



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA**

**“Efecto del plaguicida organofosforado Temefos sobre la expresión de los  
citocromos P450 hepáticos de rata macho adulta y la participación de éstos en su  
biotransformación”**

Tesis que presenta:

**Lic. Adrián Hernández Esteris**

Para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias

en la  
Especialidad de Toxicología

Director de Tesis:

**Dr. Adolfo Sierra Santoyo**

**Ciudad de México, agosto de 2020**

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio 17 del Departamento de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Adolfo Sierra Santoyo, con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), a través de la Beca No. 932921).

## AGRADECIMIENTOS

- Mis primeras palabras son para el **Dr. Adolfo Sierra Santoyo**, a quien agradezco por su aceptación, guía y apoyo para la realización de esta tesis, así como su motivación, constancia y atenciones, más dignas de un padre que de un profesor.
- A mis asesores la **Dra. Betzabet Quintanilla Vega** y el **Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre**, también por aceptarme, por su apoyo y señalamientos constructivos para enriquecer este trabajo.
- Al **colegio de profesores del Departamento de Toxicología** por sus clases, aporte teórico y apoyo durante mi estancia en la maestría.
- A mis compañeros de laboratorio **MsC. Andrés Reyes Chaparro** y **MsC. Francisco A. Verdín Betancourt (Paco)**, por su amistad, sus ocurrencias y los aportes a mi investigación.
- A la **QFB. Ma. de Lourdes López González (Lulú)**, por su cariño, invaluable ayuda, consejos, atenciones y preocupaciones conmigo.
- A mi esposa **Andrea Y. Ocharán Mercado**, por su amor, apoyo, atenciones y desvelos soportados a mi lado para conseguir este sueño.
- A mis compañeros de generación: **Vanessa, Ana Karen, Ángel, Estheisy, Leticia, Rebecca, Nuria, Andrea**.
- Al **personal de la UPEAL-CINVESTAV** por su valiosa ayuda en el trabajo con los animales empleados en el estudio
- A **México**, al **CINVESTAV-IPN** y al **CONACYT**, por la oportunidad y por el apoyo económico para realizar mis estudios en este país.

## **DEDICATORIA**

A mis amadas hijas, Aimar e Isabella, por el tremendo sacrificio personal impuesto a ustedes al alejarme tanto para alcanzar este sueño profesional y porque su amor ha seguido creciendo a pesar de la distancia.

A mi esposa Andrea, por su amor incondicional, así como su soporte emocional, comprensión y complicidad desde el primer día.

A mis padres, Nieves y Fredy por tanto amor, cariño y esfuerzo en criarme como un hombre de bien y útil a la sociedad.

A mi primo Juan Antonio Cereijo y su esposa Letty, a quienes considero mis padres también, por su amor, su inestimable apoyo y su cercanía a pesar de la distancia.

A mi adorada abuela Nelsa, mis hermanos, mis tíos y tías, mis primos y mis amigos de siempre.

A la familia Ocharán, quienes me acogieron como un hijo acá en México, por su impagable apoyo.

**A todos ustedes les dedico esta tesis como símbolo de mi trabajo y esfuerzo**

*“La ciencia nunca resuelve un problema sin crear otros 10 más”.*

George Bernard Shaw (1856 – 1950)

## Índice

Página

<b>Lista de figuras</b> .....	<b>iv</b>
<b>Lista de tablas</b> .....	<b>v</b>
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	<b>vi</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>viii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>x</b>
<b>1. Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Plaguicidas organofosforados</b> .....	<b>2</b>
1.1.1 Mecanismos de toxicidad de los POF .....	3
<b>1.2 Temefos</b> .....	<b>4</b>
1.2.1 Propiedades fisicoquímicas de Tem.....	4
1.2.2 Usos del Tem .....	5
1.2.3 Toxicocinética del Tem.....	5
1.2.3.1 Absorción .....	6
1.2.3.2 Distribución .....	6
1.2.3.3 Biotransformación .....	7
1.2.3.3.1 Propuesta de la ruta de biotransformación del Tem .....	8
1.2.3.4 Eliminación.....	10
1.2.4 Toxicidad del Tem .....	10
1.2.4.1 Hepatotoxicidad del temefos .....	13
<b>1.3 Citocromo P450 (CYP)</b> .....	<b>14</b>
1.3.1 Generalidades.....	14
1.3.2 Actividad catalítica.....	15
1.3.3 Familias del CYP .....	18
1.3.3.1 Familia CYP1 .....	18
1.3.3.2 Familia CYP2 .....	19
1.3.3.3 Familia CYP3 .....	22
1.3.4 Regulación de la expresión de los CYP450 .....	22
1.3.5 Inducción del CYP .....	23
1.3.6 Inhibición de CYP .....	25
1.3.6.1 Inhibidores químicos .....	25
<b>1.4 Justificación</b> .....	<b>26</b>
<b>1.5 Hipótesis</b> .....	<b>26</b>
<b>1.6 Objetivos</b> .....	<b>27</b>
1.6.1 Objetivo general .....	27
1.6.2 Objetivos específicos .....	27
<b>2. Materiales y Métodos</b> .....	<b>28</b>
<b>2.1 Origen de los reactivos</b> .....	<b>28</b>
<b>2.2 Estrategia experimental</b> .....	<b>28</b>
<b>2.3 Animales</b> .....	<b>28</b>
2.3.1 Tratamiento de los animales .....	29
<b>2.4 Obtención de la fracción microsomal</b> .....	<b>30</b>
2.4.1 Principio .....	30
2.4.2 Soluciones.....	30
2.4.3 Procedimiento .....	31
<b>2.5 Determinación del contenido de proteína microsomal total</b> .....	<b>32</b>
2.5.1 Principio .....	32

