+} and TCN binding to GSA, we performed a molecular docking and dynamic calculations, His145 could be involved in the active site of the protein.

RESUMEN

Los compuestos organofosforados (OP) se consideran de gran preocupación debido a su neurotoxicidad. Los tratamientos actuales de la intoxicación son ineficaces. Las A-esterasas son enzimas capaces de hidrolizar OP cuando se activan por cofactores de metales divalentes. Nuestro grupo de investigación se ha especializado en la búsqueda de A-esterasas en sueros de diferentes especies. Se encontró que la albúmina sérica de aves domésticas y marinas mostraba una A-esterasa dependiente de Cu^{2+} . Esta actividad se detectó solo en aves, pero en 2017 nuestro grupo de investigación observó una actividad dependiente de Cu^{2+} en el suero de cabra sobre el insecticida quiral tricloronato (TCN). La A-esterasa más conocida en el suero de mamíferos (PON1) es activada por Ca^{2+} y no hidroliza TCN, lo que sugiere que una o más proteínas en el suero de mamíferos son capaces de hidrólisis de OP. Identificar y caracterizar estas enzimas es importante para los campos médico, veterinario y ambiental. En este trabajo realizamos estudios *ex vivo* de la hidrólisis de TCN en suero y sus albúminas de humanos y otros mamíferos domésticos (perro, cabra, cerdo, ovejas y vaca) en presencia de Cu^{2+} , Ca^{2+} y EDTA mediante espectrofotometría UV-Vis y cromatografía quiral. La albúmina sérica de cabra (GSA) mostró actividad hidrolizante dependiente de Cu^{2+} sobre la mezcla racémica del insecticida TCN. Una alícuota de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de GSA mostró una actividad hidrolizante superior al 75% después de 60 min de reacción con sulfato de cobre a una concentración 100 y 300 μM en condiciones fisiológicas de $\text{pH}=7,4$ y $37\text{ }^\circ\text{C}$. Esta actividad estuvo entre un 38% y un 58% mayor con respecto a otras albúminas de mamíferos. La actividad TCNasa de la GSA fue estereoselectiva, ya que el isómero (+)-TCN presentó niveles de hidrólisis significativas ($p<0.05$) de un 45% con respecto a su correspondiente enantiómero (-)-TCN que mostró niveles de un 33%. Mientras, las actividades dependientes de Ca^{2+} (2.5 mM) y resistentes a EDTA (5 mM) (1-6%) no fueron significativas ($p>0.05$). Esto sugiere que la GSA es la proteína responsable de la actividad TCNasa dependiente de Cu^{2+} en el suero de cabra. Con el propósito de identificar el sitio de unión de Cu^{2+} y TCN a GSA, se realizó un estudio de cálculos de acoplamiento y dinámica molecular, e residuo de His145 de la GSA podría estar involucrado en el sitio activo de la actividad A-esterasa de esta proteína.

INDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA	3
AGRADECIMIENTOS.....	4
ABSTRACT	6
RESUMEN	7
INDICE DE CONTENIDO	8
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1. Los compuestos organofosforados (OP).....	10
1.1.1. Breve historia	10
1.1.2. Estructura química	10
1.1.3. Características	12
1.1.4. Quiralidad.....	12
1.1.5. Usos.....	13
1.2. Plaguicidas OP.....	13
1.2.1. Clasificación.....	14
1.2.2. Los Plaguicidas Altamente Peligrosos (PAP).....	15
1.2.3. Regulación nacional e internacional de plaguicidas.....	17
1.2.4. Consumo de plaguicidas de uso agrícola	18
1.2.5. Epidemiología de intoxicaciones por plaguicidas en México.....	20
1.2.6. Toxicología de plaguicidas OP	21
2. ANTECEDENTES.....	29
2.2. Uso de A-esterasas en la formulación de un tratamiento contra la intoxicación por OP .	29
2.2.6. Paraoxonasa del suero de mamíferos (PON1)	29
2.2.7. Fosfotriesterasa de <i>Brevundimonas diminuta</i> (PTE).....	31
2.1.3. Actividad A-esterasa observada en suero animal.	32
2.1.3.1. Modelo de estudio de oxofosfatos: el HDCP.....	33
2.1.3.2. Modelo de estudio de tiofosfatos: el TCN.....	33
2.3. Transporte de cobre en la sangre	36
2.4. Albúmina sérica como A-esterasa.....	36
2.4.6. Propiedades y funciones de la albúmina sérica.	36
2.4.7. Sitios de unión a metales	38
2.4.8. Sitio amino terminal (NTS).	39
3. JUSTIFICACIÓN	40

4.	HIPÓTESIS.....	41
5.	OBJETIVOS.....	42
	5.2. Objetivo general	42
	5.3. Objetivos específicos	42
6.	METODOLOGÍA.....	43
	6.1. Obtención de muestras de sueros de mamíferos domésticos y sus albúminas.....	43
	6.2. Cuantificación de la actividad de hidrólisis de la mezcla racémica de TCN por espectrofotometría UV-Vis	43
	6.3. Hidrólisis estereoselectiva de TCN por cromatografía quiral.....	45
	6.4. Análisis estadístico.....	46
	6.5. Purificación de la albúmina del suero de cabra.....	46
	6.6. Unión de Cu ²⁺ a la albúmina del suero de cabra (GSA)	47
	6.7. Hidrólisis de TCN con una albúmina mutante del suero de humano (rHSA).....	48
	6.7.1. Producción recombinante de albúmina humana (HSA) mutada.....	48
	6.7.2. Hidrólisis estereoselectiva Cu ²⁺ -dependiente de TCN con albúmina humana mutante (HSA-E3) por HPLC quiral.	52
7.	RESULTADOS.....	53
	7.1 Hidrólisis dependiente de EDTA, calcio y cobre de TCN racémico por suero y albúmina de mamíferos.....	53
	7.2. Hidrólisis estereoselectiva Cu ²⁺ dependiente de TCN por albúmina de suero de cabra ...	57
	7.3. Purificación	59
	7.3.1. Actividad TCNasa de la albúmina del suero de cabra (GSA):.....	62
	7.4. Identificación del centro catalítico por acoplamiento molecular.....	66
	7.5. Hidrólisis de TCN con albúmina mutante del suero de humano (rHSA).....	72
	7.6. Alineamiento de las secuencias de las prealbúminas	76
8.	CONCLUSIONES.....	77
9.	REFERENCIAS	78
10.	ANEXOS.....	84

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Los compuestos organofosforados (OP)

1.1.1. Breve historia

Los compuestos organofosforados (OP) son ésteres o derivados tiol del ácido fosfórico, fosfínico o fosforamídico¹. En 1849 se sintetizó por primera vez un compuesto organofosforado (OP) llamado trietil fosfato (TEP) en el laboratorio de Gustav Magnus, particularmente las contribuciones de Jean Louis Lassaigne y Jules Pelouze. En 1854 Philippe de Clermont y Moshnin sintetizaron Tetraetilpirofosfato (TEPP) el primer OP descrito como inhibidor de enzimas del sistema nervioso central llamadas colinesterasas (ChE)². Durante el siglo XIX se sintetizó una amplia variedad de compuestos organofosforados sin conocer sus efectos tóxicos hasta que en 1932 Gerda von Krueger y en 1936 Schrader, se intoxicaron accidentalmente por la exposición a ésteres de fosfatos con los que trabajaban y describieron sus efectos tóxicos que se relacionan principalmente con la inhibición de ChE como la Acetilcolinesterasa (AChE). Durante la segunda guerra mundial, en Europa hubo un gran interés en estudiar las propiedades tóxicas de estos compuestos desarrollando agentes nerviosos como el sarín y el tabún, por lo que se empezaron a producir OP en gran escala al mismo tiempo que se investigaban sus propiedades farmacológicas y toxicológicas³. Desde entonces, se desarrolló la síntesis de nuevos compuestos OP optimizando los procesos y reduciendo los costos de producción. Esto permitió que se sintetizara una gran variedad de compuestos OP con estructuras químicas muy diversas en los próximos años de la segunda mitad del siglo XX.

1.1.2. Estructura química

La estructura general de los compuestos OP comprende un átomo central de fósforo (P), que en algunos casos puede ser un centro quiral, dicho átomo une por un doble enlace a un átomo de O o S y por enlaces sencillos a grupos arilo o alquilo (R1 y R2) y a un grupo X que puede ser un halógeno, o bien, un grupo alifático, aromático o heterocíclico. Según el átomo unido al fósforo con su doble ligadura (O o S) se dividen los OP en dos grandes grupos, si el átomo es O, el OP se encuentra en su “forma oxo” (o oxofosfato), mientras que si es S, el OP está en “forma tio” (o tiofosfato). Los grupos R1, R2 y X se pueden unir a P

mediante un enlace lábil, habitualmente -O- ó -S-. El grupo X se denomina “grupo saliente” porque es el grupo que se separa cuando el OP se hidroliza químicamente o con esterasas (Figura 1) ^{4,5}.

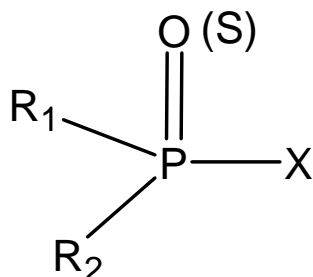


Figura 1. Estructura general de los compuestos organofosforados.

La síntesis de OP ha sido tan alta que hoy en día existe una gran diversidad de compuestos con esta estructura base. Las más comunes se observan en la Figura 2. Si el átomo de P se une a S con doble ligadura (en su forma tio) y los demás sustituyentes se unen mediante O, el OP es un fosfortionato. Cuando además de estar en forma S también un grupo R1 o R2 que se une a P con S el OP es un fosforoditionato. Si el átomo de P se une a O con doble ligadura (en su forma oxo) y sus sustituyentes se unen a P con O el OP es un fosfato y si el sustituyente es S el OP es un fosfortiolato. Si se une directamente con enlace P-C es un fosfonato, y si se une con N es un fosforamidato ^{1,5}.

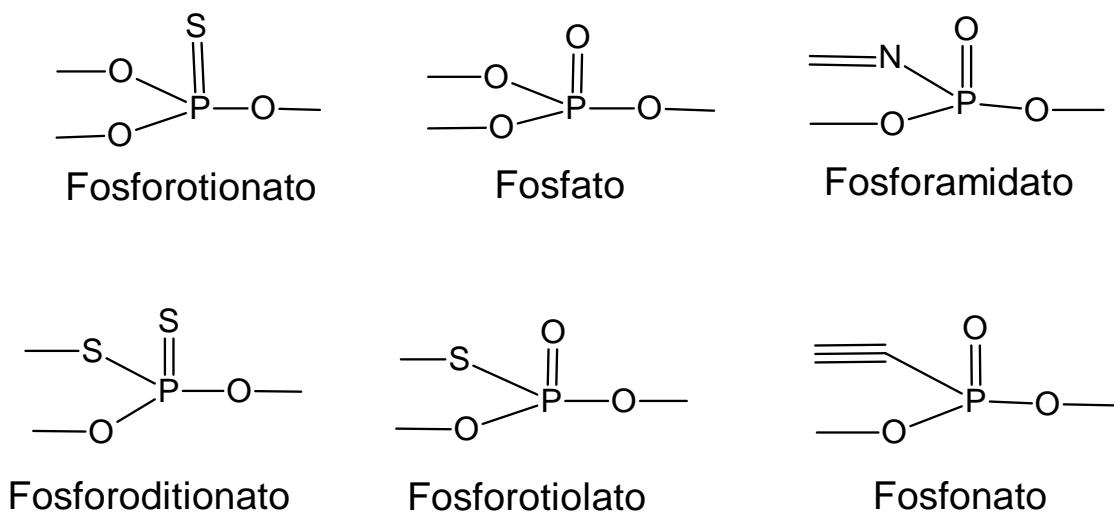


Figura 2. Estructura de los compuestos organofosforados más comunes

1.1.3. Características

Los compuestos OP, generalmente son compuestos apolares, por lo que son poco solubles en agua, se disuelven en grasas y suelen ser inhibidores de colinesterasas (ChE), enzimas del sistema nervioso central. Las diferencias químicas estructurales de los oxofosfatos y tiofosfatos les proporcionan diferencias fisicoquímicas y biológicas⁶. Los tiofosfatos tienen generalmente mayor presión de vapor, mayor lipofilidad y mayor estabilidad a la degradación hidrolítica en condiciones acuosas que sus análogos correspondientes en forma oxo. Sin embargo, los OP en forma tio suelen tener una baja actividad anticolinesterasa y son menos reactivos que el correspondiente OP en forma oxo debido a que el enlace P=S, ya que está menos polarizado en comparación con el enlace P=O por la menor electronegatividad del S en comparación con el O. La polarización del enlace P=O origina un átomo de fósforo más electropositivo, que facilita el ataque al fósforo por agentes nucleófilos. Por ejemplo, el hidroxilo de la serina de la acetilcolinesterasa (AChE). Por esta razón los fosfatos son inhibidores potentes de ChE^{4,7,8}. Los OP en forma tio pueden ser biotransformados a través de enzimas oxidasas de función mixta dependientes de los citocromos P450 (CYP450) lo que genera metabolitos en forma oxo. La forma oxo se llama "oxon" y es el metabolito activo de los compuestos tiofosfatos correspondientes como frecuentemente se refleja en el nombre común del compuesto. Por ejemplo, el paraoxón y el malaoxón son metabolitos activos de los insecticidas paratión y malatión, respectivamente^{1,4,7}. Muchos OP se sintetizan en forma tio ya que son compuestos más estables y puede biotransformarse en su oxón activo⁷.

1.1.4. Quiralidad

El átomo de P central de los OP tiene 4 sustituyentes, en algunos compuestos este átomo se presenta como un centro quiral. Alrededor del 30% de los OP comerciales son moléculas quirales⁹. Este tipo de plaguicidas OP generalmente se comercializan como mezclas equimolares de enantiómeros¹⁰. Los enantiómeros de compuestos quirales tienen propiedades físico-químicas idénticas, pero poseen diferentes actividades biológicas¹¹. Esto es de importancia toxicológica dado que las interacciones estereoselectivas con los sistemas biológicos reconocen como sustrato a uno de los enantiómeros con mayor afinidad, o metabolizan con mayor eficacia a un isómero en comparación con el otro, lo que

resulta más tóxico o más persistente a ciertos isómeros que a otros en los sistemas biológicos, que incluyen a los mamíferos y sobre todo al ser humano^{9,12,13}.

1.1.5. Usos

Los OP se han usado como agentes nerviosos (sarin, soman, VX, etc), retardadores de flama (TCPP), lubricantes, aditivos de aceite, en veterinaria se han usado como antihelmínticos y ectoparasiticidas y en estudios preclínicos se han utilizado en modelos de enfermedades como Alzheimer, Parkinson, Esquistosomiasis (metrifonato) e incluso COVID-19. Sin embargo, su principal uso es como plaguicida (paratión, malatión, clorpirifos, glifosato, etc) ^{1,4,5,14,15}. En la figura 3 se encuentran algunos ejemplos de estructuras de compuestos OP. Los OP son una de las clases más importantes de insecticidas debido a su alta toxicidad en estos organismos, así como a su propiedad biodegradable, ya que tienen baja persistencia ambiental en comparación con otros plaguicidas como los organoclorados y principalmente por sus bajos costos de producción. Por estas razones los plaguicidas OP que se utilizan en gran medida, principalmente en países en desarrollo^{8,16}.

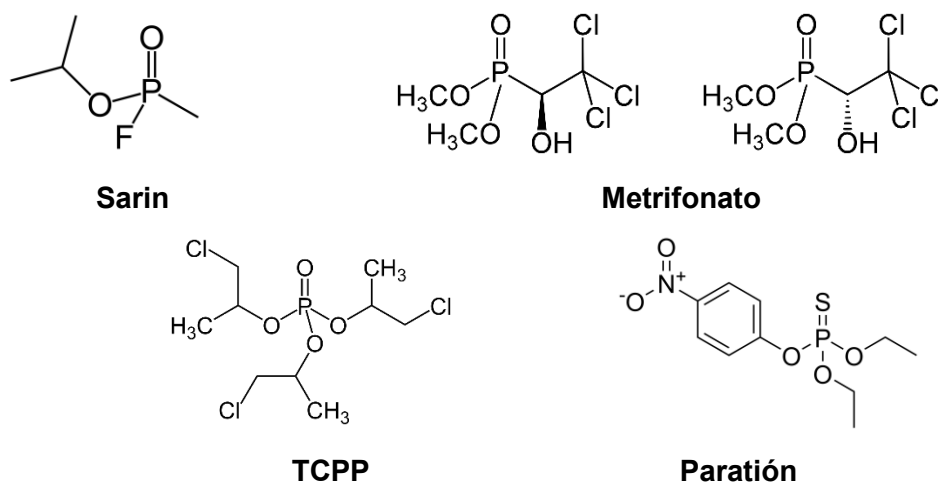


Figura 3. Estructura química de algunos organofosforados con distintos usos.

El TCPP es un retardador de flama; el Metrifonato, un OP quiral usado en terapia para la esquistosomiasis, se usa como mezcla racémica; el Sarin un agente nervioso usado en la guerra química y el paratión etílico se usa como insecticida y acaricida.

1.2. Plaguicidas OP

Los plaguicidas son sustancias o mezclas de sustancias que previenen, controlan, reducen, o eliminan cualquier plaga, ya sean plantas, animales o cualquier especie indeseada^{17,18}.

Más de 100 insecticidas OP han alcanzado la etapa de desarrollo comercial¹⁵. Los plaguicidas influyeron positivamente en el desarrollo agropecuario, para el control de plagas que destruyen los cultivos y afectan al ganado. También se utilizan para el beneficio de la salud humana, ya que mitigan riesgos a la salud mediante el control de los vectores de enfermedades^{3,19} como dengue, malaria, paludismo entre otras. Por otro lado, estos xenobióticos también tienen el potencial de ejercer efectos adversos a la salud y al medio ambiente dada su naturaleza tóxica. El uso inadecuado de los plaguicidas puede ocasionar intoxicación en los trabajadores agrícolas, así como a la población general mediante la contaminación de alimentos y el medio ambiente¹⁸.

1.2.1. Clasificación

Existen varias formas de clasificar a los plaguicidas según la propiedad de interés. Los plaguicidas OP pertenecen al grupo de plaguicidas sintéticos no persistentes, esto significa que tienen la estructura química mencionada anteriormente (Figura 1) y son de origen antropogénico²⁰. Otras estructuras químicas que pueden tener los plaguicidas son organoclorados, carbamatos y piretroides, por ejemplo el DDT, el carbaril y la cipermetrina, respectivamente³. Debido a que el objeto de estudio de esta tesis son los plaguicidas OP no se profundizará en las otras estructuras, pero es importante mencionarlo porque la orientación terapéutica para los casos de intoxicación se enfoca en su estructura química²¹. Los plaguicidas OP pueden clasificarse según los siguientes criterios:

- a) Por su tipo de acción (organismo diana):** Insecticidas, herbicidas, bactericidas, fungicidas, acaricidas, nematocidas, rodenticidas, etc.
- b) Por su uso:** Industrial, agrícola, urbano, doméstico, veterinario, etc.
- c) Por el objetivo de su uso.** Control de plagas, control de enfermedades y control de malezas.
- d) Por su peligrosidad:** De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), se clasifican con base al valor de su dosis letal 50 (DL₅₀) en ratas en mg/kg y su vía de exposición (Tabla 1). No está considerada la perturbación endócrina ni la toxicidad por inhalación.

Tabla 1. Clasificación de plaguicidas conforme a su peligrosidad²²

Clase	Clasificación	DL50 (mg/kg)	
		Vía oral	Vía dérmica
Ia	Extremadamente peligrosos	< 5	< 50
Ib	Altamente peligrosos	5-50	50-200
II	Moderadamente peligrosos	50-2000	200-2000
III	Ligeramente peligrosos	> 2000	>2000
U	Poco probable que presente peligros agudos	5000 o mayor	

e) **Por su toxicidad:** Este es un parámetro muy útil en el manejo y en el seguimiento epidemiológico de las intoxicaciones en cuanto a los riesgos inmediatos para los aplicadores, pero tiene la deficiencia de que no permite asociar el efecto con la estructura química ni predecir el comportamiento ambiental del producto³. En esta clasificación los plaguicidas se agrupan de acuerdo con el tiempo en que empiezan a manifestarse los síntomas después de la exposición (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de plaguicidas por su toxicidad²³

Clasificación	Toxicidad	Tiempo post- exposición
A corto plazo	Aguda	<24 horas
A mediano plazo		14 días
A largo plazo	Crónica	> 6 meses

1.2.2. Los Plaguicidas Altamente Peligrosos (PAP).

Los Plaguicidas Altamente Peligrosos (PAP) son aquellos plaguicidas que presentan niveles particularmente elevados de peligrosidad aguda y crónica para la salud y el medio ambiente. Pueden ser considerados PAP los que causan daño grave o irreversible a la salud o el ambiente en las condiciones de uso en un país²². Los criterios de peligrosidad propuestos por la Red de Acción de Plaguicidas (PAN, por sus siglas en inglés) para identificar los PAP están organizados en tres grupos (Tabla 3).

Tabla 3 Criterios de peligrosidad para la clasificación de PAP³

Grupo	Criterios de peligrosidad	Características
I	Toxicidad aguda	Extremadamente tóxicos Altamente tóxicos Mortales por inhalación
II	Toxicidad a largo plazo (efectos crónicos en la salud)	Carcinogénicos para los humanos Tóxicos para la reproducción Perturbadores endócrinos Destruyen a la capa de ozono
III	Peligrosos para el ambiente	Muy persistentes en agua, suelo y sedimentos Muy bioacumulativo Muy tóxico para los organismos acuáticos Tóxico para las abejas

En 2009 la PAN Internacional realizó una lista de PAP que se ha actualizado varias veces hasta 2021, enlistando finalmente 338 PAP con el objetivo de prohibirlos progresivamente. Los PAP pertenecientes al grupo de OP se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Lista de insecticidas OP pertenecientes a los PAP²⁴:

1	Acefato	14	Dimetoato	27	Fosfamidon	40	Profenofos
2	Azametifós	15	Disulfoton	28	Malatión	41	Propetamfós
3	Azinfos etil	16	Edifenfos	29	Mecarbam	42	Protiofós
4	Azinfos metil	17	E-Fosfamidón	30	Metamidofós	43	Quinalfós
5	Bromofós etil	18	EPN	31	Mevinfós	44	Sulfotep
6	Cloretoxifós	19	Etión	32	Monocrotofós	45	Tebupirimfos
7	Clorfenvinfós	20	Etoprofós	33	Naled	46	Temefós
8	Clormefós	21	Fenamifós	34	Ometoato	47	Terbufós
9	Clorpirifos metil	22	Fenitrotion	35	Paratión (etil y metil)	48	Tetraclorvinfós
10	Coumafós	23	Fention	36	Pirazofos	49	Tiometón
11	Diazinon	24	Fentoato	37	Pirazoxon	50	Triclorfon
12	Diclorfós	25	Forato	38	Piridifention	51	Triazofós
13	Dicrotofós	26	Fosmet	39	Pirimifós-metil	52	Vamidotión

1.2.3. Regulación nacional e internacional de plaguicidas

Los compuestos OP han causado intoxicaciones en poblaciones humanas en todo el mundo²⁵. Por esta razón organismos nacionales e internacionales se han coordinado para regularlos, limitarlos o prohibirlos.

1.2.3.1. Regulación internacional

Los plaguicidas empezaron a regularse en 1938 por la Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y agricultura (FAO, por sus siglas en inglés). Con el tiempo otros organismos internacionales se han sumado para tener un mejor manejo y control de estas sustancias, como lo son la Agencia de Protección Ambiental (EPA), la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) y la Unión Europea (UE). Estas organizaciones han iniciado legislaciones para prohibir progresivamente Plaguicidas Altamente Peligrosos (PAP) desde 1993 en convenios internacionales como el de Rotterdam o el de Estocolmo. Para ello se realizó una clasificación de plaguicidas por su peligrosidad (Tabla 2). Los países en desarrollo están sujetos a una variedad de problemas técnicos, políticos y económicos que propician el uso de PAP que han sido prohibidos en los países desarrollados por sus numerosos riesgos a la salud humana, principalmente.

1.2.3.2. Regulación Nacional

El uso agrícola de plaguicidas en México inició aproximadamente en 1947 pero no fue hasta 1974 que se inició la regulación de plaguicidas sintéticos por la Secretaría de Agricultura con la “nueva Ley de Sanidad Fitopecuaria”. Esta ley tomaba en cuenta únicamente la eficacia biológica del producto, sin considerar los riesgos para la salud humana y el medio ambiente. Como un intento de regular mejor los plaguicidas, considerando su impacto en la salud y el medio ambiente, se creó en 1987 la Comisión Intersecretarial para el Control de Procesos y uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (CICOPLAFEST). Sin embargo, esta Comisión no logró desarrollar un marco legal integral para plaguicidas. En 2001 se creó la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitario (COFEPRIS) que se encarga de la regulación, control y del fomento sanitario de plaguicidas. Actualmente intervienen varias secretarías de estado en el control de actividades relacionadas con los plaguicidas como la importación, registro, almacenamiento, transporte, comercialización, control de calidad e impacto ambiental; la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER, antes SAGARPA), La Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), la Secretaría de Comunicaciones y Transporte (SCT), la Secretaría del

Trabajo y Previsión Social (STPS) y la Secretaría de Salud (SS). Estos organismos crearon normas y leyes para controlar el manejo de los plaguicidas, como la Ley General de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente (LGEEPA), la Ley General de Prevención y Gestión Integral de los Residuos (LGPGIR) y la NOM-021-ZOO-1995. Aún con los esfuerzos que se han realizado, sigue existiendo un control y una normativa deficiente en el uso plaguicidas en nuestro país. De la lista de 306 PAP que realizó la PAN, México sigue teniendo en su registro 183 de ellos³. Ocho de estos plaguicidas se encuentran en la lista de PAP con más registros en nuestro país que forman parte de los plaguicidas más comercializados, según su volumen de producción (Tabla 1)^{8,26}. El mal manejo y uso de estos compuestos representa un riesgo grave para la salud³.

1.2.4. Consumo de plaguicidas de uso agrícola

1.2.4.1. Consumo internacional

Los países que presentaron un mayor consumo anual de plaguicidas de uso agrícola en el periodo de 1990-2021 son EE. UU., China, y Argentina (Figura 4). En la década de 1990 Francia fue el tercer consumidor de plaguicidas, pero ha disminuido un 40% su consumo de plaguicidas de tal forma que bajó al sexto lugar, caso contrario al de México que ha tenido un incremento de casi el 40% en su consumo de plaguicidas desde 1990²⁷.

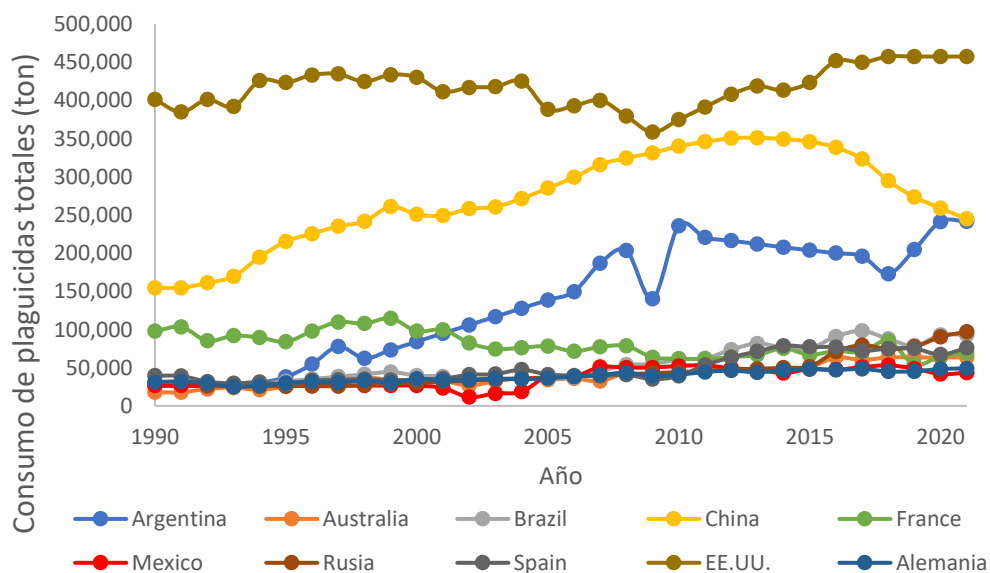


Figura 4. Países con mayor consumo anual de plaguicidas de uso agrario en el periodo de 1990-2021²⁷. Este gráfico muestra la cantidad anual de plaguicidas utilizada por los países con mayor consumo mundial. En rojo el consumo de México.

1.2.4.2. Consumo nacional

Según datos de la FAO, México tuvo un promedio de consumo anual de plaguicidas totales de 7,567.2 toneladas entre los años 1990-2021²⁷. Estos datos no incluyen detalles de los plaguicidas por grupos químicos ni el nombre de los plaguicidas más usados. El Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC) realizó una revisión de 63 publicaciones sobre el uso de plaguicidas entre 1980 y 2018, reportando una lista de 327 plaguicidas comercializados en México, de los cuales 279 son formulados con un solo ingrediente activo y 48 plaguicidas contienen más de uno. De los 279 plaguicidas formulados con un solo ingrediente activo, 137 se clasifican como PAP (49.5%), 125 tienen acción insecticida (46%) y 37 pertenecen al grupo de OP (14%), el mayor grupo químico²⁸. Podemos concluir con esta información que los plaguicidas más usados en México son los insecticidas OP y la regulación actual no es adecuada para limitar el comercio de PAP. Por otro lado, de los 37 plaguicidas OP más comercializados en México, 21 tienen forma tío (68%), 13 tienen propiedades quirales (42%) y 8 de ellos pertenecen a la lista de plaguicidas con más registros en nuestro país (Tabla 4)^{26,29}.

Tabla 4. Principales insecticidas organofosforados comercializados en México^{8,29,30}

No Quirales		Quirales	
Oxo	Tio	Oxo	Tio
Diclorvos*	Clorpirifos*	Fosfamidon	Isofenfos
Ometoato	Diazinon	Monocrotofos*	Malation*
	Dimetoato*	Profenofos	Sulprofos
	Disulfoton	Triclorfon	Foxim
	Ethion	Metamidofos*	Fentoato
	Fenitrotion	Mevinfos	
	Fention	Acefato*	
	Forato	Naled	
	Fosmet	Fosfamidon	
	Paration metílico*	Monocrotofos*	
	Pirimifos metil	Profenofos	
	Temefos	Triclorfon	
	Terbufos	Metamidofos*	
	Triazofos	Mevinfos	
		Acefato*	
		Naled	

*Pertenecen a la lista de PAP con más registros en México²⁶

1.2.5. Epidemiología de intoxicaciones por plaguicidas en México

Las causas más comunes de intoxicación por plaguicidas en México son el riesgo laboral, la ingesta voluntaria en suicidios y los accidentes derivados de la manipulación, transporte o almacenamiento de los plaguicidas³¹. En el periodo comprendido entre los años 1995 a 2012, se registraron un total de 67,711 casos de intoxicación por plaguicidas en todo el país. Alrededor del 60% de las intoxicaciones ocurrieron en los grupos de edad productiva que comprenden de los 25 a 44 años (30.91%) y de 15 a 24 años (29.20%), además el 71% de los casos corresponden al sexo masculino, por lo que las intoxicaciones se asocian al riesgo laboral. La tasa de incidencia promedio de intoxicación por plaguicidas en este periodo fue de 4 por cada 100,000 habitantes, esto es alrededor de 4,000 casos de intoxicaciones anuales. Nayarit, Colima, Morelos y Jalisco son los estados que presentan las mayores tasas de incidencia en el periodo analizado³². En estos registros sólo se presentan los casos que fueron diagnosticados y registrados en instituciones de salud y en muchas ocasiones los accidentes no se reportan por lo que deben tomarse con reserva, ya que podrían estar ocurriendo más intoxicaciones de las reportadas. En 2018, la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud registró 86 muertes por intoxicación por plaguicidas, el 58% de ellas ocurrió en el grupo de 15 a 64 años (Figura 5)³⁴ que coinciden con los grupos de edades productivas. Estos riesgos laborales se deben al inadecuado manejo de las sustancias, a desinformación sobre los productos y a la falta de uso del equipo de protección. Por lo anterior, la intoxicación por plaguicidas constituye un problema de mortalidad y morbilidad en el país.

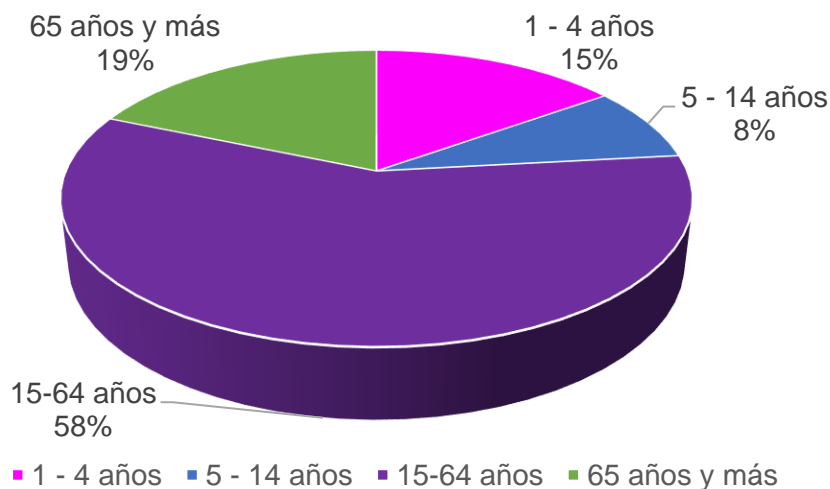


Figura 5. Mortalidad por intoxicación por plaguicidas por grupo de edad.

1.2.6. Toxicología de plaguicidas OP

Los compuestos OP han causado intoxicaciones en poblaciones humanas en todo el mundo²⁵. Los efectos tóxicos pueden ser agudos o crónicos según el tiempo de exposición al OP. La toxicidad aguda se manifiesta a corto plazo después de una única dosis provocando síntomas de envenenamiento y en casos severos, la muerte. Por otro lado, la toxicidad crónica se manifiesta a largo plazo con la exposición a varias dosis y existe controversia en sus efectos debido a la escasez de datos. Sin embargo, se han correlacionado con efectos cancerígenos, mutagénicos, teratogénicos, neurotóxicos, inmunológicos, afecciones a la piel, al aparato respiratorio y perturbación endócrina³⁵. Los efectos tóxicos agudos son más probables debido a la exposición de corto plazo⁵. Las enzimas hidrolíticas tienen un papel muy importante en la toxicidad por OP, en particular las esterasas, debido a que la forma en la que interactúan con los OP pueden conducir a la eliminación o a síntomas de intoxicación⁷.

1.2.6.1. Clasificación de esterasas según su interacción con OP

La clasificación establecida por Aldridge en 1953 sigue prevaleciendo hoy en día y agrupa a estas enzimas en A, B o C esterasas. En el primer grupo están las A-esterasas que son las que hidrolizan los OP como sustratos y no se inhiben. Generalmente dependen de cofactores divalentes. Ejemplo de estas enzimas son la paraoxonasa-1 del suero de mamíferos (PON1) y la fosfotriesterasa de *pseudomonas diminuta* (PTE). En el segundo grupo están las B-esterasas, enzimas que se inhiben con los OP en una reacción dependiente del tiempo y la temperatura mediante la fosforilación del residuo de serina o tirosina de su sitio activo. Estas enzimas pueden ser inhibidas de forma reversible o irreversible. Ejemplo de B-esterasas son la AChE, la butirilcolinesterasa (BuChE) y la esterasa blanco de la neuropatía (NTE). En el tercer grupo están las C-esterasas que son expresadas por los insectos principalmente y no interactúan con los OP^{7,36}. Las A-esterasas suelen estar involucradas en el metabolismo de OP, mientras que las B-esterasas suelen formar parte del mecanismo de toxicidad. Sin embargo, también existen B-esterasas que, aunque se inhiban por OP, no causan efectos tóxicos, como la BuChE⁴.

En la literatura las A-esterasas tienen diversos nombres según el sustrato que hidroliza (paraoxonasa o PON1) o su estructura química (fosfotriesterasas o PTE) y se suelen englobar en la clasificación de enzimas como EC3.1.8 Hidrolasas de triéster fosfórico (fosfotriesterasas), y dentro de ellas en las entradas 3.1.8.1 Arildialquilfosfatasa

(paraoxonasa; organofosfato hidrolasa, fosfotriesterasa), y 3.1.8.2 Diisopropil-fluorofosfatasa (DFPasa, organofosfato ácido anhidrasa). Anteriormente, las fosfotriesterasas se incluían en el grupo de 3.1.1.2 arilesterasa, porque las proteínas inicialmente conocidas como paraoxonasa también hidrolizan arilesteres⁴.

El mecanismo de interacción de las A- y B- esterasas con OP es similar y se observa en la Figura 6. Se forma primero el complejo de Michaelis con un inhibidor de OP que produce una enzima fosforilada o inhibida, perdiendo el grupo saliente del OP. A partir de aquí las esterasas pueden seguir dos vías. Las B-esterasas se reactivan muy lentamente o no se reactivan en absoluto, lo que puede provocar efectos tóxicos, mientras que las A-esterasas, realizan una hidrólisis intensiva y permanente de OP y su actividad catalítica y tasa de recambio son muy altas, recuperando la función enzimática y realizando la desintoxicación⁷. Las B-esterasas pueden reactivarse con agentes nucleofílicos como las oximas y con OH- del medio. Si eso no sucede, la enzima se queda inhibida o se puede envejecer, reacción que ocurre por la ruptura del enlace R-OP, perdiéndose el grupo R y formando un residuo fosfórico con carga negativa. A este fenómeno resistente al tratamiento farmacológico se le conoce como envejecimiento enzimático y es ocasionado por los OP quirales^{7,15}.

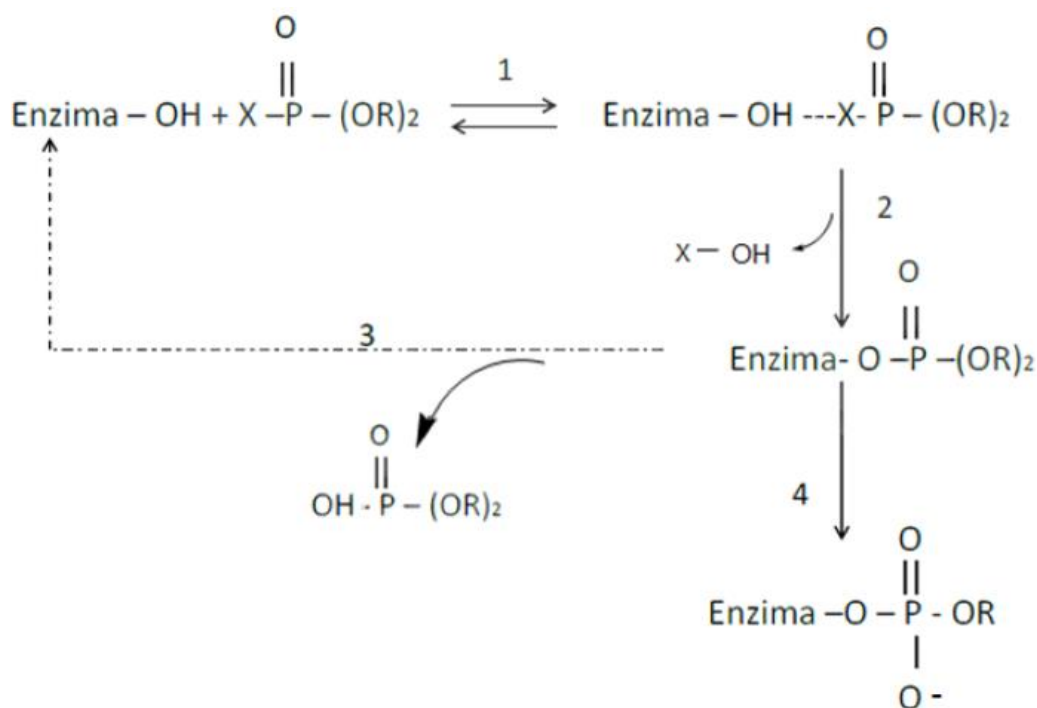


Figura 6. Mecanismo de interacción de las esterasas con compuestos OP.

1: Formación del complejo de Michaelis. 2: Fosforilación. 3: Reactivación. 4: Envejecimiento

1.2.6.2. Efectos tóxicos agudos de los OP

La severidad de los síntomas y signos adversos de los OP depende de la dosis de exposición, la ruta de absorción y la velocidad de eliminación metabólica³⁷. Los efectos tóxicos agudos inducidos por la exposición a altas concentraciones de compuestos OP se resumen en la Tabla 5 y se describen a continuación.

Tabla 5. Cuadro clínico de la intoxicación por OP.

