



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Universidad Autónoma del Estado de Morelos

FACULTAD DE FARMACIA

**“Hidrólisis metal-dependiente de compuestos
organofosforados quirales por péptidos N-terminal de
la albúmina del suero de aves y humano”**

T E S I S

que para obtener el grado de

MAESTRO EN FARMACIA

Presenta

L.F. ANA LAURA RAMÍREZ GONZÁLEZ

Director de Tesis

Dr. ANTONIO MONROY NOYOLA

Cuernavaca, Morelos, 2019



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio 11 de Neuroprotección, en la Facultad de Farmacia, de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), bajo la dirección del Dr. Antonio Monroy Noyola. Durante la elaboración de esta tesis se contó con el apoyo del CONACYT a través de la *Beca de Maestría No. 825905*.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	II
ABREVIATURAS	III
ABSTRACT	VI
RESUMEN	V
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Clasificación	2
1.2 Usos	3
1.3 Vías de entrada al organismo.....	4
1.4 Regulación de los plaguicidas en México	4
2. ANTECEDENTES	5
2.1 Compuestos organofosforados.....	6
2.2 Mecanismo de toxicidad de compuestos OP's.....	7
2.3 Toxicocinética de compuestos OPs.....	8
2.3.1 Metabolismo.....	8
2.3.1.1 Reacciones de fase I.....	8
2.3.1.2 Reacciones de fase II.....	9
2.3.2 Bioactivación de OP's	10
2.3.3 Detoxificación	10
2.3.4 Eliminación	10
2.4 Síndrome colinérgico	10
2.5 Tratamiento farmacológico	11
2.6 Polineuropatía Retardada Inducida por Organofosforados	12
2.7 Clasificación de enzimas esterasas	13
2.7.1 A-Esterasas	13
2.7.2 B-Esterasas	13
2.7.3 C-Esterasas	13

2.7.4 Mecanismo de interacción de esterasas con los OP's	13
2.7.5 Activadores e inhibidores de PTE's	14
2.7.6 Estereoespecificidad de PTE's	14
2.8 Paraoxonasa-1	14
2.8.1 Mecanismo catalítico de PON-1	15
2.8.2 Sustratos de PON-1	16
2.9 Metamidofós.....	16
2.10 HDCP	17
2.11 TCN	18
2.12 Albúmina sérica humana	19
2.12.1 Unión a metales	19
2.12.1.1 Sitio N-terminal	20
2.12.1.2 Multi-metal Bindig Site	20
2.12.1.3 Sitio Cys-34	20
2.12.2 Actividad fosfotriesterasa asociada a la albúmina	20
3. JUSTIFICACIÓN.....	22
4. HIPÓTESIS.....	24
5. OBJETIVOS.....	26
5.1 Objetivo General.....	27
5.2 Objetivos específicos.....	27
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
6.1 Reactivos.....	29
6.2 Equipos empleados.....	31
6.2.1 Espectrofotómetro UV/Visible.....	31
6.2.2 Balanza.....	31
6.2.3 Potenciómetro.....	31
6.2.4 Baño de temperatura constante.....	31

6.3 Metodología	32
6.3.1 Obtención del péptido	32
6.3.2 Ensayos de hidólisis de HDCP	32
6.3.3 Ensayos de hidrólisis de Tricloronato	33
7. RESULTADOS	34
7.1 Hidrólisis metal-dependiente de HDCP por los péptidos DAEHK del sitio N-terminal de la albúmina sérica de pollo y DAHK del sitio N-terminal de la albúmina sérica humana.....	35
7.1.1Hidrólisis cobre-dependiente de HDCP por péptidos del sitio N-terminal de la albúmina.....	36
7.1.2 Hidrólisis cobre-dependiente de HDCP por los péptidos DAEHK y DAHK a diferentes concentraciones.	36
7.1.3 Hidrólisis metal-dependiente de HDCP por los péptidos DAEHK y DAHK.....	37
7.2 Hidrólisis metal-dependiente de TCN por los péptidos DAEHK del sitio N-terminal de la albúmina sérica de pollo y DAHK del sitio N-terminal de la albúmina sérica humana.	39
7.2.1 Hidrólisis metal-dependiente de TCN por los péptidos DAEHK y DAHK.....	40
8. DISCUSIÓN.....	42
9. CONCLUSIÓN.....	45
10. PERSPECTIVAS.....	47
11. BIBLIOGRAFÍA.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Hidrólisis de ésteres por esterasas (A) e inhibición de esterasas por compuestos organofosforados (B)	7
Figura 2. Inhibición de la AChE (E) por organofosforados	11
Figura 3. Inhibición de la NTE (E) por organofosforados.....	12
Figura 4. Estructura de la paraoxonasa.....	15
Figura 5. Estructura química del metamidofós	16
Figura 6. HDCP análogo del insecticida metamidofós.....	18
Figura 7. Sitios de unión a metales en la albúmina humana sérica (HSA).....	19
Figura 8. Curva de calibración del 2,5-DCP.....	35
Figura 9. Curva de calibración de 2,4,5-triclorofenol	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los plaguicidas de acuerdo a su toxicidad	2
Tabla 2. Clasificación de los plaguicidas de acuerdo a su estructura química.....	3
Tabla 3. Reactivos utilizados.....	29
Tabla 4. Preparación de soluciones	30
Tabla 5. Hidrólisis cobre-dependiente de HDCP por péptidos del sitio <i>N</i> -terminal de la albúmina sérica de pollo y la albúmina sérica humana	36
Tabla 6. Hidrólisis cobre-dependiente de HDCP por los péptidos DAEHK y DAHK a diferentes concentraciones.....	37
Tabla 7. Hidrólisis metal-dependiente de HDCP por los péptidos DAEHK y DAHK.....	38
Tabla 8. Hidrólisis metal-dependiente de TCN por los péptidos DAEHK y DAHK.	41

ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
AAP	Aminoantipirina
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
Al ³⁺	Aluminio
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
Au	Oro
Ca ²⁺	Calcio
Cd ²⁺	Cadmio
Co ²⁺ /Co ³⁺	Cobalto
CSA	Chicken Serum Albumin
Cu ⁺ /Cu ²⁺	Cobre
CuSO ₄	Sulfato de cobre anhidro
Cys	Cisteína
DCP	2,5-diclorofenol
DFP	Diisopropilfluorofosfato
HAS	Human Serum Albumin
HCl	Ácido clorhídrico
HDCP	O-hexil O-2,5 diclorofenil fosforamidato
Hg ²⁺	Mercurio
His	Histidina
KDa	Kilodaltones
Mg ²⁺	Magnesio
Mipafox	N,N-diisopropilfosforodiamidofluoridato
mL	Mililitros
mM	Milimolar

Mn²⁺

Manganeso

ABREVIATURA

SIGNIFICADO

MnCl₂

Cloruro de manganeso

NaOH

Hidróxido de sodio

Ni/Ni²⁺

Níquel

nm

Nanómetros

NTE

Esterasa blanco de la neuropatía

OPs

Organofosforados

Pt²⁺

Plomo

SDS

Dodecil sulfato de sodio

SNC

Sistema Nervioso Central

Somán

1,2,2-trimethylpropyl

Methylphosphonofluoridate

Tb³⁺

Terbio

TSA

Turkey Serum Albumin

µg

Microgramos

µM

Micromolar

µL

Microlitros

UV/VIS

Ultravioleta/Visible

Zn²⁺

Zinc

RESUMEN

El HDCP y el tricloronato son insecticidas quirales útiles en el desarrollo agrícola y la eliminación de plagas domésticas, pero su toxicidad aguda y carencia de especificidad sobre organismos blanco, los convierte en un problema de salud pública. Producen síndrome colinérgico y neuropatía retardada característica de los compuestos organofosforados quirales. Las fosfotriesterasas de varias especies hidrolizan este tipo de compuestos lo que hace pensar en ellas como un valioso recurso terapéutico. Este tipo de actividad es dependiente de metales como cobre. Se ha reportado que la albúmina sérica de pollo en presencia de cobre hidroliza de forma estereoselectiva al R(+)-HDCP. Por esta razón en este estudio exploramos el efecto de péptidos sobre la hidrólisis del HDCP y del tricloronato mediante las técnicas de espectrofotometría, que detecta el grupo saliente liberado durante la hidrólisis para determinar si el sitio *N*-terminal de la albúmina de dos diferentes especies hidrolizan estos compuestos OP's de la misma manera que la proteína completa.

ABSTRACT

HDCP and trichloronate are chiral insecticides useful in agricultural development and the elimination of domestic pests, but their acute toxicity and their lack of specificity on target organisms, makes them a public health problem. They produce cholinergic syndrome and delayed neuropathy characteristic of chiral organophosphorus compounds. The phosphotriesterases of several species hydrolyze this type of compounds, which makes them think of as a valuable therapeutic resource. This type of activity is dependent on metals such as copper. It has been reported that chicken serum albumin in the presence of copper hydrolyses stereoselectively to R(+)-HDCP. For this reason, in this study we explored the effect of peptides on the hydrolysis of HDCP and trichloronate by spectrophotometry techniques, which detects the leaving group released during hydrolysis to determine if the *N*-terminal site of albumin of two different species hydrolyze these OP compounds in the same way as the complete protein.

1. INTRODUCCIÓN

La FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) define a un plaguicida como “una sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo vectores de enfermedad humana y animal capaces de causar daños o interferir de cualquier otra forma con la producción, procesamiento, almacenamiento, transporte o mercado de los alimentos, otros productos agrícolas, madera y sus derivados o alimentos animales”.

1.1 Clasificación

Los plaguicidas pueden clasificarse de la siguiente manera (Fernández *et al*, 2010; Plaguicidas, 2016):

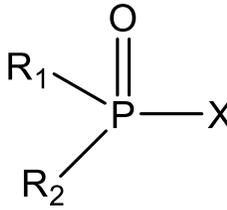
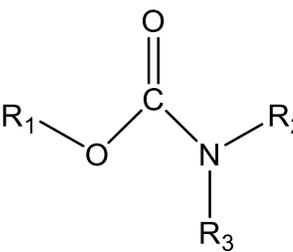
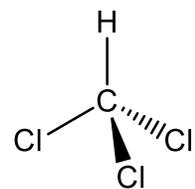
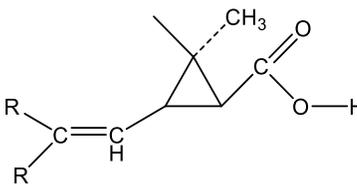
- a) *De acuerdo con su función:* insecticidas, herbicidas, fungicidas, nematocidas, acaricias, etc.
- b) *Persistencia en el ambiente:* Ligeramente persistentes (menor a 4 semanas), poco persistentes (4-26 semanas), moderadamente persistentes (27-52 semanas), altamente persistentes (1-20 años), permanentes (mayor a 20 años).
- c) *Grado de toxicidad:* (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de los plaguicidas de acuerdo a su toxicidad.

Categoría	Definición	DL₅₀ (oral aguda en ratas)
I	Extremadamente tóxicos	0-50 mg/kg
II	Altamente tóxicos	5-50 mg/kg
III	Medianamente tóxicos	50-500 mg/kg
IV	Ligeramente tóxicos	Mayor de 500 mg/kg

- d) *Estructura química:* en esta clasificación encontramos los compuestos organofosforados (OP's), carbamatos, organoclorados y piretroides. (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de los plaguicidas de acuerdo a su estructura química.