2.5.2 Soluciones.....	32
2.5.3 Procedimiento .....	32
2.5.4 Control de calidad .....	33
<b>2.6 Determinación del CYP total .....</b>	<b>33</b>
2.6.1 Principio .....	33
2.6.2 Soluciones.....	34
2.6.3 Procedimiento .....	34
2.6.4 Cálculos .....	35
2.6.5 Control de Calidad.....	35
<b>2.7 Actividades enzimáticas.....</b>	<b>35</b>
2.7.1 O-desalquilación de los éteres de resorufina .....	35
2.7.1.1 Principio .....	35
2.7.1.2 Soluciones .....	35
2.7.1.3 Procedimiento .....	36
2.7.1.4 Cálculos .....	37
2.7.2 Hidroxilasa de <i>p</i> -nitrofenol (HPNF).....	37
2.7.2.1 Principio .....	37
2.7.2.2 Soluciones .....	38
2.7.2.3 Procedimiento .....	38
2.7.2.4 Cálculos .....	39
2.7.2.5 Control de calidad .....	39
2.7.3 Hidroxilación de la testosterona .....	39
2.7.3.1 Principio .....	39
2.7.3.2 Reactivos y soluciones .....	41
2.7.3.3 Procedimiento .....	42
2.7.3.4 Determinación de los metabolitos de la testosterona por HPLC .....	42
2.7.3.5 Condiciones cromatográficas para el análisis de la testosterona y sus metabolitos .....	42
2.7.3.6 Gráficas de calibración .....	43
2.7.3.7 Cálculos .....	46
<b>2.8 Reacción enzimática de biotransformación del Tem empleando MHR.....</b>	<b>46</b>
2.8.1 Principio .....	46
2.8.2 Soluciones .....	46
2.8.3 Procedimiento .....	47
2.8.4 Ensayos de inhibición enzimática.....	48
2.8.3.1 Inhibición de las monooxigenasas dependientes de flavina .....	49
2.8.3.2 Inhibición de las monooxigenasas dependientes del CYP.....	49
2.8.3.3 Inhibición de isoformas de CYP con inhibidores químicos.....	49
2.8.5 Análisis de Tem y sus metabolitos por HPLC/DAD en extractos de ensayos enzimáticos <i>in vitro</i> .....	49
2.8.6 Metabolitos no identificados del Tem .....	50
2.8.7 Cálculos .....	51
2.8.8 Control de calidad .....	51
<b>2.9 Análisis de resultados .....</b>	<b>52</b>
<b>3. Resultados .....</b>	<b>53</b>
3.1 Toxicidad sistémica del Tem .....	53
3.2 Toxicidad hepática del Tem .....	53
3.3 Efecto del Tem sobre la actividad enzimática de los CYP hepáticos.....	55

3.3.1 Optimización y validación del método analítico de cromatografía de líquidos para la determinación de los productos de biotransformación de la T.....	55
3.3.1.1 Control de calidad y exactitud.....	58
3.3.2 Efecto del Tem sobre las hidroxilasas de la T.....	58
3.3.3 Efecto sobre la actividad enzimática de la PROD, EROD, MROD y HPNF .....	60
<b>3.4 Biotransformación <i>in vitro</i> del Tem.....</b>	<b>62</b>
3.4.1 Inhibición de los CYP y de las FMO.....	63
3.4.2 Participación de isoformas específicas de CYP en el metabolismo del Tem .....	67
<b>4. Discusión .....</b>	<b>69</b>
<b>4.1 Efecto del Tem sobre el peso corporal y el hígado de los animales.....</b>	<b>69</b>
<b>4.2 Efecto del Tem sobre las principales isoformas hepáticas del CYP .....</b>	<b>70</b>
<b>4.3 Efecto de la exposición repetida a Tem sobre su propia biotransformación ....</b>	<b>74</b>
<b>4.4 Efecto de la inducción de isoformas específicas de CYP sobre el metabolismo del Tem .....</b>	<b>76</b>
<b>4.5 Identificación de las enzimas que participan en el metabolismo del Tem.....</b>	<b>77</b>
<b>4.6 Identificación de las isoformas específicas de CYP que participan en el metabolismo del Tem .....</b>	<b>78</b>
<b>5. Conclusiones .....</b>	<b>81</b>
<b>6. Perspectivas .....</b>	<b>82</b>
<b>7. Referencias.....</b>	<b>83</b>

