

Universidad Autónoma del Estado de Morelos



FACULTAD DE FARMACIA



**Hidrólisis metal-dependiente de compuestos
organofosforados en su forma tio por el suero de aves
y mamíferos domésticos**

TESIS

Que para obtener el grado de
MAESTRA EN FARMACIA

Presenta

QFB. Susana Chávez Estrada

Director de tesis

Dr. Antonio Monroy Noyola

Cuernavaca, Morelos junio 2018

Fecha: 25 de mayo de 2018
Asunto: Jurado
Medio de notificación: Impresa/personal
Folio: FF/D/SAC/CIP/MF/090/2018

**Q.F.B. SUSANA CHÁVEZ ESTRADA
ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA EN FARMACIA
P R E S E N T E**

Por este medio le informo que, con base en la propuesta hecha en su solicitud, el Consejo Interno de Posgrado le asignó el siguiente jurado para evaluar la tesis "Hidrólisis metal-dependiente de compuestos organofosforados en su forma tío por el suero de aves y mamíferos domésticos".

Quedando integrado su comité de la siguiente manera:

Presidente: Dr. Alejandro Nieto Rodríguez
Secretario: Dr. Samuel Enoch Estrada Soto
Vocal 1: Dr. Camilo Ríos Castañeda
Vocal 2: Dr. Julio César Rivera Leyva
Vocal 3: Dra. Damianys Almenares López

Se le solicita entregar las tesis al jurado designado y dar fluidez a los trámites como se indica en el manual de procedimientos.

Esperando que esta resolución sea en beneficio de su desempeño académico, y sin otro particular por el momento reciba un cordial saludo.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia



Dr. Julio César Rivera Leyva.
Jefatura de Posgrado

ccp: archivo, Dr. Alejandro Nieto Rodríguez, Dr. Samuel Enoch Estrada Soto, Dr. Camilo Ríos Castañeda, Dr. Julio César Rivera Leyva, Dra. Damianys Almenares López
mitv



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio 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 del *Proyecto CB-257092* y la *Beca de Maestría No. 741648*.

AGRADECIMIENTOS

A Dios y mi familia por la vida, la salud y el amor incondicional.

Al Doctor Monroy y la Doctora Sara, responsables del laboratorio 11, por la confianza, la paciencia y la generosidad de su talento y sabiduría.

Al parque urbano Barranca de Chapultepec y la Facultad de Ciencias Agropecuarias, que a través de los veterinarios David e Isi facilitaron la obtención de las muestras y de quienes quedé gratamente sorprendida por su empeño y profesionalismo. Animalitos que prestaron su vida a este estudio, infinitas gracias.

A mis compañeros y amigos de HP y del laboratorio 11, por sus muestras de cariño, gracias por subir al barco, sin ustedes no habría sido tan emocionante. Erika, Lupillo, Gil, Netzy, Katinka, disfruté mucho la especie de familia que armamos, los paseos y estudiadas. Gracias Laurita por tu gran corazón, Pedro, Doctoras, por las desveladas con el HPLC, por sus consejos y compañerismo. Gil, eres parte muy importante de este episodio, una enorme motivación y promotor de mi crecimiento personal, te admiro y quiero muchísimo. Erika fue muy afortunado coincidir en esta aventura: dos morelianas en Cuernavaca, eres excelente persona roomie, quisiera ser tan fuerte como tú. Amigos de otros institutos y comunidad moreliana que desde lejos se preocuparon por mí, gracias por su hospitalidad y afecto.

La lista de personas que Dios ha puesto en mi camino es larga, todos ustedes contribuyeron a formar la persona que soy hoy y por eso les estaré infinitamente agradecida.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	viii
ABREVIATURAS	ix
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Aspectos generales de los organofosforados	1
1.1.1 Estructura y propiedades	1
1.1.2 Aplicaciones e importancia comercial	2
1.1.3 Toxicocinética	2
1.1.4 Efectos tóxicos	4
1.1.5 Limitaciones del tratamiento farmacológico	7
1.2 Problema de salud pública relacionado al uso de plaguicidas OPs.....	8
1.3 Regulación de los plaguicidas en México.....	9
1.4 Quiralidad de los plaguicidas organofosforados	10
2. ANTECEDENTES	12
2.1 Fosfotriesterasas.....	12
2.1.1 Aspectos generales	12
2.1.2 Mecanismo de acción.....	12
2.1.3 Estereoquímica	13
2.1.4 Inhibidores y activadores.....	14
2.1.5 PON1	14
2.2 Albúmina.....	15
2.2.1 Aspectos generales	15
2.2.2 Unión a metales	16
2.2.3 Actividad PTE asociada a albúmina	17
2.3 Paratión.....	18
2.4 Tricloronato	18
3. JUSTIFICACIÓN	20

4. HIPÓTESIS	21
5. OBJETIVOS	22
5.1 Objetivo general	22
5.2 Objetivos específicos	22
6. MATERIALES Y MÉTODOS	23
6.1 Reactivos y soluciones	23
6.2 Equipos utilizados	24
6.3 Origen, obtención y tratamiento de las muestras	25
6.4 Ensayos de hidrólisis enzimática	27
6.5 Cuantificación de tricloronato racémico por cromatografía quiral	28
6.6 Estudio cinético	29
6.7 Análisis estadístico	29
7. RESULTADOS	30
7.1 Paratión	30
7.2 Tricloronato	31
7.2.1 Hidrólisis de TCN en sueros de aves domésticas	31
7.2.2 Hidrólisis de TCN en suero de mamíferos domésticos	33
8. DISCUSIÓN	42
9. CONCLUSIONES	44
10. PERSPECTIVAS	45
11. BIBLIOGRAFÍA	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura general de los OPs.....	1
Figura 2. Interacción de los OPs con B-esterasas.....	7
Figura 3. Estructura general de PON1.....	15
Figura 4. Estructura de la albúmina.....	17
Figura 5. Estructura del paratión.....	18
Figura 6. Enantiómeros del tricloronato.....	19
Figura 7. Efecto de cationes divalentes sobre la hidrólisis de TCN por el suero de aves domésticas, método colorimétrico.....	31
Figura 8. Separación de los enantiómeros de TCN por HPLC quiral.....	32
Figura 9. Hidrólisis Cu (II)-dependiente de TCN por suero de aves domésticas.....	33
Figura 10. Efecto de la incubación de Ca (II) en sueros de mamíferos domésticos con TCN.....	34
Figura 11. Efecto del Cu (II) sobre la hidrólisis del TCN por el suero de mamíferos domésticos.....	35
Figura 12. Hidrólisis estereoselectiva inversa del TCN por el suero de cabra.....	36
Figura 13. Hidrólisis de TCN por diferentes cantidades de suero de cabra y Cu (II). 37	
Figura 14. Efecto de la pre-incubación de zinc (A) o níquel (B) sobre la hidrólisis Cu (II)- dependiente de TCN en el suero de cabra.....	39
Figura 15. Cinética de la hidrólisis Cu (II)-dependiente de TCN en suero de cabra... 40	
Figura 16. Efecto de la concentración de Cu (II) sobre la hidrólisis de TCN en suero de cabra.....	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Manifestaciones clínicas de envenenamiento colinérgico por OPs.....	5
Tabla 2. Descripción de los reactivos utilizados	24
Tabla 3. Origen de las muestras.....	26
Tabla 4. Condiciones cromatográficas para TCN racémico	28
Tabla 5. Actividad parationasa en suero de aves domésticas en presencia de metales.....	30

ABREVIATURAS

2-PAM	Pralidoxima
2,4,5-TCF	2,4,5-triclorofenol
AAP	Aminoantipirina
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
BBB	Barrera hematoencefálica
BCG	3,3',5,5'-tetrabromo cresol sulfon ftaleína
BuChE	Butirilcolinesterasa
CbE	Carboxilesterasa
Cofepris	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios
CSA	Albúmina sérica de pollo
DDT	Dicloro difenil tricloroetano
CYP3A4, 2D6, etc.	Isoformas del citocromo P450
DFP	Diisopropil fluorofosfato
DL ₅₀	Dosis letal media
DT ₅₀	Tiempo de degradación media
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EPA	Agencia de protección ambiental
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
HDCP	O-hexil O-2,5-diclorofenil fosforamidato
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IM	Intramuscular
IV	Intravenosa
LMR	Límite máximo de residuos
NTE	Esterasa diana de la neuropatía
OMS	Organización mundial de la salud
OPs	Organofosforados
OPIDP	Polineuropatía retardada inducida por organofosforados
PON1	Paraoxonasa

PNP	p-nitrofenol
PTE	Fosfotriesterasa
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SDS	Dodecil sulfato sódico
SEMARNAT	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
Ser	Serina
Ser966	Residuo 966 del aminoácido serina
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso parasimpático
SNS	Sistema nervioso simpático
SSA	Secretaría de Salud
TCN	Tricloronato
TCNasa	Actividad tricloronatasasa
Tris	hidroximetil aminometano
TSA	Albúmina sérica de pavo
UE	Unión Europea
UV-VIS	Ultravioleta-visible

RESUMEN

El paratión y el tricloronato son insecticidas OPs útiles en el desarrollo agrícola y la eliminación de plagas domésticas. Su uso indiscriminado es un problema de salud pública en México. La intoxicación se caracteriza por síndrome colinérgico y en algunos casos neuropatía; ambas son resultado de la inhibición de B-esterasas. Para la evaluación de la seguridad de los OPs racémicos se han sugerido estudios de metabolismo estereoselectivo, ya que éste determina en gran medida la su toxicidad. Enzimas llamadas fosfotriesterasas de varias especies hidrolizan este tipo de compuestos, lo que hace pensar en ellas como un valioso recurso terapéutico. La actividad fosfotriesterasa, dependiente de metales como Cu (II) y Ca (II) se reportó en suero de aves y mamíferos domésticos. Nuestro estudio busca la posibilidad de hidrolizar tricloronato y paratión por sueros de 7 especies de aves y 9 mamíferos domésticos, en presencia de metales. Para cumplir nuestros objetivos utilizamos la técnica adaptada de detección de fenoles por espectrofotometría UV-VIS. Detectó el grupo saliente del OP parental, liberado durante la hidrólisis enzimática. Debido a que el TCN es un OP racémico, empleamos también cromatografía quiral; que detecta la concentración residual (no hidrolizada) de sus enantiómeros. Nuestros resultados demuestran que el suero de aves domésticas presenta actividad A-esterasa (hidrolizante) sobre compuestos OPs del tipo tio-fosfato. Los sueros de codorniz, pato, ganso y pavo real realizan la hidrólisis Cu (II)-dependiente y estereoselectiva del (-)-tricloronato. Por su parte, los sueros de mamíferos no presentaron hidrólisis Ca (II)- dependiente de tricloronato, pero se descubrió una actividad Cu (II)-dependiente y estereoselectiva del (+)-tricloronato en cabra. Esta nueva actividad es inversa a la observada en sueros de aves. Estos hallazgos contribuyen a la descripción de la actividad PTE en el suero de aves y mamíferos domésticos.

ABSTRACT

Parathion and trichloronate are thio OPs insecticides useful in agricultural development and the elimination of domestic pests, but their misuse makes them a public health problem in Mexico. Cholinergic syndrome and in sometimes neuropathy, characterize the intoxication; both symptom result from the inhibition of B-esterases. Studies of stereoselective metabolism have been suggested to evaluate the safety of racemic OPs, since it determines strongly their toxicity. Enzymes called phosphotriesterases of several species hydrolyze this type of compounds, which makes them think of as a valuable therapeutic resource. Phosphotriesterase activity, which depends on metals such as Cu (II) and Ca (II), has been reported in domestic avian and mammals serums. Our study explores the possible hydrolysis on trichloronate and parathion by 7 avian and 9 mammals' serums in presence of metals. In order to our objectives we used the adapted phenols detection technique by UV-VIS spectrophotometry, which detects the leaving group released during enzymatic hydrolysis. Do TCN is a racemic OP, we also used chiral chromatography, which detects the residual concentration (non-hydrolyzed) of the parental organophosphorus enantiomers. Our results show that in fact domestic avian sera have A-esterase activity (hydrolytic) on tio-phosphates –like OPs compounds. Quail, duck, goose and peacock sera perform the Cu (II)-dependent and stereoselective hydrolysis of (-)-trichloronate. In the other hand, mammalian sera couldn't hydrolyze trichloronate Ca (II)-dependently, but surprisingly Cu (II)-dependent and stereoselective on (+)-trichloronate activity was found in goat. This new activity is opposite to the one found in avian. These findings contribute to the description of PTE activity in the serum of domestic avian and mammals.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Aspectos generales de los organofosforados

1.1.1 Estructura y propiedades

Los organofosforados (OPs) son un grupo diverso y altamente tóxico de ésteres, amidas, o derivados tiólicos del ácido fosfórico o fosfónico (Escudero Artiaga, 1997). En su estructura (**figura 1**), sus átomos de oxígeno (P=O) o azufre (P=S), unidos directamente al fósforo por un doble enlace les otorga la denominación oxo-fosfato o tio-fosfato respectivamente. Los segundos requieren activación tóxica, a través de la desulfuración oxidativa mediada por CYP3A4 y CYP2D6 principalmente en microsomas del hígado.

Poseen elevada solubilidad en grasas, lo que facilita su ingreso por membranas biológicas. Su estabilidad depende del pH del medio, son hidrolizados con rapidez en medio básico (Lunn y Sansone, 1994). Por su naturaleza electrofílica reaccionan a) con reactivos nucleofílicos como el agua; consiguiendo hidrolizarse en medio alcalino, o enzimáticamente (fosforilaciones o alquilaciones) y b) con -OH de la serina de B-esterasas causando su inhibición. Adicionalmente, un 25% de los OPs presenta quiralidad (Singh y Walker, 2006), propiedad química que será abordada en la presente tesis.

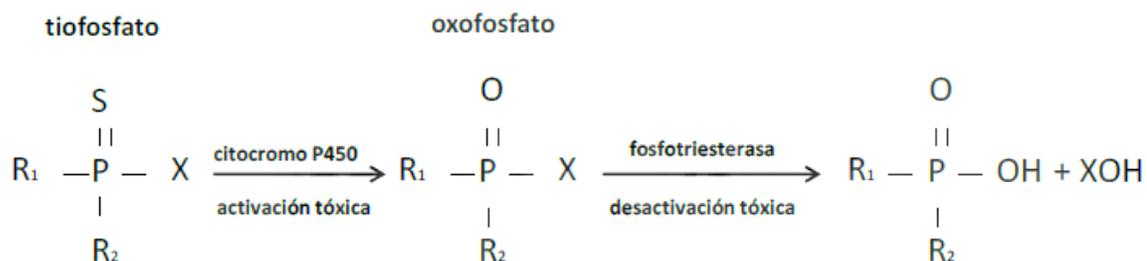


Figura 1. Estructura general de los OPs. Se compone de un átomo de oxígeno o azufre unido al fósforo por un doble enlace, radicales alquilo o arilo R₁ y R₂, y un grupo saliente X (alifático, aromático o heterociclo) que se desprende durante la hidrólisis del enlace éster, cuando el OP interactúa con fosfotriesterasas o componentes nucleofílicos de origen endógeno o exógeno (fármacos).

