



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM

*Estudio de la capacidad de tres hidrolasas para
detoxificar ocratoxina A y toxina T-2 por acoplamiento
molecular y experimentos in vitro*

T E S I S

Que para obtener el título de Biólogo

PRESENTA:

Orozco Cortés Pablo César

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Olga Nelly Rodríguez Peña

COMITÉ TUTORIAL

Dr. César Mateo Flores Ortiz

Mtra. Josefina Vázquez Medrano

Mtro. Luis Barbo Hernández Portilla

Biól. Anabel Ruíz Flores



Los Reyes Iztacala, Tlanepantla, Estado de México, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis padres, Karina y Víctor, por brindarme su afecto y apoyo incondicional durante toda mi vida. Sin ellos no hubiese llegado a donde estoy, siempre los amaré y estaré infinitamente agradecido con ustedes, en especial con mi madre quien falleció antes de retribuirle todo lo que hizo por mí.

Agradezco al Fondo de la Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico del Estado de México (COMECyT; FCDTEM-2012-077) por el financiamiento otorgado a mi directora de tesis para el desarrollo de este estudio. Doy mis agradecimientos a la Dra. Olga Nelly Rodríguez Peña y al Dr. Cesar Mateo Flores Ortiz, por el gran apoyo brindado durante el desarrollo de este trabajo y sus valiosos consejos en los últimos años de mi formación universitaria. De igual forma, agradezco a la Mtra. Josefina Vázquez Medrano, al Mtro. Luis Barbo Hernández Portilla y a la Biól. Anabel Ruíz Flores por su apoyo y guía durante las etapas *in vitro* e *in silico* de esta tesis.

Por último, agradezco a mis amigos, José, Omar y Marco, con los cuales compartí buenos momentos de mi vida universitaria y me brindaron su valiosa ayuda para salir adelante.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	5
Tablas	5
Figuras	5
RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
MARCO TEÓRICO	8
Micotoxinas	8
Ocratoxinas	11
OTA	11
<i>Ocurrencia natural</i>	11
<i>Efectos tóxicos a nivel fisiológico</i>	11
<i>Efectos tóxicos a nivel bioquímico</i>	12
Tricotecenos (TCT)	13
T-2	13
<i>Ocurrencia natural</i>	13
<i>Efectos tóxicos a nivel fisiológico</i>	13
<i>Efectos tóxicos a nivel bioquímico</i>	14
Alternativas biológicas de manejo de las micotoxinas	15
Biodegradación	15
<i>Microorganismos</i>	15
<i>Enzimas</i>	15
<i>Proteasas</i>	15
<i>Cisteín-proteasas</i>	16
<i>Serin-hidrolasas</i>	16
<i>Endometalopeptidasas</i>	16
ANTECEDENTES	17
OTA	17
T-2	20
JUSTIFICACIÓN	22
OBJETIVOS	23
MATERIAL Y MÉTODOS	24

Estudios de acoplamiento molecular	24
Experimentos <i>in vitro</i>	25
Cuantificación residual	25
<i>OTA</i>	25
<i>T-2</i>	26
Análisis de datos	26
RESULTADOS	27
Estudios de acoplamiento molecular	27
Cisteín-proteasa de <i>Ananas comosus</i>	29
<i>Bromelina-OTA</i>	29
<i>Bromelina-T2</i>	34
Monoacilglicerol lipasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
<i>Monoacilglicerol lipasa-OTA</i>	36
<i>Monoacilglicerol lipasa-T2</i>	37
Endometalopeptidasa neutra de <i>Bacillus subtilis</i>	40
<i>Endometalopeptidasa-OTA</i>	40
<i>Endometalopeptidasa-T2</i>	44
DISCUSIÓN	45
Cisteín-proteasa de <i>Ananas comosus</i> (bromelina)	45
Monoacilglicerol lipasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	45
Endometalopeptidasa neutra de <i>Bacillus subtilis</i>	46
CONCLUSIONES	48
LITERATURA CITADA	49
APÉNDICES	58
Apéndice 1. Modelos de Ramachandran de las enzimas estudiadas.	58

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tablas

Tabla 1. Estructura química de las micotoxinas y ligandos de referencia.....	27
Tabla 2. Energía libre (ΔG) y afinidad (K_i) de los complejos proteína-ligando, analizados con diferentes softwares.....	29
Tabla 3. Principales interacciones de los complejos proteína-ligando.....	30

Figuras

Figura 1. Estructura química de las micotoxinas principales (Lyagin y Efremenko, 2019)	10
Figura 2. Interacciones entre la bromelina y OTA.....	31
Figura 3. Mecanismo de detoxificación de la OTA por acción de la bromelina.....	32
Figura 4. Cromatogramas HPLC-fluorescencia de los experimentos <i>in vitro</i> de bromelina-OTA.....	33
Figura 5. Cromatogramas HPLC-TOF-MS de bromelina-OTA.....	34
Figura 6. Interacciones entre la bromelina y T-2.....	35
Figura 7. Interacciones entre la monoacilglicerol lipasa y OTA.....	36
Figura 8. Mecanismo de detoxificación de la OTA por acción de la monoacilglicerol lipasa.....	37
Figura 9. Interacciones entre la monoacilglicerol lipasa y T-2.....	38
Figura 10. Mecanismo de detoxificación de T-2 por acción de la monoacilglicerol lipasa.....	39
Figura 11. Interacciones entre la endometalopeptidasa neutra y OTA.....	40
Figura 12. Mecanismo de detoxificación de la OTA por acción de la endometalopeptidasa neutra.....	41
Figura 13. Cromatogramas HPLC-fluorescencia de los experimentos <i>in vitro</i> de endometalopeptidasa neutra-OTA.....	42
Figura 14. Cromatogramas HPLC-TOF-MS de endometalopeptidasa neutra-OTA.....	43
Figura 15. Interacciones entre la endometalopeptidasa neutra y T-2.....	44

RESUMEN

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos filamentosos, su exposición directa provoca graves enfermedades y puede causar la muerte en humanos y animales, así como importantes pérdidas monetarias en la industria pecuaria. En México existe una contaminación elevada de micotoxinas, la cual requiere del diseño de alternativas para su manejo. Con el fin de detectar nuevas alternativas biológicas, económicas y eficientes para su detoxificación, el objetivo de este trabajo consistió en estudiar la capacidad de tres hidrolasas: i) bromelina de *Ananas comosus* (cisteín-proteasa), la monoacilglicerol lipasa de *Saccharomyces cerevisiae* y la endometalopeptidasa neutra de *Bacillus subtilis*, para detoxificar a la ocratoxina A (OTA) y toxina T-2 (T-2). Con tal fin se desarrollaron estudios de acoplamiento molecular utilizando ligandos de referencia como control y experimentos *in vitro*. Los estudios de acoplamiento molecular mostraron que ambas toxinas interactuaron cerca de la triada catalítica, de forma similar a como se comportaron los ligandos de referencia en las tres enzimas estudiadas. Asimismo, basados en la proximidad de los aminoácidos en las poses más estables se propusieron mecanismos de detoxificación para la biotransformación de las micotoxinas. Los experimentos *in vitro* mostraron que mientras la bromelina disminuyó la concentración de OTA en un 7.64 % a *pH* de 4.6, la endometalopeptidasa redujo el 8.2 %, 14.44 % y 45.26 % a *pH* 4.6, 5 y 7, respectivamente ($p < 0.05$). Se confirmó que el producto final, resultado de la actividad de la endometalopeptidasa con la OTA es la ocratoxina- α (OT α), su metabolito reportado como el menos tóxico. En este estudio, se demostró por primera vez que: i) la bromelina es capaz de hidrolizar a la OTA en condiciones de *pH* ácido, aunque con poca eficacia; ii) la lipasa demostró ser eficiente en hidrolizar tanto a la OTA como a T-2 en los estudios de acoplamiento molecular; y iii) la endometalopeptidasa neutra demostró tener una alta eficacia como biodetoxicante de la OTA. Por otra parte, los resultados de los experimentos *in vitro* son prácticos, ya que las condiciones de *pH* y tiempo de incubación son comparables con el tiempo de digestión y condiciones reales intestinales de las aves de corral, siendo un aporte importante de este estudio.

Palabras Clave: ocratoxina- α ; biodetoxicación enzimática; bromelina de *Ananas comosus*; endometalopeptidasa neutra de *Bacillus subtilis*; micotoxinas; monoacilglicerol lipasa de *Saccharomyces cerevisiae*; toxina HT-2.

INTRODUCCIÓN

Los hongos constituyen un gran acervo de biodiversidad y son organismos fundamentales al desempeñar actividades ecológicas vitales en todos los ecosistemas, además de presentar una gran variedad morfológica y una gama diversa de ciclos de vida (Aguirre-Acosta et al., 2014). Desde la edad media estos organismos han sido catalogados como fuente de contaminación alimenticia, debido a su capacidad de producir compuestos secundarios llamados micotoxinas (Haque et al., 2020). Las micotoxinas son producidas por hongos filamentosos, principalmente por los organismos de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, que pueden estar presentes en el crecimiento, cosecha, secado o almacenamiento de frutos, granos y semillas (Taheur et al., 2019). Se ha reportado que la exposición directa a estos metabolitos tiene efectos carcinógenos, teratogénicos, mutagénicos e inmunosupresores, representando una causa de enfermedad o mortalidad en animales y humanos (Li et al., 2018). Lo que da como resultado, grandes pérdidas económicas principalmente en la industria pecuaria (Arroyo-Manzanares et al., 2014). El crecimiento de hongos toxigénicos y la producción de micotoxinas es dependiente de factores ambientales como la competencia microbiana, la disponibilidad de nutrientes, la estructura del sustrato, la actividad de agua, el *pH*, la humedad relativa, la presencia de insectos, la aplicación de fungicidas y pesticidas (Freire y Sant'Ana, 2018). La contaminación alimenticia puede ocurrir durante las etapas de producción y procesamiento de productos (Yogendrarajah et al., 2014). Recientemente se han identificado cerca de 100,000 hongos, y encontrado más de 500 micotoxinas con efecto toxigénico (Haque et al., 2020). Sin embargo, las toxinas que mayormente comprometen la salud incluyen a las aflatoxinas (AF), citrinas (CT), fumonisinas (FUM), ocratoxinas (OT), patulinas (PAT), tricotecenos (TCT) y zearalenonas (ZEA) (Ukwuru et al., 2018).

Diversas estrategias han sido empleadas para eliminar o reducir los niveles de micotoxinas en alimentos y piensos. Estos métodos se clasifican en tres categorías: físicos, químicos y biológicos. Las alternativas biológicas proporcionan un proceso específico, eficiente, amigable al medio ambiente y preservan la calidad nutricional de los alimentos (Abrunhosa et al., 2010). Debido a esto, son una alternativa importante a considerar para la inactivación de ocratoxina A (OTA) y toxina T-2 (T-2). Adicionalmente, el acoplamiento molecular, también conocido como docking, es una herramienta fundamental para la búsqueda y selección *in silico* tanto de ligandos de importancia biológica como posibles blancos terapéuticos, debido a que permite predecir y calcular computacionalmente la posición más favorable entre la interacción de un complejo ligando-proteína (Pagadala et al., 2017; Ballón y Grados, 2019).

Este estudio contempla el uso herramientas bioinformáticas para encontrar las interacciones más adecuadas de OTA y T-2 acopladas a tres enzimas provenientes de *Ananas comosus*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Bacillus subtilis*, con el objetivo de plantear posibles mecanismos de biodesintoxicación de micotoxinas.

MARCO TEÓRICO

Micotoxinas

El concepto de micotoxina tiene origen en la palabra griega *mukos* (hongos) y en la palabra en latín *toxicum* (veneno; Chauhan et al., 2016). El consumo, inhalación o contacto directo con micotoxinas provoca efectos negativos en la salud de animales y humanos (Ramos et al., 2020). A continuación se describen las características y afectaciones a la salud generales de las principales micotoxinas:

- a) *Aflatoxinas*: Son un grupo de compuestos orgánicos no proteicos, de bajo peso molecular. Su esqueleto básico es un anillo de furano unido a una cumarina. Las aflatoxinas de mayor interés son la B2, G1, G2 y B1, esta última está categorizada como carcinógeno de grupo 1 de acuerdo con la Agencia Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC; Martínez et al., 2013; Figura 1).
- b) *Citrinina*: Micotoxina de bajo peso molecular derivada de policétidos, producida principalmente por la especie *Penicillium citrinum*. Sin embargo, también es producida por otras especies de los géneros *Aspergillus* y *Monascus*. Es considerada un potente nefrotóxico, que afecta los túbulos proximales del riñón y es una posible causa de la nefropatía porcina (Gil-Serna et al., 2014; Figura 1).
- c) *Fumonisin*as: Las fumonisin
- B1, B2 y B3 son carcinógenos y genotóxicos, originados por las especies *Fusarium verticillioides* y *F. proliferatum*. Se ha reportado que hay una correlación positiva entre el consumo de productos contaminados y las fumonisin
- as asociadas a la incidencia de tumores esofágicos, cáncer de hígado y a defectos en el tubo neural. La fumonisin
- B1 está categorizada como posible carcinógeno en el grupo 2B de la IARC y muestra actividad genotóxica por medio de estrés oxidativo, daño al ADN, interrupción del ciclo celular y apoptosis (Ülger et al., 2020; Figura 1).
- d) *Ocratoxinas*: Las ocratoxinas son producidas principalmente por los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, poseen más de 10 derivados. La OTA es considerada la más tóxica de las ocratoxinas. Es un nefrotóxico muy potente clasificado como carcinógeno del grupo 2B por la Agencia Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer IARC (Ülger et al., 2020; Figura 1).
- e) *Patulina*: Es un policétido de lactona (C₇H₆O₄), producido principalmente por *Aspergillus*, *Byssochlamys* y *Penicillium*. La exposición a este metabolito puede causar síntomas intestinales incluyendo náusea, vómito, úlceras, hemorragias intestinales y lesiones en el duodeno. De acuerdo con la IARC, la Patulina es un carcinógeno del grupo 3. Por otra parte, su afinidad por los grupos sulfhidrilo le permiten obtener un efecto inhibitor sobre algunas enzimas (ATPasa, enzimas lisosomales, RNA polimerasa, etc.; Saleh y Goktepe, 2019; Figura 1).

- f) *Tricotecenos*: Poseen estructuras tetracíclicas y son producidos principalmente por especies de los géneros *Fusarium*, *Myrothecium* y *Stachybotrys*, cuentan con un sistema de anillo sesquiterpenoide 12, 13-epoxitricote-9-ceno. Generalmente se clasifican en 4 tipos (A, B, C y D). Entre los tricotecenos del grupo A se localiza T-2, que es de gran importancia, debido a sus afectaciones tales como decrecimiento de la viabilidad celular, inhibición de la proliferación celular, inducción de estrés oxidativo y daño mitocondrial (Chen et al., 2020; Figura 1).
- g) *Zearalenona*: Es una micotoxina estrogénica no esteroidea, producida por las especies del género *Fusarium*, con la capacidad de activar receptores estrogénicos, causando trastornos reproductivos en animales de granja y síndrome hiperestrogénico en humanos (Wang y Xie, 2020; Figura 1).

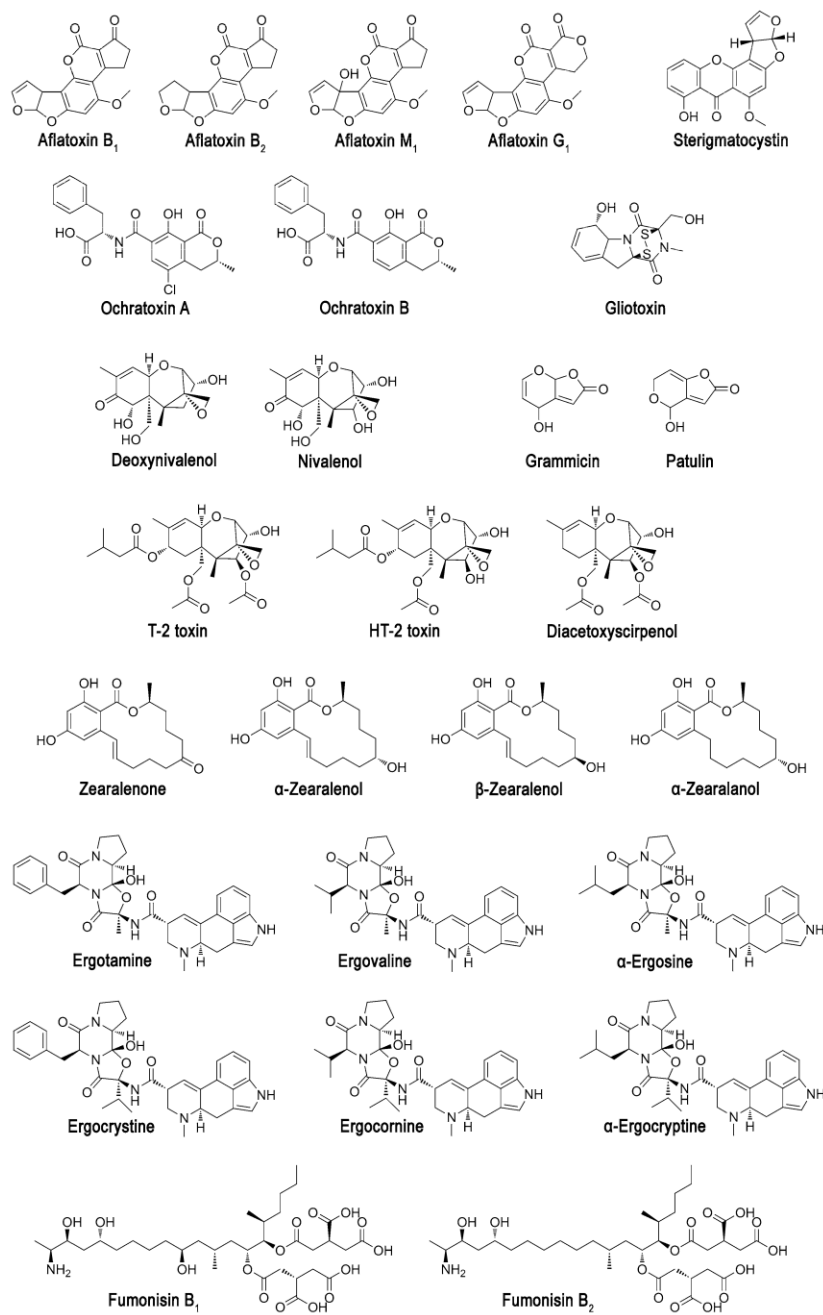


Figura 1. Estructura química de las micotoxinas principales (Lyagin y Efremenko, 2019).

Ocratoxinas

Las ocratoxinas son metabolitos secundarios que contienen un núcleo de isocumarina unido por un enlace tipo amida al aminoácido fenilalanina, y se clasifican principalmente en: ocratoxina A (OTA), ocratoxina B (OTB; análogo no clorado de OTA) y ocratoxina C (OTC; éster etílico de OTA; Kumar et al., 2020). Otros tipos son la ocratoxina- α (OT α) y la ocratoxina beta (OT β), las cuales han sido nombradas de esa forma por su similitud con la OTA y OTB, diferenciándose de estas dos por la ausencia de fenilalanina en su estructura química (Martínez y Chaves, 2019). Para los fines de este estudio, a continuación, se describirá con mayor detalle a la OTA.

OTA

La OTA es un metabolito nefrotóxico muy potente, teratógeno, carcinógeno e inmunotóxico (Zhai et al., 2021). Es producido principalmente por hongos de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* y particularmente por *P. verrucosum* y *P. nordicum*. Por otra parte, el género *Aspergillus* posee una representatividad de dos secciones productoras de OTA, la sección *Circumdati*, con once especies generadoras de grandes cantidades de ocratoxina A, destacando a las siguientes: *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* y *A. steynii*, en la sección *Nigri* los principales organismos productores son *A. carbonarius*, *A. nigertyt* y su especie críptica *A. welwitschiae* (Gallo et al., 2017). Su fórmula empírica es $C_{20}H_{18}O_6NCl$, y está conformado por un anillo 3,4-hidrometil isocumarina unido, por un grupo carboxilo, y a través de un enlace tipo amida, está unido a una molécula de fenilalanina (Fig. 2). Es muy estable, incoloro, poco soluble en agua y soluble en compuestos orgánicos polares, emite fluorescencia al ser excitado con rayos U.V. Su punto de fusión va de los 94-96 °C (Abrunhosa et al., 2010; Ravelo et al., 2011).

La transformación de OTA a OT α es el mecanismo más importante de la degradación de esta micotoxina: los productos finales de este proceso son OT α y L-fenilalanina, los cuales se forman a través de la hidrólisis del enlace amida por la acción de enzimas hidrolíticas (Chen et al., 2018).

Ocurrencia natural

Las principales especies generadoras de OTA, *P. verrucosum* y *P. nordicum*, son contaminantes de granos, quesos y carnes fermentada. *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* y *A. steynii* se encuentran en granos de arroz, café, cacao, bebidas y otros alimentos. *A. carbonarius*, está asociada a la contaminación de productos elaborados con uvas y pasas (Gallo et al., 2017). Sus límites máximos son 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en cereales crudos, 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en vino y 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en café (Kumar et al., 2020).

Efectos tóxicos a nivel fisiológico

La OTA afecta principalmente al riñón, fomentando el desarrollo de nefropatía crónica y cáncer en la parte baja de las vías urinarias. Además, causa teratogénesis, neurotoxicidad e inmunotoxicidad en animales y humanos. También se ha demostrado que puede tener efectos citotóxicos sinérgicos con la fumonisina B1 (Pinhão et al., 2020).