## Lista de figuras

Figura		Página
1	Estructura química general de los POF	2
2	Nomenclatura de las principales subclases de POF	3
3	Estructura química del Tem	4
4	Ruta metabólica general de los POF	7
5	Propuesta de ruta de biotransformación para el Tem	9
6	Ciclo catalítico del CYP	17
7	Mecanismo de regulación génica de la expresión del CYP	23
8	Estrategia experimental	29
9	Gráfica de calibración de BSA para la determinación de proteínas	33
10	Espectros representativos obtenidos de la determinación del contenido de CYP total en los diferentes grupos de tratamientos	34
11	Gráfica de calibración de la resorufina	37
12	Gráfica de calibración de <i>p</i> -nitrocatecol	39
13	Hidroxilación de la testosterona por diferentes isoformas de CYP.	40
14	Gráfica de calibración de la testosterona, sus metabolitos 2 $\beta$ -OHT, 6-DHT, Androstenediona y el estándar interno Cortexolona.	44
15	Gráfica de calibración de los metabolitos de la testosterona 6 $\alpha$ -OHT, 7 $\alpha$ -OHT, 6 $\beta$ -OHT, 16 $\alpha$ -OHT, 16 $\beta$ -OHT y 2 $\alpha$ -OHT	45
16	Efecto de los diferentes tratamientos sobre la ganancia diaria de peso corporal.	54
17	Efecto de los diferentes tratamientos sobre peso relativo del hígado	55
18	Efecto de los diferentes tratamientos sobre el contenido de proteína microsomal hepática y la concentración de CYP total hepático	55
19	Cromatogramas representativos de la biotransformación de T	57
20	Efecto de los diferentes tratamientos sobre la actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo de la T.	60
21	Efecto de los diferentes tratamientos sobre la actividad enzimática de la PROD, EROD, MROD e HPNF.	61
22	Cromatogramas representativos de la biotransformación de Tem	64
23	Efecto de los diferentes tratamientos sobre el metabolismo del Tem	65
24	Efecto de la inhibición de los CYP y de las FMO presentes en la fracción microsomal de ratas inducidas con Fb	66
25	Efecto de la inhibición de las isoformas de CYP presentes en la fracción microsomal de ratas inducidas con Fb.	68

## Lista de tablas

Tabla		Página
1	Clasificación de los plaguicidas de acuerdo con su toxicidad	1
2	Volumen de reactivos para la determinación de la actividad de O-desalquilación de diversos éteres de resorufina	37
3	Programa de solventes para análisis de metabolitos de testosterona	43
4	Programa de solventes para el análisis de la biotransformación de Tem y sus metabolitos	50
5	Ecuaciones de regresión lineal empleadas para el cálculo de la concentración de los metabolitos del Tem en el ensayo de biotransformación empleando MHR	51
6	Tiempos de retención de la T y sus metabolitos	56
7	Ecuaciones de regresión lineal empleadas para el cálculo de la concentración de los metabolitos de la T en el ensayo de biotransformación empleando MHR	58

## Lista de abreviaturas

°C	Grados Celsius (Centígrados)
Ac	anticuerpo
AchE	Acetilcolinesterasa
ACN	Acetonitrilo
AFSSET	Agencia Francesa de Seguridad Sanitaria de la Alimentación, el Medio Ambiente y el Trabajo
Ag	antígeno
AhR	Receptor de hidrocarburos aromáticos (Aryl hydrocarbon receptor)
BSA	Albúmina de suero bovino
BNF	$\beta$ -naftoflavona
BPS	Bisfenol S
CAR	Receptor constitutivo de androstano (Constitutive androstane receptor)
c.b.p	Cuanto baste para
CAS	Chemical Abstract Service Number
CE	Carboxilesterasas
CYP	Citocromo P450
CYP	Citocromos
DHT	Dihidrotestosterona
DL <sub>50</sub>	Dosis letal 50
EROD	7-etoxiresorufina-O-desalquilasa
FB ó Fb	Fenobarbital
Fig	Figura
FMO	Mono-oxigenasas que contienen flavina
GH	Hormona del crecimiento (Growth hormone)
HAPs	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (High Performance Liquid Chromatography)
HPNF	Hidroxilasa de <i>p</i> -nitrofenol
IDA	Ingesta Diaria Admisible
IC <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria 50
K <sub>m</sub>	Constante de Michaelis-Menten
MeOH	Metanol
MHR	Microsomas hepáticos de rata
MoE	Margen de Exposición
MROD	7-metoxiresorufina-O-desalquilasa
NADPH	Fosfato de Nicotinamida Adenina Dinucleótido reducido
nm	nanómetros
NOAEL	Nivel de efecto adverso no observable (Not observable adverse effect level)
OC	Organoclorado
OF	Organofosforado
-OHT	Hidroxitestosterona
OMS (WHO)	Organización Mundial de la Salud (World Health Organization)
Pa	Pascal
pc	Peso corporal