Clasificación	Estructura química	Mecanismo de toxicidad	Ejemplos
Organofosforados		Inhibe de forma irreversible la enzima acetilcolinesterasa	Metamidofos, paratión, clorpirifos, diazinon.
Carbamatos		Inhibe de forma irreversible la enzima acetilcolinesterasa	Carbaril, carbofuran, aldicarb.
Organoclorados		Inhiben la actividad de las ATP-asas relacionadas con la fosforilación oxidativa.	DDT, endrín, aldrín.
Piretroides		Actúan sobre el sistema nervioso central.	Permetrina, aletrina, decametrina.

1.2 Usos

El uso de los plaguicidas es ampliamente variado. Aproximadamente el 85% de la producción mundial es utilizada en la agricultura; un 10% es utilizado en actividades de salud pública (control de enfermedades transmitida por vectores). Además de estos usos, los plaguicidas se emplean en la ganadería, mantenimiento de áreas verdes y de reservas de agua, en la industria, así como en el hogar (Ramírez, J. A. & Lacasaña, M., 2001).

1.3 Vías de entrada al organismo

Los plaguicidas ingresan al organismo a través de la piel, la vía respiratoria, digestiva y ocular. Como caso especial, el ingreso puede ocurrir mediante las heridas (ACHS, 2014). Debido al amplio uso que tienen los plaguicidas y la facilidad con la que entran en el organismo, el uso excesivo provoca envenenamientos en organismos no blanco, incluyendo los humanos. Los principales agentes implicados en la intoxicación de humanos, animales domésticos y salvajes son los OP's. De ahí se deduce la necesidad de investigar las enzimas implicadas en la biotransformación y detoxificación de compuestos organofosforados.

1.4 Regulación de los plaguicidas en México

El uso de plaguicidas en México es una práctica frecuente. Existen dependencias encargadas de la regulación de los plaguicidas. Las instancias encargadas de la regulación de los plaguicidas son la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) encargado de regular la eficacia biológica de los productos para uso agrícola; la Secretaría de Salud (SSA) quien se encarga de los aspectos sanitarios; la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) regula el impacto que tienen los plaguicidas al medio ambiente; el transporte de estas sustancias es regulado por la Secretaría de Comunicaciones y Transporte (SCT) y la Secretaría del Trabajo y Previsión Social (STPS) emite los criterios de higiene y seguridad industrial. (Ortiz, Ávila-Chávez & Torres, 2014).

La Dirección General de Epidemiología (DGE) reportó alrededor de 4,000 casos de intoxicaciones por plaguicidas en 2016. Los estados que reportan el uso de plaguicidas son Campeche, Chiapas, Estado de México, Morelos, Nayarit, Puebla, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán.

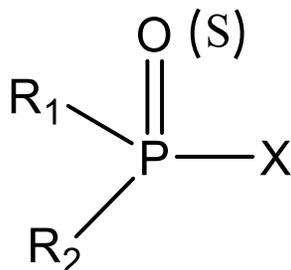
Dentro de la clasificación de los plaguicidas según su función, los insecticidas son los pesticidas de mayor uso (45%), seguido de herbicidas (30.5%) y fungicidas (20.1%). De acuerdo a la clasificación según su estructura química, los insecticidas más vendidos pertenecen al grupo de los OP's (50%), seguido de los piretroides (20%), carbamatos (8%), organoclorados (8 %) y otros (14 %) (García Hernández et al., 2018).

2. ANTECEDENTES

2.1 Compuestos organofosforados

Químicamente, los insecticidas organofosforados (OP's), son ésteres del ácido fosfórico.

Su fórmula básica es:



Donde:

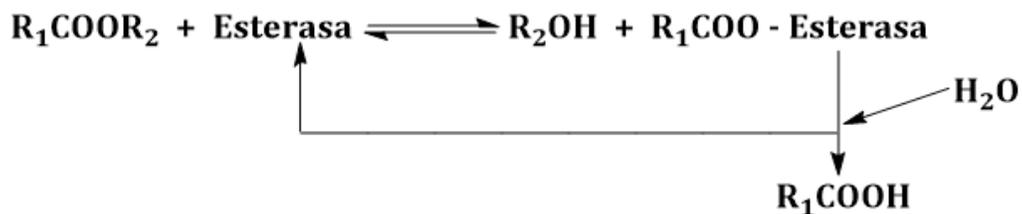
R₁ y R₂ corresponden a radicales alquilo o arilo que se unen al átomo de fósforo directamente (formando fosfinatos) o mediante un átomo de fósforo o azufre (para formar fosfatos o fosfotionatos, respectivamente). En los fosforamidatos al menos uno de los radicales se une al átomo de fósforo mediante un grupo NH₂. El grupo "X" corresponde al grupo saliente de la reacción, pudiendo ser un halógeno, un grupo alifático, aromático o un grupo heterocíclico. Este grupo puede estar unido al átomo de fósforo a través de un oxígeno o un azufre y es el grupo que llega a separarse cuando el OP reacciona de forma covalente con la proteína diana (Mangas, Estevez, Vilanova & Costa Franca, 2016; Vilanova & Sogorb, 1999).

En general, los OP's, son los insecticidas de mayor potencia tóxica, debido a que tienen la propiedad de inhibir enzimas con actividad esterásica, específicamente la inhibición de acetilcolinesterasa (AChE) en las sinapsis neuromusculares, lo que genera una acumulación de acetilcolina ocasionando el síndrome colinérgico típico de la intoxicación aguda (Córdoba P, 2001; Fernández *et al*, 2010). Además de la inhibición de la AChE por OP's también inhiben la esterasa blanco de neuropatía (NTE) produciendo un segundo efecto conocido como Polineuropatía Retardada Inducida por Organofosforados (OPIDP), la cual se manifiesta de 2 a 3 semanas después de una intoxicación aguda. Esta polineuropatía se asocia con la inhibición de al menos un 70% de la NTE y está caracterizado principalmente por ataxia y parálisis flácida de los miembros inferiores (Jokanovic, 2001).

2.2 Mecanismo de toxicidad de compuestos OP's

Los OP's ejercen su mecanismo de acción a través de la inhibición covalente de enzimas B-esterasas. Las B-esterasas son enzimas capaces de hidrolizar carboxilésteres pero son inhibidas en presencia de OP's mediante la unión covalente del OP's con un residuo de serina en el sitio activo de la enzima (Figura 1). La inhibición de esta enzima origina una sobreestimulación en los receptores muscarínicos y nicotínicos de la acetilcolinesterasa (Mangas, Estevez, Vilanova & Costa Franca, 2016; Vilanova & Sogorb, 1999).

(A)



(B)

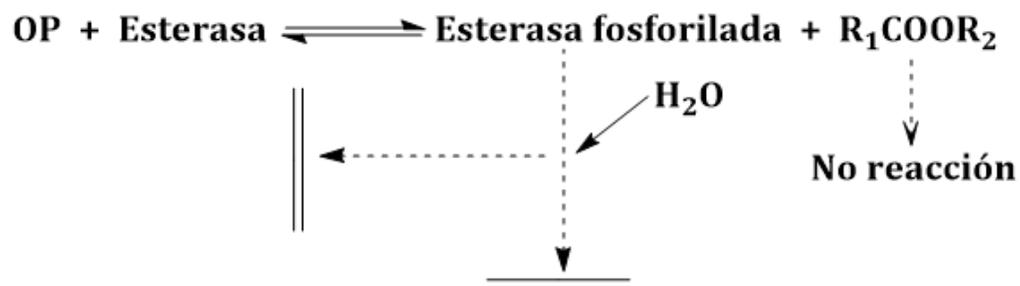


Figura 1. Hidrólisis de ésteres por esterasas (A) e inhibición de esterasas por compuestos organofosforados (B). El complejo R_1COO -esterasa es hidrolizado quedando la esterasa libre para hidrolizar más sustrato (R_1COOR_2). La esterasa fosforilada no es capaz de reaccionar con el sustrato y no puede ser reactivada con moléculas de agua, por lo que esta inhibición produce una sobreestimulación de los receptores muscarínicos y nicotínicos.

2.3 Toxicocinética de compuestos OP's

Los OP's ingresan al organismo a través de diferentes vías como la vía respiratoria, por ingestión y a través de la piel. Debido a que tienen la característica de ser altamente liposolubles son rápidamente absorbidos (Fernández *et al*, 2010).

2.3.1 Metabolismo

Una vez que el OP ingresa al organismo y es distribuido, es metabolizado por el citocromo P-450 (CYP-450). Las familias 3A4 y 2D6 del CYP450 están involucradas en la detoxificación de los OP's a través de reacciones de oxidación y reducción (Cohen, Friedman, Zimmermann & Soreq, 2010). La detoxificación de los OP's incluye su biotransformación a metabolitos menos tóxicos. La biotransformación es la combinación de reacciones enzimáticas que introduce cambios dentro de la estructura química del xenobiótico para incrementar su velocidad de excreción. La biotransformación de compuestos OP's puede dar como resultado sustancias químicamente inactivas o con toxicidad reducida. Por el contrario, el resultado de la biotransformación puede generar sustancias con mayor toxicidad que el compuesto original (Ramírez, J. A. & Lacasaña, M., 2001; Sogorb, M., & Vilanova, E., 2010).

Las reacciones de biotransformación de OP's pueden dividirse en: reacciones de fase I (reacciones de reducción, oxidación e hidrólisis), y las reacciones de fase II (reacciones de conjugación) (Jokanovic, M., 2001).

2.3.1.1 Reacciones de fase I

En las reacciones de fase I, un grupo polar, como el grupo hidroxilo (OH), el grupo carboxilo (COOH), un grupo tiol (SH) o un grupo amino (NH₂), es introducido de la molécula a través de reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis (Jokanovic, M., 2001).

Reacciones de hidrólisis: en humanos, la hidrólisis de xenobióticos es catalizada por carboxilesterasas presentes en el hígado e intestino; y por colinesterasas, paraoxonasas y albúmina presentes en la sangre.

Tanto las carboxilesterasas como las colinesterasas son conocidas como serin-esterasas debido a que su sitio catalítico contiene un residuo de serina que participa en la hidrólisis de OP's (Klaassen, 2013).

Reacciones de oxidación: las reacciones de oxidación se llevan a cabo por enzimas llamadas oxidasas de función mixta o monooxigenasas.

En los fosfotriésteros, la presencia del grupo S=P confiere a la molécula una mayor estabilidad química. La mayoría de los OP's que son fosfotriésteros son biotransformados a su forma "oxo" (O=P) mediante una reacción de desulfuración oxidativa dando como resultado un incremento importante de la toxicidad del producto y posteriormente inducir toxicidad a través de la fosforilación del sitio activo de enzimas B-esterasas como la AChE (Mangas, I., Estevez, J., Vilanova, E., & Costa Franca, T., 2016; Chambers, J.E., Meek, E.C., Ross, M., 2010; Klaassen & Watkins, 2001).

Reacciones de reducción: Ciertos metales y xenobióticos que contienen un grupo aldehído, cetona, disulfuro, sulfóxido, quinona, N-óxido, alqueno, azo o nitro a menudo se reducen *in vivo*. El grupo nitro del paratión o de otros compuestos similares pueden ser enzimáticamente reducidos a grupos amino. Los metabolitos amino formados, son inactivos como insecticidas y no poseen actividad de inhibición contra la AChE (Klaassen & Watkins, 2001; Jokanovic, M., 2001).

2.3.1.2 Reacciones de fase II

En las reacciones de fase II, los metabolitos polares son conjugados con sustratos endógenos (ácido glucorónico, sulfatos, acetato y aminoácidos) para formar productos hidrosolubles que puedan ser excretados fácilmente en la orina (Jokanovic, M., 2001). Estas reacciones incluyen: glucuronidación, sulfación, acetilación, metilación, conjugación con glutatión y conjugación con aminoácidos. Los cofactores para estas reacciones reaccionan con grupos funcionales que están presentes en el xenobiótico o se inducen durante la biotransformación fase I (Klaassen & Watkins, 2001).