Efectos tóxicos a nivel bioquímico

Se ha reportado que la OTA puede causar una sobreproducción de radicales libres ocasionando daño oxidativo, lo que a su vez, aumenta la peroxidación de lípidos, genera el rompimiento de cadenas de ADN, daña las bases nitrogenadas, e inhibe la síntesis de proteínas y ARN (Chandra et al., 2015). Además de causar apoptosis celular y daño en los receptores celulares (Tao et al., 2018).

Tricotecenos (TCT)

Los TCT, son una familia de sesquiterpenos tetracíclicos que afectan principalmente la división celular por medio de la inhibición de proteínas. Los TCT se clasifican en 4 grupos según su estructura química: A, B, C y D (McCormick et al., 2011). Las toxinas del grupo A son mayormente producidas por las especies *F. sporotrichioides* y *F. poe*, esta clasificación abarca al neosolaniol (NEO), diacetoxiscirpenol (DAS), monoacetoxiscirpenol (MAS), verrucarol (VER), scirpentriol (SCP), toxina HT-2 (HT-2), toxina T-2 y derivados de las anteriores (Polak-Sliwinska y Paszcyk, 2021). Los TCT son un grupo de sesquiterpenos tetracíclicos que se caracterizan por compartir un grupo funcional epóxido en posición C-12 y C-13, además de presentar un doble enlace en C-9 y C-10. La gran diversidad de estos metabolitos secundarios se debe a las diferentes cantidades y posiciones de los grupos hidroxilo presentes en su estructura base. Los tricotecenos de tipo A, se pueden dividir en dos familias: la familia T-2, que se distingue con una hidroxilación en el carbono 8 y la familia scirpenol, caracterizada por una ausencia de grupos funcionales en el C-8 (Rychlik, 2012).

T-2

Los principales productores de T-2 son *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium sporotrichioides* y *Fusarium acuminatum* (Polak-Sliwinska y Paszcyk, 2021). La estructura química de esta micotoxina se caracteriza por la presencia de un grupo hidroxilo en la posición C-3, un grupo acetoxi en las posiciones C-4 y C-5, un hidrógeno en C-7 y un grupo isovaleril unido al éster en C-8 (Janik et al., 2021). Es insoluble en agua y soluble en cetona, acetato de etilo, cloroformo, etanol, metanol. Es estable en distintas condiciones ambientales (Adhikari et al., 2017).

Los mecanismos más importantes de la degradación de la toxina T-2 consiste en la hidrólisis del doble enlace entre C-9 y C-10, del anillo epóxido y del grupo hidroxilo en C-3. Dando como producto metabolitos menos tóxicos como HT-2 o 3-OH T-2 (Janik et al., 2021; Vanhoutte et al., 2016).

Ocurrencia natural

La T-2 (con una ingesta diaria recomendable de 0.06 µg/kg de peso) se encuentra contaminando el trigo, maíz, arroz, la cebada y la avena, y otros alimentos hechos a base de cereales. Los granos pequeños como el arroz y el trigo también pueden estar contaminados con otras micotoxinas como la OTA, el DON y la ZEA (Polak-Sliwinska y Paszcyk, 2021).

Efectos tóxicos a nivel fisiológico

La T-2 puede causar daños en múltiples órganos como el cerebro, el riñón y tejidos gastrointestinales, la exposición a esta micotoxina se asocia con la leucopenia en órganos linfoides, inhibición de la hematopoyesis y disminución de la proliferación de linfocitos (Ülger et al., 2020; Zhang et al., 2020).

Efectos tóxicos a nivel bioquímico

Al igual que la OTA, la T-2 puede inhibir la síntesis de proteínas, del ADN y ARN, por medio de un mecanismo genotóxico que interrumpe el proceso de maduración de las células, afectando a la mitocondria y neutralizando el glutatión, lo que induce a una peroxidación de los lípidos (Ulguer et al., 2020).

Alternativas biológicas de manejo de las micotoxinas

Biodegradación

La biodegradación se define como la aplicación de enzimas, provenientes de diversos microorganismos y sus metabolitos, para la degradación de micotoxinas. Este proceso es una alternativa prometedora, ya que ofrece la posibilidad de usar numerosas opciones (Muhialdin et al., 2020). A continuación, se mencionan a los microorganismos con la capacidad de degradar micotoxinas y la información general de las proteínas empleadas en el presente trabajo.

Microorganismos

Algunos microorganismos son capaces de degradar o adsorber micotoxinas debido a las enzimas que contienen, entre ellos se encuentran: las actinobacterias, bacterias, hongos filamentosos y levaduras (Taheur et al., 2019).

Enzimas

Diversas investigaciones han reportado la degradación de micotoxinas por parte de enzimas crudas y purificadas provenientes de distintas fuentes biológicas (Chen et al. 2020). Las enzimas se clasifican en 6 tipos, de acuerdo con la reacción que catalizan: oxidorreductasas, transferasas, liasas, isomerasas, ligasas e hidrolasas (Blanco y Blanco, 2017). Dentro del grupo 3 de las hidrolasas se encuentran las proteasas (Zhu et al., 2019).

Proteasas

Las proteasas son enzimas presentes en animales, plantas y microorganismos, cuya función principal es romper enlaces peptídicos de compuestos orgánicos: catalizan reacciones utilizando una molécula de agua, causando la ruptura de enlaces químicos (Flores-Gallegos et al., 2019). Se dividen en dos subgrupos, dependiendo de la zona en la que actúan; las exopeptidasas rompen el enlace peptídico proximal a los extremos amino o C-terminal, mientras que las endopeptidasas escinden los enlaces peptídicos distantes de los extremos del sustrato (Rao et al., 1998). Dentro de las exopeptidasas se encuentran las aminopeptidasas, dipeptidil-peptidasas, tripeptidil-peptidasas, carboxipeptidasas, dipeptidasas y Ω -peptidasas (Barrett, 1994). Por otra parte, la denominación de las endopeptidasas se hace en base a la preferencia por un residuo determinado, sin embargo, como su especificidad es muy compleja, se ha preferido utilizar nombres asignados para nombrarlas como: bromelina, papaína, tripsina, quimiotripsina, pepsina (Singh et al., 2019).

Cisteín-proteasas

Las cisteín-proteasas son endoproteasas que contienen una díada de cisteína-histidina en su centro catalítico (Quesne et al., 2013). Por lo general, requieren de agentes reductores para retener la actividad catalítica y son desnaturalizadas o inhibidas por reactivos sulfhídricos (Ward, 2011). Su mecanismo catalítico consiste en la ruptura de enlaces peptídicos y depende de un par de iones tiolato-imidazol proporcionados por los residuos de cisteína e histidina en el sitio activo, en donde, el ataque nucleofílico al grupo carbonilo da lugar a la formación de un intermedio oxianión tetraédrico, el cual acepta un protón del grupo imidazol. Esto, da lugar a la formación de un intermediario enzimático acil y a la liberación de la porción C-terminal del sustrato (Buttle y Mort, 2013).

Serin-hidrolasas

La familia de las serin-hidrolasas es una de las más diversas, se divide en endoproteasas y exoproteasas, que a su vez incluyen a proteasas, lipasas, esterasas, peptidasas, tioesterasas y amidasas (Faucher et al., 2020; Shukla et al., 2022). Su mecanismo se da por medio del rompimiento hidrolítico de enlaces tipo éster, tioéster y amida. Esto es posible debido a un nucleófilo de serina que ataca al correspondiente enlace electrofílico del sustrato para formar un intermediario covalente. Posteriormente, el aducto se libera por un proceso de hidrólisis regenerando a la enzima para una nueva ronda de catálisis (Sieber et al., 2010).

Las lipasas se encargan de la hidrólisis de lípidos y aceites, y están involucradas en procesos como la esterificación, interesterificación, transesterificación, alcoholólisis, acidólisis y aminólisis (Gopinath et al., 2013). Principalmente se encuentran en levaduras y los hongos, siendo las fuentes más importantes de extracción para su aplicación industrial (Gupta et al., 2015). Las monoacilglicerol lipasas son hidrolasas de ésteres carboxílicos que catalizan la hidrólisis de los monoglicéridos en ácidos grasos libres y glicerol (Aschauer, 2016; Chang et al., 2021). Su mecanismo catalítico comienza cuando el sustrato llega al sitio activo y su enlace éster se hidroliza por el ataque nucleofílico del residuo de serina. De este modo se forma un intermediario tetraédrico, se libera glicerol como grupo saliente y posteriormente se da lugar a un complejo acil-enzima. Finalmente, el ataque nucleofílico de una molécula de agua activa al grupo carbonilo del complejo con el grupo acilo (Gil-Ordóñez et al., 2018).

Endometalopeptidasas

Las metaloproteasas son enzimas en las que el ataque nucleofílico a un enlace peptídico esta mediado por una molécula de agua y durante este proceso un catión metálico divalente se encarga de la activación del agua (Rawlings y Barrett, 2004). La mayoría de las metaloproteasa contienen zinc y un residuo de ácido glutámico/histidina en su sitio activo, estos elementos pueden dar lugar a una reacción nucleofílica por parte del hidróxido de zinc y la catálisis de reacciones ácido/base (Alud, 2013). Aunque la mayoría de las metaloproteasas son endopeptidasas, pueden ser catalogadas de diferente forma según la posición en la que actúen sobre un polipéptido (Chang et al., 2021).

ANTECEDENTES

OTA

Una de las primeras investigaciones sobre la degradación de OTA empleando enzimas se llevó a cabo por Pitout (1968), comprobando la hidrólisis de OTA (0.45×10^{-4} M- 2.75×10^{-4} M). En este estudio, se utilizaron tres enzimas proteolíticas: la carboxipeptidasa A de *Aspergillus niger*, con un valor de degradación de 1.5×10^{-4} M, la α -quimotripsina con un valor obtenido de 1×10^{-3} M y la tripsina de páncreas bovino, la cual no registró actividad. El proceso de incubación se realizó con una temperatura de 25 °C y se utilizaron buffers a un *pH* de 7.5 ± 0.02 . Al final del experimento se identificó a la OT α como metabolito residual.

Posteriormente, Hwang y Draughon (1994) estudiaron la degradación de OTA (10 ppm) por medio de un barrido con varios microorganismos. La bacteria *Acinetobacter calcoaceticus* presentó un promedio de degradación del 0.1005 ppm/h y 0.0636 ppm/h, a una temperatura de incubación de 25 °C y 30 °C, respectivamente. Se identificó a la OT α como producto residual.

Años más tarde, Doster y Sinnhuber (1972) evaluaron la degradación de OTA y OTB (2.04×10^{-4} M para ambas micotoxinas) por acción de la carboxipeptidasa de páncreas bovino. Los autores registraron una velocidad máxima de 5.15×10^{-7} M/min de OTA. La incubación se realizó con una temperatura de 37 °C y se utilizó un *pH* de 7.5. Al final de la hidrólisis se confirmó a la OT α y OT β como productos finales.

De igual forma, Stander et al. (2000) realizaron un estudio de selección contemplando 24 hidrolasas comerciales con el potencial para degradar a la OTA. Sin embargo, se obtuvieron resultados únicamente en la preparación de lipasa A extraída de *Aspergillus niger*, la cual registró una actividad en crudo de 7.63 Unidades/ μ g y 2.3 Unidades/mg en estado puro. Los autores obtuvieron a la OT α y fenilalanina como productos finales. Un año después, Stander et al. (2001) estudiaron la actividad cinética de la degradación de OTA por parte de la carboxipeptidasa A de páncreas bovino, dicha enzima obtuvo una *K_m* de 5.6 μ M. Al terminar el proceso de hidrólisis se identificó a la OT α y a la fenilalanina como metabolitos residuales.

Dos años después, Schatzmayr et al. (2003) evaluaron la degradación de la OTA (200 ppb) por parte de *Trichosporon* sp., registrando un rango del 30-100 % después de un periodo de incubación de 2.5-5 h con una temperatura de 25 °C y un rango de 80-100 % con una temperatura de 35 °C. Los autores encontraron a la OT α y fenilalanina como productos finales. Posteriormente, Politis et al. (2005) estudiaron la capacidad de degradación de OTA (500 ppm) por parte del microorganismo *Trichosporon mycotoxinivorans*, utilizando pollos como modelos *in vivo*, encontrando que la cepa fue efectiva para evitar los efectos citotóxicos de la OTA al suministrar una dieta con el tratamiento durante 40 días.

Al igual que Stander y colaboradores, Abrunhosa et al. (2006) reportaron la capacidad de degradación de OTA (1 ppm) por acción de la enzima Ancex de *Aspergillus niger*, la proteasa A, la pancreatina y la enzima PAC: los resultados obtenidos mostraron porcentajes de 99.8 %, 87.3 %, 43.3 % y 3 %, respectivamente, al concluir un tiempo de incubación de 25 h y a un *pH* de 7.5. Se reportó la presencia de la OT α y la fenilalanina como productos finales.

Un año más tarde, Péteri et al. (2007) reportaron la degradación de OTA (7.5 ppm) por medio de la cepa *Phaffia rhodozyma* CBS 5905 y dos cepas de *Xanthophyllomyces*, CBS 5908 y CBS 6938, siendo *P. rhodozyma* CBS 5905 la que registró un porcentaje mayor al 90 % al concluir 15 días, utilizando una temperatura de incubación 20 °C y un *pH* de 7.5. Para validar el experimento se cuantificó la cantidad de OT α como producto final.

Un año después, Petchkongkaew et al. (2008) estudiaron la degradación de OTA (500 ppm) y AFB a través de un barrido con cepas de *Bacillus spp.* Encontraron que *Bacillus licheniformis* fué capaz de degradar el 92.5 % de OTA, después de 7 días y utilizando una temperatura de incubación de 37 °C. Se reportó la presencia de la OT α como metabolito residual. Otro estudio con microorganismos fue realizado por Fuchs et al. (2008), donde se emplearon bacterias ácido-lácticas para degradar a la OTA (100 ppm). Obteniendo como resultado una efectividad mayor al 95 %, por parte de *Lactobacillus acidophilus*, después de 4 h con una temperatura de incubación de 37 °C y un *pH* de 5.0.

Años más tarde, Armando et al. (2012) estudiaron la degradación de OTA (100 ppm) por parte de distintas cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Los resultados obtenidos mostraron que las cepas RC012 y RC016, obtuvieron una efectividad del 71 % y 74 %, respectivamente. Esto después de 1 h y con una temperatura de incubación de 37 °C.

Posteriormente, Dobritzsch et al. (2014) realizaron una caracterización estructural y funcional de la ocratoxinasa proveniente de *Aspergillus niger*. Se realizó un ensayo de degradación de OTA contemplando un tiempo de 2 h y una temperatura de incubación de 40 °C. Se identificó la presencia de la OT α como metabolito residual. En el mismo año, Chang et al. (2014) estudiaron la detoxificación de OTA (50 ppm) por acción de la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* ASAG1, resultando en un 99 % de degradación después de 24-72 h, utilizando una temperatura de incubación de 31 °C y *pH* de 7.0. Otro estudio fue realizado por Petruzzi et al. (2014), en donde se estudió la biodegradación de la OTA (2 ppm) mediante dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, W28 y W46, reportando una efectividad del 70 %, al concluir 72 h con temperatura de incubación de 25-30 °C. La micotoxina fue liberada al medio después de 10 días.

Un año después, Yu et al. (2015) determinaron el porcentaje de biodegradación de OTA (38 ppm) por acción de la amidasa 2, proveniente de *Aspergillus niger*, en muestras de harina de maíz. Los resultados mostraron una degradación del 99 % después de un tiempo de incubación de 20 h con una temperatura de 30 °C y un *pH* de 7.0. Adicionalmente, evaluaron la biodegradación de la OTA (0.047 ppm) por parte la amidasa 2. Se obtuvo una degradación mayor al 95.8 % al concluir un periodo de incubación de 2.5 h con una temperatura de 40 °C. Otra investigación que empleó enzimas del género *Aspergillus* fue llevada a cabo por Cho et al. (2016), realizando el aislamiento de enzimas crudas de *A. tubingensis* M036 y M074 con la finalidad de remover a la OTA (0.04 ppm). Se registró una remoción del 97.5 % con un *pH* de 5.0 y 80.3 % con un *pH* de 7.0, correspondiente a la primera cepa y un 75.3 % con un *pH* de 7.0 perteneciente a la segunda, tras una incubación de 24 h a una temperatura de 25 °C. Se identificó a la OT α como metabolito residual.

Un año más tarde, Scafuri et al. (2017) realizaron un estudio *in silico* y estadístico para identificar posibles objetivos proteicos de un conjunto de micotoxinas y compuestos xenobióticos con la capacidad de contaminar alimentos: OTA, AFB1 y algunos de sus derivados, DON y ZEA. Se realizó un acoplamiento molecular registrando un rango de energía libre entre -11.04 a -4.27 kcal/mol. También se utilizó la estructura la carboxipeptidasa 2, la cual presentó un valor de -9.27 kcal/mol en complejo con la OTA.

Posteriormente, Loi et al. (2018) estudiaron la capacidad de degradación de OTA (0.5 ppm) y otras micotoxinas, mediante el mediador de la enzima lacasa Ery4 proveniente de *Pleurotus eryngii*. Los resultados mostraron una efectividad del 100 % después de 72 h de incubación a una temperatura de 25 °C y con un *pH* de 5. En el mismo año, Zhang et al. (2018) analizaron los mecanismos de degradación de OTA (1 ppm) por acción de la cepa *Yarrowia lipolytica* Y-2, la cual registró una efectividad del 97.2 % al concluir un periodo de incubación de 4 h a una temperatura de 28 °C y un *pH* de 6.8.

Dos años más tarde, De Oliveira et al. (2020) demostraron la degradación simultánea de la OTA (0.01 ppm) y la ZEA (1 ppm) utilizando una peroxidasa comercial en muestras de cerveza, se obtuvo una degradación del 27 % y 64.9 %, respectivamente, todo ello al concluir un periodo de incubación de 6 h a una temperatura de 30 °C y un *pH* de 7. Los autores reportaron a la OTα como metabolito residual. En el mismo año, Wei et al. (2020) estudiaron la biodegradación de OTA (20 ppm) mediante la cepa *Lysobacter* sp. CW239 y el gen de carboxipeptidasa cp4, los resultados mostraron una degradación del 86.2 % y 36 %, respectivamente, después de 24 h con una temperatura de incubación de 37 °C y un *pH* de 7.0. Se confirmó la presencia de la OTα como producto final. Otro estudio fue realizado por Xiong et al. (2020), los cuales analizaron la degradación de OTA (2 ppm) por medio de una carboxipeptidasa modificada. Los autores obtuvieron un 93.36 % de efectividad, al concluir 24 h con una temperatura óptima de incubación de 40 °C y un *pH* óptimo de 8. Se identificó la producción de OTα como metabolito final.

Recientemente, Leitão et al. (2021) realizaron un estudio de acoplamiento molecular ciego, por medio de AutoDock Vina, para caracterizar diversas enzimas con potencial de degradar a la OTA. Los estudios demostraron que las enzimas parecidas a la ocratoxinasa, producida por hongos productores de OTA, poseen sitios de unión más favorables para acomodar a la OTA y OTB. Otra investigación reciente fue realizada por Quing et al. (2021), los cuales analizaron la degradación de OTA por acción carboxipeptidasas D-alanil-D-alanina Dac A y Dac B, ambas provenientes de *Bacillus subtilis* ANSB168, en estudios *in vitro* e *in vivo*. Los ensayos mostraron un porcentaje de degradación de 45 % para DacA y 42 % para DacB, al concluir 72 h con una temperatura de incubación de 37 °C. Se detectó la presencia de OTα como residuo final.

T-2

Una de las primeras investigaciones sobre la detoxificación de T-2 se llevó a cabo por Beeton y Bull (1989), comprobando la degradación de T-2 (2-10 ppm) por medio de bacterias de suelo fresco. Los resultados mostraron una degradación del 100 % por parte de las comunidades bacterianas KS10 y TS4, esto después de un periodo de incubación de 24 y 48 h, respectivamente. Se identificó la presencia de HT-2 y triol T-2 al final del proceso.

Años más tarde, Wang et al. (2011) estudiaron la capacidad de los citocromos porcinos CYP3A46 y CYP3A36 para degradar a T-2 (0.05 ppm). Se comprobó que CYP46 fue capaz de metabolizar a toda la micotoxina después de 48 h con una temperatura de incubación de 37 °C. Los autores encontraron 3-hidroxi-T-2 como producto final.

Un año después, McCormick et al. (2012) elaboraron un estudio de barrido abarcando el potencial de degradación de 23 especies de levaduras del clado *Trichomanusculus*, los resultados obtenidos mostraron la conversión del 75 % de T-2 (3×10^{-4} M) a 3-acetil-toxina T-2 después de 6 días por acción de *Blastobotrys proliferans* y una transformación del 100 % de T-2 a toxina T-2-3-glucosido en un periodo de 4 días por acción de *Blastobotrys muscicola*. De igual forma, Cserháti et al. (2013) realizaron un barrido contemplando a 32 cepas de *Rhodococcus*, de las cuales *R. erythropolis*, *R. globerulus*, *R. rhodochrous*, *R. coprophilus* y *R. atherivorans* obtuvieron una degradación de T-2 (2 ppm) del 90 % al concluir un periodo de incubación de 72 h a una temperatura de 28 °C.

Por otra parte, Cheng et al. (2014) realizaron estudios *in silico* e *in vitro* para demostrar los mecanismos involucrados en la inactivación enzimática de T-2, por acción del citocromo porcino CYP3A29. Se encontró que los residuos clave son Arg106, Ser119, Lys212 y Arg105, este último se identificó como importante para el reconocimiento de la micotoxina y para poder efectuar la conversión de T-2 a 3'-OH-T-2.