POF	Plaguicida organofosforado
POFT	Plaguicida organofosforotioato
PPAR- $\alpha$	Receptor activador de la proliferación de peroxisomas alfa (peroxisome proliferator-activated receptor alpha)
ppm	partes por millón
PROD	7-pentoxiresorufina-O-desalquilasa
PXR	Receptor X de pregnano (Pregnane X Receptor)
RN	Receptores nucleares
SNC	Sistema Nervioso Central
T	Testosterona
TDF	4,4'-tiodifenol
TDF-SO ó SIDP	4,4'-sulfanildifenol (tiodifenol sulfóxido)
TDF-SO <sub>2</sub> ó SODP	4,4'-sulfonildifenol (tiodifenol sulfona) ó BPS
Tem	Temefos
Tem-oxón	Temefos oxón
Tem-oxón-SO-OH	Temefos oxón sulfóxido monohidrolizado
Tem-SO	Temefos sulfóxido
Tem-SO <sub>2</sub>	Temefos sulfona
TGI	Tracto gastrointestinal
THF	Tetrahidrofurano
TSH	Tiempo de sueño inducido por el Hexobarbital
$t_{ret}$	Tiempo de retención
$t_{1/2\ elim}$	Tiempo de vida media de eliminación
US-EPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (United States Environmental Protection Agency).
Vol.	Volumen
$\lambda_{em}$	Longitud de onda de emisión
$\lambda_{exc}$	Longitud de onda de excitación

## Resumen

El Temefos (Tem) es un plaguicida organofosforado (POF) empleado principalmente como larvicida para el control de mosquitos, moscas negras y otros simúlidos, transmisores de enfermedades como el dengue, el Zika y el chikungunya. En México y otros países tropicales se comenzó a emplear desde la década de 1970, cuando la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomendó su uso para el control del vector transmisor del dengue, teniendo como base su toxicidad baja en exposiciones agudas. Como sucede con otros POF, el Tem requiere ser biotransformado para la formación de productos oxidados (oxones) que son la forma biológicamente activa con una toxicidad mucho más alta que la del compuesto padre. La presencia del mono-oxón y di-oxones del Tem solo ha sido reportada en plantas como el frijol y en larvas de mosquitos, su formación en los mamíferos solo se ha inferido por la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE). Se ha descrito la presencia de derivados S-oxidados del Tem, así como de otros productos generados por la hidrólisis de los ésteres del fosfato, los cuales poseen escaso efecto sobre la actividad de la AChE y sugieren que el Tem tiene toxicidad baja en los mamíferos. El metabolismo del Tem ha sido poco estudiado y hasta la fecha no se ha propuesto su ruta de biotransformación, tampoco se conoce que enzimas participan en ella y si este plaguicida posee la capacidad de afectar su propio metabolismo y el de otros compuestos tanto endógenos como exógenos debido a una alteración en la expresión de las isoformas de citocromo P450 (CYP) hepático. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del Tem sobre la expresión de isoformas de CYP hepático y la participación de estas enzimas en su biotransformación. Para ello, se administraron ratas Wistar macho adultas ( $100 \pm 10$  d de edad) por vía oral a una dosis de Tem de 50 mg/kg/d por 3 d. A las 24 h después de la última administración los animales se sacrificaron y el hígado se procesó para obtener la fracción microsomal. Un grupo control solo recibió el vehículo. Como controles positivos se administraron paralelamente ratas con fenobarbital (Fb, 80 mg/kg/d por 3 d) o  $\beta$ -naftoflavona (BNF, 80 mg/kg/d por 2 d). La exposición al Tem provocó un aumento de 12.5% en el peso relativo del hígado de las ratas tratadas respecto al grupo no tratado. Sin embargo, no modificó significativamente el contenido del CYP total hepático, ni tampoco las actividades enzimáticas de los CYP1A1 (EROD), CYP1A2 (MROD), CYP2B1/2 (PROD), CYP2A1 (6 $\alpha$ - y 7 $\alpha$ -hidroxilasa de la testosterona (-OHT)) y HPNF (CYP2E1). Por el contrario, si produjo un aumento significativo en la formación de los metabolitos 6 $\beta$ -OHT (CYP3A1/2) y 16 $\alpha$ -OHT (CYP2C11), así como en la formación de la androstenediona (CYP2C11 y la 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa) de 100, 262 y 162%, respectivamente. Los animales tratados con BNF y Fb mostraron la inducción típica de las actividades enzimáticas de las isoformas CYP1A1 (18 veces) y 1A2 (6.5 veces), y 2B1/2 (32 veces). En los ensayos *in vitro* usando microsomas hepáticos de rata (MHR), el Tem se metabolizó en por lo menos 10 metabolitos intermediarios, entre ellos hay oxones, dioxones, sulfóxidos, sulfonas y derivados fenólicos como productos de la hidrólisis de los ésteres de fosfato. Los MHR previamente tratadas con Tem no mostraron diferencias significativas en el perfil metabólico del plaguicida respecto al grupo no tratado. Por el contrario, el patrón de biotransformación del Tem si fue modificado cuando se emplearon MHR inducidos con Fb y BNF. En ensayos *in vitro* con MHR en presencia de inhibidores de CYP y de monooxigenasas dependientes de flavina (FMO), se observó que la formación de los derivados mono-oxón y dioxón del Tem son llevados a cabo casi