Síndrome	Efectos	Síntomas	Enzima inhibida	Tipo de inhibición	Tiempo
Colinérgico	Muscarínicos	Broncoespasmos Miosis Dolor abdominal Calambres	AChE	Reversible	8-12 hr
	Nicotínicos	Dolor muscular Parálisis	AChE	Reversible	8-12 hr
	Efectos del sistema nervioso central	Convulsiones Coma Muerte	AChE	Reversible	8-12 hr
Intermedio		Parálisis de extremidades, cuellos y músculos respiratorios	AChE	Reversible	72 hr
Polineuropatía retardada	Sistema nervioso periférico	Degeneración axonal Déficit funcional de terminaciones nerviosas motoras	NTE	Irreversible	21 días

1.2.6.2.1. Síndrome colinérgico

Los síntomas son agitación, debilidad muscular, fasciculaciones musculares, miosis, hipersalivación y sudoración. Las intoxicaciones graves también pueden causar insuficiencia respiratoria, confusión inconsciente, convulsiones e incluso la muerte. Sin embargo, éstas no correlacionan con los niveles de inhibición de AChE. Estos síntomas aparecen 8-12 horas después de la exposición³⁸. El tratamiento farmacológico consiste en la administración de antagonistas de ACh, como la atropina, para proteger de los efectos muscarínicos, y el uso de agentes nucleofílicos como las oximas, que permiten la reactivación de AChE del espacio sináptico. También se recomienda el uso de fármacos como benzodiazepinas para evitar efectos del sistema nervioso central. Ninguno de estos tratamientos suele ser eficaz en las intoxicaciones graves y no funcionan para los efectos nicotínicos^{4,16}.

1.2.6.2.2. Síndrome intermedio

Deterioro pre y postsináptico de la transmisión neuro-muscular, debido a la prolongada inhibición de la AChE en la placa motora, provocando parálisis muscular. Estos síntomas aparecen entre 1 y 6 días después de la exposición y puede durar entre 3 y 10 días. Generalmente en la clínica este síndrome se atiende con tratamientos médicos que incluyen ventilación mecánica^{5,16}

1.2.6.2.3. Síndrome retardado

También llamado polineuropatía retardada inducida por organofosfatos (OPIDP): Está relacionada con la fosforilación y envejecimiento de la llamada esterasa diana de la neuropatía (NTE). Este síndrome se caracteriza por lesión a nivel axonal, cambios intraneuronales irreparables y degeneración neuronal. Los síntomas principales son debilidad flácida de los músculos de las extremidades distales, especialmente en las piernas y pérdida de la coordinación espacial. Estos daños aparecen en humanos generalmente a los 21 días posteriores a la exposición aguda. No existe tratamiento farmacológico de selección para revertir este padecimiento^{5,16}.

1.2.6.3. Mecanismo de toxicidad aguda

El mecanismo de acción de los OP es a través de la fosforilación de B-esterasas como la acetilcolinesterasa (AChE) y la esterasa diana de la neuropatía (NTE)⁴. La inhibición de AChE provoca efectos colinérgicos y la inhibición de NTE neuropatía retardada.

1.2.6.3.1. Inhibición de AChE: Síndrome colinérgico

Los compuestos OP inhiben la AChE, lo que provoca que aumente la cantidad de acetilcolina (ACh), neurotransmisor del sistema parasimpático que controla funciones y actos involuntarios. La enzima fosforilada ya no es capaz de efectuar la hidrólisis de ACh, lo cual resulta en una acumulación del neurotransmisor en la sinapsis nerviosa o unión neuromuscular y la sobreestimulación de los receptores nicotínicos y muscarínicos¹⁵. También puede ocurrir la acumulación de ACh a nivel del sistema nervioso central (Figura 7). Para que se manifiesten signos y síntomas de envenenamiento por inhibición de AChE, debe inactivarse una proporción importante de la enzima tisular a causa de la fosforilación (70%)³⁹. Los efectos parasimpáticos del envenenamiento por OP se pueden observar en múltiples sistemas, incluidos el corazón, las glándulas exocrinas y los músculos lisos. Una concentración alta de ACh en las uniones colinérgicas nerviosas con el músculo liso y las células glandulares puede causar contracción del músculo y secreción, respectivamente.

En las uniones musculoesqueléticas, el exceso de ACh puede ser excitatorio, pero también puede debilitar o paralizar la célula, despolarizando la placa terminal. Altas concentraciones de ACh en el sistema nervioso central causan alteraciones sensoriales y de comportamiento, falta de coordinación, depresión de la función motora y depresión respiratoria. La depresión de los músculos de la respiración puede causar paro respiratorio (la principal causa de defunción en la intoxicación por OP)⁴⁰. El complejo AChE-OP puede sufrir un proceso llamado envejecimiento, que es un cambio conformacional en la enzima que la vuelve resistente a la reactivación por agentes nucleofílicos, lo que hace que algunas opciones de tratamiento con oximas sean inútiles³⁷.

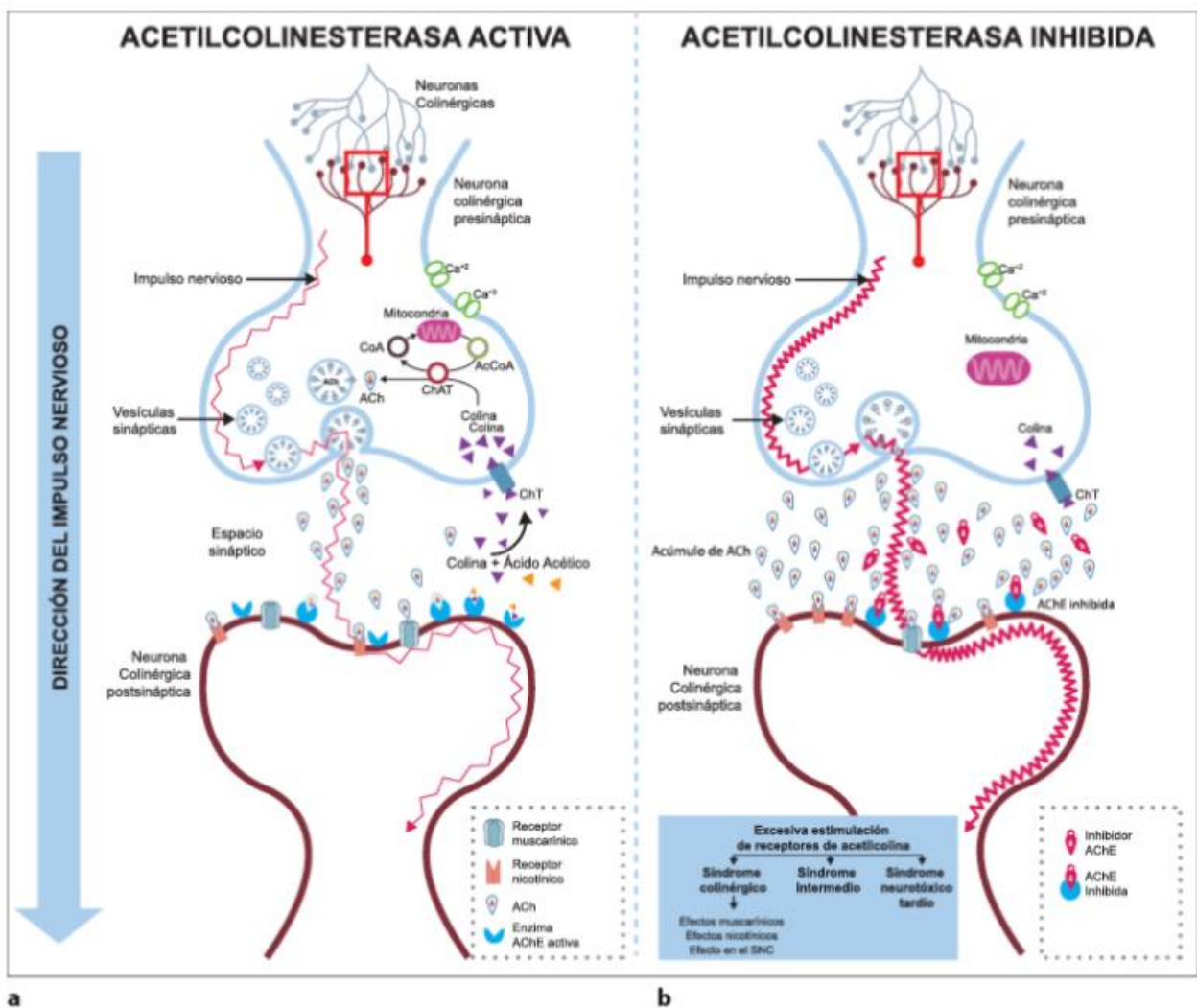


Figura 7 Inhibición de Acetilcolinesterasa (AChE)⁴¹. Panel a: proceso de transmisión del impulso nervioso. b: AChE inhibida por OP

1.2.6.3.2. Inhibición de NTE: Polineuropatía retardada inducida por OP (OPIDP)

La inhibición y envejecimiento de NTE por OP produce un síndrome particular llamado polineuropatía retardada inducida por organofosforados (OPIDP por sus siglas en ingles). Aunque un OP sea un potente inhibidor de NTE, no se desarrolla la neuropatía a menos que se envejezca la enzima en más del 70% en adultos y hasta el 90% en jóvenes después de la exposición a dosis altas de forma aguda⁴². Los efectos tóxicos de OPIDP en raras ocasiones conducen a la muerte, no obstante su etiología es similar a la de la esclerosis lateral amiotrófica⁴³. La OPIDP se caracteriza por la degeneración distal de algunos axones del sistema nervioso periférico y central que ocurre entre 14-28 días después de una exposición aguda o de corta duración a OP^{42,44}. Los primeros síntomas de OPIDN son calambres, dolores musculares en las piernas y parestesia distal en las extremidades. Los signos motores progresan rápidamente a debilidad muscular, primero en las extremidades inferiores y luego en las manos, causando la caída característica del pie y la muñeca. Finalmente, se desarrollan espasticidad (signos de la neurona motora superior) y atrofia muscular (signos de la neurona motora inferior), que luego progresan a parálisis de las piernas o incluso cuadriplejía en casos más graves (Figura 8). El déficit motor adquirido en OPIDP rara vez es reversible y su extensión podría depender del nivel de exposición y de la potencia del OP para causar lesiones irreversibles del SNC^{42,43}. El modelo de gallina ha demostrado una correlación con la neuropatía humana, por lo que se emplea para ensayos toxicológicos de plaguicidas⁴⁴. Los fosforamidatos y los fosfonatos son considerados compuestos con potencial neuropático^{42,45}. No existe tratamiento que revierta los efectos de esta neuropatía una vez que se ha producido el daño axonal⁴⁶.

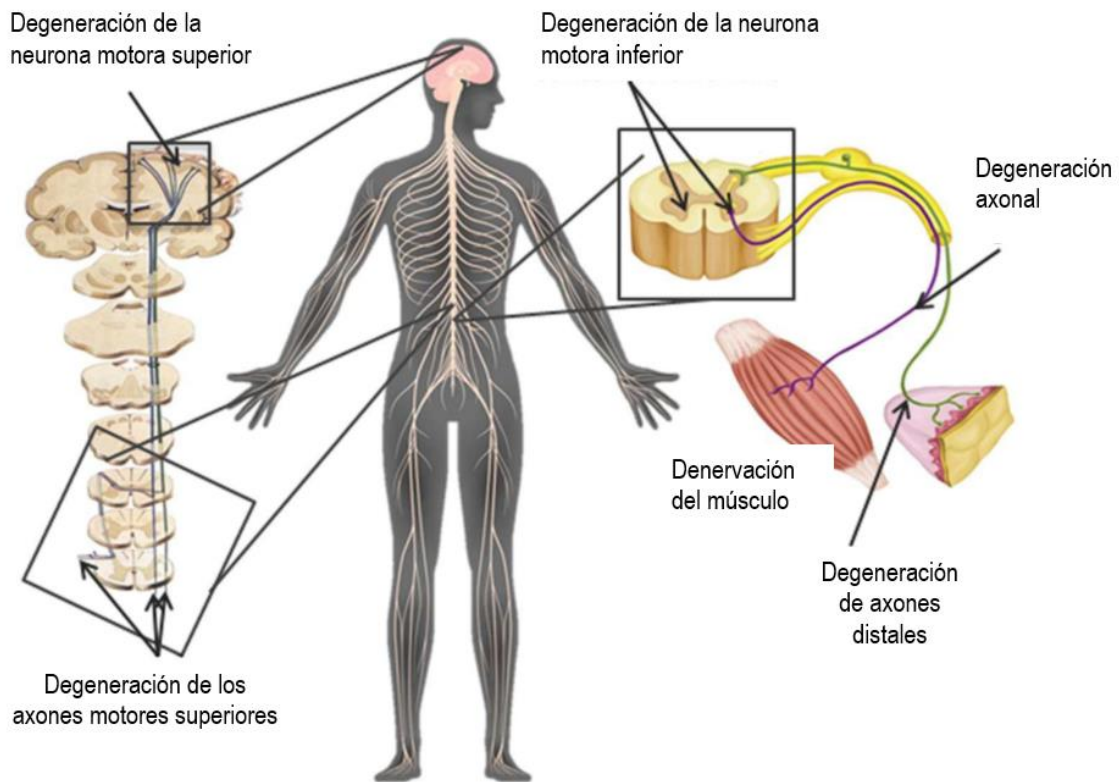


Figura 8. Sitios de posibles lesiones en OPIDP⁴³.

1.2.6.4. Toxicocinética

1.2.6.4.1. Absorción

La absorción de compuestos OP ocurre a través de las membranas intestinales, alveolares y dérmicas debido a que atraviesan bicapas lipídicas por sus propiedades lipofílicas, principalmente los fosforotiónatos, siendo así las vías cutánea y aérea las más incidentes. Ya que los insecticidas OP son comunes, accesibles y de bajo costo también son los más usados en casos de suicidio, por ingestión. Los OP también permean la mucosa gástrica^{5,38}. Por esta razón la absorción de OP puede ser oral, dérmica o por inhalación. Usualmente los trabajadores del campo se intoxican por vía cutánea y aérea. Mientras los casos suicidas por vía oral. Existe una variación importante entre la absorción por diferentes vías, como vemos en los valores DL₅₀ de la tabla 1³⁵. La manifestación clínica más rápida de los plaguicidas OP se observa mediante inhalación⁴⁷.

1.2.6.4.2. Distribución

Después de absorberse, los OP se distribuyen a todos los órganos y tejidos, según su ruta de exposición y biodisponibilidad, especialmente donde haya tejido adiposo. Las concentraciones más altas se alcanzan en el hígado y riñones. Los compuestos más

lipofílicos pueden almacenarse en los tejidos grasos y el tejido nervioso para ser liberados y redistribuidos posteriormente, pero no es muy común su bioacumulación dada su rápida degradación³⁸.

1.2.6.4.3. Biotransformación

Como cualquier xenobiótico, los compuestos OP se biotransforman para su eliminación a través de reacciones de la Fase I (oxidación, reducción e hidrólisis) y de la Fase II (conjugación), con enzimas del hígado e intestino y por A-esterasas presentes en la sangre. En el caso de los OP en forma tio, los metabolitos formados en la Fase I suelen activar al compuesto en un metabolito más tóxico (oxón), por lo que la biotransformación suele dividirse en procesos de activación y desintoxicación (Figura 9). La activación de OP ocurre a través de la reacción de desulfuración oxidativa, donde las monooxigenasas microsomales (MO) de función mixta desempeñan un papel importante, en particular el sistema del CYP450⁷. Un ejemplo de la biotransformación de OP es la activación de paratión en su oxón correspondiente, el paraoxon, que es casi 10 veces más potente inhibidor de AChE por vía cutánea (DL50=40mg/kg vs LD₅₀=5 mg/kg)²⁹. La desintoxicación de un insecticida OP puede ocurrir mediante hidrólisis enzimática o química por la escisión de uno de los enlaces del fósforo (grupo saliente), formando una molécula cargada negativamente que inactiva al OP como anti-colinesterasa. El grupo saliente generalmente contiene grupos hidroxilo, amino o tiol que sufren fácilmente reacciones de conjugación⁷. La reacción de desintoxicación es más rápida que la de activación. Cuando dos o más OP se absorben a la vez, las enzimas esenciales para la degradación de uno pueden ser inhibidas por el otro, causando potenciación del efecto⁴⁰.

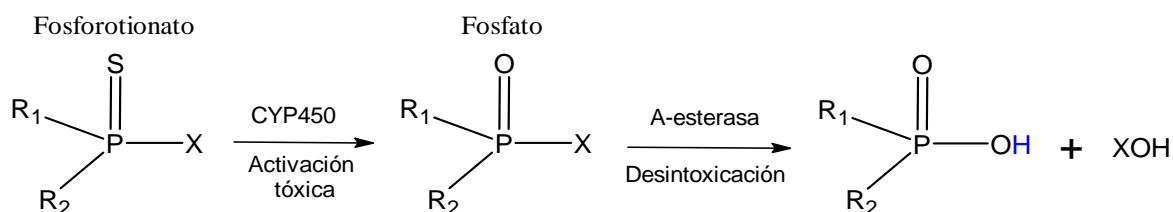


Figura 9. Biotransformación de compuestos OP en forma tio. Los fosforotionatos se activan mediante oxidasas transformándose en sus oxones correspondientes. Luego, su fosfato análogo se desactiva mediante A-esterasas que hidrolizan al OP.

1.2.6.4.4. Eliminación

Los metabolitos de degradación son más estables e hidrosolubles que los compuestos originales y se excretan fácilmente a través de la orina. Estos metabolitos son potencialmente útiles como biomarcadores de exposición⁵.

2. ANTECEDENTES

2.1. Uso de A-esterasas en la formulación de un tratamiento contra la intoxicación por OP

Las A-esterasas se han identificado en una variedad de tejidos de plantas y animales, así como en algunas bacterias. Algunos ejemplos son la PON1 del suero de mamíferos y la PTE de *Brevundimonas diminuta* (anteriormente *Pseudomonas diminuta*)⁴⁸. PON1 es la A-esterasa más conocida en todos los niveles (molecular, genético, etc.). En consecuencia, siempre que se describe una nueva actividad, se pretende establecer paralelismos con PON1. Sin embargo, el mecanismo de hidrólisis y estructura molecular están mejor estudiadas en la PTE de *B. diminuta*. La actividad catalítica de las A-esterasas suele depender de cofactores divalentes como Ca^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , entre otros, que pueden participar en su conformación o directamente en el sitio activo. Por esta razón las A-esterasas son metaloproteínas y se ven inhibidas por agentes quelantes como el EDTA⁴⁸. Las A-esterasas exhiben diferentes respuestas a los activadores e inhibidores⁴⁸. Las A-esterasas más estudiadas se mencionan a continuación.

2.1.1. Paraoxonasa del suero de mamíferos (PON1)

PON1 es una enzima polimórfica que comprende 354 aminoácidos, su peso molecular es de 45 kDa y posee múltiples actividades hidrolíticas como paraoxonasa, arilesterasa y lactonasa^{49,50}. Aunque se desconocen los sustratos fisiológicos de la enzima, se cree que la actividad catalítica de la PON1 nativa es la actividad lactonasa⁵¹. PON1 fue descrita por primera vez debido a su capacidad para hidrolizar al insecticida paraoxón, por lo que se le dio el nombre de paraoxonasa. Sin embargo, este nombre lleva a la idea errónea de que el paraoxón es el mejor sustrato para esta enzima y existen otros sustratos con mayor afinidad, como el fenilacetato cuya hidrólisis es 1000 veces más rápida que la de paraoxón⁵². Además de estos sustratos, PON1 hidroliza oxofosfatos como los metabolitos tóxicos de los insecticidas chlorpirifos y diazinon y los agentes nerviosos sarin y soman^{53,54}. El mecanismo catalítico A-esterásico de PON1 aún no está elucidado, pero se sabe que es dependiente de Ca^{2+} . Se ha sugerido que los iones de calcio tienen las siguientes funciones: mantener la conformación del sitio activo, participar directamente en la reacción catalítica y facilitar la eliminación del dietilfosfato, probablemente polarizando el enlace $\text{P}=\text{O}$ del intermediario dietilfosfato para que el fósforo sea más susceptible a los ataques

nucleofílicos⁴⁸. La estructura cristalográfica con sus equivalentes de calcio se puede observar en la Figura 10. PON1 se sintetiza en el hígado y se secreta en el torrente sanguíneo para unirse a las lipoproteínas de alta densidad mediante la proteína APO E1 (HDL). Se distribuye en el cerebro, riñón, hígado, intestino delgado y pulmones, pero sólo alcanza niveles significativos de interés toxicológico en el hígado y el suero⁵⁰. PON1 se considera una proteína relevante para la desintoxicación de OP porque especies como aves y peces que tienen bajos niveles de actividad PON1 son muy susceptibles a intoxicaciones, mientras que las especies con mayores niveles de esta proteína son más resistentes a la toxicidad de estos compuestos^{55,56}. Sin embargo, la tasa de catálisis de PON1 sobre agentes nerviosos quirales se ha considerado baja en términos toxicológicos, además no puede actuar sobre la mayoría de las mezclas racémicas ni de compuestos tiofosfatos. Se ha reportado que PON1 solo hidroliza unos pocos OP por los que la protección de PON1 contra la toxicidad de OP es limitada⁵⁰. De ahí la necesidad de buscar otras esterasas más eficientes con fines médicos y biotecnológicos, que van desde la búsqueda en otras especies y tejidos hasta la ingeniería de proteínas para volver más eficientes a las A-esterasas ya conocidas.

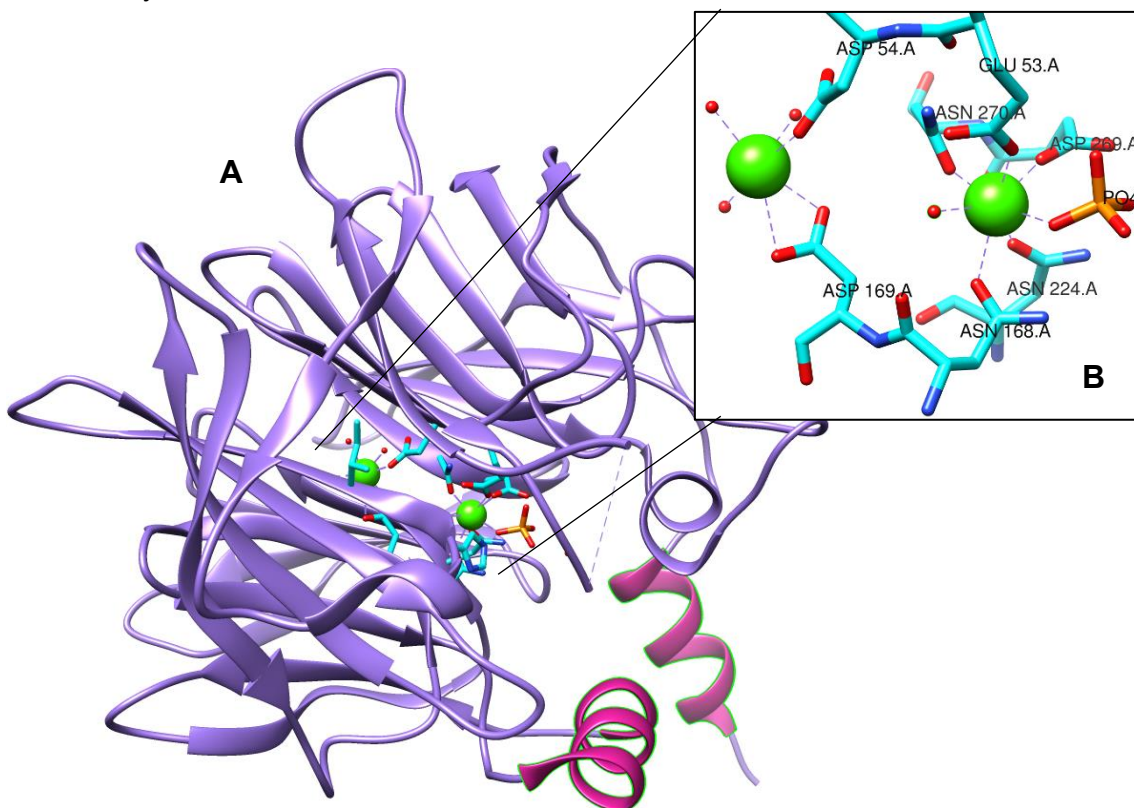


Figura 10. Estructura cristalográfica de PON1 del suero humano (PDB:1V04)⁵⁷.
A: Estructura secundaria de PON1 con su sitio catalítico. **B:** Sitio catalítico de PON1. Calcio (verde), fosfato (naranja), residuos catalíticos (cian).

2.1.2. Fosfotriesterasa de *Brevundimonas diminuta* (PTE).

PTE es una proteína dimérica que cataliza la hidrólisis de ésteres fosfóricos con un alto recambio catalítico y una amplia especificidad de sustrato⁵⁸. Aunque su sustrato natural es desconocido, la PTE cataliza la hidrólisis de paraoxon con una k_{cat} de 10^4 s^{-1} , mientras que los valores correspondientes para k_{cat}/K_m se acercan a $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.⁵⁹ En el sitio activo de la proteína se encuentra un centro bimetálico de zinc (2 equivalentes de zinc por molécula), los dos iones metálicos requeridos están unidos mediante un ligando común y la mayoría de los otros ligandos proteicos del grupo metálico binuclear son cadenas laterales de imidazol de residuos de histidina. La actividad catalítica se pierde tras la incubación de la proteína con agentes quelantes como EDTA y se puede restaurar con la incubación con cationes divalentes como Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} o Mn^{2+} .⁶⁰ La estructura secundaria de la proteína consta de hojas beta, hélices alfa y su sitio catalítico está formado por 2 equivalentes de Zinc, las His 55, 57, 201, 230, la Lis 169 y el Asp 301 (Figura 11). El mecanismo catalítico de esta PTE se describe a continuación; el OP se une al centro metálico binuclear dentro del sitio activo mediante la coordinación del oxígeno fosforilo del OP con el ion metálico β y el disolvente, esta interacción debilita el enlace del puente de hidróxido al metal β . La interacción del oxígeno del metal polariza el enlace del oxígeno del fosforilo y hace que el centro del fósforo sea más electrófilo. El ataque nucleofílico por parte del hidróxido unido se ve favorecido por la abstracción de protones de Asp301. A medida que el hidróxido ataca el centro de fósforo, el enlace con el grupo saliente se debilita. La His354 puede facilitar la transferencia de un protón desde el sitio activo al disolvente del medio⁶¹. La limitación del uso de la PTE de esta bacteria en el tratamiento contra intoxicación por OP en humanos es la reacción del sistema inmunológico que podría resultar en un choque anafiláctico, ya que las bacterias están muy alejadas evolutivamente de los humanos, por esta razón se han probado estrategias como la mutagénesis y la PEGilación de la proteína que, aunque han dado buenos resultados, no alcanzan los niveles de reactividad de la proteína nativa o no llegan a su blanco molecular durante su administración⁶².

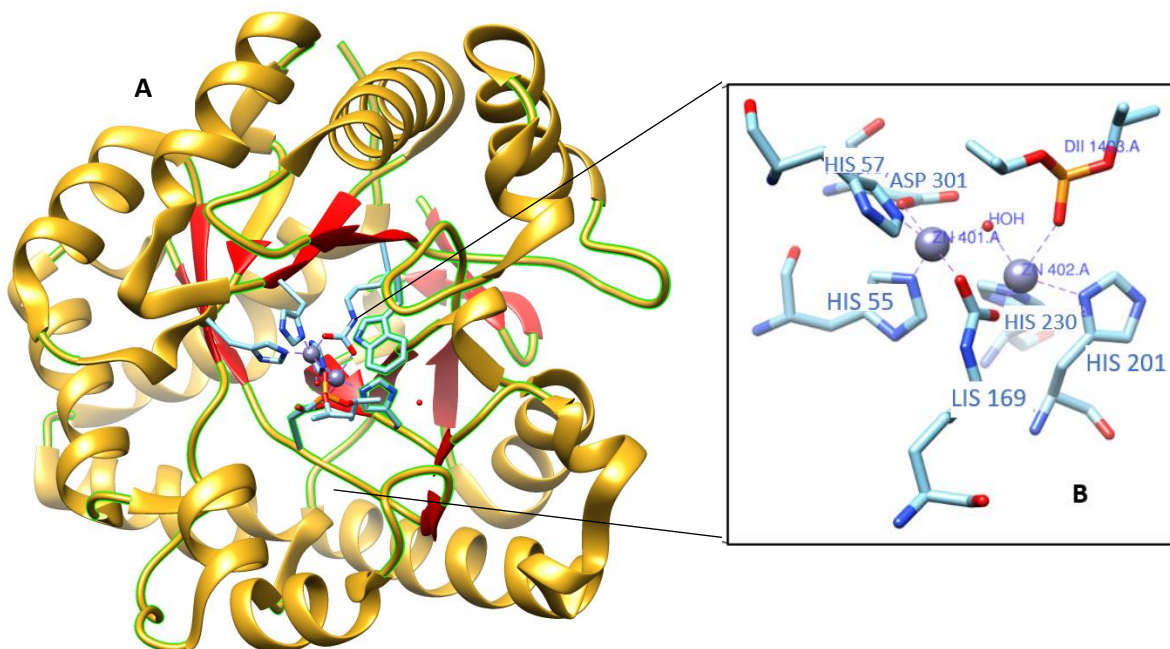


Figura 11. Estructura cristalográfica de PTE de *Brevundimonas diminuta* (PDB: 1EZ2)⁶³.
A: Estructura secundaria, sitio catalítico con 2 átomos de zinc como cofactores y un sustrato OP. **B:** Sitio catalítico. Zinc (morado), residuos involucrados (azul) y el sustrato (naranja, Diisopropilmetil fosfonato).

2.1.3. Actividad A-esterasa observada en suero animal.

Para el estudio de la toxicidad por plaguicidas se han implementado técnicas *in vitro* e *in vivo* para determinar si un OP es neurotóxico y/o neuropático, como lo son la inhibición y reactivación de B-esterasas (AChE y NTE) y la inducción de neuropatía retardada en gallinas⁶⁴. Así también existen técnicas analíticas para determinar si un OP es hidrolizado *in vitro* o *ex vivo* por una proteína o un tejido¹³. Una técnica factible para detectar la hidrólisis de OP es la cuantificación del grupo saliente al final de la reacción y otra es la cuantificación del sustrato remanente⁶⁵. Esto se puede realizar a tiempos finales o como cinéticas de formación de producto y/o desaparición del sustrato. El modelo de estudio para la hidrólisis de oxofosfato que se ha utilizado en nuestro laboratorio es la del O-hexyl O-2,5-dichlorofenil fosforamidato (HDCP), un compuesto análogo del insecticida metamidofós, que produce neuropatía retardada¹³. El modelo de tiofosfato ha sido el O-etil O-(2,4,5-triclorofenil) etilfosfonotioato o tricloronato (TCN), usado anteriormente como insecticida y retirado del mercado por sus efectos neurotóxicos y neuropáticos⁶⁵. Estos compuestos han sido modelos aceptados por la comunidad científica ya que existe suficiente información bioquímica sobre sus efectos tóxicos y su biotransformación *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*^{12,13}. Los grupos salientes de la hidrólisis de HDCP y TCN son fenoles (2,5-diclorofenol y 2,4,5-

triclorofeno, respectivamente) que pueden ser detectados y cuantificados con métodos colorimétricos, además el método para separar sus enantiómeros por cromatografía quiral es accesible ^{12,13,65}. Con estas metodologías se ha reportado que el suero de las aves poseen actividades HDCPasa y TCNasa en presencia de Cu^{2+} a pesar de que estudios previos consideraban a las aves carentes de A-esterasas debido a su baja actividad dependiente de Ca^{2+} ⁶⁶.

2.1.3.1. Modelo de estudio de oxofosfatos: el HDCP

El O-hexyl O-2,5-diclorofenil fosforamidato (HDCP), un compuesto análogo del insecticida metamidofós (Figura 12), que produce neuropatía retardada¹³. Fue diseñado para estudiar la inhibición y envejecimiento de B-esterasas. Este compuesto OP pertenece al grupo de oxofosfatos quirales y tiene 2 isómeros el R(+)-HDCP y el S(-)-HDCP. El isómero R(+) inhibe y envejece la NTE podría ser el enantiómero que provoque la neuropatía retardada ^{64,67}

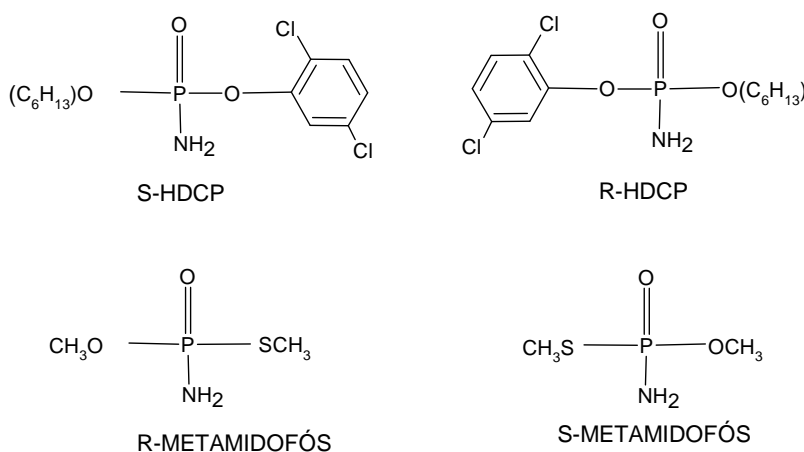


Figura 12. Estructura química de los enantiómeros de Metamidofós y su análogo HDCP¹³

2.1.3.2. Modelo de estudio de tiofosfatos: el TCN

El O-etil O-(2,4,5-triclorofenil) etilfosfonotioato o tricloronato (TCN) es un insecticida OP que pertenece al grupo de los tiofosfatos (P=S) quirales. Su nombre comercial es Phytosol, Agrisil, Agritox, entre otros. Este insecticida fue desarrollado en 1960 por Bayer AG para controlar plagas del suelo como gusanos de la raíz y gusanos de alambre, pero se retiró del mercado por sus efectos tóxicos anticolinesterásicos y neuropáticos. Además, es persistente en el suelo (180 días), de alta toxicidad para la vida acuática (DL50 0.11 - 0.18 mg/L, 96 h, trucha arcoíris), de mamíferos (DL50 23.7 mg/kg, rata) y aves (DL50 12 mg/kg *Anas platyrhynchos*)²⁹. No existe evidencia de que el TCN sea cancerígeno, mutagénico ni que interfiera con la reproducción (perturbación endócrina, teratogenicidad ni otros). El TCN tiene dos enantiómeros, cuando se hidrolizan se libera su grupo saliente 2,4,5-triclorofenol

(TCP) que puede detectarse por espectrofotometría (Figura 13)^{19,25,26}. Su configuración absoluta se calculó con las reglas de Cahan, Ingold y Prelog, pero no se han determinado experimentalmente. La forma en la que se identifican los enantiómeros actualmente es con su configuración relativa determinada por el ángulo de desviación de la luz, teniendo el enantiómero (+)-TCN y (-)-TCN. Esta es la nomenclatura que se utilizará para referirse a estos enantiomeros en el presente trabajo. La mezcla racémica de TCN se puede separar por cromatografía quiral empleando la columna Chiralcel OD. En este sistema el primero que eluye corresponde al isómero (+)-TCN. Es importante mencionar que el enantiómero (-)-TCN es entre 8 y 11 veces más tóxico que la forma (+)-TCN en organismos acuáticos (CL50 $\mu\text{g/L}$ *Ceriodaphnia dubia* (+)-TCN=0.68 vs (-)-TCN= 0.06)⁷¹.

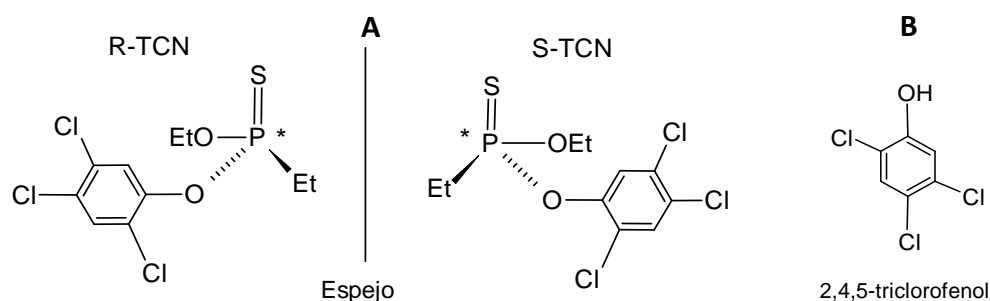


Figura 13. Estructura química de los enantiómeros de tricloronato (TCN) y su grupo saliente.
A: Enantiómero R y S de TCN, * centro quiral. **B:** Grupo saliente 2,4,5-TCP ⁷¹

2.1.3.3. Actividad HDCPasa en el suero de aves domésticas y marinas.

Monroy y col. (2018) realizaron experimentos de hidrólisis de HDCP (400 μM racémico) con sueros de 20 especies de aves domésticas y marinas (10 μL por especie) en presencia de 100 μM de Cu^{2+} en condiciones fisiológicas (pH=7.4 y 37°C). Después de 90 min de reacción se cuantificó el grupo saliente (2,5-diclorofenol) por espectrofotometría UV/Vis y el remanente de HDCP por cromatografía quiral. Todas las especies hidrolizaron el HDCP, resultando la conversión del sustrato entre 25% y 75%, siendo el suero de pavo la especie que presentó mayores niveles hidrólisis de HDCP ya que ambos isómeros de HDCP se hidrolizaron en el mismo nivel. Mientras, que el suero de pollo presentó una hidrólisis estereoselectiva Cu^{2+} -dependiente, se hidrolizó el isómero R(+)-HDCP, que es el enantiomero más tóxico de esta mezcla racémica (conversión de isómeros S/R: 5% vs 50%). En presencia de EDTA las actividades HDCPasas de los sueros de todas las aves fueron inhibidas de manera significativa⁷². Posteriormente, estudios in vitro con cuproproteínas del suero de aves y mamíferos Se identificó que la proteína responsable de esta hidrólisis Cu^{2+} en el suero de aves es la albúmina⁷³.

2.1.3.4. Actividad TCNasa en el suero de aves y mamíferos doméstico.

El suero de aves también presenta actividad TCNasa dependiente de Cu^{2+} . Como parte de la tesis de maestría de la QFB Susana Chavez (2019) se llevaron a cabo experimentos de hidrólisis de TCN con suero de aves domésticas⁶⁸. Estos experimentos consistieron en la incubación de 10 μL del suero de 7 especies diferentes de aves domésticas (pavo, paloma, codorniz, pato, ganso, pavo real y gallina) con TCN racémico 400 μM en condiciones fisiológicas ($\text{pH}=7.4$, 37°C .) en presencia de 300 μM de Cu^{2+} . Después de 60 min de reacción todas las especies presentaron hidrólisis de TCN ($>75\%$), algunas de ellas de forma estereoselectiva (pavo, codorniz, pato, ganso, y pavo real) a favor del isómero (-)-TCN, isómero con mayor toxicidad que su correspondiente (+)-TCN (conversión de isómeros +/-: 84% vs 94.5%). También fueron incubados 10 μL de suero de 8 mamíferos domésticos (perro, cabra, cerdo, oveja, caballo, gato, conejo y vaca) y de humano con una alícuota de 400 μM de TCN racémico en condiciones fisiológicas en presencia de Ca^{2+} 2.5 mM, Cu^{2+} 300 μM y EDTA 5 mM. Después de 60 min de reacción se pudo observar que exclusivamente el suero de cabra en presencia de cobre hidrolizó al TCN. Esta hidrólisis fue ligeramente estereoselectiva a favor del isómero (+)-TCN (conversión de isómeros +/-: 27% vs 16%), actividad hidrolizante inversa a la que se observó en el suero de aves. Otros estudios complementarios muestran que después de 120 min de reacción la hidrólisis de TCN alcanzó el 90% de hidrólisis de ambos isómeros, lo que indica que el suero de cabra hidroliza ambos isómeros, con una velocidad ligeramente mayor para el isómero no tóxico (+)-TCN. No se fue identificada la proteína responsable de la hidrólisis de TCN en el suero de cabra. Sin embargo, la activación por Cu^{2+} sugiere la participación de una cuproproteína y al no ser activada por Ca^{2+} , se descartó a la PON1⁶⁸. Por otro lado, Damianys Almenares y col (2019) realizaron experimentos de hidrólisis de TCN con suero y albúmina de pavo, que consistieron en la incubación de 10 μL de suero de pavo o 200 μg de albúmina con una mezcla racémica de 400 μM de TCN en condiciones fisiológicas de pH y temperatura en presencia de 300 μM de Cu^{2+} . Después de 60 min de reacción se identificó una hidrólisis estereoselectiva a favor del isómero (-)-TCN (conversión de isómeros +/-: 32% vs 65%)⁶⁵. También esta actividad TCNasa fue inhibida con EDTA y se demostró que la proteína responsable de la actividad TCNasa Cu^{2+} dependiente en suero de pavo también es la albúmina⁷⁴. No se sabe cuál es la proteína responsable de la actividad A-esterasa de TCN observada en el suero de cabra, pero se sabe que es dependiente de Cu^{2+} .