2.3.2 Bioactivación de OP's

En los fosfotyonatos, la presencia del grupo S=P confiere a la molécula una mayor estabilidad química y reduce las propiedades inhibitorias de la Ache. Sin embargo, cuando los fosfotyonatos son bioactivados, sufren una reacción de desulfuración oxidativa dando como resultado un incremento importante de la toxicidad del producto. (Klaassen & Watkins, 2001; Mangas, I., Estevez, J., Vilanova, E., & Costa Franca, T., 2016).

2.3.3 Detoxificación

En la vía de detoxificación, las A-esterasas juegan un papel importante en la hidrólisis de los OP's. Se realiza principalmente por la ruptura de uno de los enlaces al fósforo de los compuestos OP's. El metabolito formado es un inhibidor menos potente de la AChE que el compuesto original, siendo así el compuesto menos tóxico. Son hidrosolubles, lo que les permite que sean eliminados más rápidamente a través de la orina (Jokanovic, M., 2001; Mangas, I., Estevez, J., Vilanova, E., & Costa Franca, T., 2016).

2.3.4 Eliminación

Muchos OP's son biotransformados en productos más hidrosolubles antes de ser excretados a través de la orina, que es la principal vía de excreción de OP's. La segunda vía de eliminación es por medio de las heces y la tercer vía, principalmente para gases, es mediante los pulmones (Klaassen, 2013).

2.4 Síndrome colinérgico

La intoxicación aguda por compuestos OP's está asociada con la inhibición de la enzima AChE (Figura 2). En presencia del OP esta enzima es inhibida lo que provoca una sobreestimulación de los receptores muscarínicos y nicotínicos y del Sistema Nervioso Central. Esta sobreestimulación en dichos receptores desarrolla lo que se conoce como Síndrome Colinérgico caracterizado por: agitación, debilidad muscular, hipersalivación, miosis y sudoración. En casos más severos de intoxicación puede causar convulsiones, confusión mental, fallo respiratorio, coma o incluso la muerte (Sogorb & Vilanova, 2002; Vilanova, E., & Sogorb, M., 1999).

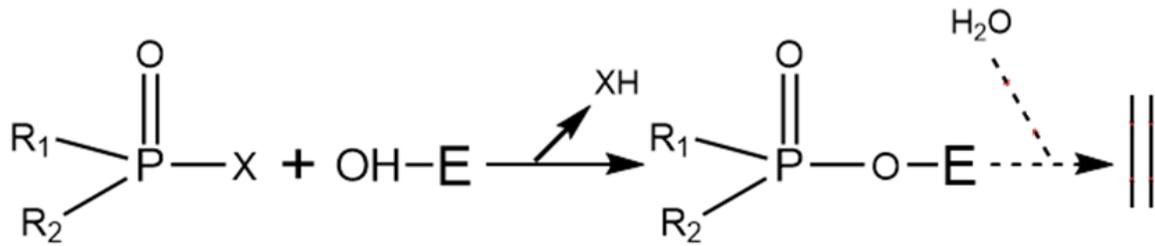


Figura 2. Inhibición de la AChE (E) por organofosforados. En presencia del OP, la AChE es inhibida por lo que no es capaz de hidrolizar a la Ach lo que produce una sobreestimulación de los receptores muscarínicos y nicotínicos desarrollando el síndrome colinérgico.

2.5 Tratamiento farmacológico

El tratamiento farmacológico para tratar el síndrome colinérgico se basa principalmente en: protección de los receptores de Ach mediante la administración de atropina, reactivación de la AChE inhibida, protección contra daño en el sistema nervioso central con la administración de benzodiazepinas (Sogorb, Vilanova & Carrera, 2004).

Atropina: es un antagonista competitivo de la ACh que se une a los receptores muscarínicos de la AChE produciendo efectos anticolinérgicos. Se utiliza para tratar los síntomas muscarínicos en el síndrome colinérgico (King, A. M. & Aaron, C. K., 2015; Fernández *et al*, 2010; Atropine - DrugBank, 2019).

Oximas: son agentes nucleofílicos que reactivan a la AChE fosforilada mediante desplazamiento del grupo fosfato de la enzima. Tratan fundamentalmente los síntomas nicotínicos mediante la reactivación de la AChE eliminando su grupo fosfato.

En el proceso de reactivación, se forman la enzima desfosforilada y la oxima fosforilada y la actividad de la enzima es restaurada. La reactivación sólo es posible si los sustituyentes del éster en el fósforo no fueron hidrolizados, es decir, no se produjo envejecimiento en la enzima fosforilada (Fernández *et al*, 2010; Carod Benedico, 2002; Jokanović & Stojiljković, 2006).

2.6 Polineuropatía Retardada Inducida por Organofosforados

Además del síndrome colinérgico, los OP's provocan otro efecto tóxico sobre el sistema nervioso central y periférico conocido como Polineuropatía Retardada Inducida por Organofosforados (OPIDP) que se manifiesta de 14 a 21 días después de una intoxicación aguda. La OPIDP es causada por OP's capaces de inhibir el centro esterásico de la esterasa blanco de neuropatía (NTE) e inducir envejecimiento, por lo que la enzima pierde la capacidad de ser reactivada por agentes nucleofílicos (Figura 3). La NTE es fosforilada y modificada por lo que esta enzima queda envejecida perdiendo así su función biológica. Esta inhibición y el posterior envejecimiento de la NTE son considerados la condición esencial para la OPIDP (Vilanova, E., & Sogorb, M., 1999; Wu & Chang, 2010; Sogorb, Pamies, Estevan, Estévez & Vilanova, 2016).

Actualmente no existe tratamiento farmacológico para tratar la OPIDP por lo que es necesario la búsqueda de una alternativa terapéutica con actividad fosfotriesterasa.

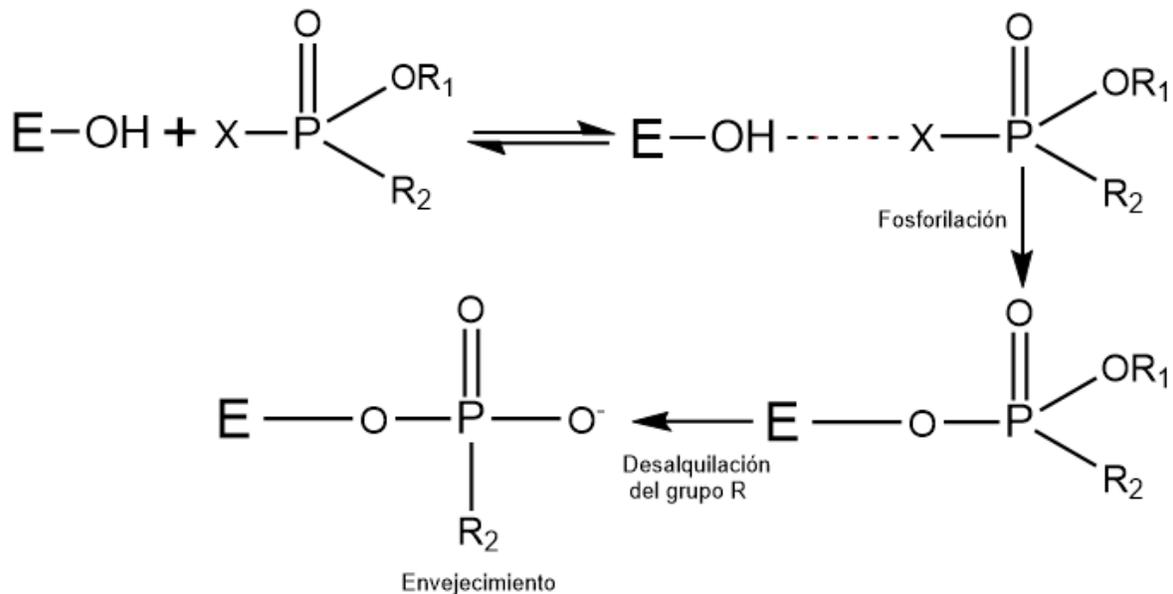


Figura 3. Inhibición de la NTE (E) por organofosforados. En presencia del OP, la NTE es fosforilada y posteriormente envejecida perdiendo la capacidad de ser reactivada por agentes nucleofílicos.

2.7 Clasificación de enzimas esterasas

2.7.1 A-Esterasas

Las A-esterasas, o también llamadas fosfotriesterasas (PTE's), son enzimas capaces de hidrolizar carboxilésteres, además hidrolizan algunos OP's sin ser inhibidas por estos compuestos, por lo que juegan un papel importante en la hidrólisis de los OP's. Un ejemplo de PTE's es la Paraoxonasa-1 (PON-1), que hidroliza algunos compuestos OP's (Jokanovic, M., 2001; Mangas, I., Estevez, J., Vilanova, E., & Costa Franca, T., 2016).

2.7.2 B-esterasas

Las B-esterasas son enzimas que hidrolizan carboxilésteres y en presencia de OP's. son inhibidas mediante la fosforilación del residuo de serina del sitio activo de la enzima. Estas enzimas pueden ser inhibidas de forma reversible o de forma irreversible. En este grupo de enzimas se encuentra la AChE y la NTE (Jokanovic, M., 2001; Mangas, I., Estevez, J., Vilanova, E., & Costa Franca, T., 2016).

2.7.3 C-esterasas

Además de las A-esterasas y las B-esterasas, dentro de esta clasificación se encuentran las C-esterasas, que son carboxilesterasas que no interactúan con los OP's (Vilanova, E., & Sogorb, M., 1999).

2.7.4 Mecanismo de interacción de esterasas con los OP's

En presencia de un OP, las B-esterasas forman un complejo michaeliano con el OP produciendo una fosforilación en el sitio activo de la enzima por lo que la enzima queda inhibida. La enzima puede ser lentamente reactivada o puede quedarse de forma inhibida perdiendo su función biológica (Jokanovic, M., 2001; Sogorb, Vilanova & Carrera, 2004). Una vez formado el complejo michaeliano, las PTE's rompen la unión entre el átomo de fósforo y el grupo saliente. El producto de la hidrólisis es un compuesto más polar que no se acumula en tejido graso y es fácilmente excretado en orina (Sogorb & Vilanova, 2002).

2.7.5 Activadores e inhibidores de PTE's

La actividad de la mayoría de las PTE's depende en gran medida de la presencia de cationes divalentes o agentes quelantes en el medio de reacción que actúan como activadores o inhibidores en la hidrólisis de OP's. Un gran número de cationes divalentes actúan como cofactores de las PTE's. Algunos ejemplos de cationes que funcionan como activadores son Ca^{2+} que participa en la hidrólisis del paraoxón por la PON-1 y el Cu^{2+} actúa como activador en la hidrólisis del HDCP (Vilanova, E., & Sogorb, M., 1999; Sogorb & Vilanova, 2002).

2.7.6 Estereoespecificidad de PTE's

Algunos OP's tienen centros quirales en su estructura, por lo que presentan dos o más isómeros. La estereoselectividad en la hidrólisis de OP's es debido a que las PTE's hidrolizan un solo isómero, o a que la hidrólisis de un isómero es más rápida con respecto a los demás. Los efectos tóxicos van a depender de esta hidrólisis estereoselectiva de cada uno de los isómeros de los OP's. Un ejemplo de hidrólisis estereoselectiva es observada en la hidrólisis de HDCP por suero de pollo en presencia de Cu^{2+} a favor del isómero R-HDCP (Vilanova, E., & Sogorb, M., 1999; Sogorb & Vilanova, 2002).