1.1.2 Aplicaciones e importancia comercial

Los OPs cumplen propósitos industriales, terapéuticos e inclusive bélicos y pese al debate ecológico su papel como plaguicidas es el más importante desde hace 50 años. Cada año en el mundo se aplican alrededor de 4 millones de toneladas y solo el 1% alcanza el organismo blanco. Los OPs representan un tercio del mercado global de insecticidas (Singh y Walker, 2006) con usos agrícolas, domésticos y sanitarios; ya que su aplicación está considerada en el programa de control de enfermedades transmitidas por vectores. A partir de los 70's los OPs han reemplazado a los insecticidas organoclorados como el DDT (Costa, 2006). Los más utilizados en México son metil paratión, metamidofos y malatión (Greenpeace México, 2015) y los corporativos que dominan este mercado son Bayer, Monsanto, DuPont y Zeneca.

1.1.3 Toxicocinética

1.1.3.1 Absorción y distribución

La absorción se refiere al paso del xenobiótico a través de membranas y su ingreso a la circulación sanguínea. La elevada liposolubilidad de los OPs, especialmente de la forma tio, facilita su absorción por piel, membrana alveolar, tracto gastrointestinal y barrera hematoencefálica. La distribución está determinada por el riego sanguíneo, la concentración plasmática, la unión a proteínas y la afinidad del xenobiótico por los diferentes tejidos. Pueden acumularse en tejido adiposo, hígado y cerebro (Sogorb y col., 2004) posibilitando la reaparición de los signos clínicos de la intoxicación después de la recuperación (Frediksson y Bigelow, 1961). Son transportados al SNC por difusión y por carboxilesterasas a través de la BBB (Miroshkina y col., 1999).

1.1.3.2 Metabolismo y excreción

Dos procesos pueden ocurrir a los OPs dentro del organismo; la desactivación o la activación tóxica, esto depende de su estructura química y de los sistemas enzimáticos con que interactúen (Jokanovi, 2001). En los mamíferos la hidrólisis enzimática por paraoxonasa (PON1) es una de las principales vías de detoxificación de OPs en su forma oxo. La adición de grupos funcionales (OH, COOH, SH, NH₂) a la molécula de OP mediante reacciones de óxido-reducción o hidrólisis (Fase I) le confiere más polaridad. El resultado final de las reacciones de hidrólisis son los grupos salientes característicos de cada OP y diferentes alquilfosfatos. En las reacciones de Fase II los metabolitos resultantes se conjugan con sustratos endógenos como glucurónidos y aminoácidos o se unen a esterasas como BuChE. Paradójicamente las reacciones de Fase I y II también pueden originar metabolitos más tóxicos, ejemplo de ello es la conversión de los tiofosfatos (P=S) en oxo-fosfatos (P=O) por desulfuración oxidativa mediada por citocromos de varios tejidos (**figura 1**). Esta conversión provoca una mayor afinidad o toxicidad de los compuestos mediante la inhibición efectiva de la AChE. La eliminación de los metabolitos ocurre principalmente por la orina y en menor proporción por heces y aire exhalado (Sogorb y col., 2004). En la desintoxicación de OPs la excreción es mínima y su eliminación sin biotransformación es posible aunque poco común.

1.1.3.3 Enzimas que participan en su biotransformación

Las enzimas que interactúen con los OPs determinarán la sensibilidad de una especie o su resistencia a estos compuestos. Entre las más importantes se encuentran:

Oxidasas de función mixta. Son dependientes de citocromo P450 distribuido en hígado, cerebro, riñón, etc. A pesar de los pocos reportes sobre las isoformas de P450 involucradas en la activación de paratión y otros OPs, se sabe que en humanos la principal es CYP3A4, mientras que CYP1A2, CYP2C9, CYP2C10 y CYP2E1 participan en menor grado (Butler y Murray, 1997). El ion sulfuro liberado de la conversión de los P=S en P=O también puede suprimir la actividad de citocromos debido a su unión al grupo hemo (Rose y col., 2005).

Glutación S-transferasas (GST). Catalizan el ataque nucleofílico a partir de su grupo sulfidrido, adicionando glutación endógeno a varios xenobióticos para hacerlos más

solubles. Metabolizan P=O y P=S con competencia de alquil y aril-transferasas. La familia citosólica es inducible y conforma un mecanismo bioquímico que confiere resistencia a los insecticidas (Zhou y col., 2015).

Esterasas. Hidrolasas de ésteres que fueron divididas -desde el punto de vista toxicológico- por Aldridge en dos grupos: A-esterasas y B-esterasas (Aldridge, 1953).

A-esterasas: Se reserva este término para las carboxilesterasas (CbEs), que además de carboxilésteres -como indica su nomenclatura- también hidrolizan organofosforados, dando lugar a productos inactivos y excretables. A esta categoría pertenecen las fosfotriesterasas (PTEs) con actividad arildialquilfosfatasa, que debido a su importancia serán abordadas particularmente en los capítulos posteriores en esta tesis.

B-esterasas: Presentes en muchas especies, en el retículo endoplásmico y citoplasma de varios tejidos como sangre, intestino, hígado y cerebro. Son las esterases cuya característica principal es ser inhibidas por los OPs. La inhibición sucede por fosforilación de residuos de Ser en su centro catalítico, trayendo consigo la unión covalente P-enzima. Esta unión es estable y tarda en disociarse horas e incluso días, mientras que la unión C-enzima en ese mismo sitio por parte del acetato en la ACh resiste apenas unos segundos. Es importante mencionar que la inhibición de CbEs no vitales como la **BuChE** constituye una estrategia de detoxificación al reducir la cantidad de moléculas disponibles para unirse a CbEs de importancia clínica como la **AChE** y **NTE**, y que también hacen posible el diagnóstico de intoxicación por OPs.

1.1.4 Efectos tóxicos

Los efectos de los OPs dependen en gran medida de su metabolismo, los más característicos son los neurotóxicos; relacionados con su interacción con B-esterasas, AChE y NTE principalmente (**figura 2**). También afectan otras funciones como la reproducción y pueden dañar el DNA dado su potencial como agentes alquilantes (Sánchez-Peña y col., 2004). Los efectos pueden aparecer horas o semanas después de la exposición. Su gravedad es producto de la convergencia de factores como: estado de nutrición y genotipo individual, tiempo de exposición, cantidad de compuesto y su vía de entrada.

1.1.4.1 Síndrome colinérgico

Se trata de los signos y síntomas característicos de la intoxicación aguda, aparece a las 8-12 h después de la exposición. Es consecuencia de que el OP fosforile residuos de serina del sitio activo de la AChE, lo que impide la hidrólisis de acetilcolina (colina + acetato) y promueve su acumulación en la sinapsis sobre estimulando a los receptores muscarínicos (acoplados a proteínas G) y nicotínicos (vinculados a canales de sodio). La AChE permanecerá inhibida hasta que se sintetice nueva enzima o hasta la administración de un reactivador (Sogorb, y col., 2004). La inhibición del 70-90% suele ser letal (Casida y Quistad 2005). La muerte puede suceder por paro cardiorrespiratorio, otras manifestaciones se encuentran resumidas a continuación (**tabla 1**).

Tabla 1. Manifestaciones clínicas de envenenamiento colinérgico por OPs (Sogorb, y col., 2004).

Receptores muscarínicos	Receptores nicotínicos	SNC
Salivación	Fatiga muscular	Ansiedad
Lagrimo	Debilidad	Insomnio
Incontinencia urinaria	Temblor	Pesadillas
Bradycardia y paro cardiaco	Disnea	Confusión
Opresión abdominal	Parálisis	Neurosis
Náusea y vómito	Palidez	Inestabilidad emocional
Miosis	Taquicardia	Debilidad
Bronconstricción	Hipertensión	Convulsiones
Aumento de las secreciones bronquiales		Depresión respiratoria y cardiovascular
Sudoración		Coma

1.1.4.2 Síndrome intermedio

En casos de intoxicación por organofosforados con inhibición persistente de la AChE, se reportó una entidad clínica diferente que aparece después del síndrome colinérgico y antes de la neuropatía; entre las 24 y 96 h siguientes a la exposición. Los pacientes manifiestan parálisis progresiva de músculos del tracto respiratorio y pares craneales, atribuible a los efectos nicotínicos. Este evento parece estar más relacionado con la severidad de la intoxicación que con un OP específico (Senanayake y Karalliedde, 1987).

1.1.4.3 Polineuropatía retardada inducida por OPs (OPIDP)

La esterasa diana de la neuropatía o NTE, descubierta en los 60's por M.K. Johnson, es una enzima ligada a los lípidos de membrana, abundante en retículo endoplásmico de neuronas y linfocitos. (Dudek y Richardson, 1982). Tiene 1,327 aminoácidos y su sitio activo es Ser966. Se determina que la esterasa está envejecida cuando es imposible su reactivación con agentes nucleofílicos (KF) (Clothier y Johnson, 1979).

Algunos OPs -denominados neuropáticos- como el insecticida racémico metamidofos, inducen daño axónico relacionado a la fosforilación (>70%) y posterior envejecimiento de la NTE. Esto se conoce como OPIDP y aparece 2-3 semanas después de la exposición a una dosis única pero suficientemente alta de OP neuropático. Su característica clínica es la parálisis flácida de extremidades inferiores con progresión retrógrada ascendente (Lotti, 1999) lo que daña gravemente a la columna vertebral y el nervio ciático. OPs neuropáticos también incrementan la autofosforilación de la calcio/calmodulina cinasa II (Gupta y AbouDonia, 1995), lo que incrementa la fosforilación de proteínas del cito esqueleto, razón por la cual se sugiere que el cito esqueleto es la diana de la OPIDP (Vilanova y Sogorb 1999).

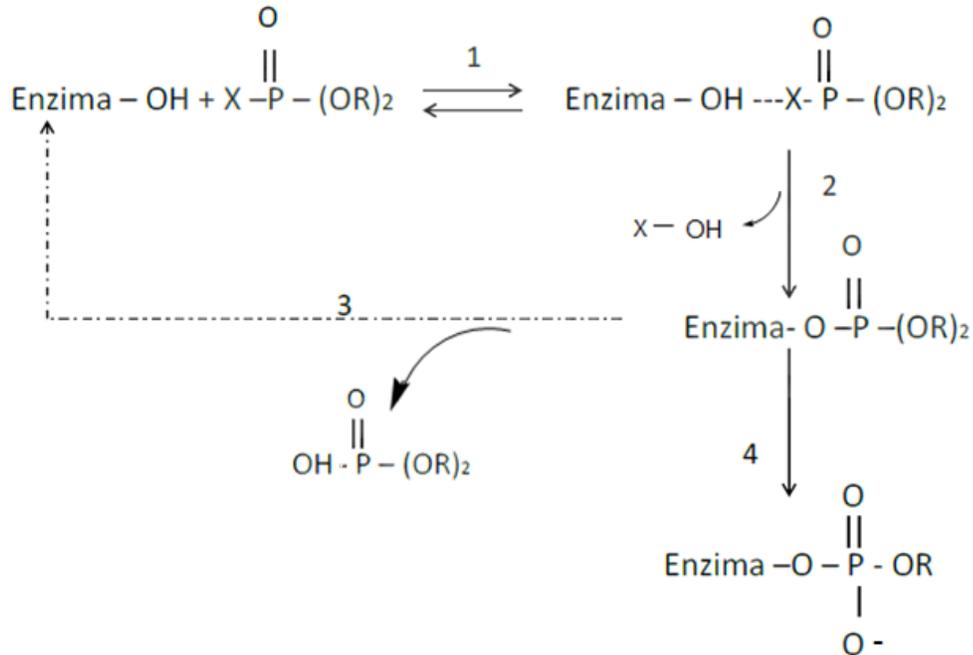


Figura 2. Interacción de los OPs con B-esterasas. Una vez formado el complejo michaeliano entre la enzima y el OP (reacción 1) se fosforila un residuo de serina de la enzima, perdiéndose el grupo saliente X (reacción 2). A partir de aquí pueden darse dos vías: la de reactivación con agentes nucleofílicos: OH⁻ del medio o fármacos (reacción 3) recuperan la función enzimática, o una reacción de envejecimiento (reacción 4) en la que se rompe el enlace R-O-P perdiéndose el grupo R y formándose un residuo fosfórico con carga negativa. Este fenómeno resistente al tratamiento farmacológico es ocasionado por los organofosforados quirales (Monroy-Noyola y col., 2007).

1.1.4.4 Neurotoxicidad crónica

La exposición constante a bajos niveles de agentes nerviosos OPs se asocia con el déficit neurológico que engloba varios problemas como el déficit de atención, trastornos del sueño y dificultad de la memoria. Estos signos y síntomas se observaron en soldados que volvieron de la Guerra del Golfo y trabajadores agrícolas (McCauley, 2006).

1.1.5 Limitaciones del tratamiento farmacológico

El sulfato de atropina por vía IV o IM (hasta 300 mg/ día) se ha empleado con eficacia para contrarrestar los efectos muscarínicos de las intoxicaciones por OPs, pero es inútil

contra los nicotínicos, la reactivación de la AChE o la eliminación de los OPs. Adicionalmente en intoxicación severa, algunos individuos presentan tolerancia a la atropina, lo que implica administrar mayor dosis y favorece la aparición de efectos adversos. Los primeros 2 días tras la formación del complejo enzima-OP son cruciales para la recuperación, ya que parte de la enzima inactivada puede defosforilarse recobrando su actividad gracias a la administración de oximas como pralidoxima (2-PAM) y obidoxima, que actúan como agentes nucleofílicos disociando el complejo. Por lo contrario, si se pierde un grupo alquilo del aducto fosforilo, con el paso del tiempo, el complejo se refuerza (envejecimiento) y la oxima pierde valor terapéutico. Adicionalmente, mantener elevadas concentraciones tisulares de OP cuando el efecto de la atropina desaparece provoca acentuación del envejecimiento enzimático. Corticoides, dopamina, nifedipino, verapamil se han ensayado en el tratamiento de la neuropatía sin probar hasta ahora su efectividad, solamente ha sido útil la rehabilitación y en el caso de la protección del SNC las benzodiazepinas también presentan inconvenientes como la excesiva sedación.

1.2 Problema de salud pública relacionado al uso de plaguicidas OPs

Países en desarrollo usan y fabrican indiscriminadamente plaguicidas, estas sustancias son responsables de la mayor proporción de intoxicaciones en humanos. La OMS ha estimado 3 millones de intoxicaciones y alrededor de 200 mil muertes anuales (WHO, 1990). En México la producción agrícola se beneficia del uso de plaguicidas OPs, pero a un elevado precio ecológico y humano ya que estos compuestos no son suficientemente específicos, logrando envenenar a otras especies a las que no están dirigidos debido a la semejanza fisiológica y bioquímica con el organismo blanco (Yáñez y col., 2002). Las intoxicaciones agudas por estos compuestos son un problema de salud pública. Las entidades que reportan el mayor número de casos son Nayarit, Jalisco, Sinaloa y Chiapas (Greenpeace México, 2015). Los agricultores son uno de los sectores de la población más desprotegido en términos de seguridad laboral y social, y especialmente los que trabajan en invernaderos presentan mayor exposición a plaguicidas OPs. La exposición habitual laboral incluye las vías respiratoria y dérmica, siendo la primera la más rápida, permitiendo alcanzar altas concentraciones en circulación y órganos diana.