2.2. Transporte de cobre en la sangre

Las tres principales proteínas que unen cobre en la sangre son la ceruloplasmina, la albumina y la metalotioneína⁷⁵. La mayoría del cobre (60-70%) de la sangre se une a la ceruloplasmina para su distribución corporal. Dicha cuproproteína redox es responsable de la oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} para permitir su incorporación en la transferrina. El 15% del cobre en la sangre humana es transportado por la albúmina para distribuirlo entre los órganos internos y se une a la albúmina como Cu^{2+} debido a las condiciones oxidativas en la sangre⁷⁶. La tercera proteína capaz de unir cobre en la sangre es la metalotioneína, pero la cantidad de unión a cobre es mínima en comparación de la cantidad que une a la ceruloplasmina y a la albumina⁷⁵. Se realizaron ensayos in vitro empleando las tres proteínas para medir actividad A-esterasa dependiente de Cu^{2+} en el suero de pollo tomando como sustrato al HDCP. Se observó que la única proteína que presentó actividad HDCPasa fue la albúmina⁷³.

2.3. Albúmina sérica como A-esterasa.

Se ha demostrado la actividad A-esterasa Cu^{2+} dependiente de la albúmina de aves^{11,24}. La albúmina del suero de pavo y pollo tienen actividades TCNasa y HDCPasa Cu^{2+} dependiente, respectivamente. En presencia de Cu^{2+} 100 μM la albumina del suero de pavo (TSA) hidrolizó los dos isómeros de TCN en condiciones fisiológicas, con una ligera preferencia por el isómero (-)-TCN (86% vs 95%) en 120 min de reacción. En estas condiciones, la hidrólisis de TCN con la albumina del suero de pollo (CSA) fue menor del 10%⁷⁴. En cambio, usando de sustrato al HDCP, en las mismas condiciones, la hidrólisis con CSA del isómero R(+)-HDCP alcanzó un 95% de reacción y el isómero S(-)-HDCP llegó a 37% de reacción⁷³. En ambos casos, la hidrólisis se inhibió con EDTA. Por estos resultados, se puede concluir que la hidrólisis A-esterasa de TSA y CSA es Cu^{2+} -dependiente y estereoselectiva a favor de los isómeros más tóxicos de TCN y HDCP, resultando la estereoselectividad del R(+)-HDCP de CSA más evidente. Estas dos actividades A-esterasas son de interés toxicológico, por lo que es relevante profundizar en las propiedades bioquímicas y farmacológicas de estas proteínas como candidatas para utilizarse en un futuro como un posible tratamiento contra intoxicaciones por OP.

2.3.1. Propiedades y funciones de la albúmina sérica.

La albúmina es la proteína más abundante en el suero sanguíneo de los animales vertebrados, su concentración normal es de 0.6mM, es una proteína multifuncional de 66

kDa y 585 aminoácidos que consta de 3 dominios, cada dominio tiene 2 subunidades idénticas compuestas de 4 y 6 α -hélices sin hojas beta y sin grupos prostéticos. Tiene 17 pares de puentes disulfuro que le dan forma de corazón y contiene sólo una cisteína libre (Cys34)⁷⁷. La albúmina tiene un papel clave en el mantenimiento de la presión oncótica y su función es transportar diversos ligandos endógenos y exógenos como hormonas, ácidos grasos, xenobióticos, fármacos y iones metálicos. El Cu^{2+} es uno de los iones metálicos más estudiado con respecto a su asociación con la albúmina. La albúmina se sintetiza en los hepatocitos, pero no se almacena en el hígado porque pasa directamente al torrente sanguíneo; la mayor parte (40% -60%) se degrada en músculos, hígado y riñones⁷⁸. Además, la albúmina funciona como biomarcador de muchas enfermedades entre ellas el Alzheimer, daños hepáticos, daños a la barrera hematoencefálica y en intoxicaciones por plaguicidas OP^{76,79}. A pesar de ser conocida por ser una proteína de transporte, la albúmina también se le ha atribuido actividad antioxidante y propiedades enzimáticas en medios tanto acuosos como no acuosos (como en etanol, DMSO y DMF)⁷⁷. Se ha observado que la albúmina puede adquirir actividades como oxidoreductasa (EC 1.11.1.24), como carboxilesterasa (EC 3.1.1.103), arilesterasa (EC 3.1.1.2) y A-esterasa o fosfotriesterasa (EC 3.1.8.3) y por esa versatilidad catalítica se puede definir como un biocatalizador promiscuo^{48,52}. La unión específica con sustratos favorece una actividad estereoselectiva frente a compuestos racémicos^{52,77}. Se ha descrito una peculiar actividad paraoxonasa a la albúmina sérica de mamíferos y aves que no depende de iones Ca^{2+} y que es resistente a EDTA⁴⁸. Esta actividad se demostró que es tipo B-esterasa a través de la formación de un intermediario covalente como pseudoesterasa de fosforilación rápida y desfosforilación lenta⁸⁰. En la catálisis de esta actividad HDCEPasa EDTA resistente está participando la Tyr411, siendo este aminoácido el centro pseudoesterásico de la albúmina⁸¹ en ausencia de cofactores metálicos. El sitio catalítico metal-dependiente A-esterásico de las albúminas aún se desconoce, pero se sabe que requiere cofactores divalentes. Tal es el caso de las albúminas de aves que son Cu^{2+} dependientes^{73,74}. Se ha sugerido que este mecanismo de reacción puede involucrar metales de transición acomplejados para dar metaloenzimas artificiales⁷⁷. La albúmina es una cuproproteína importante en la sangre y en el líquido cefalorraquídeo⁸², pero también es un transportador de otros iones metálicos. En el siguiente apartado profundizaremos en los sitios de unión a metales en esta proteína plasmática.

2.3.2. Sitios de unión a metales

La unión de metales a albúmina es de importancia tanto fisiológica como de relevancia toxicológica; la albúmina transporta iones esenciales como Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} y Co^{2+} , también pueden unirse a sustancias tóxicas como Hg^{2+} y Cd^{2+} o a iones involucrados en terapias como Au^{1+} y Pt^{4+} con afinidades distintas en cada sitio⁸². Se reconocen 4 sitios de unión a metales en su estructura (Tabla 6)⁷⁶.

Tabla 6. Características y afinidad metálica de los sitios de unión a metales

Sitio	Orden de afinidad metálica	Características
Sitio amino terminal (NTS)	$\text{Cu}^{2+} > \text{VO}^{4+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+}$	<ul style="list-style-type: none"> • Primer sitio de unión a Cu^{2+} • Formado por los 3 primeros aminoácidos de la albúmina
Sitio A (MBS)	$\text{VO}^{4+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+}$	<ul style="list-style-type: none"> • Estructura cuadrada plana • Segundo sitio de unión para Cu^{2+} y Ni^{2+} • Primer sitio de unión a Zn^{2+} • Formado por los residuos: His67, Asn99, His247 y Asp249
Sitio B	Mn^{2+} , $\text{Cd}^{2+} > \text{Co}^{2+} = \text{Cu}^{2+}$, * Zn^{2+}	<ul style="list-style-type: none"> • Sitio primario para iones Mn^{2+} • No se conoce su ubicación • Cd^{2+} y Co^{2+} compiten por el sitio
Cys34	Unión inespecífica de metales	<ul style="list-style-type: none"> • Une metales vía enlace de azufre. • No se une significativamente a iones metálicos endógenos

*Existe incertidumbre

Se ha reportado que el primer sitio de unión a Cu^{2+} en la albúmina es el extremo N-terminal (NTS) formado por los primeros 3 aminoácidos de la proteína, el segundo sitio es el "Sitio de unión a metales múltiples" (MBS)⁷⁶. La unión de Cu^{2+} al segundo sitio no afecta la unión con el primero ya que se une al segundo sitio una vez que se satura el primero⁷⁷. Debido a que la actividad observada en la albúmina del suero de aves es Cu^{2+} dependiente y que el primer sitio de unión a Cu^{2+} en la albúmina es NTS se ha sugerido que juega un papel importante en la catálisis de OP, formando parte del sitio catalítico o induciendo la conformación a la proteína⁸³. Por esta razón es de interés profundizar en sus características de unión a metales, en particular la unión a Cu^{2+} . Se ha reportado un modelo de una estructura cristalina del péptido NTS de la albúmina humana unido a cobre⁸⁴. Sin embargo, no se ha cristalizado a la albúmina unida a cobre, ni con nuestros ligandos OP (HDCP o TCN). Existen estructuras de la albúmina de diferentes especies, entre ellas la humana y la caprina, unida a ligandos como fármacos, ácidos grasos y metales (Figura X).

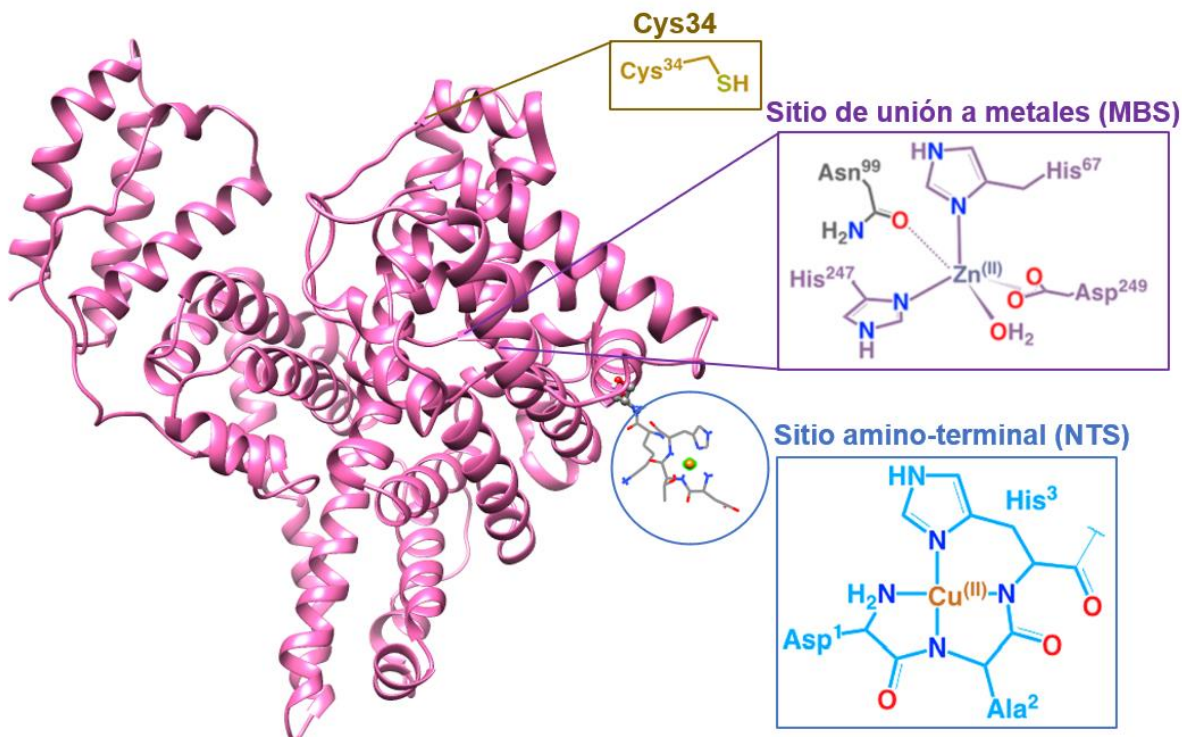


Figura 14. Estructura cristalográfica de la albúmina humana (PDB:5IJF)⁸⁵ con sus sitios de unión a metales⁸². NTS se acopló según la estructura cristalina del péptido DAHK (CCDC-809109)⁸⁴ para ilustrar el sitio de unión NTS. No se ha ubicado el sitio B.

2.3.3. Sitio amino terminal (NTS).

Este sitio está compuesto por los primeros residuos en la secuencia de la albúmina. Esta secuencia es Asp-Ala/Thr-His en la mayoría de las albúminas de mamífero, excepto en el cerdo y perro, que tienen la His3 mutada por Tyr3. En el caso de las aves, en la tercera posición se encuentra un Asp y la His se encuentra en cuarta posición, lo que podría ser resultado de una inserción o deleción evolutiva (Tabla 7)⁸³. Esta disposición de cuatro coordenadas de átomos donantes es más estable con iones metálicos capaces de formar complejos cuadrados y planos como el Cu^{2+} y Ni^{2+} ⁷⁶. La secuencia amino-terminal de albúminas de algunas especies de interés en el presente estudio son las siguientes:

Tabla 7. Secuencia NTS de algunas albúminas de interés.

Especie	1	2	3	4
Pollo (<i>Gallus gallus</i>)	Asp	Ala	Glu	His
Pavo (<i>Meleagris gallopavo</i>)	Asp	Ala	Glu	His
Humano (<i>Homo sapiens</i>)	Asp	Ala	His	Lis
Perro (<i>Canis lupus familiaris</i>)	Glu	Ala	Tyr	Lis
Cerdo (<i>Sus scrofa domestica</i>)	Asp	Thr	Tyr	Lis
Cabra (<i>Capra aegagrus hircus</i>)	Asp	Thr	His	Lis
Oveja (<i>Ovis aries</i>)	Asp	Thr	His	Lis
Vaca (<i>Bos taurus</i>)	Asp	Thr	His	Lis

3. JUSTIFICACIÓN

Los compuestos OPs son utilizados ampliamente en los países subdesarrollados, ya que son eficientes y accesibles por su bajo costo, el uso de estos productos es posible que no disminuya, sino que incluso podría incrementar. Los efectos neurotóxicos que tienen estos compuestos sobre los mamíferos incluyendo humanos. Mientras que la ausencia de un tratamiento farmacológico efectivo ante la exposición aguda a altas concentraciones a estos compuestos, lo convierte en un problema de salud pública mundial. Asimismo, dentro de los diversos OPs, los tiofosfatos presentan mayor lipofilicidad y menor hidrólisis por A-esterasas que la de sus análogos oxofosfatos. Esto hace posible que se bioactiven *in situ* en tejidos blanco como el cerebro, por lo que su toxicidad pudiera ser mayor. Por otro lado, se ha encontrado que el suero de cabra puede hidrolizar tiofosfatos de una manera estereoselectiva y dependiente de Cu^{2+} ; Sin embargo, no se ha identificado cuál proteína sería la responsable. En base a estudios previos con suero de pollo, donde se demostró que la albúmina fue capaz de hidrolizar de manera estereoselectiva un OP racémico de forma similar a lo observado en suero de cabra y a la dependencia de Cu^{2+} , se sugiere que la actividad de A-esterasa en el suero de cabra podría deberse a la albúmina. Esta investigación se engloba dentro de un proyecto que busca identificar y caracterizar la o las proteínas responsables de la actividad A-esterasa en el suero de cabra, así como la identificación de la unión de cobre y sobre todo del centro catalítico de las albuminas animales. Por esta razón, los hallazgos derivados de esta investigación bioquímica y biotecnológica se podrán contribuir al entendimiento de los procesos del metabolismo y toxicidad de OP, así como al desarrollo de un tratamiento profiláctico o un fármaco efectivo post-exposición en la clínica humana y veterinaria, así como en el desarrollo biotecnológico para la bioremediación ambiental de OPs.

4. HIPÓTESIS

H1: La albúmina del suero de cabra, será la proteína responsable de la actividad A-esterasa sobre tiofosfatos quirales, resultando esta actividad estereoselectiva en presencia de Cu^{2+} .

H2: El sitio amino-terminal (NTS), forma parte del sitio catalítico A-esterásico de la proteína.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar la posible actividad A-esterasa Cu^{2+} dependiente de las albúminas presente en el suero de mamíferos y proponer la localización de su sitio activo.

5.2. Objetivos específicos

1. Evaluar la actividad A-esterásica Cu^{2+} dependiente de las albúminas del suero de mamíferos sobre el insecticida quiral TCN.
2. Determinar la estereoselectividad de la reacción de hidrólisis de TCN con las albúminas que presenten actividad A-esterásica.
3. Identificar el centro catalítico A-esterásico de la albúmina del suero de vertebrados.
4. Caracterizar la hidrólisis Cu^{2+} -dependiente de TCN por una proteína mutada en el sitio NTS de la albúmina del suero humano (HSA) que la vuelva más parecida a la albumina de cabra y de aves.

6. METODOLOGÍA

6.1. Obtención de muestras de sueros de mamíferos domésticos y sus albúminas

Se obtuvieron muestras, 5-10 mL, de sangre de animales adultos sanos (n=3) de perro (*Canis lupus familiaris*), cabra (*Capra aegagrus hircus*), cerdo (*Sus scrofa domestica*), ovino (*Ovis aries*), bovino (*Bos primigenius Taurus*) y pavo (*Meleagris gallopavo*) en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) como parte del proyecto de tesis de Susana Chávez⁶⁸. Todas las muestras se recogieron en tubos libres de anticoagulante y se centrifugaron a 1000 x g durante 10 min para obtener los sueros que se almacenaron a -20 °C hasta su posterior manipulación. El cuidado y manejo de los animales se realizó siguiendo la NOM-062-ZOO-1999. Las muestras de suero humano sano fueron proporcionadas de un proyecto de obesidad y síndrome metabólico dirigido por la dra. N. Sara García Jiménez⁸⁶, las cuales fueron obtenidas mediante consentimiento informado (n=3). Las muestras y los residuos fueron manipulados según lo establecido por las Normas Oficiales Mexicanas NOM-253-SSA1-2012 y NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Las albúminas de suero liofilizado de humano, perro, cerdo, oveja, vaca y pavo con una pureza del 98% se adquirieron de Sigma-Aldrich Company. Mientras que, la albúmina del suero de cabra (GSA) se obtuvo de la empresa CUSABIO con una pureza > 95%.

6.2. Cuantificación de la actividad de hidrólisis de la mezcla racémica de TCN por espectrofotometría UV-Vis

La actividad de hidrólisis del TCN la denominaremos en adelante como TCNasa. Se midió mediante la cuantificación del 2,4,5 triclorofenol (TCP, grupo saliente). Este método espectrofotométrico UV-Vis fue desarrollado por nuestro grupo de investigación. Es importante mencionar que por este procedimiento no se diferencia la hidrólisis de los enantiómeros.

La cuantificación de la albúmina presente en los diferentes sueros estudiados fue mediante un kit comercial SPINREACT BSIS02-E 11/02/16. El método se basa en la medición fotométrica UV-Vis de un complejo colorido formado con la unión específica de la albúmina con verde de bromocresol. Para los ensayos de hidrólisis se normalizó la cantidad de albúmina en los sueros (10 µL) para tener 200 µg de albúmina de cada especie en la reacción. En el caso de las albúminas comerciales de mamíferos, se preparó un stock 2mM

en agua desionizada y se tomaron 100 μL para tener los mismos 200 μg de albúmina. Se incubaron las proteínas con sulfato de cobre pentahidratado a la concentración indicada en cada experimento a $\text{pH}=7.4$ (TRIS 10 mM) y $37\text{ }^\circ\text{C}$ en un volumen de reacción de 1 mL. La reacción inició una vez que se añaden 25 μL de TCN racémico de un stock 4mM para tener una concentración final de 100 μM . Después de 60 min de incubación, se detiene la reacción con 750 μL de una solución de 4-aminoantipirina 0.25 mg/mL y SDS 2% m/V en TRIS 50 mM a $\text{pH}=8$ (solución de paro). Posteriormente, se añadieron 375 μL de ferricianuro de potasio al 0.4% m/V para formar un complejo de color que se mide a 512 nm mediante espectrofotometría UV-Vis (PERKIN-ELMER, Lambda 25). Se realizó una curva de calibrado con un estándar de triclorofenol (TCP 28, 52, 80 y 100 μM), las cuales se incubaron en las mismas condiciones que las muestras de suero y albúmina. Posteriormente, se leyó la absorbancia (A) a 512 nm (Figura 14) y se hizo una regresión lineal con los puntos de la curva de calibrado graficando A vs [TCP] para obtener los parámetros de linealización (pendiente y ordenada al origen) que se utilizaron para convertir las A leídas en las muestras a [TCP]. Finalmente, el nivel de hidrólisis de TCN con las muestras se estimó cuantificando la concentración del producto de la reacción (TCP). Los ensayos se realizaron por triplicado. Los valores de la hidrólisis se expresaron en promedio de la [TCP] (μM) formado con su error estándar. Se colocó como control un tubo de “hidrólisis espontánea” que corresponde a un ensayo de hidrólisis no enzimática del sustrato (TCN) en el medio de reacción (sin albúmina ni suero) en las mismas condiciones de reacción. Para el análisis de los datos obtenidos de hidrólisis observada de cada suero se procedió a restar el valor de la hidrólisis espontánea. Los valores de hidrólisis se expresaron en concentraciones μM de TCP por 60 min de reacción.

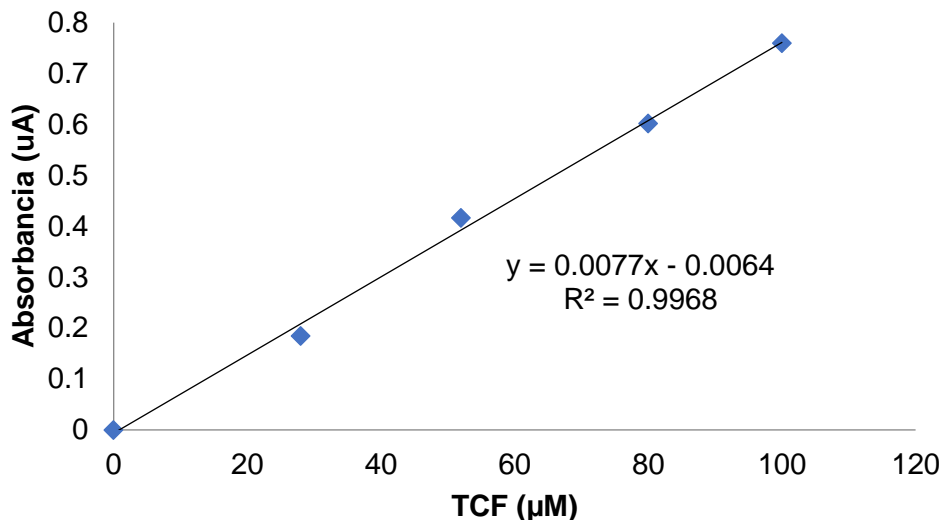


Figura 14. Curva de calibrado de TCP por espectrofotometría UV-Vis

6.3. Hidrólisis estereoselectiva de TCN por cromatografía quiral

La hidrólisis estereoselectiva de TCN se cuantificó mediante la cuantificación de la concentración residual de cada enantiómero (μM) utilizando un método cromatográfico quiral validado por nuestro grupo de investigación²⁷. Este método considera las condiciones cromatográficas establecidas por Ellington *et al* 2001²⁸. El enantiómero (+)-TCN eluye a un tiempo de retención de 8.2 min y su correspondiente (-)-TCN a los 9 min empleando una columna quiral CHIRALCEL OD y una fase móvil de 100% heptano grado HPLC. Los ensayos consistieron en incubar una alícuota de 10 μL de suero o sus respectivos 200 μg de albúmina de cada especie con sulfato de cobre pentahidratado 300 μM a pH 7.4 (TRIS 10 mM) y 37 °C. La reacción de hidrólisis (1 mL) se inició añadiendo 25 μL de un stock de TCN 4mM disuelto en acetona para dar una concentración final de TCN racémico 100 μM (~ 50 μM de cada enantiómero). La reacción se detuvo después de 60 min añadiendo 40 μL de HCl 0.2 M. Posteriormente, se llevó a cabo una extracción líquido-líquido con 1 mL de heptano para obtener el TCN residual del medio acuoso mediante su centrifugación a 1000 x g durante 15 min. Finalmente se inyectó una alícuota de 20 μL de la fase orgánica en el sistema de cromatográfico (HPLC) (serie Agilent 1220 Infinity) equipado con un detector de UV/Vis con arreglo de diodos usando 207 nm a un flujo de 1mL/min de fase móvil. El tiempo de la corrida cromatográfica fue de 10 min por inyección. Para la cuantificación de la hidrólisis estereoespecífica se realizó una curva de calibrado de estándar de TCN en concentraciones 50 μM , 100 μM , 200 μM y 400 μM (Figura 15), las cuales fueron expuestas a las mismas condiciones de pH y temperatura que las muestras

experimentales. Los niveles de hidrólisis se expresaron en el promedio de la concentración residual para cada isómero \pm su error estándar.

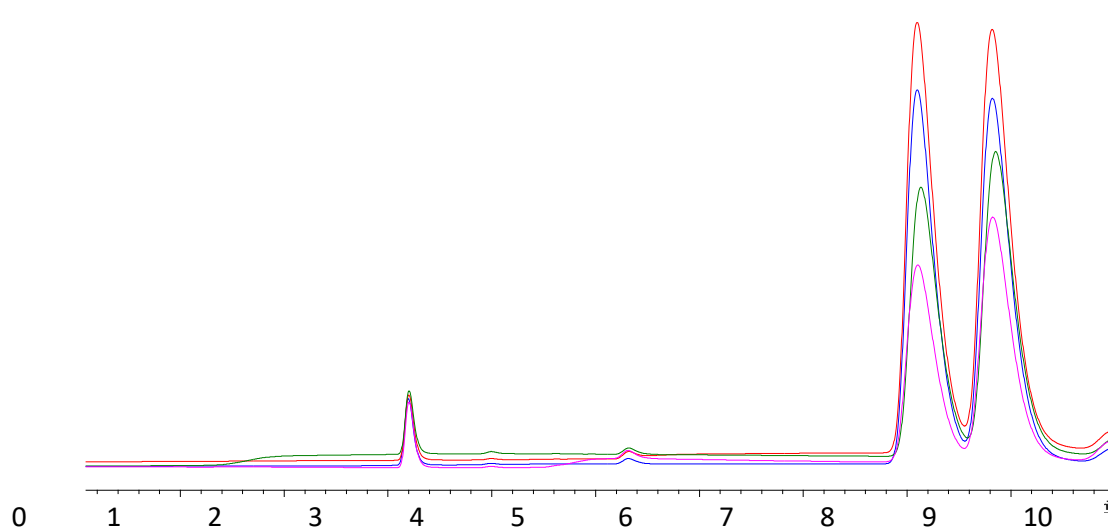


Figura 15. Cromatogramas de la curva de calibrado de TCN

Cada línea representa la elución y detección a 207 nm de mezcla racémica de TCN calidad estándar incubado por 60 min, 37°C, pH 7.4 a las siguientes concentraciones: 50 μ M (rosa), 100 μ M (verde), 200 μ M (azul) y 400 μ M (rojo). (+)-TCN: 8.1 min, (-)-TCN: 8.9 min. El pico observado a 3.2 min corresponde a la acetona en la que se diluyó el estándar de TCN.

6.4. Análisis estadístico

El valor de la concentración remanente de cada enantiómero de tricloronato de los grupos experimentales (sueros + albúminas de mamíferos en presencia de Ca^{2+} o EDTA o Cu^{2+}) en comparación del grupo control fueron analizados por la prueba estadística ANOVA de una vía. Para la comparación de la hidrólisis de (+)-TCN contra (-)-TCN de cada grupo experimental se aplicó una prueba paramétrica t-Student. Se utilizó $p < 0.05$ como valor de significación estadística. Estos análisis se realizaron con paquete estadístico SPSS versión 19 y los gráficos se dibujaron con el programa Sigma Plot versión 12.

6.5. Purificación de la albúmina del suero de cabra

Con el propósito de purificar albúmina del suero de cabra, se tomó una muestra de aproximadamente 5 mL de sangre de cabra, los cuales fueron centrifugados a 1000 x g para la obtención del sobrenadante (suero), en el cual se cuantificó la cantidad de albúmina, así como su actividad TCNasa empleando los procedimientos espectrofotométricos descritos anteriormente. Finalmente, se dializó en frío (4°C) con una membrana de 12 kDa en buffer de acetatos 10 mM, pH=5. Es importante mencionar que para la primera etapa de su purificación se realizó una precipitación con sulfato de amonio al 50% a pH=5 (buffer de

acetatos), después fue centrifugada la muestra a 10,000 rpm por 10 min y el precipitado fue re-suspendido en 10 mL de buffer. La cuantificación de albúmina en las diferentes fracciones se realizó mediante el método de verde de bromocresol. El precipitado con mayor nivel de albúmina y actividad TCNasa fue de dializado en buffer de acetatos pH=5 durante toda la noche empleando una membrana de 12 kDa. El dializado nuevamente se centrifugó para eliminación de un ligero precipitado que se formó durante la diálisis. Este sobrenadante se identificó como “0” y se concentró por ultrafiltración. La segunda etapa de purificación consistió en una separación cromatográfica de intercambio iónico (IEX-DEAE) equilibrando la columna con buffer de acetatos 10 mM (pH=5). La muestra “0” se cargó a una velocidad de 1 mL/min y la proteína eluyó con un gradiente discontinuo de NaCl de 0 a 1 mM. El volumen de la columna (30 mL) se calculó, para pasar 2 volúmenes de buffer a la columna antes de empezar a eluir, uniendo la fracción que no se adherió a la columna (flow through) en la muestra “1”. De esta forma se eluyeron las proteínas con el paso de un volumen de columna por cada concentración de NaCl (50, 100, 200 y 1000 mM). Finalmente, se colectaron fracciones de 6 mL para cada concentración de elución y fueron identificadas las fracciones que contenían albúmina con el ensayo con verde de bromocresol en una placa de 96 pozos utilizando 100 uL de reactivo por cada 10 uL de muestra. De acuerdo con la concentración de NaCl en la que eluyó, obtuvimos las muestras: 2 (50 mM NaCl), 3 (200 mM NaCl), 3 (1000 mM NaCl).

Las fracciones que contenían albúmina fueron concentradas y lavadas por ultrafiltración (membrana Amycon de 10 kDa). Para determinar la pureza de la proteína se corrió un gel desnaturante de acrilamida SDS-PAGE con todas las fracciones (20 µL de cada muestra) teñidas con azul de Commassie. Posteriormente, se procedió a determinar la actividad TCNasa mediante el método establecido en nuestro laboratorio, cuantificando el grupo saliente TCP y la cantidad de proteína (método de Spinreact: Biuret) en las fracciones purificadas empleando los métodos descritos anteriormente. La albúmina fue concentrada en el Amycon, con una membrana de 10 kDa.

6.6. Unión de Cu^{2+} a la albúmina del suero de cabra (GSA)

Con el propósito de determinar el tipo de unión (fuerte o débil) del Cu^{2+} a la albúmina fueron incubados 200 µg de albúmina con 300 µM de Cu^{2+} durante 60 min en condiciones fisiológicas (pH=7.4, TRIS 10 mM, 37 °C). Posteriormente, las muestras se centrifugaron por 5 min a 15000 rpm empleando filtros de 0.1 micras. La alícuota filtrada que contenía el exceso de cobre o cobre no unido a la proteína se empleó para comprobar la hidrólisis

espontánea del metal. Mientras la albúmina retenida en el filtro que en principio mantuvo cobre unido fue re-suspendida con Tris 10 mM pH=7.4 para realizar la actividad hidrolizante de TCN. Para este ensayo se empleó como grupo control 200 µg de albúmina con 300 µM de Cu²⁺. La fracción centrifugada (cobre libre) y ambas albuminas (retenida en el filtro y sin filtrar) fueron incubadas con 100 µM de TCN a pH=7.4 y 37 °C durante 60 min. La reacción de hidrólisis fue finalizada al agregar AAP+SDS a pH=8 y ferricianuro de potasio (0.4%) para formar el complejo colorido con el fenol del grupo saliente del TCN, el cual se midió a λ=512nm.

6.7. Hidrólisis de TCN con una albúmina mutante del suero de humano (rHSA)

6.7.1. Producción recombinante de albúmina humana (HSA) mutada.

Con el propósito de identificar el sitio catalítico de la actividad TCNasa Cu²⁺-dependiente de la albumina de vertebrados, fue obtenida una albúmina recombinante del suero humano. Particularmente le fue insertado un ácido glutámico del sitio amino terminal, que ha sido reportado como un sitio de unión a cobre en la albúmina de vertebrados. Esta inserción está basada en la mayor actividad A-esterasa que presenta la albumina del suero de aves (pollo y pavo) la cual es mayor en comparación con la albúmina del suero de mamíferos que carece de este aminoácido en dicha secuencia. La recombinante humana fue realizada por la empresa Creative BioMart (EE. UU.). Brevemente, se empleó una clona de expresión para la obtención de albúmina de suero humano mutada con una inserción de ácido glutámico en la posición 3 (Glu3). Dicha proteína se expresó en una cepa de *Pichia pastoris* GS115 en medio BMGY y BMMY. En este procedimiento fue empleado metanol al 1% como inductor durante 96 horas. La proteína recombinante fue purificada por cromatografía de intercambio iónico (Q-Sepharosa) y por afinidad (Resina de Sepharosa Azul CL-6B), empleando los amortiguadores. Para la cromatografía de intercambio iónico se usó buffer de fosfatos 25 mM, pH=7.5 con NaCl 1M. Para la purificación por afinidad se usó buffer Tris-HCl 50 mM pH=8 y se eluyó con 2 M de NaCl., respectivamente. La cuantificación de albúmina recombinante fue mediante el método de Bradford y la determinación de su pureza fue a través de un gel SDS-PAGE. La pureza de la proteína recombinante fue del 80% a una concentración de 0.25 mg/mL. A continuación, se muestra el procedimiento que realizó la empresa para obtener la albúmina mutante.

Gen que codifica la proteína objetivo.

Se sintetizó el cDNA con la optimización de la expresión de *P.pastoris*. La secuencia se encuentra a continuación:

>*albúmina 1,775 bp*

```
GAATTCGATGCTGAACATAAATCTGAGGTTGCTCACAGATTCAAGGATTTGGGTGAAGAGAAGCTTCAAAGCTT
TGGTTTTGATTGCTTTTGTCTCAATACTTGCAACAATGTCCATTCGAAGATCATGTTAAGTTGGTTAACGAAGT
TACTGAGTTTGTCTAAAACCTTGTGTTGCTGATGAATCTGCTGAGAATTGTGATAAGTCTTGCACACTTTGTTC
GGAGATAAATTTGTGTACTGTTGCTACTTTGAGAGAAAACCTTATGGAGAGATGGCTGATTGTTGTGCTAAGCAAG
AACCAGAGAGAAAACGAATGTTTCTTGCAACATAAAGATGATAACCCAAATTTGCCTAGATTGGTTAGACCTGA
GGTTGATGTTATGTGTACTGCTTTCCATGATAACGAAGAGACTTTCTTGAAGAAATACTTGTACGAAATCGCT
AGAAGACACCCATACTTCTATGCTCCTGAGTTGTTGTTTTTCGCTAAAAGATAACAAGGCTGCTTTTTACTGAAT
GTTGTCAAGCTGCTGATAAAGCTGCTTGTGTTTGGCAAAGTTGGATGAATTGAGAGATGAGGGTAAAGCTTC
TTCTGCTAAACAAAGATTGAAGTGTGCTTCTTTGCAAAAATTTGGTGAAGAGCTTTCAAGGCTTGGGCTGTT
GCTAGATTGTCTCAAAGATTTTCTAAAGCTGAATTTGCTGAGGTTTCTAAATTGGTTACTGATTTGACTAAGG
TTCATACTGAATGTTGTACGGAGATTTGTTGGAGTGTGCTGATGATAGAGCTGATTTGGCTAAGTACATCTG
TGAAAACCAAGATTCTATCTCTTCTAAGTTGAAGGAATGTTGTGAGAAACCATTGTTGGAAAAGTCTCATTGT
ATTGCTGAAGTTGAGAACGATGAGATGAGAGCTGATTTGCCTTCTTTGGCTGCTGATTTTCGTTGAATCTAAGG
ATGTTTGTAAAGAATTACGCTGAGGCTAAGGATGTTTTCTTGGGAATGTTCTTGTACGAATATGCTAGAAGACA
TCCAGATTACTCTGTTGTCTTGTGTTGAGATTGGCTAAGACTTATGAAACTACTTTGGAGAAATGTTGTGCT
GCTGCTGATCCTCACGAATGTTACGCTAAGGTTTTTCGATGAGTTCAAGCCATTGGTTGAAGAGCCTCAAAACT
TGATTAAGCAAAACTGTGAATTGTTTCGAGCAATTGGGTGAATACAAGTTCCAAAACGCTTTGTTGGTTAGATA
CACTAAGAAAGTTCCACAAGTTTCTACTCCTACTTTGGTTGAAGTTTCTAGAAATTTGGGTAAAGTTGGTTCT
AAATGTTGTAAGCATCCAGAAGCTAAAAGAATGCCTTGTGCTGAGGATTACTTGTCTGTTGTTTTGAACCAAT
TGTGTGTTTTTGCACGAAAAGACTCCAGTTTCTGATAGAGTTACTAAATGTTGTACTGAGTCTTTGGTTAACAG
AAGACCATTGTTTCTCTGCTTTGGAAGTTGATGAGACTTATGTTTCTAAGGAGTTTAAACGCTGAGACTTTTACT
TTCCATGCTGATATCTGTACTTTGTCTGAAAAGGAGAGACAAATTAAGAAAACAAACTGCTCTTGTGTTAATTGG
TTAAGCACAAACCTAAGGCTACTAAGAGCAATTGAAGGCTGTTATGGATGATTTTGTCTGCTTTTCGTTGAAAA
ATGTTGTAAGGCTGATGATAAGGAGACTTGTGTTTGTGCTGAAGAGGGTAAAAAGTTGGTTGCTGCTTCTCAAGCT
GCTTTGGGTTTGTGAGCGGCCGC
```

Expresión del vector

La proteína esperada producida se muestra a continuación.

> *albumin protein, 588 AAs, 66.84 kDa, pI 5.68 sin el péptido*

```
DAEHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI.AFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGD
KLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVPRPEVDVMCTAFHDNEETFLLKLYLYEIIARR
HPYFYAPELFFAKRYKAAFTECCQAADKAAACLLPKLDELRLDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVAR
LSQRFPAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIA
EVENDEMRAADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLRLRLAKTYETTTLEKCCAAA
DPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQELGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKC
CKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFH
ADICTLSEKERQIKKQATALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL
GL*
```

Transformación en la cepa GS115 y detección de alta copia

Los plásmidos de expresión se linealizaron con Mss I. La cepa GS115 se transformó mediante electroporación con placa RD. Una vez que aparecieron los clones en la placa, se lavaron las clonas con agua esterilizada y se colocaron en una placa YPD+G418 (1000 µg/ml). Las clonas de *Pichia* recombinantes se identificaron mediante PCR. Los iniciadores (primers) de PCR fueron los siguientes:

5'AOX: 5'gactggttccaattgacaagc 3'

3'AOX: 5'gcaaatggcattctgacatcc 3'

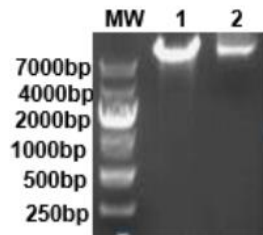


Figura 16. Plásmidos linealizados. Tinción Goldview.

MW. DL10000 1. Plásmido pPIC9K de albúmina - 2. Plásmido pPIC9K de albúmina linealizado

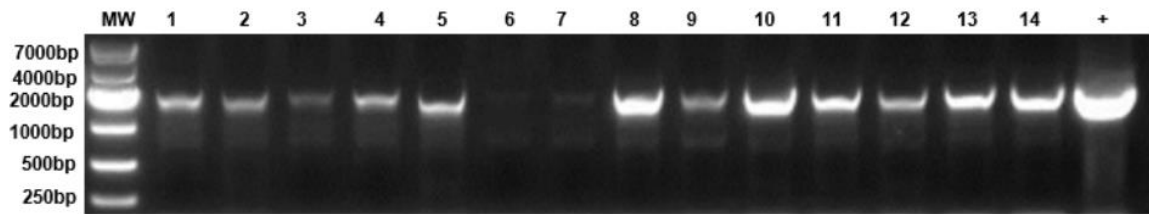


Figure 2. PCR analysis for positive clones in *P.pastoris*. Goldview staining.

Figura 17. Análisis PCR para clonas positivas en *P. pastoris*. Tinción Goldview

Prueba de expresión

Se realizó una prueba usando 2 clonas positivas. Las condiciones de expresión se enlistan a continuación:

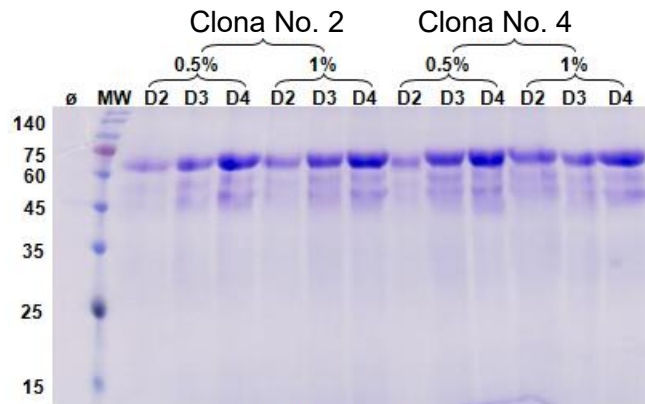


Figura 18. Prueba de expresión con el medio de cultivo.