2.8 Paraoxonasa-1

La Paraoxonasa-1 (PON-1) del suero de los mamíferos, es una A-esterasa dependiente de calcio sintetizada en el hígado (Figura 4). Circula en sangre asociada a las lipoproteínas de alta densidad (HDL). Posee un peso molecular de 45 kDa y 354 aminoácidos con 3 residuos de cisteína. Dos de estos residuos se unen para formar un puente disulfuro cercano al carboxilo terminal de la proteína. El tercer residuo se localiza en la posición 283 (Vilanova, E., & Sogorb, M., 1999; Sogorb, Vilanova & Carrera, 2004). Presenta dos átomos de calcio (Ca^{2+}), uno de ellos sirve para mantener la conformación del sitio activo de la enzima. La función fisiológica de PON-1 parece estar relacionada con la protección de lipoproteínas de baja densidad (LDL) contra la peroxidación lipídica (Vilanova, E., & Sogorb, M., 1999; Sogorb & Vilanova, 2002).

Hidroliza OP's que contienen en su estructura un grupo "oxo" y su actividad hidrolítica es inhibida por CdSO_4 , HgCl_2 , AgNO_3 y EDTA (Sogorb & Vilanova, 2002; Sogorb, Vilanova & Carrera, 2004). Contrario a los mamíferos, las aves y los insectos son considerados carentes de PON-1 por lo que son más susceptibles a OP's como el paraoxón (Sogorb & Vilanova, 2002).

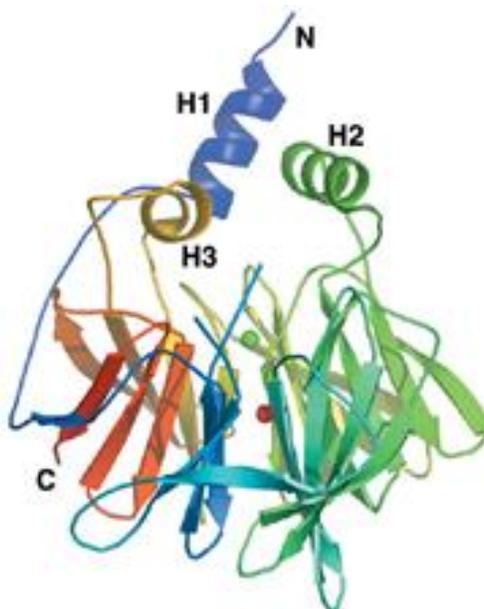


Figura 4. Estructura de la paraoxonasa. Se muestran dos iones calcio, uno en la parte superior y uno en la parte central: el calcio catalítico en color verde y el calcio estructural, que le da estabilidad a la proteína, en color rojo.

2.8.1 Mecanismo catalítico de PON1

En la hidrólisis del paraoxón por PON-1, el Ca^{2+} juega un rol importante. Primero, el Ca^{2+} podría participar directamente en la reacción catalítica o podría ser requerido para mantener la apropiada conformación del sitio activo de la enzima. Segundo, el Ca^{2+} libre, o Ca^{2+} débilmente asociado a la PON-1, facilita la remoción del dietilfosfato de la proteína, probablemente mediante la polarización de la unión $\text{P}=\text{O}$ del intermediario dietilfosfato-paraoxonasa, siendo el fósforo más susceptible a un ataque nucleofílico por iones hidroxilo (Vilanova, E., & Sogorb, M., 1999).

2.8.2 Sustratos de PON 1

La PON-1 tiene la capacidad de hidrolizar insecticidas organofosforados como clorpirifos-oxon, paraoxón y diazoxón metabolitos de los insecticidas altamente tóxicos clorpirifós, paratión y diazinón, respectivamente, y agentes de guerra como el sarín y el somán (Harel, M. et al. 2004; Monroy-Noyola, Rojas, Vilanova & Sogorb, 2007).

2.9 Metamidofós

El metamidofós (*O,S*-dimetil fosforotioamidato) es un compuesto organofosforado quiral ampliamente utilizado en la agricultura como insecticida y acaricida. Presenta dos isómeros (*R*(+)-metamidofós y *S*(-)-metamidofós) (Figura 5). Ejerce su efecto adverso inhibiendo la AChE mediante la unión covalente con un residuo de serina (Ser203) en el sitio activo de la enzima, provocando una acumulación de ACh en el espacio sináptico e induciendo a una sobreestimulación de los receptores muscarínicos y nicotínicos ocasionando el síndrome colinérgico (Lugokenski et al., 2012; Maretto et al., 2012). Además de inhibir la AChE, el metamidofós inhibe y envejece la NTE cerebral provocando un segundo síndrome neurotóxico agudo llamado polineuropatía retarda inducida por organofosforados (OPIDP) en personas quienes deliberadamente se exponen a este compuesto (Carod Benedico, 2002; Sogorb Miguel Ángel, et al., 1997).



Figura 5. Estructura química del metamidofós. Se muestran los isómeros del insecticida OP quiral metamidofós. Del lado izquierdo el isómero *R*-metamidofós y del lado derecho el isómero *S*-metamidofós

2.10 HDCP

En 1987 Vilanova y colaboradores desarrollaron dos series de compuestos con estructuras análogas del metamidofós para investigar en detalle las interacciones de estos compuestos con las B-esterasas (AChE y NTE). El compuesto O-2,5-diclorofenil fosforamidato de O-hexilo (HDCP) es un compuesto racémico, análogo del insecticida metamidofós. Presenta dos enantiómeros; (R(+)-HDCP y S(-)-HDCP), que tienen propiedades inhibitorias sobre la AChE (Figura 6). Mientras, que el isómero R(+)-HDCP induce inhibición y envejecimiento la NTE (Sogorb et al., 1997).

Estudios realizados por Vilanova y colaboradores en 1987 demostraron que de forma *in vitro*, el HDCP racémico induce una progresiva inhibición de AChE y de NTE sin provocar envejecimiento. Posteriormente, Sogorb y colaboradores en 1997 demostraron de forma *in vivo* que el isómero R(+)-HDCP causa inhibición y envejecimiento de la NTE, mientras que el isómero S(-)-HDCP inhibe pero no envejece a la enzima.

Monroy-Noyola y colaboradores (2007) realizaron un estudio comparando la hidrólisis de HDCP y del paraoxón en diferentes tejidos de vertebrados observando que el isómero S(-)-HDCP es hidrolizado más rápidamente que el isómero R(+)-HDCP. Posteriormente, en 2014 caracterizaron la hidrólisis del HDCP racémico por isoformas de PON-1 en suero humano en presencia de 2.5 mM de Ca^{2+} . Las tres isoformas de PON-1 Q192R mostraron actividad catalítica hidrolizando de forma estereoselectiva al isómero S(-)-HDCP (isómero no neuropático), sin embargo, no hidrolizó al isómero R(+)-HDCP.

Contrario a lo observado, Monroy-Noyola y colaboradores (2017) descubrieron la hidrólisis de HDCP por suero de pollo en presencia de Cu^{2+} y Zn^{2+} , reportando que el Cu^{2+} tiene un efecto activador estereoselectivo a favor del isómero R(+)-HDCP, sin embargo, esta actividad no fue observada en presencia de Zn^{2+} y otros cationes, descubriendo así una hidrólisis Cu^{2+} -dependiente estereoselectiva del HDCP por suero de pollo, especie considerada carente de PTE's como PON-1.

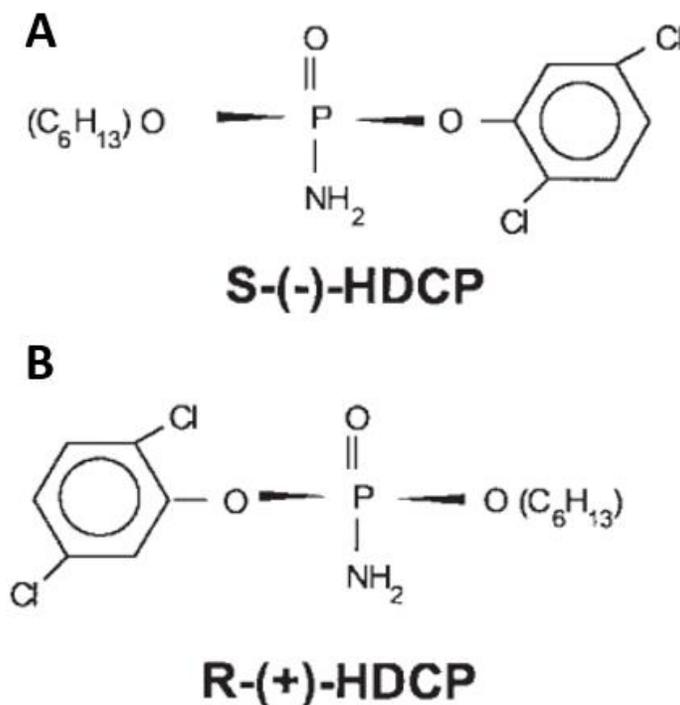


Figura 6. HDCEP análogo del insecticida metamidofós. El HDCEP presenta dos isómeros, el isómero S-(-)-HDCEP (A) con propiedades de inhibición de la AChE y el isómero R-(+)-HDCEP (B) que inhibe y envejece la NTE.

2.11 TCN

El tricloronato (TCN) es un insecticida fosfotonato quiral usado ampliamente en la agricultura, principalmente para el control de la mosca *Psylla rosae* y su larva. Presenta dos isómeros, el isómero (+)-TCN y el isómero (-)-TCN. Al igual que el metamidofós, ejerce su mecanismo de toxicidad inhibiendo la AChE causando el síndrome colinérgico. Así mismo, presenta inhibición y envejecimiento de la NTE causado OPIDP.

Almenares-López y colaboradores (2019) demostraron la hidrólisis Cu^{2+} -dependiente del (-)-TCN por suero de pavo, siendo el primer reporte de hidrólisis de un compuesto OP quiral en su forma "tio" por una A-esterasa del suero de esta especie. Este metabolismo estereoselectivo es importante debido a que el isómero (-)-TCN es de 8-11 veces más tóxico que el isómero (+)-TCN, además de ser el responsable de la OPIDP causada por este OP. Este estudio refuerza lo reportado con anterioridad sobre la actividad A-esterasa Cu^{2+} -dependiente del suero de pollo en la hidrólisis del HDCEP. Lo que sugiere que las aves pueden presentar una mayor protección por OP's quirales.

2.12 Albúmina Sérica Humana

La albúmina humana sérica (HSA) es la proteína más abundante presente en el suero de los mamíferos. Es sintetizada y excretada por el hígado. Constituida por 585 aminoácidos, tiene un peso molecular es de 66 kDa. Presenta tres dominios: dominio I (residuos 1-195), dominio II (196-383) y dominio III (384-585). Tiene 35 residuos de Cys, todos, excepto el residuo Cys-34, forman puentes disulfuro que estabilizan la estructura de la HSA. Posee la capacidad de unir forma covalente o reversible un gran número de compuestos endógenos como exógenos, por lo que entre sus funciones fisiológicas se encuentra el transporte de hormonas, ácidos grasos, xenobióticos, fármacos y cationes, también regula la presión osmótica. La HSA tiene carga negativa, pero une de forma reversible tanto cationes como aniones (Bal, Christodoulou, Sadler & Tucker, 1998; Varshney et al., 2009; Yang, Zhang & Liang, 2014).

2.12.1 Unión a metales

La HSA tiene 4 sitios de unión a metales. Los sitios son: sitio *N*-terminal, el residuo Cys-34, el sitio multi-metal binding site (MBS) y un cuarto sitio de unión a metales no localizado en la albúmina de mamíferos (Figura 7) (Bal, Sokołowska, Kurowska & Faller, 2013; Sendzik, 2017).