Dos años más tarde, Nathanail et al. (2016) investigaron la capacidad de degradación de T-2 (100 ppm) por medio de la cepa *Saccharomyces pastorianus* A15. Los resultados obtenidos mostraron una efectividad del 31 % al transcurrir 4 días en un proceso de fermentación. En el mismo año, Schmeitzel et al. (2016) llevaron a cabo la caracterización de los genes de las carboxilesterasas de *Brachypodium distachyon*, encargadas de la desacetilación de tricotecenos. El gen BdCXE29 presentó una hidrólisis del 100 % de T-2 (10 ppm) después de 2 h con una temperatura de incubación de 25 °C y un pH de 7.5.

Posteriormente, Gao et al. (2018) estudiaron la capacidad de *Eggerthella sp.* DII-9, proveniente de los intestinos de pollo, para degradar toxina T-2 (20 ppm). Registraron una efectividad del 88 % después de 48 h con una temperatura de incubación de 39 °C y un pH de 7.5. Al final del proceso se identificó la presencia de T-2 de-epoxi triol. De igual forma, Juodeikiene et al. (2018) analizaron la detoxificación de T-2 (<5 ppm) empleando bacterias acidolácticas en granos de trigo cervecero. Los autores reportaron que la cepas de *Pedicoccus pentosaceus* KTU05-8, KTU05-9 y KTU05-10, presentaron una degradación de 52 %, 60 % y 78 %, respectivamente. En el mismo año, Loi et al. (2018) estudiaron la capacidad de degradación de T-2 (1 ppm) y otras micotoxinas, mediante el mediador de la enzima lacasa Ery4 proveniente de *Pleurotus eryngii*. Los resultados mostraron una degradación del 40 % después de 72 h con una temperatura de incubación a 25 °C y un pH de 5.

Dos años después, Chlebicz y Śliżewska (2020) estudiaron la detoxificación de T-2 (100 ppm) por medio de bacterias probióticas del género *Lactobacillus* y levaduras *Saccharomyces cerevisiae*. Los resultados obtenidos mostraron que las cepas del género *Lactobacillus* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, obtuvieron una degradación media del 61 % y 69 %, respectivamente. Esto al concluir 24 h de incubación, con una temperatura de 37 °C para las bacterias y 30 °C para la levadura. En el mismo año, Al-Nussairawi et al. (2020) investigaron la degradación de T-2 (1 ppm) empleando organismos del género *Cupriavidus*. La cepa que registró mayor degradación fue *Cupriavidus gilardi* JMC 11283 con un 95 %, mientras que *Cupriavidus metallidurans* CCUG 13724, *Cupriavidus numazuensis* DSM 15562, *Cupriavidus pinatubonensis* DSM 1955, *Cupriavidus basilensis* DSM 11853 y *Cupriavidus plantarum* LGM 26296, obtuvieron un rango de efectividad del 66-88 %. Todo ello después de un periodo de 5 días a una temperatura de incubación de 28 °C.

Recientemente, Hassan et al. (2021) realizaron un estudio de la detoxificación de toxina T-2 (0.6 ppm) por acción de varias especies de *Bacillus*. Las cepas *Bacillus cereus* BM344-1, *Bacillus cereus* BC399-2, *Bacillus simplex* BS350-3 y *Paenibacillus favisporus*, mostraron una degradación del 72 %, 70 %, 72 % y 88 %, respectivamente. Esto después de un periodo de 44 h con una temperatura de 30 °C.

JUSTIFICACIÓN

Debido a la amplia distribución y estabilidad de los hongos filamentosos, estos son capaces de contaminar una gran variedad de alimentos primarios de manera pre y post cosecha, fomentando la ingesta, inhalación o contacto directo con micotoxinas. Dos de las micotoxinas más importantes son la OTA y la T-2 presentes en cereales, semillas, vegetales, frutas, carnes y productos lácteos, suponiendo grandes afectaciones a los organismos, así como grandes pérdidas económicas en la Industria.

Las enzimas utilizadas en la inactivación de micotoxinas proporcionan un proceso eficiente, específico y amigable al medioambiente. Además, al final del proceso pueden conservar la calidad nutrimental de los alimentos. Por tales razones, es necesario identificar opciones accesibles y altamente eficaces, así como la comprensión de los mecanismos de degradación enzimática de las micotoxinas, para buscar la inocuidad en todos sus niveles.

OBJETIVOS

General

Determinar el efecto de tres hidrolasas para biotransformar a OTA y T-2 en metabolitos secundarios menos tóxicos.

Particulares

- Determinar *in silico* la interacción de la OTA con la cisteín-proteasa (bromelina) de *Ananas comosus*, la monoacilglicerol lipasa de *Saccharomyces cerevisiae* y la endometalopeptidasa neutra de *Bacillus subtilis*.
- Determinar *in silico* la interacción de T-2 con la cisteín-proteasa de *Ananas comosus*, la monoacilglicerol lipasa de *Saccharomyces cerevisiae* y la endometalopeptidasa neutra de *Bacillus subtilis*.
- Proponer hipótesis de mecanismos de biotransformación de OTA y T-2, por acción de la cisteín-proteasa de *Ananas comosus*, la monoacilglicerol lipasa de *Saccharomyces cerevisiae* y la endometalopeptidasa neutra de *Bacillus subtilis*.
- Validar mediante experimentos *in vitro* los mecanismos de biodetoxificación de OTA y T-2, por acción de la cisteín-proteasa de *Ananas comosus*, la monoacilglicerol lipasa de *Saccharomyces cerevisiae* y la endometalopeptidasa neutra de *Bacillus subtilis*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudios de acoplamiento molecular

Las estructuras químicas de las enzimas fueron descargadas del Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org>): i) cisteín-proteasa (bromelina) de *Ananas comosus* (PDB: 6YCF); ii) monoacilglicerol lipasa de *Saccharomyces cerevisiae* (PDB: 4ZWN) y iii) endometalo-peptidasa neutra de *Bacillus subtilis*. En el caso de esta última enzima, no se encontró una estructura adecuada y se optó por trabajar con el archivo de la proteasa neutra B proveniente de *Bacillus subtilis* (<https://alphafold.ebi.ac.uk>; AlphaFold ID: P39899). Sin embargo, al no presentar el ion de zinc en el sitio activo, se modeló a partir de la metaloproteínasa neutra de *Bacillus cereus* (PDB: 1NPC). Para verificar que las enzimas de *Bacillus* fuesen compatibles se realizó una alineación de ambas estructuras usando PyMOL[®] (Schrödinger, 2020); obteniendo un 44.5 % de similitud, resultado aceptable según los criterios de homología de Xiang (2006). Adicionalmente, se confirmó que los mismos residuos catalíticos están presentes en los dos archivos. La cadena A fue seleccionada en todas las enzimas, y los aminoácidos faltantes se repararon en SwissModel[®] (<https://swissmodel.expasy.org/>), utilizando la secuencia de cada enzima (Uniprot ID: Q7DNA3, P28321 y P39899; para la bromelina, la lipasa y la endometalo-peptidasa, respectivamente). La minimización de energía se llevó a cabo en Chimera[®] (versión 1.16; <https://www.rbvi.ucsf.edu/chimera>; Pettersen et al., 2004) y para validar la geometría de las proteínas se realizaron análisis de Ramachandran con el uso de MolProbity[®] (<http://molprobity.biochem.duke.edu/index.php>; Williams et al., 2018). Las estructuras de la OTA (Pubchem ID: 442530), T-2 (PubChem ID: 5284461), y la de los ligandos de referencia E64 (Drugbank ID: DB04276), 4S7 (PubChem ID: 137348279) y DB07673 (Drugbank ID: DB07673) se dibujaron utilizando ChemSketch[®] (versión 2021.2.0; www.acdlabs.com; Tabla 1). La geometría de los ligandos se optimizó a nivel molecular utilizando Gaussian[®] 09 (versión 9; Frisch et al., 2016).

Los estudios de acoplamiento molecular se llevaron a cabo en tres softwares: Autodock Vina[®] (Trott y Olson 2010; Eberhardt et al., 2021), SwissDock[®] (Grosdidier et al., 2011) y Autodock[®] (versión 4.2.6; Morris et al., 2009), debido a que su diferencia en funcionamiento (scoring function) permite comparar los resultados, lo que los hace más confiables. Los archivos de las proteínas y ligandos que se utilizaron en Autodock Vina[®] y Autodock[®], se prepararon con AutoDockTools (versión 1.5.6). En breve, las moléculas de agua, ligandos y iones residuales fueron eliminados, posteriormente se añadieron hidrógenos polares y cargas de Kollman. Las cargas de Gasteiger se calcularon para cada ligando. Los archivos de salida generados en Autodock[®] fueron utilizados en SwissDock[®].

Se desarrollaron estudios de acoplamiento molecular de tipo ciego y dirigido. El acoplamiento molecular ciego se utilizó con el fin de explorar sitios de unión en toda la superficie de las enzimas y descartar sitios alostéricos putativos. El espacio de búsqueda fue de 120×120×120 Å. Por otra parte, el acoplamiento molecular dirigido fue utilizado para evaluar las interacciones de los ligandos en el sitio activo de las enzimas. El tamaño de búsqueda fue de 60×60×60 Å y se centró en el sitio activo en donde se acoplaron los ligandos de referencia. Para llevar a cabo los análisis, se utilizó un algoritmo Lamarckiano con una población inicial de 100 individuos aleatorios y 6 iteraciones (1x107), en el caso de AutoDockTools[®] (versión 4.2.6) y Autodock Vina[®]. En SwissDock[®] el tipo de acoplamiento molecular “preciso” fue seleccionado.

Los resultados se analizaron con valores de estimación de afinidad e interacciones en AutoDockTools® (versión 1.5.6). La afinidad de los ligandos por las proteínas se evaluó con los valores de energía libre (ΔG), obtenidos en Autodock Vina®, SwissDock® y Autodock4®, en donde un valor más negativo, indica una mayor espontaneidad en la conformación proteína-ligando. Los valores teóricos de la constante de inhibición (K_i) se calcularon en Autodock4®, en donde un valor menor indica una mayor afinidad del ligando por la proteína. Las figuras se realizaron en Discovery Studio® (BIOVIA, San Diego, CA, EUA) y PyMOL®.

Experimentos *in vitro*

En laboratorio se preparó una mezcla con un volumen final de 1 mL que contenía 20 mg de enzima, cisteín-proteasa (Sigma®) o endometalopeptidasa neutra (Nutrioma®), y estándar puro de OTA o T-2 (Trilogy®) a una concentración de 100 ppb y 1000 ppb, respectivamente. Se utilizó un buffer de fosfatos a 150 mM. El control consistió en estándar puro de micotoxina 10 μ l y buffer de fosfatos hasta aforar a 1 mL. Para ambas enzimas, los ensayos se llevaron a cabo a *pH* de 4.6, 5 y 7 y todos los tubos se incubaron a 41°C durante 60 min. Las muestras se centrifugaron a 14000 rpm durante 2 min. A pesar de que la monoacilglicerol lipasa demostró su capacidad para biotransformar tanto OTA como T-2 en los estudios de acoplamiento molecular, por su nula disponibilidad en el mercado, fue imposible desarrollar los análisis *in vitro*.

Cuantificación residual

OTA

La cuantificación de OTA se realizó mediante HPLC-FL (por sus siglas en inglés, High-Performance Liquid Chromatography coupled with a Fluorimetric Detector), fase reversa, en un sistema HPLC (Agilent Technology 1100) acoplado a un detector de fluorescencia (Perkin Elmer LS50B) con una longitud de excitación de onda de 345 nm y una longitud de emisión de onda de 455 nm. Se utilizó una columna Discovery C18 (Supelco; 5 μ m; 250 x 4.6 mm, EUA) a una temperatura de 25 °C. La fase móvil fue de acetonitrilo: ácido fosfórico 0.25 N a una proporción de 50:50 V/V. La velocidad de flujo se ajustó a 1 ml/min. Los datos fueron recopilados con el software FL Winlab® (versión 2.00; Perkin-Elmer Corporation).

Los metabolitos finales se analizaron con HPLC-ESI-TOF-MS (por sus siglas en inglés, High Pressure Liquid Chromatography-Electrospray-Time of Flight-Mass Spectrometry) fase reversa, en modo iones positivos, usando un sistema HPLC (Agilent 1260 Infinity) equipado con una columna C-18 (ZORBAX Eclipse Plus, 1.8 μm , 2.1 x 10 mm, EUA) a una temperatura de 25 °C. La fase móvil fue de agua; ácido fórmico 1 % y acetonitrilo. La velocidad de flujo se ajustó a 0.15 ml/min. El gradiente inició con un 80 % de A y 20 % de B. Con un volumen de inyección de 30 μl . El HPLC se acopló a un TOF/MS (Agilent 66230B) con interfase electrospray (Solfrizzo et al., 1998). La temperatura del gas a 350 °C, el flujo del gas 6 L/min y la presión del nebulizador 50 psig, el fragmentor 105 V, skimmer 60 V y Oct RF 750 V, voltaje del capilar 4000 V. Los datos se analizaron con los softwares Mass Hunter Data Acquisition® para series 6200 (versión 5.01.5125; Aligent Technologies, 2017) y Qualitative Analysis® (versión 6.0.633.10; Aligent Technologies, 2017).

T-2

La cuantificación de T-2 se llevó a cabo mediante HPLC-ESI-TOF-MS fase reversa, en modo iones positivos, utilizando un sistema HPLC (Agilent 1260; Infinity) equipado con una columna C18 (RRHD; Eclipse Plus, 1.8 μm , 2.1 x 100 mm; Agilent Technologies, EUA), a una temperatura de 25 °C. La fase móvil contenía acetato de amonio 10 mM (A) y metanol grado HPLC (B). El gradiente inició con un 80 % de A y 20 % de B. La velocidad de flujo se ajustó a 0.15 mL/min y 40 μl para el volumen de inyección de la muestra. El HPLC se acopló a un TOF/MS (Agilent 66230B) con interfase electrospray. La temperatura del gas a 350 °C, el flujo del gas 6 L/min y la presión del nebulizador 50 psig, el fragmentor 105 V, skimmer 60 V y Oct RF 750 V, voltaje del capilar 4000 V. Los datos se analizaron con los softwares Mass Hunter Data Acquisition® para series 6200 (versión 5.01.5125; Aligent Technologies, EUA) y Qualitative Analysis® (versión 6.0.633.10; Aligent Technologies, 2017).

Análisis de datos

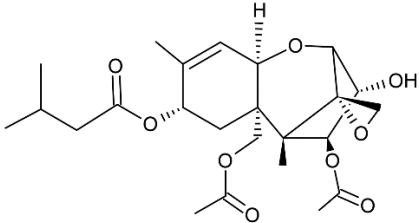
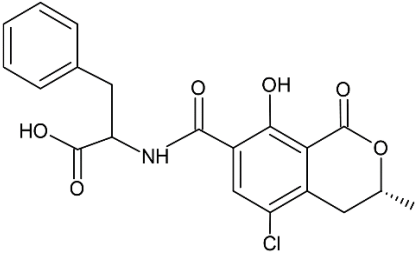
Para determinar la existencia de diferencias significativas en la concentración (ng) de micotoxina (OTA o T-2) entre el control y los tubos experimentales a diferentes condiciones de *pH*, se realizó un análisis ANOVA de una vía seguido de las pruebas post hoc de Sidak, en el caso de las muestras con OTA. Un valor de $P < 0.05$ se consideró significativo. Los análisis y las figuras se elaboraron con Prism8® (versión 8.4.0 para Mac OS; GraphPad Software, inc., La Jolla, California, EUA).

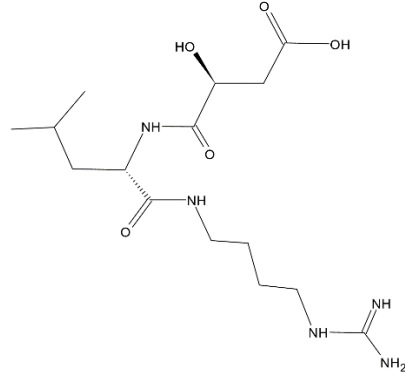
RESULTADOS

Estudios de acoplamiento molecular

Los modelos de Ramachandran de las enzimas estudiadas, bromelina, lipasa y endometalopeptidasa, no mostraron residuos en la región atípica (Apéndice 1). Los resultados del acoplamiento molecular ciego mostraron que las enzimas estudiadas no contienen regiones alostéricas o sitios de unión diferentes a los reportados en estudios anteriores (Tabla 1). Los sitios de unión al sustrato y sitios activos fueron los más estables para el acoplamiento de la OTA y T-2. Ambas toxinas mostraron una mayor afinidad en comparación a los ligandos de referencia. En cuanto al acoplamiento molecular dirigido, las poses que adoptaron las micotoxinas en el sitio activo de las enzimas fueron similares a las de los ligandos de referencia.

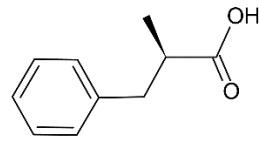
Tabla 1. Estructura química de las micotoxinas y ligandos de referencia.

ID	Nombre	Estructura 2D	Referencia
T-2	Toxina T-2 4 β ,15-diacetoxi-3 α -hidroxi-8 α -(3-metilbutiriloxi)-12,13-epoxitricotec-9-eno,12,13-epoxitricoc-9-eno-3,4,8,15-tetrol-4,15-diacetato-8-isovalerato		Pernica, M. <i>et al.</i> 2022
OTA	Ocratoxina A N-[(3R)- (5-cloro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-7-isocromanil) carbonil]-L-fenilalanina		Zhu, L. <i>et al.</i> 2021
E64	N-[N-[1-hidroxicarboxietil-carbonil] leucilamino-butyl]-guanidina		Azarkan, M. <i>et al.</i> 2020



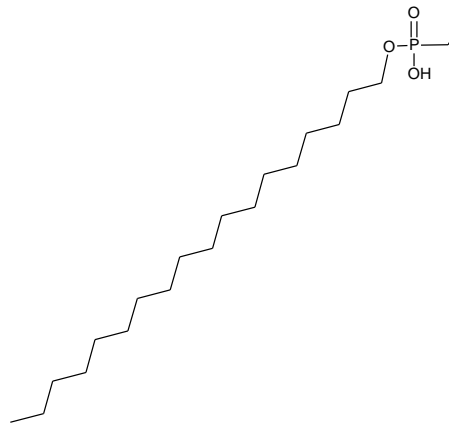
DB07673 (2S)-2-Metil-3-ácido fenilpropanoico

NCBI 2022



4S7 1-{3-[(R)-hidroxi(octadeciloxi)fosforil]propil} triaza-1,2-dien-2-io

Aschauer, P. et al., 2016



Cisteín-proteasa de *Ananas comosus*

Bromelina-OTA

En los estudios de acoplamiento molecular, la OTA registró valores de energía libre (ΔG) más negativos con el sitio activo de la bromelina en comparación del ligando de referencia (E64; Tabla 2). Los valores teóricos de la constante de inhibición (K_i) indicaron que la afinidad de OTA es aproximadamente 7 veces mayor por la enzima que el ligando de referencia y 1.3 veces que T-2 (Tabla 2).

Tabla 2. Energía libre (ΔG) y afinidad (K_i) de los complejos proteína-ligando, analizados con diferentes softwares.

Proteína	Ligando	Autodock	Swiss	Autodock 4.2.6	
		Vina*	Dock*	Energía libre	Ki (μ M)
		Energía libre (kcal/mol)	Energía libre (kcal/mol)	Energía libre (kcal/mol)	
Cisteín-proteasa de <i>Ananas comosus</i>	OTA	-5.94	-7.46	-5.63	74.14
	T-2	-6.06	-8.14	-5.45	101.78
	E64	-6.43	-7.76	-4.44	553.81
Monoacilglicerol lipasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	OTA	-10.23	-10.12	-11.2	0.01
	T-2	-8.02	-6.67	-8.95	0.27
	4S7	-6.89	-9.90	-7.00	7.43
Endometalopeptidasa neutra de <i>Bacillus subtilis</i>	OTA	-7.57	-8.56	-5.94	44.05
	T-2	-6.45	-6.86	-6.21	28.06
	DB07673	-5.23	-9.35	-3.82	1.59

Las interacciones de la OTA con el sitio activo están mediadas por puentes de hidrógeno, enlaces alifáticos y tipo π - π en forma de T (Tabla 3).

Tabla 3. Principales interacciones de los complejos proteína-ligando.

Proteína	Ligando	Residuos
Cisteín-proteasa de <i>Ananas comosus</i>	T-2	Enlace H: Gln20, Cys26, Asn157.
	OTA	Enlace H: Gln24, Cys26, Gly66. Alifático: Ala136. Π-π en forma de T: His158, Trp181.
	E64	Enlace H: Gln20, Cys26, His158, Gly66, Lys64. Alifático: Ala159, Ala133, Trp67.
Monoacilglicerol lipasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	T-2	Enlace H: Asn254, Thr182, Lys162, Asp185. Alifático: Met159, Ile215, Ile253. Enlace H: Ser123, Met124, Lys162, Phe49 carbonilo.
	OTA	Alifático: Ile253, Ile189. Π-σ: Ile215. Π-sulfuro: Met219 π-π en forma de T: His281.
	4S7	Enlace H: Ser123, Met124, Phe49 carbonilo. Alifático: Phe218, Leu151, Met159, Ile166, Met219, Ile215, Leu154, Pro169.
Endometalopeptidasa neutra de <i>Bacillus subtilis</i>	T-2	Enlace H: His453, Gln377. Alifático: Ile366. Π-σ: His369, His373.
	OTA	Enlace H: Asn339, His453. Alifático: Ile340, Leu360, Ile366.
	DB07673	Atracción de carga: Arg425, His453, ion Zn. Π-σ: Ala341.