SDS-PAGE reductor con tinción de azul de Coomassie. Dn. Tiempo de inducción. ø. Control negativo

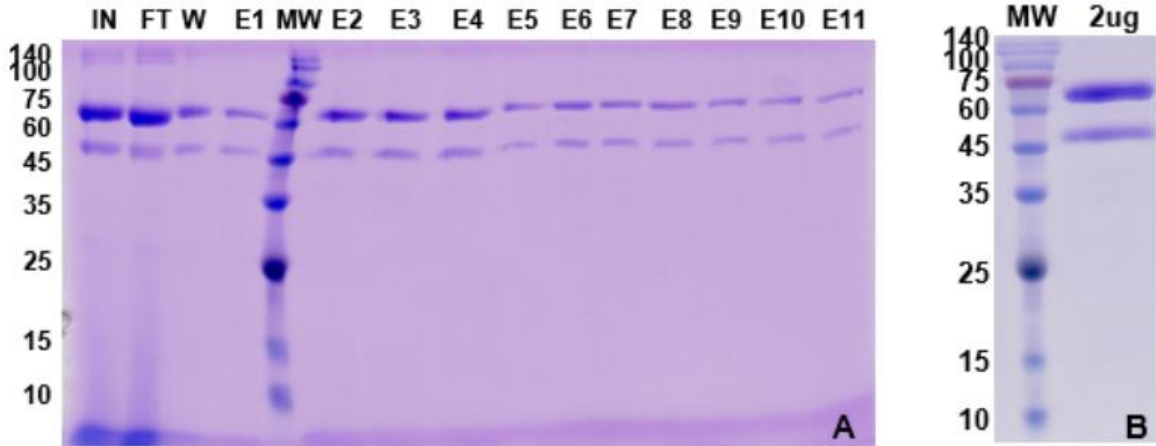


Figura 19. Purificación por afinidad (Resina de Sepharosa Azul CL-6B). SDS-PAGE con tinción de azul de Coomassie. **MW.** Marcador de peso molecular. **IN.** Entrada. **FT.** “Flow through”. **W.** Fracciones de lavado **En.** Fracciones eluidas. **A.** Perfiles de purificación. **B.** Muestra final después de la cromatografía (2 μ g por carril).

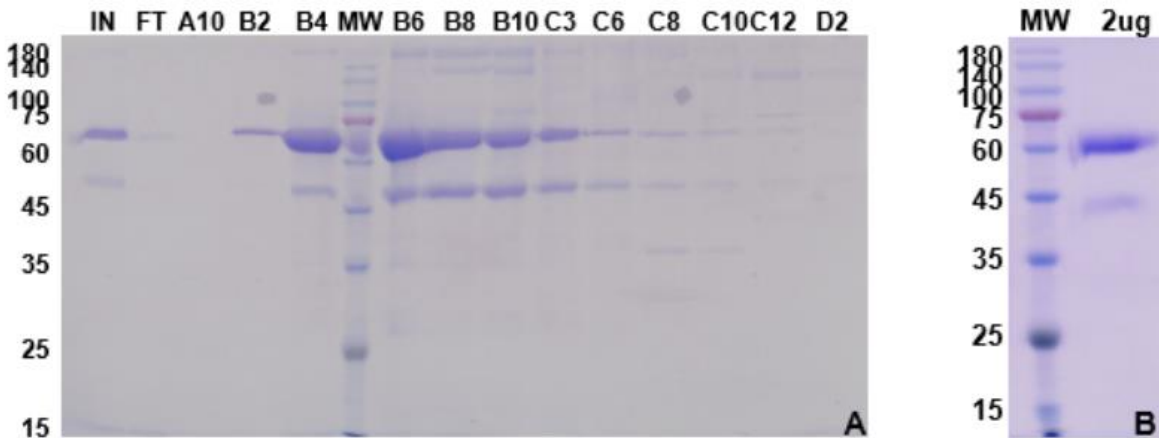
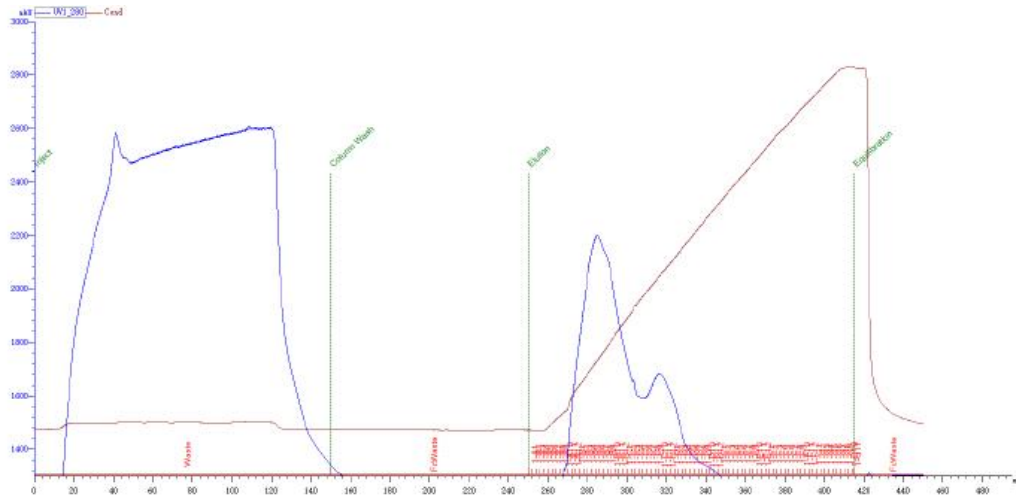


Figura 20. Purificación por intercambio iónico (Resina Q-Sepharosa). SDS-PAGE con tinción de azul de Coomassie **MW.** Marcador de peso molecular. **IN.** Entrada. **FT.** “Flow through”. **An-Dn.** Fracciones eluidas. **A.** Perfiles de purificación. **B.** Muestras finales después del cambio de buffer (2 μ g por carril).

5.7.2. Hidrólisis estereoselectiva Cu²⁺-dependiente de TCN con albúmina humana mutante (HSA-E3) por HPLC quiral.

Para medir la hidrólisis estereoselectiva Cu²⁺-dependiente de TCN por la albúmina mutante (HSA-E3) se realizó por la metodología de detección del TCN remanente por cromatografía quiral cuantificando la concentración de TCN residual al final de la reacción. En el ensayo se emplearon otras albúminas de suero de mamíferos: humano, perro, cabra, puerco, oveja, vaca y burro, además de los controles positivos de pavo y pollo. Para esto, se incubaron 200 µg de albúmina de cada una de ellas en presencia de sulfato de cobre pentahidratado (100 o 300 µM) en condiciones fisiológicas (pH=7.4, T=37°C) durante 60 min. La reacción se detuvo con 40 µL de HCl 0.2M y para la extracción orgánica del TCN se añadió 2 mL de heptano grado HPLC. Esta mezcla fue centrifugada a 1000 x g durante 15 min. Veinte µL de fase orgánica fueron inyectados en el sistema de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (Waters 2996) equipado con un detector con arreglo de fotodiodos a 207 nm, un auto muestreador (Waters 717), una fase móvil (heptano) a una velocidad de flujo de 1mL/min y una columna quiral CHIRALCEL OD. La corrida cromatográfica fue de 10 min. Se determinó el área bajo la curva de los cromatogramas con el software Empower con el objetivo de cuantificar la concentración residual de cada isómero⁸⁷. Se inyectó una curva de 5 concentraciones de TCN estándar en las mismas condiciones que las muestras para realizar la conversión de área bajo la curva a concentración residual µM. Como control, las proteínas fueron incubadas con EDTA 5mM.

7. RESULTADOS

7.1 Hidrólisis dependiente de EDTA, calcio y cobre de TCN racémico por suero y albúmina de mamíferos

La Figura 21 muestra los valores de TCP (actividad TCNasa) de EDTA, Ca^{2+} y Cu^{2+} obtenidos de suero de mamíferos humanos y domésticos. Como se muestra en el panel A y B, no hay una hidrólisis significativa de TCN dependiente de EDTA y Ca^{2+} en el suero de todas las especies de mamíferos estudiadas (1-6%). Sin embargo, hay una actividad TCNasa dependiente de Cu^{2+} estadísticamente significativa ($p < 0.05$, ANOVA de una vía) del suero de cabra cuando se incubó con sulfato de cobre 100 μM o 300 μM (hidrólisis del 38-56%, respectivamente) (panel C y D) con respecto a los otros sueros de mamíferos. El suero humano y bovino mostró una actividad TCNasa del 24% y el 11% cuando ambas muestras se incubaron con cobre 100 μM . Sin embargo, estos niveles no fueron significativos (Figura 3C). Los ensayos de hidrólisis enzimática fueron altamente reproducibles (menos del 10% de variabilidad entre triplicados). Con el objetivo de identificar si las albúminas son las cuproproteínas séricas de mamíferos responsables de la hidrólisis de TCN racémica dependiente de Cu^{2+} en sueros de mamíferos, se midió la concentración de proteína de albúmina en 10 μL de cada suero de mamífero con verde de bromocresol usando un kit comercial (SPINREACT), como se describe en la sección de materiales y métodos. La concentración de albúmina se cuantificó en cada uno de los sueros de los siete mamíferos. Los valores de albúmina se encontraron en un rango de 175 a 230 μg en 10 mL de suero. Por esta razón, decidimos incubar 200 μg de albúmina de cada suero de mamífero como en los estudios de hidrólisis de OP anteriores realizados por nuestro grupo de investigación con albúmina de pavo y pollo. La Figura 21 muestra que 5 mM EDTA (a) o 2.5 mM de calcio (B) y cobre (C y D) no activaron la hidrólisis de TCN en las siete albúminas de suero de mamíferos, excepto en la albúmina de suero de cabra que muestra niveles de hidrólisis más altos (~78 vs 38-56%) que su suero respectivo con ambas concentraciones de sulfato de cobre. Resultando estadísticamente significativo ($p < 0.05$, prueba t-Student) con la concentración de sulfato de cobre 100 μM .

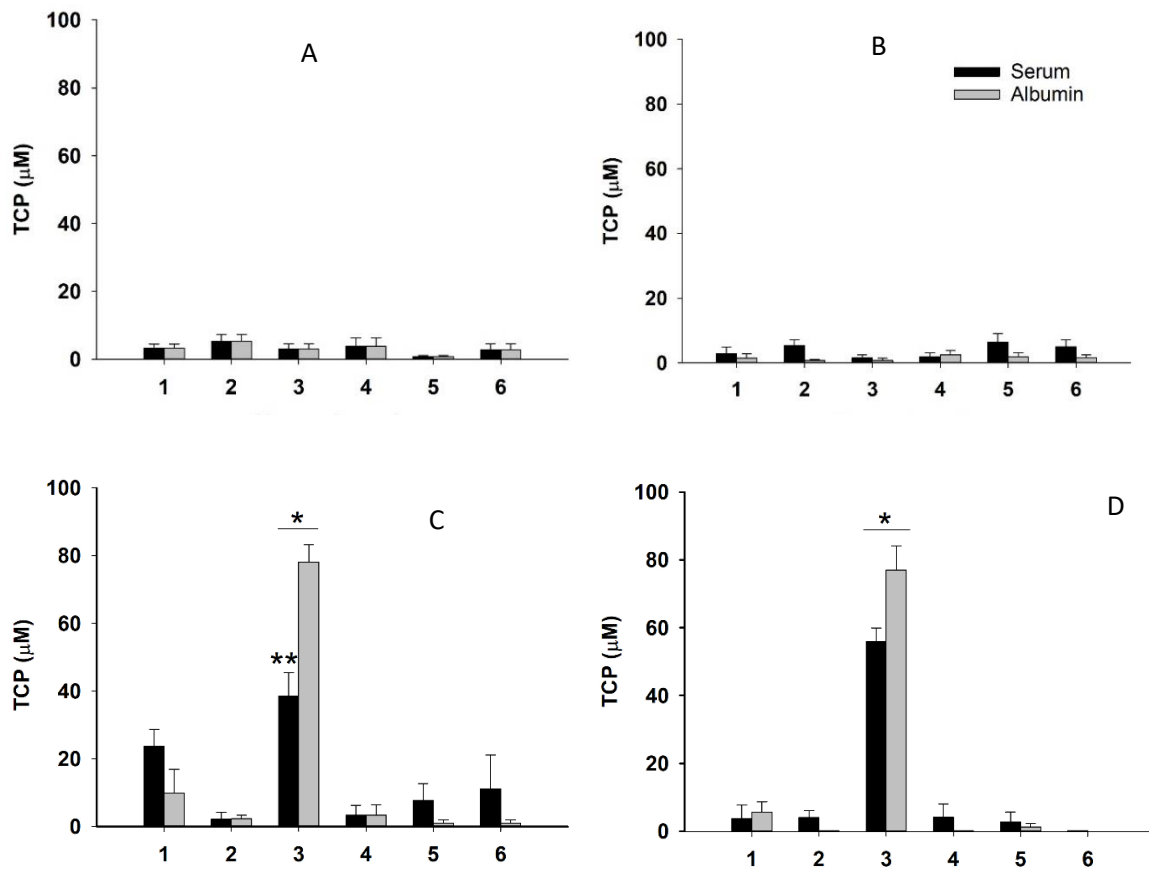


Figura 21. Hidrólisis de TCN racémico por suero y su albúmina de mamíferos domésticos por espectrofotometría de UV-Vis. En esta gráfica se muestra el promedio + el error estándar de 3 experimentos del suero (pool de 3-5 animales por especie) y su albúmina de humano (1), perro (2), cabra (3), cerdo (4), oveja (5) o vaca (6), de la cuantificación del grupo saliente de la reacción (TCP). En negro se muestra la hidrólisis del suero y en gris la hidrólisis de albúmina. Se incubó una alícuota de 10 μL de suero o 200 μg de albúmina con 100 μM de TCN racémico en presencia de A:5mM de EDTA, B: 2.5mM de Ca^{2+} , C: 100 μM de Cu^{2+} y D: 300 μM de Cu^{2+} a pH=7.4, 37°C durante 60 min. Comparación interespecies * $p > 0.05$ ANOVA de dos vías, Tukey. Suero vs albúmina ** $p < 0.05$, t-student

La figura 21 muestra los valores de TCP (actividad TCNasa) de EDTA, Ca^{2+} y Cu^{2+} obtenidos a partir de suero humano y de mamíferos domésticos. Un estudio previo de la cinética de la actividad de la TCNasa en suero de pavo informó que la actividad era lineal con el tiempo de reacción; por lo tanto, 60 min fue el tiempo de reacción elegido para medir la hidrólisis de TCN racémico en este estudio. Como se muestra en el panel a y b, no hay una hidrólisis significativa de TCN dependiente de EDTA y Ca^{2+} en el suero de todas las especies de mamíferos estudiadas (1-6%). Sin embargo, existe una actividad TCNasa dependiente de Cu^{2+} estadísticamente significativa ($p < 0.05$, ANOVA de una vía) del suero

de cabra cuando se incubó con sulfato de cobre 100 μM o 300 μM (38-56% de hidrólisis, respectivamente) (panel c y d) con respecto a los otros sueros de mamíferos. El suero humano y bovino mostró una actividad TCNasa de 24 % y 11 % cuando ambas muestras se incubaron con 100 μM de cobre. Sin embargo, estos niveles no fueron significativos (Figura 2C). Los ensayos de hidrólisis enzimática fueron altamente reproducibles (menos del 10 % de variabilidad entre triplicados), el rango de actividad entre los animales fue entre 7,3, 2,7 y 6,1 veces para la actividad TCNasa dependiente de EDTA, Ca^{2+} y Cu^{2+} , respectivamente. Con el objetivo de identificar si las albúminas son las cuproproteínas séricas de mamíferos responsables de la hidrólisis de estos TCN racémicos dependientes de Cu^{2+} en sueros de mamíferos. La concentración de proteína albúmina se midió en 10 μL de cada suero de mamífero con verde de bromocresol usando un kit comercial (SPINREACT) como se describe en la sección de materiales y métodos. La concentración de albúmina se cuantificó en cada uno de los sueros de los siete mamíferos. Los valores de albúmina se encontraron en un rango de 175 a 230 μg en 10 mL de suero. Por esta razón, decidimos incubar 200 μg de albúmina de cada suero de mamífero como en los estudios previos de hidrólisis de OP realizados por nuestro grupo de investigación con albúmina de pavo y pollo. Como muestra la figura 2, EDTA 5 mM (a) o calcio (b) y cobre 2,5 mM (c y d) no activaron la hidrólisis de TCN en las siete albúminas séricas de mamíferos, excepto en la albúmina sérica de cabra que se muestra significativa ($p < 0.05$, prueba t-Student) niveles de hidrólisis más altos (~78 vs 38-56 %) que su respectivo suero con ambas concentraciones de sulfato de cobre.

Una vez que demostramos que la albúmina y el suero de cabra tienen actividad TCNasa, probamos diferentes concentraciones de cobre biológicamente relevantes entre 1-800 μM tanto de suero como en albúmina. Los resultados de este experimento se presentan en la Figura 22. La máxima hidrólisis de TCN en el suero de cabra la encontramos a una concentración de 300 μM de Cu^{2+} , mientras que el máximo de la hidrólisis de TCN en la albúmina de cabra se encuentra en 100 μM . En el suero de la cabra se encuentran otras proteínas que unen cobre, como la ceruloplasmina, proteínas que podrían no tener actividad TCNasa, pero que reducen la cantidad disponible de Cu^{2+} en el medio. Por esta razón al tener la albúmina pura requiere de una menor concentración de Cu^{2+} para hidrolizar el sustrato.

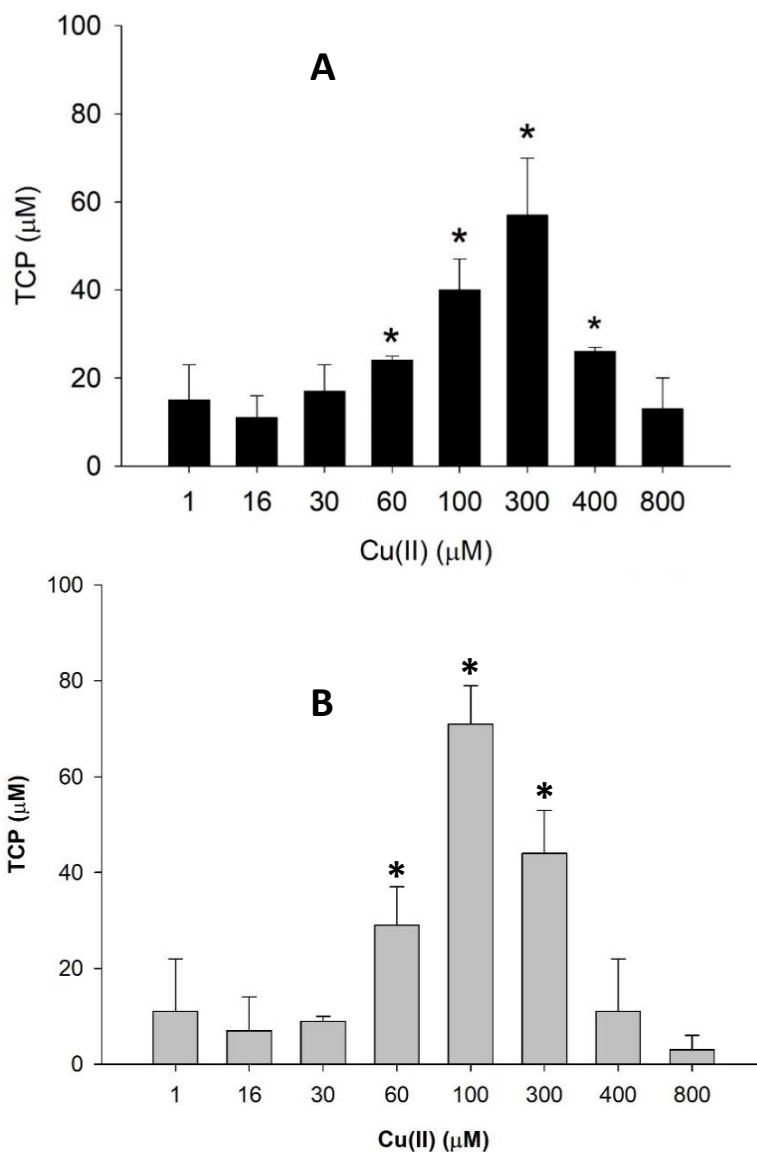


Figura 22. Actividad TCNasa del suero de cabra y su albúmina a diferentes concentraciones de cobre. En esta gráfica se muestra el promedio + el error estándar de 3 experimentos de A: suero (“pool” de 3 cabras) y B: albúmina del suero de cabra. Se incubó una alícuota de 10 μL de suero o 200 μg de albúmina con 100μM de TCN racémico en presencia de diferentes concentraciones de Cu²⁺ a pH=7.4, 37°C durante 60 min. *p>0.05 ANOVA de dos vías, Tukey.

La hidrólisis del suero de cabra fue mayor al 70% en presencia de 100 o 300 μM de Cu²⁺ después de 60 minutos bajo condiciones fisiológicas. La albúmina mostró la misma actividad que la del suero de cabra, por lo que se sugiere que es la proteína responsable de la hidrólisis de TCN observado en el suero de este mamífero. Esta actividad hidrolizante del TCN es similar a la previamente reportada en albúmina de pavo (grupo control). La

hidrólisis de los demás mamíferos analizados fue <10%. La hidrólisis máxima de TCN se presenta a una concentración de Cu^{2+} 100 μM .

Con base en el efecto activador de Cu^{2+} observado en el suero de cabra anterior y sus respectivos resultados de albúmina, se incubaron 10 μL de suero de cabra con una alícuota de TCN 100 μM en presencia de sulfato de cobre en concentraciones que oscilaron entre 1 μM y 800 μM . La medida de hidrólisis de TCN se tomó cuantificando el TCP liberado después de una reacción de 60 minutos. Cu^{2+} tuvo un efecto activador en la hidrólisis de TCN (Figura 3). La hidrólisis de TCN dependiente de Cu^{2+} aumentó significativamente ($p < 0.05$, ANOVA one way) con una mayor concentración de cationes, y su efecto activador se identificó pasando de 60 μM a 400 μM en el suero obteniendo su mayor activación hidrolizante de TCN a 300 μM de este metal divalente y su concentración efectiva 50 (EC50) fue de aproximadamente ~ 80 μM para esta muestra biológica.

7.1. Hidrólisis estereoselectiva Cu^{2+} dependiente de TCN por albúmina de suero de cabra

Para identificar si la hidrólisis dependiente de Cu^{2+} de TCN por albúmina de suero de cabra es estereoselectiva y si es una propiedad catalítica específica de esta proteína se seleccionaron 200 μg de albúmina del suero de humano y cabra. También se seleccionó albúmina de suero de pavo como grupo de control positivo (Figura 23). Se incubaron con una alícuota de TCN de mezcla racémica de 400 μM y la actividad de TCNasa se cuantificó a través de la concentración residual de cada estereoisómero mediante el método de cromatografía quiral. Los picos cromatográficos corresponden a 1:(+)-TCN y 2:(-)-TCN (Figura 6). La Figura 22 muestra la concentración restante (μM) de cada isómero de TCN (hidrólisis) en albúmina humana y de cabra en presencia de sulfato de cobre 300 μM durante 60 min. Se observó hidrólisis significativa dependiente de Cu^{2+} ($p < 0.05$, ANOVA unidireccional) de ambos enantiómeros (40%) en albúmina de cabra (Grupo 2) con respecto al grupo control de mezcla racémica TCN sin cobre y sin proteína (C1) o grupo experimental de albúmina de suero humano con ambos reactivos (Grupo 1). Este efecto activador del cobre en la albúmina de suero de cabra es significativamente estereoselectivo de (+)-TCN ($p < 0.05$, t-Student) ya que su valor restante fue menor (109 ± 0.6 μM) que su correspondiente enantiómero (-)-TCN (134 ± 0.9 μM). Esta hidrólisis estereoespecífica dependiente de Cu^{2+} del isómero (+)-TCN es menor y se revierte a la actividad enzimática estereoselectiva obtenida con albúmina del suero de pavo (Grupo C2), debido a que esta

proteína de suero de ave (grupo de control positivo) mostró niveles más altos de hidrólisis de TCN (56%) y una estereoselectividad significativa ($p < 0.05$, t-Student) de (-)-TCN.

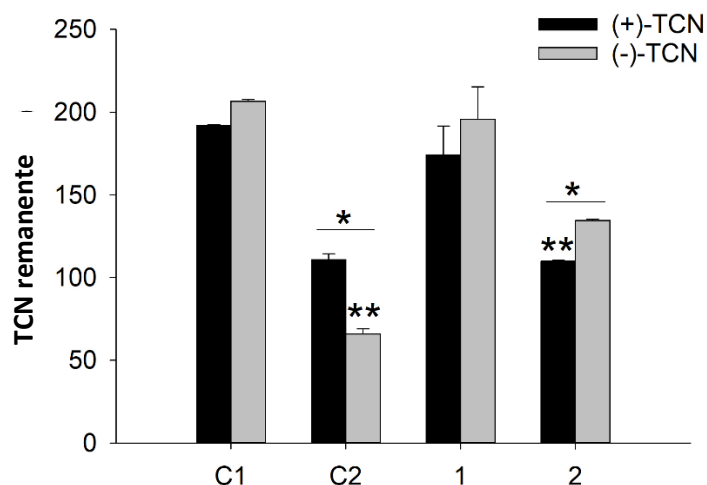


Figura 23. TCN remanente de las reacciones de hidrólisis de albúmina del suero de mamíferos.

En esta gráfica se muestra el promedio más el error estándar de dos experimentos diferentes de la albúmina de pavo (C2), humano (1) y cabra (2) y un control de TCN sin cobre (C1). Se incubó una alícuota de 200 μg de albúmina con 400 μM de TCN racémico en presencia de diferentes concentraciones de Cu^{2+} a $\text{pH}=7.4$, 37°C durante 60 min. * $p > 0.05$ ANOVA de dos vías, Tukey. Suero vs albúmina ** $p < 0.05$, t-student.

La Figura 23 muestra el área de los dos picos (enantiómeros TCN) que son iguales al control de TCN estándar, que es el grupo control (C1) y la albúmina de suero humano (Grupo 1). Mientras que el área y la altura de ambos enantiómeros de TCN (Pico 1 y 2) disminuyen diferencialmente en las albúminas de cabra y pavo. El pico 1 corresponde al isómero (+)-TCN y el pico 2 corresponde al isómero (-)-TCN.

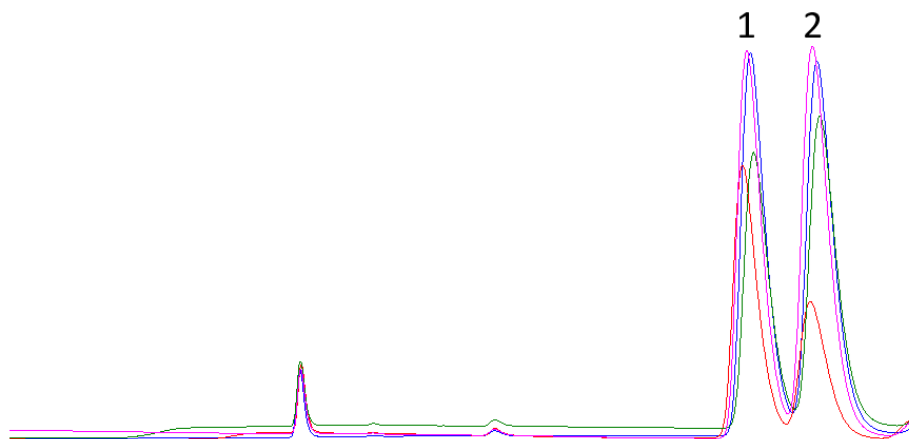


Figura 24. Cromatogramas de TCN residual de las reacciones de hidrólisis con albúminas de mamífero a $\text{pH} = 7.4$ y 37°C durante 60 min. Comparación de hidrólisis de TCN remanente entre

albúmina del suero de humano (rosa), pavo (rojo) y cabra (verde) y un control de TCN sin cobre (azul). La concentración de Cu^{2+} utilizada fue de 300 μM .

Con estos resultados podemos sugerir que la albúmina es la proteína responsable de la hidrólisis estereoselectiva Cu^{2+} -dependiente en el suero de cabra. Este estudio también demuestra que la proteína responsable de esta actividad TCNasa estereoselectiva dependiente de Cu^{2+} en suero de cabra es la proteína de albúmina como se ha demostrado para el suero de pavo²⁴ utilizando las mismas concentraciones de cobre (300 μM). Con la diferencia de que el isómero (+)-TCN se hidroliza más rápido que su correspondiente (-)-TCN, que es el enantiómero con menor capacidad tóxica sobre colinesterasas⁵. La hidrólisis estereoselectiva es opuesta a la hidrólisis dependiente de Cu^{2+} de este insecticida quiral por albúmina de suero de pavo²⁷.

7.2. Purificación

Para medir la actividad de la albúmina utilizamos un ensayo colorimétrico estándar (verde de bromocresol) de manera cualitativa para identificar las fracciones que contenían albúmina obteniendo los resultados que se muestran en la Figura 7. En la primera etapa de purificación, la fracción que contenía más albúmina fue la del pellet (pozo A2, Figura 7). La albúmina debería quedar soluble dado que el pH en el que precipitamos era de 5 y su punto isoeléctrico es 4.1, pero en los pozos del sobrenadante (pozo A11, Figura 7) casi no mostraron la presencia de albúmina. Después de dializar la proteína se concentraron las dos fracciones y se realizó nuevamente la prueba de verde de bromocresol (pozos A6 y B11, Figura 7). Confirmando que en el pellet se encontraba la mayor concentración de albúmina, se pasó la fracción 0 (pellet), por la columna de IEX. Las filas B a E de la figura 25 corresponden a la segunda etapa de purificación. Juntamos las fracciones en donde se detectó la presencia de albúmina de la siguiente manera: B1 y B2 (flow-through) en la muestra 1, las fracciones 9,10 y 11 en la muestra 2; 16, 17 y 18 en la muestra 3 y la 19 y 20 en la muestra 4. Concentramos cada muestra y las lavamos para quitarles la sal. Después determinamos la cantidad de proteínas según los métodos de Spireact para albúmina (verde de bromocresol) y proteínas totales (Biuret), los resultados obtenidos son los que se muestran encuentran en la Tabla 8.

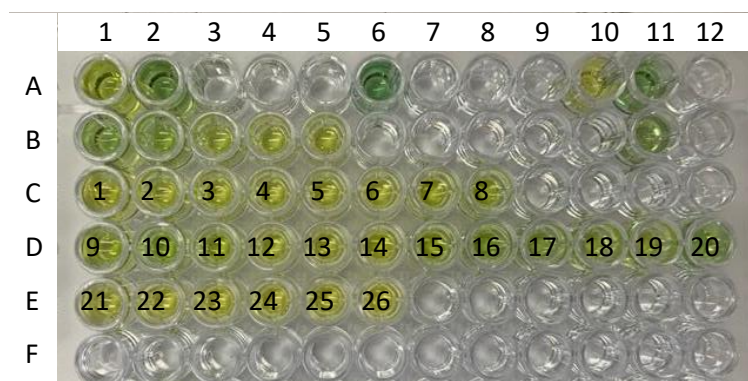


Figura 25. Prueba cualitativa para determinar las fracciones que contenían albúmina en el proceso de purificación. en cada pozo colocamos 200 μ L de solución estándar de verde de bromocresol y 20 μ L de las siguientes muestras: A1-control de verde de bromocresol; A2-pellet después de dializar; A6-pellet concentrado, muestra que se pasó por la columna; A10-sobrenadante; A11 y B11- sobrenadante concentrado; B1-5-flowthrough y lavado; fracciones eluidas con sal: 1-5 50mM; 6-9 100mM; 10-15 200mM; 16-26 1M más el volumen de la columna $V=30$ mL (aprox. 5 fracciones). Las fracciones verdes indican la presencia de albúmina en la muestra, entre más intenso sea el color, se encuentra una mayor concentración.

Tabla 8. Determinación de la cantidad de proteínas y actividad

Fracción	V (mL)	Albúmina (GSA)		Proteínas totales (pt)		GSA/pt %	Actividad específica (U/mg)
		mg	C (mg/mL)	mg	C (mg/mL)		
Suero (GS)	2	147	74	284	142	52	0.003
sn	4	44	11	99	25	45	0.007
0	5	29	6	156	31	19	0.007
1	2.5	12	5	44	18	26	0.004
2	1.5	5	3	17	11	27	0.004
3	5	6	1	67	13	9	0.007
4	1.5	ND	ND	13	8	ND	ND

En la Tabla 8 vemos los resultados cuantificables de nuestro proceso de purificación de albúmina de cabra. La cantidad de albúmina y proteínas totales se determinó con un método colorimétrico en el que pudo interferir el color rojo de la muestra inicial y de la fracción sn. Sin embargo, las fracciones 0-4 que corresponden a la segunda etapa de purificación no presentaron color. La concentración de albúmina en la muestra 4 estuvo por debajo del límite de detección. El cociente GSA/pt es un indicador de la pureza de la albúmina en la muestra, el del suero debe estar alrededor del 60%. No vimos que mejorara en ninguna de las fracciones. La actividad específica se calculó usando la concentración de albúmina en la muestra. Las 3 fracciones que tienen una mayor actividad específica fueron sn, 0 y 3,

más del doble de la actividad específica en el suero. La fracción 3 tiene el menor índice GSA/pt y sin embargo fue la de mayor actividad en la segunda etapa de purificación. En la tabla 9 observamos el rendimiento de cada fracción y etapa de purificación.

Tabla 9. Rendimiento de las etapas de purificación:

Fracción	Albúmina (%GSA)	Proteínas totales (pt) (%)
sn	30	35
0	20	55
Etapas 1	50	90
1	42	28
2	17	11
3	21	43
4	ND	8
Etapas 2	79	90
Total	45	85

El rendimiento de la primera etapa fue del 50% con respecto a la albúmina y del 90% respecto a las proteínas totales. Una pérdida del 50% de la albúmina en la muestra representa alrededor del 25% de las proteínas totales, que correspondería a un rendimiento en proteínas totales de 75%, no del 90%. El rendimiento de la segunda etapa de purificación, con respecto a la primera, estuvo alrededor del 80% para la albúmina y del 90% para las proteínas totales. La albúmina en la fracción 0 fue de 29mg, y se perdieron 6 mg; por otro lado, la cantidad de proteínas totales era de 156 mg, con una pérdida de 16mg incluyendo a la albúmina. El rendimiento total de la albúmina fue de 45%, resultando en una pérdida de 81 mg de albúmina. El rendimiento de las proteínas totales es del 85% que equivale a una pérdida de 21 mg de proteínas. De acuerdo con esto, se está perdiendo más albúmina que proteínas en la muestra.

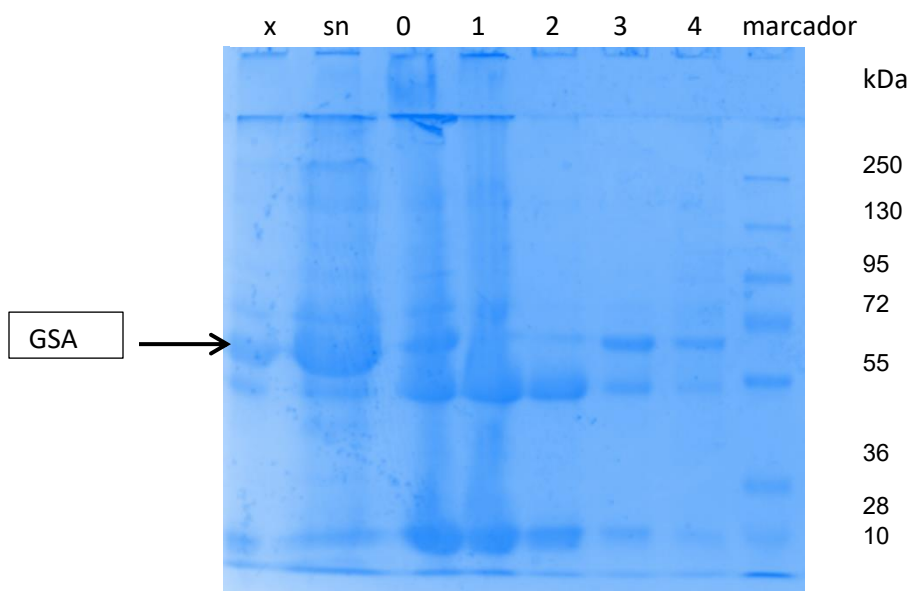


Figura 26. Gel de acrilamida de las fracciones de purificación de albúmina del suero de cabra (GSA). El peso de GSA es 66 kDa. Las muestras después de la primera etapa de purificación (precipitación con sulfato de amonio) están en los carriles: x, sn- sobrenadante- y 0 -pellet-, las muestras de la segunda etapa de purificación (cromatografía IEX) se encuentran en los carriles: 1- fracción que no se unió a la columna- 2, 3 y 4- fracciones eluidas con 50, 200 y 1000 mM de NaCl respectivamente-. Se colocaron en el gel 20 μ L de cada muestra. NOTA, no guardé una muestra de suero inicial para correr el gel.

El primer carril, denominado x, no contiene muestra; sin embargo, al cargar el carril sn una parte de la muestra se pasó a x. Como la muestra sn estaba muy concentrada se aprecia mejor en el carril x. En el gel (Figura 26) observamos que la mayor concentración de albúmina está en el sobrenadante (sn), contrario a los resultados de la cuantificación con verde de bromocresol. En el carril 1 observamos las proteínas que no se unieron a la columna, en el gel no se ve la banda de 66 kDa, pero en la cuantificación de proteínas, esta es la fracción con mayor concentración de albúmina en la segunda etapa de purificación. En el carril 3 se encuentra la fracción que eluyó a una concentración de 200 mM de NaCl, y es donde se aprecia mejor la banda de 66 kDa. Esta fracción tiene la mayor actividad específica de la segunda etapa de purificación. A continuación, se presentan los resultados de actividad por fracción.

7.3.1. Actividad TCNasa de la albúmina del suero de cabra (GSA):

La cantidad de proteína de cada fracción colocada para el ensayo de actividad fue la equivalente a 200 μ g de albúmina, según el ensayo de verde de bromocresol. En la Figura 27 observamos la concentración del producto (triclorofenol, TCP) de la reacción de hidrólisis de tricloronato (TCN) con albúmina del suero de cabra (GSA).