1.3 Regulación de los plaguicidas en México

Un plaguicida es una sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo vectores de enfermedad humana o animal, especies indeseadas de plantas o animales capaces de causar daños o interferir en la producción, procesamiento, almacenamiento, transporte o mercado de alimentos (FAO, 1989; WHO 1990). Para la protección ambiental y de sus habitantes se establecieron leyes que tratan el tema de los plaguicidas en varios contextos, por ejemplo prohíben el uso de algunos productos, mantienen vigilancia de sus límites permisibles y disposición de sus residuos, etc. A continuación se muestra un listado:

- a) Ley Federal de Sanidad Fitopecuaria
- b) Ley General de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente (LEGEPa)
- c) Ley Federal de Sanidad Vegetal
- d) Ley de Desarrollo Rural Sustentable
- e) Ley General de Salud, artículo 278
- f) Ley Federal de Sanidad Animal
- g) Ley Federal del Trabajo y Reglamento Federal de Seguridad, Higiene y Medio Ambiente de Trabajo
- h) Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos
- i) Ley de Caminos, Puentes y Autotransporte Federal y Reglamento para el Transporte Terrestre de Materiales y Residuos Peligrosos
- j) Ley Aduanera
- k) Ley de Comercio Exterior

Otros instrumentos:

- a) Reglamento en Materia de Registro, Autorizaciones de Importación y Exportación y Certificados de Exportación de Plaguicidas, Nutrientes Vegetales y Sustancias y Materiales Tóxicos o Peligrosos
- b) NOM-CRP-001-ECOL/93 (residuos)
- c) NOM-021-ZOO-1995 (única específica de plaguicidas)
- d) Convenio de Róterdam (sobre procedimiento de consentimiento fundamentado previo aplicable a plaguicidas para comercio internacional)

También fue creada la comisión intersecretarial para el control del proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas (CICOPLAFEST). Este organismo comprende varias secretarías: SSA, SAGARPA, SECOFI y SEMARNAT y atiende la formulación, fabricación, distribución (importación), comercialización y aplicación de estos compuestos. La secretaría de salud a través de Cofepris emitió un catálogo de plaguicidas con objeto de ayudar al buen uso y manejo de plaguicidas en sus áreas de empleo.

Apoyo gubernamental al ejercicio de la difusión científica:

Actualmente Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) promueve la colaboración interdisciplinaria para atender el problema de los plaguicidas a través de la Red Temática de Toxicología de Plaguicidas.

En el ámbito global están, por ejemplo:

- a) E.U.A: Ley sobre plaguicidas 1988
- b) Francia: Ley No. 71-1139
- c) UE: Vigilancia permanente de LMR
- d) OMS, FAO, EPA

1.4 Quiralidad de los plaguicidas organofosforados

Se dice que una molécula es quiral cuando tiene una imagen especular no superponible, denominada enantiómero. Este tipo de estereoisómeros tiene actividad óptica y aunque poseen la misma fórmula molecular y propiedades químicas, su actividad biológica es distinta. El átomo responsable de este fenómeno se conoce como centro quiral, el de los OPs es el fósforo pentavalente con sustituyentes oxígeno o azufre. La cantidad de centros quirales determina el número de estereoisómeros que tendrá una molécula. La resolución quiral (separación de los enantiómeros) es posible mediante procedimientos como HPLC adaptando una columna quiral. Los insecticidas organofosforados quirales se obtienen comercialmente como mezcla racémica (mezcla equimolar del par de enantiómeros) ya que la síntesis enantioselectiva es muy costosa o no se ha desarrollado para algunos compuestos. Esto supone un problema de bioseguridad puesto que en un mismo producto pueden encontrarse componentes con diferente actividad; inhibitoria, envejecedora o ambas. Los sistemas enzimáticos para la desintoxicación pueden hidrolizar o bien a un

solo estereoisómero (estereoespecificidad) o bien a uno con mayor rapidez respecto a los demás (estereoselectividad).

2. ANTECEDENTES

2.1 Fosfotriesterasas

2.1.1 Aspectos generales

Las fosfotriesterasas (PTEs) son un tipo de esterasas (EC 3.1.8) que catalizan la hidrólisis metal-dependiente de los enlaces P-O, P-F o P-S de los OPs y están ampliamente distribuidas en la naturaleza desde bacterias hasta grandes vertebrados. Comprenden dos grupos:

EC 3.1.8.1 Arildialquilfosfatasas (A-esterasas): el principal sustrato es paroxón. Las más estudiadas son PTE de *Pseudomona diminuta*, que depende de Zn (II) y PON1 del suero de mamíferos incluyendo el humano, que depende de Ca (II).

EC 3.1.8.2 Diisopropilfluorofosfatasas: actúan sobre enlaces fósforo-cianuro y fósforo-haluro de gases nerviosos como el DFP, tabun y soman.

Aunque no es claro el papel fisiológico de las PTEs, es posible que evolucionaran para degradar metabolitos halogenados y OPs del ambiente, ya que son eficaces en el tratamiento de estas intoxicaciones (Sogorb, y col., 2004). En general, los mayores representantes de la actividad PTE son los mamíferos, mientras que las aves, han manifestado niveles bajos de esta actividad. En humanos la actividad PTE se ha encontrado en varios tejidos siendo más importante en hígado y plasma, pero su ausencia en el SNC sugiere la neurotoxicidad de los OPs. Esto aumenta nuestro interés en la búsqueda de proteínas que actúen a este nivel y resulten útiles para la profilaxis.

2.1.2 Mecanismo de acción

Se ha propuesto que las PTEs realizan ataque nucleofílico sobre el OP mediante el grupo hidroxilo de las moléculas de agua del medio que es activado por los cationes divalentes de su centro catalítico. Los productos de esta hidrólisis son alcoholes o ácidos y su formación ocurre en un solo paso, por lo que se ha denominado a este mecanismo de

hidrólisis “desplazamiento directo” (Aubert y col., 2004). Es importante mencionar que la distribución espacial de una molécula determina su disposición a reaccionar, es así como se favorece el contacto enzimático en el lado del sustrato con menos impedimento estérico.

2.1.3 Estereoquímica

El metamidofos, es un OP fosforamidato que produce OPIDP en humanos. Debido a la dificultad para inducir OPIDP en modelos animales con este compuesto (por sus efectos colinérgicos) fue sintetizado el O- hexil O-2,5-diclorofenil fosforamidato (HDGP) con mayor afinidad sobre la NTE en comparación con la AChE. Los isómeros de un mismo OP pueden diferir en su capacidad inhibitoria de B-esterasas, incluso en el tipo de interacción con ellas, como ocurrió con el HDGP, el EPN y tricloronato. Particularmente el S-(-)-HDGP resultó más potente inhibidor que el R-(+)-HDGP, pero respecto al envejecimiento enzimático sólo el R-(+)-HDGP lo generó (Sogorb y col., 1998). En los estudios de hidrólisis de HDGP *in vitro* e *in vivo* de Villanova, Sogorb y Monroy (2002; 2007) en varios tejidos de mamíferos y aves domésticos, se observó que: **1)** una misma especie puede mostrar más de una actividad PTE, que implica la hidrólisis estereoespecífica o estereoselectiva de isómeros de un mismo sustrato, **2)** esta hidrólisis depende de diferentes cationes metálicos según el tejido y especie, destacando el Ca (II) en los sueros de mamíferos y el Cu (II) en los de aves, **3)** el isómero que logra sobrevivir al metabolismo sistémico es el responsable de alcanzar las dianas de toxicidad; por lo tanto de los efectos *in vivo*.

Estos descubrimientos sugirieron que otros OPs racémicos podrían hidrolizarse en especies y condiciones similares incluyendo a los tio-fosfatos. Fue así como nuestro laboratorio encontró que la albúmina sérica (fracción V) de *Meleagris gallopavo* hidroliza principalmente al (-)-tricloronato de manera Cu (II)-dependiente (Almenares-López, 2010). Convirtiéndose en el primer reporte de hidrólisis estereoselectiva de un tio-fosfato en aves domésticas por A-esterasas.

2.1.4 Inhibidores y activadores

Los patrones de respuesta a cationes inorgánicos del medio de reacción de las PTEs o A-esterasas, que a diferencia de las B-esterasas sí requieren de cofactores, es útil para diferenciar sus actividades (Vilanova y Sogorb, 1999). La sensibilidad hacia agentes quelantes las caracteriza como metaloenzimas y su interacción con bloqueadores de grupos tiol sugiere que las PTEs presentan residuos de cisteína en su sitio activo o histidina, ácido glutámico y aspártico como en el centro activo de PON1 del suero de mamíferos y la PTE de *Pseudomona diminuta*.

2.1.5 PON1

Esta proteína de 45 kDa se sintetizada en el hígado y transporta en la sangre asociada a HDL mediante la apolipoproteína A-I. En relación a los niveles de PON1; citosinas inflamatorias, fumar, padecer diabetes o dieta rica en grasas trans son condiciones que los reducen, mientras que el consumo de polifenoles, fibratos y estatinas tienden a aumentarlos. Consecuentemente, niveles altos de PON1 sérica se asocian con ateroprotección. (J. Lusis y col., 2015). Se ha propuesto un papel antioxidante que lo liga también con la enfermedad de Parkinson y Alzheimer.

A través de sus dos átomos de Ca (II) PON1 mantiene estabilidad estructural (**figura 3**) y cataliza tres tipos de actividad: a) lactonasa: hidroliza lactonas aromáticas y alifáticas como la dihidroumarina, b) arilesterasa (EC 3.1.1.2): hidroliza esteres aromáticos como el acetato de fenilo y la más importante; c) paroxonasa (EC 3.1.8.1): hidroliza compuestos organofosforados. Del efecto sobre OPs son responsables sus residuos de histidina y triptófano en el sitio activo. El sustrato endógeno de PON1 es desconocido, pero los únicos insecticidas OPs sobre los que ejerce su actividad tienen forma oxo: paroxón (del que deriva su nombre), clorpirifos-oxon y diazoxon principalmente. Puesto que el gen de PON1 presenta polimorfismos en la posición 192 (glutamina o arginina), se han realizado estudios de las diferencias individuales de actividad paroxonasa, logrando caracterizar población de alta, media o baja actividad. Por ejemplo el polimorfismo PON1 192R hidroliza más rápido al paroxón, mientras que PON1 Q192 hidroliza más rápido al diazoxón (Davies y col., 1996). Los factores de riesgo, la

susceptibilidad genética, la exclusión de estructuras S=P de la lista de sustratos de PON1 o su selectividad sobre el isómero menos tóxico, son algunos de los desafíos más importantes en el tratamiento de la intoxicación por OPs.

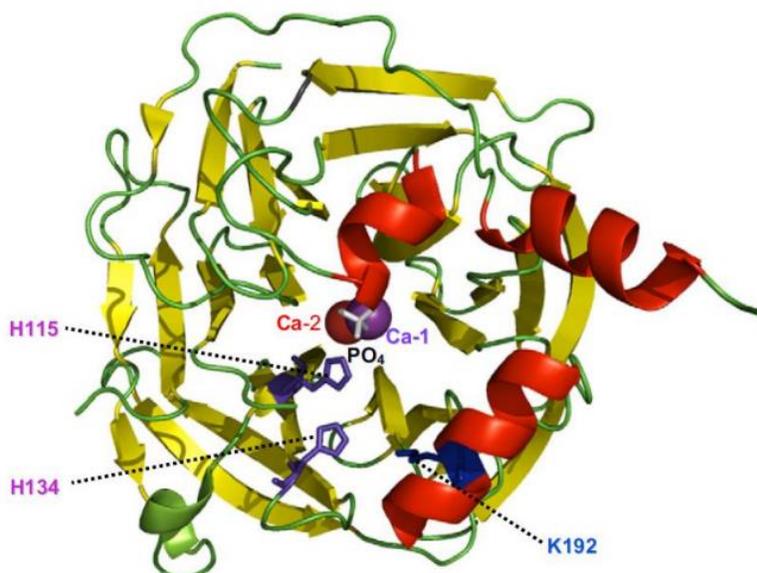


Figura 3. Estructura general de PON1. Tomada de Masson y col., 2010. Están identificados sus átomos de calcio (II) como Ca-1 y Ca-2 y los residuos de histidina (H115, H134) en su sitio activo; responsables del efecto sobre los organofosforados y lisina (K192).

2.2 Albúmina

2.2.1 Aspectos generales

Es una proteína multifuncional muy abundante en el suero (50 g/L; 0.75 mM) que puede unir y transportar varios ligandos dada su flexibilidad conformacional, como ácidos grasos (9 sitios de unión) y metales (4 sitios de unión parcialmente selectivos). Contiene alrededor de 585 aminoácidos distribuidos en tres dominios homólogos. La característica estructural más importante de las albúminas son sus puentes disulfuro pareados formando bucles que al asociarse le dan un aspecto globular.

Dentro de los mamíferos, la albúmina de perros y gatos es la de mayor similitud a la humana (80-82%). Mientras que las aves tienen una similitud del 61-63%. La albúmina de aves y mamíferos tiene un solo grupo tiol que resulta del residuo de cisteína libre en la posición 34. Ésta estructura se encuentra en un sitio parcialmente protegido de la oxidación en el giro de 7 residuos entre las hélices h2 y h3 del subdominio IA.

2.2.2 Unión a metales

N- terminal (NTS)- En condiciones fisiológicas 2% de este sitio es ocupado por el Cu (II) en la HSA, suficiente para convertirla en la segunda fuente proteica más importante de este mineral, después de la ceruloplasmina.

Residuo CYS-34- Localizado en un pliegue entre las hélices 2 y 3 del subdominio IA. Tiene un grupo tiol libre en la denominada HSA reducida y con ello un papel fundamental en la formación de disulfuros heterogénicos con cisteínas externas o glutatión.

Sitio de unión múltiple a metales (MBS; Sitio A)- es la región preferencial para unir Zn (II), una de las dos opciones para Cd (II) y la segunda en afinidad para Cu (II) y Ni (II). En el caso de cobre se retiene al menos una molécula de agua, que puede sustituirse con facilidad.

Sitio B- Tiene afinidad similar al MBS para Cd (II) y baja afinidad para Zn (II), sin embargo para Mn (II) parece ser el principal.

Mn (II) y Fe (II) cuentan para su distribución con la transferrina, sin embargo la albúmina- una proteína promiscua- puede también unirlos con significancia más bien tóxica. La unión de Mn (II) en HSA es modulada por Zn (II), pH y miristato a través de la inhibición competitiva y mecanismos alostéricos (Fasano y col., 2012). Un exceso de Zn (II) desplaza el Mn (II) de su sitio primario de unión, lo que sugiere que el sitio primario de Mn (II) corresponde al sitio secundario de Zn (II). La funcionalidad de este sitio no completamente caracterizado también está relacionada con la unión de un ácido graso.