El grupo amida de la OTA está orientado hacia los residuos involucrados en la actividad catalítica: Cys26, Gln20, His158 y Asn179 (Figura 2).

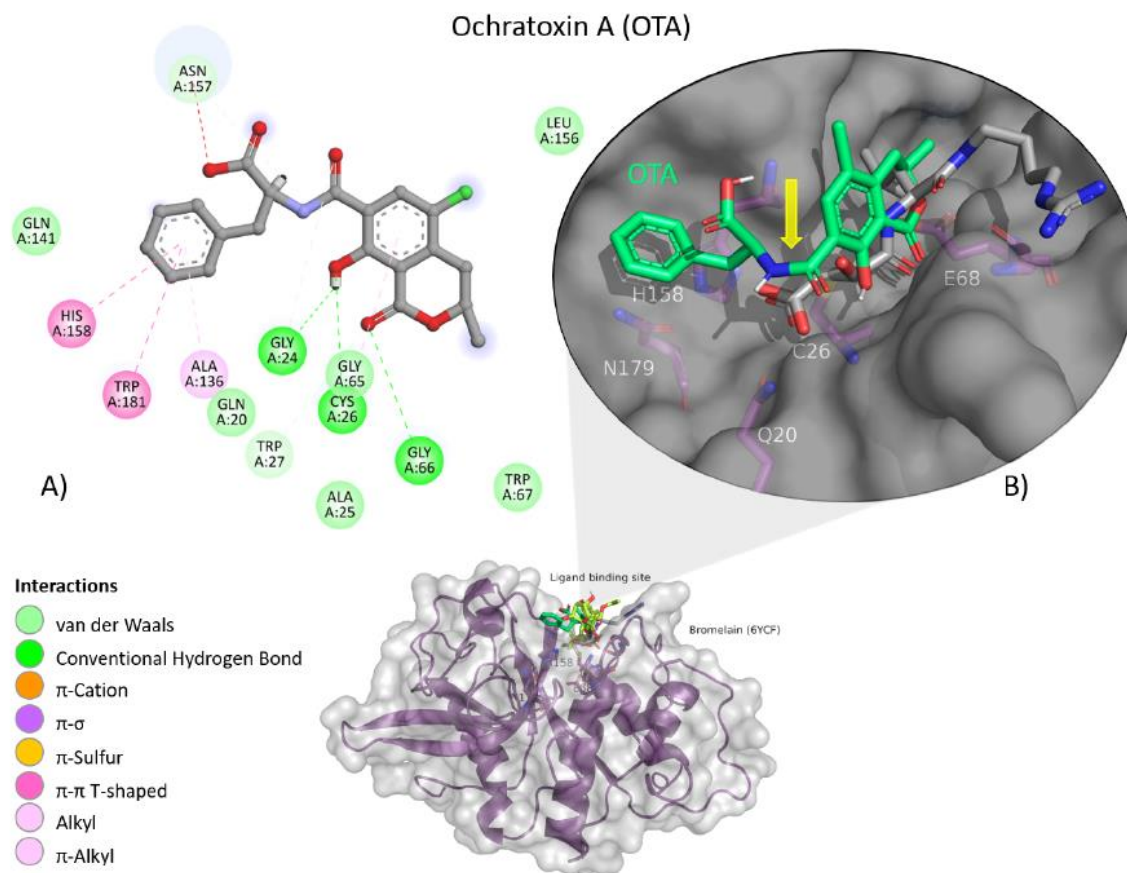


Figura 2. Interacciones entre la bromelina y OTA. A) Vista detallada de las interacciones entre los residuos en el sitio de unión de la bromelina y la OTA. B) Vista panorámica del ligando de referencia (E64) y la OTA en el sitio de unión de la bromelina. Comparación de las poses entre el ligando de referencia y la micotoxina. La flecha amarilla indica la cercanía entre la triada catalítica de la bromelina y el enlace amida de la OTA, lo que sugiere el rompimiento de este último.

El mecanismo de detoxificación de OTA por medio de la bromelina inicia con la acción catalítica de Cys26, atacando el grupo carbonilo del grupo amida en la micotoxina, dando como resultado a la fenilalanina y la OT α como productos finales (Figura 3).

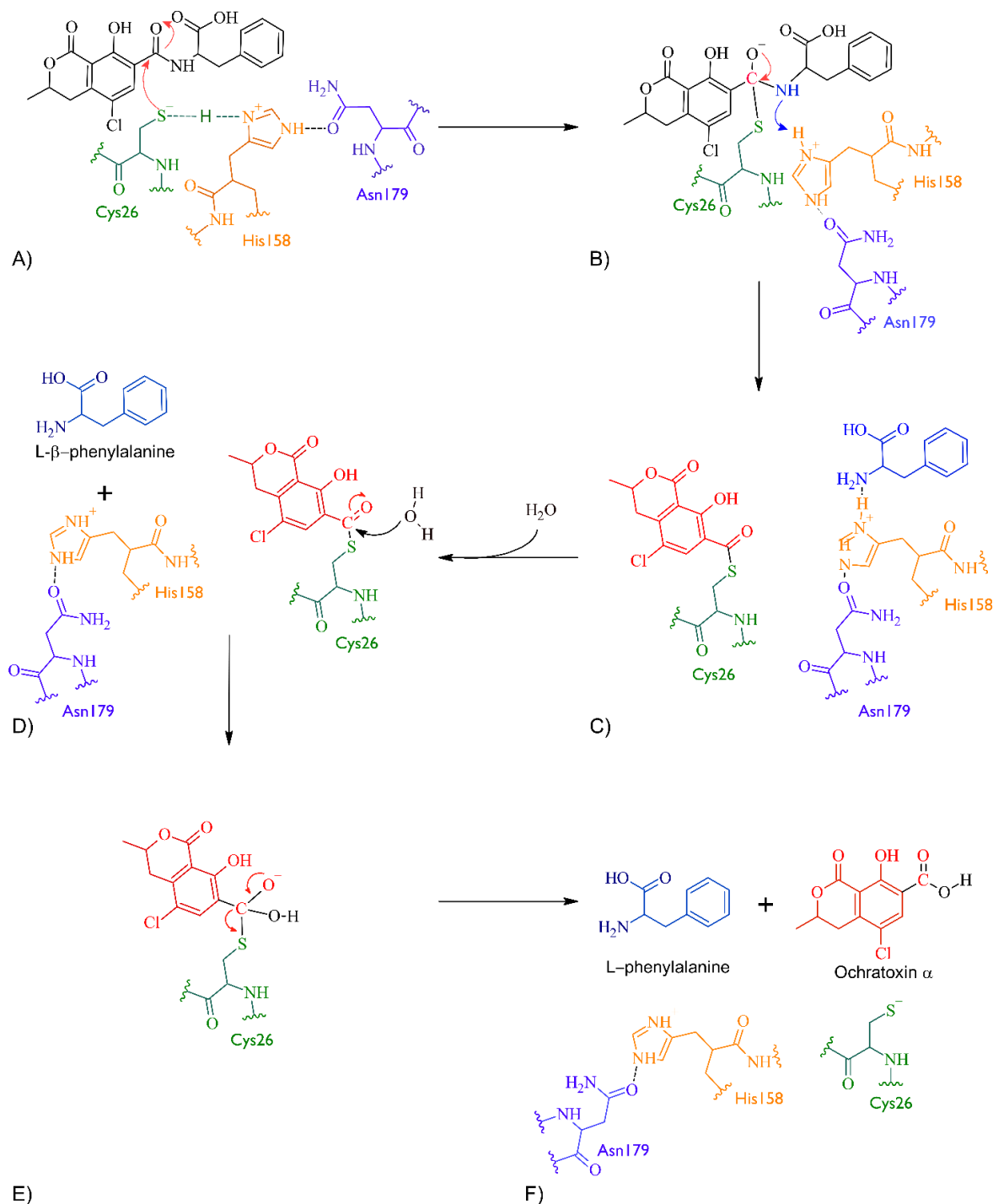


Figura 3. Mecanismo de detoxificación de la OTA por acción de la bromelina. A) el fragmento Cys26 ataca el grupo carbonilo del grupo amida en la micotoxina, este fragmento permanece en forma de tiol y la cadena imidazol de His158 se protona para formar un par iónico; B) Se forma un intermediario entre el fragmento Cys26 de la bromelina y la OTA, esto restaura el par electrónico, y se restablece el doble enlace del carbonilo

y el oxígeno; C) Se forma un intermediario entre Cys26 y el fragmento de la OTA que contiene el carbonilo, y uno más entre His158 y el fragmento de OTA que contiene el grupo amino; D) Se libera la fenilalanina y el fragmento His158 es restablecido. Una molécula de agua es utilizada para hidrolizar el intermediario entre Cys26 y el fragmento que contiene el carbonilo de la OTA. El oxígeno en la molécula de agua ataca al carbonilo y deslocaliza un par de electrones hacía el oxígeno del grupo funcional; E) El doble enlace del carbonilo es restaurado, y se rompe el enlace creado entre Cys26 y el carbonilo del fragmento de OTA. F) Los residuos en el sitio activo de la bromelina se restablecen, se libera la fenilalanina y la OT α como productos finales.

Los experimentos *in vitro* mostraron diferencias significativas (ANOVA $p < 0.0001$; $F = 16.87$). La prueba de Sidak encontró que la bromelaina redujo la concentración de OTA en 7.64 % a un pH de 4.6 ($p < 0.0001$; $t = 6.496$; $GL = 12$; Figura 4). Sin embargo, a pesar de que el ion de OTA se detectó (404.08 m/z; Figura 5) no se encontró el de OT α (212.85 m/z; Figura 5), el producto final sugerido en el mecanismo de detoxificación.

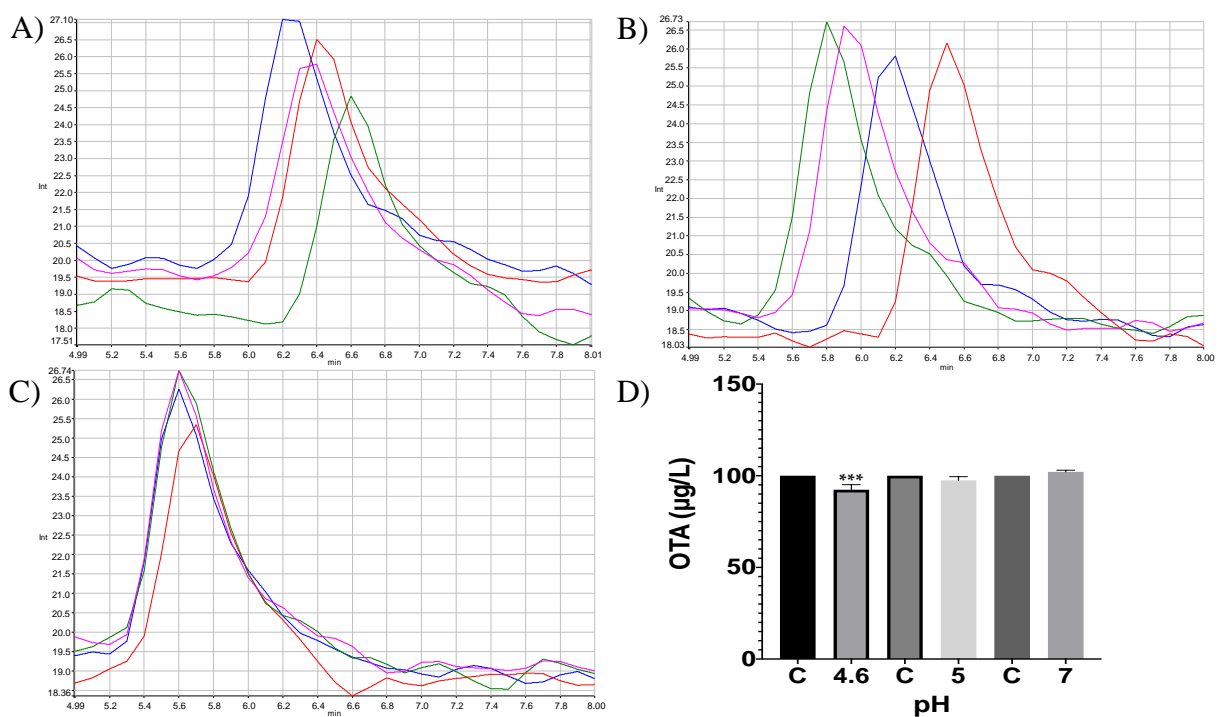


Figura 4. Cromatogramas HPLC-fluorescencia de los experimentos *in vitro* de bromelina-OTA. Se muestran diferencias en la capacidad de la bromelina para hidrolizar OTA a diferentes condiciones de pH , incubada a 41 °C durante 1 h. A) pH 4.6; B). pH 5; C) pH 7; D) El gráfico de barras muestra la degradación de OTA $\mu g/L$ en un 7.64 % a pH 4.6. En todos los cromatogramas, el control está representado con color rojo y el grupo experimental con sus repeticiones en color azul, verde y rosa. (***) $P < 0.0001$).

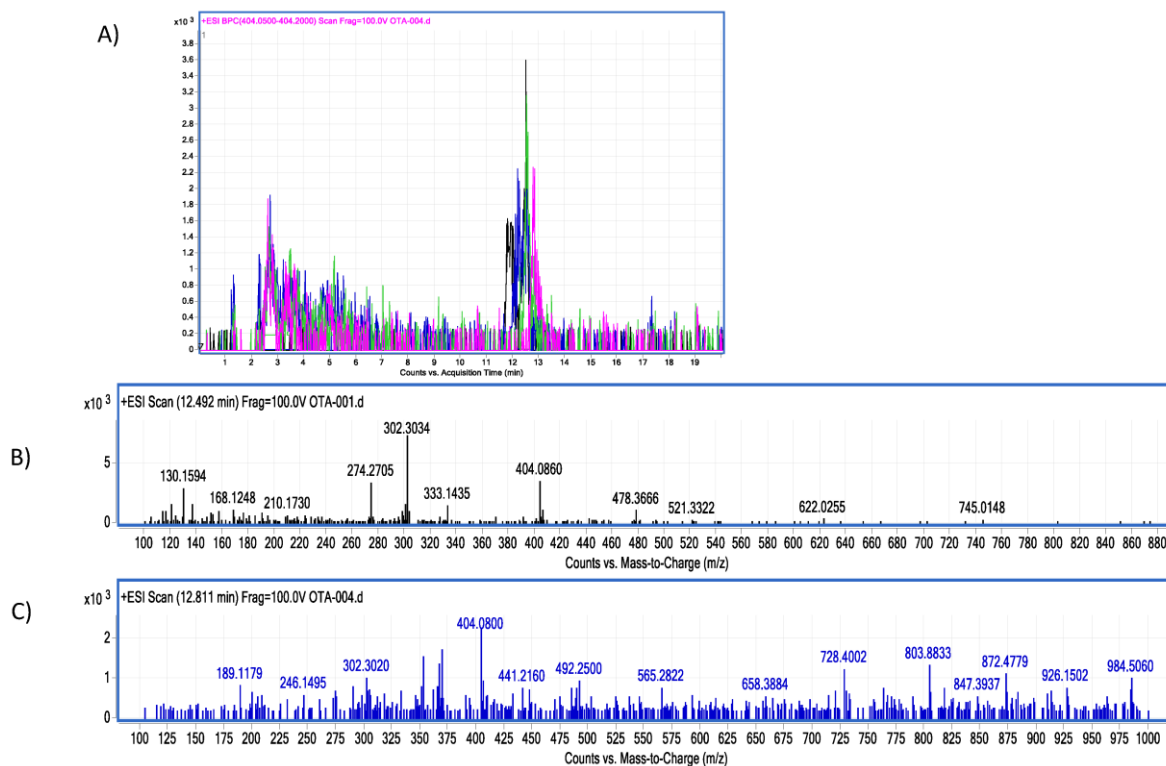


Figura 5. Cromatogramas HPLC-TOF-MS de bromelina-OTA. A) Grupo control de OTA (negro), experimental y réplicas (azul, verde y rosa). B) ion molecular de OTA en tubos control (M+1) a 404.08 (m/z); C) ion molecular de OTA en tubos experimentales (M+1) a 404.08 m/z. El ion molecular (M+1) de OT α no fue detectado (fragmentación a 212.85 m/z).

Bromelina-T2

En los estudios de acoplamiento molecular, T-2 mostró una energía libre más negativa y su afinidad (K_i) por la bromelina fue aproximadamente 5.44 veces mayor comparada con la del ligando de referencia (E64; Tabla 2). T-2 presentó interacciones mediadas por puentes de hidrogeno con los residuos del sitio de unión del ligando (Tabla 3). Los grupos éster de T-2 se encontraron situados cerca de los residuos de la tríada catalítica (Figura 6). Aunque los grupos éster de T-2 se localizaron cerca de los residuos de bromelina involucrados en la actividad catalítica, debido la naturaleza de la reacción llevada a cabo por esta enzima, el anillo epóxido y los grupos éster no pueden ser hidrolizados. Sin embargo, dada la alta afinidad de T-2 ($K_i = 101.78 \mu\text{M}$) y su alta probabilidad para formar enlaces con la bromelina ($\Delta G = -5.45 \text{ kcal/mol}$) es posible que pudiera actuar como un inhibidor competitivo.

T-2 toxin (T-2)

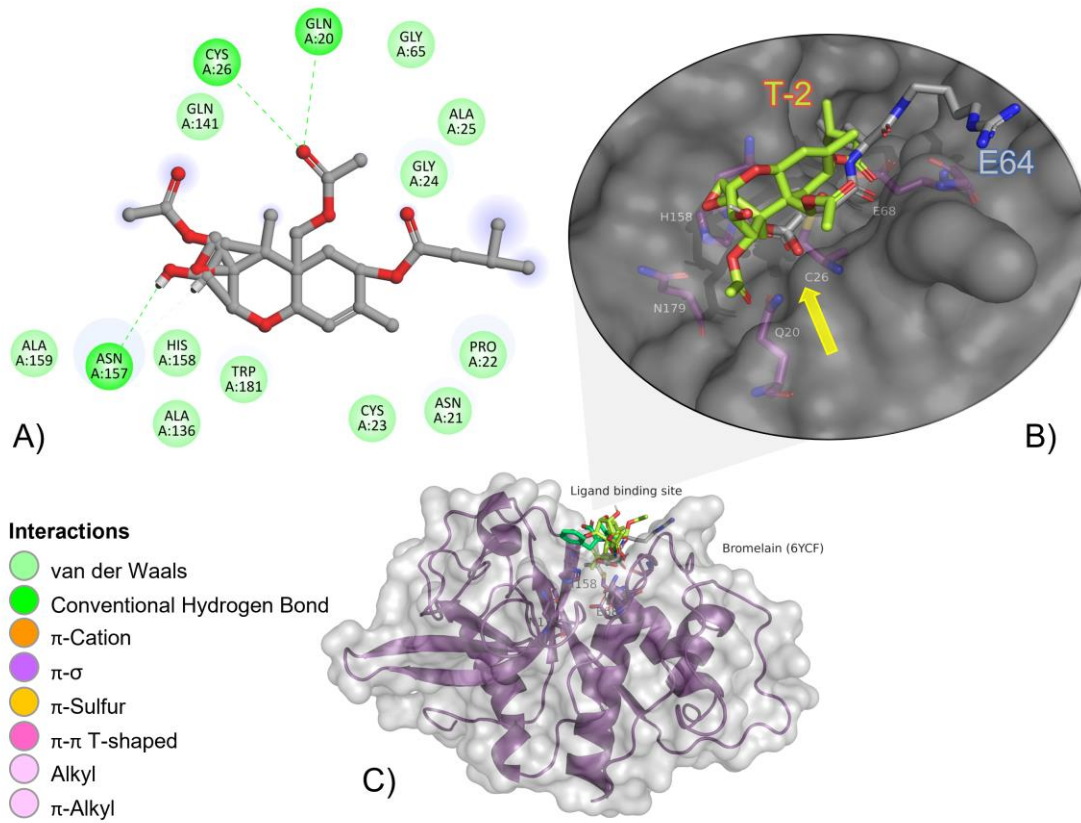


Figura 6. Interacciones entre la bromelina y T-2. A) Vista detallada de las interacciones entre los residuos en el sitio de unión de la bromelina y T-2. B) Vista panorámica del ligando de referencia (E64) y T-2 en el sitio de unión de la bromelina. Comparación de las poses entre el ligando de referencia y la micotoxina. La flecha amarilla indica la cercanía entre la triada catalítica de la bromelina y T-2.

Monoacilglicerol lipasa de *Saccharomyces cerevisiae*

Monoacilglicerol lipasa-OTA

Los estudios de acoplamiento molecular mostraron que la OTA presentó la mayor energía libre de unión en el sitio activo de la lipasa, de entre todos los ligandos evaluados (Tabla 2). La afinidad de OTA fue 743 veces más alta en comparación al ligando de referencia (4S7) y 27 veces mayor en comparación con la T-2. Las interacciones de la OTA con los residuos de la lipasa están mediadas por puentes de hidrógeno, enlaces alifáticos, π - σ y π - π en forma de T (Tabla 3; Figura 7). El mecanismo de detoxificación inicia con la acción catalítica de Ser123 al éster del anillo de lactona de OTA, lo que resulta en la OTA con el anillo de lactona abierto (Figura 8).