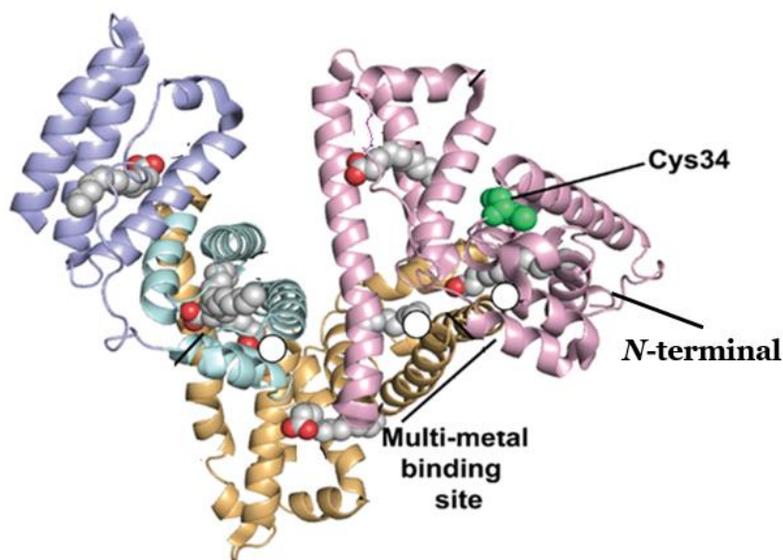


Figura 7. Sitios de unión a metales en la albúmina humana sérica (HSA). La HSA presenta 4 diferentes sitios de unión a metales, la Cys-34, el sitio de unión múltiple a metales (MBS), al *N*-terminal, que une principalmente cobre y un sitio no localizado.

2.12.1.1 Sitio N-terminal

El sitio N-terminal de la HSA presenta la secuencia Asp-Ala-His-Lys que poseen una alta afinidad por el Cu^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} y Ag^{2+} (Varshney et al., 2009). Alrededor del 2% del cobre es transportado en la sangre a través del sitio N-terminal, lo que lo convierte en el segundo grupo que transporta Cu^{2+} en sangre más grande después de la ceruloplasmina (Bal, Sokołowska, Kurowska & Faller, 2013).

Otras albúminas séricas, como la canina, tienen sustituida la His-3 por una Tyr. Mientras que la de pollo presenta la histidina en posición 4 por inserción de un ácido glutámico en posición 3 (Asp-Ala-Glu-His). por lo que, bajo condiciones fisiológicas el Cu^{2+} se une de manera inespecífica al sitio N-terminal (Bal, 1998).

2.12.1.2 Multi-metal Binding Site

Se ha reportado un segundo sitio de unión a metales llamado “multimetal binding site” (MBS), debido a la capacidad de unión de diferentes metales. Este sitio de unión a metales incluye los aminoácidos: His67, Asn99, His247 y Asp249. El sitio MBS une Zn^{2+} y Cd^{2+} , además, sirve como un sitio de unión secundario para el Cu^{2+} , Ni^{2+} y Co^{2+} (Bal, Sokołowska, Kurowska & Faller, 2013; Sendzik, 2017).

2.12.1.3 Sitio Cys-34

La Cys-34 tiene un grupo tiol con la capacidad de unir iones metálicos. Estudios de rayos-X indican la presencia de residuos que pueden unir metales como Asp38 y la His39, sin embargo, la localización espacial de estos aminoácidos no permite la coordinación del metal con la Cys-34, por lo que a unión de los metales a la HSA a través de este sitio mediante la unión del metal al con el azufre de la Cys (Bal, Sokołowska, Kurowska & Faller, 2013).

2.12.2 Actividad fosfotriesterasa asociada a la albúmina

Las aves son consideradas carentes de A-esterasas, por lo que son más susceptibles a intoxicaciones por OP's. Por esta misma razón, especies como *Gallus gallus domesticus* son utilizadas como modelo para la OPIDP.

Estudios de hidrólisis de HDCP realizados por Monroy-Noyola y cols. (2017) en suero de esta especie, incubaron 10 μL de suero de pollo en presencia de diferentes cofactores y observaron que el Cu^{2+} y el Zn^{2+} tienen un efecto activador en la hidrólisis de HDCP y la además observaron que el Cu^{2+} es responsable de una hidrólisis estereoselectiva a favor del isómero R(+)-HDCP, isómero neuropático responsable de la OPIDP. También evaluaron esta hidrólisis cobre-dependiente incubando 10 μL de suero de pollo con cobre a diferentes concentraciones (1 μM – 1 mM de cobre) encontrando una mayor cantidad de hidrólisis a una concentración de 250 μM , siendo esta hidrólisis 20 veces mayor comparada contra el control de suero en presencia de Ca^{2+} 2.5 mM (concentración requerida para la enzima PON-1). Este efecto no es calcio-dependiente por lo que puede no estar asociada con PON-1, por lo que estos estudios sugirieron que la proteína en el suero de pollo responsable de la hidrólisis Cu^{2+} -dependiente y estereoselectiva es diferente a la PON-1 y que el efecto de este catión puede deberse a la interacción con aminoácidos como histidina, lisina, ácido glutámico o ácido aspártico que son residuos en esta cupoproteína para formar un sitio catalítico similar al centro catalítico de enzimas PTE's.

Para elucidar cuál proteína presente en el suero de pollo era la responsable de la hidrólisis del HDCP, Monroy y cols. (2018), incubaron 10 μL de suero de pollo o 216 μg de CSA o 200 μg de ceruloplasmina o 200 μg de metalotioneina (cantidades presente en los 10 μL de suero de pollo), con una alícuota de 400 μM de HDCP racémico en presencia de cofactores como Ca^{2+} (2.5 mM), Cu^{2+} (1 μM -3 mM), entre otros. Los resultados revelaron que la proteína presente en el suero del pollo con actividad fosfotriesterasa es la albúmina y que además es activa por Cu^{2+} y estereoselectiva a favor de isómero R(+)-HDCP responsable de la OPIDP. En cuanto a los valores en hidrólisis del HDCP por el suero de pollo comparado con los 216 μg de CSA mostraron ser muy similares y en ambos casos la hidrólisis es estereoselectiva, siendo este estudio el primer reporte metal-dependiente en la hidrólisis de compuestos OP's por la CSA (Monroy-Noyola, A, et al, 2018).

Los sitios sugeridos como responsables de esta actividad son la secuencia N-terminal (reportado como primer sitio de unión a Cu^{2+}) y la MBS (reportado como segundo sitio de unión a Cu^{2+}) (Bal, Christodoulou, Sadler & Tucker, 1998; Bal, Sokołowska, Kurowska & Faller, 2013).

3. JUSTIFICACIÓN

Los insecticidas organofosforados son utilizados ampliamente para propósitos de salud pública, de jardinería y principalmente agrícolas. Debido a la facilidad con la que son absorbidos por el organismo son responsables de una gran cantidad de intoxicaciones humanas, lo que conlleva a tener casos de intoxicaciones con síndrome colinérgico y en otros casos a desarrollar OPIDP.

La OMS ha estimado que anualmente ocurren 3 millones de intoxicaciones humanas en el mundo, de las cuales mueren alrededor de 200 mil personas.

Actualmente el tratamiento farmacológico contra intoxicaciones por organofosforados consiste en la administración de atropina en conjunto con oximas, sin embargo, en casos severos de intoxicación humana por insecticidas organofosforados neuropáticos este tratamiento es ineficiente por lo que se propone como alternativa terapéutica el uso de fosfotriesterasas.

4. HIPÓTESIS

Los compuestos *O*-2,5-diclorofenil fosforamidato de *O*-hexilo (HDCP) así como el tricloronato serán hidrolizados por péptidos del sitio *N*-terminal de la albúmina de suero de pollo (DAEHK) y de la albúmina de suero humano (DAHK), en presencia de metales.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la hidrólisis de los compuestos *O*-2,5-diclorofenil fosforamidoato de *O*-hexilo (HDCP) y tricloronato (TCN) por péptidos del sitio *N*-terminal de la albúmina de suero de aves y humano activada por metales.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Cuantificar la hidrólisis metal-dependiente de HDCP por el péptido DAEHK en presencia de metales por espectrofotometría de UV/VIS.
2. Cuantificar la hidrólisis metal-dependiente de HDCP por el péptido DAHK en presencia de metales por espectrofotometría de UV/VIS.
3. Cuantificar la hidrólisis metal-dependiente de TCN por el péptido DAEHK en presencia de metales por espectrofotometría de UV/VIS.
4. Cuantificar la hidrólisis metal-dependiente de TCN por el péptido DAHK en presencia de metales por espectrofotometría de UV/VIS.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Reactivos

El compuesto O-2,5-diclorofenil fosforamidato de O-hexilo (HDGP) con una pureza >98% fue donado por el laboratorio del doctor Eugenio Vilanova de la Unidad de Toxicología y Seguridad Química del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández en Alicante, España.

El estándar de 2,4,5-tricloronato (TCN) con una pureza de > 98% fue obtenido de Chem Service, Inc.

Se utilizaron los estándares del 2,5-diclorofenol y el 2,4,5-triclorofenol para la preparación de las curvas de calibración del HDGP de Sigma-Aldrich (98% de pureza) y del 2,4,5-tricloronato de Chem Service, Inc (98% de pureza) respectivamente.

Para la preparación de las soluciones de trabajo se utilizaron los reactivos que se muestran en la tabla 3 y se prepararon como se muestra en la tabla 4.

Tabla 3. Reactivos

Reactivo	Pureza	Procedencia	Prueba en que se emplea
Acetona anhidra	Grado HPLC	Burdick & Jackson	Preparación de stocks (curvas de calibración y sustratos)
Ácido clorhídrico	Grado reactivo	Aldrich	Ajuste de pH
Albúmina de pavo	98%	Sigma – Aldrich	Ensayos de hidrólisis
Albúmina de pollo	98%	Sigma – Aldrich	Ensayos de hidrólisis
Aminoantipirina	Grado reactivo	Sigma	Pruebas de hidrólisis (detener reacción enzimática)
Cloruro de calcio dihidratado	99 %	J. T. Baker	Pruebas de hidrólisis (cofactor)
Cloruro de cobalto	98%	Mallinckrodt Baker	Pruebas de hidrólisis (cofactor)
Cloruro de	97%	Aldrich	Pruebas de hidrólisis

manganeso			(cofactor)
Cloruro de magnesio	99%	Productos Químicos Monterrey, S.A. de C.V	Pruebas de hidrólisis (cofactor)
Cloruro de zinc	98%	Sigma – Aldrich	Pruebas de hidrólisis (cofactor)
Dodecil sulfato de sodio	> 99%	Amresco	Pruebas de hidrólisis (detener reacción enzimática)
Ferricianuro de potasio	Grado reactivo	Research Organics	Pruebas de hidrólisis (Coloración)
Hidróxido de sodio	Grado reactivo	J. T. Baker	Ajuste de pH e inactivación de los sustratos de desecho.
Nitrato de níquel hexahidratado	> 99	Sigma – Aldrich	Pruebas de hidrólisis (cofactor)
Trizma base	Grado reactivo	Sigma – Aldrich	Buffer en las pruebas de hidólisis
Sulfato de cobre anhidro	> 99 %	Sigma – Aldrich	Pruebas de hidrólisis (cofactor)

Tabla 4. Preparación de soluciones de trabajo

Solución	Disolvente
HDGP 4 mM	Acetona
2,5- diclorofenol 4 mM	Acetona
TCN 4 mM	Acetona
2,4,5- triclorofenol 4 mM	Acetona
Albúminas	Agua desionizada
Cofactores 4 mM	Agua desionizada
Ferricianuro de potasio 0.4%	Agua desionizada
SDS 2% / AAP (0.25 mg)	Tris 50 mM
Tris 10 mM pH 7.4	Agua desionizada

6.2 Equipos empleados

Para la realización de este proyecto se utilizaron los siguientes equipos.