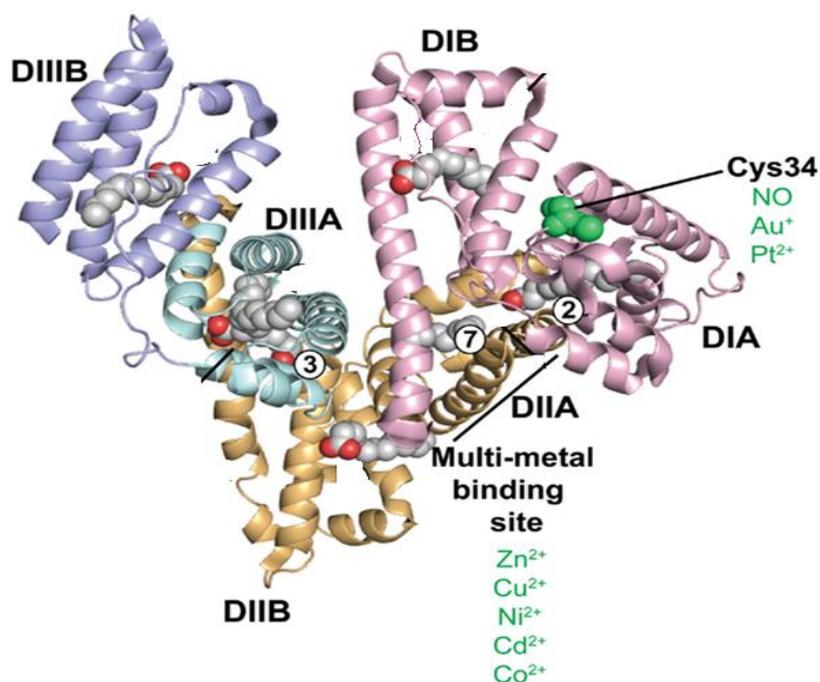


Figura 4. Estructura de la albúmina. La imagen señala los sitios de unión a metales en los diversos dominios homólogos (DI, II, III; A, B) y algunas moléculas de ácidos grasos (2, 3, 7).

2.2.3 Actividad PTE asociada a albúmina

La actividad PTE (HDCPasa principalmente) encontrada en aves y mamíferos asociada a la albúmina sérica no es calcio-dependiente, por lo tanto no es sensible a EDTA. Su cinética enzimática consta de dos etapas (Sogorb, 1997):

Primera: Unión rápida del sustrato OP a la proteína –fosforilación de la albúmina.

Segunda: Lenta defosforilación de las moléculas de albumina.

En el laboratorio del Dr. Vilanova se desarrolló un método colorimétrico para la detección del 2,5-diclorofenol (DCP) grupo saliente del HDCP con lo que fue confirmada su degradación y por medio de cromatografía de exclusión molecular e intercambio iónico se determinó que la fracción V (albúmina) de suero de pollo y conejo es la responsable de dicha hidrólisis, proponiendo como centro activo la secuencia Arg⁴¹⁰-Try⁴¹¹-Thr⁴¹²-Lys⁴¹³ (Sogorb y col., 1998).

2.3 Paratión

El O,O-dietil O-(p-nitrofenil) fosforotioato (**Figura 5**) es un insecticida y acaricida muy potente que resulta fatal si es inhalado, ingerido o al contacto con la piel, por lo que está prohibido en Europa y los Estados Unidos . Se convierte en el organismo a la forma activa paroxón, uno de los más potentes inhibidores de AChE pero no de NTE. Es un líquido de color amarillo claro. Tiene coeficiente de partición (n-octanol/agua) 3.8, densidad 1.26 g/ml, peso molecular 291.26 g/mol, punto de ebullición 375°C y presión de vapor 0 kPa a 20°C. Su grupo saliente es el P-nitrofenol, que puede detectarse por espectrofotometría. Es extremadamente tóxico para la vida acuática (LD₅₀ 0.056 mg/l, 96 h, guppy) y de mamíferos (DL₅₀ 2 mg/kg, rata y 28 - 56 mg/kg, cabra). Se sabe que afecta la reproducción y está identificado como mutagénico y posiblemente cancerígeno y disruptor endócrino (PPBD).

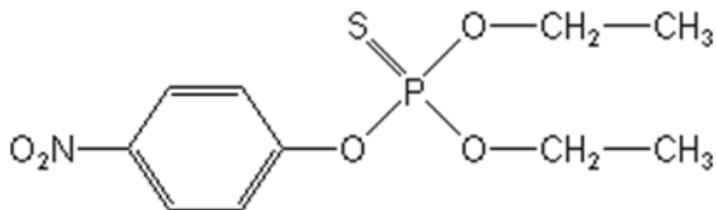


Figura 5. Estructura del paratión

2.4 Tricloronato

El Tricloronato (RS)- (O-etil O-2,4,5-triclorofenil etilfosfonotioato) es un líquido de color ámbar, tiene coeficiente de partición (n-octanol/agua) 5.2, densidad 1.365 g/cm³, peso molecular 333.6 g/mol, punto de ebullición 108°C y presión de vapor 0 kPa a 25°C. Su grupo saliente es el 2,4,5-triclorofenol, que puede detectarse por espectrofotometría. El Tricloronato se comercializa con los nombres Phytosol, Agrisil, Agritox, entre otros. Es un insecticida no sistémico que combate la mosca *Pylla rosae* y la cochinilla *Rhizoeus cacticans* invasores de invernaderos y cultivos de hortalizas. Se trata de un tio-fosfato anticolinesterásico y neuropático. Tiene un centro quiral, por lo que presenta dos

enantiómeros (+)-tricloronato y (-)-tricloronato (**figura 6**). No es carcinogénico, sin embargo no hay información suficiente a cerca de mutagénesis ni efectos sobre la reproducción. Algunas características de su ecotoxicidad son: persistente en el suelo (DT₅₀ en campo 180 días), muy tóxico para la vida acuática (LD₅₀ 0.11 - 0.18 mg/l, 96 h, trucha arcoíris) y de mamíferos (DL₅₀ 23.7 mg/kg, rata) y aves (DL₅₀ 12 mg/kg *Anas platyrhynchos*) (PPDB).

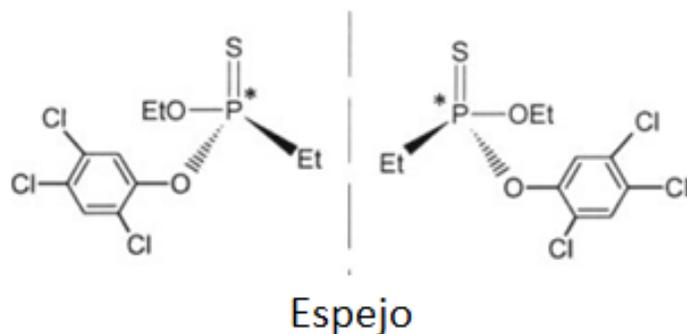


Figura 6. Enantiómeros del tricloronato. *centro quiral (Liu y col., 2006)

3. JUSTIFICACIÓN

Los insecticidas organofosforados son útiles en la eliminación de plagas agrícolas y domésticas así como de vectores de enfermedades de importancia en la salud pública, sin embargo su uso indiscriminado ha traído graves consecuencias en la salud humana y veterinaria. La síntesis química de OPs con estructura tio ($P=S$) es más conveniente que la de sus análogos oxo ($P=O$), por efecto hay numerosas intoxicaciones relacionadas con la disponibilidad comercial de estas formulaciones. Presentan mayor lipofilia y menor hidrólisis por A-esterasas, la posibilidad de bioactivarse *in situ* aumenta enormemente su toxicidad en tejidos blanco como el cerebro.

Respecto a las intoxicaciones agudas, hay condiciones de los fármacos (dosis, poco específicos, prontitud en su administración); del paciente (susceptibilidad); y de la especie química implicada (mezcla, estructura) que impulsan a los investigadores en la búsqueda de agentes profilácticos y terapéuticos. En este sentido, las proteínas de otras especies con actividad tipo PTE podrían ser útiles, si se toman en cuenta sus requerimientos bioquímicos como cofactores y el metabolismo estereoselectivo.

Por esta razón, cualquier hallazgo derivado de esta investigación podría contribuir al entendimiento de los procesos del metabolismo y toxicidad de OPs así como al desarrollo biotecnológico. Debido a la conveniencia económica y metódica de la espectrofotometría y cromatografía quiral, estas técnicas se desarrollarán para explorar la capacidad hidrolítica de insecticidas tio-fosfatos, de los sueros de especies de aves y mamíferos domésticos, en presencia de cofactores, dados los antecedentes de tricloronato y HDCP.

4. HIPÓTESIS

Con base en los antecedentes mencionados de hidrólisis de insecticidas OPs en forma tío, los sueros de aves y mamíferos domésticos hidrolizarán paratión y de forma estereoselectiva al tricloronato en presencia de Cu (II).

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Caracterizar la hidrólisis *ex vivo* de insecticidas tio-fosfatos por los sueros de aves y mamíferos domésticos.

5.2 Objetivos específicos

- 1) Cuantificar la posible hidrólisis de insecticidas tio-fosfatos mediante la detección de su grupo saliente por espectrofotometría de UV-VIS.
- 2) En el caso de tricloronato, determinar el enantiómero responsable de la mayor hidrólisis por cromatografía quiral.
- 3) Caracterizar el mecanismo catalítico de la posible hidrólisis de insecticidas tiofosfatos por cinética.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Reactivos y soluciones

Los estándares de alta pureza (>98%) tricloronato, paratión, 2,4,5-triclorofenol, p-nitrofenol, y 2,5-diclorofenol se obtuvieron de Chem Service, Inc., mientras que el HDCP fue proporcionado por el laboratorio del Doctor Eugenio Vilanova de la Unidad de Toxicología y Seguridad Química del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández. El resto de los reactivos generales y grado cromatográfico se presentan en la **tabla 2**.

La solución stock de los insecticidas se preparó en volúmenes pequeños (5 mL aprox.) de acetona anhidra, llevándola a una concentración de 4 mM. Se mantuvo en refrigeración a 4°C, protegido de la humedad o en baño de hielo durante su administración en los experimentos. Se prepararon soluciones amortiguadoras de Tris de acuerdo a las condiciones de cada insecticida, para favorecer en algunos casos la solubilidad a través de soluciones intermedias. Se conservaron en refrigeración con constante monitoreo de su pH. La solución detergente para detener la reacción enzimática fue constituida a partir de una solución de Tris al que se le agregó 2% (m/v) de SDS y AAP (0.25 mg/mL) y se empleó una vez conseguida su homogeneidad, se conservó a temperatura ambiente. Se prepararon volúmenes pequeños (1 mg en 500 µL) de albúminas; CSA y TSA con pureza de 98%, en agua desionizada, conservándose en refrigeración. Las soluciones catiónicas y ferrocianuro de potasio (0,4%) tuvieron como disolvente agua desionizada. En caso del segundo, se conservó protegido de la luz.

Tabla 2. Descripción de los reactivos utilizados

Reactivo	Pureza	Procedencia	Se emplea en
Acetona anhidra	Grado HPLC	Sigma- Aldrich	Solución stock de OPs
Ácido clorhídrico	Grado reactivo		Ajuste de pH y paro de reacción enzimática
4-aminoantipirina	Grado reactivo	Sigma	Ensayos de hidrólisis
Cloruro de calcio	Grado reactivo	J. T. Baker	Ensayos de hidrólisis
Cloruro de manganeso (II)	Grado reactivo	Aldrich	Ensayos de hidrólisis
Cloruro de zinc	Grado reactivo	Sigma-Aldrich	Ensayos de hidrólisis
CSA	Grado reactivo	Sigma- Aldrich	Ensayos de hidrólisis
Ferrocianuro de potasio	Grado reactivo	Research Organics	Ensayos de hidrólisis
Hexano	Grado HPLC	Burdick & Jackson	Fase móvil HPLC
Hidróxido de sodio	Grado reactivo	J. T. Baker	Tratamiento de residuos OPs
SDS	Grado reactivo	Amresco	Paro de reacción enzimática
Nitrato de níquel (II)	Grado reactivo	Sigma-Aldrich	Ensayos de hidrólisis
Sulfato cúprico	Grado reactivo	J. T. Baker	Ensayos de hidrólisis
Tris	Grado reactivo	Sigma	Solución amortiguadora
TSA	Grado reactivo	Sigma- Aldrich	Ensayos de hidrólisis

6.2 Equipos utilizados

a) Para recrear la temperatura fisiológica en los ensayos de hidrolisis enzimática se empleó el baño de temperatura constante Scorpion Scientific.

b) Para conseguir pH específico de medios de reacción y soluciones se utilizó el medidor de pH/Mv/temperatura JENWAY, 3520.

c) Para degasificar la fase móvil, homogenizar soluciones y limpiar viales del HPLC se utilizó el limpiador de ultrasonido de 40 Hz, BRANSON, 2510R-DTH.

d) Para la obtención de plasma y la adecuada extracción del Tricloronato de las muestras biológicas fue empleada la centrífuga Hettich, EBA-20, con capacidad de 8 tubos y 100-127 V.

e) Para garantizar la interacción de todos los elementos en la reacción enzimática y homogenizar las muestras utilizamos un vótex de Daigger Scientific, G560, y el agitador multi-tubos de Henry Troemner, LLC., 945107, ambos equipos con 120 V.

f) Para la cuantificación del grupo saliente en la hidrólisis enzimática de los insecticidas organofosforados fue empleado el espectrofotómetro UV-VIS, PERKIN-ELMER, Lambda 25.

g) Para la resolución, detección y cuantificación de la hidrólisis de los enantiómeros de tricloronato se utilizó un sistema cromatográfico WATERS 600 con lámpara de fotodiodos WATERS 2996 y sistema de inyección WATERS 717. El tricloronato eluyó a través de una columna quiral de acero inoxidable CHIRALCEL OD-H de celulosa Tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) con cubierta de sílica gel 5 μm y los datos se obtuvieron con el Software EMPOWER 1, Waters Company.

6.3 Origen, obtención y tratamiento de las muestras

Para la caracterización de la hidrólisis de insecticidas tio-fosfatos por suero de diferentes especies de aves y mamíferos (**tabla 3**). Todas las muestras se colectaron en tubos de 5 mL sin adición de anticoagulante, se centrifugaron a 1000 x g durante 10 min y se almacenaron en congelación a -20°C , fueron manipuladas junto con los residuos derivados según lo establecido por la NOM-003-SSA2-1993 y NOM-087-ECOL-SSA1-2002. A continuación se describe su obtención:

Aves- Por punción venosa o cardiaca de los animales sanos con asistencia veterinaria (1% del peso corporal), y en el caso de la especie *Coturnix coturnix* por decapitación en criadero.

Mamíferos- La toma de estas muestras pertenece al proyecto de Mederos Ramírez (2018) y su origen se identifica en la **tabla 3**.

Humanos- Donativo de sangre venosa de individuos sanos adscritos a un proyecto de síndrome metabólico dirigido por la Doctora N. Sara García Jiménez de la Facultad de Farmacia de la UAEM.