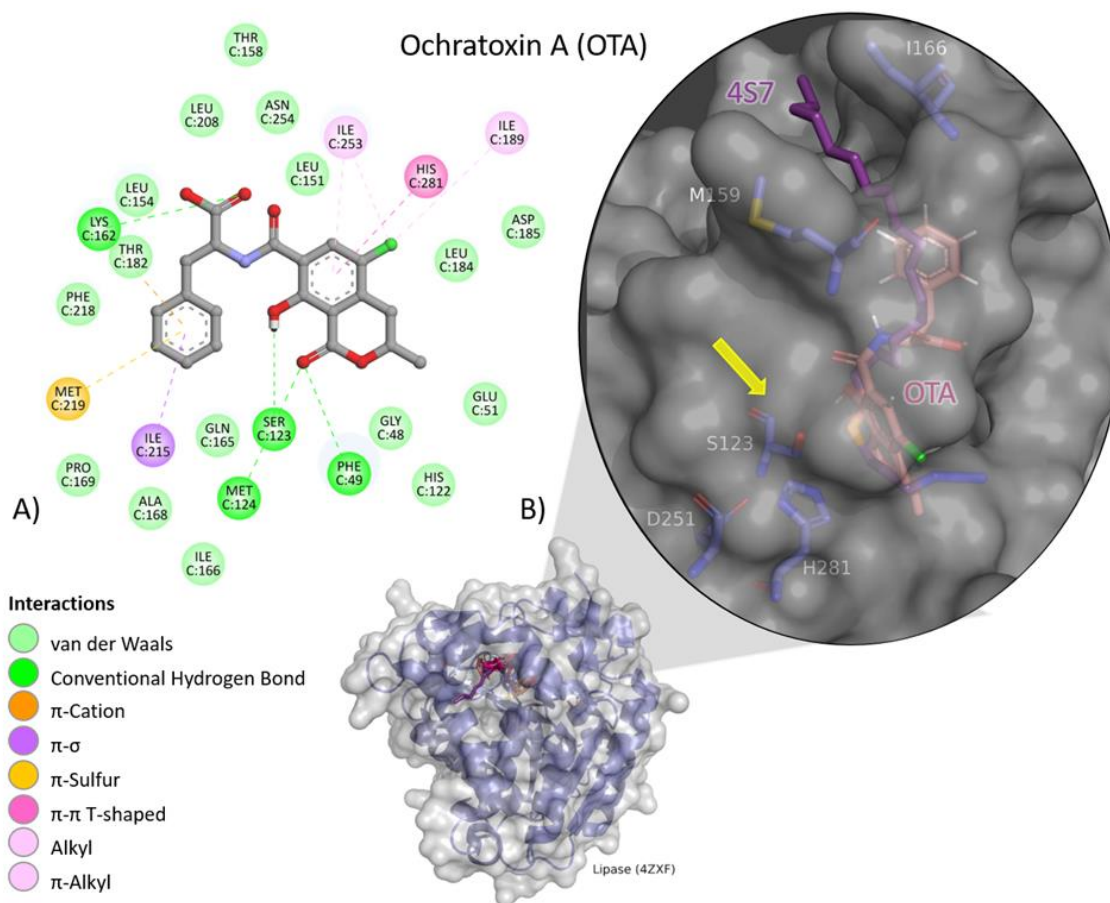


Figura 7. Interacciones entre la monoacilglicerol lipasa y OTA. A) Vista detallada de las interacciones entre los residuos en el sitio de unión de la monoacilglicerol lipasa y OTA. B) Vista panorámica del ligando de referencia (E64) y la OTA en el sitio de unión de la monoacilglicerol lipasa. Comparación de las poses entre el ligando de referencia y la micotoxina. La flecha amarilla indica la proximidad de la tríada catalítica de la monoacilglicerol lipasa y el éster del anillo de lactona de la OTA, sugiriendo la ruptura de este último.

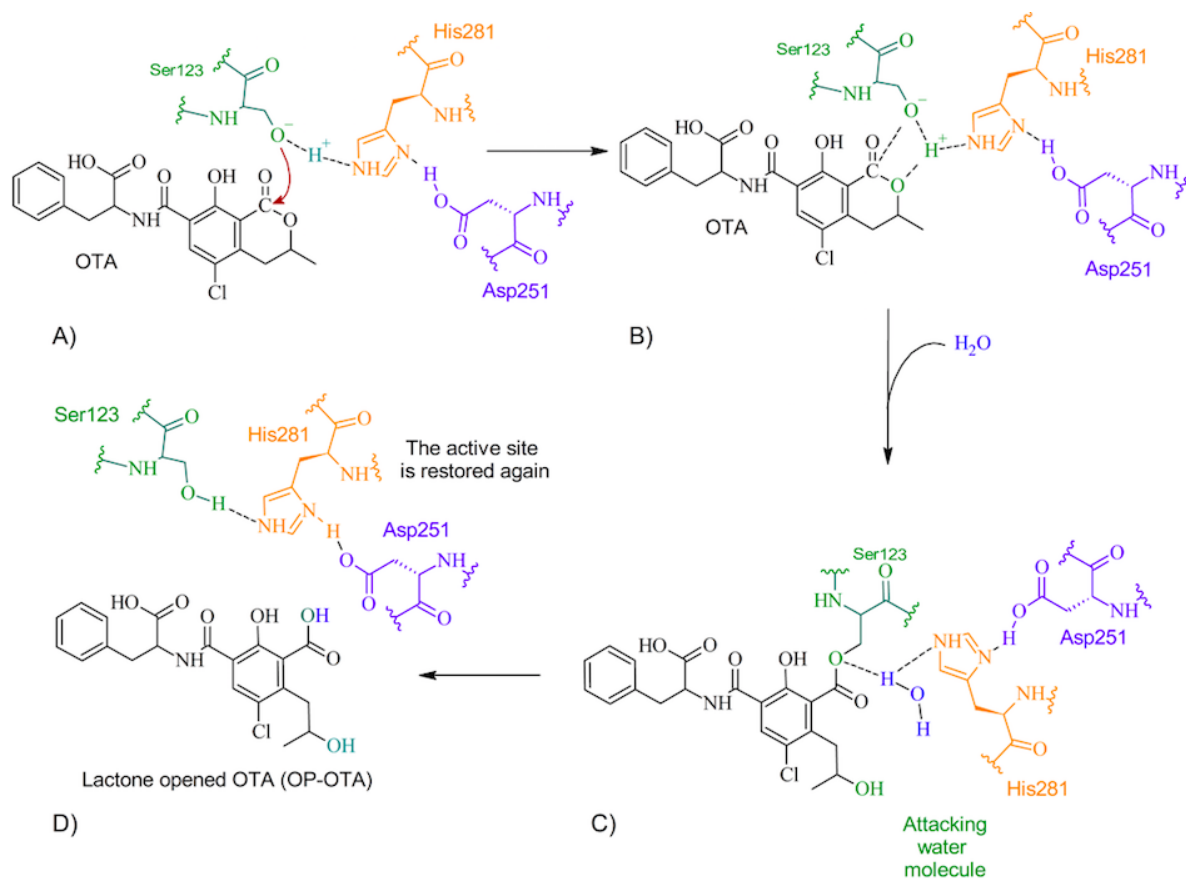


Figura 8. Mecanismo de detoxificación de la OTA por acción de la monoacilglicerol lipasa. A) El grupo hidroxilo presente en Ser123 ataca al éster del anillo de lactona de la OTA; B) Se forma un intermediario entre Ser123 y OTA, que interacciona entre His281 y el grupo hidroxilo del anillo lactona de OTA, lo que causa su rompimiento y se forma un nuevo intermediario Ser123-OTA; C) Se consume una molécula de agua para hidrolizar el intermediario Ser123-OTA; D) El sitio activo de la lipasa se restablece, se obtiene como producto final a OTA con el anillo de lactona abierto.

Monoacilglicerol lipasa-T2

En los estudios de acoplamiento molecular, T-2 mostró una alta afinidad por los residuos de la tríada catalítica en el sitio activo de la lipasa y una mayor energía libre (ΔG) en comparación con el ligando de referencia (4S7; Tabla 2). La afinidad (K_i) de T-2 por la lipasa fue aproximadamente 26 veces mayor en comparación con la mostrada por el sustrato de referencia. Las interacciones de T-2 con los residuos de la lipasa están mediadas por puentes de hidrógeno e interacciones alifáticas (Tabla 3). Dos de los grupos éster de la estructura de T-2 se orientaron hacia la tríada catalítica de la lipasa: Ser123, His281 y Asp 251, interactuando también con Met159 y Ile166, residuos de la enzima involucrados en el mecanismo de anclaje (Figura 9). El mecanismo de detoxificación de la toxina se desencadena con la acción catalítica de Ser123 en uno de los grupos éster de la micotoxina, dando lugar a HT-2 y ácido acético como productos finales (Figura 10).

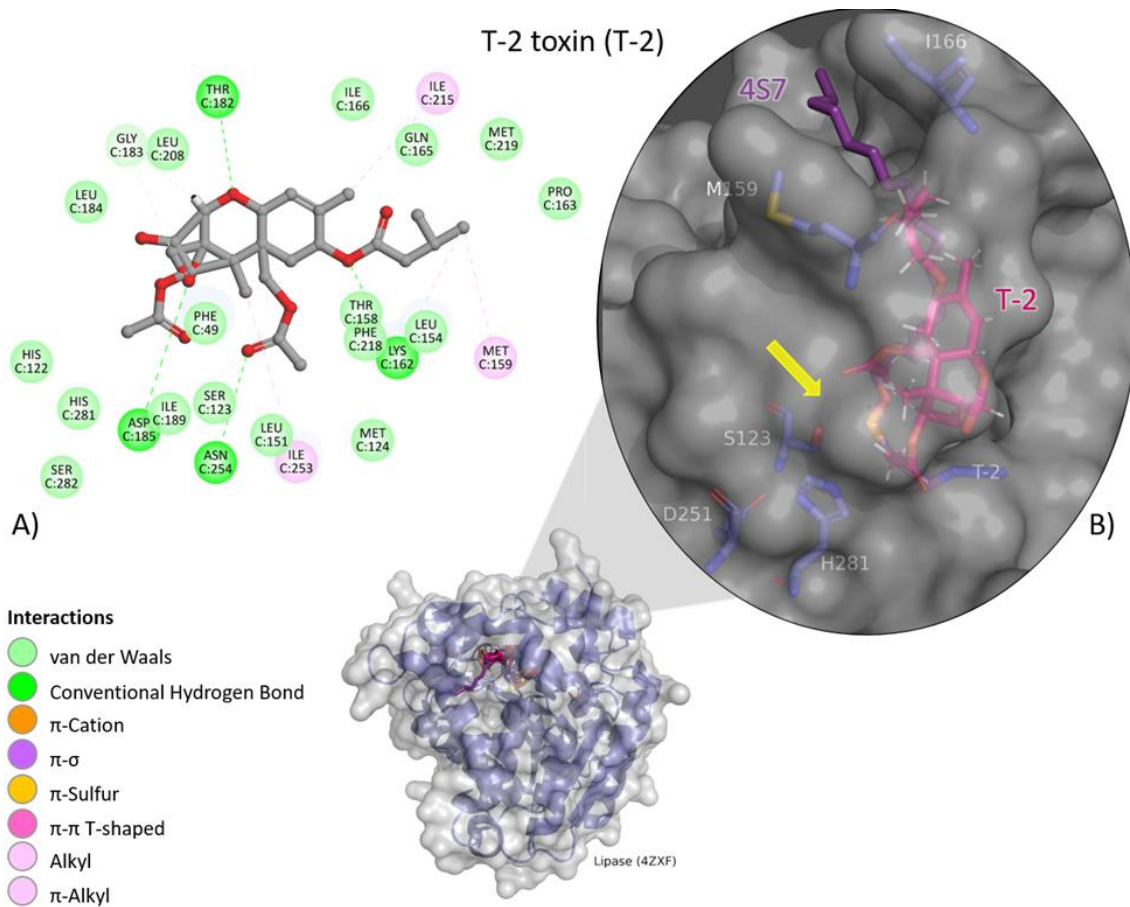


Figura 9. Interacciones entre la monoacilglicerol lipasa y T-2. A) Vista detallada de las interacciones entre los diferentes residuos de aminoácidos en el sitio de unión de la lipasa y T-2. B) Vista panorámica del ligando de referencia (4S7) y T-2 en el sitio de unión de la lipasa. Comparación de las poses entre el ligando de referencia y la micotoxina. La flecha amarilla indica la proximidad de la tríada catalítica de la monoacilglicerol lipasa y el éster de T-2, sugiriendo la ruptura de este último.

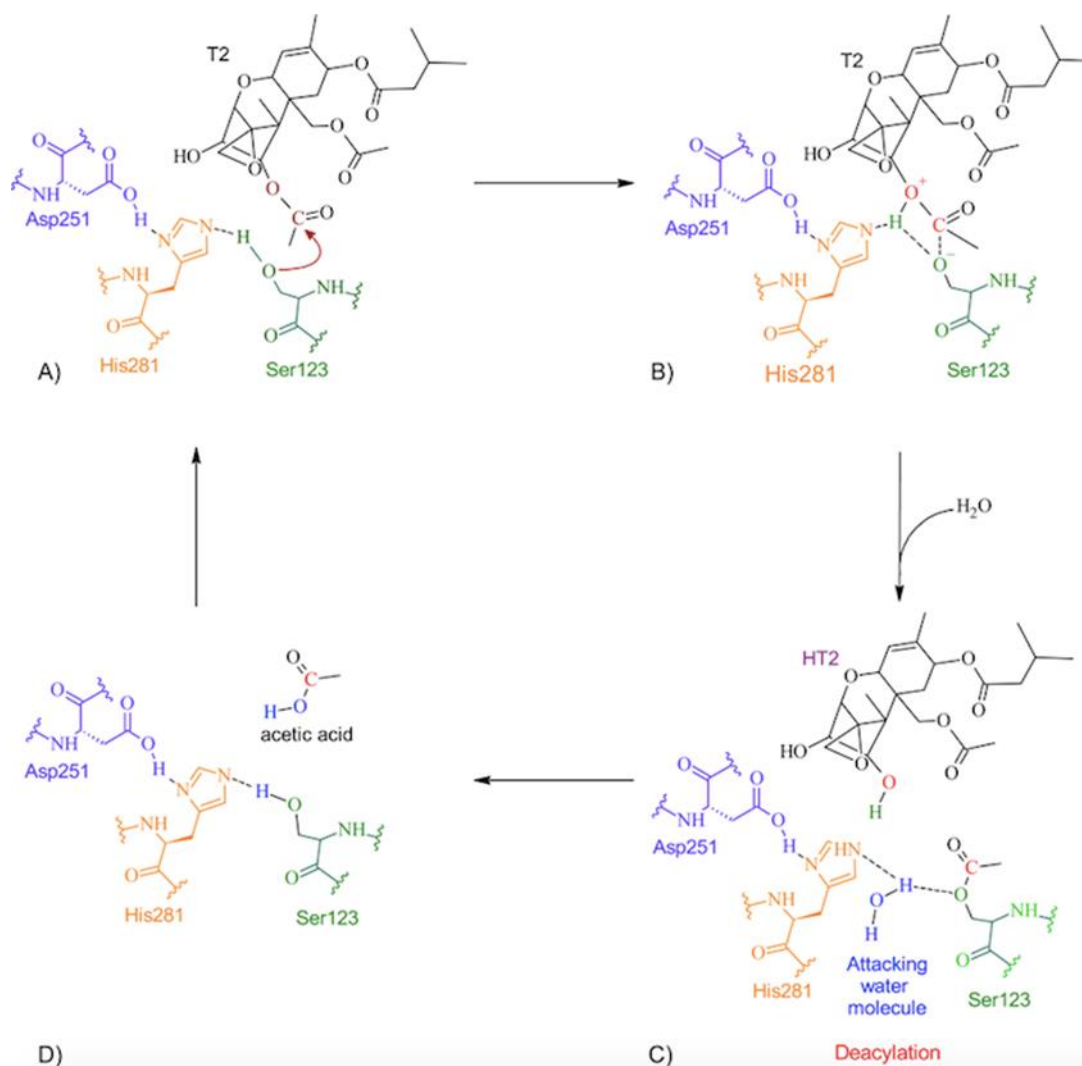


Figura 10. Mecanismo de detoxificación de T-2 por acción de la monoacilglicerol lipasa. A) El grupo hidroxilo del fragmento Ser123 ataca al grupo éster de T-2; B) Se forma un intermediario entre el carbonilo de T-2 y el grupo hidroxilo de Ser123, y otro nuevo intermediario se forma entre el oxígeno del éster presente en T-2 y el fragmento His281 de la monoacilglicerol lipasa; C) El intermediario entre la His281 y T-2 es roto, liberando un fragmento de T-2. Se forma un intermediario entre Ser123 y el grupo acetilo. Se consume una molécula de agua para desacetilar al residuo Ser123; D) El sitio activo de la monoacilglicerol lipasa es restaurado, obteniendo como productos finales HT-2 y ácido acético.

Endometalopeptidasa neutra de *Bacillus subtilis*

Endometalopeptidasa-OTA

Los estudios de acoplamiento molecular demostraron que la OTA obtuvo la mayor energía libre (ΔG) en el sitio activo de la endometalopeptidasa neutra entre todos los ligandos evaluados (Tabla 2). Los valores de (K_i) indicaron que la afinidad con la endometalopeptidasa fue 27 veces menor al ligando de referencia (DB07673) y 1.5 veces menor comparado con T-2. La OTA mostró interacciones con la endometalopeptidasa por medio de enlaces de puentes de hidrógeno y alifáticos (Tabla 3; Figura 11). Su mecanismo de detoxificación inicia con la interacción entre el carbonilo de OTA y el zinc, obteniendo a la fenilalanina y $OT\alpha$ como productos finales (Figura 12).

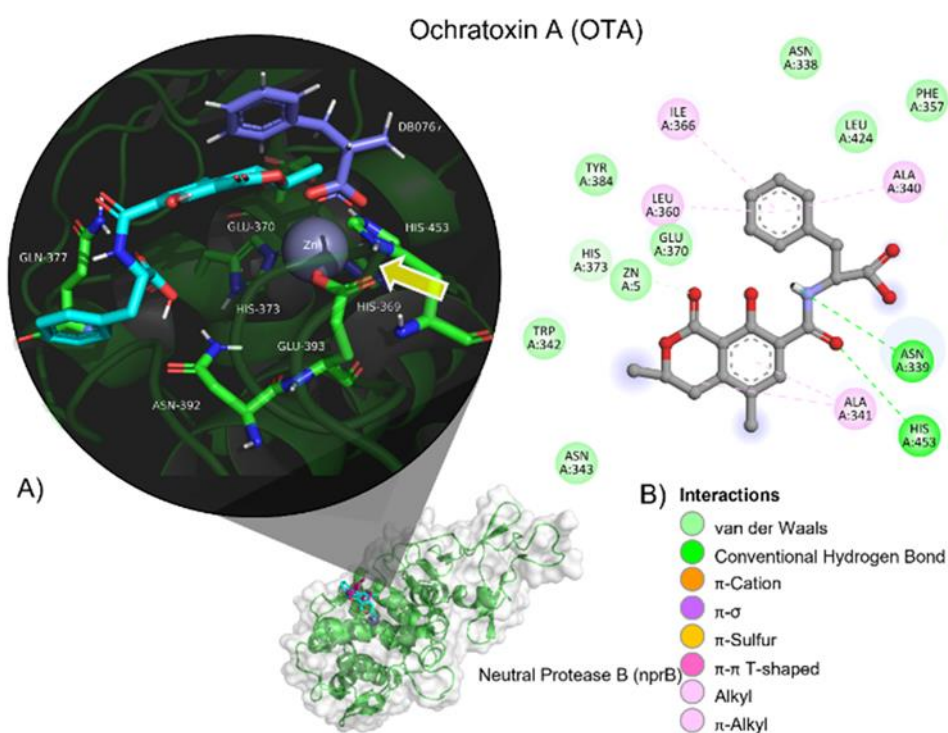


Figura 11. Interacciones entre la endometalopeptidasa neutra y OTA. A) Vista panorámica del ligando de referencia (DB07673) y la OTA en el sitio activo de la endometalopeptidasa neutra. La flecha amarilla indica la proximidad de la triada catalítica de la endometalopeptidasa neutra y el enlace amida de OTA, sugiriendo la ruptura de este último. B) Vista detallada de las interacciones entre los diferentes residuos de aminoácidos en el sitio de unión de la metaloproteína neutra y OTA.