exclusivamente por los CYP. Por medio del uso de inhibidores químicos se determinó que los CYP2B1/2 y 3A1/2 tienen una participación muy importante en la formación de los oxones y dioxones del Tem. Estos resultados indican que la exposición al Tem por 3 d afecta selectivamente y de manera discreta la expresión de algunas isoformas del CYP hepáticas y, aunque no modifica su propio metabolismo, sí puede modificar la biotransformación de compuestos endógenos y exógenos y su metabolismo puede ser alterado por la co-exposición a xenobióticos, así como su toxicidad. Estos resultados ayudarán a la caracterización toxicológica del Tem, a proponer una ruta metabólica y cuáles son las enzimas involucradas en su biotransformación.

## Abstract

Temephos (Tem) is an organophosphate pesticide (OP) used as larvicide for the control of mosquitoes, black flies and other simuliidae, which are transmitters of diseases such as dengue, Zika and chikungunya. In Mexico and other tropical countries, it is used since 1970s when the World Health Organization (WHO) recommended its use for the control of the dengue transmitting vector, based on its low toxicity in acute exposures. In a similar manner as other OPs, Tem needs to be metabolized to oxons, which are the biologically active form to inhibit the acetylcholinesterase (AChE) enzyme and are more potent than the parent compound. The presence of Tem mono-oxon and di-oxon derivatives have only been reported in bean leaves and mosquito larvae, in mammals it has been indirectly inferred by the inhibition of AChE. The literature has described the presence of S-oxidized derivatives of Tem, as well as other products of phosphate esters hydrolysis in Tem treated rats, which have low ability to inhibit AChE activity. To date there is not a proposed biotransformation pathway for Tem, as well as the enzymes that are involving in its biotransformation. The information about the effect of Tem on hepatic cytochrome P450 (CYP) expression is very limited and controversial. The aim of this study was to evaluate the effect of Tem on the expression of hepatic CYP isoforms and the participation of these enzymes in its biotransformation. Adult male Wistar rats ( $100 \pm 10$  days old) were administered an oral dose of 50 mg/kg/d for 3 d. Animals were euthanized at 24 h after the last administration, the liver perfused and processed to obtain the microsomal fraction. Simultaneously, another animal group were daily administered an i.p. dose of phenobarbital (Pb, 80 mg/kg/d for 3 d or  $\beta$ -naphthoflavone (BNF, 80 mg/kg/d for 2 d). Tem treatment caused an increase of 12% in the liver relative weight but no effect was observed on hepatic total CYP compared with the non-treated group. EROD (CYP1A1), MROD (CYP1A2), PROD (CYP2B1/2, 6 $\alpha$ - and 7 $\alpha$ -testosterone hydroxylase (-OHT) (CYP2A1) and PNPH (CYP2E1) enzyme activities were not affected by Tem treatment. In contrast, a significant increase of 100, 262 and 162%, on 6 $\beta$ -OHT (CYP3A), 16 $\alpha$ -OHT (CYP2C11), and androstenedione (CYP2C11 and 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase) formation, respectively, were observed. Animals treated with BNF and Pb showed an induction 18-, 6.5-, and 32-fold on EROD, MROD and PROD, respectively. Tem was metabolized to at least 10 intermediary metabolites in *in vitro* assays using rat liver microsomes (RLM) obtained from non-treated animals. Tem treatment did not modify the metabolic pattern using RLM obtained from Tem treated animals. On the contrary, Pb and BNF treatment modified the metabolic pattern of Tem. Inhibition assays using CO for CYP and temperature for flavin containing monooxygenases (FMO) showed that CYP are the main enzymes involved in the formation of Tem mono-oxon and dioxon derivatives. It was observed that CYP2B1/2 and 3A1/2 have an important role in Tem-oxon and dioxon derivatives formation, using chemical inhibitors in *in vitro* assays. The results indicate that Tem exposure to the dose of 50 mg/kg/d for 3 d did not induce hepatic total CYP content but selectively and discreetly affected the expression of some hepatic CYP isoforms, in addition, it did not modify its metabolic pattern but it can modify the biotransformation of endogenous compounds and xenobiotics. The co-exposure to xenobiotics may modify the metabolic pattern of Tem and consequently its toxicity. These results contribute to the toxicological characterization of Tem, as well as to propose a metabolic pathway and enzymes involved in its biotransformation.