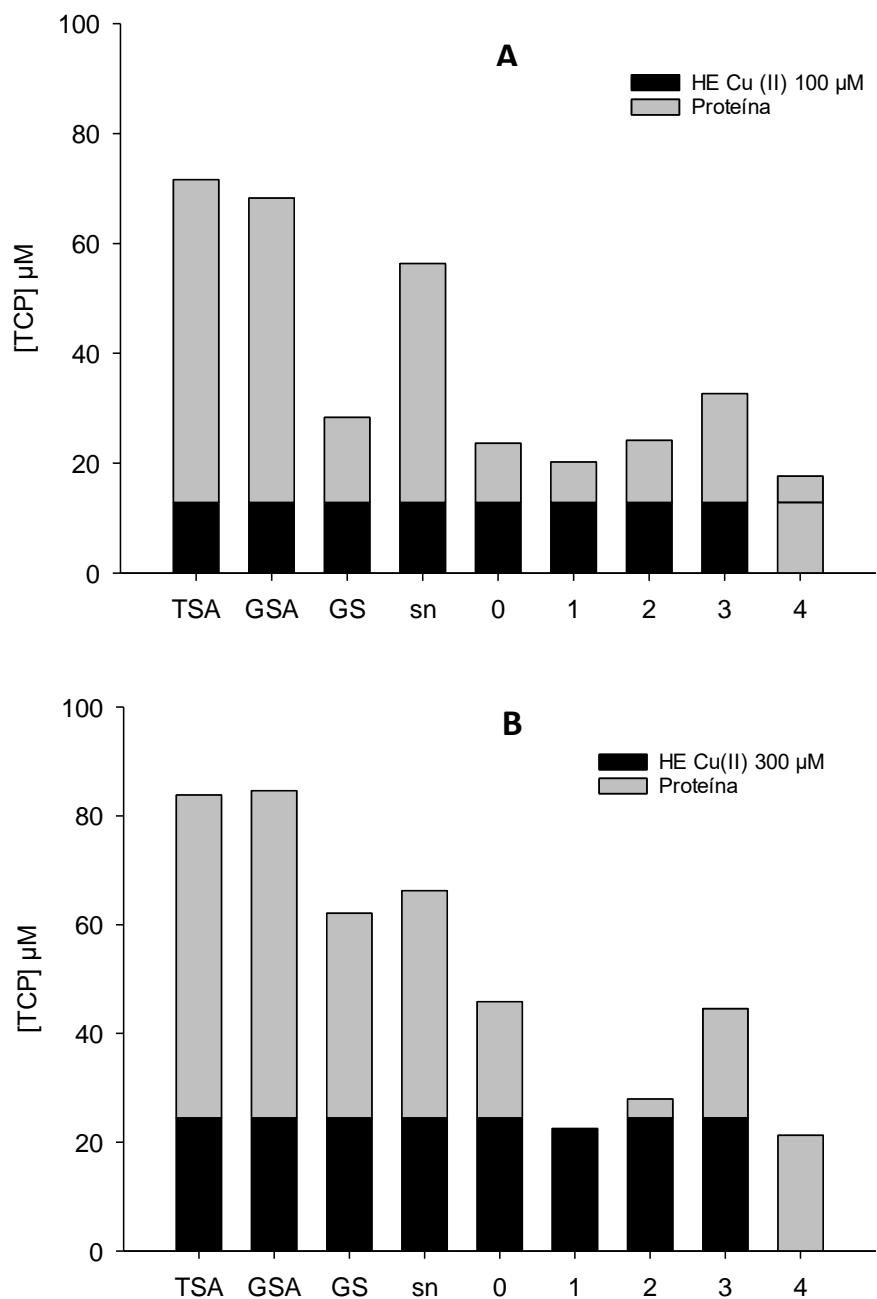


Figura 27. Concentración final de triclorofenol (TCP) proveniente de la hidrólisis de tricloronato (TCN) con GSA después de 60 minutos de reacción. La concentración inicial de sustrato es 100 µM y la de Cu²⁺ es 100 µM en el panel A y 300 µM en el panel B. Las fracciones son: TSA y GSA: albúminas comerciales del suero de pavo y cabra (Controles). GS: suero de cabra inicial, sn y 0 fracciones de la primera etapa de purificación. 1,2,3 y 4: fracciones de la segunda etapa de purificación. En negro la hidrólisis equivalente a la espontánea (HE) con Cu²⁺, sin proteína. En gris la hidrólisis relacionada a la cuproproteína del suero de cabra. Unión de Cu²⁺ a la albúmina del suero de cabra (GSA)

El control TSA resultó como esperábamos con alrededor de 70% de conversión, restando la hidrólisis espontánea, lo que valida nuestro experimento. La fracción en la que vemos la mayor conversión de sustrato es sn, la proveniente del sobrenadante de la precipitación. Como vimos en el gel también es la fracción que tiene la mayor cantidad de albúmina (Figura X). La hidrólisis del control GSA, de nuestra albúmina comercial de cabra es similar a la hidrólisis presentada por el suero y la fracción sn. La fracción 0 también hidroliza al sustrato, pero en menor medida que sn y como vemos en el gel, esta fracción tiene una mayor concentración de proteínas que no son de nuestro interés. De la segunda etapa de purificación (cromatografía IEX), la fracción que presenta la mayor conversión de sustrato es la 3, la fracción eluida con NaCl 200 μM . La conversión de sustrato en esta fracción es equivalente a la de 0. Las fracciones 1,2 y 4 tienen una mayor concentración de proteínas que no son de nuestro interés y la conversión de sustrato que presentan no es mayor a la de la hidrólisis espontánea. Estos resultados se observan tanto con 100 como con 300 μM de Cu^{2+} . La hidrólisis es la misma en las dos concentraciones en casi todas las fracciones, excepto en Gs y 0. Estas fracciones contienen además de albúmina, otras proteínas. Al agregar una mayor concentración de Cu^{2+} , tenemos más hidrólisis de TCN, lo que sugiere que unen cobre y lo dejan menos disponible para la albúmina. La fracción más pura que obtuvimos (3) en la segunda etapa de purificación presenta la misma hidrólisis con 100 y con 300 μM de Cu^{2+} . La hidrólisis de la fracción sn es la más alta de todas las fracciones en la purificación y no varía mucho entre las dos concentraciones usadas de Cu^{2+} , pero aún está un poco por debajo de la comercial, por lo que podíamos pasarla por la columna de IEX para conseguir una albúmina más pura.

Tabla 10: Hidrólisis de TCN con las albuminas y sueros de pavo y cabra antes y después de filtrar el Cu^{2+} que no se unió a la proteína.

	Absorbancia (UA)		[TCP]saliente (μM)	
	Proteína + Cu	Filtrado	Proteína + Cu	Filtrado
HE	0.336	-	35	-
c TSAc	1.4924	-	161	-
TSA	1.287	0.3529	139	37
c TS	0.8417	-	167	-
TS	1.2858	0.2045	139	20
c GSA	0.6235	-	113	-
GSA	0.467	0.3927	49	41
c GS	0.5042	-	78	-
GS	0.3847	0.2074	40	21

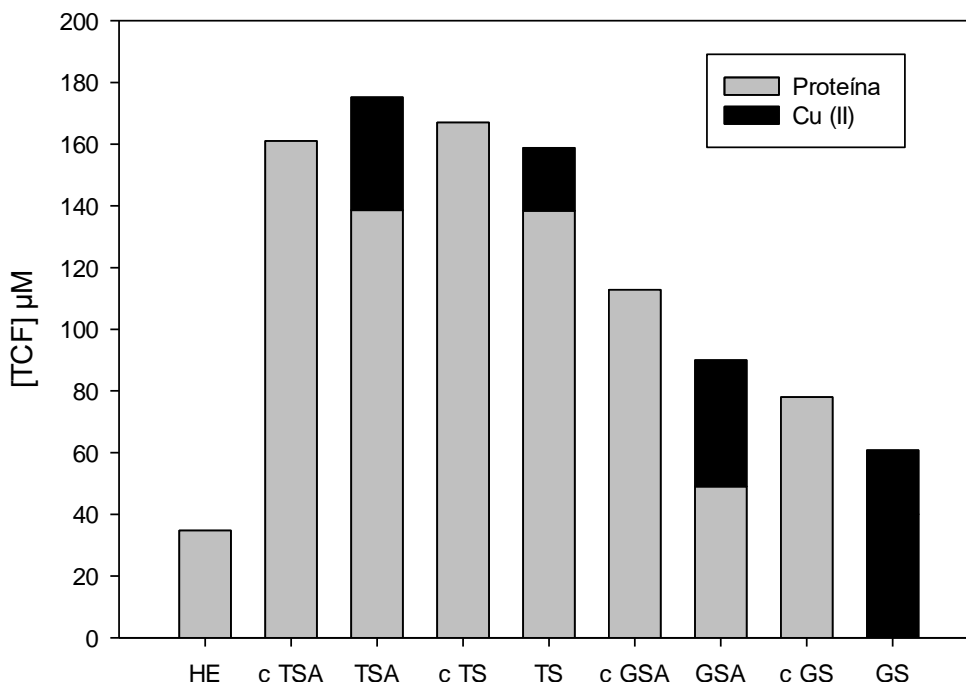


Figura 28. Hidrólisis de TCN con las albuminas y sueros de pavo y cabra antes y después de filtrar el Cu^{2+} que no se unió a la proteína. En esta gráfica se muestra un único experimento de la hidrólisis de TCN con Cu^{2+} (HE), con albúmina sin filtrar (c TSA, pavo; c GSA, cabra), con albúmina filtrada (TSA, pavo; GSA, cabra; gris proteína, negro filtrado) con suero sin filtrar (c TS, pavo; c GS, cabra; gris proteína, negro filtrado) y con suero filtrado (TS, pavo; GS, cabra; gris proteína, negro filtrado). Se incubó una alícuota de 10 μL de suero o el equivalente de su albúmina, 200 μg , con 100 μM de TCN racémico en presencia de 300 μM de Cu^{2+} a $\text{pH}=7.4$, 37°C durante 60 min.

En la figura 28 observamos la hidrólisis de TCN mediante la cuantificación del grupo saliente (TCP), con la albúmina del suero de cabra y pavo. La albúmina se incubó con cobre y se filtró para observar la hidrólisis debida a la albúmina con su cofactor unido y quitar el cobre en exceso. En gris se muestra la hidrólisis de la proteína y en negro la hidrólisis del cobre filtrado que no se unió a la proteína. Los resultados nos dan una concentración de grupo saliente mayor a la inicial del sustrato, esto puede deberse a que el sustrato estaba más concentrado, ya que el stock no fue preparado al momento y se pudo evaporar el solvente en que estaba diluido, pero la concentración colocada en todos los ensayos fue la misma. El suero une más cobre que la albúmina correspondiente, pero la hidrólisis es la misma. La hidrólisis observada del suero y de la albumina de pavo es similar. La unión con cobre es fuerte, ya que al filtrar el exceso de cobre sigue teniendo el mismo grado de hidrólisis y que además el filtrado tiene una menor hidrólisis que la espontánea. El suero une más cobre que la albúmina, tanto en el pavo como en la cabra. La albúmina de cabra une Cu^{2+} , pero esta unión no es tan fuerte como la de pavo, ya que la suma de la hidrólisis del filtrado y de la proteína sin exceso de Cu^{2+} no es igual a la del control sin filtrar, y es lo mismo que

observamos en el suero; sin embargo, la hidrólisis en el suero y en la albúmina de cabra después de quitar el exceso de Cu^{2+} es similar, lo que sugiere que la albúmina es la proteína responsable de la hidrólisis de TCN en el suero de cabra.

7.3. Identificación del centro catalítico por estudios computacionales

7.3.1. Acoplamiento molecular

Tomando como modelo la estructura cristalizada de albúmina del suero cabra (PDB: 5ORI), se introdujo un átomo de cobre en el extremo N-terminal, tomando como base la estructura cristalizada del complejo Cu^{2+} -DAHK (CCDC: 809109) que es el tetrapéptido de los aminoácidos del extremo N-terminal de la albúmina de humano con Cu^{2+} . Esta estructura es complementaria a los experimentos de Predki 1992³⁵, que demostró que las albúminas que tienen His en la posición 3 del extremo N-terminal forma una estructura pentacoordinada con los nitrógenos como ligandos que unen de manera específica Cu^{2+} y Ni^{2+} . Nuestra hipótesis se basa en que al existir un átomo de cobre en el extremo N-terminal, el ligando (tricloronato) se unirá en ese sitio. Para ello hicimos un cálculo de acoplamiento molecular dirigido, de tal forma que el extremo N-terminal entrara completo. Además, hicimos un acoplamiento molecular ciego para buscar algún sitio adicional de unión de nuestro ligando a la proteína. Como la estructura con cobre no está cristalizada, sino que fue un modelo computacional, usamos como control la estructura cristalográfica 5ORI sin el átomo de cobre. Realizamos un acoplamiento molecular con 100 repeticiones en el programa Autodock Vina, calculando a la salida el RMSD y la energía de unión.

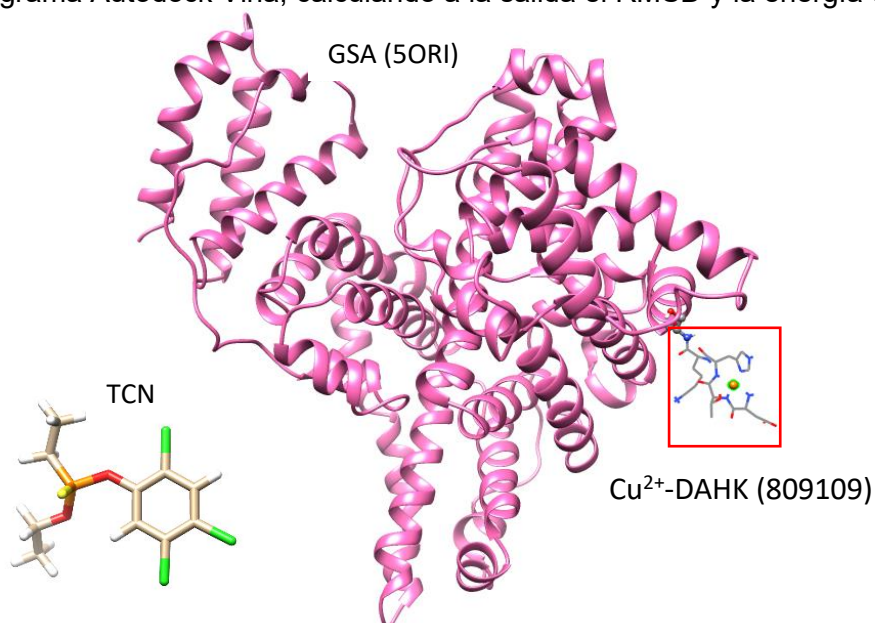


Figura 29. Estructura cristalográfica de GSA (PDB: 5ORI) modificada en el extremo N-terminal para unir un átomo de cobre, según la estructura Cu^{2+} -DAHK (CCDC: 809109) en el software Chimera (UCSF) y el ligando te TCN modelado en el software Avogadro.

Para el cálculo de RMSD se compararon todas las conformaciones que tomó la proteína en los 100 archivos de salida vs la estructura de la primera salida de Vina, ya que no tenemos una estructura cristalográfica de la proteína con el ligando ni con cobre.

Tabla 11. Puntajes de acoplamiento para los diferentes modelos estudiados.

Tipo de acoplamiento		Energía promedio (Kcal/mol)
Sin cobre (5ORI)	Ciego	-6.0
	Dirigido	-3.5
Con cobre (5ORI-Cu ²⁺)	Ciego	-5.8
	Dirigido	-3.8

La energía que vemos en la Tabla 11 mide la afinidad que tiene el ligando con la proteína, de tal modo que a menor energía es mayor la afinidad. La estimación de la energía de afinidad en el acoplamiento ciego (-5.804 kcal/mol) es 1.5 veces menor que en el acoplamiento sitio-dirigido (-3.816 kcal/mol), cuando unimos Cu²⁺, al igual que el control negativo (ciego: -6.015; kcal/mol; sitio dirigido -3,515 kcal/mol) lo que sugiere que la proteína tiene uno o más sitios con mayor afinidad por el ligando que el sitio N-terminal. Para encontrar la estructura predicha más frecuente, calculamos el RMSD e hicimos un gráfico de frecuencia de las salidas de Vina (Figura 30). En la figura 30 podemos ver que, en el acoplamiento ciego, tanto sin cobre como con cobre, existen más de 10 posibles conformaciones. 25 veces fue la mayor frecuencia (de 100 analizadas). Para el acoplamiento dirigido hay dos estructuras posibles, y que la frecuencia de una es mayor en el acoplamiento con cobre. La estructura más repetida de cada tipo de acoplamiento se visualizó con la interfaz Maestro de la suite Schrödinger para saber qué aminoácidos están involucrados en la unión del ligando.

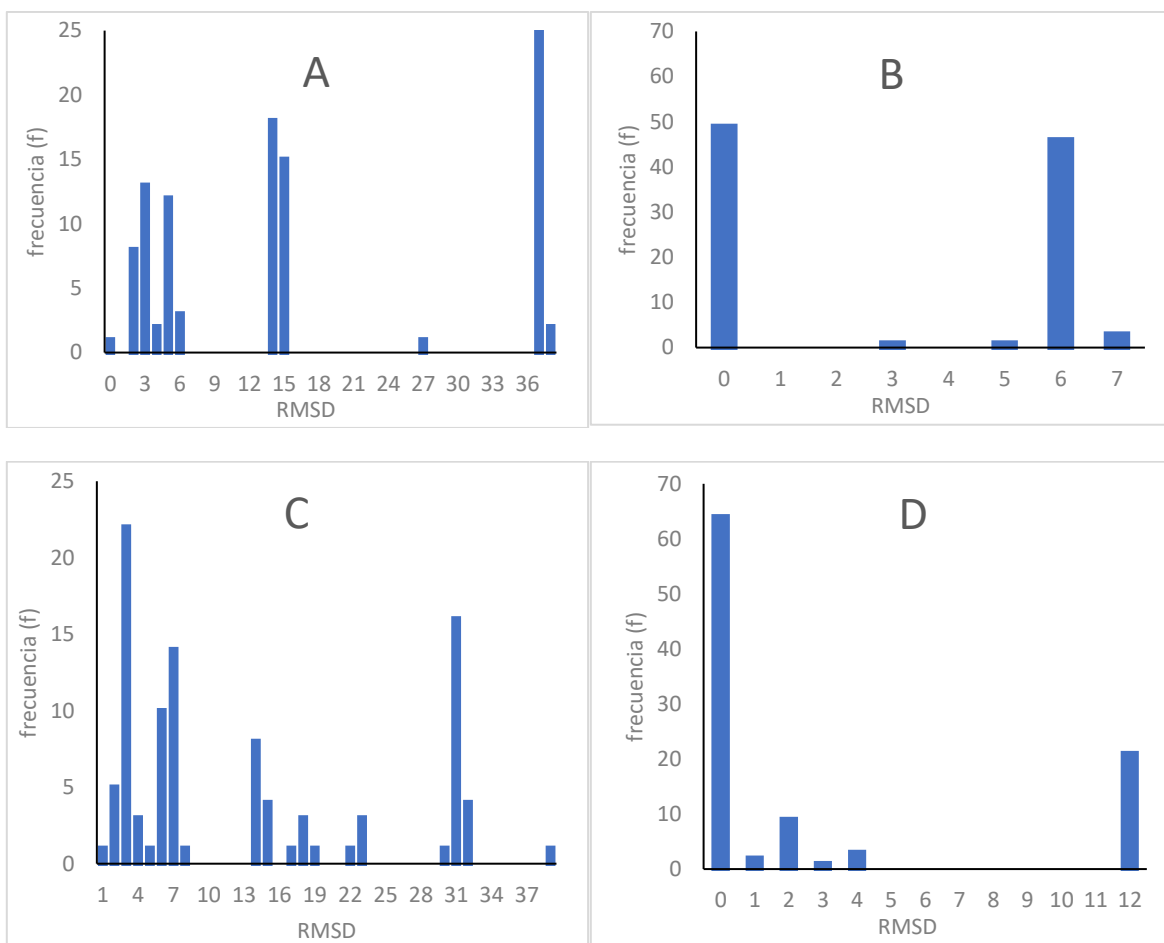


Figura 12. Gráficos de frecuencia de las estructuras predichas en el acoplamiento molecular a la salida de Vina en comparación con la primera salida. En cada panel se ve el acoplamiento A: Ciego sin cobre, B: Dirigido sin cobre, C: Ciego con cobre, D: Dirigido con cobre.

TCN se une al aminoácido Tyr451 en el acoplamiento ciego, tanto en presencia de cobre como en su ausencia (Figura 31 A y C). En el acoplamiento dirigido sin cobre (Figura 31 B), el TCN se une al sitio NTS mediante interacciones polares, pero no existe un enlace entre el ligando y la proteína, además TCN está más expuesto al solvente, lo que justificaría que la energía de unión sea más baja en esta zona que en el resto de la proteína. Cuando el sitio NTS está unido a cobre (Figura 31 D), TCN no se une en este sitio, sino en el mismo sitio de unión que en el acoplamiento ciego.

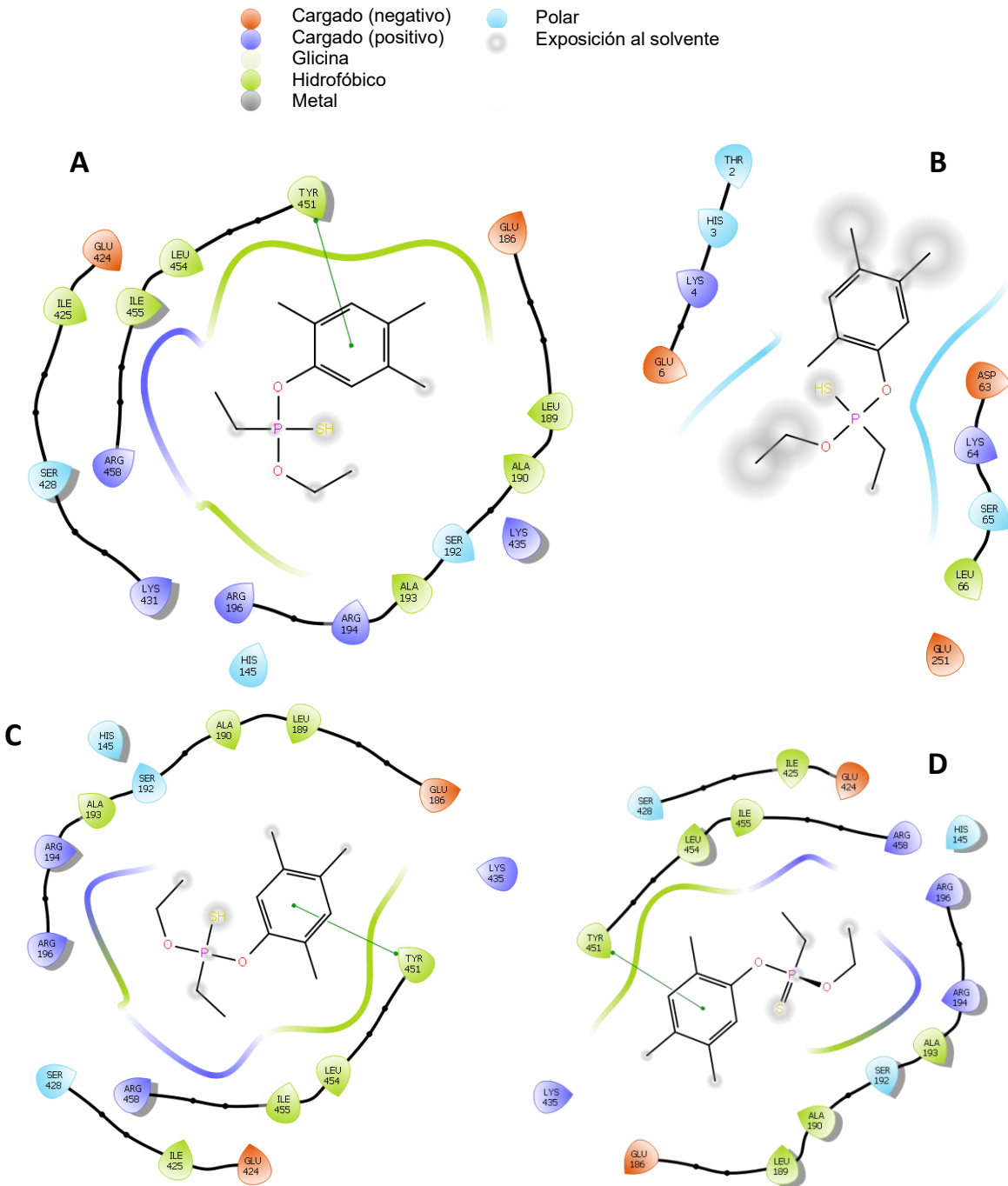


Figura 31. Aminoácidos de interacción entre el ligando y la proteína, con base en la estructura predicha con mayor frecuencia en los acoplamiento sin cobre A: Ciego; B: Dirigido y con cobre C: Ciego y D: Dirigido.

7.3.2. Simulación por dinámica molecular

Para estudiar la unión del átomo de cobre a la proteína hicimos un estudio de dinámica molecular. Tomamos como base la misma estructura cristalográfica de la albúmina de cabra que para los estudios de acoplamiento molecular (PDB: 5ORI) e insertamos un átomo de cobre en el NTS mediante el software de visualización de proteínas Chimera 1.14 (USCF). Para preparar el sistema para la simulación utilizamos la interfaz gráfica online CHARMM-GUI³⁻⁵, donde establecimos condiciones fisiológicas de presión, temperatura y concentración de sales (KCl). Se simuló con el átomo de cobre y los enlaces disulfuro. El campo de fuerza que utiliza es Charmm36M. Una vez generado el input se hizo simulación de 100 ns con GROMACS en la supercomputadora de la UNAM (Miztli). Usamos como control una dinámica de la estructura 5ORI sin cobre en las mismas condiciones. En la Figura 32 podemos observar en naranja la simulación control de 5ORI y vemos que está estable en el tiempo después de 20 ns de simulación, el tiempo que tarda en estabilizarse la dinámica. Al añadir el átomo de cobre (en gris) la simulación es más inestable, la proteína se abre y se cierra a lo largo de la simulación. Para comparar el movimiento de los residuos en el tiempo calculamos el RMSF (Figura 33).

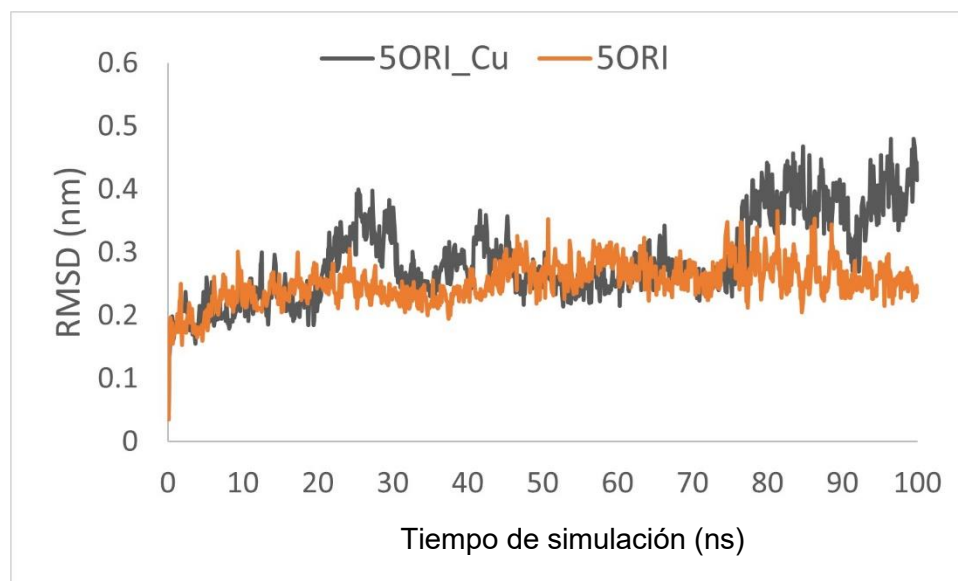


Figura 32. Gráfica del RMSD de los carbonos alfa de las estructuras de salida en los 100 ns de simulación en comparación con la estructura de entrada después de equilibrar el sistema. En naranja el control de 5ORI, en negro la simulación de 5ORI con cobre.

En la Figura 33 observamos que el movimiento de los residuos es similar en las dos dinámicas en NTS, el sitio donde unimos al cobre; sin embargo, hay diferencias en el extremo C-terminal, al unir el átomo de cobre se mueve más esa región. Al visualizar la dinámica en el software VMD 1.9.3 se observó que el cobre no se unió NTS. Los residuos 1-4, que corresponden al NTS, tienen la mayor variación de RMSF en ambas dinámicas, independientemente del átomo de cobre. No hubo diferencia entre la proteína 5ORI con cobre y su control. El átomo de cobre no se une a NTS en ningún momento de la simulación. En conclusión, el átomo de cobre no se unió en esta región (NTS) en esta simulación de dinámica molecular.

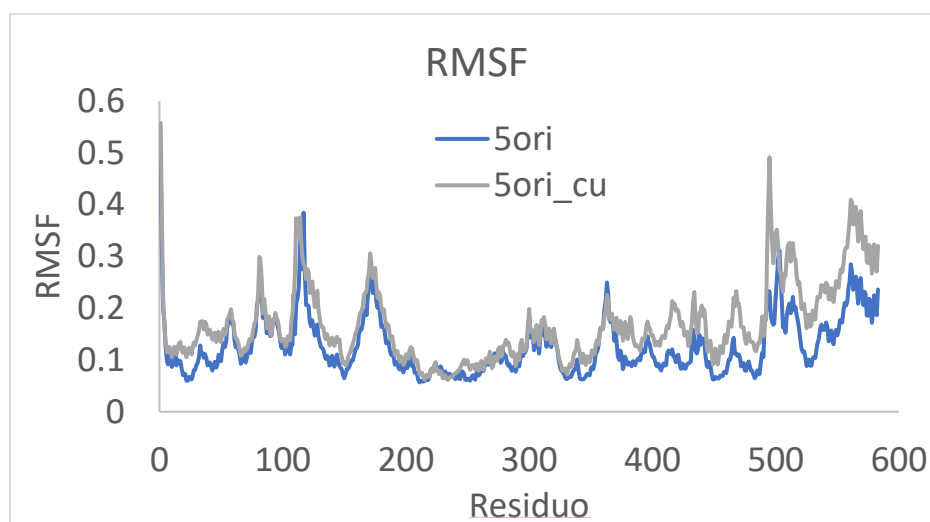


Figura 33. Gráfica de RMSF de los carbonos alfa de los 583 residuos de la proteína en el tiempo de simulación (100 ns). En azul el control 5ORI, en gris la estructura con cobre.

En la bibliografía se encontró una estructura cristalográfica de albúmina humana (PDB: 5YB1) que se une a un profármaco de cobre anticancerígeno (8zr) con un átomo de cobre y un átomo de azufre (Figura 34). El sitio de coordinación de este fármaco es la His146, que coincide con el resultado de His145 en el estudio de acoplamiento ciego. Ninguno de los sitios de unión al ligando corresponde a los sitios de unión al cobre; sin embargo, His145 parece estar involucrado, como se informó en estudios previos, pero no pudimos simular el enlace de coordinación.

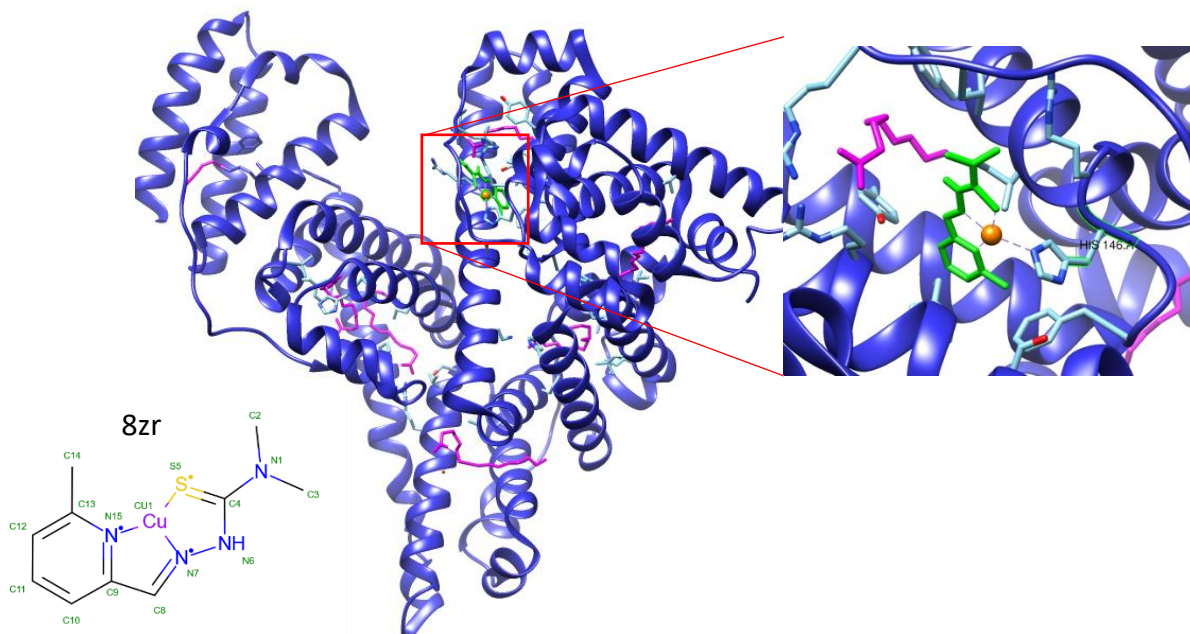


Figura 34: Estructura cristalográfica de HSA (PDB: 5YB1) con ácidos grasos (ácido palmítico, rosa) y como ligando un fármaco anticancerígeno (8zr, verde). Para la simulación limpiamos la estructura quitándole los ácidos palmíticos. El aminoácido de unión es la His146. La estructura química de 8zr se muestra en la figura abajo a la izquierda.

Estos estudios preliminares pueden servir para mejorar a la albúmina como A-esterasa, modificándola para que hidrolice una variedad más amplia de sustratos o que las reacciones sean más eficientes. Para comprobar esta hipótesis, se podría realizar una mutante knock-out sobre la His145. Si se pierde la actividad, indicaría que este aminoácido y su entorno químico son importantes para la hidrólisis de OP. Estos resultados no descartan que el sitio N-terminal pueda ser un sitio alostérico o que participe para darle la conformación necesaria a la proteína.

7.4. Hidrólisis de TCN con albúmina mutante del suero de humano (rHSA)

En la figura 35 observamos un ejemplo de los cromatogramas obtenidos para realizar el análisis cuantitativo de TCN remanente. Los isómeros han sido previamente identificados.

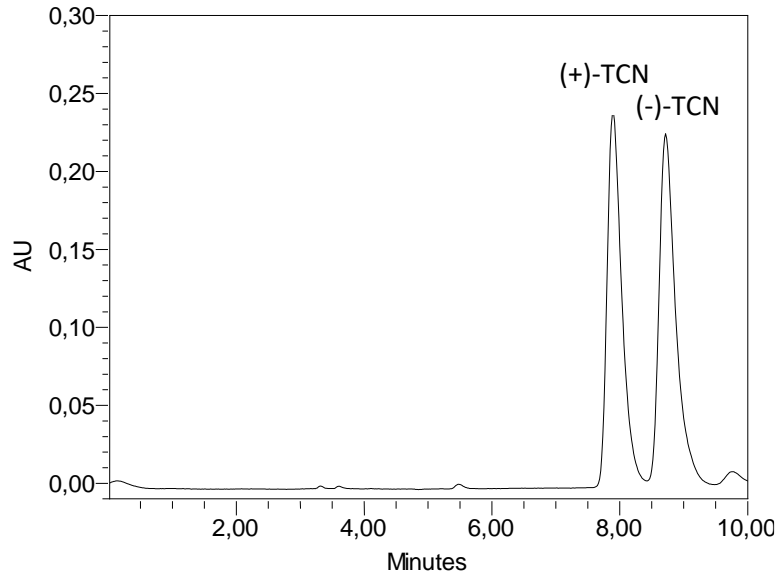


Figura 35 Cromatograma del estándar de TCN 100uM a 207nm. Se observan el isómero (+)-TCN al minuto 8 y el isómero (-)-TCN al minuto 8.7 del tiempo de corrida.

En la figura 36 observamos la curva de calibración que utilizamos para hacer la conversión a concentración. El coeficiente de correlación es cercano a 1, por lo que nuestro modelo es adecuado.

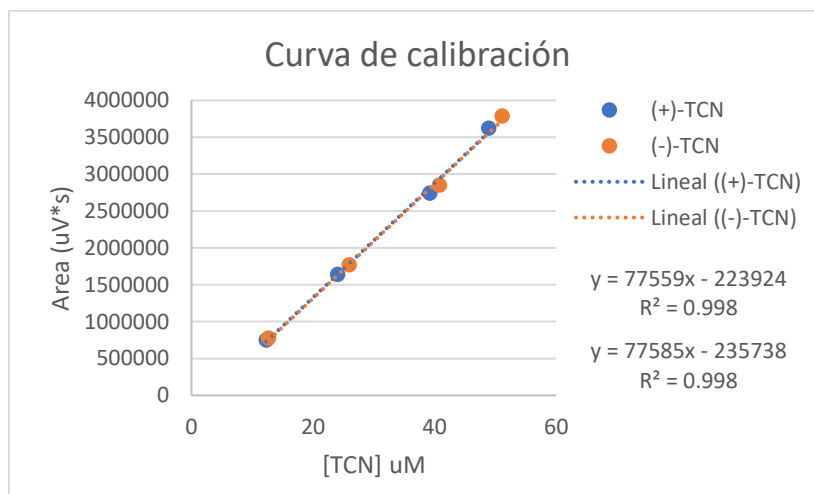


Figura 36. Curva de calibración de TCN por isómero. Se muestra la línea de tendencia lineal, sus respectivas ecuaciones y el coeficiente de correlación lineal.

En la Figura 37 observamos la hidrólisis de rHSA en comparación con la de otros mamíferos. Ninguno presentó hidrólisis, excepto la cabra. Además, la mutante (rHSA) no mejoró su actividad en comparación con la proteína del suero de humano (HSA), como se muestra en la Figura 35. Los controles de pollo y pavo presentaron hidrólisis, por lo que

validamos el experimento. Los controles con EDTA muestra que tampoco existe una actividad EDTA resistente en las albúminas.

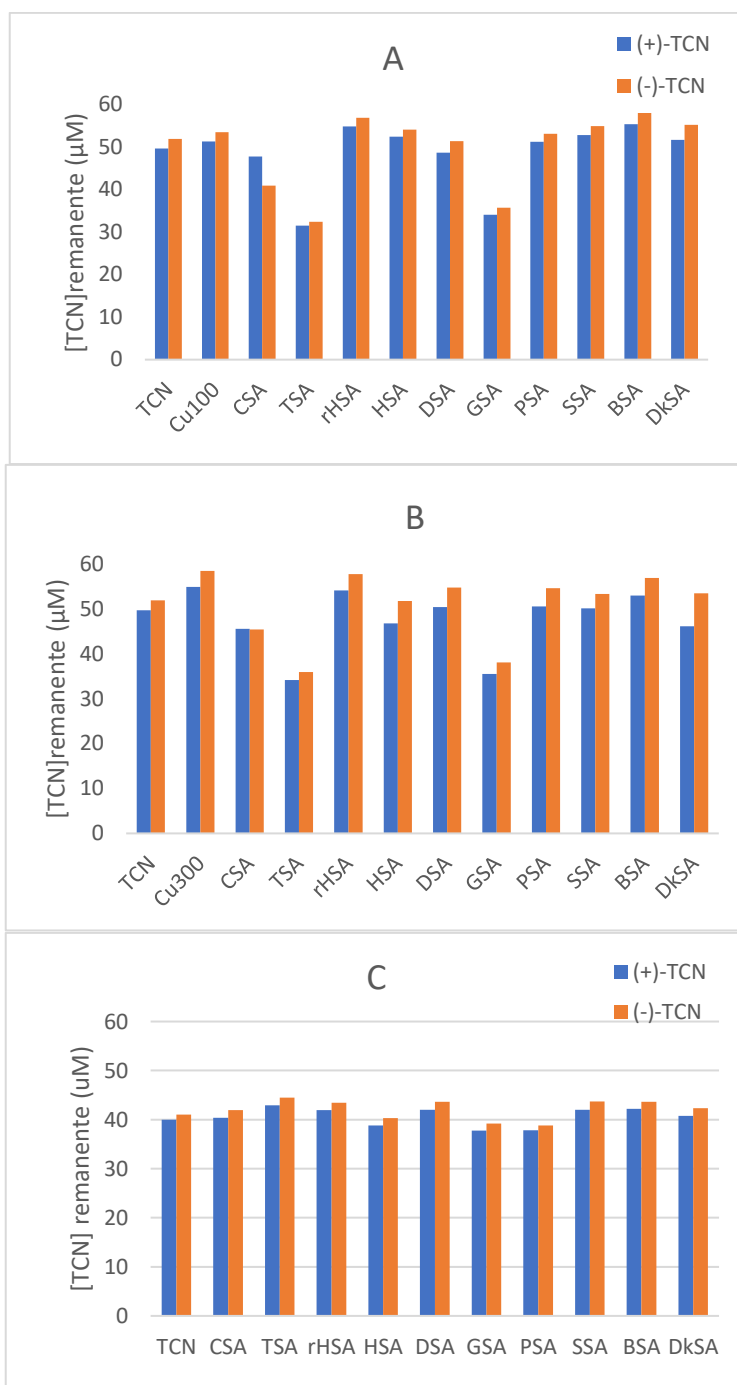


Figura 37. TCN remanente después de 60 minutos de reacción con albúmina del suero de humano mutante (rHSA), humano (HSA), perro (DSA), cabra (GSA), puerco (PSA), oveja (SSA), vaca (BSA) y burro (DkSA) con una concentración de Cu²⁺ de (A) 100 µM y (B) 300 µM y (C) EDTA 5 mM. Los controles positivos son la albúmina del suero de pollo (CSA) y pavo (TSA) y el control de hidrólisis espontánea (Cu100 y Cu300). La [TCN]_{inicial}=100 µM; se observa el punto de la curva de calibración (TCN).

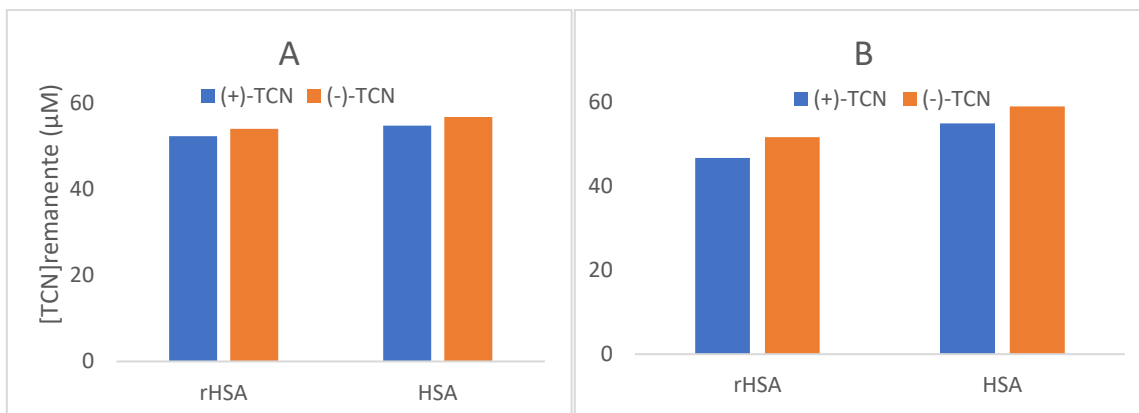


Figura 38. Comparación de la hidrólisis de los isómeros de TCN con la proteína mutante (rHSA) vs la albúmina del suero humano (HSA) en presencia de Cu²⁺ (A) 100 μM y (B) 300 μM. La [TCN]_{inicial}=100μM.