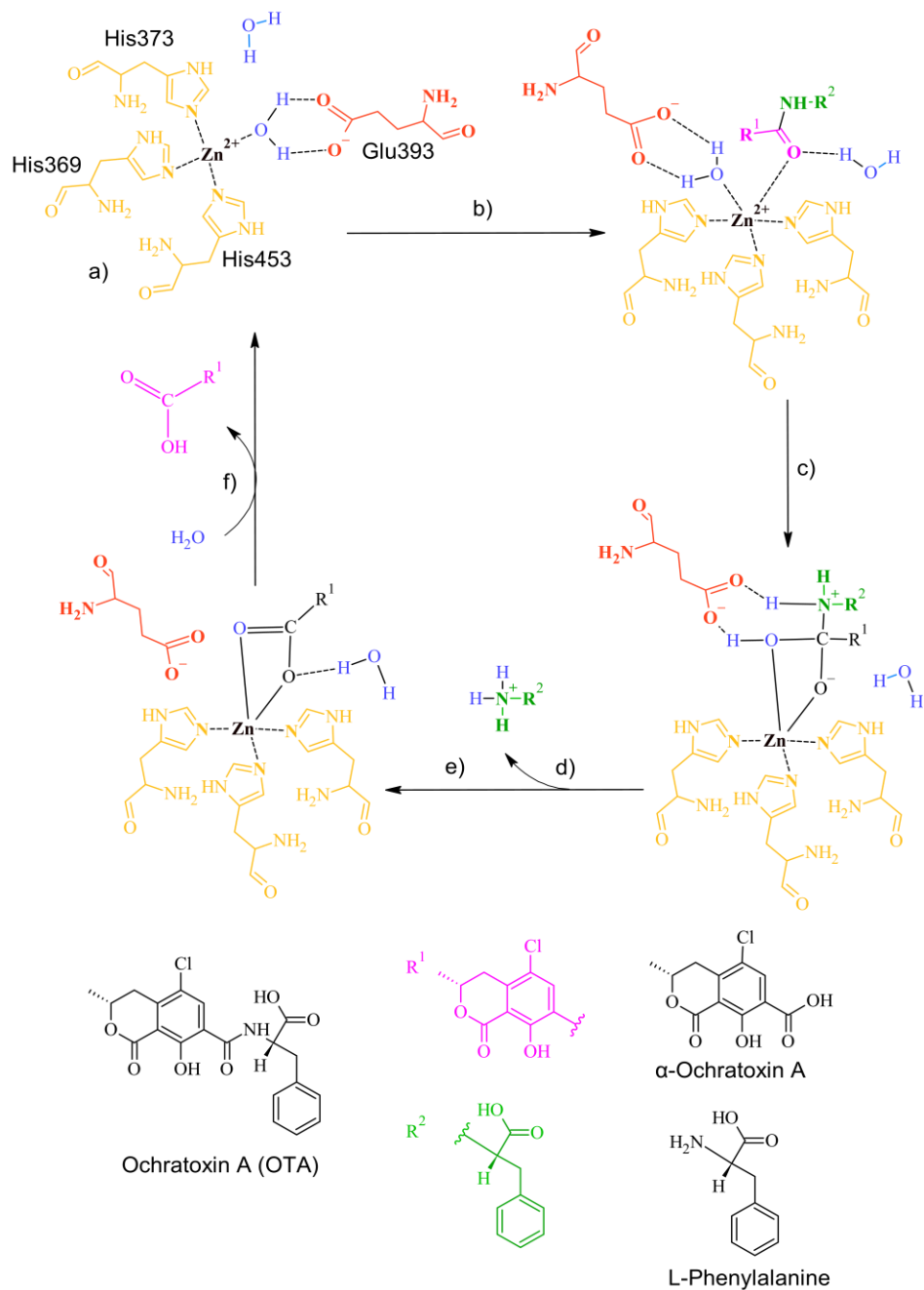


Figura 12. Mecanismo de detoxificación de la OTA por acción de la endometalo peptidasa neutra. A) Sitio de unión de la endometalo peptidasa neutra; B) El grupo carbonilo de OTA interactúa con el zinc del sitio activo de la endometalo peptidasa neutra, formando un complejo con una molécula de agua; C) se disuelve el complejo entre la molécula de agua y el oxígeno. Se forma un enlace covalente entre el oxígeno del carbonilo y el zinc del sitio activo, posteriormente se forma un complejo entre el oxígeno de la molécula de agua y el carbonilo de la OTA; D) Liberación del grupo amina; E) Se restablece el doble enlace entre el carbonilo y el oxígeno en la OTA. Las interacciones entre el ácido glutámico y la OTA se rompen, y se forma un complejo entre la molécula de agua y el oxígeno del carbonilo de OTA. F) Se libera el grupo carbonilo y se restablece el sitio activo con el ingreso de una molécula de agua.

Los experimentos *in vitro* mostraron diferencias en la capacidad de la endometalopeptidasa neutra para reducir la concentración de OTA a diferentes condiciones de *pH* (ANOVA $p < 0.0001$; $F=464$; Figura 13). Las pruebas post-hoc de comparaciones múltiples de Sidak, mostraron diferencias significativas entre el control y los tubos experimentales a todas las condiciones de *pH*: a *pH* de 4.6 redujo la concentración de OTA en 8.2 (%; $p < 0.0001$; $t=7.07$; $GL=12$); a *pH* de 5, en 14.44 (%; $p < 0.0001$; $t=12.47$; $GL=12$); a *pH* 7, en 45.26 (%; $p < 0.0001$; $t=39.08$; $GL=12$). El producto final fue identificado inequívocamente como OT α (Figura 14).

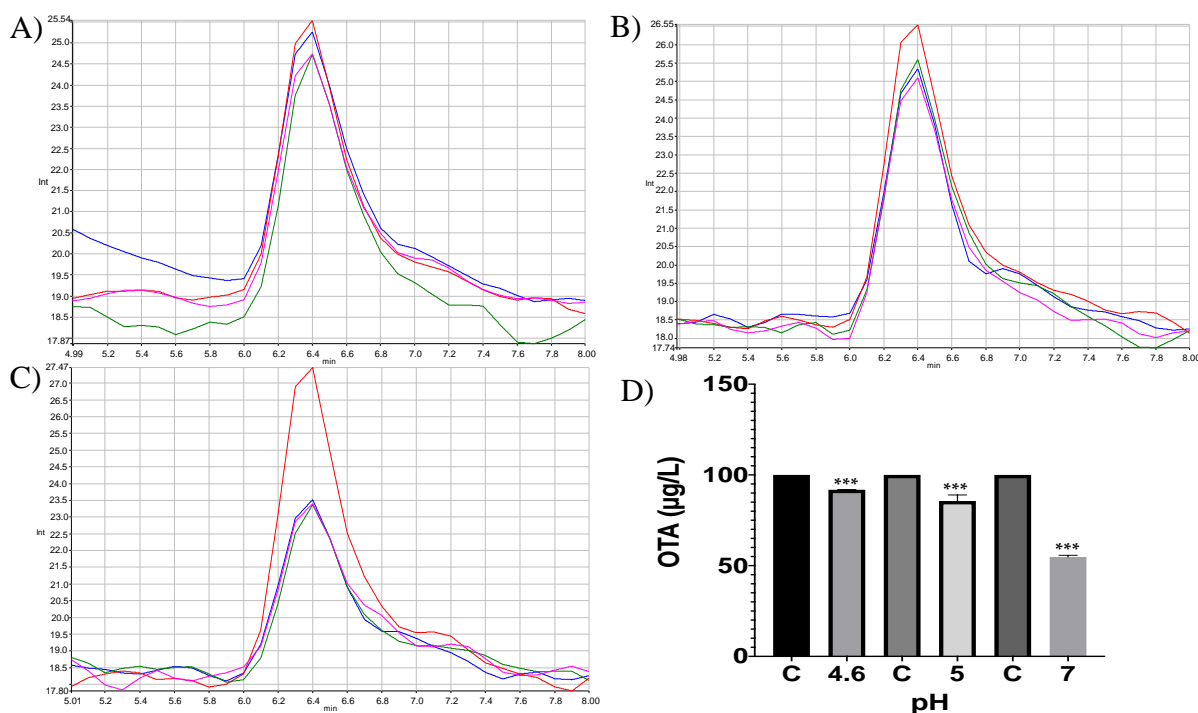


Figura 13. Cromatogramas HPLC-fluorescencia de los experimentos *in vitro* de endometalopeptidasa neutra-OTA. Se muestran diferencias en la capacidad de la endometalopeptidasa para degradar OTA a diferentes condiciones de *pH*, incubada a 41 °C durante 1 h. A) *pH* 4.6; B) *pH* 5; C) *pH* 7; D) Gráfico de barras mostrando la disminución en la concentración de OTA µg/L en 8.2, 14.44 y 45.26 % a un *pH* de 4.6, 5 y 7, respectivamente. En todos los cromatogramas el control está representado en rojo y experimentales en azul, verde y rosa. (***) $P < 0.0001$).

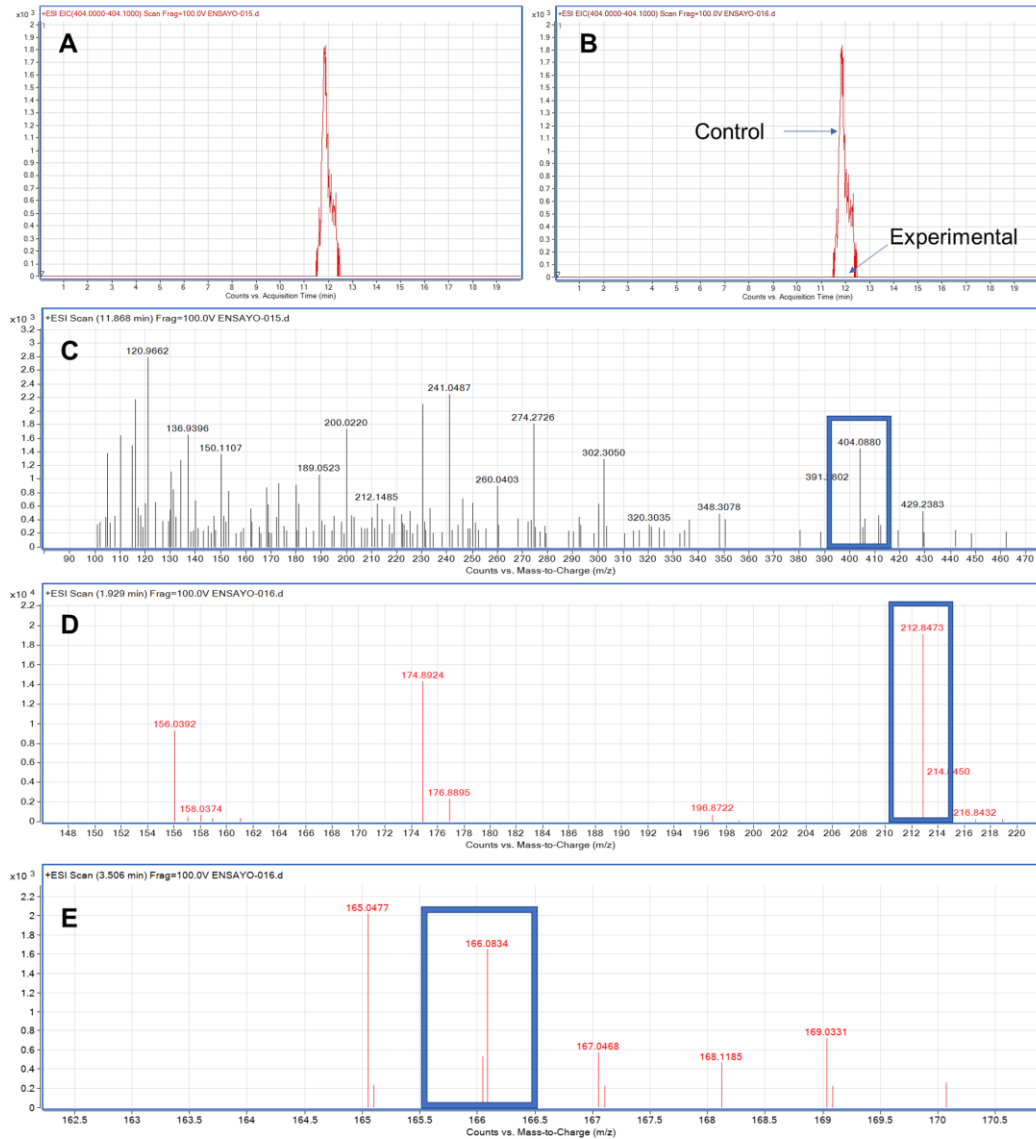


Figura 14. Cromatogramas HPLC-TOF-MS de endometalopeptidasa neutra-OTA. mostrando: A) pico control de OTA; B) El pico de OTA no está presente en los tubos experimentales (rojo = control; café = tubo experimental); C) Ion molecular de OTA en control (M+1) a 404.05 (m/z); D) Ion molecular (M+1) del producto de fragmentación más estable de OT α a 212.84 m/z en tubos experimentales; E) Ion molecular de fenilalanina (M+1) a 166.08 m/z en tubos experimentales.

Endometalopeptidasa-T2

Los estudios de acoplamiento molecular mostraron que T-2 presentó una mayor energía libre (ΔG) en comparación con la del ligando de referencia (DB07673; Tabla 2). La afinidad (K_i) de T-2 fue 1.5 veces mayor que la de la OTA y 17 veces menor comparada con el ligando de referencia (DB0763). Las interacciones entre la endometalopeptidasa y T-2 se dieron a través de puentes hidrógeno, alifáticos y π - σ (Tabla 3; Figura 15). Aunque los grupos éster de la toxina T-2 se localizaron cerca de los aminoácidos involucrados en la actividad catalítica, debido a la naturaleza de la reacción llevada a cabo por la endometalopeptidasa neutra, el anillo epóxido y los grupos éster no son hidrolizados.

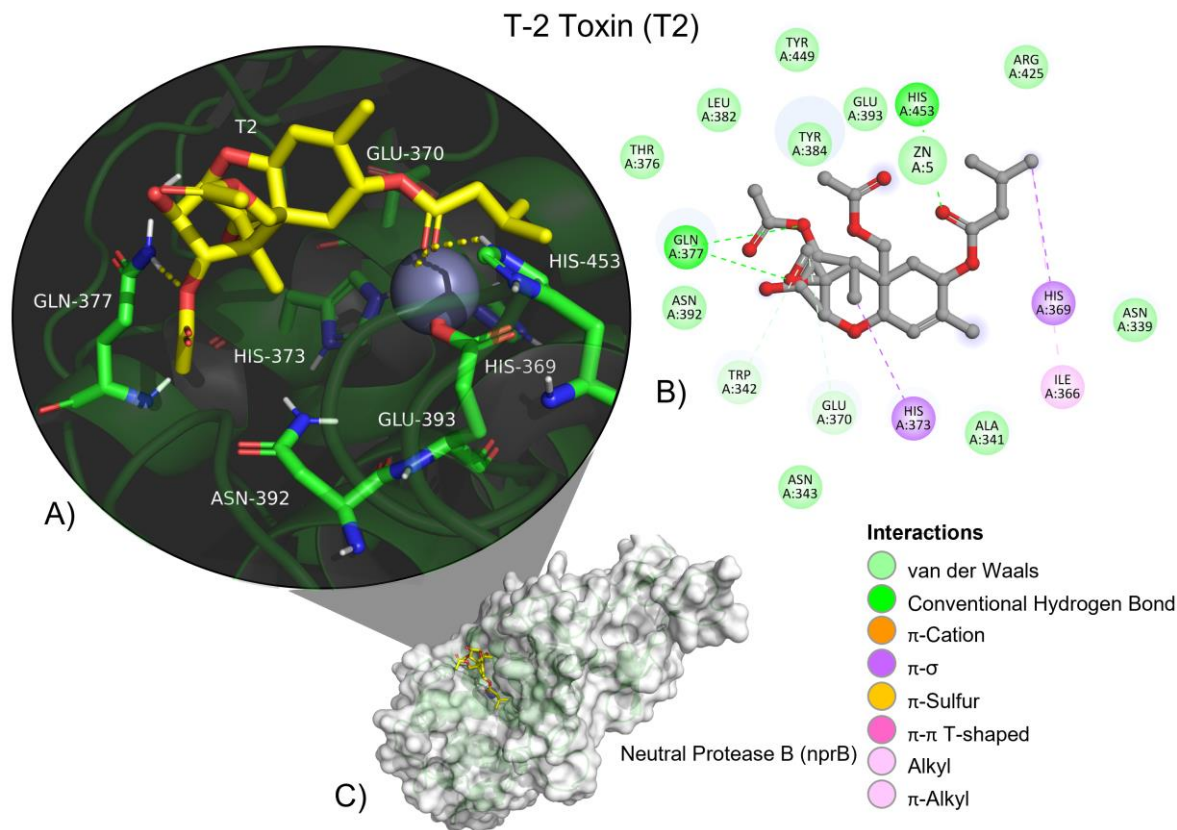


Figura 15. Interacciones entre la endometalopeptidasa neutra y T-2. A) Vista panorámica del ligando de referencia (DB07673) y T-2 en el sitio activo de la endometalopeptidasa neutra. La flecha amarilla indica la proximidad de la triada catalítica de la endometalopeptidasa neutra y T-2. B) Vista detallada de las interacciones entre los diferentes residuos de aminoácidos en el sitio de unión de la metaloproteinasina neutra y T-2.

DISCUSIÓN

La detoxificación biológica con el uso de enzimas provenientes de productos naturales o producidas por microorganismos es uno de los enfoques más prometedores para reducir o eliminar por completo la contaminación por micotoxinas de los alimentos (Nahle et al., 2022); por lo que resulta importante probar otras enzimas, especialmente las que son económicas, fáciles de extraer y eficientes. En este estudio se demostró por primera vez que: i) la bromelina es capaz de hidrolizar la OTA en condiciones de *pH* ácido, aunque con poca eficacia; ii) la lipasa demostró ser eficiente en hidrolizar tanto a la OTA como a T-2 en los estudios de acoplamiento molecular; y iii) la endometalopeptidasa neutra demostró tener una alta eficacia como biodetoxicante de la OTA. Asimismo, se confirmó a la OT α como producto final de la reacción enzimática con la endometalopeptidasa neutra, esto debido a la degradación y no por un proceso de adsorción. Por otra parte, los resultados de los experimentos *in vitro* son prácticos, ya que las condiciones de *pH* y tiempo de incubación son comparables con el tiempo de digestión y condiciones reales intestinales de las aves de corral, siendo un aporte importante de este estudio. En esta sección se discutirán los hallazgos más importantes y sus implicaciones.

Cisteín-proteasa de *Ananas comosus* (bromelina)

Este estudio es el primero en evaluar la capacidad de la bromelina en la biodetoxicación de la OTA, a pesar de ser una enzima fácil de obtener, de bajo costo y altamente resistente. Aunque los resultados del acoplamiento molecular mostraron la viabilidad de la bromelina para hidrolizar a la OTA y a pesar de que los experimentos se realizaron a tres condiciones de *pH*, los resultados solamente fueron significativos en el *pH* más ácido (4.6) y con un porcentaje de hidrólisis bajo. Debido a que la bromelina es una enzima de tipo cisteína-tiol que contiene una díada catalítica Cys-His, este grupo de proteasas cortan generalmente del lado izquierdo (Vernet et al., 1995). Por lo tanto, es poco probable que ocurra la catálisis si la OTA se acopló al revés del sitio activo. Por otra parte, como proteasa, la bromelina actúa de manera muy específica, y el enlace peptídico de Arg-X es su sitio de corte reconocido (Murachi y Yamazaki, 1970), además necesita reconocer la cadena lateral de Arg. Dado que la estructura de la OTA no tiene similitud con la cadena lateral de Arg, es posible que la enzima no reconozca el sitio de corte de manera eficiente. Los resultados mostraron que, aunque la OTA redujo su concentración en presencia de la bromelina, no se detectó el ion de la OT α . Esto podría deberse a que la tasa de degradación de la bromelina podría ser muy baja y no hay suficiente OT α para ser detectada. Sin embargo, otros estudios son necesarios para aclarar este punto, que incluyan una gama más amplia de *pH*, temperatura y tiempo de incubación, concentraciones de sustrato y otros factores.

Monoacilglicerol lipasa de *Saccharomyces cerevisiae*

En cuanto a los resultados obtenidos en el acoplamiento molecular de la monoacilglicerol lipasa de *Saccharomyces cerevisiae*, la OTA obtuvo la mayor afinidad, además de que la molécula interactúa en el sitio activo con el residuo catalítico Ser123. Esto supone una posible catálisis por parte de la lipasa, similar a los resultados obtenidos con la lipasa A donde se obtuvo fenilalanina

y OT α como productos finales (Stander et al., 2000), sin embargo, el mecanismo de inactivación planteado en el presente estudio se efectúa en el anillo de lactona de la OTA para lograr su degradación. Respecto a los resultados de T-2, la afinidad registrada fue mayor a la del ligando de referencia (y los grupos éster se acoplaron en dirección a los residuos catalíticos: Ser123, His281 y Asp251) por lo que se espera una posible catálisis, donde los residuos finales son toxina HT-2 y ácido acético. Estos resultados difieren con el estudio bioinformático-experimental de CYP3A29 donde se obtuvo 3'-OH-T-2 como producto final, siendo este más tóxico que HT-2 (Cheng et al., 2014).

Endometalopeptidasa neutra de *Bacillus subtilis*

Los resultados mostraron que la endometalopeptidasa neutra de *Bacillus subtilis* fue capaz de degradar la OTA en condiciones de *pH* ácido y neutro. Previamente se han reportado porcentajes de degradación similares para otras metaloproteasas como las carboxipeptidasas de *Bacillus amyloliquefaciens* (Chang et al., 2014) y de *Aspergillus niger* (Abrunhosa et al., 2010), en donde se encontró que la OTA se degradó en un 72 y 99 % respectivamente, y otras más (Pitout, 1969; Stander et al., 2001). Por otra parte, la similitud entre los resultados encontrados a las distintas condiciones de *pH* puede explicarse en términos del valor de ionización de la OTA (4.4 pKa; Huang et al., 2017), en el que independientemente del estado de ionización del carboxilo de la OTA, no afectó la biotransformación de la micotoxina. Además, este hecho permite confirmar el mecanismo de degradación propuesto, en el que el carboxilo no participa en la hidrólisis-ionización. Por otra parte, aunque la endometalopeptidasa en este estudio degradó a la OTA a *pH* 5, fue mayor a *pH* 7, lo que concuerda con lo reportado para una carboxipeptidasa por Abrunhosa et al., (2006). Estudio en el que se reportaron que los valores óptimos de *pH* para las metaloenzimas están entre 6.5 y 7.5. Sin embargo, no se obtuvo degradación de OTA al probar esta enzima a 50 °C. Los resultados mostraron que la endometalopeptidasa neutra degrada efectivamente a la OTA a 41 °C. Además, este es el primer estudio en abordar la capacidad de una endometalopeptidasa para hidrolizar a la OTA.