## 1. Introducción

Los plaguicidas son compuestos ampliamente utilizados a nivel mundial para controlar plagas que transmiten enfermedades a las plantas, los animales y el hombre. Para la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US-EPA, por sus siglas en inglés), el término plaguicida se aplica a toda sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir, repeler o controlar una plaga (US-EPA, 2008). A partir de los años 60 del siglo pasado aparecieron los primeros plaguicidas obtenidos por síntesis química, los que por su elevado rendimiento y mayor facilidad de obtención cambiaron radicalmente los sistemas de control de plagas y enfermedades (Perry, 2008).

Los plaguicidas pueden ser clasificados de acuerdo con su uso, composición química, naturaleza química, acción específica, concentración, formulación, modo de acción, grado de toxicidad y persistencia en el ambiente. La clasificación más empleada es por su composición química, mediante la cual los plaguicidas son divididos en familias que incluyen a los organoclorados (OC), organofosforados (OF), carbamatos, piretroides, neonicotinoides, entre otros.

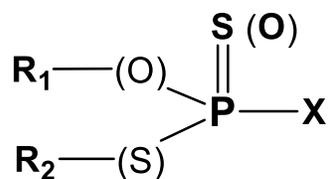
La Organización Mundial de la Salud (OMS ó WHO, por sus siglas en inglés) en el 2009 y la US-EPA en 2001, establecieron una clasificación basada en la toxicidad aguda y la peligrosidad de los plaguicidas. La toxicidad se determinó con base a la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) (Tabla 1).

**Tabla 1. Clasificación de los plaguicidas de acuerdo con su toxicidad**

<b>Toxicidad aguda a los plaguicidas</b>			
<b>Clasificación OMS</b>		<b>Clasificación US-EPA</b>	
Ia	Extremadamente peligroso	I	Altamente tóxico
Ib	Altamente peligroso		
II	Moderadamente peligroso	II	Moderadamente tóxico
III	Ligeramente peligroso	III	Ligeramente tóxico
U	Poco probable un peligro agudo	IV	Prácticamente no tóxico