Tabla 3. Origen de las muestras

Especie		Código	Origen
Nombre científico	Nombre común		
<i>Meleagris gallopavo</i>	Pavo	Tu	Facultad de Ciencias Agropecuarias, UAEM
<i>Columba livia</i>	Paloma	Pa	Criadores locales
<i>Coturnix coturnix</i>	Codorniz	Co	Criadores locales
<i>Cairina moschata</i>	Pato	Pt	Parque Estatal Urbano Barranca de Chapultepec
<i>Anser favalis</i>	Ganso	Ga	Parque Estatal Urbano Barranca de Chapultepec
<i>Pavo cristatus</i>	Pavo real	Pr	Parque Estatal Urbano Barranca de Chapultepec
<i>Gallus gallus</i>	Gallina	Ch	Facultad de Ciencias Agropecuarias, UAEM
<i>Homo sapiens</i>	Humano	Hu	Proyecto síndrome metabólico, Facultad de Farmacia, UAEM
<i>Canis lupus familiaris</i>	Perro	Do	Dueños voluntarios
<i>Capra aegagrus hircus</i>	Cabra	Go	Criadores del estado de Guerrero
<i>Sus scrofa</i>	Cerdo	Pi	Facultad de Ciencias Agropecuarias, UAEM

domestica

<i>Ovis aries</i>	Oveja	Sh	Criadores del estado de Guerrero
<i>Equus caballus</i>	Caballo	Ho	Facultad de Ciencias Agropecuarias, UAEM
<i>Felis catus</i>	Gato	Ca	Dueños voluntarios
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Conejo	Ra	Facultad de Ciencias Agropecuarias, UAEM
<i>Bos primigenius</i>	Vaca	Bo	Rastro municipal de Cuernavaca
<i>Taurus</i>			

Con ayuda de la Doctora N. Sara García Jiménez se determinó el contenido de albúmina de las especies de aves domésticas por medio de la técnica colorimétrica con BCG. Encontrando que 5 a 6 μL de suero con suficientes para tener 200 μg de albúmina (cantidad apropiada para los ensayos enzimáticos de anteriores reportes) y que no hay una variación importante inter- e intra-especie. El ajuste de volumen a partir de este tipo de determinaciones nos permitirá en futuros experimentos optimizar el volumen de las muestras.

6.4 Ensayos de hidrólisis enzimática

Los ensayos de hidrólisis enzimática de insecticidas organofosforados tio consistieron en la identificación de su grupo saliente por medio de optimizaciones técnicas realizadas al método de identificación de fenoles por espectrofotometría de Emerson (1943). Para este propósito fue incubada una alícuota de 400 μM del insecticida con 10 μL de suero de cada especie en presencia de los cofactores de interés, en condiciones fisiológicas pH 7.4, 37°C, durante 30 min (paratión) o 60 min (tricloronato). La reacción enzimática se detuvo adicionando 750 μL de solución de dodecil sulfato de sodio y aminoantipirina (SDS-AAP), seguidos de 375 μL de solución de ferrocianuro de potasio al 0.4% y agitación. El complejo colorido que corresponde al 2,4,5-triclorofenol fue medido por espectrofotometría UV-VIS a 512 nm en el caso de tricloronato, empleó como control positivo suero de pavo con TCN y cobre. Mientras que para el paratión, la solución de paro de reacción contenía únicamente 2% de SDS y su grupo saliente; el p-nitrofenol se

leyó a 412 nm. Empleó como control positivo HDCP en suero de pollo y cobre. En el análisis de ambos ensayos fueron considerados controles de hidrólisis espontánea de reactivos y curva de calibración del grupo saliente.

6.5 Cuantificación de tricloronato racémico por cromatografía quiral

El tricloronato residual se refiere a la concentración μM no hidrolizada de cada isómero de tricloronato, que se obtiene al interpolar en la curva de calibración de tricloronato racémico (~ 50% de cada isómero). Este procedimiento se desarrolló en tres etapas; 1) la hidrólisis enzimática, 2) la extracción y 3) la cromatografía quiral. Para el análisis de cromatografía quiral, la reacción enzimática fue detenida con adición de 40 μL de ácido clorhídrico 0.2 M. Se extrajo el tricloronato con hexano (1-2 mL) y agitación en vórtex y centrifuga (15 min, 1000 x g). Una alícuota de 25 μL fue inyectada en el HPLC. Liu y col. (2006) identificaron los enantiómeros de tricloronato y reportaron que el primero en eluir es el (+)-tricloronato, seguido del (-)-tricloronato. En nuestros cromatogramas se observan estos dos picos característicos y dadas las condiciones cromatográficas (**tabla 4**) el tiempo de corrida para cada muestra fue de 10 min. En el análisis de la concentración residual de TCN fueron considerados controles de hidrólisis espontánea de reactivos. Se utilizó una curva de calibración directa de TCN, en lugar del grupo saliente como en el método colorimétrico.

Tabla 4. Condiciones cromatográficas para TCN racémico

Condiciones cromatográficas	
Fase móvil	n-hexano 100%
Fase estacionaria	celulosa/ sílice
Volumen de inyección	25 μL
Temperatura	20°C
Flujo	1.5 mL/ min

6.6 Estudio cinético

Con el propósito de confirmar la hidrólisis de TCN por el suero de cabra, que resultó ser la especie con efecto hidrolizante en los mamíferos domésticos, se desarrollaron ensayos con tiempos de incubación y cantidad de suero variable partiendo de diferentes concentraciones de cobre y mezclas de suero de cabra.

6.7 Análisis estadístico

Las variables de respuesta de la hidrólisis por los métodos de espectrofotometría UV-VIS (concentraciones μM de grupo saliente) y cromatografía quiral (concentraciones μM residuales de cada enantiómero) fueron analizados estadísticamente empleando el análisis de varianza ANOVA de 2 vías, seguido de la prueba post hoc HSD (Tuckey) para las comparaciones múltiples según el caso experimental. Se utilizaron hojas de cálculo de Excel y el software Graph Pad Prisma versión 5.

7. RESULTADOS

7.1 Paratión

Basados en la hidrólisis de OPs en sueros de aves domésticas empleando varios cationes, elegimos utilizar Cu (II), Zn (II) y Mn (II) en estos ensayos de hidrólisis de insecticidas tio-fosfatos racémicos y no racémicos. Dada la metodología descrita para los ensayos de hidrólisis enzimática de tricloronato, decidimos realizar en este trabajo el primer estudio exploratorio con paratión. El cual consistió en la detección por espectrofotometría de UV-VIS del p-nitrofenol (grupo saliente). Los sueros de 7 especies de aves domésticas se incubaron con una alícuota del insecticida paratión 400 μ M, en presencia de 300 μ M de cobre o zinc o manganeso durante 30 min a pH 7.4 y 37°C.

Los resultados de la actividad parationasa por el suero de aves con estos cofactores metálicos se resumen en la **tabla 5**. Como se puede observar, el Zn (II) no tiene un efecto activador de la hidrólisis de paratión en ninguno de los sueros de aves analizadas. Mientras que con Cu (II) los sueros de paloma (Pa), pato (Pt) y pavo real (Pr) presentaron una ligera hidrólisis detectable (1%). Sin embargo, este nivel de actividad no es significativo y podría considerarse a estas muestras de suero como no activas en presencia de dicho catión. Este efecto fue muy similar en presencia de Mn (II) para los sueros de paloma (Pa) y codorniz (Co) (4%). En general estos resultados exhiben la carente actividad parationasa en los sueros de aves domésticas estudiadas.

Tabla 5. Actividad parationasa en suero de aves domésticas en presencia de metales. La hidrólisis de paratión se expresa en μ M de p-nitrofenol formado por 10 μ l de suero/ 30 min, a 37°C y pH 7.4, o no detectable (ND). Los datos fueron contrastados con controles de sustrato y metales. Especies: gallina (Ch), pavo (Tu), paloma (Pa), codorniz (Co), pato (Pt), ganso (Ga) y pavo real (Pr).

Metal/Especie	Ch	Tu	Pa	Co	Pt	Ga	Pr
Cu (II)	ND	3.8	3.7	0.6	3.5	ND	4.3
Zn (II)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Mn (II)	ND	ND	18.9	17.3	ND	0.8	0.5

7.2 Tricloronato

7.2.1 Hidrólisis de TCN en sueros de aves domésticas

7.2.1.1 Hidrólisis enzimática

A continuación se presentan los resultados de la hidrólisis de TCN por los sueros de 7 especies de aves domésticas incubados con cationes. Observados por espectrofotometría de UV-VIS y expresados en concentración μM de 2,4,5-TCF formado durante 60 min. En la **figura 7** es evidente la activación por parte del Cu (II) de la hidrólisis del TCN en los sueros de todas las especies ensayadas, ya que la cantidad de 2,4,5-TCF formado se encontró entre los 50-100 μM que es significativa ($p < 0.001$) contra el tratamiento con Mn (II). Si bien, la actividad lograda con Cu (II) mostró un ligero incremento (~10%) al combinar Mn (II), apreciándose mejor en las especies pavo (Tu), paloma (Pa) y gallina (Ch), éste no es significativo. Estos resultados permiten observar el efecto activador del Cu (II) comparado con en Mn (II) de la hidrólisis del insecticida en los sueros de aves domésticas.

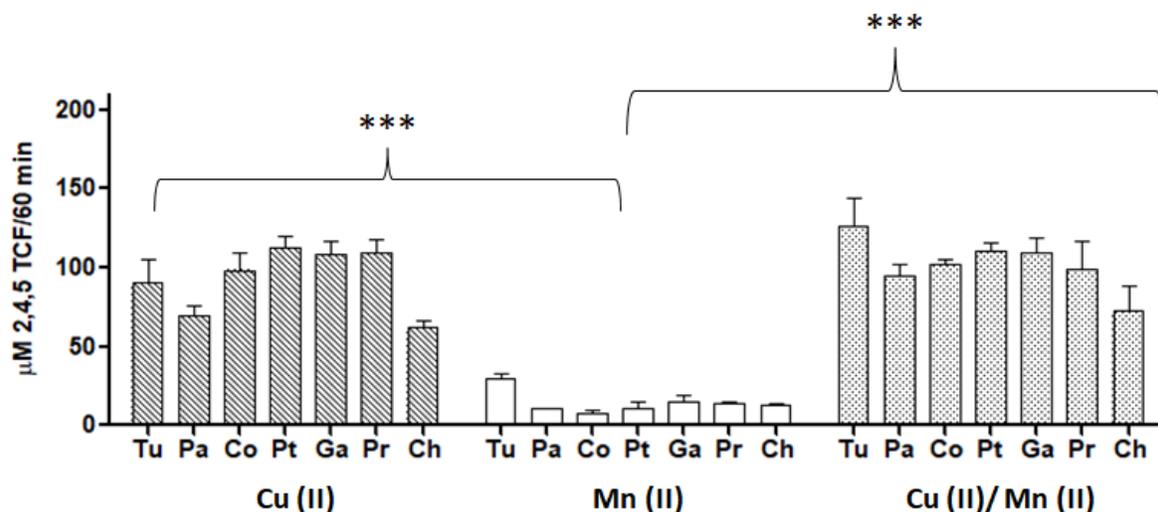


Figura 7. Efecto de cationes divalentes sobre la hidrólisis de TCN por el suero de aves domésticas, método colorimétrico. Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de tres mediciones del grupo saliente del TCN por espectrofotometría UV-VIS a 512 nm. Diez microlitros de pavo (Tu); paloma (Pa); codorniz (Co); pato (Pt); ganso (Ga); pavo real (Pr) y gallina (Ch), se

incubaron durante 60 min a 37°C y pH 7.4 con una alícuota de 400 μM de TCN y 300 μM de Cu (II) y/o 200 μM de Mn (II). *** ($p < 0.001$) Anova, seguida de Tukey.

7.2.1.2 Hidrolisis de enantiómeros de TCN por suero de aves domésticas y Cu (II)

Para determinar la actividad TCNasa por cromatografía quiral se utilizaron las condiciones cromatográficas establecidas por Ellington (2001) y Almenares- López (2010) (**figura 8**) con algunas modificaciones como la utilización de la columna CHIRALCEL OD-H. Puesto que los resultados de esta técnica corresponden a la concentración μM residual para cada enantiómero del TCN, es importante mencionar que: mayor altura de la barra en las figuras, o del pico en los cromatogramas, significa menor hidrólisis.

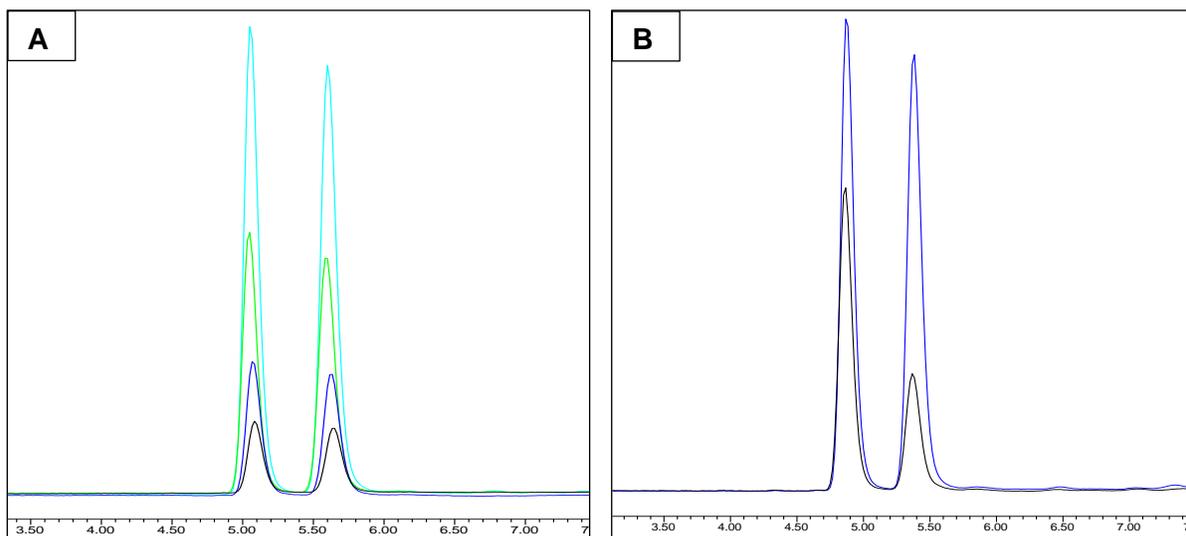


Figura 8. Separación de los enantiómeros de TCN por HPLC quiral. Panel A: Curva de calibración de tricloronato por HPLC quiral. Cada línea representa la elución y detección de las siguientes concentraciones de TCN estándar; 50 μM (negro), 100 μM (azul), 200 μM (verde) y 400 μM (azul celeste), incubadas por 60 min, 37°C, pH 7.4. **Panel B: Picos característicos del estándar de TCN racémico y control positivo (suero de pavo).** La línea azul representa la elución de una alícuota de 400 μM de TCN estándar y la negra representa un control positivo de 400 μM TCN incubados con 10 μL de suero de pavo en presencia de 300 μM de Cu (II) (en este caso el ejemplo corresponde a 30 min, 37°C, pH 7.4). Las condiciones cromatográficas en ambos casos fueron: volumen de inyección 25 μL , fase móvil hexano 100%, flujo de 1.5 ml/min y tiempo de análisis de 10 min. El pico cromatográfico que eluye primero (a la izquierda) corresponde al (+)-TCN y el segundo al (-)-TCN (a la derecha) (Ellington, 2001).

Debido a la hidrólisis observada en el suero de aves domésticas en presencia de cobre por espectrofotometría UV-VIS, decidimos realizar un estudio exploratorio por

cromatografía quiral incubando los sueros (10 μL) de aves con una alícuota de 400 μM de TCN racémico y 300 μM de Cu (II) para determinar si dicha hidrólisis es estereoselectiva o estereoespecífica. Como podemos observar, en la **figura 9** todos los sueros de aves domésticas analizadas hidrolizaron considerablemente el insecticida TCN y en algunas de ellas de manera estereoselectiva, ya que la concentración residual del (+)-TCN son mayores que las del (-)-TCN en pavo (32 \pm 1, 11 \pm 1), codorniz (42 \pm 2, 32 \pm 4), pato (45 \pm 2, 31 \pm 3), ganso (39 \pm 3, 28 \pm 4) y pavo real (42 \pm 4, 25 \pm 4). Estos resultados muestran que la hidrólisis es estereoselectiva debido a que se hidrolizan ambos isómeros (con predilección por el (-)-TCN) y no estereoespecífica donde solo se hidroliza uno.