Se realizó otro ensayo con una concentración inicial diferente de [TCN]=80 μM con la albúmina mutante y de humano. En la figura 39 se observa la hidrólisis de TCN con una concentración inicial más baja (80μM) y confirmamos que la albúmina mutante tiene la misma actividad que la albúmina humana a 100μM de Cu²⁺ y a 300 μM disminuye su actividad. Esto sugiere que al insertar el ácido glutámico en la posición 3 de la albúmina de cabra, la proteína pierde su capacidad de unión de Cu²⁺ y así en vez de mejorar su actividad A-esterásica, disminuye.

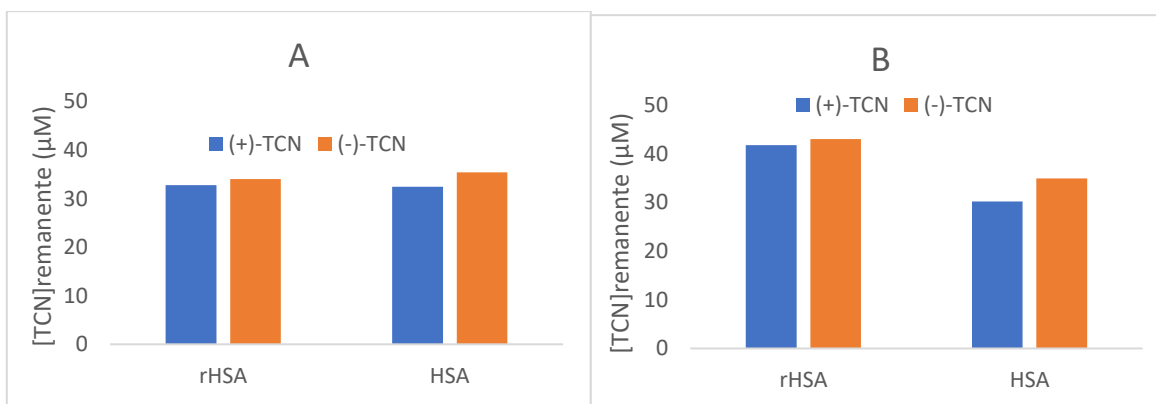


Figura 39. Comparación de la hidrólisis de los isómeros de TCN con la proteína mutante (rHSA) vs la albúmina del suero humano (HSA) en presencia de Cu²⁺ (A) 100 μM y (B) 300 μM. La [TCN]_{inicial}=80μM.

Este resultado, si bien podría sugerir que el centro catalítico no es el sitio amino terminal, aun podría haber muchas razones por las que no observamos una mejora en la actividad A-esterásica de la albúmina mutante; por ejemplo, que no haya sido la mutación más adecuada o que se necesiten mutar también otros aminoácidos. La literatura menciona que el sitio de unión a cobre en la albúmina de humano es la His3. Al agregar el ácido glutámico

hay una competencia entre los aminoácidos donadores de N, desestabilizando el extremo amino terminal en su unión con Cu^{2+} . Esto aunado a los resultados computacionales podrían sugerir que el sitio catalítico A-esterásico de la albúmina sérica se encuentran en otro sitio, pero eso no descarta la participación del sitio amino terminal.

7.5. Alineamiento de las secuencias de albúmina de diferentes especies.

Para verificar si el NTS o la His 145 de la cabra están conservados en las especies con hidrólisis y si tienen alguna diferencia con las especies sin actividad A-esterasa, se realizó un alineamiento de las secuencias de aminoácidos. Las especies de ave seleccionadas fueron pavo y pollo y las de mamífero fueron cabra, borrego y vaca. Se seleccionaron estas especies porque la albúmina de pavo y cabra tienen actividad TCNasa, la de pollo tiene actividad HDCPasa y el borrego y vaca no tienen actividad A-esterasa. Las únicas secuencias de aves que se encontraron fueron las de la proalbúmina, que es la albúmina con un péptido precursor de 26 aminoácidos que se pierde cuando se sintetiza la albúmina, el resto de la proteína es la secuencia de la albúmina, no se encontraron las secuencias de la albúmina sin este precursor, por lo que la alineación se realizó con las secuencias de la proalbúmina de las especies seleccionadas (Figura 40).



Figura 40. Comparación de la secuencia de aminoácidos de las albúminas de mamífero y la de pavo. En el recuadro de arriba se encuentra la secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal, el cual no está conservado.

La alineación se realizó con la interfaz en línea Clustal Omega. Encontramos que el extremo N-terminal no está conservado y que no hay ningún patrón observable en este sitio entre las especies que presentan hidrólisis y las que no. La His145 se encuentra en la mayoría de las especies, excepto en el pavo, pero el aminoácido encontrado en esa función

conserva la misma función que la His 145 de la cabra. Esto sugiere que el sitio catalítico de las albúminas se encuentra en un sitio diferente al extremo N-terminal, sin descartar que NTS esté involucrado de alguna forma en la catálisis de la albúmina, por ejemplo, para que adquiriera la conformación necesaria para unir sustratos.

8. CONCLUSIONES

La albúmina del suero de cabra (GSA) tiene actividad A-esterasa (TCNasa), esta actividad A-esterasa es Cu^{2+} -dependiente y es similar a la de la albúmina de pavo, previamente reportada; además es 7 veces mayor que la del resto de los mamíferos analizados.

La reacción de hidrólisis de TCN por GSA es estereoselectiva a favor del isómero (+)-TCN, el isómero menos tóxico del TCN y además esa estereoselectividad es inversa a la presentada por albúminas de aves.

Se creía que el extremo N-terminal era el sitio catalítico de la proteína, pero la afinidad de unión a la proteína observada en el acoplamiento sugiere que hay otro sitio que puede unir al sustrato y que la mutación en HSA no mejora la actividad A-esterasa de la proteína sugieren que el sitio N-terminal no es el sitio catalítico de la albúmina, sin embargo, con estos resultados por sí solos no se pueden sacar conclusiones. No se descarta por completo porque no se pudo simular el enlace de coordinación con cobre, además podría estar participando en la catálisis para darle estabilidad a la proteína o como un sitio alostérico. Es de interés el estudio del aminoácido His145 como parte del sitio catalítico de la proteína. Estos estudios preliminares pueden servir para mejorar a la albúmina como A-esterasa, modificándola para que hidrolice una variedad más amplia de sustratos o que las reacciones sean más eficientes. Para comprobar esta hipótesis, se podría realizar una mutante knock-out sobre la His145. Si se pierde la actividad, indicaría que este aminoácido y su entorno químico son importantes para la hidrólisis de OP.

9. REFERENCIAS

- (1) Karalliedde, L.; Senanayake, N. Organophosphorus Insecticide Poisoning. *Br. J. Anaesth.* **1989**, *63* (6), 736–750. <https://doi.org/10.1093/bja/63.6.736>.
- (2) Petroianu, G. HISTORY OF ORGANOPHOSPHORUS CHOLINESTERASE INHIBITORS & REACTIVATORS. *Mil. Med. Sci. Lett.* **2015**, *84* (4), 182–185. <https://doi.org/10.31482/mmsl.2015.023>.
- (3) Albert, L. A.; Viveros Ruíz, A. D. *Plaguicidas y Ambiente*; Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas para México A.C.: Xalapa, Veracruz, México, 2019.
- (4) Vilanova, E.; Sogorb, M. A. The Role of Phosphotriesterases in the Detoxication of Organophosphorus Compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* **1999**, *29* (1), 21–57. <https://doi.org/10.1080/10408449991349177>.
- (5) Mangas, I.; Vilanova, E.; Estévez, J.; França, T. C. C. Neurotoxic Effects Associated with Current Uses of Organophosphorus Compounds. *J. Braz. Chem. Soc.* **2016**. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20160084>.
- (6) Obiols, Jordi. (1999). *Plaguicidas organofosforados (I): aspectos generales y toxicocinética*. Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo O.A., M.P. (INSST). https://www.insst.es/documents/94886/327064/ntp_512.pdf/5852f604-3aad-40a3-ac2a-94507be3a1f5.
- (7) Jokanović, M. Biotransformation of Organophosphorus Compounds. *Toxicology* **2001**, *166* (3), 139–160. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00463-2](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00463-2).
- (8) Badii, M. H.; Varela, S. Insecticidas organofosforados: efectos sobre la salud y el ambiente. **2008**, No. 28.
- (9) Garrison, A. W. Probing the Enantioselectivity of Chiral Pesticides. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40* (1), 16–23. <https://doi.org/10.1021/es063022f>.
- (10) Nillos, M. G.; Gan, J.; Schlenk, D. Chirality of Organophosphorus Pesticides: Analysis and Toxicity. *J. Chromatogr. B* **2010**, *878* (17–18), 1277–1284. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.11.022>.
- (11) Li, L.; Zhou, S.; Jin, L.; Zhang, C.; Liu, W. Enantiomeric Separation of Organophosphorus Pesticides by High-Performance Liquid Chromatography, Gas Chromatography and Capillary Electrophoresis and Their Applications to Environmental Fate and Toxicity Assays. *J. Chromatogr. B* **2010**, *878* (17), 1264–1276. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.10.031>.
- (12) Liu, W.; Lin, K.; Gan, J. Separation and Aquatic Toxicity of Enantiomers of the Organophosphorus Insecticide Trichloronate. *Chirality* **2006**, *18* (9), 713–716. <https://doi.org/10.1002/chir.20323>.
- (13) Monroy-Noyola, A.; Sogorb, M. A.; Vilanova, E. Stereospecific Hydrolysis of a Phosphoramidate as a Model to Understand the Role of Biotransformation in the Neurotoxicity of Chiral Organophosphorus Compounds. *Toxicol. Lett.* **2007**, *170* (2), 157–164. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.03.002>.
- (14) Wang, M.; Zhang, L.; Huo, X.; Zhang, Z.; Yuan, Q.; Li, P.; Chen, J.; Zou, Y.; Wu, Z.; Zhang, W. Catalytic Asymmetric Synthesis of the Anti-COVID-19 Drug Remdesivir. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59* (47), 20814–20819. <https://doi.org/10.1002/anie.202011527>.
- (15) Fukuto, T. R. Mechanism of Action of Organophosphorus and Carbamate Insecticides. *Environ. Health Perspect.* **1990**, *87*, 245–254.

- (16) *Intoxicaciones Por Organofosforados, Carbamatos y Organoclorados - Doctora Clara Inés Manrique R.*; 2016. <https://www.youtube.com/watch?v=eVYa00-7c7A> (accessed 2023-10-01).
- (17) *DEFINICIONES PARA LOS FINES DEL CODEX ALIMENTARIUS.* <https://www.fao.org/3/W5975S/w5975s08.htm> (accessed 2023-10-23).
- (18) *NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-232-SSA1-2009, Plaguicidas: que establece los requisitos del envase, embalaje y etiquetado de productos grado técnico y para uso agrícola, forestal, pecuario, jardinería, urbano, industrial y doméstico.* <https://www.dof.gob.mx/normasOficiales/4020/salud/salud.htm> (accessed 2023-10-23).
- (19) Sanitarios, C. F. para la P. contra R. *Los plaguicidas en nuestro hogar.* gob.mx. <http://www.gob.mx/cofepris/documentos/los-plaguicidas-en-nuestro-hogar> (accessed 2023-10-23).
- (19) Fernández A., D. G., Mancipe G., L. C., & Fernández A., D. C. (2010). Intoxicación por organofosforados. *Revista Med*, 18(1), 84–92. <https://doi.org/10.18359/rmed.1295>
- (21) Instituto Nacional de Salud, Grupo de vigilancia y control de factores de riesgo ambiental. (2010) PROTOCOLO DE VIGILANCIA Y CONTROL DE INTOXICACIONES POR PLAGUICIDAS. https://www.minsalud.gov.co/comunicadosPrensa/Documents/INTOXICACION_POR_PLAGUICIDAS.pdf (accessed 2023-10-29).
- (22) *The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and guidelines to classification, 2019 edition.* <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240005662> (accessed 2023-10-28).
- (23) *Toxicidad en salud humana.* <http://www.plaguicidasdecentroamerica.una.ac.cr/index.php/toxicidad-salud-humana> (accessed 2023-10-28).
- (24) *Lista de Plaguicidas Altamente Peligrosos de PAN Internacional Marzo 2021.* RAPAM | La Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas en México. <https://www.rapam.org/critica-a-los-plaguicidas-2/> (accessed 2023-10-30).
- (25) Boedeker, W.; Watts, M.; Clausing, P.; Marquez, E. The Global Distribution of Acute Unintentional Pesticide Poisoning: Estimations Based on a Systematic Review. *BMC Public Health* **2020**, 20 (1), 1875. <https://doi.org/10.1186/s12889-020-09939-0>.
- (26) González, F. B.; Márquez, D. A.; Solís, J. D. A.; Meraz, E. A.; Aguilar, O. A.; Arriaga, J. A. L.; Méndez, R. M.; Rodríguez, I. E. M. Los Plaguicidas Altamente Peligrosos en México.
- (27) *FAOSTAT.* <https://www.fao.org/faostat/en/#data/RP> (accessed 2023-10-24).
- (28) Climático, I. N. de E. y C. *Estudios e Investigaciones 2013 a 2022 en materia de contaminación y salud ambiental.* gob.mx. <http://www.gob.mx/inecc/documentos/investigaciones-2017-2013-en-materia-de-contaminacion-y-salud-ambiental-rev1> (accessed 2023-10-25).
- (29) Lewis, K. A.; Tzilivakis, J.; Warner, D. J.; Green, A. An International Database for Pesticide Risk Assessments and Management. *Hum. Ecol. Risk Assess. Int. J.* **2016**, 22 (4), 1050–1064. <https://doi.org/10.1080/10807039.2015.1133242>.
- (30) *Consulta registros de plaguicidas y nutrientes.* <http://siipris03.cofepris.gob.mx/Resoluciones/Consultas/ConWebRegPlaguicida.asp> (accessed 2023-10-14).
- (31) Hernández González, M. M.; Jiménez Garcés, C.; Jiménez Albarrán, F. R.; Arceo Guzmán, M. E. Caracterización de las intoxicaciones agudas por plaguicidas: perfil

- ocupacional y conductas de uso de agroquímicos en una zona agrícola del Estado de México, México. *Rev. Int. Contam. Ambient.* **2007**, 23 (4), 159–167.
- (32) Salud, S. de. *Boletín Epidemiológico* 33 2013. gob.mx. <http://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/historico-boletin-epidemiologico> (accessed 2023-10-30).
- (33) Laboratorio de Ciencias Ambientales, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD) Coordinación Guaymas; García Hernández, J.; Leyva Morales, J. B.; Centro Nayarita de Innovación y Transferencia de Tecnología, A.C. (CENITT), Cátedras CONACYT-Universidad Autónoma de Nayarit, Secretaría de Investigación y Posgrado; Martínez Rodríguez, I. E.; Laboratorio de Ecotoxicología, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD) Coordinación Mazatlán; Hernández Ochoa, M. I.; Departamento de Toxicología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav); Aldana Madrid, M. L.; Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora; Rojas García, A. E.; Secretaría de Investigación y Posgrado, Universidad Autónoma de Nayarit. Ciudad de la Cultura Amado Nervo, Tepic, Nayarit. México; Betancourt Lozano, M.; Laboratorio de Ecotoxicología, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD) Coordinación Mazatlán; Perez Herrera, N. E.; Unidad Interinstitucional de Investigación Clínica y Epidemiología, Facultad de Medicina Universidad Autónoma de Yucatán; Perera Rios, J. H.; Unidad Interinstitucional de Investigación Clínica y Epidemiología, Facultad de Medicina Universidad Autónoma de Yucatán. ESTADO ACTUAL DE LA INVESTIGACIÓN SOBRE PLAGUICIDAS EN MÉXICO. *Rev. Int. Contam. Ambient.* **2018**, 34 (esp01), 29–60. <https://doi.org/10.20937/RICA.2018.34.esp01.03>.
- (34) ANUARIO_MORTALIDAD_2018.Pdf. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/632600/ANUARIO_MORTALIDAD_2018.pdf (accessed 2023-10-30).
- (35) Doménech, J. Plaguicidas. *Offarm* **2004**, 23 (7), 108–114.
- (36) Aldridge, W. N. Serum Esterases. I. Two Types of Esterase (A and B) Hydrolysing p-Nitrophenyl Acetate, Propionate and Butyrate, and a Method for Their Determination. *Biochem. J.* **1953**, 53 (1), 110–117. <https://doi.org/10.1042/bj0530110>.
- (37) Robb, E. L.; Baker, M. B. Organophosphate Toxicity. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2023.
- (38) Sogorb, M. A.; Vilanova, E.; Carrera, V. Future Applications of Phosphotriesterases in the Prophylaxis and Treatment of Organophosphorus Insecticide and Nerve Agent Poisonings. *Toxicol. Lett.* **2004**, 151 (1), 219–233. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.01.022>.
- (39) Vilanova, E.; Johnson, M. K.; Vicedo, J. L. Interaction of Some Unsubstituted Phosphoramidate Analogs of Methamidophos (O,S-Dimethyl Phosphorothioamidate) with Acetylcholinesterase and Neuropathy Target Esterase of Hen Brain. *Pestic. Biochem. Physiol.* **1987**, 28 (2), 224–238. [https://doi.org/10.1016/0048-3575\(87\)90021-6](https://doi.org/10.1016/0048-3575(87)90021-6).
- (40) Salud, S. de. *Guía de Prevención y Manejo de Intoxicación por Insecticidas*. gob.mx. <http://www.gob.mx/salud/en/documentos/guia-de-prevencion-y-manejo-de-intoxicacion-por-insecticidas> (accessed 2023-10-31).
- (41) Caro-Gamboa, L. J.; Forero-Castro, M.; Dallo-Báez, A. E. Inhibición de la colinesterasa como biomarcador para la vigilancia de población ocupacionalmente expuesta a

- plaguicidas organofosforados. *Cienc. Tecnol. Agropecu.* **2020**, *21* (3), 1–23. https://doi.org/10.21930/rcta.vol21_num3_art:1562.
- (42) Lotti, M.; Moretto, A. Organophosphate-Induced Delayed Polyneuropathy. *Toxicol Rev* **2005**.
- (43) Merwin, S. J.; Obis, T.; Nunez, Y.; Re, D. B. Organophosphate Neurotoxicity to the Voluntary Motor System on the Trail of Environment-Caused Amyotrophic Lateral Sclerosis: The Known, the Misknown, and the Unknown. *Arch. Toxicol.* **2017**, *91* (8), 2939–2952. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1926-1>.
- (44) Johnson, M. K.; Glynn, P. Neuropathy Target Esterase (NTE) and Organophosphorus-Induced Delayed Polyneuropathy (OPIDP): Recent Advances. *Toxicol. Lett.* **1995**, *82–83*, 459–463. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(95\)03495-1](https://doi.org/10.1016/0378-4274(95)03495-1).
- (45) Davies, D. R.; Holland, P.; Rumens, M. J. The Delayed Neurotoxicity of Phosphorodiamidic Fluorides. *Biochem. Pharmacol.* **1966**, *15* (11), 1783–1789. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(66\)90085-2](https://doi.org/10.1016/0006-2952(66)90085-2).
- (46) Marrs, T. C. Organophosphate Poisoning. *Pharmacol. Ther.* **1993**, *58* (1), 51–66. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(93\)90066-m](https://doi.org/10.1016/0163-7258(93)90066-m).
- (47) Adeyinka, A.; Muco, E.; Pierre, L. Organophosphates. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2023.
- (48) Vilanova, E.; Sogorb, M. A. The Role of Phosphotriesterases in the Detoxication of Organophosphorus Compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* **1999**, *29* (1), 21–57. <https://doi.org/10.1080/10408449991349177>.
- (49) Taler-Verčič, A.; Goličnik, M.; Bavec, A. The Structure and Function of Paraoxonase-1 and Its Comparison to Paraoxonase-2 and -3. *Molecules* **2020**, *25* (24), 5980. <https://doi.org/10.3390/molecules25245980>.
- (50) Monroy-Noyola, A.; Almenares-Lopez, D.; Gisbert, E. V. Hydrolysis of Chiral Organophosphorus Compounds by Phosphotriesterases and Mammalian Paraoxonase-1. *Front. Biosci.-Landmark* **2020**, *26* (4), 744–770. <https://doi.org/10.2741/4916>.
- (51) Khersonsky, O.; Tawfik, D. S. Structure–Reactivity Studies of Serum Paraoxonase PON1 Suggest That Its Native Activity Is Lactonase. *Biochemistry* **2005**, *44* (16), 6371–6382. <https://doi.org/10.1021/bi047440d>.
- (52) Albanese, D. C. M.; Gaggero, N. Albumin as a Promiscuous Biocatalyst in Organic Synthesis. *RSC Adv.* **2015**, *5* (14), 10588–10598. <https://doi.org/10.1039/C4RA11206G>.
- (53) Furlong, C. E.; Richter, R. J.; Seidel, S. L.; Costa, L. G.; Motulsky, A. G. Spectrophotometric Assays for the Enzymatic Hydrolysis of the Active Metabolites of Chlorpyrifos and Parathion by Plasma Paraoxonase/Arylesterase. *Anal. Biochem.* **1989**, *180* (2), 242–247. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90424-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90424-7).
- (54) Davies, H. G.; Richter, R. J.; Keifer, M.; Broomfield, C. A.; Sowalla, J.; Furlong, C. E. The Effect of the Human Serum Paraoxonase Polymorphism Is Reversed with Diazoxon, Soman and Sarin. *Nat. Genet.* **1996**, *14* (3), 334–336. <https://doi.org/10.1038/ng1196-334>.
- (55) Brealey, C. J.; Walker, C. H.; Baldwin, B. C. A-Esterase Activities in Relation to the Differential Toxicity of Pirimiphos-Methyl to Birds and Mammals. *Pestic. Sci.* **1980**, *11* (5), 546–554. <https://doi.org/10.1002/ps.2780110512>.
- (56) Costa, L. G.; McDonald, B. E.; Murphy, S. D.; Omenn, G. S.; Richter, R. J.; Motulsky, A. G.; Furlong, C. E. Serum Paraoxonase and Its Influence on Paraoxon and Chlorpyrifos-Oxon Toxicity in Rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1990**, *103* (1), 66–76. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(90\)90263-T](https://doi.org/10.1016/0041-008X(90)90263-T).

- (57) Harel, M.; Aharoni, A.; Gaidukov, L.; Brumshtein, B.; Khersonsky, O.; Megeed, R.; Dvir, H.; Ravelli, R. B. G.; McCarthy, A.; Toker, L.; Silman, I.; Sussman, J. L.; Tawfik, D. S. Structure and Evolution of the Serum Paraoxonase Family of Detoxifying and Anti-Atherosclerotic Enzymes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11* (5), 412–419. <https://doi.org/10.1038/nsmb767>.
- (58) Benning, M. M.; Kuo, J. M.; Raushel, F. M.; Holden, H. M. Three-Dimensional Structure of Phosphotriesterase: An Enzyme Capable of Detoxifying Organophosphate Nerve Agents. *Biochemistry* **1994**, *33* (50), 15001–15007. <https://doi.org/10.1021/bi00254a008>.
- (59) Soares, T. A.; Osman, M. A.; Straatsma, T. P. Molecular Dynamics of Organophosphorous Hydrolases Bound to the Nerve Agent Soman. *J. Chem. Theory Comput.* **2007**, *3* (4), 1569–1579. <https://doi.org/10.1021/ct700024h>.
- (60) Omburo, G. A.; Kuo, J. M.; Mullins, L. S.; Raushel, F. M. Characterization of the Zinc Binding Site of Bacterial Phosphotriesterase. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267* (19), 13278–13283.
- (61) Raushel, F. M. Bacterial Detoxification of Organophosphate Nerve Agents. *Curr. Opin. Microbiol.* **2002**, *5* (3), 288–295. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(02\)00314-4](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(02)00314-4).
- (62) Alejo-González, K.; Hanson-Viana, E.; Vazquez-Duhalt, R. Enzymatic Detoxification of Organophosphorus Pesticides and Related Toxicants. *J. Pestic. Sci.* **2018**, *43* (1), 1–9. <https://doi.org/10.1584/jpestics.D17-078>.
- (63) Benning, M. M.; Hong, S.-B.; Raushel, F. M.; Holden, H. M. The Binding of Substrate Analogs to Phosphotriesterase *. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (39), 30556–30560. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003852200>.
- (64) Sogorb, M. A.; Vilanova, E.; Díaz-Alejo, N. The Kinetics of O-Hexyl O-2,5-Dichlorophenyl Phosphoramidate Hydrolysing Activity in Hen Plasma. *Chem. Biol. Interact.* **1993**, *87* (1–3), 117–125. [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(93\)90032-T](https://doi.org/10.1016/0009-2797(93)90032-T).
- (65) Almenares-López, D.; Juantorena-Ugas, A.; Rosales-Espinosa, K.; Vilanova, E.; Ríos, C.; Monroy-Noyola, A. Copper-Dependent Hydrolysis of Trichloronate by Turkey Serum Studied with Use of New Analytical Procedure Based on Application of Chiral Chromatography and UV/Vis Spectrophotometry. *J. Chromatogr. B* **2019**, *1105*, 203–209. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.12.026>.
- (66) Monroy-Noyola, A.; Sogorb, M. A.; Díaz-Alejo, N.; Vilanova, E. Copper Activation of Organophosphorus Compounds Detoxication by Chicken Serum. *Food Chem. Toxicol.* **2017**, *106*, 417–423. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.05.055>.
- (67) Angel Sogorb, M.; Díaz-Alejo, N.; Pellín, M. C.; Vilanova, E. Inhibition and Aging of Neuropathy Target Esterase by the Stereoisomers of a Phosphoramidate Related to Methamidophos. *Toxicol. Lett.* **1997**, *93* (2–3), 95–102. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(97\)00084-2](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(97)00084-2).
- (68) Estrada, S. C. Hidrólisis metal-dependiente de compuestos organofosforados en su forma tio por el suero de aves y mamíferos domésticos. **2019**.
- (69) Eto, M. *Organophosphorus Pesticides*; CRC Press, 2018. <https://doi.org/10.1201/9781351075305>.
- (70) Lewis, K. A.; Tzilivakis, J.; Warner, D. J.; Green, A. An International Database for Pesticide Risk Assessments and Management. *Hum. Ecol. Risk Assess. Int. J.* **2016**, *22* (4), 1050–1064. <https://doi.org/10.1080/10807039.2015.1133242>.

- (71) Liu, W.; Lin, K.; Gan, J. Separation and Aquatic Toxicity of Enantiomers of the Organophosphorus Insecticide Trichloronate. *Chirality* **2006**, *18* (9), 713–716. <https://doi.org/10.1002/chir.20323>.
- (72) Monroy-Noyola, A.; Vilanova, E.; Campos, F.; Mederos, P.; Rendon, N.; Garcia-Hernandez, J.; Castillo-Guerrero, J. A.; Ríos, C. O-Hexyl O-2,5-Dichlorophenyl Phosphoramidate as a Substrate for Domestic and Sea Bird Serum A-Esterases: Hydrolysis Levels, Cu²⁺- and Zn²⁺-Dependence and Stereoselectivity. *Chem. Biol. Interact.* **2019**, *310*, 108727. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.108727>.
- (73) Monroy-Noyola, A.; Sogorb, M. A.; Vilanova, E. Albumin, the Responsible Protein of the Cu²⁺-Dependent Hydrolysis of O-Hexyl O-2,5-Dichlorophenyl Phosphoramidate (HDCP) by Chicken Serum “Antagonistic Stereoselectivity.” *Food Chem. Toxicol.* **2018**, *120*, 523–527. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.07.047>.
- (74) Almenares-López, D.; Monroy-Noyola, A. Copper(II)-Dependent Hydrolysis of Trichloronate by Turkey Serum Albumin. *Chem. Biol. Interact.* **2019**, *308*, 252–257. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.05.039>.
- (75) Speisky, H.; Navarro, P.; Cherian, M. G.; Jiménez, I. Copper-Binding Proteins in Human Erythrocytes: Searching for Potential Biomarkers of Copper over-Exposure. *Biometals* **2003**, *16* (1), 113–123. <https://doi.org/10.1023/A:1020724331271>.
- (76) Bal, W.; Sokołowska, M.; Kurowska, E.; Faller, P. Binding of Transition Metal Ions to Albumin: Sites, Affinities and Rates. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **2013**, *1830* (12), 5444–5455. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.06.018>.
- (77) Raoufinia, R.; Mota, A.; Keyhanvar, N.; Safari, F.; Shamekhi, S.; Abdolalizadeh, J. Overview of Albumin and Its Purification Methods. *Adv. Pharm. Bull.* **2016**, *6* (4), 495–507. <https://doi.org/10.15171/apb.2016.063>.
- (78) Bal, W.; Christodoulou, J.; Sadler, P. J.; Tucker, A. Multi-Metal Binding Site of Serum Albumin. *J. Inorg. Biochem.* **1998**, *70* (1), 33–39. [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(98\)00010-5](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(98)00010-5).
- (79) Varshney, A.; Sen, P.; Ahmad, E.; Rehan, Mohd.; Subbarao, N.; Khan, R. H. Ligand Binding Strategies of Human Serum Albumin: How Can the Cargo Be Utilized? *Chirality* **2010**, *22* (1), 77–87. <https://doi.org/10.1002/chir.20709>.
- (80) Lockridge, O.; Xue, W.; Gaydess, A.; Grigoryan, H.; Ding, S.-J.; Schopfer, L. M.; Hinrichs, S. H.; Masson, P. Pseudo-Esterase Activity of Human Albumin. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (33), 22582–22590. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802555200>.
- (81) Li, B.; Schopfer, L. M.; Hinrichs, S. H.; Masson, P.; Lockridge, O. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Assay for Organophosphorus Toxicants Bound to Human Albumin at Tyr411. *Anal. Biochem.* **2007**, *361* (2), 263–272. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.11.018>.
- (82) Sendzik, M.; Pushie, M. J.; Stefaniak, E.; Haas, K. L. Structure and Affinity of Cu(I) Bound to Human Serum Albumin. *Inorg. Chem.* **2017**, *56* (24), 15057–15065. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.7b02397>.
- (83) Monroy-Noyola, A.; Sogorb, M. A.; Almenares-Lopez, D.; Vilanova, E. DAEH N-Terminal Sequence of Avian Serum Albumins as Catalytic Center of Cu (II)-Dependent Organophosphorus Hydrolyzing A-Esterase Activity. *Chem. Biol. Interact.* **2021**, *345*, 109524. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109524>.
- (84) Hureau, C.; Eury, H.; Guillot, R.; Bijani, C.; Sayen, S.; Solari, P.; Guillon, E.; Faller, P.; Dorlet, P. X-ray and Solution Structures of Cu^{II} GHK and Cu^{II} DAHK Complexes:

- Influence on Their Redox Properties. *Chem. – Eur. J.* **2011**, *17* (36), 10151–10160. <https://doi.org/10.1002/chem.201100751>.
- (85) Handing, K. B.; Shabalin, I. G.; Kassar, O.; Khazaipoul, S.; Blindauer, C. A.; Stewart, A. J.; Chruszcz, M.; Minor, W. Circulatory Zinc Transport Is Controlled by Distinct Interdomain Sites on Mammalian Albumins. *Chem. Sci.* **2016**, *7* (11), 6635–6648. <https://doi.org/10.1039/C6SC02267G>.
- (86) Dominguez, R. S. E. Caracterización de la amylna en niños obesos con y sin diagnóstico de síndrome metabólico en un hospital pediátrico. **2020**.
- (87) Jackson Ellington, J.; Evans, J. J.; Prickett, K. B.; Champion, W. L. High-Performance Liquid Chromatographic Separation of the Enantiomers of Organophosphorus Pesticides on Polysaccharide Chiral Stationary Phases. *J. Chromatogr. A* **2001**, *928* (2), 145–154. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01138-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01138-4).

10. ANEXOS

Como parte de este trabajo se publicaron 2 artículos en revistas arbitradas de circulación internacional, los cuales se muestran a continuación



Cu²⁺-dependent stereoselective hydrolysis of a chiral organophosphonothioate insecticide for domestic mammals' sera and its albumins

Elizabeth Undiano^a, Susana Chávez^a, Pedro Mederos^a, Marcela Ayala^b, Antonio Monroy-Noyola^{a,*}

^a Laboratorio de Neuroprotección, Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma Del Estado de Morelos, Mexico

^b Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos, Mexico

ARTICLE INFO

Handling Editor: Dr. Jose Luis Domingo

Keywords:

Mammals
Organophosphorus
Albumin
Serum
Copper
Hydrolysis

ABSTRACT

Acute toxicity of organophosphate (OPs) pesticides is a public health problem. The adverse effects are associated with the inhibition and aging of nervous system B-esterases such as acetyl cholinesterase (AChE) and neuropathic target esterase (NTE). Treatment based on A-esterases such as mammal serum paraoxonase-1 has been suggested. This *ex vivo* study shows the Cu²⁺-dependent hydrolysis of trichloronate (TCN), a racemic organophosphonothioate insecticide, in human and domestic mammal serum (dog, goat, pig, sheep and cow). Ca²⁺-dependent (2.5 mM) or EDTA-resistant (5 mM) activity (1–6%) was not significant ($p > 0.05$) in all samples, except goat serum and its albumin, which showed higher levels of TCN hydrolysis (38–58%) than other mammals with 100 and 300 μM copper sulfate at physiological conditions for 60 min. Goat serum albumin (GSA) showed significant ($p < 0.05$) stereoselective hydrolysis (+)-TCN > (-)-TCN (45% versus 33%). This suggests that GSA is the protein responsible for Cu²⁺-dependent TCNase activity in goat serum. This is the first report on Cu²⁺-dependent A-esterase activity in mammalian tissues. This goat serum cuproprotein could be considered as an alternative in future biotechnological applications including enantiomeric synthesis, bioremediation and antidotal treatment of organophosphonothioate pesticide poisoning.

Author contributions

Elizabeth Undiano: Conceptualization, methodology, validation, writing, **Susana Chávez and Pedro Mederos:** Collection of samples and methodology, **Marcela Ayala:** HPLC analysis, **Antonio Monroy-Noyola:** Conceptualization, methodology, validation, visualization writing—review and editing, All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

1. Introduction

Organophosphorus (OPs) compounds are used for the manufacture of insecticides for agricultural and public health activities (Iaroshenko,

2019). OPs have in common a central phosphorus atom that has a sulfur atom (thio form, phosphorothionates) or oxygen (oxo form, phosphates) linked by a double bond. In addition, the phosphorus atom has two R groups and one X group (leaving group) that can be a halogen, or an aliphatic, aromatic or heterocycle group, which can be linked directly or by the oxygen or sulfur atom. Group X is released from the phosphorous atom when these compounds interact with nucleophilic agents (Jokanovic and Prostran, 2009), which include the OH groups of the serine and tyrosine amino acids of enzymes known as esterases in biological systems. Nowadays, about 30% of commercial insecticidal OPs have a chiral center in the phosphorus atom, so they are enantiomeric racemic mixtures. These structural chemical differences in OPs provide them with physicochemical and biological differences. Phosphorothionates

Abbreviations: OPs, organophosphorus; AChE, acetyl cholinesterase; NTE, neuropathic target esterase; TCN, trichloronate; GSA, Goat serum albumin; TCNase, trichloronate hydrolyzing activity; OPIDP, organophosphate-induced delayed polyneuropathy; HDCP, O-hexyl O-2,5-dichlorophenyl phosphoramidate; HPLC, High-Performance Liquid Chromatography; TCP, trichlorophenol.

* Corresponding author. Laboratorio de Neuroprotección, Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, CP: 62209, Cuernavaca, Morelos, Mexico.

E-mail address: amonroy@uaem.mx (A. Monroy-Noyola).

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112408>

Received 17 March 2021; Received in revised form 2 July 2021; Accepted 9 July 2021

Available online 10 July 2021

0278-6915/© 2021 Published by Elsevier Ltd.

are less toxic than phosphates (Pimentel, 1971). Phosphorothionates as trichloronate (TCN) (Fig. 1) can be biotransformed into their phosphate metabolite, which is more toxic through cytochrome p450 (Mangas et al., 2016).

It is well-known that acute exposure to OPs induces cholinergic syndrome by the inhibition of acetyl cholinesterase (AChE) in the central and peripheral nervous systems. This syndrome is characterized by signs and symptoms of muscarinic and nicotinic origin during the first 24–72 h after exposure. Chiral OPs comprising around 25% of OP insecticides, induce a second acute neurotoxic syndrome called organophosphorus induce delayed polyneuropathy (OPIDP). This syndrome is associated with the inhibition and aging of the neuropathic target esterase (NTE) in the central nervous system. OPIDP manifests around 21 days after acute exposure and this is characterized by bilateral and irreversible axonopathy of the lower limbs (Richardson et al., 2020). Each isomer has different toxic properties on the enzymatic systems of organisms (Liu et al., 2006; Mohammed et al., 2017). In the pharmacological treatment of cholinergic syndrome, acetylcholine (ACh) antagonist drugs such as atropine are used, and in severe cases of human poisoning this drug is administered in combination with nucleophilic agents known as pralidoximes (de Koning et al., 2020). In the case of OPIDP, there are no drugs of choice; for this reason, the use of enzymes involved in the stereoselective metabolism of OPs in oxo form, known as A-esterases, is being investigated; these enzymes depend on divalent cations for their activity (Monroy-Noyola et al., 2021a).

O-Ethyl O-2,4,5-trichlorophenyl ethylphosphonothioate (TCN) is a chiral OP nematocide in tio form with (+)-TCN and (–)-TCN enantiomer. This racemic compound has been commercialized as Agrisil, Phytosol and Fenophospon in the agriculture for the control of the adult carrot root fly *Plylla rosae* and its larvae. Expose chickens and humans have shown that this nematocide induces cholinergic syndrome and OPIDP (Jedrzejska et al., 1980; (Johnson, 1982)). Nowadays, this insecticide is not used in public health control. Toxicology studies in birds and mammals have reported that the racemic mixture of TCN induces both acute neurotoxic syndromes by AChE inhibition and it may have the ability to inhibit and age NTE (El-Sebae et al., 1981). Aquatic toxicity studies using purified TCN isomers and small crustaceans commonly called water fleas (*Daphnia magna*) shown that the mortality (LC50) of (+)-TCN is around 10-fold less toxic than its corresponding enantiomer (–)-TCN (Liu et al., 2006). Other pre-clinical studies have suggested that the neurotoxicity of this OP could be due to its enzymatic bioactivation by cytochrome p450 to its oxo form in the nervous system and its lack of Ca²⁺-dependent hydrolysis of paraoxonase-1 (Johnson, 1982). The (+)-TCN and (–)-TCN toxicity in vivo have been observed for other racemic OP insecticides (Battershill et al., 2004). For this reason, it is important to perform pre-clinical studies of its stereospecific degradation by bacterial and animal A-esterases, including bird and mammalian enzymes. This will provide knowledge relevant to the treatment of poisonings in the clinic, toxicology studies, the development of biosensors and biocatalysts, and the formulation of safer pesticides. Ex vivo experiments carried out in our laboratory have shown the metal-dependent hydrolysis of hexyl dichlorophenyl phosphoramidate (oxo form), called HDCP, and TCN (tio form), by the sera of birds (Monroy-Noyola et al., 2019; Almenares-López and Monroy-Noyola,

2019) and mammals (Monroy-Noyola et al., 1999, 2007, 2015) in the presence of metallic cofactors (Monroy-Noyola et al., 2017, 2018,), using analytical chemistry techniques (Almenares-López et al., 2019). The results have shown a stereoselective Ca²⁺-dependent hydrolysis of S (–)-HDCP in rat and rabbit tissues, as well as in human serum (Monroy-Noyola et al., 2015), which has been associated with an A-esterase known as paraoxonase-1 in mammalian serum. In the sera of chicken (*Gallus gallus*) and turkey (*Melleagris gallopavo*), the Cu²⁺-dependent hydrolysis of R (+)-HDCP and (–)-TCN also occurs. In both cases, albumin was identified as the cuproprotein responsible for stereoselective hydrolysis. This knowledge is relevant because it supports the A-esterase activity of albumin in the presence of copper on OP compounds, including those of the tio form such as TCN (Almenares-López and Monroy-Noyola, 2019; Monroy-Noyola et al., 2018). In the present study, the Cu²⁺-dependent stereoselective hydrolysis of racemic TCN for domestic mammals' sera and its albumin was characterized by UV/Vis spectrophotometry and chiral chromatography.