Los resultados del acoplamiento molecular mostraron que el metabolito final de la OTA es la OT α como producto de la reacción de las tres enzimas aquí estudiadas. La detoxificación enzimática de la OTA podría lograrse mediante la hidrólisis de: i) el enlace amida para generar a la OT α y L-fenilalanina mediante el uso de una amidohidrolasa, o ii) el anillo de lactona mediante el uso de una ocratoxina-lactonasa (Lyagin y Efremenko, 2019; Leitão y Enguita, 2021; Liu et al., 2022). En este estudio se obtuvieron como productos finales a la OT α y L-fenilalanina, ampliamente reconocidos como productos esencialmente no tóxicos. La OT α es la sección de la isocumarina de la OTA. La transformación de la OTA en OT α , es una forma eficiente de reducir no solo su concentración sino también su toxicidad (Nahle et al., 2022), ya que la OT α ha sido descrita como la molécula menos tóxica de las ocratoxinas, donde la OTA es la más tóxica, seguida por OTC, OTB y finalmente la OT α (Creppy et al., 1983; Xiao et al., 1996; Bruinink et al., 1998; Müller et al., 2004). Se ha reportado que la OT α es 1000 veces menos tóxica en cultivos de células nerviosas y su vida media de eliminación *in vivo* es 10 veces más rápida que la de OTA (Abrunhosa et al., 2010), hasta la fecha, ha sido químicamente identificada como producto de la degradación de OTA por microorganismos y enzimas (Wang et al., 2022).

Por otra parte, los resultados del acoplamiento molecular de la lipasa mostraron su capacidad para hidrolizar a T-2, sin embargo, es necesario que se desarrollen futuros estudios de dinámica molecular para demostrar la estabilidad de este complejo, así como su abordaje en procedimientos *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, considerando que dos de las tres enzimas aquí estudiadas no son capaces de romper enlaces tipo éster, se utilizó a T-2 como control negativo; y dado a su arreglo en ambos complejos, con la bromelina y endometalopeptidasa neutra, con respecto al sitio activo, es posible que la toxina pueda actuar como un inhibidor natural. Si esta afirmación fuese cierta, podría aumentarse la cantidad de enzima para que T-2 pueda ser inhibida, dejando enzima libre para que pueda actuar con la OTA. Así, si T-2 está interactuando con la enzima, aunque esta no sea capaz de degradarla, ésta, estaría limitada y no podrá ser absorbida en el intestino del animal. Debido a que las micotoxinas suelen coexistir en alimentos y pienso se ha demostrado que pueden actuar de forma nociva, incluso, se han reportado efectos sinérgicos para algunas mezclas de micotoxinas que también contienen OTA y T-2 (Palumbo et al., 2020). Por lo tanto, los resultados obtenidos en este estudio resaltan aún más la importancia de seguir buscando opciones enzimáticas efectivas y capaces de detoxificar a varios tipos de micotoxinas.

CONCLUSIONES

- 1) Este estudio proporciona evidencia consistente *in silico* e *in vitro* de que la bromelina de *Ananas comosus* es capaz de hidrolizar a la OTA en condiciones de *pH* ácido con una eficacia baja.
- 2) La monoacilglicerol lipasa de *Saccharomyces cerevisiae* demostró ser eficiente en hidrolizar tanto a la OTA como la toxina T-2 en los estudios de acoplamiento molecular.
- 3) La endometalopeptidasa neutra de *Bacillus subtilis* tiene una alta eficiencia como biodetoxicante de la OTA (a *pH* 7, con una degradación del 45.26 %).
- 4) La OT α es el producto final de las reacciones enzimáticas en tiempo real sobre la degradación de OTA.

LITERATURA CITADA

- Abrunhosa, L., L. Santos y A. Venâncio. 2006. Degradation of ochratoxin A by proteases and by a crude enzyme of *Aspergillus niger*. *Food Biotech.*, 20(3): 231-242.
- Abrunhosa, L., R. R. M. Paterson y A. Venâncio. 2010. Biodegradation of Ochratoxin A for Food and Feed Decontamination. *Toxins (Basel)*, 2(5): 1078-1099.
- Adhikari, M., B. Negi, N. Kaushik, A. Adhikari, A. A. Al-Khedhairi, N. K. Kaushik y E. H. Choi. 2017. T-2 mycotoxin: toxicological effects and decontamination strategies. *Oncotarget*, 8(20), 33933.
- Aguirre-Acosta, E., M. Ulloa, S. Aguilar, J. Cifuentes y R. Valenzuela. 2014. Biodiversidad de hongos en México. *Rev. Mex. Biodiv.*, 85: 76-81.
- Al-Nussairawi, M., A. Risa, E. Garai, E. Varga, I. Szabó, Z. Csenki-Bakos, B. Kriszt y M. Cserhádi. 2020. Mycotoxin biodegradation ability of the *Cupriavidus* genus. *Current Microbiology*, 77, 2430-2440.
- Alud, D. S. 2013. Metalloproteases. *Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition)*, Academic Press, 86-89.
- Armando, M. R., R. P. Pizzolitto, C. A. Dogi, A. Cristofolini, C. Meriks, V. Poloni, A. M. Dalcero y L. R. Cavaglieri. 2012. Adsorption of ochratoxin A and zearalenone by potential probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains and its relation with cell wall thickness. *Journal of applied microbiology*, 113(2), 256-264.
- Arroyo-Manzanares, N., J. F. Huertas-Pérez, L. Gamiz-García y A. M. García-Campaña. 2014. Control de micotoxinas en alimentos. *Bol. Graseqa*, (7), 16-31.
- Aschauer, P., S. Rengachari, J. Lichtenegger, M. Schittmayer, K. M. P. Das, N. Mayer, R. Breinbauer, R. Birner-Gruenberger, C. C. Gruber, R. Zimmermann, K. Gruber y M. Oberer. 2016. Crystal structure of the *Saccharomyces cerevisiae* monoglyceride lipase Yju3p. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1861(5), 462-470.
- Azarkan, M., E. Maquoi, F. Delbrassine, R. Herman, N. M'Rabet, R. C. Espoito, P. Charlier y F. Kerff. 2020. Structures of the free and inhibitors-bound forms of bromelain and ananain from *Ananas comosus* stem and in vitro study of their cytotoxicity. *Scientific reports*, 10(1), 1-18.
- Ballón, W. G. y R. E. Grados. 2019. Acoplamiento molecular: criterios prácticos para la selección de ligandos biológicamente activos e identificación de nuevos blancos terapéuticos. *CON CIENCIA*, 7(2), 55-72.
- Barrett, A. J. 1994. Classification of peptidases. *Methods in enzymology*, 244, 1-15.
- Beeton, S. y A. T. Bull. 1989. Biotransformation and detoxification of T-2 toxin by soil and freshwater bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 55(1), 190-197.
- BIOVIA- Dassult Systèmes. 2020. Discovery Studio Visualizer, 21.1. 0.20298. *Dassault Systèmes: San Diego, CA, USA*.

- Blanco, A. y G. Blanco. 2017. Medical biochemistry. *Academic Press*, 154-175.
- Bruinink, A.; T. Rasonyi, C. Sidler. 1998. Differences in neurotoxic effects of ochratoxin A, ochracin and ochratoxin- α *in vitro*. *Natural toxins*, 6(5), 173-177.
- Buttle, D. J. y J. S. Mort. 2013. Cysteine Proteases. *Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition)*, *Academic Press*, 589-592.
- Chandra, K, A. S. Salman, A. Mohd, R Sweetey y K. N. Ali. 2015. Protection against FCA induced oxidative stress induced DNA damage as a model of arthritis and *in vitro* anti-arthritic potential of *costus speciosus* rhizome extract. *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research*, 7(2), 383-389.
- Chang, A., L. Jeske, S. Ulbrich, J. Hoffman, J. Koblitz, J. Schomburg, M. Neumann-Schaal, D. Jahn y D. Schomburg. 2021. BRENDA, the ELIXIR core data resource in 2021: new developments and updates. *Nucleic acids research*, 49(D1), D498-D508.
- Chang, X., Z. Wu, S. Wu, Y. Dai y C. Sun. 2014. Degradation of ochratoxin A by *Bacillus amyloliquefaciens* ASAG1. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 32(4), 564-571.
- Chauhan, R., J. Singh, T. Sachdev, T. Basu y B. D. Malhotra. 2016. Recent advances in mycotoxins detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 81, 532-535.
- Chen, P., B. Xiang, H. Shi, P. Yu, Y. Song y S. Li. 2020. Recent advances on type A trichothecenes in food and feed: Analysis, prevalence, toxicity, and decontamination techniques. *Food Control*, 118, artículo 107371.
- Chen, W., C. Li, B. Zhang, Z. Zhou, Y. Shen, X. Liao, J. Yang, Y. Wang, X. Li, Y. Li y X. L. Shen. 2018. Advances in biodegradation of ochratoxin A-A review of the past five decades. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1386.
- Cheng, G, C. Liu, X. Wang, H. Ma, Y. Pan. L. Huang, H. Hao, M. Dai y Z. Yuan. 2014. Structure-Function Analysis of Porcine Cytochrome P4503A29 in the Hydroxylation of T-2 Toxin as Revealed by Docking and Mutagenesis Studies. *PLOS one*, 9(9): e106769.
- Chlebicz, A. y K. Śliżewska. 2020. *In vitro* detoxification of aflatoxin B1, deoxynivalenol, fumonisins, T-2 toxin and zearalenone by probiotic bacteria from genus *Lactobacillus* and *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 12, 289-301.
- Cho, S. M., S. E. Jeong, K. R. Lee, H. P. Sudhani, M. Kim, S. Y. Hong y S. H. Chung. 2016. Biodegradation of Ochratoxin A by *Aspergillus tubingensis* Isolated from Meju. *J. Microbiol. Biotechnol*, (10): 1687-1695.
- Creppy, E. E., F. C. Størmer, R. Rösenthaller y G. Dirheimer. 1983. Effects of two metabolites of ochratoxin A, (4R)-4-hydroxyochratoxin A and ochratoxin alpha, on immune response in mice. *Infection and Immunity*, 39(3), 1015-1018.
- Cserhádi, M., B. Kriszt, C. Krifaton, S. Szoboszlay, J. Háhn, S. Tóth, I. Nagy y J. Kukolya. 2013. Mycotoxin-degradation profile of *Rhodococcus* strains. *Int. J. Food Microbiol*, 166, 176-185.

- De Oliveira, S., K. V. Marimón, W. Vilar, A. C. Penteadó, D. F. Alvares, M. B. Rodrigues, E. Badiale y J. Garda-Buffon. 2020. Peroxidase as a simultaneous degradation agent of ochratoxin A and zearalenone applied to model solution and beer. *Food Res. Int.*, *131*: 109039.
- Dobritzsch, D., H. Wang, G. Schneider y S. Yu. 2014. Structural and functional characterization of ochratoxinase, a novel mycotoxin-degrading enzyme. *Biochemical Journal*, *462*(3), 441-452.
- Doster, R. C. y R. O. Sinnhuber. 1972. Comparative rates of hydrolysis of ochratoxin A and B *in vitro*. *Pergamon Press*, *10*: 389-394.
- Faucher, F., J. M. Bennett, M. Bogyo y S. Lovell. 2020. Strategies for tuning the selectivity of chemical probes that target serine hydrolases. *Cell chemical biology*, *27*(8), 937-952.
- Flores-Gallegos, A. C., M. Delgado-García, J. A. Ascacio-Valdés, S. Villareal-Morales, M. R. Michel-Michel, C. N. Aguilar-González y R. Rodríguez-Herrera. 2019. Hydrolases of Halophilic Origin With Importance for the Food Industry. *Enzymes in Food Biotechnology*, 197-219.
- Freire, L. y A. S. Sant'Ana. 2018. Modified mycotoxins: An updated review on their formation, detection, occurrence, and toxic effects. *Food and Chemical Toxicology*, *111*, 189-205.
- Frisch, M. J., G. W. Trucks, H. B. Schelegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson y H. Nakatsuji. 2016. gaussian09. <http://www.gaussian.com/>.
- Fuchs, S., G. Sontag, R. Stidi, V. Ehrlich, M. Kundi y S. Knasmüller. 2008. Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. *Food and chemical toxicology*, *46*(4), 1398-1407.
- Gallo, A., M. Ferrara y G. Perrone. 2017. Modified mycotoxins: An updated review on their formation, detection, occurrence, and toxic effects. *COFS*, *17*: 49-56.
- Gao, X., P. Mu, J. Wen, Y. Sun, Q. Chen y Y. Deng. 2018. Detoxification of trichothecene mycotoxins by a novel bacterium, Eggerthella sp. DII-9. *Food and Chemical Toxicology*, *112*, 310-319.
- Gil-Ordóñez, A., M. Martín-Fontecha, S. Ortega-Gutiérrez y M. L. López-Rodríguez. 2018. Monoacylglycerol lipase (MAGL) as a promising therapeutic target. *Biochemical pharmacology*, *157*, 18-32.
- Gil-Serna, J., C. Vázquez, M. T. González-Jaén y B. Patiño. 2014. Mycotoxins. *Toxicology. Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*, 887- 892.
- Gopinath, S. C., P. Anbu, T. LakshmiPriya y A. Hilda. 2013. Strategies to characterize fungal lipases for applications in medicine and dairy industry. *BioMed research international*, *2013*, artículo 154549.
- Grosdidier, A., V. Zoete y O. Michielin. 2011. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. *Nucleic acids research*, *39*(2), 270-277.
- Gupta, R., A. Kumari, P. Syal, y Y. Singh. 2015. Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: Their role in biotechnology and cellular physiology. *Progress in lipid research*, *57*, 40-54.

- Haque, M. A., Y. Wang, Z. Shen, X. Li, M. K. Saleemi y C. He. 2020. Mycotoxin contamination and control strategy in human, domestic animal and poultry: A review. *Microbiol. Pathogenesis*, 142, 104095.
- Hassan, Z. U., R. Al Thani, M. Alsafran, Q. Migheli y S. Jaoua. 2021. Selection of *Bacillus* spp. with decontamination potential on multiple *Fusarium* mycotoxins. *Food Control*, 127, 108119.
- Huang, J., S. Rauscher, G. Nawrocki, T. Ran, M. Feig, B. L. De Groot, H. Grubmüller y A. D. MacKerell Jr. 2017. CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. *Nature methods*, 14(1), 71-73.
- Hwang, C. y F. A. Draughon. 1994. Degradation of ochratoxin A by *Acinetobacter calcoaceticus*. *Journal of Food Protection*, 57(5), 410-414.
- Janik, E., M. Niemcewicz, M. Podogrocki, M. Ceremuga, M. Stela y M. Bijak. 2021. T-2 toxin—The most toxic trichothecene mycotoxin: Metabolism, toxicity, and decontamination strategies. *Molecules*, 26(22), 6868.
- Juodeikiene, G., E. Bartkiene, D. Cernauskas, D. Cizeikiene, D. Zadeike, V. Lele y V. Bartkevics. 2018. Antifungal activity of lactic acid bacteria and their application for *Fusarium* mycotoxin reduction in malting wheat grains. *LWT*, 89, 307-314.
- Kumar, P., D. P. Mahato, B. Sharma, R. Borah, S. Haque, M. M. C. Mahmud, A. K. Shah, D. Rawal, H. Bora y S. Bui. 2020. Ochratoxins in food and feed: Occurrence and its impact on human health and management strategies. *Toxicon*, 187, 151-162.
- Leitão, A. L. y F. J. Enguita. 2021. Systematic structure-based search for ochratoxin-degrading enzymes in proteomes from filamentous fungi. *Biomolecules*, 11(7), 1040.
- Li, Y., G. Tian, G. Dong., S. Bai, X. Han, J. Liang, J. Meng y H. Zhang. 2018. Research progress on the raw and modified montmorillonites as adsorbents for mycotoxins: A review. *Applied Clay Science*, 163: 299-311.
- Liu, L., M. Xie y D. Wei. 2022. Biological detoxification of mycotoxins: Current status and future advances. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1064.
- Loi, M., F. Fanelli, M. T Cimmarusti., V. Mirabelli, M. Haidukowski, A. F. Logrieco, R. Caliandro y G. Mule. 2018. In vitro single and combined mycotoxins degradation by Ery4 laccase from *Pleurotus eryngii* and redox mediators. *Food Control*, 90, 401-406.
- Lyagin, I. y E. Efremenko. 2019. Enzymes for Detoxification of Various Mycotoxins: Origins and Mechanisms of Catalytic Action. *Molecules*, 24(13):2362.
- Martínez, C. C. y D. C. Chaves. 2019. Ocratoxinas y su potencial nefrótico. *Revista de nefrología, diálisis y transplante*, 39(1), 73-81.
- Martínez, M. M., L. M. Vargas del Río y V. M. Gómez. 2013. Aflatoxinas: incidencia, impactos en la salud, control y prevención. *Biosalud*, 12(2), 89-109.
- McCormick, S. P., A. M. Stanley, N. A. Stover y N. J. Alexander. 2011. Trichothecenes: from simple to complex mycotoxins. *Toxins*, 3(7), 802-814.

- McCormick, S. P., N. P. Price y C. P. Kurtzman. 2012. Glucosylation and other biotransformations of T-2 toxin by yeasts of the *Trichomonascus* clade. *Applied and environmental microbiology*, 78(24), 8694-8702.
- Morris, G. M., R. Huey, W. Lindstrom, M. F. Sanner, R. K. Belew, D. S. Goodsell y A. J. Olson. 2009. Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J. Computational Chem*, 16: 2785-2791.
- Muhaladin, B. J., N. Saari y A. S. Meor Hussin. 2020. Review on the biological detoxification of mycotoxins using lactic acid bacteria to enhance the sustainability of foods supply. *Molecules*, 25(11), 2655.
- Müller, G. B. Burket, U. Möller, R. Diller, B. Rohrmann, H. Rosner y H. Köhler. 2004. Ochratoxin A and some of its derivatives modulate radical formation of porcine blood monocytes and granulocytes. *Toxicology*, 199(2-3), 251-259.
- Murachi, T. y M. Yamazaki. 1970. Changes in conformation and enzymic activity of stem bromelain in alkaline media. *Biochemistry*, 9(9), 1935-1938.
- Nahle, S., A. El Khoury, I. Savvaidis, A. Chokr, N. Louka y A. Atoui. 2022. Detoxification approaches of mycotoxins: by microorganisms, biofilms and enzymes. *International Journal of Food Contamination*, 9(1), 1-14.
- Nathanail, A. V., B. Gibson, L. Han, K. Peltonen, V. Ollilainen, M. Jestoi y A. Laitila. 2016. The lager yeast *Saccharomyces pastorianus* removes and transforms *Fusarium* trichothecene mycotoxins during fermentation of brewer's wort. *Food chemistry*, 203, 448-455.
- Pagadala, N. S., K. Syed y J. Tuszynski. 2017. Software for molecular docking: a review. *Biophysical reviews*, 9(2), 91-102.
- Palumbo, R., A. Crisci, A. Venâncio, J. Cortiñas Abrahantes, J. L. Dorne, P. Battilani y P. Toscano. 2020. Occurrence and co-occurrence of mycotoxins in cereal-based feed and food. *Microorganisms*, 8(1), 74.
- Pernica, M., B. Kyalová, Z. Svobodam, R. Boško, I. Brožková, L. Česlová, K. Benešová, L. Červenka y S. Běláková. 2022. Levels of T-2 toxin and its metabolites, and the occurrence of *Fusarium* fungi in spring barley in the Czech Republic. *Food microbiology*, 102, 103875.
- Petchkongkaew, A., P. Taillandier, P. Gasaluck y P. Lebrhi. 2008. Isolation of *Bacillus* spp. from Thai fermented soybean (Thua-nao): screening for aflatoxin B1 and ochratoxin A detoxification. *Journal of Applied Microbiology*, 104(5), 1495-1502.
- Péteri, Z., J. Téren, C. Vágvölgyi y J. Varga. 2007. Ochratoxin degradation and adsorption caused by astaxanthin-producing yeasts. *Food microbiology*, 24(3), 205-210.
- Petruzzi, L., A. Bevilacqua, A. Baiano, L. Beneduce, M. R. Corbo y M. Sinigaglia. 2014. In vitro removal of ochratoxin A by two strains of *Saccharomyces cerevisiae* and their performances under fermentative and stressing conditions. *Journal of applied microbiology*, 116(1), 60-70.