6.2.1 Espectrofotómetro UV/VIS

Para cuantificar la hidrólisis de HDCP y del TCN mediante un método colorimétrico se utilizó un espectrofotómetro UV/Visible Perkin Elmer, Lambda 25. Para ambos compuestos se midió a una longitud de onda de 512 nm donde se cuantificó el grupo saliente correspondiente a cada compuesto, 2,5- DCP para el caso del HDCP y el 2,4,5- TCP para el caso del TCN.

6.2.2 Balanza

Para pesar cada uno de los reactivos y preparar las soluciones se utilizó una balanza analítica marca Sartorius modelo TE2145. Antes de pesar cada uno de los reactivos se verificó que la balanza estuviera correctamente calibrada.

6.2.3 Potenciómetro

Para ajustar el pH a 7.4 de la solución buffer se utilizó el potenciómetro Jenwal modelo 3520. Antes de ajustar el pH de la solución fue necesario calibrar el equipo empleando los estándares de calibración de la marca Merck.

6.2.4 Baño de temperatura constante

Se utilizó un baño de temperatura constante marca Scorpion Scientific para incubar las reacciones enzimáticas en cada ensayo a una temperatura de 37 °C.

6.3 Metodología

6.3.1 Obtención del péptido

El péptido se obtuvo en colaboración con la doctora Lina Andrea Rivillas Acevedo del Centro de Investigación en Dinámica Celular (CIDC) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, de acuerdo con la siguiente metodología:

Síntesis

La síntesis se realiza del extremo carboxilo al extremo amino utilizando aminoácidos con su grupo amino protegido por un grupo FMOC y su cadena lateral con un grupo BUT o BOC. El primer paso de la síntesis es la remoción del grupo FMOC, o la desprotección. De esta manera queda una amina libre para reaccionar con el ácido carboxílico del siguiente aminoácido. Antes de adicionar el siguiente residuo a la péptido-resina, se debe hacer activar el aminoácido, cambiando el ácido carboxílico del residuo a un éster modificado, para aumentar la reactividad y evitar la racemización. Luego, se mezclan la péptido-resina con el aminoácido modificado y se deja reaccionar de 6 a 8 h (acoplamiento).

Cuando el acoplamiento está completo, se realiza la desprotección del aminoácido recién acoplado, luego se adiciona el siguiente aminoácido como éster modificado para que ocurra el acoplamiento. Esto se hace de manera secuencial hasta acoplar todos los aminoácidos deseados. Finalmente, se rompe el enlace entre el carboxilo del péptido y la resina. Esta ruptura se realiza en un medio ácido, que además remueve los grupos protectores de las cadenas laterales. Finalmente, el péptido se precipita con éter etílico y se recupera por centrifugación.

Purificación y caracterización de los péptidos

Los péptidos se purifican por RP-HPLC, en una columna C18, equilibrada con agua y haciendo un gradiente de elusión de 0 a 100% de acetonitrilo. Las fracciones obtenidas se caracterizaron por espectrometría de masas.

6.3.2 Ensayos de hidrólisis de HDCP

Para la cuantificación de la hidrólisis de HDCP por albúmina de pollo y los péptidos DAEHK y DAHK, del sitio *N*-terminal de la albúmina de pollo y la albúmina humana respectivamente,

por UV/VIS se incubaron 200 µg de albúmina de pollo u 8.5 µL de péptido con una alícuota de 100 µM de HDCP durante 30 minutos a 37 °C y un pH de 7.4 en presencia de Cu²⁺, Zn²⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Co²⁺ o Ni²⁺ a diferentes concentraciones (1-1000 µM). Para detener la reacción se agregaron 750 µL de la solución SDS 2% / AAP (0.25 mg) en Tris 50 mM y para dar la coloración se añadieron 375 µL de ferricianuro de potasio al 0.4%. El complejo colorimétrico fue medido a una longitud de onda de 512 nm en el espectrofotómetro de UV/VIS. Para la cuantificación del 2,5-diclorofenol liberado (producto de la hidrólisis) se empleó una curva de calibración utilizando un estándar del 2,5-diclorofenol con concentraciones de 0 a 100 µM.

6.3.3 Ensayos de hidrólisis de Tricloronato

Para la cuantificación de la hidrólisis de tricloronato por albúmina de pavo y los péptidos DAEHK y DAHK, del sitio *N*-terminal de la albúmina de pollo y la albúmina humana respectivamente, por UV/VIS se incubaron 200 µg de albúmina de pavo u 8.5 µL de péptido con una alícuota de 100 µM de Tricloronato durante 30 minutos a 37 °C y un pH de 7.4 en presencia de Cu²⁺, Zn²⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Co²⁺ o Ni²⁺ a diferentes concentraciones (1-1000 µM). Para detener la reacción se agregaron 750 µL de la solución SDS 2% / AAP (0.25 mg) en Tris 50 mM y para dar la coloración se añadieron 375 µL de ferricianuro de potasio al 0.4%. El complejo colorimétrico fue medido a una longitud de onda de 512 nm en el espectrofotómetro de UV/VIS. Para la cuantificación del 2,4,5-triclorofenol liberado (producto de la hidrólisis) se empleó una curva de calibración con un estándar del 2,4,5-triclorofenol con concentraciones de 0 a 100 µM.

7. RESULTADOS

7.1 Hidrólisis metal-dependiente de HDCP por los péptidos DAEHK del sitio N-terminal de la albúmina sérica de pollo y DAHK del sitio N-terminal de la albúmina sérica humana.

A continuación, se presentan los resultados de diferentes experimentos de la hidrólisis metal-dependiente del HDCP utilizando dos diferentes péptidos: el péptido DAEHK del sitio N-terminal de la albúmina sérica de pollo (CSA) y el péptido DAHK del sitio N-terminal de la albúmina sérica humana (HSA). Se estableció la concentración equimolar correspondiente a cada péptido con base en la concentración de CSA y HSA que se utiliza cuando colocamos la proteína completa. Ambos péptidos fueron incubados bajo las mismas condiciones, es decir, la concentración equimolar con respecto a la CSA y a la HSA de cada péptido se incubó con diferentes cationes a diferentes concentraciones en condiciones fisiológicas por 30 minutos y con una alícuota de 100 μM de HDCP. Una vez transcurrido el tiempo de incubación la reacción se detuvo con 750 μL de TRIS 50 mM/ 2% SDS/ AAP. Posterior a esto, para dar coloración a la reacción se agregaron 375 μL de ferricianuro de potasio al 0.4%. Las muestras se leyeron por espectrofotometría de UV/VIS a una longitud de onda de 512 nm. Antes de leer las muestras se leyó una curva de calibración (Figura 8) del 2,5-DCP (grupo saliente de la reacción) utilizando 5 concentraciones: 20 μM , 40 μM , 60 μM , 80 μM y 100 μM antes de cada experimento para posteriormente cuantificar la hidrólisis del HDCP. En cada experimento se utilizó CSA con 300 μM de cobre como control positivo.

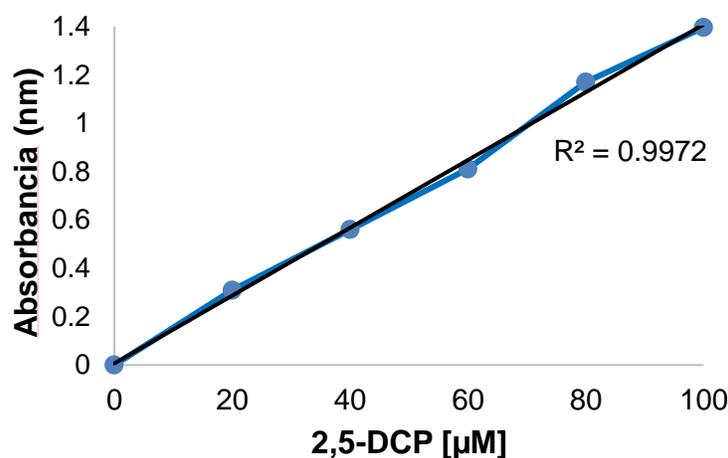


Figura 8. Curva de calibración del 2,5-DCP. Antes de realizar los ensayos se utilizaba una curva de calibración con concentraciones que iban desde 0 hasta 100 μM .

7.1.1 Hidrólisis cobre-dependiente de HDCP por péptidos del sitio N-terminal de la albúmina.

En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos, expresados en porcentaje, de la hidrólisis del HDCP por los péptidos DAEHK y DAHK cuando son incubados con cobre como activador a diferentes concentraciones (5 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM , 300 μM , 500 μM , 750 μM y 1000 μM).

Al incubar el péptido DAEHK con una concentración de 50 μM de cobre es en donde se observa el mayor porcentaje de hidrólisis del HDCP, sin embargo, está hidrólisis es mucho menor (~28 veces) en comparación con el control positivo (CSA). Por otro lado, al incubar el péptido DAHK con 1000 μM de cobre es en donde se observa el mayor porcentaje de hidrólisis. Este porcentaje de hidrólisis con respecto al control es 500 veces menor.

Tabla 5. Hidrólisis cobre-dependiente de HDCP por péptidos del sitio N-terminal de la albúmina sérica de pollo y la albúmina sérica humana.

[Cu ²⁺] μM	% de hidrólisis de HDCP	
	Péptido DAEHK	Péptido DAHK
5	0.29	ND
25	ND	ND
50	2.89	ND
100	ND	ND
300	ND	ND
500	ND	ND
750	0.11	0.067
1000	ND	0.16
CSA	81.14	80.23

La hidrólisis del HDCP se expresa como porcentaje de 2,5-DCP formado o no detectable (ND).

7.1.2 Hidrólisis cobre-dependiente de HDCP por los péptidos DAEHK y DAHK a diferentes concentraciones.

Con base en los antecedentes de ensayos realizados por Monroy-Noyola en 2017 donde se estableció que utilizando cobre a una concentración de 300 μM se observa la mayor

cantidad de hidrólisis de HDCP con 216 μg de CSA para los siguientes ensayos la concentración de cobre fue de 300 μM con diferentes concentraciones de cada péptido. Las concentraciones que se encuentran en “**negrita**” son las concentraciones equimolares que corresponden al sitio *N*-terminal de la CSA y la HSA de los péptidos DAEHK y DAHK, respectivamente. A partir de la concentración equimolar correspondiente a cada péptido se fue aumentando la concentración al doble hasta 16 veces para el caso del péptido DAEHK y hasta 32 veces para el péptido DAHK. Las concentraciones de péptido que se encuentran en “*Cursiva*” corresponden a 100 veces más la concentración equimolar de cada péptido con respecto a su respectiva albúmina.

Tabla 6. Hidrólisis cobre-dependiente de HDCP por los péptidos DAEHK y DAHK a diferentes concentraciones.

[Péptido] μM	% de hidrólisis de	[Péptido] μM	% de hidrólisis de
DAEHK	HDCP	DAHK	HDCP
0.85	ND	1.37	0.99
1.7	0.63	2.74	1.95
3.4	ND	5.48	1.99
6.8	ND	10.96	1.69
13.6	1.27	13.7	2.49
27.2	0.005	21.92	2.10
<i>170</i>	ND	<i>137</i>	4.86
CSA	81.14	CSA	80.23

La hidrólisis del HDCP se expresa como porcentaje de 2,5-DCP formado o no detectable (ND).