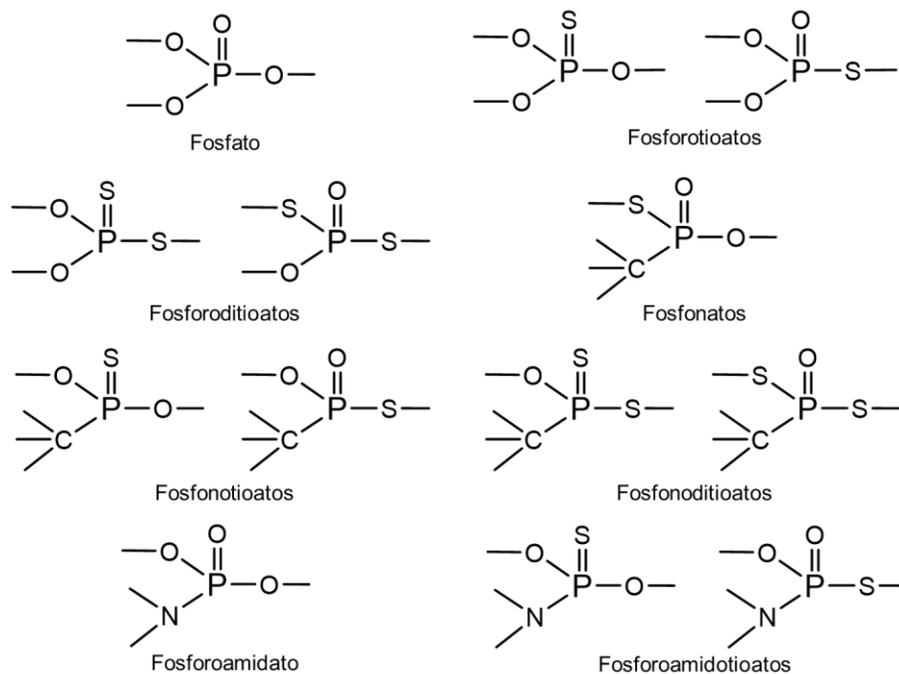
## 1.1 Plaguicidas organofosforados

Los plaguicidas OF (POF) se han utilizado ampliamente en todo el mundo desde la disminución del uso de plaguicidas OC en las décadas de 1960 y 1970. Estos compuestos son menos persistentes en el medio ambiente en comparación con los plaguicidas OC y, por lo tanto, presentan menos riesgos para la salud a largo plazo para los animales y los humanos (Pehkonen y Zhang, 2002). Después de la introducción del paratión en 1944, los POF han sido los plaguicidas más utilizados a nivel mundial (Costa, 2008), tanto en la agricultura como en los hogares. Los POF se consideran derivados sintéticos del ácido fosfórico o del ácido fosfónico en los cuales todos los átomos de hidrógeno han sido reemplazados por grupos orgánicos. En su estructura química general (Figura 1) encontramos un grupo X denominado “grupo saliente” (el más susceptible a la hidrólisis), los grupos R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> (fundamentalmente grupos metoxi o etoxi) y un grupo S (oxígeno o azufre) unido mediante un doble enlace a un fósforo central.



**Figura 1. Estructura química general de los POF.**

En muchos POF, uno o más átomos de oxígeno son reemplazados por azufre y/o nitrógeno (Figura 2). Por las diferencias en su estructura química los POF se clasifican en fosfatos, fosforotioatos, fosforoamidatos, fosfonatos, entre otros (Figura 2). Adicionalmente, el grupo saliente en los POF puede ser de naturaleza diferente; algunos se caracterizan por la presencia de anillos aromáticos, como en el caso de clorpirifos, diazinón y paratión, mientras que en el malatión y el dimetoato este grupo tiene una estructura química lineal. Así mismo, puede estar presente un segundo átomo de azufre sulfoxidable, como ocurre en el fentión y el forato (Buratti y col., 2007).



**Figura 2. Nomenclatura de las principales subclases de POF** (Tomado de Buratti y col., 2007).

### 1.1.1 Mecanismos de toxicidad de los POF

La mayoría de los plaguicidas comerciales son fosforotioatos ( $P=S$ ), los que por sí mismos no poseen capacidad para inhibir a la enzima acetilcolinesterasa (AChE) y se biotransforman a sus análogos óxidos u oxones ( $P=O$ ), los cuales sí manifiestan actividad biológica y están implicados en sus efectos tóxicos (Costa, 2008). Los POF actúan uniéndose de manera covalente al sitio activo de la AChE, inhibiendo competitivamente la hidrólisis de la acetilcolina por esta enzima, lo que produce una acumulación de acetilcolina en las sinapsis neuromusculares alterando el funcionamiento del impulso nervioso. Los efectos tóxicos agudos de los POF se deben a la hiperestimulación de los receptores muscarínicos y nicotínicos, lo que produce síntomas que van desde un aumento de las secreciones hasta la muerte por depresión respiratoria. En el caso de algunos POF se inhibe también la enzima esterasa blanco neuropática (NTE, por sus siglas en inglés) y esta inhibición, junto con el incremento del  $Ca^{2+}$  intracelular por alteración de la enzima calcio-calmodulina-quinasa II, parecen constituir el mecanismo de generación de la neuropatía retardada asociada a toxicidad por POF (Costa, 2008).

## 1.2 Temefos

El Temefos (Tem, fosforotioato de O,O,O',O'-tetrametil-O,O'-tio-bis-*p*-fenileno, CAS: 3383-96-8) (Abate® 4-E, Cyanamid, USA), es un plaguicida no sistémico del grupo de los organofosforotioatos (OFT) (Figura 3) empleado principalmente como larvicida para el control de vectores transmisores de enfermedades. El Tem posee una estructura simétrica con un grupo dimetoxitiofosfato doble que le proporcionan una vasta y compleja combinación de lugares susceptibles de procesos de oxidación e isomerización en cuerpos de agua, el ambiente y al contacto con la luz y organismos (Figura 3). En México y otros países tropicales se comenzó a emplear desde la década de 1970, cuando la OMS recomendó su uso para el tratamiento de agua potable en una concentración que no exceda 1 mg/L (Rozendaal, 1997; WHO, 2009). Entre las presentaciones comerciales de Tem se encuentran: grado técnico (97.4%), concentrado emulsionado (50%), concentrado emulsionado para control de simúlidos (90%) y granulado en arena (1%). La OMS ha clasificado al Tem como un plaguicida ligeramente peligroso (Clase III).