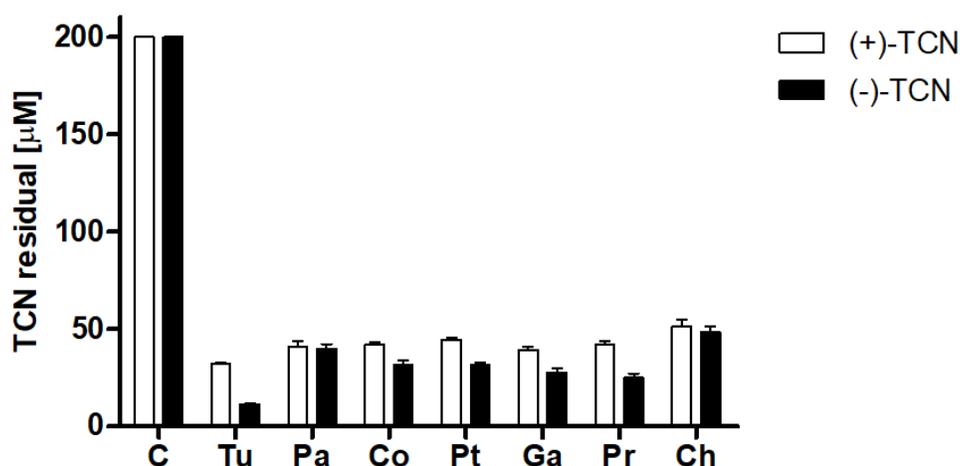


Figura 9. Hidrólisis Cu (II)-dependiente de TCN por suero de aves domésticas. Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de tres experimentos. Se incubaron 10 μL de suero de pavo (Tu); paloma (Pa); codorniz (Co); pato (Pt); ganso (Ga); pavo real (Pr) y gallina (Ch) con una alícuota de 400 μM de TCN racémico (\sim 200 μM de cada enantiómero) durante 60 min en presencia de 300 μM de Cu (II), pH 7.4, 37°C.

7.2.2 Hidrólisis de TCN en suero de mamíferos domésticos

Estos ensayos se realizaron con el propósito de comparar la hidrólisis Cu (II)- dependiente del tricloronato encontrada en aves con la actividad PTE conocida en mamíferos. Se exploró la hidrólisis de TCN por 9 sueros de mamíferos domésticos en presencia de 2.5 mM de Ca (II) (**figura 10**). Las concentraciones (μM) residuales de ambos isómeros de TCN manifiestan la inexistente hidrólisis de TCN en sueros de mamíferos analizados incluido el humano. El Ca (II) no activa la hidrólisis de este insecticida racémico en el suero de mamíferos.



Figura 10. Efecto de la incubación de Ca (II) en sueros de mamíferos domésticos con TCN. Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de tres mediciones. Se incubaron 10 μL de suero de humano (Hu), perro (Do), cabra (Go), cerdo (Pi), oveja (Sh), caballo (Ho), gato (Ca), conejo (Ra) y vaca (Bo) con una alícuota de 400 μM de TCN racémico ($\sim 200 \mu\text{M}$ de cada enantiómero) y 2.5 mM de Ca (II), durante 60 min, pH 7.4, 37°C. Ninguna de las especies presenta hidrólisis bajo estas condiciones, tal como el control de sustrato (C).

Con el propósito de explorar posible hidrólisis de TCN en sueros de mamíferos en otras condiciones, se realizó el primer ensayo con Cu (II), debido a nuestros resultados de hidrólisis estereoselectiva de este tiofosfato racémico por el suero de aves domésticas. En la **figura 11A** se observa que los sueros ensayados no presentan actividad hidrolizante en presencia de Cu (II) de ninguno de los dos enantiómeros del TCN, excepto

el suero de cabra que muestra una significativa hidrólisis Cu (II)- dependiente y estereoselectiva del TCN, al hidrolizar mayormente al (+)-TCN (27%) que al (-)-TCN (16%). Esta hidrólisis estereoselectiva es inversa u opuesta a la observada en suero de aves (figura 11B).

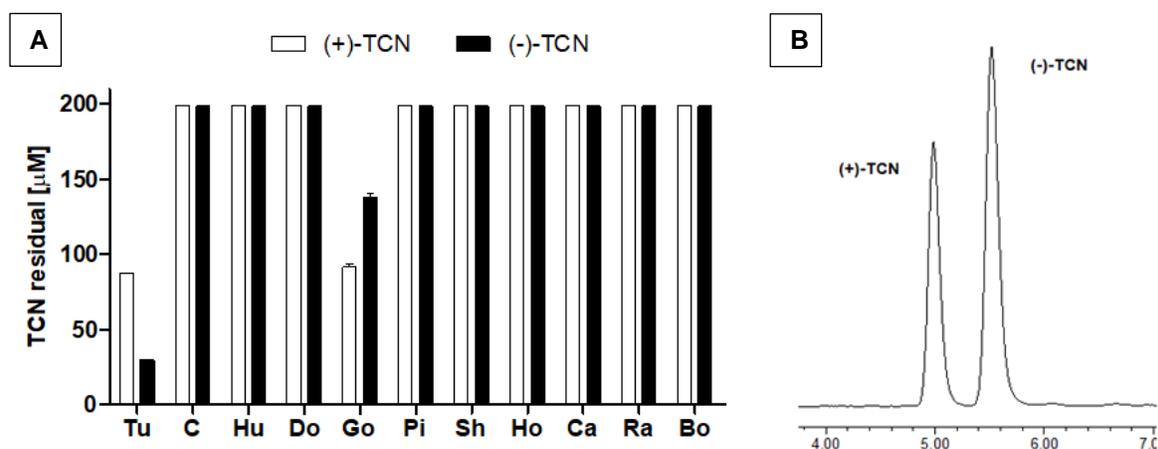


Figura 11. Efecto del Cu (II) sobre la hidrólisis del TCN por el suero de mamíferos domésticos. 11 A: Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de tres mediciones. Se incubaron 10 μ L de suero de humano (Hu), perro (Do), cabra (Go), cerdo (Pi), oveja (Sh), caballo (Ho), gato (Ca), conejo (Ra) y vaca (Bo) con una alícuota de 400 μ M de TCN racémico (\sim 200 μ M de cada enantiómero). El cromatograma del lado derecho (**11B**) corresponde a la hidrólisis estereoselectiva a favor el (+)-TCN encontrada en el suero de cabra, lo que resulta inverso al efecto que tiene el pavo (Tu) sobre este insecticida.

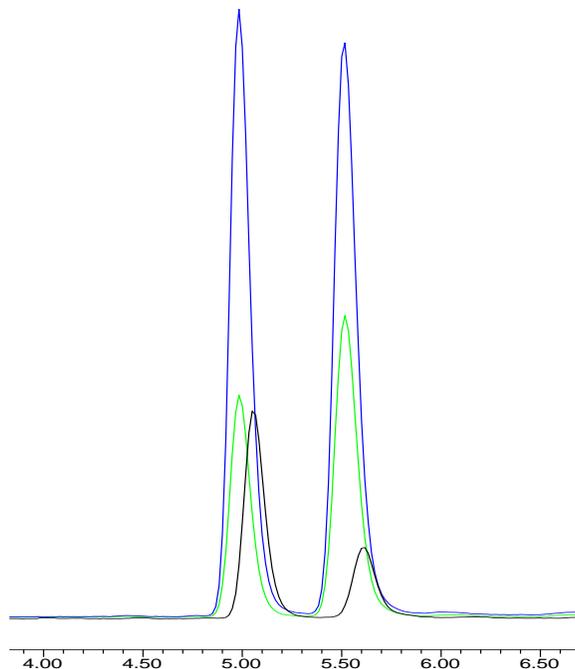


Figura 12. Hidrólisis estereoselectiva inversa del TCN por el suero de cabra. Cada línea representa la elución de tres muestras de 10 μL de suero (azul: humano, verde: cabra y negro: pavo) incubadas con una alícuota de 400 μM de TCN en presencia de 300 μM de Cu (II); pH 7.4, 37°C, 60 min. Las condiciones cromatográficas fueron: volumen de inyección 25 μL , fase móvil hexano 100%, flujo de 1.5 ml/min y tiempo de análisis de 10 min. El pico cromatográfico que eluye primero (a la izquierda) corresponde al (+)-TCN y el segundo al (-)-TCN (a la derecha) (Ellington, 2001).

7.2.2.1 Hidrólisis de TCN por varias concentraciones de suero de cabra y Cu (II)

Debido a la hidrólisis Cu (II)-dependiente de TCN detectada en suero de cabra, se caracterizó dicha hidrólisis en el suero de este mamífero empleando diferentes condiciones en el ensayo. Iniciando con el incremento del volumen de suero y variando la concentración de Cu (II), ya que la cantidad de enzima ha demostrado ser un factor importante en los ensayos de hidrólisis estereoselectiva de otros OPs (Monroy-Noyola, 1999). La **figura 13** muestra que la cantidad de suero de cabra de 10-100 μL incubada con 400 μM de TCN y 100 μM de Cu (II) en condiciones fisiológicas durante 60 min no activa la hidrólisis de enantiómeros de TCN (**13A**). Sin embargo, cuando incrementamos la concentración de Cu (II) a 300 μM en este ensayo es posible observar una hidrólisis significativa de 50% en 10 μL de suero, caracterizada por un ligero incremento (20%) de la hidrólisis del (+)- TCN en comparación con el (-)- TCN.

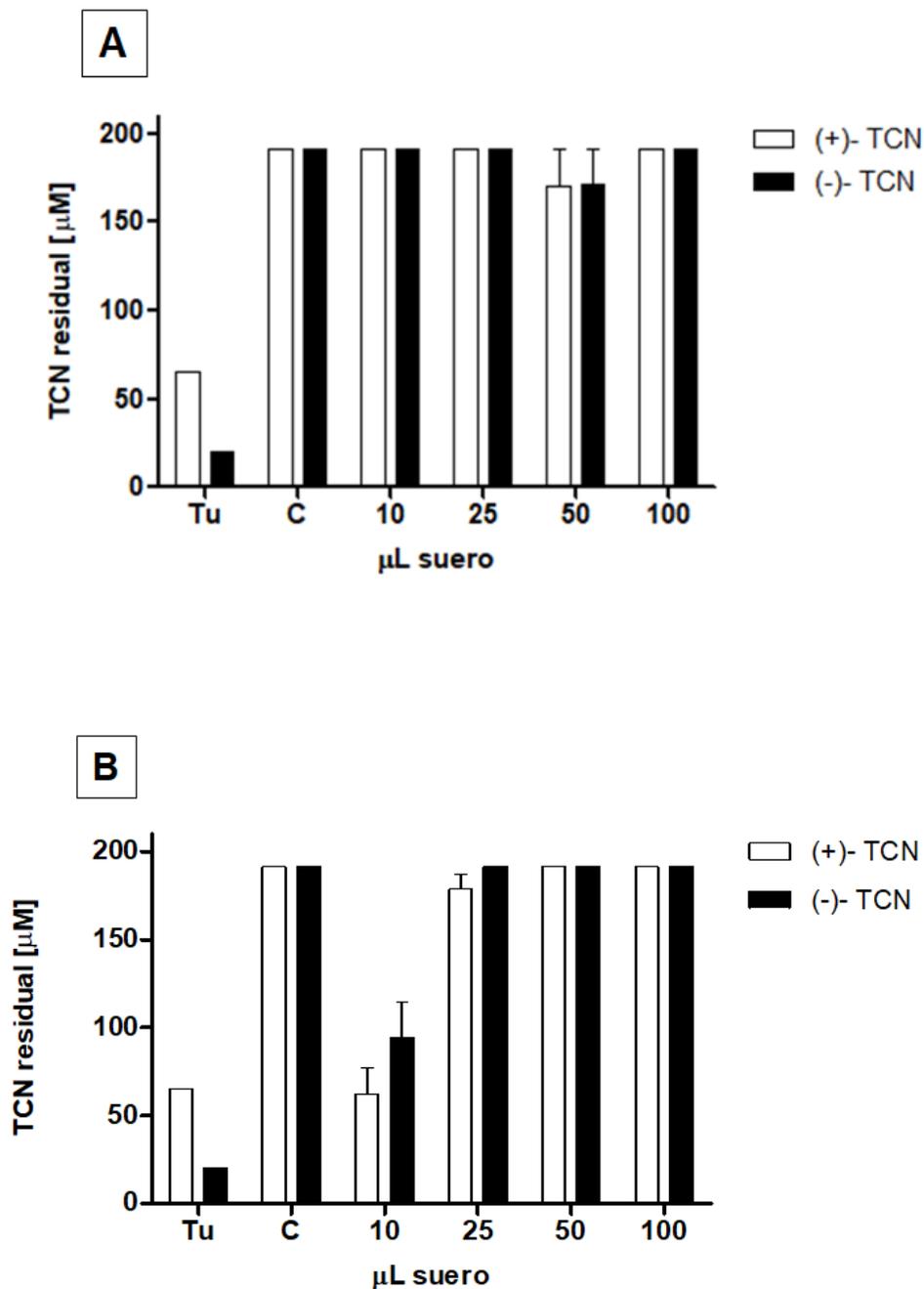
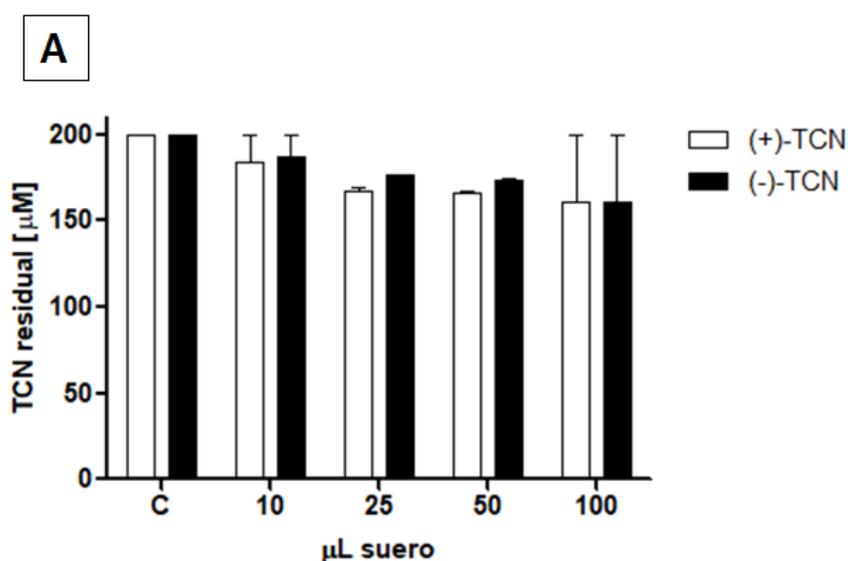


Figura 13. Hidrólisis de TCN por diferentes cantidades de suero de cabra y Cu (II). Se incubaron 10, 25, 50 o 100 µL con una alícuota de 400 µM de TCN racémico (~200 µM de cada enantiómero) en presencia de Cu (II): 100 µM (A) o 300 µM (B) en condiciones fisiológicas de pH y temperatura por 60 min. Cada barra representa el promedio ± el error estándar de tres mediciones. Se expresa la concentración µM de TCN residual.