- Pettersen, E. F., T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng y T. E. Ferrin. 2004. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*, 25(13), 1605-1612.
- Pinhão, M., A. M. Tavares, S. Loureiro, H. Louro, P. Alvito y M. J. Silva. 2020. Combined cytotoxic and genotoxic effects of ochratoxin A and fumonisin B₁ in human kidney and liver cell models. *Toxicology in Vitro*, 68, artículo 104949.
- Pitout, M. J. 1969. The hydrolysis of ochratoxin A by some proteolytic enzymes. *Biochem. Pharmacol.*, 18(2), 481-495.
- Polak-Sliwinska, M. y B. Paszyk. 2021. Trichothecenes in Food and Feed, Relevance to Human and Animal Health and Methods of Detection: A Systematic Review. *Molecules*, 26(2), 254.
- Politis, I., K. Fegeros, S. Nitsch, G. Schatzmayr y D. Kantas. 2005. Use of Trichosporon mycotoxinivorans to suppress the effects of ochratoxicosis on the immune system of broiler chicks. *British poultry science*, 46(1), 58-65.
- Qing, H., X. Huo, S. Huang, L. Zhao, J. Zhang, C. Ji y Q. Ma. 2021. Bacillus subtilis ANSB168 producing d-alanyl-d-alanine carboxypeptidase could alleviate the immune injury and inflammation induced by Ochratoxin A. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), 12059.
- Quesne, M. G., R. A. Ward y S. P. de Visser. 2013. Cysteine protease inhibition by nitrile-based inhibitors: a computational study. *Frontiers in chemistry*, 1, 39.
- Ramos, A. G., S. Marín, F. Molino, P. Vila y V. Sanchis. 2020. Las micotoxinas: el enemigo silencioso. *Arbor*, 196(795), a540.
- Rao, M. B., A. M. Tanksale, M. S. Ghatge y V. V. Deshpande. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(3), 597-635.
- Ravelo, A., C. Rubio, A. J. Gutiérrez y A. Hardisson. 2011. La ocratoxina A en alimentos de consumo humano: revisión. *Nutrición Hospitalaria*, 26(6), 1215-1226.
- Rawlings, N. D. y A. D. Barrett. 2004. Introduction: metalloproteases and their clans. *Handbook of Proteolytic Enzymes (Second Edition)*, Academic Press, 231-267.
- Rychlik, M. 2012. Chemical Contaminants and Residues in Food. *Food Science, Technology and Nutrition*, 320-341.
- Saleh, I. y I. Goktepe. 2019. The characteristics, occurrence, and toxicological effects of patulins. *Food and Chemical Toxicology*, 129, 301-311.
- Scafuri, B., A. Barriale, A. Facchiano, S. D'Auria, M. E. Raggi y A. Marabotti. 2017. Binding of mycotoxins to proteins involved in neuronal plasticity: a combined in silico/wet investigation. *Scientific reports*, 7(1), 1-11.
- Schatzmayr, G., D. Helder, E. Fuchs, S. Nitsch, M. Mohnl, M. Täubel, A. P. Loibner, R. Braun y E. M. Binder. 2003. Investigation of different yeast strains for the detoxification of ochratoxin A. *Mycotoxin research*, 19(2), 124-128.

Schmeitzel, C., E. Varga, B. Warth, K. G. Kugler, A. Malachová, H. Michlmyr, G. Wiesenberg, K. F. Mayer, H. W. Mewes y R. Krska. 2016. Identification and Characterization of Carboxylesterases from *Brachypodium distachyon* Deacetylating Trichothecene Mycotoxins. *Toxins*, 8, 6.

Schrödinger, L y W. De Lano. PyMOL. 2020. Available online: <http://www.pymol.org/pymol>.

Shukla, E., A. D. Bendre y S. M. Gaikwad. 2022. Hydrolases: The Most Diverse Class of Enzymes. *Hydrolases*, 2, 3.

Sieber, S. A., T. Böttcher, I. Staub y R. Orth. 2010. Small Molecules as Versatile Tools for Activity-Based Protein Profiling Experiments. *Comprehensive Natural Products II*, 629-674.

Singh, R., A. Singh y S. Sachan. 2019. Enzymes used in the food industry: Friends or foes?. *Enzymes in food biotechnology*. 827-843.

Solfrizzo, M., G. Avantiaggiato y A. Visconti. 1998. Use of various clean-up procedures for the analysis of ochratoxin A in cereal. *J. of Chromatography A*, 815, 67-73.

Stander, A. M., P. S. Steyn, F. H. van der Westhuizen y B. E. Payne. 2001. A kinetic study into the hydrolysis of the ochratoxins and analogues by carboxypeptidase A. *Chemical research in Toxicology*, 14(3), 302-304.

Stander, A. M., U. T. Bornscheuer, E. Henke y P. S. Steyn. 2000. Screening of commercial hydrolases for the degradation of ochratoxin A. *J. Agric. Food Chem.*, 48(11), 5736-5739.

Taheur, F. B., B. Kouidhi, Y. M. A. Quarashi, J. B. Salah-Abbès y K. Chaieb. 2019. Review: Biotechnology of mycotoxins detoxification using microorganisms and enzymes. *Toxicon*, 160: 12-22.

Tao, Y., S. Xie, F. Xu, A. Liu, Y. Wang, D. Chen, Y. Pan, L. Huang, D. Peng, X. Wang y Z. Yuan. 2018. Ochratoxin A: Toxicity, oxidative stress and metabolism. *Food and Chemical Toxicology*, 112, 320-331.

Trott, O. y A. J. Olson. 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*, 31(2), 455-461.

Ukwuru, M. U., C. G. Ohaegbu y A Muritala. 2017. An overview of mycotoxin contamination of foods and feeds. *J. Biochem. Microb. Toxicol.*, 1(1), 101.

Ülger, T. G., A. Uçar, F. P. Çakıroğlu y S. Yilmaz. 2020. Genotoxic effects of mycotoxins. *Toxicon*, 185, 104-113.

Vanhoutte, I., K. Audenaert y L. De Gelder. 2016. Biodegradation of mycotoxins: Tales from known and unexplored worlds. *Frontiers in microbiology*, 7, 561.

Vernet, T., D. C. Tessier, J. Chatellier, C. Plouffe, T. S. Lee, D. Y. Thomas, A. C. Storer y R. Ménard. 1995. Structural and Functional Roles of Asparagine 175 in the Cysteine Protease Papain. *Journal of Biological Chemistry*, 270(28), 16645-16652.

- Wang, J., J. Jiang, H. Zhang, J. Wang, H. Cai, C. Li, K. Li y J. Liu. 2011. Integrated transcriptional and proteomic analysis with in vitro biochemical assay reveal the important role of CYP3A46 in T-2 toxin hydroxylation in porcine primary hepatocytes. *Mol. Cell Proteomics*, 10, M111.008748.
- Wang, J. y Y. Xie. 2020. Review on microbial degradation of zearalenone and aflatoxins. *Grain & Oil Science and Technology*, 3, 117-125.
- Wang, L., X. Hua, J. Shi, N. Jing, T. Ji, B. Lv, L. Liu y Y. Chen. 2022. Ochratoxin A: Occurrence and recent advances in detoxification. *Toxicon*, 210, 11-18.
- Ward, O. P. 2011. Proteases. *Comprehensive biotechnology*, 604-615.
- Wei, W., Y. Qian, Y. Wu, Y. Chen, C. Peng, M. Luo, J. Xu y Y. Zhou. 2020. Detoxification of ochratoxin A by *Lysobacter* sp. CW239 and characteristics of a novel degrading gene carboxypeptidase cp4. *Environmental Pollution*, 258, 113677.
- Williams, C. J., J. J. Headd, N. W. Moriarty, M. G. Prisant, L. L. Videau, L. N. Deis, V. Verma, D. A. Keedy, B. J. Hintze, V. B. Chen, S. Jain, S. M. Lewis, W. B. Arendall, J. Snoeyink, P. D. Adams, S. C. Lovell, J. S. Richardson y D. C. Richardson. 2018. MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. *Protein Science*, 27(1), 293-315.
- Xiang, Z. 2006. Advances in homology protein structure modeling. *Current Protein and Peptide Science*, 7(3), 217-227.
- Xiao, H., S. Madhyastha, R. R. Marquardt, S. Li, J. K. Vodela, A. A. Frohlich y B. W. Kempainen. 1996. Toxicity of ochratoxin A, its opened lactone form and several of its analogs: structure–activity relationships. *Toxicology and applied pharmacology*, 137(2), 182-192.
- Xiong, L., M. Peng, M. Zhao y Z. Liang. 2020. Truncated expression of a carboxypeptidase a from bovine improves its enzymatic properties and detoxification efficiency of ochratoxin A. *Toxins*, 12(11), 680.
- Yogendrarajah, P., L. Jacxsens, S. De Saeger y B. De Meulenaer. 2014. Co-occurrence of multiple mycotoxins in dry chilli (*Capiscum annum* L.) samples from the markets of Sri Lanka and Belgium. *Food Control*, 46, 26-34.
- Yu, S., C. H. Poulsen, S. Dalsgaard, H. Wand y I. Nikolaev. 2015. *United States Patent*. US 9,113,649 B2
Disponibile en:
<https://patentimages.storage.googleapis.com/3e/c7/d4/bec2463f514aa1/US9113649.pdf>
- Zhai, S., Y. Zhu, P. Feng, M. Li, W. Wang, L. Yang y Y. Yang. 2021. Ochratoxin A: Its impact on poultry gut health and microbiota, an Overview. *Poultry Science*, 100(5), 101037.
- Zhang, J., L. You, W. Wu, X. Wang, Z. Chrienova, E. Nepovimova, Q. Wu y K. Kuca. 2020. The neurotoxicity of trichothecenes T-2 toxin and deoxynivalenol (DON): Current status and future perspectives. *Food and Chem. Tox*, 146, 111676.
- Zhang, X., H. Yang, M. T. Apaliya, L. Zhao, X. Gu, X. Zheng, W. Hu y H. Zhang. 2018. The mechanisms involved in ochratoxin A elimination by *Yarrowia lipolytica* Y-2. *Annals of Applied Biology*, 173(2), 164-174.

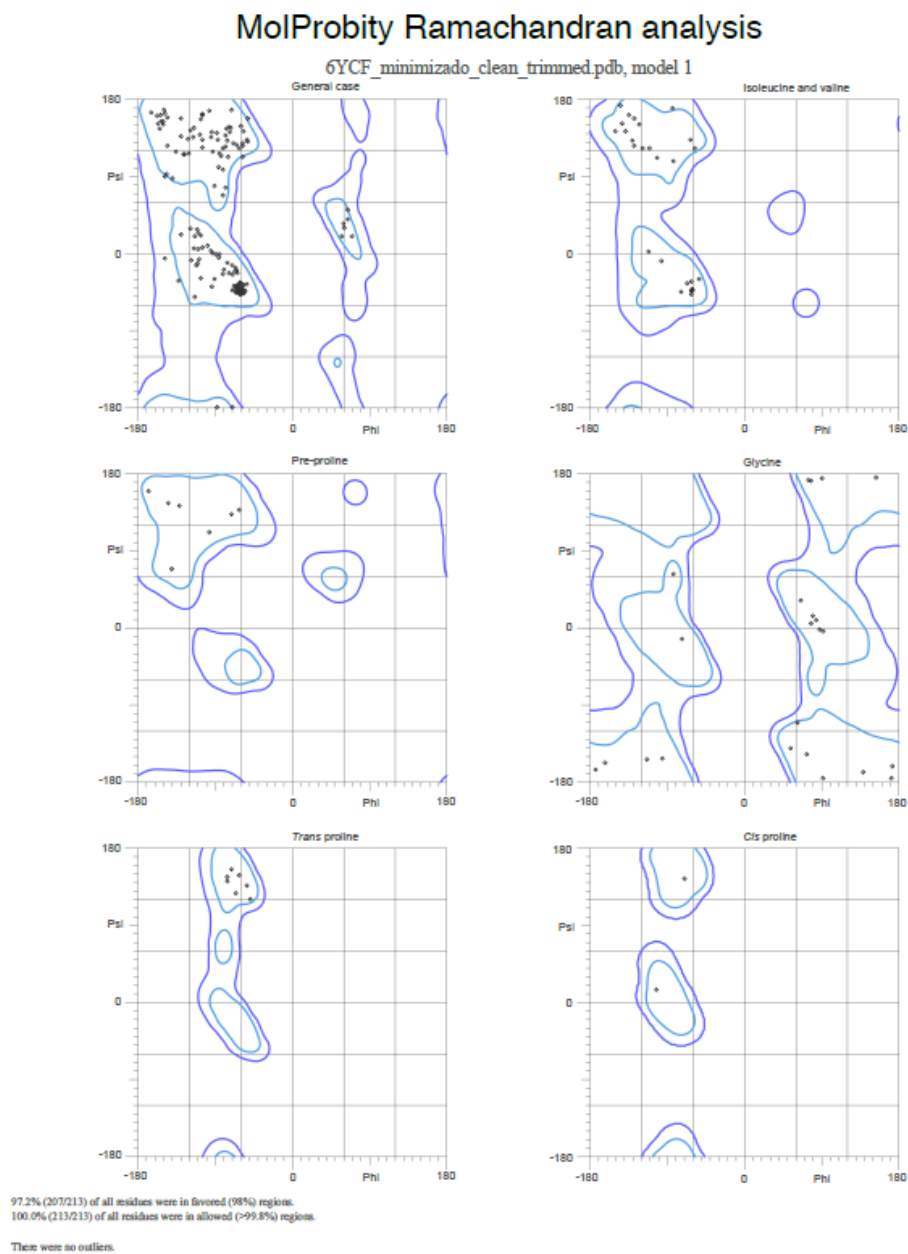
Zhu, D., Q. Wu y L. Hua. 2019. Industrial Enzymes. *Comprehensive Biotechnology (Third Edition)*. Life Sciences. 3, 1-13.

Zhu, L., H. Wang, J. Yuhan, B. Zhang, H. Li, C. Asakiya, K. Huang, X. He y W. Xu. 2021. Exosomes mediated the delivery of ochratoxin A-induced cytotoxicity in HEK293 cells. *Toxicology*, 461, 152926.

APÉNDICES

Apéndice 1. Modelos de Ramachandran de las enzimas estudiadas.

1.1 Cisteín-proteasa de *Ananas comosus* (Bromelina).

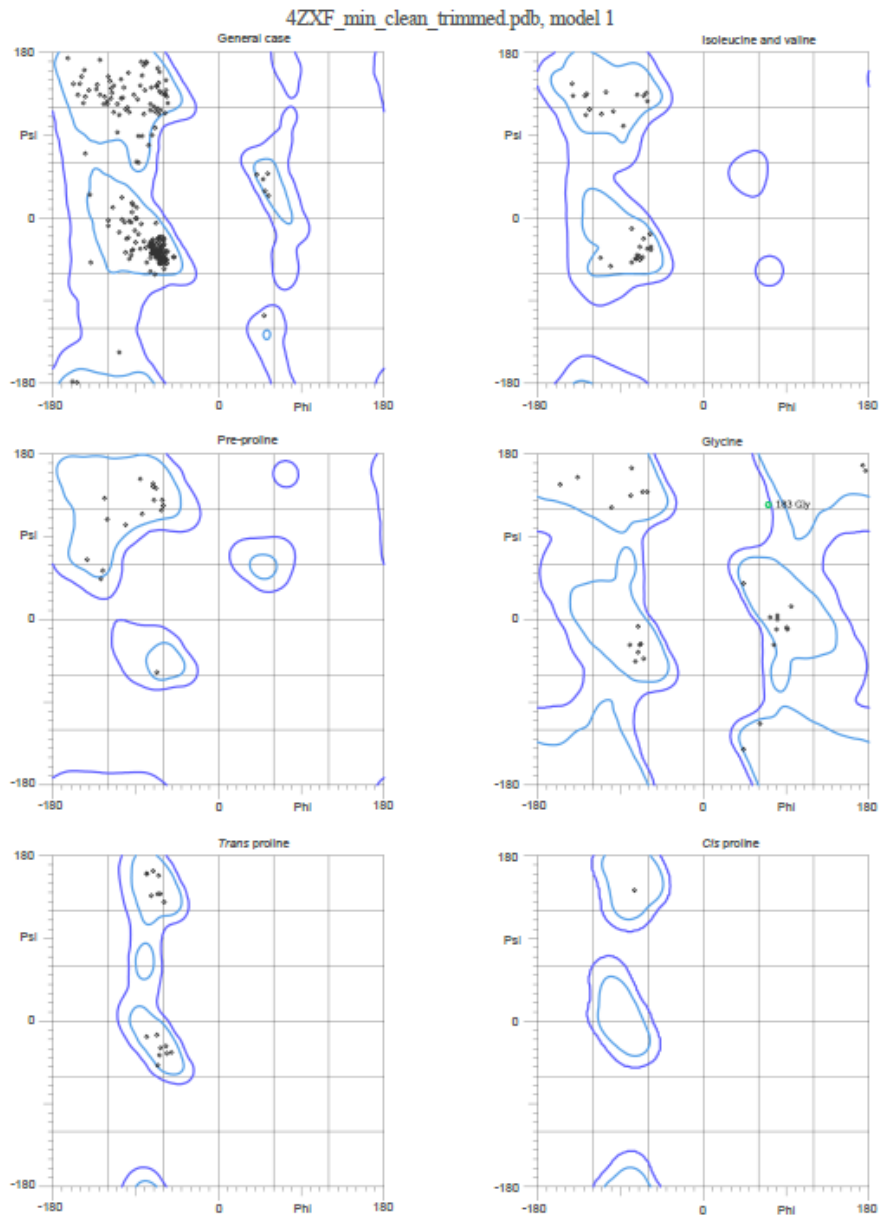


<http://kinemage.biochem.duke.edu>

Lovell, Davis, et al. Proteins 50:437 (2003)

1.2 Monoacilglicerol lipasa de *Saccharomyces cerevisiae*.

MolProbity Ramachandran analysis



96.7% (295/305) of all residues were in favored (98%) regions.
99.7% (304/305) of all residues were in allowed (>99.8%) regions.

There were 1 outliers (phi, psi):
183 Gly (71.9, 125.1)

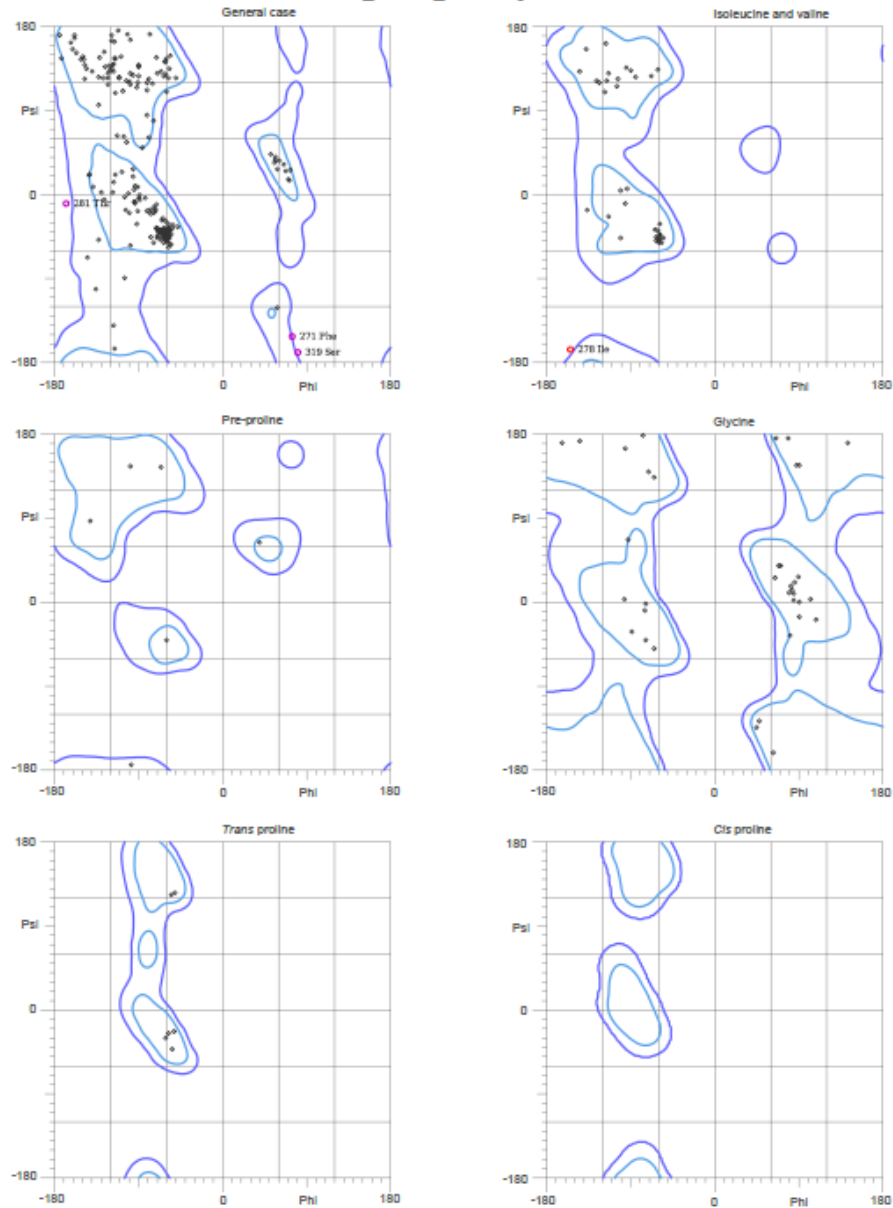
<http://kinemage.biochem.duke.edu>

Lovell, Davis, et al. Proteins 50:437 (2003)

1.3. Endometalopeptidasa neutra de *Bacillus subtilis*.

MolProbity Ramachandran analysis

modelo1_neutral_trimmed.pdb, model 1



92.6% (287/310) of all residues were in favored (98%) regions.
98.7% (306/310) of all residues were in allowed (>99.8%) regions.

There were 4 outliers (phi, psi):
271 Phe (75.9, -152.7)
278 Ile (-155.9, -166.1)
281 Thr (-168.4, -9.8)
319 Ser (81.5, -169.4)

<http://kinemage.biochem.duke.edu>

Lovell, Davis, et al. Proteins 50:437 (2003)