2. Materials and methods

2.1. Chemical reagents

Trichloronate (O-ethyl O-2,4,5-trichlorophenyl ethylphosphonothioate), standard quality (purity 98%) and standard of 2,4,5-trichlorophenol (TCP) with 98% purity were purchased from Chem Service. Trizma, 4-aminoantipyrine and anhydrous acetone HPLC grade with 98% purity were purchased from Sigma-Aldrich. Heptane HPLC grade was from Burdick & Jackson, copper (II) sulfate pentahydrate (purity 98%) was from J.T. Baker, potassium ferricyanide from was Research Organics Inc. and sodium dodecyl sulfate (SDS) was from Amresco Inc.

2.2. Domestic mammalian sera and their albumins

Dog (*Canis lupus familiaris*), goat (*Capra aegagrus hircus*), pig (*Sus scrofa domestica*), sheep (*Ovis aries*), bovine (*Bos primigenius Taurus*) and turkey (*Meleagris gallopavo*) blood samples (5–10 mL) were obtained from Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) (healthy adult animals, n = 3). All samples were collected in anticoagulant free tubes and centrifuged at 1000 × g for 10 min to obtain the sera, which were stored at –20 °C until the hydrolysis assays. Samples and waste were manipulated as established by Mexican Official Norms NOM-253-SSA1-2012 and NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Animal's care and handling followed NOM-062-ZOO-1999. Human serum samples were provided by healthy human donors (n = 3) from a metabolic syndrome project (Facultad de Farmacia, UAEM). Samples and waste were manipulated as established by Mexican Official Norms NOM-253-SSA1-2012 and NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Lyophilized serum albumins from human (HSA), dog (DSA), pig (PSA), sheep (SSA), bovine (BSA) and turkey (TSA) with purity 98% were purchased from Sigma-Aldrich. Goat serum albumin (GSA) was obtained from Cusabio with >95% purity.

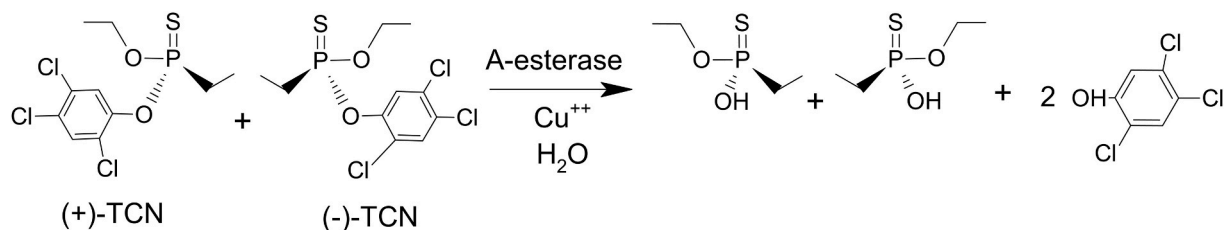


Fig. 1. Hydrolysis of TCN isomers by A-esterases enzymes in the presence of water and Cu²⁺ producing alcohol as leaving group and their respective phosphoric acids.

2.3. Albumin quantification in mammal sera

Albumin quantification in mammal sera, the blood samples were obtained by venous puncture from three animals per species (HSA, DSA, PSA, SSA, BSA, GSA and TSA). All blood samples were centrifuged from $1000 \times g$ for 10 min. The serum samples were analyzed following the method described for the quantitative determination of albumin with bromocresol green using a kit commercial (SPINREACT). Briefly, an aliquot of 5 μL of serum sample was mixed with 1 mL of the reagent and incubated for 10 min at room temperature. The mix (serum and reagent) was read against the reagent blank in a spectrophotometer at 630 nm (Spin-Lab). The quantification of albumin protein (g/dL) was performed with a calibration curve of bovine serum albumin.

2.4. Quantification of racemic TCN hydrolysis by UV/Vis spectrophotometry

TCN hydrolysis activity was measured by the colorimetric quantification of 2,4,5-trichlorophenol (TCP, leaving group). This UV/Vis spectrophotometric method was developed by our research group (Almenares-López et al., 2019). Ten μL from each mammalian serum or 200 μg of their respective albumin dissolved in 100 μL of deionized water (normalized amount from the quantification of albumin in mammals sera) were incubated in 1 mL of reaction volume containing 100 μM racemic TCN and 100 or 300 μM copper sulfate or 5 mM EDTA or 2.5 mM calcium at 37 °C in 10 mM TRIS buffer at pH 7.4 for 60 min. For the assay of the effect of Cu^{2+} on the TCNase activity on goat serum albumin concentrations of copper sulfate in a range of 1–800 μM were used. The reaction was stopped with 750 μL of stop solution formulated with 4-aminoantipyrine 0.25 mg/mL and SDS 2% m/V in 50 mM TRIS buffer pH 8. Later, 375 μL of potassium ferricyanide 0.4% m/V were added to form a color complex that was measured at 512 nm by a UV/Vis spectrophotometer (PERKIN-ELMER, Lambda 25). The hydrolysis level was measured with a standard curve of TCP (28, 52, 80 and 100 μM), which was included in the same assay conditions as the sera and albumin samples. The hydrolysis values are expressed as the average TCP [μM] and standard error. The value of the spontaneous hydrolysis of the reagents was subtracted.

2.5. Stereoselective hydrolysis of TCN by chiral chromatography

Stereoselective hydrolysis of TCN was quantified by the enantiomer residual concentration (μM) using a method validated by our research group (Almenares-López et al., 2019). This chiral chromatographic method considers the chromatographic conditions established previously (Ellington et al., 2001). Therefore, (+)-TCN enantiomer elutes first and its corresponding (–)-TCN second using CHIRALCEL OD column. Briefly, an aliquot of 10 μL of serum (containing $\sim 200 \mu\text{g}$ of albumin) or 200 μg of the respective albumin (dissolved in 100 μL of deionized water) of each mammalian species was incubated in 1 mL reaction volume containing 300 μM copper sulfate at 37 °C in 10 mM TRIS buffer pH 7.4. The hydrolysis reaction was started by adding 25 μL to final concentration of 400 μM of TCN racemic mixture ($\sim 200 \mu\text{M}$ of each enantiomer). The reaction was stopped after 60 min by adding 40 μL of 0.2 M HCl. Liquid-liquid extraction with 1 mL of heptane was carried out to remove the residual TCN enantiomers. The organic phase was centrifuged at $1000 \times g$ for 15 min and a 20 μL aliquot was injected into the HPLC system (Agilent 1220 Infinity series) equipped with a diode array detector at 207 nm. A TCN standard calibration curve (50 μM , 100 μM , 200 μM and 400 μM) was performed under the same conditions as the biological samples. The hydrolysis levels are expressed as the average of the residual concentration for each isomer and the standard error, from which the spontaneous hydrolysis of the reagents was subtracted.

2.6. Statistical analysis

Remaining values of TCN enantiomers of the experimental groups (mammalian sera and albumins plus Ca^{2+} or EDTA or Cu^{2+}) versus control groups (racemic TCN without Cu^{2+} or with Cu^{2+} or serum or turkey albumin plus Cu^{2+}) were analyzed by the one-way ANOVA statistical test. For comparison of the hydrolysis of (+)-TCN versus (–)-TCN of the experimental group, Student's t-test was applied, with $p < 0.05$ was used as the value indicating statistical significance. These analyses were carried out with SPSS version 19 and the graphics were drawn with Sigma Plot 12.

3. Results

3.1. EDTA, Ca^{2+} and Cu^{2+} -dependent hydrolysis of racemic TCN by mammal serum and albumins

In order to rule out the copper-dependent hydrolysis of TCN by paraoxonase-1 by these mammals sera, and their respective albumin, these biological samples were incubated with the chelating agent EDTA or with the calcium ion at a biological concentration. their levels of TCNase activity were compared against the levels of copper-dependent hydrolysis. Fig. 2 shows the TCP values (TCNase activity) of EDTA, Ca^{2+} and Cu^{2+} obtained from human and domestic mammal sera. A previous TCNase activity kinetic study in turkey serum reported that the activity was linear with reaction time (Almenares-López and Monroy-Noyola, 2019); therefore, 60 min was the reaction time chosen to measure racemic TCN hydrolysis in this study. As shown in panels A and B, there was no significant EDTA and Ca^{2+} -dependent hydrolysis of TCN in the serum of all mammal species studied (1–6%). However, there was statistically significant ($p < 0.05$, one-way ANOVA) Cu^{2+} -dependent TCNase activity in goat serum when it was incubated with 100 μM or 300 μM copper sulfate (38–56% hydrolysis, respectively) (panels C and D) with respect to the other mammal sera. The human and bovine sera showed TCNase activity of 24% and 11% respectively when both samples were incubated with 100 μM copper. However, these levels were not significant (Fig. 2C). The enzymatic hydrolysis assays were highly reproducible (less than 10% variability among triplicates).

With the objective of identifying if the albumins are the mammal serum cuproproteins responsible for Cu^{2+} -dependent racemic TCN hydrolysis in mammal sera, the albumin protein concentration was measured in each mammalian serum with bromocresol green using a commercial kit (SPINREACT), as described in the Materials and Methods section. The albumin concentration was quantified in each of the sera of the six mammals and turkey serum. The albumin values were in the range of 175–230 μg in 10 mL of serum. For this reason, we decided to incubate 200 μg of albumin from each mammalian serum as in the previous OPs hydrolysis studies carried out by our research group with chicken and turkey albumin (Monroy-Noyola et al., 2018; Almenares-López and Monroy-Noyola, 2019). As Fig. 2 shows, 5 mM EDTA (A) or 2.5 mM calcium (B) and copper (C and D) did not activate TCN hydrolysis in the six mammal serum albumins, except in the goat serum albumin that showed higher hydrolysis levels ($\sim 78\%$ vs. 38–56%) than its respective serum with both copper sulfate concentrations. The results were statistically significant ($p < 0.05$, Student's t-test) with 100 μM copper sulfate.

3.2. Cu^{2+} -dependent TCN hydrolysis by goat serum and albumin

Based on the Cu^{2+} activating effect observed in the previous goat serum and its respective albumin results, 10 μL of goat serum were incubated in 1 mL of reaction volume containing 100 μM TCN and 1–800 μM copper sulfate at 37 °C in 10 mM TRIS buffer pH 7.4. The TCN hydrolysis measurement was taken by quantifying the TCP released after 60 min reaction. Cu^{2+} clearly had an activating effect on TCN hydrolysis (Fig. 3). Cu^{2+} -dependent TCN hydrolysis was increased significantly (p

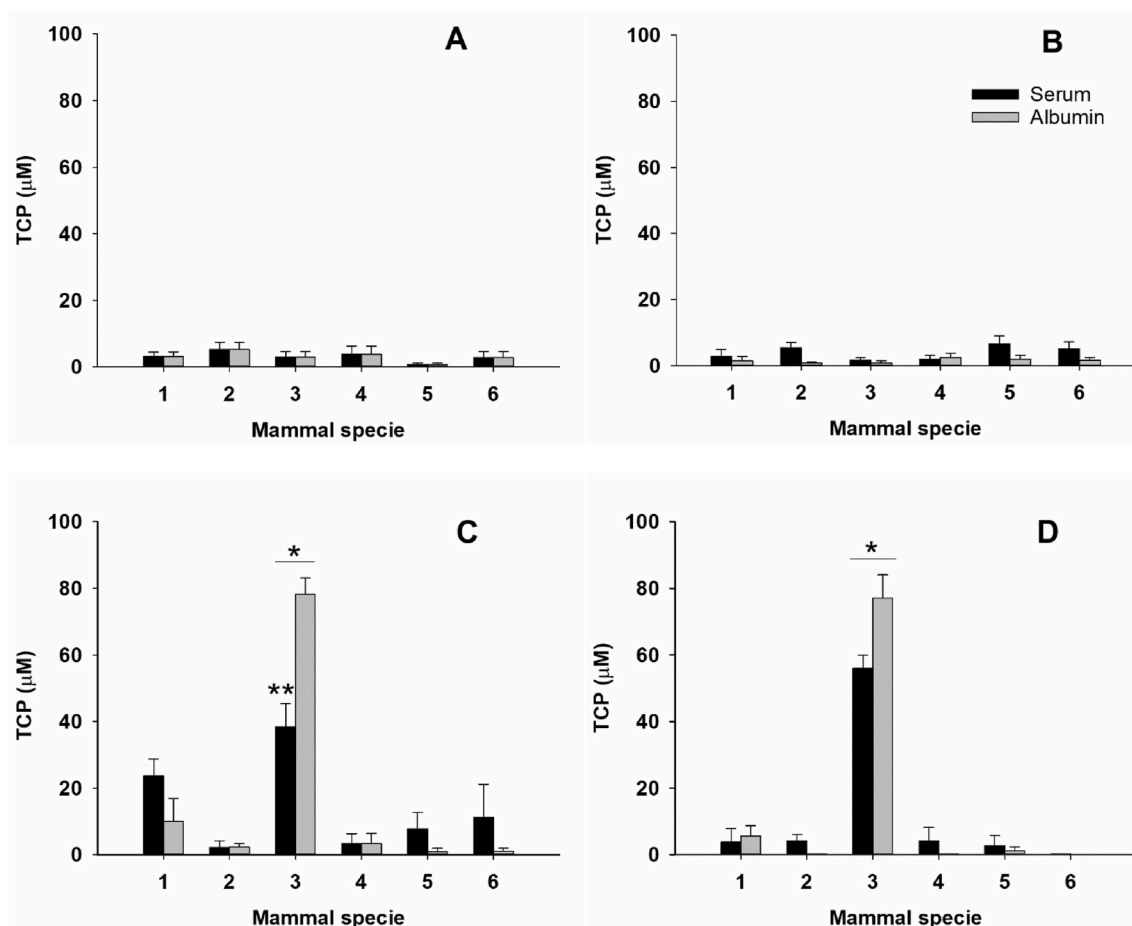


Fig. 2. Cu²⁺-dependent hydrolysis of TCN by domestic mammal serum and their albumins. Each bar represents the average \pm SEM of TCP (leaving group) of three independent experiments. 10 μ L of serum (pool n = 3–5) or 100 μ L containing 200 μ g of albumin from human (1), dog (2), goat (3), pig (4), sheep (5) or bovine (6) were incubated in 1 mL of reaction volume containing 100 μ M of racemic mixture TCN and 5 mM EDTA (A) or 2.5 mM Ca²⁺ (B) or 100 μ M Cu²⁺ (C) or 300 μ M Cu²⁺ (D) at 37 °C in 10 mM TRIS buffer pH = 7.4 for 60 min *p < 0.05, ANOVA one way, **p < 0.05, t-Student. Averages were corrected for their spontaneous hydrolysis.

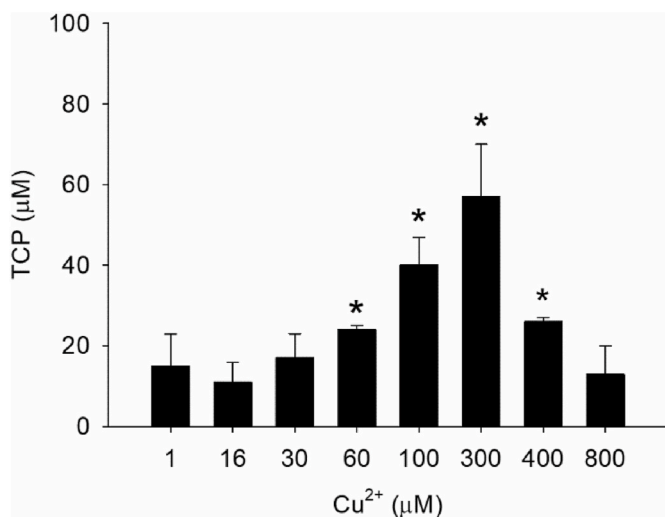


Fig. 3. Effect of Cu²⁺ concentration on TCN hydrolysis in goat serum. Each bar represents the average \pm SEM of TCP (leaving group) of three independent experiments. 10 μ L of goat serum (pool, n = 3) were incubated in 1 mL of reaction volume containing 100 μ M TCN racemic mixture and 1–800 μ M Cu²⁺ at 37 °C in 10 mM TRIS buffer pH = 7.4 for 60 min. Average were corrected for their spontaneous hydrolysis. *p < 0.05 ANOVA one way.

< 0.05, ANOVA one way) with increased cation concentrations, and its activator effect was identified as going from 60 μ M to 400 μ M in the serum obtaining its highest hydrolyzing activation of TCN at 300 μ M of this divalent metal. The effective concentration 50% (EC50) was approximately \sim 80 μ M to this biological sample.

3.3. Cu²⁺-dependent stereoselective hydrolysis of TCN by goat serum albumin

To identify whether the Cu²⁺-dependent hydrolysis of TCN by goat serum albumin is stereoselective and if it is a specific catalytic property of this protein, 200 μ g of serum albumin from human and goat were selected for this study. Turkey serum albumin was also selected as a positive control (Fig. 4). It has recently been reported that this avian cuproprotein shows Cu²⁺-dependent stereoselective activity of the (–)-TCN enantiomer (Almenares-López and Monroy-Noyola, 2019). These three cuproproteins were incubated with a 400 μ M racemic mixture of TCN and the TCNase activity was quantified through the residual concentration of each stereoisomer by the chiral chromatography method (Almenares-López et al., 2019), as shown in the chromatographic peaks, 1 = (+)-TCN and 2 = (–)-TCN (Fig. 5). Fig. 4 shows the remaining concentration (μ M) of each TCN isomer (hydrolysis) in human and goat albumin in the presence of 300 μ M copper sulfate after 60 min. Significant Cu²⁺-dependent hydrolysis (p < 0.05, one-way ANOVA) of both enantiomers (40%) in goat albumin was observed (group 2) with respect to the TCN racemic mixture control group

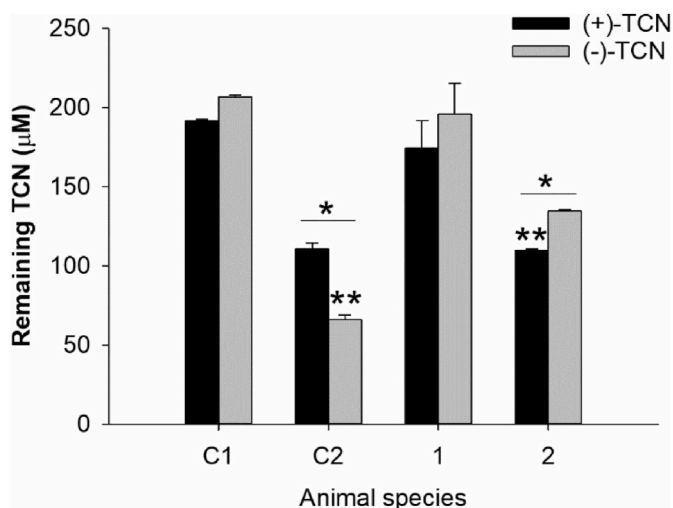


Fig. 4. Stereoselective hydrolysis of TCN by albumin from human and domestic animals. Each bar represents the average \pm SEM of three independent experiments. An aliquot of 400 μ M TCN racemic (C1) (\sim 200 μ M of each enantiomer) were incubated with 200 μ g of albumin from turkey (C2) (control positive group) or human (1) or goat (2) in the presence of 300 μ M Cu^{2+} at 37 $^{\circ}\text{C}$ in 10 mM TRIS buffer pH = 7.4 for 60 min * p < 0.05 ANOVA one way, ** p < 0.05, t-Student.

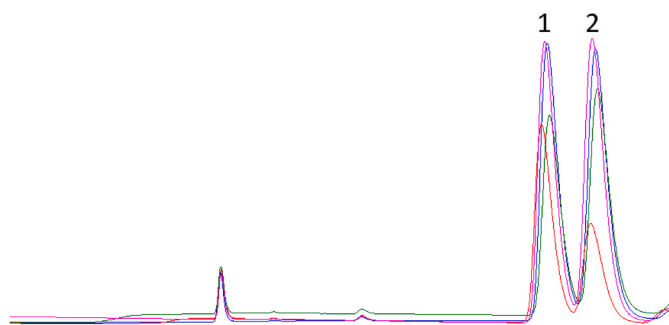


Fig. 5. HPLC chromatogram showing the stereoselective Cu^{2+} -dependent TCN hydrolysis by goat serum albumin. First peak (1) and second peak (2) in the traces correspond to isomer (+)-TCN and its corresponding (-)-TCN, respectively. 400 μ M TCN racemic mixture (blue) were incubated with 300 μ M Cu^{2+} and 200 μ g of serum albumin from turkey (red) (positive control) or human (pink) or goat (green) at 37 $^{\circ}\text{C}$ in 10 mM TRIS buffer pH 7.4 for 60 min. Reactions were stopped by 40 μ L of 0.2 M HCl and 2 mL of heptane. Then 25 μ L of the heptane extract were injected in the HPLC system.

without copper and without protein (C1) or the experimental group of human serum albumin in both reactions (group 1). This copper activating effect in goat serum albumin was significantly stereoselective for (+)-TCN (p < 0.05, Student's t-test) since its remaining value was lower (109 ± 0.6 μ M) than that of the corresponding (-)-TCN enantiomer (134 ± 0.9 μ M). This stereospecific Cu^{2+} -dependent hydrolysis of the (+)-TCN isomer is lower and opposite to the stereoselective enzymatic activity obtained with turkey serum albumin (group C2), because this bird serum protein (positive control group) showed higher levels of TCN hydrolysis (56%) and significant (p < 0.05, Student's t-test) metal stereoselectivity for (-)-TCN. Fig. 5 shows the area of the two peaks (TCN enantiomers) that were constant in the chromatograms from the control group (C1) and human serum albumin (group 1). The area and height of both TCN enantiomers (peak 1 and 2) differentially decreased in goat and turkey albumins.

4. Discussion

This work confirms the presence of metalloproteins known as A-esterases in mammalian tissues, similar to the Cu^{2+} -dependent A-esterases in the serum of domestic birds (Monroy-Noyola et al., 2017, 2019; Almenares-López et al., 2019). They are different from mammalian serum paraoxonase-1, because this Cu^{2+} -dependent TCNase is not calcium-dependent but it is inhibited with the chelating agent EDTA (Sogorb et al., 1998a). In vivo extrapolation of this Cu^{2+} -dependent A-esterase activity in the serum albumin of mammals and avian could make these species more tolerant to the toxicity of OPs in the form tio and oxo. As a result there is a clear correlation between the levels of A-esterase or phosphotriesterases activities and the susceptibility to intoxication by these compounds. Although the Cu^{2+} -dependent A-esterase activity of vertebrate serum albumins has not been fully studied in vivo. It could be defined as a true A-esterase activity, because it depends on divalent cations (copper) and therefore is inhibited by EDTA. It also shares biochemical properties with other phosphotriesterase enzymes identified in different biological systems (Vilanova and Sogorb, 1999). Ex vivo studies performed by our research group reported this same copper-dependent A-esterase activity in chicken and turkey sera; the activity was around 20-fold greater than EDTA-resistant or calcium-dependent HDCPase activity using 300 μ M copper in the assay (Monroy-Noyola et al., 2017; Almenares-López et al., 2019). The lack of TCNase activity in the sera and albumin of those domestic mammals studied in the presence of calcium at physiological concentrations rules out paraoxonase-1 from mammalian serum as being responsible for this TCNase activity. The low levels of EDTA-resistant TCN hydrolysis (6%) reinforce the idea of a hydrolyzing capacity of mammalian albumin at a catalytic center constituted by tyrosine 411 as it has been suggested in bovine serum albumin when hydrolyzing the phosphorothioate insecticides chlorpyrifos and parathion (Sultatos et al., 1984). The participation of this Tyr 411 from human albumin in the hydrolysis of OPs in oxo form has also been suggested (Li et al., 2007). Particularly, this OPs hydrolysis of avian serum albumin is thought to be a kinetic mechanism for fast phosphorylation and slow dephosphorylation (Sogorb et al., 1998b). However, other sites of this EDTA-resistant TCNase activity of mammalian serum albumin, called pseudoesterase, cannot be ruled out, due to the fact that this protein is acylated at 82 sites, of which 56 are lysines (Lockridge et al., 2008). In silico studies propose Tyr150 as a second phosphorylation site, because this amino acid binds to the nervous agent soman more efficiently than Tyr411 (Goncharov et al., 2017).

The activating effect of copper on goat serum A-esterase activity shown in this study reinforces the notion that OP hydrolysis occurs in the tio and oxo forms, as reported for the avian serum (Monroy-Noyola et al., 2017; Almenares-López et al., 2019). The maximum concentration of copper activation in these biological samples was 300 μ M. TCN hydrolysis in goat serum was activated with 60 μ M copper. These divalent cofactor concentrations are higher than the concentration quantified in vivo in vertebrate sera (Grochowski et al., 2019). However, concentrations greater than 100 μ M copper have been reported in mammalian tissues (Collins et al., 2010). This suggests the possibility of hydrolyzing this racemic OP compound in vivo. The importance of the metal-dependent A-esterase activity of mammalian serum albumin, mainly that observed in goat serum albumin, is relevant for the possible in vivo detoxication of OP insecticides of the tio form in the bloodstream of agricultural workers exposed to those insecticides, whose main routes of occupational exposure are the respiratory and skin routes. Hydrolysis at the blood level would avoid greater neurotoxicity, due to a lower distribution to the CNS of the OPs, and therefore a lower bioactivation of its oxo metabolites by CYP450. Metabolites of CYP450 of those OPs possess a higher inhibitory capacity on B-esterases, such as AChE and NTE (Johnson, 1982). This copper-dependent hydrolyzing activity of mammalian serum albumin is also relevant because the calcium-dependent A-esterase, known as paraoxonase-1, are considered

the most efficient enzymatic system for the detoxification of OPs in mammals, is specific to OPs in the oxo form, and its hydrolyzing activity against chiral OPs is limited (Monroy-Noyola et al., 2021a). Unquestionably, it will be of great importance to demonstrate the copper-dependent capacity of the albumin of mammals, birds and their recombinants on the OPs and their metabolites for the tio and oxo form using different animal models. This study also demonstrates that the protein responsible for this stereoselective Cu²⁺-dependent TCNase activity in goat serum is the albumin protein, as has been shown for turkey serum (Almenares-López and Monroy-Noyola, 2019) using the same concentration of copper (300 µM), with the difference that the (+)-TCN isomer is hydrolyzed faster than the corresponding (–)-TCN, which is the enantiomer with the lowest toxic capacity on cholinesterases (Liu et al., 2006). Stereoselective hydrolysis was different from the Cu²⁺-dependent hydrolysis of this chiral insecticide by turkey serum albumin (Almenares-López and Monroy-Noyola, 2019). It is well-known that these copper proteins in vertebrate sera transport around 15% of copper in the bloodstream (Bal et al., 2013). In mammal serum albumin, there are four known copper binding sites, which have different structures and metal specificity: N-terminal site, multimetal binding site (MBS), Site B and Cys34 (Bal et al., 2013; Sendzik et al., 2017). The N-terminal site is more specific for Cu²⁺ than the other three sites; for this reason, this site has been called a specific site, while MBS, Site B and Cys34 are non-specific. Cu²⁺ binding to the second site is until first is saturated. The second site does not bind copper under physiological conditions (Bal et al., 1998). All this biochemical information on the affinity of copper to albumin suggests that the albumin N-terminal site is involved in stereoselective TCN hydrolysis as recently has been suggested in the hydrolysis Cu²⁺-dependent of chiral organophosphorus compounds with oxo form by vertebrate serum albumins (Monroy-Noyola et al., 2021b). Unquestionably, it will be of great importance to demonstrate the stereoselective hydrolysis of TCN in vivo and to identify the N-terminal site of goat serum albumin as the A-esterase catalytic center of phosphorothionate esters.

In conclusion, this study shows for the first time the Cu²⁺-dependent hydrolysis of a chiral racemic organophosphate insecticide in mammalian serum, as well as the identification of albumin as the enzyme responsible for this TCNase activity. This cuproprotein could be the target of applications for the development of antidotes in clinical toxicology, the development of biocatalysts and biosensors in biotechnological bioremediation, as well as in the enantiomeric chemical synthesis of OPs.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

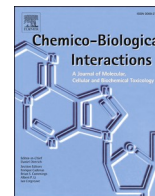
This work was supported by CONACYT and FORDECYT-PRONACES 840801. Elizabeth Undiano received a fellowship from CONACYT 663707.

References

Almenares-López, D., Monroy-Noyola, A., 2019. Copper(II)-dependent hydrolysis of trichloronate by Turkey serum albumin. *Chem. Biol. Interact.* 308, 252–257. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.05.039>.

- Almenares-López, D., Juantorena-Ugas, A., Rosales-Espinosa, K., Vilanova, E., Ríos, C., Monroy-Noyola, A., 2019. Copper-dependent hydrolysis of trichloronate by Turkey serum studied with use of new analytical procedure based on application of chiral chromatography and UV/Vis spectrophotometry. *J. Chromatogr. B.* 1105, 203–209. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.12.026>.
- Bal, W., Christodoulou, J., Sadler, P.J., Tucker, A., 1998. Multi-metal binding site of serum albumin. *J. Inorg. Biochem.* 70, 33–39. [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(98\)00010-5](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(98)00010-5).
- Bal, W., Sokolowska, M., Kurowska, E., Faller, P., 2013. Binding of transition metal ions to albumin: sites, affinities and rates. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1830, 5444–5455. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.06.018>.
- Battershill, J.M., Edwards, P.M., Johnson, M.K., 2004. Toxicological assessment of isomeric pesticides: a strategy for testing of chiral organophosphorus (OP) compounds for delayed polyneuropathy in a regulatory setting. *Food Chem. Toxicol.* 42, 1279–1285. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2004.03.004>.
- Collins, J.F., Prohaska, J.R., Knutson, M.D., 2010. Metabolic crossroads of iron and copper. *Nutr. Rev.* 68, 133–147. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00271.x>.
- de Koning, M.C., Horn, G., Worek, F., van Grol, M., 2020. Synthesis and in vitro evaluation of novel non-oximes for the reactivation of nerve agent inhibited human acetylcholinesterase. *Chem. Biol. Interact.* 326, 109139. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109139>.
- El-Sebae, A.H., Soliman, S.A., Ahmed, N.S., Curley, A., 1981. Biochemical interaction of six op delayed neurotoxicants with several neurotargets. *12. J. Environ. Sci. Health B16*, 465–474. <https://doi.org/10.1080/10934528109374998>.
- Ellington, J., Evans, J.J., Prickett, K.B., Champion, W.L., 2001. High-performance liquid chromatographic separation of the enantiomers of organophosphorus pesticides on polysaccharide chiral stationary phases. *J. Chromatogr. A* 928, 145–154. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01138-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01138-4).
- Goncharov, N.V., Belinkaia, D.A., Shmurak, V.I., Terpilowski, M.A., Jenkins, R.O., Avdonin, P.V., 2017. Serum albumin binding and esterase activity: mechanistic interactions with organophosphates. *Molecules* 22, 1201. <https://doi.org/10.3390/molecules22071201>.
- Grochowski, C., Blicharska, E., Baj, J., Mierzwińska, A., Brzozowska, K., Forma, A., Maciejewski, R., 2019. Serum iron, magnesium, copper, and manganese levels in alcoholism: a systematic review. *Molecules* 24, 1361. <https://doi.org/10.3390/molecules24071361>.
- Jedrzejowska, H., Rowińska-Marcińska, K., Hoppe, B., 1980. Neuropathy due to phytosol (Agritox). Report of a case. *Article in. Acta Neuropathol.* 49, 163–168. <https://doi.org/10.1007/BF00690757>.
- Johnson, M.K., 1982. The target for initiation of delayed neurotoxicity by organophosphorus esters: biochemical studies and toxicological applications. *Rev. Biochem. Toxicol.* 4, 141–212.
- Jokanovic, M., Prostran, M., 2009. Pyridinium oximes as cholinesterase reactivators. Structure-activity relationship and efficacy in the treatment of poisoning with organophosphorus compounds. *Curr. Med. Chem.* 16, 2177–2188. <https://doi.org/10.2174/092986709788612729>.
- Li, B., Schopfer, L.M., Hinrichs, S.H., Masson, P., Lockridge, O., 2007. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry assay for organophosphorus toxicants bound to human albumin at Tyr411. *Anal. Biochem.* 361, 263–272. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.11.018>.
- Liu, W., Lin, K., Gan, J., 2006. Separation and aquatic toxicity of enantiomers of the organophosphorus insecticide trichloronate. *Chirality* 18, 713–716. <https://doi.org/10.1002/chir.20323>.
- Lockridge, O., Xue, W., Gaydess, A., Grigoryan, H., Ding, S.-J., Schopfer, L.M., Hinrichs, S.H., Masson, P., 2008. Pseudo-esterase activity of human albumin: slow turnover on tyrosine 411 and stable acetylation of 82 residues including 59 lysines. *J. Biol. Chem.* 283, 22582–22590. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802555200>.
- Mangas, I., Vilanova, E., Estévez, J., Franca, T.C.C., 2016. Neurotoxic effects associated with current uses of organophosphorus compounds. *J. Braz. Chem. Soc.* 27, 809–825. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20160084>.
- Mohammed, A., Sneathen, J., Frojen, S.G., Kuo, L., Dupureur, C.M., 2017. Stereospecific cholinesterase inhibition by O,S-diethylphenylphosphonothioate. *Bioorg. Med. Chem.* 3053–3058. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.03.058>.
- Monroy Noyola A, Sogorb, M.A., Diaz-Alejo, N., Niguez, N., Barril, J., Vicedo, J.L., Escudero, M.A., Vilanova, E., 1999. Dichlorophenyl phosphoramidates as substrates for avian and mammalian liver phosphotriesterases: activity levels, calcium dependence and stereospecificity. *Chem. Biol. Interact.* 119–120, 257–262. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(99\)00035-6](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(99)00035-6).
- Monroy Noyola, A., Sogorb, M.A., Vilanova, E., 2007. Stereospecific hydrolysis of a phosphoramidate as a model to understand the role of biotransformation in the neurotoxicity of chiral organophosphorus compounds. *Toxicol. Lett.* 170, 157–164. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.03.002>.
- Monroy Noyola, A., Trujillo, B., Yescas, P., Martínez-Salazar, F., García-Jiménez, S., Ríos, C., Vilanova, E., 2015. Stereospecific hydrolysis of a phosphoramidate used as an OPIDP model by human sera with PON1 192 alloforms. *Arch. Toxicol.* 89, 1801–1809. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1327-2>.
- Monroy-Noyola, A., Sogorb, M.A., Diaz-Alejo, N., Vilanova, E., 2017. Copper activation of organophosphorus compounds detoxication by chicken serum. *Food Chem. Toxicol.* 106, 417–423. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.05.055>.
- Monroy-Noyola, A., Sogorb, M.A., Vilanova, E., 2018. Albumin, the responsible protein of the Cu²⁺-dependent hydrolysis of O-hexyl O-2,5-dichlorophenyl phosphoramidate (HDGP) by chicken serum “antagonistic stereoselectivity. *Food Chem. Toxicol.* 120, 523–527. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.07.047>.
- Monroy-Noyola, A., Vilanova, E., Campos, F., Mederos, P., Rendon, N., García-Hernández, J., Castillo-Guerrero, J.A., Ríos, C., 2019. O-hexyl O-2,5-dichlorophenyl

- phosphoramidate as a substrate for domestic and sea bird serum A-esterases: hydrolysis levels, Cu²⁺ and Zn²⁺-dependence and stereoselectivity. *Chem. Biol. Interact.* 310, 108727. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.108727>.
- Monroy-Noyola, A., Almenares-Lopez, D., Gisbert, E.V., 2021a. Hydrolysis of chiral organophosphorus compounds by phosphotriesterases and mammalian paraoxonase-1. *Front. Biosci. Landmark* 26, 744–770.
- Monroy-Noyola, A., Sogorb, M.A., Almenares-Lopez, D., Vilanova, E., 2021b. DAEH N-terminal sequence of avian serum albumins as catalytic center of Cu (II)-dependent organophosphorus hydrolyzing A-esterase activity. *Chem. Biol. Interact.* 345, 109524. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109524>.
- Pimentel, D., 1971. Ecological Effects of Pesticides on Non-Target Species. Executive Office Of The President. Office of Science and Technology. Stock number 4106-0029. The Superintendent of Documents, U.S. Government Printing Office, Washington, D. C. <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPURL.cgi?Dockey=2000L15A.txt>.
- Richardson, R.J., Fink, J.K., Glynn, P., Hufnagel, R.B., Makhaeva, G.F., Wijeyesakere, S. J., 2020. Neuropathy target esterase (NTE/PNPLA6) and organophosphorus compound-induced delayed neurotoxicity (OPIDN). *Adv. Neurotoxicol.* 4, 1–78. <https://doi.org/10.1016/bs.ant.2020.01.001>.
- Sendzik, M., Pushie, M.J., Stefaniak, E., Haas, K.L., 2017. Structure and affinity of Cu(I) bound to human serum albumin. *Inorg. Chem.* 56, 15057–15065. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.7b02397>.
- Sogorb, M.A., Díaz-Alejo, N., Escudero, M.A., Vilanova, E., 1998a. Phosphotriesterase activity identified in purified serum albumins. *Arch. Toxicol.* 72, 219–226. <https://doi.org/10.1007/s002040050492>.
- Sogorb, M.A., Monroy, A., Vilanova, E., 1998b. Chicken serum albumin hydrolyzes dichlorophenyl phosphoramidates by a mechanism based on transient phosphorylation. *Chem. Res. Toxicol.* 11, 1441–1446. <https://doi.org/10.1021/tx980015z>.
- Sultatos, L.G., Basker, K.M., Shao, M., Murphy, S.D., 1984. The interaction of the phosphorothioate insecticides chlorpyrifos and parathion and their oxygen analogues with bovine serum albumin. *Mol. Pharmacol.* 26, 99–104.
- Vilanova, E., Sogorb, M.A., 1999. The role of phosphotriesterases in the detoxication of organophosphorus compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* 29, 21–57. <https://doi.org/10.1080/10408449991349177>.



Computational study to find the goat serum albumin (GSA) binding site as A-esterase

Elizabeth Undiano^a, César Millán-Pacheco^a, Marcela Ayala^b, Antonio Monroy-Noyola^{a,*}

^a Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma de Estado de Morelos (UAEM), CP 62209, Cuernavaca, Morelos, Mexico

^b Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), CP 62209, Cuernavaca, Morelos, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

A-esterase
Organophosphorous
Albumin
N-terminal site
Copper
Docking
Molecular dynamic

ABSTRACT

A-esterases are a classical term applied to enzymatic activity of the proteins by a mechanism not involving intermediate covalent phosphorylation, but requiring a divalent cation cofactor. Recently, a copper-dependent A-esterase activity has been identified in goat serum albumin (GSA) on the organophosphorus insecticide trichloronate. This hydrolysis was identified *ex vivo* with spectrophotometry and chromatography techniques. Albumin mechanism of action and catalytic site as Cu²⁺-dependent A-esterase are still unknown. Therefore, to know the copper bind to albumin is relevant. N-terminal sequence has been reported as the high affinity site for this cation, due to the histidine in position 3. The aim of this work *in silico* is to explore how occurs this metallic binding and active the esterase catalytic function. The GSA crystallized structure (PDB: 5ORI) was chosen for molecular docking and dynamics. A site-directed docking, for N-terminal site and a blind docking was done with trichloronate as ligand. Root-mean-square deviation and frequency plot was calculated to find the most frequent predicted structure and visualize the amino acids involved in binding site. The affinity energy in the blind docking (−5.80 kcal/mol) is almost twice lower than site-directed docking (−3.81 kcal/mol) and N-terminal amino acids do not appear in the most repeated structure binding site, suggesting that the protein has a site with higher affinity to the trichloronate ligand. His145 could be involved in the binding site as has been reported in previous studies.

1. Introduction

The intoxication by pesticides is a issue of global health concern due to the large number of intoxication reported in the last decades [1]. The organophosphorus (OPs) insecticides have caused many cases of severe poisoning due to its high toxicity. Clinical treatments consist in the administration of atropine and oximes have saved many human intoxication cases by OPs. However, these pharmacological treatments are not efficient in cases of high doses exposures. The atropine in high doses is toxic and oximes are inefficient.

A-esterases are a classical term applied to enzymatic activity of the proteins capable to hydrolyze (OPs) compounds by a mechanism not involving intermediate covalent phosphorylation but requiring a

divalent cation cofactor, also called as phosphotriesterases (EC 3.1.8. Phosphotriesterases), being paraoxonase one of the best-known OP hydrolyzing enzymes in mammalian sera. In contrast, the term B-esterase is applied to enzymes able to hydrolyze some carboxyl esters but that are inhibited by OP by a mechanism involving a covalent binding by organophosphorylation, and in some case able to hydrolyze them if a subsequent dephosphorylation is occurring. They are usually proteins with serine or tyrosine in the catalytic center. The A-esterases administration has been suggested as therapeutic alternative in OPs poisoning by its biological role of OPs hydrolysis in the blood before they reach their toxicological target [2].

Rabbit and human serum albumin (HSA) hydrolyze p-nitrophenyl acetate and others phosphoric esters through a catalytic mechanism of

Abbreviations: GSA, goat serum albumin; HSA, human serum albumin; NTS, N-terminal site; OPs, organophosphorus compounds; PDB, Protein Data Bank; CCDC, Cambridge Crystallographic Data Centre; MBS, multi-metal binding site; RMSD, root-mean-square deviation; RMSF, root-mean-square fluctuation; UNAM, National Autonomous University of Mexico.