7.2.2.2 Efecto de la pre-incubación de Zn (II) y Ni (II) sobre la hidrólisis Cu (II)-dependiente de TCN en suero de cabra

Extendiendo los análisis de la nueva actividad de hidrólisis de TCN en suero de cabra, se evaluó el efecto de la pre-incubación de Zn (II) o Ni (II) para tratar de elucidar la dependencia catiónica del Cu (II), es decir la especificidad catalítica, ya que la configuración de la proteína podría cambiar en presencia de Zn (II) o Ni (II), que se han reportado comparten los mismos sitios de unión a proteínas incluyendo la albúmina. En la **figura 14** se observa que la pre-incubación de Zn (II) en el ensayo con 300 μM , inhibe la hidrólisis del Cu (II) sobre ambos isómeros del TCN (25-40%) (**panel A**). Mientras que la pre-incubación con Ni (II) 300 μM no inhibió la hidrólisis Cu (II)-dependiente del suero de cabra sobre estos isómeros. Estos resultados demuestran que la actividad hidrolizante del TCN es Cu (II)-dependiente (**panel B**).



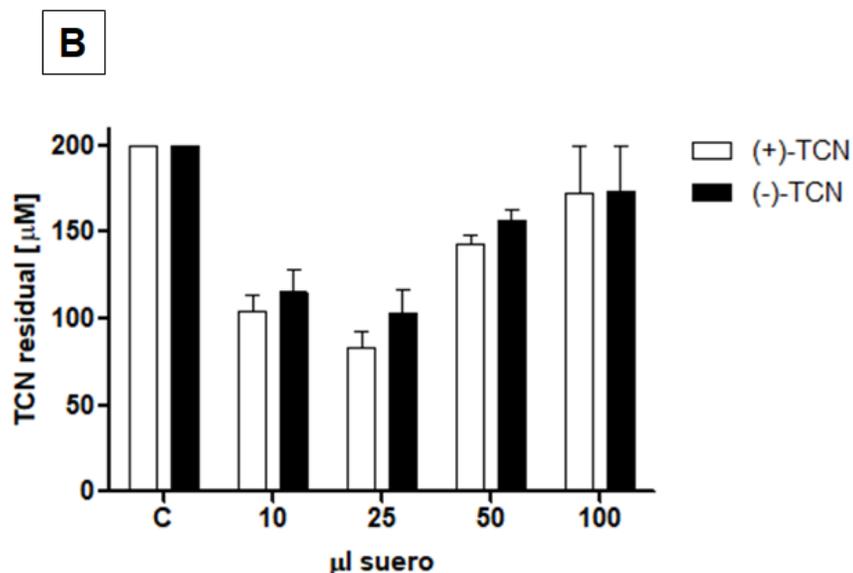


Figura 14. Efecto de la pre-incubación de zinc (A) o níquel (B) sobre la hidrólisis Cu (II)-dependiente de TCN en el suero de cabra. Cada barra representa el promedio de tres experimentos \pm el error estándar. Por 15 min fueron pre-incubados 10, 25, 50 o 100 μ L de suero de cabra con 300 μ M Zn (II) (**panel A**) o Ni (II) (**panel B**), posteriormente fueron incubados con 400 μ M TCN racémico (\sim 200 μ M de cada enantiómero) y 300 μ M de Cu (II) durante 60 min, 37°C, pH 7.4.

7.2.2.3. Cinética de la hidrólisis Cu (II)-dependiente del TCN por el suero de cabra

Con el objetivo de estudiar el curso temporal de la hidrólisis Cu (II)- dependiente de los enantiómeros de TCN del suero de cabra, se diseñó el ensayo estándar estableciendo diferentes tiempos de incubación desde 0 hasta 120 minutos. La **figura 15** muestra que ambos isómeros se hidrolizan a partir de los 30 min (\sim 20%) resultando más evidente a los 120 min ya que se muestra una hidrólisis de un 90% de la mezcla racémica. Estos resultados exhiben una significativa activación del Cu (II) de la hidrólisis del TCN por el suero de cabra.

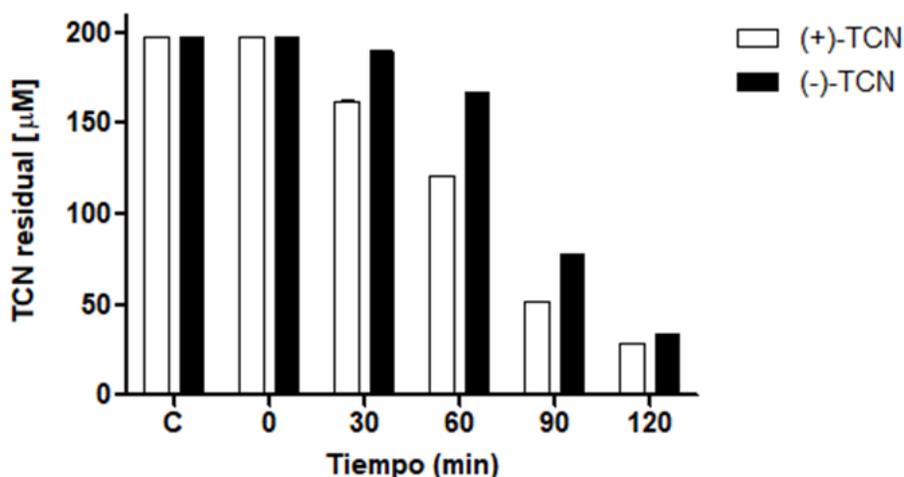


Figura 15. Cinética de la hidrólisis Cu (II)-dependiente de TCN en suero de cabra. Cada barra representa el promedio de tres experimentos \pm el error estándar. Se incubaron 10 μ L de suero de cabra con una alícuota de 400 μ M de TCN racémico (\sim 200 μ M de cada enantiómero) en presencia de Cu (II) 300 μ M y condiciones fisiológicas de pH y temperatura por diferentes tiempos (0, 30, 60, 90 y 120 min).

7.2.2.3 Efecto de la concentración de Cu (II)

Debido a que encontramos actividad estereoselectiva Cu (II)-dependiente sobre TCN con 10 μ L de suero de cabra a partir de los 30 min de reacción, se realizó un ensayo variando las concentraciones de Cu (II) desde 1 hasta 1,000 μ M. La **figura 16** muestra el efecto activador de Cu (II) a partir de los 300 μ M, siendo más evidente esta hidrólisis con 500 μ M (92 μ M para (+)-TCN y 130 μ M (-)-TCN). También podemos observar que al aumentar la concentración de cobre a 750-1000 μ M se presenta un efecto inhibitorio de dicha hidrólisis. Finalmente, estos resultados demuestran que 500 μ M de Cu (II) en 10 μ L de suero de cabra es la concentración óptima de hidrólisis de este insecticida tio-fosfato.

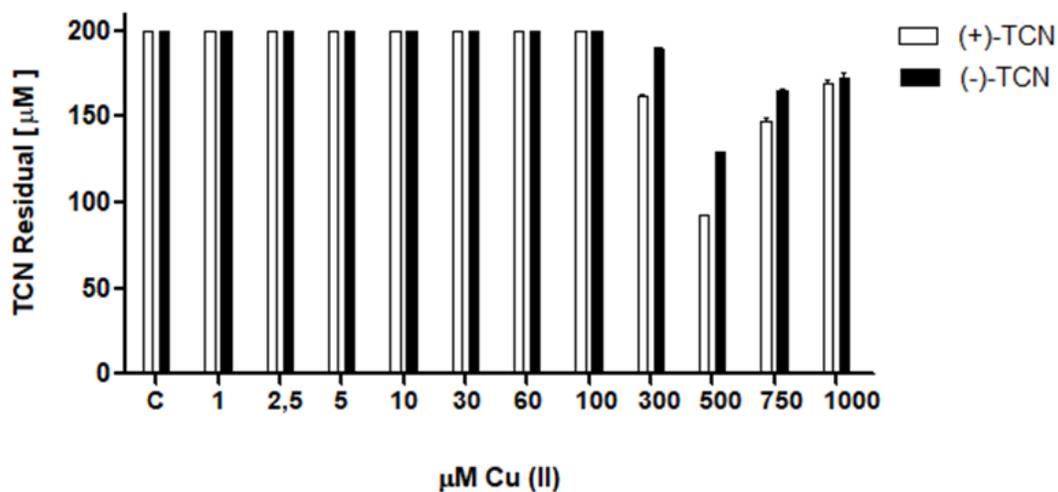


Figura 16. Efecto de la concentración de Cu (II) sobre la hidrólisis de TCN en suero de cabra. Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de tres experimentos. Diez microlitros de suero de cabra fueron incubados con 400 μM de TCN racémico ($\sim 200 \mu\text{M}$ de cada enantiómero) durante 30 min a pH 7.4, 37 °C con concentraciones de Cu (II) desde 1 hasta 1000 μM .

Como lo vimos anteriormente, una concentración menor o igual a 100 μM de Cu (II) resulta insuficiente para activar la hidrólisis de TCN, en cambio, concentraciones de 300 a 750 μM favorecen la hidrólisis estereoselectiva del (+)-TCN, pero al llegar a 1,000 μM la predilección por uno de los enantiómeros desaparece y los niveles de hidrólisis son apenas detectables.

8. DISCUSIÓN

En este estudio se emplearon con éxito dos métodos analíticos para la determinación de la hidrólisis del insecticida tio-fosfato conocido en el mercado como tricloronato. Ambos métodos se han empleado en otros estudios del metabolismo de OPs con tejidos de aves y mamíferos domésticos (Monroy-Noyola y col., 2007) incluyendo humanos (Almenares-López y col., 2013), (Monroy-Noyola y col., 2014). El primero, fue colorimétrico y consistió en la detección del grupo saliente del TCN (2,4,5-triclorofenol) por espectrofotometría UV-VIS. Se basa en la afinidad de la AAP por el –OH del fenol y la posterior formación de un compuesto colorido de aminoantipirina cuando una ferrocianuro de potasio en pH alcalino (Emerson, 1943). Con el segundo método se logró la cuantificación de la hidrólisis estereoselectiva por la separación de enantiómeros de tricloronato por HPLC con columna quiral CHIRALCEL OD-H y otras adaptaciones del método de Ellington (Ellington, 2001; Almenares-López, 2010) reportando igual configuración estereoquímica para los enantiómeros; (+)-tricloronato para el que eluye primero y (-)-tricloronato para el que le sigue en la corrida cromatográfica. En el presente estudio ambos métodos fueron complementarios para la caracterización de la hidrólisis del paratión y especialmente del tricloronato.

Los resultados de hidrólisis del paratión por los sueros de aves en presencia de cofactores refuerzan el conocimiento de que las aves son altamente sensibles a estos insecticidas debido a que carecen de A-esterasas en sus tejidos. (Sogorb y col., 1998) Con este estudio también se refuerza que las A-esterasas no hidrolizan paratión en presencia de Cu (II).

El tricloronato es un insecticida OP tio y quiral, que produce OPIDP en gallinas (Johnson, 1982) y humanos (Jędrzejowska y col., 1980). Los resultados observados de su hidrólisis Cu (II)-dependiente en el suero de las aves domésticas así como en la cabra son relevantes debido a dos razones; **1)** se metaboliza un OP neuropático de manera estereoselectiva en comparación con el suero de los mamíferos que no hidrolizan al TCN por las A-esterasas Ca (II)- dependientes como PON1, ni otros compuestos neuropáticos racémicos como metamidofos, fenamifos (Almenares- López, 2013) o agentes nerviosos (Khersonsky y Tawfik, 2005), **2)** se confirma la hidrólisis Cu (II)-dependiente de un tio-fosfato por una A-esterasa en el suero de las aves.

Cabe destacar que la estereoselectividad del suero de aves domésticas en TCN ((-)-tricloronato) como en HDCP ((+)-HDCP), (Monroy-Noyola, 2017) es a favor de los isómeros más tóxicos (fuertemente inhibidores y con capacidad envejecedora de NTE), por ejemplo se hidroliza en el suero de las aves el enantiómero (-)-tricloronato el cual se ha reportado en estudios in vitro como el isómero de mayor potencia tóxica 8–11 veces en comparación con el (+)-tricloronato (Liu y col., 2006). Mientras que en PON1 (Monroy-Noyola et al., 2014) y PTEs bacterianas se hidrolizan los menos tóxicos de algunos OPs quirales.

El estudio exploratorio con sueros de mamíferos domésticos (perro, cabra, cerdo, oveja, caballo, gato, conejo y vaca) demuestra que no tienen capacidad hidrolizante de compuestos tio-fosfatos y racémicos en presencia de cationes metálicos divalentes, lo que sugiere la falta de activación de A-esterasas como PON1, en la cual se ha reportado (Pla y col., 2007) un efecto inhibitor de metales divalentes como el Cu (II). Este estudio es relevante debido a la excepción del suero de cabra que mostró una hidrólisis estereoselectiva inversa (27% para (+)-tricloronato, y 16% para (-)-tricloronato) a la observada en las aves en presencia de Cu (II) lo que sugiere la participación de una cupro-proteína en el suero de la cabra, que podría ser similar a la del suero de las aves. Recientemente nuestro grupo de investigación ha publicado la actividad hidrolizante Cu (II)-dependiente de un fosforamidato análogo del insecticida racémico metamidofos, que fue hidrolizado por el suero de pollo (Monroy Noyola, 2017) sugiriendo a la albúmina como la proteína responsable de esta hidrólisis ya que conocida como cupro-proteína que transporta aproximadamente el 10% del Cu en la sangre de vertebrados incluyendo aves y mamíferos.

Los resultados de este estudio refuerzan el conocimiento de que PON1 es una proteína limitada en la protección contra la toxicidad de OPs tio incluyendo los racematos, también sugiere la posibilidad de hidrolizar otros insecticidas con características estructurales similares al tricloronato las cuales serán de un gran interés biomédico para el tratamiento de intoxicaciones humanas y animales de importancia veterinaria, así como en aplicaciones biotecnológicas para la biorremediación de residuos de insecticidas OPs en el medio ambiente que incluyen principalmente cuerpos de agua (Khersonsky y Tawfik, 2005; Amitai y col., 2006).

9. CONCLUSIONES

- 1) Los sueros de aves domésticas no presentan actividad hidrolizante Cu, Zn, Ni (II)-dependiente del paratión.
- 2) El suero de las aves domésticas presentan actividad A-esterasa sobre compuestos OPs del tipo tio-fosfato.
- 3) Los sueros de codorniz, pato, ganso y pavo real presentan una hidrólisis Cu (II)-dependiente sobre el (-)-tricloronato.
- 4) Los sueros de mamíferos no presentaron hidrólisis Ca (II)- dependiente de tricloronato.
- 5) Los sueros de mamíferos no presentan actividad Cu(II)-dependiente sobre TCN excepto el suero de cabra
- 6) El suero de cabra presenta una hidrólisis Cu (II)-dependiente estereoselectiva opuesta a la observada en sueros de aves; el enantiómero (+)- TCN se hidroliza en mayor proporción en comparación con el (-)- TCN.