7.1.3 Hidrólisis metal-dependiente de HDCP por los péptidos DAEHK y DAHK

A continuación, se presentan los resultados de la hidrólisis de HDCP por los péptidos DAEHK y DAHK utilizando diferentes cationes como se resume en la tabla 7. Los cationes utilizados fueron: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} y Co^{2+} . Las concentraciones que se utilizaron fueron 100 μM , 300 μM y 500 μM .

La mayor cantidad de hidrólisis por el péptido DAEHK se observa al utilizar Co^{2+} a una concentración de 300 μM (1.17%), sin embargo este porcentaje de hidrólisis es ~70 veces

menor comparado contra el control de CSA incubado con 300 μM de Cu^{2+} (81.14%). Por otro lado, el mayor porcentaje de hidrólisis por el péptido DAHK se observa al utilizar Ni^{2+} 300 μM , obteniendo un 0.24% de hidrólisis, lo que representa ~ 334 veces menos el porcentaje de hidrólisis comparado con el control de CSA con 300 μM de Cu^{2+} (80.23%)

Tabla 7. Hidrólisis metal-dependiente de HDCP por los péptidos DAEHK y DAHK.

Cofactor	[Cofactor] μM	% de hidrólisis de HDCP	
		Péptido DAEHK	Péptido DAHK
<i>Calcio</i>	100	ND	ND
	300	0.87	ND
	500	ND	ND
<i>Magnesio</i>	100	0.10	ND
	300	0.47	ND
	500	0.10	ND
<i>Manganeso</i>	100	ND	ND
	300	0.10	ND
	500	ND	ND
<i>Zinc</i>	100	ND	ND
	300	0.013	ND
	500	0.87	ND
<i>Níquel</i>	100	ND	ND
	300	ND	0.24
	500	ND	ND
<i>Cobalto</i>	100	ND	ND
	300	1.17	0.20
	500	ND	0.07
CSA	300	81.14	80.23

La hidrólisis del HDCP se expresa como porcentaje de 2,5-DCP formado o no detectable (ND).

7.2 Hidrólisis metal-dependiente de TCN por los péptidos DAEHK del sitio N-terminal de la albúmina sérica de pollo y DAHK del sitio N-terminal de la albúmina sérica humana.

Para los ensayos de hidrólisis con TCN por los dos diferentes péptidos (DAEHK del sitio N-terminal de la CSA y DAHK del sitio N-terminal de la HSA), se estableció la concentración equimolar correspondiente a cada péptido con base en la concentración de CSA y HSA que se utiliza cuando colocamos la proteína completa. Ambos péptidos fueron incubados bajo las mismas condiciones, es decir, la concentración equimolar a la CSA y a la HSA de cada péptido se incubó con diferentes cationes a diferentes concentraciones en condiciones fisiológicas por 30 minutos y con una alícuota de 100 μM de TCN. Una vez transcurrido el tiempo de incubación la reacción se detuvo con 750 μL de TRIS 50 mM/ 2% SDS/ AAP, y para dar coloración a la reacción se agregaron 375 μL de ferricianuro de potasio al 0.4%. Las muestras se leyeron por espectrofotometría de UV/VIS a una longitud de onda de 512 nm. Antes de leer las muestras se leyó una curva de calibración (Figura 9) del 2,4,5-TCP (grupo saliente de la reacción) utilizando 5 concentraciones: 20 μM , 40 μM , 60 μM , 80 μM y 100 μM antes de cada experimento para posteriormente cuantificar la hidrólisis del TCN. En cada experimento se utilizó como control positivo la albúmina sérica de pavo (TSA) con 300 μM de cobre.

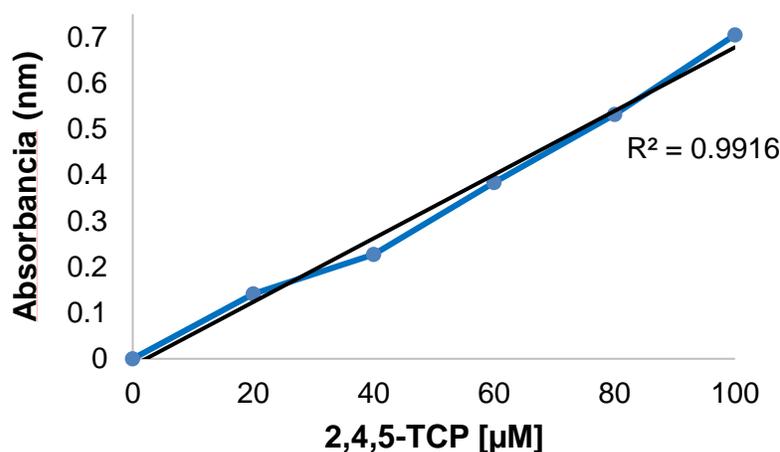


Figura 9. Curva de calibración del 2,4,5-TCP. Antes de realizar los ensayos se utilizaba una curva de calibración con concentraciones que iban desde 0 hasta 100 μM .

7.2.1 Hidrólisis metal-dependiente de TCN por los péptidos DAEHK y DAHK.

La tabla 8 muestra los resultados de la hidrólisis de TCN por los péptidos DAEHK y DAHK utilizando diferentes cationes, los cuales fueron: Cu^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} y Co^{2+} . Las concentraciones que se utilizaron fueron, para el caso del Cu^{2+} y Zn^{2+} , de 100 μM a 1000 μM y para el resto de los cationes las concentraciones que se utilizaron fueron 100 μM , 300 μM y 500 μM .

La mayor cantidad de hidrólisis del TCN por el péptido DAEHK se observa al utilizar Cu^{2+} a una concentración de 1000 μM (2.16%), siendo este porcentaje de hidrólisis es ~44 veces menor comparado contra el control positivo de TSA incubado con 300 μM de Cu^{2+} (95.63%). Con respecto al péptido DAHK no se observa hidrólisis con ninguno de los cofactores utilizados.

Tabla 8. Hidrólisis metal-dependiente de TCN por los péptidos DAEHK y DAHK.

Cofactor	[Cofactor] μM	% de hidrólisis de TCN	
		Péptido DAEHK	Péptido DAHK
<i>Cobre</i>	100	0.39	ND
	300	ND	ND
	500	ND	ND
	750	1.83	ND
	1000	2.16	ND
<i>Calcio</i>	100	ND	ND
	300	ND	ND
	500	ND	ND
<i>Magnesio</i>	100	ND	ND
	300	ND	ND
	500	ND	ND
<i>Manganeso</i>	100	ND	ND
	300	ND	ND
	500	ND	ND
<i>Zinc</i>	100	ND	ND
	300	ND	ND
	500	ND	ND
	750	1.49	ND
	1000	0.63	ND
<i>Níquel</i>	100	ND	ND
	300	ND	ND
	500	ND	ND
<i>Cobalto</i>	100	ND	ND
	300	ND	ND
	500	ND	ND
TSA	300	95.63	98.86

ND= No Detectable

La hidrólisis del TCN se expresa como porcentaje de 2,4,5-TCP formado o no detectable (ND).

8. DISCUSIÓN

De todos los OP's comerciales, un 30% son vendidos en mezclas racémicas como el metamidofós y el TCN que son responsables de causar OPIDP en mamíferos y otras especies (Monroy et al, 2014).

En este estudio se empleó un método colorimétrico para cuantificar una posible hidrólisis de compuestos OP's quirales (HDCP y TCN) por péptidos *N*-terminal de la albúmina de suero de aves y humano en condiciones similares a las previamente ya utilizadas por otros estudios con suero de aves y suero humano (Monroy-Noyola et al., 2007; Almenares-López et al., 2013). El método consistió en la detección del grupo saliente de cada uno de los compuestos utilizados, el 2,5-diclorofenol para el HDCP y el 2,4,5-triclorofenol para el triclronato por espectrofotometría UV/VIS que se basa en la afinidad de la AAP por el –OH del fenol y la posterior formación de un compuesto colorido de aminoantipirina con ferrocianuro de potasio en pH alcalino (Emerson, 1943). Así mismo, se emplearon diferentes cofactores que han sido descritos como activadores en la hidrólisis de dichos compuestos en suero de pollo (Vilanova, E., & Sogorb, M., 1999).

Estudios bioquímicos han evidenciado que la albúmina presenta diferentes sitios específicos de unión a metales. Estos sitios de unión son el *N*-terminal, el multi-metal binding site, Cys-34 y un sitio que aún es desconocido.

El Cu^{2+} se une a la HSA se une a través del grupo imidazol de la His-3, por lo que en especies donde la His-3 es reemplazada por otro aminoácido presentan una carencia de afinidad y especificidad del Cu^{2+} al sitio *N*-terminal.

Con base en estudios realizados por nuestro equipo de trabajo donde se reportó a la albúmina de suero de pollo como la responsable de la hidrólisis estereoselectiva y cobre-dependiente del HDCP (Monroy-Noyola, 2018) y teniendo en cuenta que el péptido DAHK del sitio *N*-terminal de la albúmina sérica humana (HSA) presenta una gran afinidad por el Cu^{2+} , y es esta proteína la principal responsable del transporte de cobre en la sangre unido a la His-3 (Hureau et al., 2011) en este proyecto se utilizaron las secuencias del sitio *N*-terminal de la albúmina sérica de estas especies (albúmina sérica de pollo y albúmina sérica de humano) para elucidar si este sitio es el responsable de la hidrólisis de HDCP por la CSA. Las secuencias utilizadas fueron: DAEHK que pertenece al sitio *N*-terminal de la CSA y la secuencia DAHK que pertenece al sitio *N*-terminal de la HSA (Sokolowska, Krezel, Dyba, Szewczuk & Bal, 2002).

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, no logramos detectar hidrólisis del HDCP ni del TCN. Sin embargo, se propone que para estudios posteriores sean utilizados

bloqueadores específicos de sitios en la albúmina con unión a metales para determinar si algún otro sitio está implicado en la hidrólisis antes vista y así determinar cuál es el sitio responsable de la hidrólisis cobre-dependiente en la CSA.

Es importante mencionar que no se descarta la idea de que el sitio responsable de la hidrólisis sean los residuos presentes en *N*-terminal, y que los péptidos que fueron utilizados podrían no haber sido lo suficientemente grandes para llevar a cabo la hidrólisis como cuando se tiene la proteína completa.

Este estudio desea seguir impulsando a la búsqueda de fosfotriesterasas para ser empleadas como alternativa terapéutica en intoxicaciones agudas por compuestos organofosforados quirales, ya que estos son los responsables de causar polineuropatía retardada inducida por organofosforados.

9. CONCLUSIÓN

- Se caracterizó la hidrólisis del compuesto *O*-2,5-diclorofenil fosforamidato de *O*-hexilo (HDCP) por el péptido DAEHK y DAHK del sitio *N*-terminal de la albúmina de suero de pollo y albúmina de suero humano respectivamente.
- Se cuantificó la hidrólisis metal-dependiente de HDCP por los péptidos DAEHK y DAHK en presencia de metales por espectrofotometría de UV/VIS.
- Se cuantificó la hidrólisis metal-dependiente de TCN por los péptidos DAEHK y DAHK en presencia de metales por espectrofotometría de UV/VIS.
- En ninguno de los casos se observó hidrólisis por los péptidos DAEHK y DAHK.

10. PERSPECTIVAS

Con base en resultados obtenidos anteriormente por nuestro equipo de trabajo donde se evidenció una actividad A-esterasa por la albúmina de suero de pollo que hidroliza de forma estereoeselctiva y cobre-dependiente al isómero R(+)-HDGP que es responsable de la polineuropatía retardada inducida por organofosforados y con base en los resultados obtenidos durante este trabajo donde no se observó hidrólisis de los compuestos quirales utilizados durante el estudio por los péptidos DAEHK y DAHK del sitio *N*-terminal de la albúmina de aves y humano respectivamente se propone el uso de la albúmina humana mutada en su sitio *N*-terminal para determinar si ese sitio es el responsable de la hidrólisis estereoeselctiva y cobre-dependiente del isómero R(+)-HDGP

11. BIBLIOGRAFÍA

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. *Journal of Chromatography B*, 1105, 203-209. doi: 10.1016/j.jchromb.2018.12.026

Atropine - DrugBank (2019).