* Corresponding author. Laboratorio de Neuroprotección Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma de Estado de Morelos, Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa C.P. 62209, Cuernavaca, Morelos, Mexico.

E-mail address: amonroy@uaem.mx (A. Monroy-Noyola).

<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2023.110564>

Received 19 March 2023; Received in revised form 18 May 2023; Accepted 22 May 2023

Available online 23 May 2023

0009-2797/© 2023 Published by Elsevier B.V.

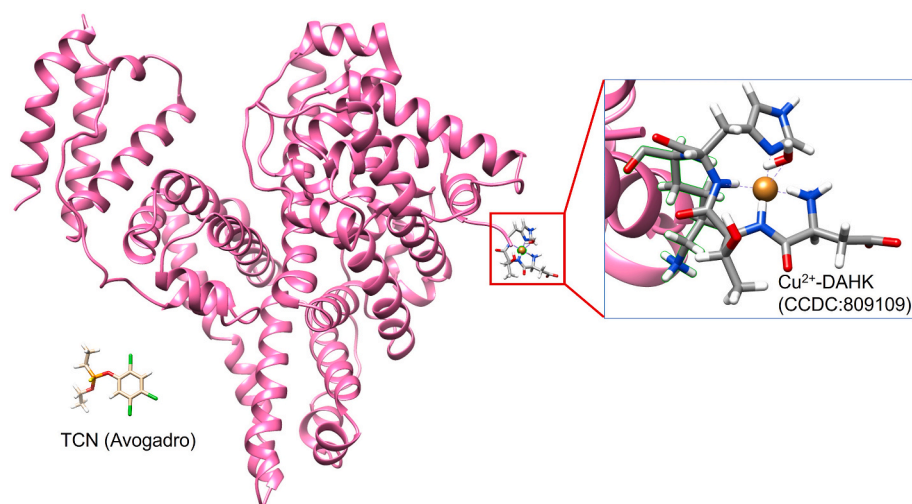


Fig. 1. Crystallographic structure of GSA with modified NTS.

This figure shows the GSA structure from Protein Data Bank (PDB: 5ORI) with modified NTS to bind a copper atom, according to the Cu^{2+} -DAHK peptide structure from Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC: 809109). The structure was modified in Chimera software (UCSF) and the trichloronate ligand was drawing in Avogadro software.

rapid phosphorylation and slow dephosphorylation in a typical mechanism type B-esterase in which the amino acid tyrosine 411 participates in the catalytic center [3,4] in contrast to enzymes like cholinesterases that are serine-esterases. However, in chicken, turkey and goat serum albumins an A-esterase hydrolysis has been observed. It is 20–40 fold more active in the presence of 300 μM of copper sulphate [5–8]. Albumin is a protein with multiple functions. It maintains the oncotic pressure in the blood, transports metabolites, xenobiotics, fatty acids, and metal ions, meanly. It has an important role in the detoxification of heavy metals and even it has antioxidant activity. HSA is reported to have neuroprotective function on neuronal and glial cells and regulates brain circulation. Under certain conditions albumin possess catalytic activity as a metalloenzyme, with a metal ion cofactor [9,10]. There are 4 known metal binding sites on HSA. N-terminal site (NTS), multi-metal binding site (MBS) or Site A, Site B, and Cys34. Each one differing in structure and metal ion specificity. NTS is composed of the first 4 residues of albumin sequence and prefers metal ions capable of square planar complex formation such Cu^{2+} and Ni^{2+} . MBS is formed by the amino acids Asn99, His247, His67, Asp249 and is the preferential site for Zn^{2+} , and is also a secondary binding site for Cu^{2+} . Site B is the primary site for Mn^{2+} ions and the second Cd^{2+} site; it has not been localized so far. Cys34 is located between helix 2 and helix 3 of sub-domain IA and it binds non-specifically to metal ions with a single metal-sulfur bond [11].

NTS is the first copper binding site in albumin forming a penta-coordinate structure with two peptide nitrogens: nitrogen 3 of the histidine ring and an aspartyl carboxylate group as ligands when histidine is in the third position, such as HSA and GSA [12]. Ni^{2+} , Zn^{2+} and Cd^{2+} can displace the Cu^{2+} from the second Cu^{2+} site but not from the first stronger bound site [13]. For this reason, it has been proposed the hypothesis that the catalytic site of the A-esterase activity of avian albumins is the NTS [14]. The insecticide trichloronate was observed to be hydrolyzed by GSA when it was incubated with copper [8]. Therefore, the aim of this work is to explore the proposed hypothesis through docking and molecular dynamics, studying the docking of trichloronate to GSA containing bound copper, and a molecular dynamic approach of the binding of copper to the albumin. The interest in this research is not only in medical field but also as an alternative in biotechnological applications for enantiomeric synthesis, protein engineering and bioremediation.

2. Material and methods

2.1. Protein and ligand structure

Preparation of GSA crystallized structure and ligand.

GSA crystallized structure (PDB: 5ORI) was chosen for molecular docking. This structure has no ligand trichloronate and no copper bonded. Therefore, we used the crystallized protein as negative control. UCSF Chimera was used to bind one Cu^{2+} ion at NTS based on the crystallized structure of the NTS human albumin tetrapeptide complex (DAHK) bond to Cu^{2+} (CCDC: 809109). GSA NTS sequence is DTHK while the crystallographic structure from HSA (CCDC) has a DAHK sequence. This structure was chosen because it is the only crystallographic report available for albumin NTS sequence with copper. Although NTS from HSA and GSA is not the same, it is 75% similar and the second amino acid in this sequence has been shown not to be essential for divalent cation binding [15]. Trichloronate was drawing on Avogadro 1.2 software.

2.2. Docking analysis

Site-directed docking was performed placing a box for the NTS size. Blind docking was done to look for an additional binding site for the ligand trichloronate. For each structure we ran docking 100 times with Autodock Vina with statistical proposes, calculating root-mean-square deviation (RMSD) vs the first output and the binding energy. The most repetitive structure was taken to form a complex with ligand trichloronate. Software Maestro 12.0 (Schrödinger) was used for visualizing the amino acids in the complex interacting with ligand and copper ion.

2.3. Molecular dynamic analysis

For molecular dynamics the structure 5ORI modify with USCF Chimera to bind copper was taken to run 100 ns with GROMACS. Online graphical interface CHARMM-GUI [16–18] was used to generate GROMACS inputs. Boundary periodic conditions, temperature (310.5 K), salt concentration (0.15 M KCl), disulfide bonds and the force field (CHARMM36 m) were established. Once the input was generated, 100 ns of simulation were run in GROMACS on a supercomputer (UNAM “Miztli”). VMD 1.9.3. was used to visualize the results. RMSD and root-mean-square fluctuation (RMSF) was calculated.

Table 1
Average energy calculations for molecular docking.

Cofactor	Docking type	E (Kcal/mol)
Negative-Control ^a	Blind	-6.01
	Direct	-3.51
GSA-Copper	Blind	-5.80
	Direct	-3.81

^a Negative control measures the binding of trichloronate to goat albumin in the absence of copper.

3. Results and discussion

3.1. Molecular docking

We take the crystallized structure of GSA (PDB: 5ORI) and binding to a copper atom at the NTS, based on the crystallized structure of the Cu²⁺-DAHK complex (CCDC: 809109), which is the tetrapeptide of HSA amino acids of the NTS with Cu²⁺. This structure is complementary to

Predki experiments [19], showing that albumins have His at position 3 of the N-terminus form a pentacoordinate structure with nitrogens as ligands that specifically bind Cu²⁺ and Ni²⁺ (Fig. 1).

The hypothesis was that bind the copper atom at NTS, the ligand trichloronate was going to bind at that site. For this a directed docking was made, placing a box of sufficient size for the NTS. In addition, blind docking was done to look for some additional binding site of ligand trichloronate to the protein. As the structure with copper is not crystallized, but was a computational modelling, as a control, the crystallographic structure 5ORI without the copper atom was used. Up to 100 runs were done in the Autodock Vina program (for each docking), calculating at the output the RMSD and binding energy. For the calculation of the RMSD all the outputs were compared vs the structure of the first output of Vina, since we had no crystallographic structure of the protein with trichloronate or with copper.

The calculated energy values with RMSD <1 (Table 1) measures the affinity of the protein to the ligand trichloronate. The lower the energy, the greater the affinity. The energy is lower in the blind docking than that obtained in the directed one for both copper and non-copper

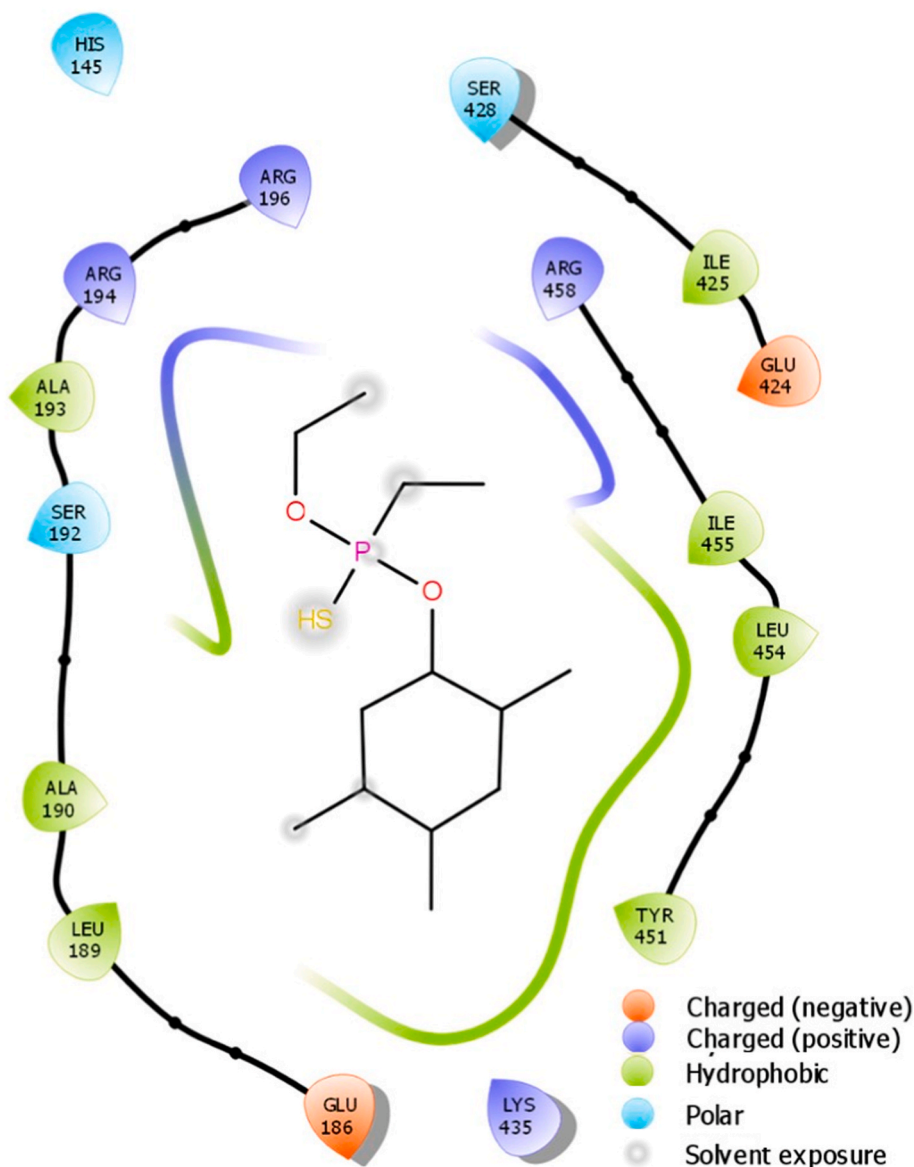


Fig. 2. Most repeated structure of blind docking

This figure shows the amino acids involved in trichloronate binding to GSA while the copper ion is bound to NTS. A complex was form with albumin structure output from Vina and the ligand input. This complex was visualized with Maestro from Schrödinger.

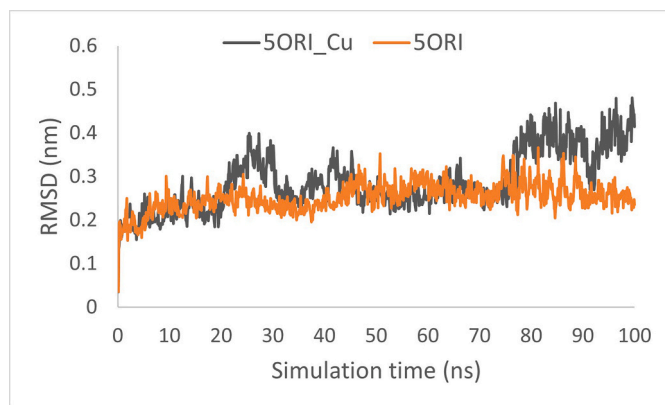


Fig. 3. RMSD plot of output structures from GROMACS molecular dynamics simulation.

This graphic shows of the alpha carbons of the output structures in 100 ns simulation in GROMACS compared to the input structure after system balance. In orange the control of 5ORI, in black the simulation of 5ORI with copper.

conditions. The energy is lower in the conditions without copper for blind docking. However, in the site-directed docking it is lower in the conditions with copper. This suggests that, in the simulated conditions, the copper atom confers stability at the NTS to the protein so that it binds at that site. Moreover, there is another site of the protein where the ligand trichloronate has higher affinity. To find the most frequent predicted structure RMSD was calculated using first Vina outputs because of the lack of crystallographic ligand with copper (Fig. 1).

There are many possible structures in blind docking, both with and without copper. 25 times was the highest frequency (out of 100 analyzed). For site-directed docking there are two possible structures, and that the frequency of one is higher in docking with copper. To know which amino acids are involved in the binding of the trichloronate in these structures that are most repeated was used the Maestro program of the Schrödinger interface. The results are shown in Fig. 2.

The trichloronate leaving group is stabilized by interactions with the neutral amino acids Ala, Leu, Ile, and Tyr bound to the chlorine atoms of the benzene ring. The diethoxy and diethyl groups are bound to positively charged Arg residues. The phosphorus atom and the thiol group are exposed to the solvent. His145 does not seem to bind directly to trichloronate, however it could be involved in binding to the copper atom as has been reported [20].

In blind docking, none of the predicted structures bind to the NTS (with or without copper) and in site-directed docking, although it binds to the NTS, trichloronate is exposed to the solvent, which would justify that the binding energy is lower in this area than in the rest of the protein.

To confirm the hypothesis that the NTS is the ligand binding site, the energy would have to be lower in the site-directed docking than in blind docking, and that the most repeated structure in the blind docking had the ligand at the NTS. However, this is not observed in the conditions that were simulated. Since there are 2 variables (the bond of the copper atom and the binding to the ligand), it was decided to eliminate the ligand and study the copper atom binding to the protein. For this, a study of molecular dynamics was carried out.

3.2. Molecular dynamics simulation

To prepare the simulation system, the online graphical interface CHARMM-GUI was used. A complex was formed with crystallographic structure 5ORI and a copper atom binding in NTS based in structure CCDC: 809109. This complex (protein + copper) was used as the input. Physiological conditions of pressure, temperature, and salt concentration (KCl) and disulfide bonds were established. The force field was Charmm36 M. Once the simulation system was generated, 100 ns of

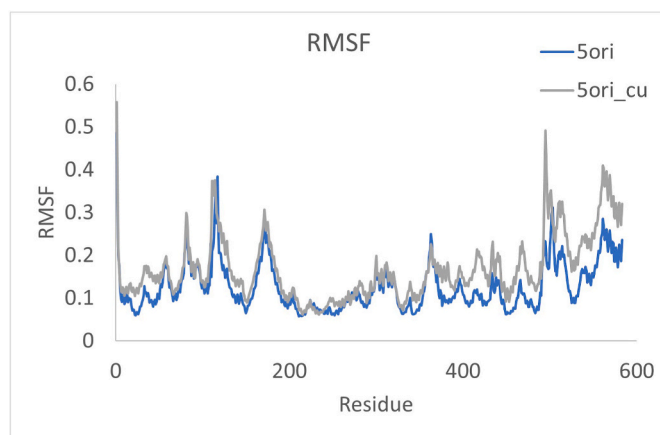


Fig. 4. RMSF plot from GROMACS molecular dynamics simulation after 100 ns

This graphic shows the alpha carbons of the 583 protein residues at the final of simulation time (100 ns). In blue the 5ORI control, in grey the structure with copper.

simulation were run with GROMACS on the UNAM supercomputer (Miztli). A dynamic system from 5ORI structure without copper under the same conditions was used as a control.

Fig. 3 shows the control simulation of 5ORI in orange, and it is observed that it is stable in time after 20 ns, the time it takes for the dynamics to stabilize. By adding the copper atom (in black) the simulation is more unstable, the protein opens and closes during the entire simulation. To compare the movement of residues over time, the RMSF was calculated (Fig. 4).

In Fig. 4, the residues movement of 5ORI protein during the running time in both dynamics is observed. The blue line corresponds to the control (the crystallographic structure) and in grey the 5ORI structure with copper. The movement in the first 300 amino acid is similar in both dynamics. The dynamics differ between amino acids 374 and 583, being the greatest difference with residue 495.

Residues 1–4, which correspond to the N-terminus, have the largest RMSF variation in both dynamics, regardless of the copper atom. There was no difference between 5ORI protein with copper and its control. Copper did not appear to be binding at NTS when visualizing the dynamics in VMD 1.9.3 software. The copper atom does not bind to NTS at any time in simulation. In conclusion, copper atom did not bind in this region (NTS) in this molecular dynamic simulation.

The HSA crystallographic structure (PDB: 5YB1) that binds to an anticancer copper prodrug (8zr) was found in the literature [20]. The molecule of this prodrug has one copper atom in its structure (Fig. 5). The copper atom binds 8 ZR drug to HSA in His 146. His 146 on HSA is equivalent to His 145 on GSA. Further, this drug has a bond copper-sulfur in the molecule and this sulfur atom binds to the rest of the molecule with a double bond. Although the 8zr molecule is not like trichloronate, the way it binds to albumin appears to be similar. These results suggest that His145 could be part of the GSA catalytic site.

To test this hypothesis, a knock-out mutant could be made on His145. If activity is lost, it would indicate that this amino acid and its chemical environment are important for OP hydrolysis. These preliminary studies may serve to the base to improve albumin as an A-esterase, modifying it to hydrolyze a wider variety of substrates or to make reactions more efficient. These results do not rule out the NTS participation in trichloronate hydrolysis. NTS could be an allosteric site or giving GSA the conformation to activate it as A-esterase.

4. Conclusions

The affinity energy in blind docking (-5.80 kcal/mol) was about two

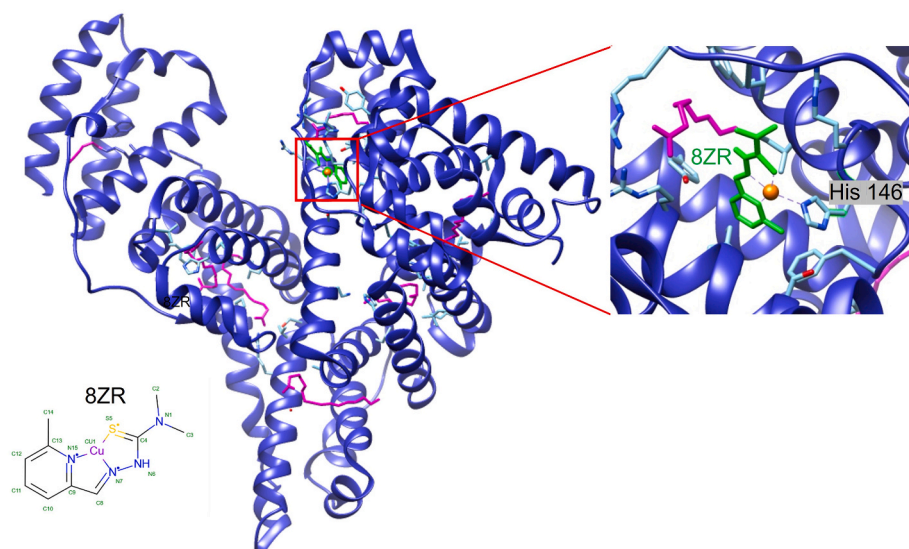


Fig. 5. Copper prodrug 8ZR binding site to HSA (PDB: 5YB1).

Crystallographic structure of HSA with fatty acids (palmitic acid, pink) that had been used to bind an anticancer drug (8ZR, green) with a copper atom in the molecule. This structure was taken from the Protein Data Bank (PDB: 5YB1). For the simulation we cleaned the structure by removing the palmitic acids. The binding amino acid is His146. The chemical structure of 8ZR is shown in the figure below left.

times lower than site-directed docking (-3.81 kcal/mol), when Cu^{2+} was bound, as negative control was (blind docking: -6.01 kcal/mol; site-directed docking -3.51 kcal/mol) suggesting that the protein has one or more sites with higher affinity for the ligand than the N-terminal site. None of the known ligand binding sites correspond to the copper binding site neither in the docking nor in the simulation by dynamics; the HSA-copper bind from 5YB1 seems to be like GSA-copper bind from blind docking, on His 145/146, so GSA His 145 seems to be involved in catalytic site.

Author contribution

Elizabeth Undiano, César Millán-Pacheco, Marcela Ayala and Antonio Monroy-Noyola design objectives. Elizabeth Undiano and César Millán-Pacheco designed computational approaches and performed molecular docking and dynamics. Marcela Ayala contributes to the result interpretation. Elizabeth Undiano and Antonio Monroy-Noyola wrote the manuscript.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

No data was used for the research described in the article.

Acknowledgements

This work was supported by computational resources from LANCAD 83-2021 and 39-2022 projects in UNAM supercomputer "Miztli" node. Take in part from the experimental work of the Ph. D. student Elizabeth Undiano, who received a fellowship CONACYT 663707. This work is part of the project financed by the CONACYT/F003 project number 840801.

References

- [1] W. Boedeker, M. Watts, P. Clausing, E. Marquez, The global distribution of acute unintentional pesticide poisoning: estimations based on a systematic review, *BMC Publ. Health* 20 (1) (2020) 1875, <https://doi.org/10.1186/s12889-020-09939-0>.
- [2] E. Vilanova, M.A. Sogorb, The role of phosphotriesterases in the detoxication of organophosphorus compounds, *Crit. Rev. Toxicol.* 29 (1) (1999) 21–57, <https://doi.org/10.1080/10408449991349177>.
- [3] O. Lockridge, W. Xue, A. Gaydoss, H. Grigoryan, S.J. Ding, L.M. Schopfer, S. H. Hinrichs, P. Masson, Pseudo-esterase activity of human albumin: slow turnover on tyrosine 411 and stable acetylation of 82 residues including 59 lysines, *J. Biol. Chem.* 283 (33) (2008) 22582–22590, <https://doi.org/10.1074/jbc.M802555200>.
- [4] M.A. Sogorb, A. Monroy-Noyola, E. Vilanova, Chicken serum albumin hydrolyzes dichlorophenyl phosphoramidates by a mechanism based on transient phosphorylation, *Chem. Res. Toxicol.* 11 (12) (1998) 1441–1446, <https://doi.org/10.1021/tx980015z>.
- [5] A. Monroy-Noyola, M.A. Sogorb, N. Díaz-Alejo, E. Vilanova, Copper activation of organophosphorus compounds detoxication by chicken serum, *Food Chem. Toxicol.* 106 (Pt A) (2017) 417–423, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.05.055>.
- [6] A. Monroy-Noyola, M. Sogorb, E. Vilanova, Albumin, the responsible protein of the Cu^{2+} -dependent hydrolysis of O-hexyl O-2,5-dichlorophenyl phosphoramidate (HDCP) by chicken serum "antagonistic stereoselectivity", *Food Chem. Toxicol.* 120 (2018), <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.07.047>.
- [7] D. Almenares-López, A. Monroy-Noyola, Copper(II)-dependent hydrolysis of trichloronate by turkey serum albumin, *Chem. Biol. Interact.* 308 (2019) 252–257, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.05.039>.
- [8] E. Undiano, S. Chávez, P. Mederos, M. Ayala, A. Monroy-Noyola, Cu^{2+} -dependent stereoselective hydrolysis of a chiral organophosphonothioate insecticide for domestic mammals' sera and its albumins, *Food Chem. Toxicol.* 155 (2021), 112408, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112408>.
- [9] R. Raoufina, A. Mota, N. Keyhanvar, F. Safari, S. Shamekhi, J. Abdolizadeh, Overview of albumin and its purification methods, *Adv. Pharmaceut. Bull.* 4 (2016) 495–507, <https://doi.org/10.15171/apb.2016.063>.
- [10] D. Albanese, N. Gaggero, Albumin as a promiscuous biocatalyst in organic synthesis, *RSC Adv.* 5 (2015) 10588–10598, <https://doi.org/10.1074/jbc.M802555200>.
- [11] W. Bal, M. Sokołowska, E. Kurowska, P. Faller, Binding of transition metal ions to albumin: sites, affinities and rates, *Biochim. Biophys. Acta* 1830 (12) (2013) 5444–5455, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.06.018>.
- [12] M. Sendzik, M.J. Pushie, E. Stefaniak, K.L. Haas, Structure and affinity of $\text{Cu}(\text{I})$ bound to human serum albumin, *Inorg. Chem.* 56 (24) (2017) 15057–15065, <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.7b02397>.
- [13] W. Bal, J. Christodoulou, P.J. Sadler, A. Tucker, Multi-metal binding site of serum albumin, *J. Inorg. Biochem.* 70 (1) (1998) 33–39, [https://doi.org/10.1016/s0162-0134\(98\)00010-5](https://doi.org/10.1016/s0162-0134(98)00010-5).
- [14] A. Monroy-Noyola, M.A. Sogorb, D. Almenares-Lopez, E. Vilanova, DAEH N-terminal sequence of avian serum albumins as catalytic center of $\text{Cu}(\text{II})$ -dependent organophosphorus hydrolyzing A-esterase activity, *Chem. Biol. Interact.* 345 (2021), 109524, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109524>.
- [15] Suresh de Silva, Rohini M. de Silva, K.M. Nalin de Silva, Molecular mechanics (MM), molecular dynamics (MD) and semi-empirical study of Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} and Cd^{2+} binding to N-terminal of human serum albumin (HSA), *J. Mol. Struct-theochem.* 711 (2004) 73–81, <https://doi.org/10.1016/j.theochem.2004.08.031>. ISSN 0166-1280.
- [16] B.R. Brooks, C.L. Brooks 3rd, A.D. Mackerell Jr., L. Nilsson, R.J. Petrella, B. Roux, Y. Won, G. Archontis, C. Bartels, S. Boresch, A. Caffisch, L. Caves, Q. Cui, A. R. Dinner, M. Feig, S. Fischer, J. Gao, M. Hodoscek, W. Im, K. Kuczera, T. Lazaridis, J. Ma, V. Ovchinnikov, E. Paci, R.W. Pastor, C.B. Post, J.Z. Pu, M. Schaefer, B. Tidor, R.M. Venable, H.L. Woodcock, X. Wu, W. Yang, D.M. York, M. Karplus, CHARMM: the biomolecular simulation program, *J. Comput. Chem.* 30 (10) (2009) 1545–1614, <https://doi.org/10.1002/jcc.21287>.

- [17] S. Jo, T. Kim, V.G. Iyer, W. Im, CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM, *J. Comput. Chem.* 29 (11) (2008) 1859–1865, <https://doi.org/10.1002/jcc.20945>.
- [18] J. Lee, X. Cheng, J.M. Swails, M.S. Yeom, P.K. Eastman, J.A. Lemkul, S. Wei, J. Buckner, J.C. Jeong, Y. Qi, S. Jo, V.S. Pande, D.A. Case, C.L. Brooks 3rd, A. D. MacKerell Jr., J.B. Klauda, W. Im, CHARMM-GUI input generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM simulations using the CHARMM36 additive force field, *J. Chem. Theor. Comput.* 12 (1) (2016) 405–413, <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00935>.
- [19] P.F. Predki, C. Harford, P. Brar, B. Sarkar, Further characterization of the N-terminal copper(II)- and nickel(II)-binding motif of proteins. Studies of metal binding to chicken serum albumin and the native sequence peptide, *Biochem. J.* 287 (Pt 1) (1992) 211–215, <https://doi.org/10.1042/bj2870211> (Pt 1).
- [20] J. Wang, Y. Gou, Z. Zhang, P. Yu, J. Qi, Q. Qin, H. Sun, X. Wu, H. Liang, F. Yang, Developing an anticancer copper(II) multitarget pro-drug based on the His146 residue in the IB subdomain of modified human serum albumin, *Mol. Pharm.* 15 (6) (2018) 2180–2193, <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00045>.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Mor., a 20 de abril de 2023

Asunto: asignación de jurado

Folio: FF/D/SI/CIP/DF/039/2023

**M. C. ELIZABETH UNDIANO CICERO
ALUMNA DEL DOCTORADO EN FARMACIA**

PRESENTE

Por este medio le informo que el Consejo Interno de Posgrado (CIP), en su Sesión ordinaria del 19 de abril de 2023, designó a los siguientes sinodales como integrantes de la Comisión Revisora y Jurado para la revisión y evaluación de la tesis titulada **“Hidrólisis de compuestos tiofosfatos por albúminas de suero de mamíferos”**,

Sinodal

Presidente	Dr. José Luis Montiel Hernández ^{NA}
Secretario	Dr. César Millán Pacheco
Vocal 1	Dr. Eugenio Vilanova Gisbert
Vocal 2	Dr. Jaime Escalante García
Vocal 3	Dra. Mayra Guadalupe Avelar Frausto
Suplente 1	Dra. Damianys Almenares López
Suplente 2	Dr. Antonio Monroy Noyola ^{NA}

*NA = Núcleo Académico de Posgrado en Farmacia

Adscripción

Facultad de Farmacia-UAEM
Facultad de Farmacia-UAEM
Universidad Miguel Hernández, Alicante, España
CIQ-UAEM
UAZ
Universidad Popular de Chontalpa
Facultad de Farmacia-UAEM

Se le solicita entregar el presente oficio y manuscrito de tesis a esta comisión, así como dar fluidez a los trámites como se indica en el manual de procedimientos.

Nota (Art. 74 RGEP-UAEM): Los sinodales tendrán un plazo máximo de 20 días hábiles contados a partir de la recepción del documento de tesis para entregar los comentarios de la revisión y para emitir un voto aprobatorio o negatorio. En caso de condicionar el voto a la entrega de un documento en el que el tesista deberá solventar lo revisado, este contará con un plazo no mayor a 20 días hábiles, contados a partir de la notificación del primer dictamen emitido, para integrar las correcciones señaladas, una vez fenecido dicho plazo el sinodal emitirá el voto aprobatorio o negatorio que corresponda.

Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

“Por una humanidad culta”
Una universidad de excelencia

efirma-UAEM

Dr. Sergio Alcalá Alcalá
Jefe de Posgrado en Farmacia

c.c.p Dr. José Luis Montiel Hernández, Dr. César Millán Pacheco, Dr. Eugenio Vilanova Gisbert, Dr. Jaime Escalante García, Dra. Mayra Guadalupe Avelar Frausto, Dra. Damianys Almenares López, Dr. Antonio Monroy Noyola.
c.c.p. Archivo

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México. C.P. 62209, Edificio 61, ala C, 2° piso.
Tel. (777) 329 7000, Ext. 7986 Jefatura de Posgrado en Farmacia, posgrado_ff@uaem.mx





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

SERGIO ALCALA ALCALA | Fecha:2023-04-24 09:59:28 | Firmante

dAfG+MV0d6ywzt4NWmwl8iXt1biBcVEsCXusUfYlPkwCB2XNWv3VWvSV3FTsXNskaj/GRzkw5723CNVkp2kr0hW3vdHSWn13Y9ras7QhA9n5cL3ymHxwnYrUjJwmOKOeAR7R
YauT50WFnE9mnRrM9QdBFgOeHSMoes33b5IGxEWizRQ3k4XmInj4r7C7EeX+489dlcdz0/JBtYoxYf+YtJqeLwzE+ia1AOlzML6I5CUhy4kbkc+CoUwjbaLyMajwXYa7zzwi/Zjml1p
BlfZNftndXrjG3eZ4wkZRJTJHh8ojLYwnGynC6mnnoLlsw6NqMV79QxEmPcnBlvLbjuoGI9Q==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[8kzIBeqIs](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/INa7S8FAY92RTiwJRMw6HDCqbUhL8tAc>





**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Elizabeth Undiano Cicero

Título de la tesis: "Hidrólisis de compuestos tiofosfatos con albúminas del suero de mamíferos"

Grado a obtener:

- Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. José Luis Montiel Hernández

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

- Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

Firma del miembro del jurado

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JOSE LUIS MONTIEL HERNANDEZ | Fecha:2023-11-30 10:23:05 | Firmante

lrmP0QLwWrETeyECz6lG4ZylToPuiRBot26QspUIOmWe1KNVTzqB3CclXAnfr5y2qmzrZeowo3tccY0jXCv76pkYHbAX8ggqKLBgURnjCNI60YUBeoCuODfx+RMBMT+OIL5ViNTEYH/QxPP+re6mgf+leX7tXBYdcuPBqDzcETINrPFdz1kXpSiTY/X+XPeNkbzNlndYnNr8BVK61r2bJXqilbJViEbKOmLrH8RV7PJCs2ShLCqEf3HIWwc4NFxHapGcLRcDap+Qq8YQX9KKUvr57DFIMva5lAr/5ySBREMyCdzDhpgbFdKZkkH+ja0FWp92ak4jVcil8Qx2kut81g==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



IjYvSTGxC

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/xlSGSuB93AOZSWwo24swfuKKCUrmz0A7>





**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Elizabeth Undiano Cicero

Título de la tesis: "Hidrólisis de compuestos tiofosfatos con albúminas del suero de mamíferos"

Grado a obtener:

- Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. César Millán Pacheco

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

- Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

Firma del miembro del jurado

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

CESAR MILLAN PACHECO | Fecha:2023-11-30 00:07:00 | Firmante

THRIFN085r4uSR7DDjBub2W79IW7wlwKj1sEzNVVplOqo0+ttC4k64K0x7si8LDfZ2DasdRYOhZ1tSlezt4rUSXPZMWWZ4pJxZCPaJtd59N7R8t4IN3yVMgp8T0/f145fJW1XrsemPIZAA3Kxt2my+K163mh66QZ1HLNt02pBmfjWzKDCcuCijXghBZderFD0Td3GCOvV7XUCThUKa/ZlvvyqnZ1Cdu8xOSOZOSF8E/4BS2nq11/gRaG9tiq7nyT0Lbfi7UStGQyYkulTrtBP940pV+470cvtvypk9oNrP3L7uLjcnnlRDjvs4G+N4TTToVfrm0W38zstiP6qDCA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[82GuqyOiN](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/yNvPoycsW8GDr0VPc2fgcnAy7cEYOezF>





**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Elizabeth Undiano Cicero

Título de la tesis: “Hidrólisis de compuestos tiofosfatos con albúminas del suero de mamíferos”

Grado a obtener:

- Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Eugenio Vilanova Gisbert

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

- Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

Firma del miembro del jurado

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

EUGENIO VILANOVA GISBERT | Fecha:2023-11-30 07:39:55 | Firmante

lzoqDa1JLLM+BqAdrYrzBEsr62RyDht7FmPGSZw8kmEP6H8dRV57lNkgVrqsEeBhuO5hLygpsDPicK80b35j9UTN75PZoA0NEL7lYm+xA+f0MCj5QfMyyQGr4y8jGGW+dm2MjIifvDdKM+Kb3X7OTkcNOKiYpFJiFAqx9hjAu7cDWrlWw2B/VtUJpcJjEW5N4o9Mqpv27+K278DSkX+La3HHsZt52xnZF2rwONz+bAfMy1h/PcQrZSrQZmXNEzPvg+PiceBR5HcT4B2ARxxcgpqQSVpJSNKtO8Bixt6Ha8L6JTzMWsI0my05dXkCElbuYN4RGrgYU0CoKlvpmyncZQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[CWGyAo3hs](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/JMSV7Mfph0UIbLaZr4VMbWPrLEuRvIKw>





**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Elizabeth Undiano Cicero

Título de la tesis: "Hidrólisis de compuestos tiofosfatos con albúminas del suero de mamíferos"

Grado a obtener:

- Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Jaime Escalante García

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

- Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

Firma del miembro del jurado

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JAIME ESCALANTE GARCIA | Fecha:2023-11-29 20:48:10 | Firmante

O1szlpmtFpGOpMD9VM+wUNCWhlL+kruXZbRtju9olNdm3DdWhf0oXDEHZYKfUjGIGtVyqonLgnHn9NdfZeWIWMWhgmQpZMlwWvEjgvXZEggfJHYT10UpJl7bl3qglI/3A+d1uYRwdEpL2Tpy9felBF9GglZX2kdT0FCmmpUyA71G/b9F8vm8QNIPwOFvmY9lkQqTMULjOqxnXZxt/MLLfggrEefuRWP4guGZkvQpGnrNRGajqpTJULltzUyHUFKsOsubko38e3XWODNbFO/GkoVYeUITT6PhVV0kLpKz1F67Lorl4x1EogQZzK7LCvSyiYw88O4kQmpzGfsQEAA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[CE7LjniK4](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/LIQc2ajOmr9pRHLvtl1tcxCcXXiSAzwi>





**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Elizabeth Undiano Cicero

Título de la tesis: “Hidrólisis de compuestos tiofosfatos con albúminas del suero de mamíferos”

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Mayra Guadalupe Avelar Frausto

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

Firma del miembro del jurado

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MAYRA GUADALUPE AVELAR FRAUSTO | Fecha:2023-12-01 18:35:34 | Firmante

bg96eOz5GVGMruGDynu5Hwk47wN5LAMNHIDzNovjgxCE1QhQhwvx9GSOI5UtpgcFw7xYrQ9UP1zUHSIK/tmRXN2WK+tIWF6qpiJ41ZQ9X/xCStKETr/QfeaaCTXU6O6sCt+E
FPK5L2MG+UVcAbNn5KGmqIX93VEiIOAz0iDkazWF06MevqfA6Q4hxYYStiVFH2h8Oj+jmYwsLyhHkH0uT+NYZ5jPLbeQn7fSp5q/mix1XVB9GEKpa2PmlB03sfUgZai8wboPIHZI
Keg4nhr2cwz8pqMHtlhVqdGM8/wpJjFC96RYucc8TowATIFPBepH0lzmC67gtSBLW2JO9AuvQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[2gTtNEbza](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/FNVboVTYW1XNHCFCoMp2ibL3F4Dwep65>





**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Elizabeth Undiano Cicero

Título de la tesis: "Hidrólisis de compuestos tiofosfatos con albúminas del suero de mamíferos"

Grado a obtener:

- Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Damianys Almenares López

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

- Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

Firma del miembro del jurado

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

DAMIANYS ALMENARES LOPEZ | Fecha:2023-11-29 21:15:41 | Firmante

oA6VKW+hLAlqeIT9NBFCbcel7DW6Rlww0ps1Fs8/7Pvoov5eZ5cv8o0KF3OXMLupVdtyelusrKe11DeNZ7EnJFHN1WmlylpupNmDMiwt45+bmX9boDyp5ogdPrFs3kts843azFAXN
KWwnErPRuAUZpLtFQQZ9c1dA3Kd8LubTzAfOGFy/REwPezoa7NJC24jPAhR3M2ZKYCRKe384C3gYYHNN1xCvOezvt0FYfhQpo4w27WQtleQzI58yuaeZXv2vDrfEVBtMkcSg
KI2CHxQV66EdISYICISKeGe6OQfiUGhPeNmD48WGTaWleRS5Ar79bdP0Vylm5DNtDSG46yQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[rSiGxdIDK](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/0zkkLsCVLuyPYt0CDEvQSB92hYwiKzLF>





**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Elizabeth Undiano Cicero

Título de la tesis: "Hidrólisis de compuestos tiofosfatos con albúminas del suero de mamíferos"

Grado a obtener:

- Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Antonio Monroy Noyola

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

- Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

Firma del miembro del jurado

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ANTONIO MONROY NOYOLA | Fecha:2023-11-29 20:07:56 | Firmante

LF+iFNx696/xq5z9sHQ6OWXvKL1dXzhGqdFeksFXEs7g1/y7KmkGjeprrzwtJeA42vPrJu3Fj/7edvliiKXWeeJMBT3u2vRddMb1xxmuHco8Kb59+Np7bXmFSC5phJPjKCVgdQGYs7gFhE6LxE6g3eBKDoZdpOcGLPN0Ay46lp5DhiWLOFFZczZiPZmCVHZUCZrS2tc0x5J1lcZ0w8TA7drzLCNReiC13+goKFrDCvrnTIJHjbvOLIfniBDalmktM+4J9HbRWNJ+gQ/7XwdAvnork3JG4EoyxFida3dJaGCqRJXawVyR1gLk57zHldE/6VqibsrnycXMeef4iVz/a4w==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



EjPTCptcK

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/8fMTBqHV6aCLI6yAPTuSaoqvyXqEaqF0>