10. PERSPECTIVAS

- 1) Caracterizar el mecanismo catalítico de la hidrólisis Cu (II)-dependiente en el suero de la cabra mediante cinética enzimática.

- 2) Identificar la proteína responsable de la hidrólisis Cu (II)-dependiente del suero de estas especies sobre TCN.

- 3) Realizar estudios exploratorios de hidrólisis Cu (II)-dependiente de otros insecticidas OPs en el suero de las aves y cabra.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Aldridge, W.N. (1953). Serum esterases 2-An enzyme hydrolysing diethyl p-nitrophenylphosphate (E600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera. *Biochem. J.* 53:117-124.
- Aubert, S. D., Li, Y., & Raushel, F. M. (2004). Mechanism for the Hydrolysis of Organophosphates by the Bacterial Phosphotriesterase. *Biochemistry*, 43(19), 5707–5715. <http://doi.org/10.1021/bi0497805>
- Butler, A. M., & Murray, M. (1997). Biotransformation of parathion in human liver: participation of CYP3A4 and its inactivation during microsomal parathion oxidation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 280(2), 966–73. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9023313>
- Casida, J. E., & Quistad, G. B. (2005). Serine hydrolase targets of organophosphorus toxicants. *Chemico-Biological Interactions*, 157-158, 277–283. <http://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.10.036>
- Clothier, B., & Johnson, M. K. (1979). Rapid aging of neurotoxic esterase after inhibition by di-isopropyl phosphorofluoridate. *The Biochemical Journal*, 177(2), 549–58. <http://doi.org/10.1042/bj1770549>
- Costa, L. G. (2006). Current issues in organophosphate toxicology. *Clinica Chimica Acta*, 366(1-2), 1–13. <http://doi.org/10.1016/j.cca.2005.10.008>
- Damianys, A. L., Fernanda, M. S. M., Laura, O. H. M., Rafael, V. D., & Antonio, M. N. (2013). Fenamiphos is recalcitrant to the hydrolysis by alloforms PON1 Q192R of human serum. *Toxicology in Vitro*, 27(2), 681–685. <http://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.11.014>
- Dudek, B. R., & Richardson, R. J. (1982). Evidence for the existence of neurotoxic esterase in neural and lymphatic tissue of the adult hen. *Biochemical Pharmacology*, 31(6), 1117–1121. [http://doi.org/10.1016/0006-2952\(82\)90351-3](http://doi.org/10.1016/0006-2952(82)90351-3)
- Escudero Artiaga, M. Á. (1997). *Forma Soluble De Esterasa Diana De Neuropatía (S-Nte)*.
- FAO (19898). Guidelines for Legislation on the Control of Pesticides. <http://www.fao.org/AG/AGP/AGPP/Pesticid>.
- Gupta, R. P. and AbouDonia, M. B., Neurofilament phosphorylation and (125I)calmodulin binding by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein Kinase in the brain sub-cellular fractions of diisopropyl phosphorofluoridate (DFP)-treated hen. *Neurochem. Res.*, 20, 1095-1105, 1995.
- Greenpeace México. (2015). La mancha en tu comida, 24.
- Jokanovi, M. (2001). Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology*, 166(3), 139–160. [http://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00463-2](http://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00463-2)
- Lotti, M. (1999). Promotion of organophosphate induced delayed polyneuropathy by certain esterase inhibitors. *Toxicology*, 181-182, 245–248.

[http://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00291-3](http://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00291-3)

- 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. *Toxicology Letters*, 170(2), 157–164. <http://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. (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. <http://doi.org/10.1007/s00204-014-1327-2>
- Pla, A., Rodrigo, L., Hernández, A., Gil, F., Lopez, O., 2007. Effect of metal ions and calcium on purified PON1 and PON3 from rat liver. *Chem. Biol. Internact.* 167, 63-70.
- Rose, R. L., Tang, J., Choi, J., Cao, Y., Usmani, A., Cherrington, N., & Hodgson, E. (2005). Pesticide metabolism in humans, including polymorphisms. *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health*, 31(SUPPL. 1), 156–163.
- Sánchez-Peña, L. C., Reyes, B. E., López-Carrillo, L., Recio, R., Morán-Martínez, J., Cebrián, M. E., & Quintanilla-Vega, B. (2004). Organophosphorous pesticide exposure alters sperm chromatin structure in Mexican agricultural workers. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 196(1), 108–113. <http://doi.org/10.1016/j.taap.2003.11.023>
- Senanayake, N. and Karalliedde, L., Neurotoxic effects of organophosphorus insecticides. An intermediate syndrome. *N. Engl. J. Med.*, 316, 761-763, 1987.
- Singh, B. K., & Walker, A. (2006). Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(3), 428–471. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00018.x>
- Sogorb, M. A., Mobroy-Noyola, A., & Vilanova, E. (2002). Importancia de la hidrólisis estereoespecífica en la evaluación de riesgos tóxicos de insecticidas fosforamidatos. *Revista de Toxicología*, 19, 61–68.
- Sogorb, M. A., Monroy, A., & Vilanova, E. (1998). Chicken serum albumin hydrolyzes dichlorophenyl phosphoramidates by a mechanism based on transient phosphorylation. *Chemical Research in Toxicology*, 11(12), 1441–1446. <http://doi.org/10.1021/tx980015z>
- Sogorb, M. A., 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. <http://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.01.022>
- Vilanova, E., & Sogorb, M. A. (1999). The role of phosphotriesterases in the detoxication of organophosphorus compounds. *Critical Reviews in Toxicology*, 29(1), 21–57. <http://doi.org/10.1080/10408449991349177>
- WEIPING LIU, KUNDE LIN, A. J. G. (2006). Separation and Aquatic Toxicity of Enantiomers of the Organophosphorus Insecticide Trichloronate. *Chirality*, 713–716. <http://doi.org/10.1002/chir>

- Yáñez, L., Ortiz, D., Calderón, J., Batres, L., Carrizales, L., Mejía, J., Díaz-Barriga, F. (2002). Overview of human health and chemical mixtures: Problems facing developing countries. *Environmental Health Perspectives*, 110(SUPPL. 6), 901–909. <http://doi.org/10.1289/ehp.02110s6901>
- Zhou, L., Fang, S. M., Huang, K., Yu, Q. Y., & Zhang, Z. (2015). Characterization of an epsilon-class glutathione S-transferase involved in tolerance in the silkworm larvae after long term exposure to insecticides. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 120, 20–26. <http://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.05.027>
- WHO (1990) Public Health Impact of Pesticides Used Inagriculture, World Health Organization.

12. ANEXOS



Dependencia. SECRETARÍA DE DESARROLLO SUSTENTABLE
Depto. SUBSRIA. DE GESTIÓN AMBIENTAL SUSTENTABLE
Sección: DIR. GRAL. DE ÁREAS NATURALES PROTEGIDAS
Oficio No. SDS/SSGAS/DGANP/320/2016
Expediente
No. Entrada: DGANP-119

"2016, Año del Centenario de la Soberana Convención Revolucionaria en el Estado de Morelos, 1916-2016"

Cuernavaca, Morelos, a 11 de agosto del 2016

DR. ANTONIO MONROY NOYOLA
PROFESOR INVESTIGADOR
FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
P R E S E N T E

Me refiero a su escrito con fecha de recibido 09 de agosto del año en curso, en el cual solicita apoyo para "obtener una alícuota de sangre de aves con las que cuenta el parque (1 a 10 ml de acuerdo al tamaño y peso del ave)", con la finalidad de encontrar proteínas con potencial de antidotos contra intoxicaciones humanas y veterinarias por insecticidas.

Al respecto, con fundamento en lo establecido en los Artículos 81 fracción I y 101 de la Ley de Equilibrio Ecológico y Protección Ambiental del Estado de Morelos, le comunico que se autoriza la toma de una alícuota de sangre de algunas aves con las que cuenta el área natural protegida Parque Estatal Urbano Barranca de Chapultepec, siempre y cuando se observen las siguientes consideraciones:

1. Informar a la Dirección del Parque Estatal Urbano Barranca de Chapultepec, al menos con 2 días de anticipación, el día y horario en que se efectuará la toma de sangre.
2. Las aves susceptibles para toma de alícuota serán únicamente patos, pavorreales y gansos.
3. Solamente se podrá tomar una muestra de sangre por ave.
4. El autorizado será responsable de contar con un médico veterinario que supervise la toma de muestras y garantice durante el tiempo que dure la actividad, el bienestar animal de las aves.
5. En todo momento se deberá atender las indicaciones y observaciones del personal del Parque Estatal; asimismo, se deberán reportar aquellas irregularidades y acciones que hubiere observado y que pudieran constituir infracciones o delitos.
6. Respetar la señalización y las distintas zonas del Área Natural Protegida, para lo cual se anexa en adjunto copia de las actividades y conductas No permitidas en el Parque Estatal.
7. Se prohíbe introducir unícel, vidrio, refrescos, aluminio, objetos punzo cortantes, pelotas o balones, autos y juguetes eléctricos, bicicletas y sus equivalentes.
8. Al término de su actividad el autorizado será responsable de recoger y llevarse aquellos residuos biológico-infecciosos generados durante su estancia en el Parque, lo anterior para su correcta disposición de acuerdo al marco normativo vigente.



Dirección General de Áreas Naturales Protegidas
Bajada Chapultepec No. 27, Col. Chapultepec,
C.P. 62450 Cuernavaca, Morelos
(777) 100 05 89 y 100 05 90
E-mail: desarrollo.sustentable@morelos.gob.mx
<http://susentable.morelos.gob.mx/>
FB: Desarrollo Sustentable Morelos/ TW @SDS_Morelos
<http://tramites.morelos.gob.mx>



www.morelos.gob.mx

10. Se prohíbe dañar, molestar y extraer flora y fauna silvestre.

11. El Área Natural Protegida es un espacio 100 % libre de humo de cigarro, por lo que queda prohibido ingresar con cigarros.

12. Finalmente, no omito mencionar que para estar en posibilidad de darle el acceso al Parque Estatal Urbano Barranca de Chapultepec, deberá presentar la presente autorización con el personal de vigilancia ubicado en la entrada principal, y cada vez que así le sea requerido durante la duración de su evento.

Lo anterior con fundamento en los artículos 5, 16, 17, fracciones VI, XVII, XVIII y XXII y 23 fracción XXIV del Reglamento Interior de la Secretaría de Desarrollo Sustentable.

Sin otro particular, reitero a usted las seguridades de mi más atenta y distinguida consideración.

ATENTAMENTE
EL DIRECTOR GENERAL DE ÁREAS NATURALES PROTEGIDAS

BIOL. JULIÁN MORÁN ALTAMIRANO



DIRECCIÓN GENERAL DE
ÁREAS NATURALES
PROTEGIDAS

Con copia para
Dr. Einar Topiltzin Contreras Macbeath.- Secretario de Desarrollo Sustentable.- Para su conocimiento.
Ing. José Iván Fernández Galván.- Subsecretario de Gestión Ambiental Sustentable.-Mismo fin.
Expediente

JMA/APPV

#yosoySUS^TENTABLE



Dirección General de Áreas Naturales Protegidas
Bajada Chapultepec No. 27, Col. Chapultepec,
C.P. 62450 Cuernavaca, Morelos
(777) 100 05 89 y 100 05 90

E-mail: desarrollo.sustentable@morelos.gob.mx

<http://susentable.morelos.gob.mx/>

FB: Desarrollo Sustentable Morelos/ TW @SDS_Morelos

<http://tramites.morelos.gob.mx>



www.morelos.gob.mx



Secretaría
de Desarrollo
Sustentable

Dependencia. SECRETARÍA DE DESARROLLO SUSTENTABLE
Depto. SUBSRIA. DE GESTIÓN AMBIENTAL SUSTENTABLE
Sección: DIR. GRAL. DE ÁREAS NATURALES PROTEGIDAS
Oficio No. SDS/SSGAS/DGANP/320/2016
Expediente
No. Entrada: DGANP-119

"2016, Año del Centenario de la Soberana Convención Revolucionaria en el Estado de Morelos, 1916-2016"

De las Prohibiciones
Área Natural Protegida
Parque Estatal Urbano Barranca de Chapultepec

Se consideran actividades prohibidas las siguientes

1. Alterar el orden y la tranquilidad, destruir las obras materiales y culturales existentes;
2. Verter o descargar contaminantes en el suelo, subsuelo y en cualquier clase de cauce, vaso o acuífero, así como desarrollar cualquier actividad contaminante;
3. Interrumpir, rellenar, desecar o desviar los flujos hidráulicos;
4. Introducir, distribuir o usar insecticidas, plaguicidas, fungicidas, detergentes y/o cualquier agente contaminante;
5. Alterar o destruir por cualquier medio sitios de alimentación, anidación, refugio o reproducción de las especies silvestres;
6. Capturar, coleccionar y extraer cualquier tipo de material vegetal y/o animal;
7. Introducir especies de flora y fauna silvestre que no sea característica del ecosistema, así como de especies exóticas;
8. Introducir unicel, aluminio, vasos de plástico, cigarrillos, refrescos, chicles, alimentos y golosinas que vengan en empaques de polipropileno;
9. Ingresar patines, patinetas, triciclos, boomerang, bicicletas, vidrios de todo tipo, objetos punzo cortantes, pelotas y comida
10. Ingresar animales domésticos, con excepción de los que sirvan de apoyo a discapacitados.
11. La venta ambulante;
12. Introducir o consumir psicotrópicos y bebidas alcohólicas;
13. Introducir o portar cualquier tipo de arma, utensilios de caza o captura;
14. Construir y ampliar comercios, viviendas o instalaciones de cualquier tipo;
15. Los actos contrarios a las buenas costumbres;
16. Realizar cualquier tipo de aprovechamiento o explotación de los recursos naturales con fines comerciales;
17. Arrojar, tirar o abandonar basura, restos de jardinería y poda o cualquier tipo de residuo;
18. Depositar desechos en los contenedores no autorizados para tal fin;
19. Utilizar altavoces, equipo de sonido, radios portátiles, cualquier instrumento musical electrónico que cause contaminación por ruido en los escenarios naturales del Parque;
20. Filmaciones, actividades de fotografía, la captura de imágenes o sonidos por cualquier medio, con fines comerciales;
21. Fijar o instalar anuncios publicitarios, salvo que sean con fines de señalización u orientación del Parque;
22. Instalar lonas;
23. Encender fogatas;
24. Distribuir todo tipo de propaganda o publicidad, marcar, pintar o colgar letreros o cualquier mercancía en las formaciones rocosas, en los árboles o en las infraestructuras del Parque;
25. Internarse en las zonas restringidas sin el permiso correspondiente, y
26. Todas las demás consideradas en los reglamentos, leyes y demás disposiciones legales.



Dirección General de Áreas Naturales Protegidas
Bajada Chapultepec No. 27, Col. Chapultepec,
C.P. 62450 Cuernavaca, Morelos
(777) 100 05 89 y 100 05 90

E-mail: desarrollo.sustentable@morelos.gob.mx
<http://susentable.morelos.gob.mx/>
FB: Desarrollo Sustentable Morelos/ TW @SDS_Morelos
<http://tramites.morelos.gob.mx>



www.morelos.gob.mx