Retrieved from <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00572>

Asociación Chilena de Seguridad (ACHS) (2014). Riesgo por exposición a plaguicidas.

Bal, W., Christodoulou, J., Sadler, P., & Tucker, A. (1998). Multi-metal binding site of serum albumin. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 70(1), 33-39. doi: 10.1016/s0162-0134(98)00010-5

Bal, W., Sokołowska, M., Kurowska, E., & Faller, P. (2013). Binding of transition metal ions to albumin: Sites, affinities and rates. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, (12). doi: 10.1016/j.bbagen.2013.06.018

Barguil-Díaz, I., Lozano Mosquera, N., Pinto Maquilón, J., & Aristizábal Hernández, J. (2012). Síndrome intermedio en intoxicación aguda por organofosforados: reporte de caso. *Medicina U.P.B.*, 31 (1), 53-58.

Chambers, J.E., Meek, E.C., Ross, M. (2010). The metabolic activation and detoxication of anticholinesterase insecticides. In T. Satoh & R. Gupta, *Anticholinesterase pesticides: metabolism, neurotoxicity and epidemiology* (pp. 19-23). John Wiley & Sons.

Cohen, J., Friedman, A., Zimmermann, G., & Soreq, H. (2010). Genomic implications of anticholinesterase sensitivities. In T. Satoh & R. Gupta, *Anticholinesterase pesticides: metabolism, neurotoxicity and epidemiology* (pp. 19-23). John Wiley & Sons.

Carod Benedico, E. (2002). Insecticidas organofosforados: "De la guerra química al riesgo laboral y doméstico". *Medifam*, 12(5). doi: 10.4321/s1131-57682002000500005

Fernández A., D., Mancipe G., L., & Fernández A., D. (2010). Intoxicación por organofosforados. *Revista Med*, 18 (1), 84-92.

García Hernández, J., Leyva Morales, J., Martínez Rodríguez, I., Hernández Ochoa, M., Aldana Madrid, M., & Rojas García, A. et al. (2018). Estado actual de la investigación sobre plaguicidas en México. *Revista Internacional De Contaminación Ambiental*, 34 (esp01), 29-60. doi: 10.20937/rica.2018.34.esp01.03

Harel, M. Aharoni, A. Gaidukov L, Brumshtein B, Khersonsky O, & Tawfik DS. (2004). Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11:412–419

Hureau, C., Eury, H., Guillot, R., Bijani, C., Sayen, S., & Solari, P. et al. (2011). X-ray and Solution Structures of CuIIGHK and CuIIDAHK Complexes: Influence on Their Redox Properties. *Chemistry - A European Journal*, 17(36), 10151-10160. doi: 10.1002/chem.201100751

Jokanovic, M. (2001). Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology*, 166. 139-160.

Jokanović, M., & Stojilković, M. (2006). Current understanding of the application of pyridinium oximes as cholinesterase reactivators in treatment of organophosphate poisoning. *European Journal of Pharmacology*, 553(1-3), 10-17. doi: 10.1016/j.ejphar.2006.09.054

King, Andrew M. & Aaron, Cynthia K. (2015). Organophosphate and Carbamate Poisoning. *Emerg Med Clin N Am*, 33. 133–151.

Klaassen, C. (2013). *Casarett and Doull's toxicology* (8th ed., pp. 202-222). United States: McGraw-Hill Education.

Klaassen, C., & Watkins, J. (2001). *Manual de toxicología* (5th ed., pp. 630-632). Ciudad de México: McGraw-Hill Interamericana.

Lugokenski, T., Gubert, P., Bueno, D., Nogara, P., de Aquino Saraiva, R., & Barcelos, R. et al. (2012). Effect of Different Oximes on Rat and Human Cholinesterases Inhibited by Methamidophos: A Comparative In Vitro and In Silico Study. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 111(6), 362-370. doi: 10.1111/j.1742-7843.2012.00912.x

Mangas, I., Estevez, J., Vilanova, E., & Costa Franca, T. (2016). New insights on molecular interactions of organophosphorus pesticides with esterases. *Toxicology*. Doi: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.tox.2016.06.006>

Maretto, G., do Nascimento, C., Passamani, L., Schenberg, L., de Andrade, T., & Figueiredo, S. et al. (2012). Acute exposure to the insecticide O,S-dimethyl phosphoramidothioate (methamidophos) leads to impairment of cardiovascular reflexes in rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 80, 203-207. doi: 10.1016/j.ecoenv.2012.03.001

Monroy-Noyola, A., Rojas, P., Vilanova, E., & Sogorb, M. (2007). Comparative hydrolysis of O-hexyl O-2,5-dichlorophenyl phosphoramidate and paraoxon in different

tissues of vertebrates. *Archives of Toxicology*, 81(10), 689-695. doi: 10.1007/s00204-007-0197-2

Monroy-Noyola, A., Trujillo, B., Yescas, P., Martínez-Salazar, F., García-Jiménez, S., Ríos, C., & Vilanova, E. (2014). Stereospecific hydrolysis of a phosphoramidate used as an OPIDP model by human sera with PON1 192 alloforms. *Archives of Toxicology*, 89(10), 1801-1809. doi: 10.1007/s00204-014-1327-2

Monroy-Noyola, A., Sogorb, M., Díaz-Alejo, N., & Vilanova, E. (2017). Copper activation of organophosphorus compounds detoxication by chicken serum. *Food and Chemical Toxicology*, 106, 417-423. doi: 10.1016/j.fct.2017.05.055

Monroy-Noyola, A., Sogorb, M., & Vilanova, E. (2018). Albumin, the responsible protein of the Cu²⁺-dependent hydrolysis of O-hexyl O-2,5-dichlorophenyl phosphoramidate (HDCP) by chicken serum "antagonistic stereoselectivity". *Food and Chemical Toxicology*, 120, 523-527. doi: 10.1016/j.fct.2018.07.047

Ortiz, I., Ávila-Chávez, M., & Torres, L. (2014). Plaguicidas en México: usos, riesgos y marco regulatorio. *Revista Latinoamericana De Biotecnología Ambiental Y Algal*, 4(1), 26-46.

Plaguicidas. (2016). Inecc.gob.mx. Revisado el 27 de junio de 2018, from <http://www.inecc.gob.mx/sqre-temas/768-sqre-plaguicidas>.

Ramírez, J. A. & Lacasaña, M. (2001). Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Arch Prev Riesgos Labor*, 4(2):67-75

Roberts, S., James, R., & Williams, P. (2002). *Principles of toxicology* (2nd ed., pp. 355-358). Canada: John Wiley & Sons, Inc.

Sogorb Miguel Ángel, Díaz-Alejo Nuria, Pellín María C., Vilanova Eugenio. (1997). Inhibition and aging of neuropathy target esterase by the stereoisomers of a phosphoramidate related to methamidophos. *Toxicology Letters*, 93. 95–102.

Sogorb, M., Pamies, D., Estevan, C., Estévez, J., & Vilanova, E. (2016). Roles of NTE protein and encoding gene in development and neurodevelopmental toxicity. *Chemico-Biological Interactions*, 259, 352-357. doi: 10.1016/j.cbi.2016.07.030

Sogorb, M., & Vilanova, E. (2002). Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicology Letters*, 128, 215-228.

Sogorb, M., & Vilanova, E. (2010). Detoxication of anticholinesterase pesticides. In T. Satoh & R. Gupta, *Anticholinesterase pesticides: metabolism, neurotoxicity and epidemiology* (pp. 19-23). John Wiley & Sons.

Sogorb, M., Vilanova, E., & Carrera, V. (2004). Future applications of phosphotriesterases in the prophylaxis and treatment of organophosphorus insecticide and nerve agent poisonings. *Toxicology Letters*, 151(1), 219-233. doi: 10.1016/j.toxlet.2004.01.022

Sokolowska, M., Krezel, A., Dyba, M., Szewczuk, Z., & Bal, W. (2002). Short peptides are not reliable models of thermodynamic and kinetic properties of the N-terminal metal binding site in serum albumin. *European Journal of Biochemistry*, 269(4), 1323-1331. doi: 10.1046/j.1432-1033.2002.02772.x

Varshney, A., Sen, P., Ahmad, E., Rehan, M., Subbarao, N., & Khan, R. (2009). Ligand binding strategies of human serum albumin: How can the cargo be utilized? *Chirality*, 22(1), 77-87. doi: 10.1002/chir.20709

Vilanova, E., & Sogorb, M. (1999). The role of phosphotriesterases in the detoxication of organophosphorus compounds. *Critical Reviews in Toxicology*, 29(1), 21-57.

Wu, Y., Chang, P. (2010). Molecular toxicology of neuropathy target esterase. In T. Satoh & R. Gupta, *Anticholinesterase pesticides: metabolism, neurotoxicity and epidemiology* (pp. 19-23). John Wiley & Sons.

Yang, F., Zhang, Y., & Liang, H. (2014). Interactive Association of Drugs Binding to Human Serum Albumin. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(3), 3580-3595. doi: 10.3390/ijms15033580

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

Nombre del alumno: Ana Laura Ramírez González

Título de la tesis: "Hidrólisis metal-dependiente de compuestos organofosforados quirales por péptidos N-terminal de la albúmina del suero de aves y humano"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

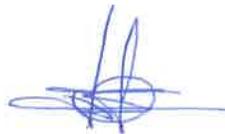
Miembro del jurado: Dr. Samuel Enoch Estrada Soto

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): _____



Dr. Samuel Enoch Estrada Soto

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

Nombre del alumno: Ana Laura Ramírez González

Título de la tesis: "Hidrólisis metal-dependiente de compuestos organofosforados quirales por péptidos N-terminal de la albúmina del suero de aves y humano"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Germán Bernal Fernández

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): _____



Dr. Germán Bernal Fernández

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

Nombre del alumno: Ana Laura Ramírez González

Título de la tesis: "Hidrólisis metal-dependiente de compuestos organofosforados quirales por péptidos N-terminal de la albúmina del suero de aves y humano"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

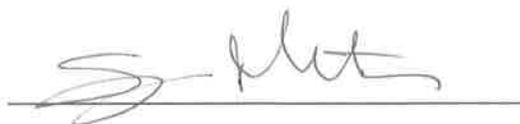
Miembro del jurado: Dr. Sergio Montes López

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): _____



Dr. Sergio Montes López

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

Nombre del alumno: Ana Laura Ramírez González

Título de la tesis: "Hidrólisis metal-dependiente de compuestos organofosforados quirales por péptidos N-terminal de la albúmina del suero de aves y humano"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

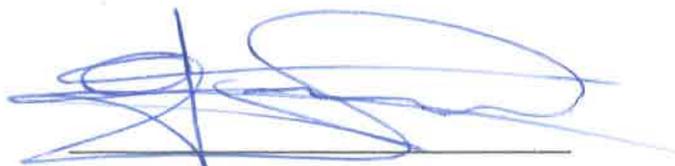
Miembro del jurado: Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez

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): _____



Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez

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

Nombre del alumno: Ana Laura Ramírez González

Título de la tesis: "Hidrólisis metal-dependiente de compuestos organofosforados quirales por péptidos N-terminal de la albúmina del suero de aves y humano"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Yoshajandith Aguirre Vidal

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):



Dra. Yoshajandith Aguirre Vidal