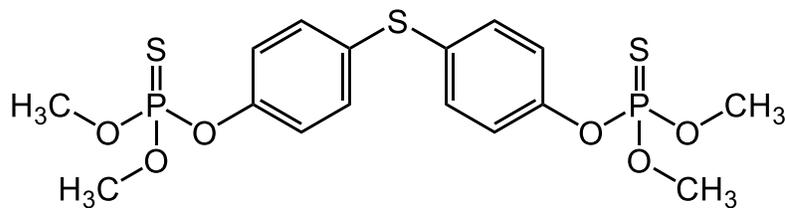


Figura 3. Estructura química del Tem.

### 1.2.1 Propiedades fisicoquímicas de Tem

El Tem posee las siguientes características fisicoquímicas: punto de fusión de 30-30.5 °C, densidad relativa de 1.32 g/cm<sup>3</sup> a 25 °C y un peso molecular de 466.5 g/mol; es soluble en disolventes orgánicos comunes como el dietiléter e hidrocarburos aromáticos y clorados y es poco soluble en agua (0.03 mg/L a 25 °C). Su presión de vapor es de 9.5 x 10<sup>-6</sup> Pa a 25 °C, se hidroliza con ácidos y bases fuertes y se descompone a temperaturas entre los 120 y 125 °C. El Tem tiene un elevado coeficiente de reparto octanol/agua a 25 °C (Log Kow= 4.91), lo que combinado con sus otras características fisicoquímicas ya mencionadas

favorece su absorción y bioacumulación en los organismos vivos (US-EPA, 2008; WHO, 2008).

### **1.2.2 Usos del Tem**

El Tem es uno de los compuestos recomendados por la OMS a nivel mundial como un larvicida (Renshaw y Bobbis, 2006). Desde la década de 1970, se recomendó su aplicación en depósitos de agua potable y no potable para el control de larvas de mosquitos, moscas negras y otros insectos, que constituyen vectores de enfermedades tales como la malaria, dengue, Zika, chikungunya, tifo y oncocercosis. Su uso fue rápidamente adoptado y extendido debido a que este insecticida es de fácil aplicación y barato, posee un buen efecto residual y se puede almacenar fácilmente en condiciones tropicales. A la concentración recomendada de 1 mg/L (1 ppm) de Tem en cuerpos de agua, ésta es inodora, insípida y se considera inofensiva para la vida de los humanos, las plantas y los peces. El Tem también se puede usar para controlar las pulgas en perros y gatos y para controlar los piojos en los seres humanos (Edward y Sogbesan, 2007).

En México, el dengue es una problemática de salud pública desde hace varios años, con reportes a nivel nacional de los 4 serotipos de esta enfermedad. Según un informe de la Secretaría de Salud de México, en 2019 solo la Ciudad de México y Tlaxcala no reportaron incidencia de este virus y el estado de Jalisco tuvo la incidencia más alta con 141.6 casos por cada 100 mil habitantes (Secretaría de Salud, 2019). El Tem es el principal larvicida empleado en las campañas anuales para el control del *Aedes aegypti*, mosquito transmisor del dengue, conocidas en México como “campañas de abatización” en las que se deposita el Tem en los recipientes de agua que puedan servir como criadero de mosquitos en zonas con alta infestación de estos. El Tem también se aplica mediante nebulización (rociado espacial) empleando equipo pesado generalmente ubicado sobre un vehículo que se desplaza a 15 km/h, con una tasa de descarga de 250 mL/min, dejando 167 mL/ha (CENAPRECE, 2010).

### **1.2.3 Toxicocinética del Tem**

La literatura referente a la toxicocinética del Tem es escasa, la mayoría de los estudios sobre este tema fueron realizados en los inicios de su comercialización en los años 60 y hasta 1980.

### **1.2.3.1 Absorción**

Dado que la principal forma de uso del Tem es en granulados de arena que se depositan en contenedores de agua, la principal vía por la que este plaguicida ingresa al organismo es por la vía oral, aunque también existe ingestión inhalatoria y en menor proporción por la vía dérmica. Al realizar las actividades domésticas cotidianas la mayoría de la población entra en contacto con el plaguicida. La exposición por vía inhalatoria ocurre tanto de manera ocupacional durante la fabricación y aplicación del producto como en la población general a través de los aerosoles. La US-EPA considera que la exposición ocupacional (mezclador, cargador y aplicador) a Tem es baja, esto basado en su baja tasa de aplicación, la corta duración de estancia del trabajador en el área tratada y las actividades realizadas por el trabajador (US-EPA, 2008). No obstante, no existe ninguna referencia sobre el monitoreo para evaluar el grado de exposición a Tem de forma ocupacional y no ocupacional.

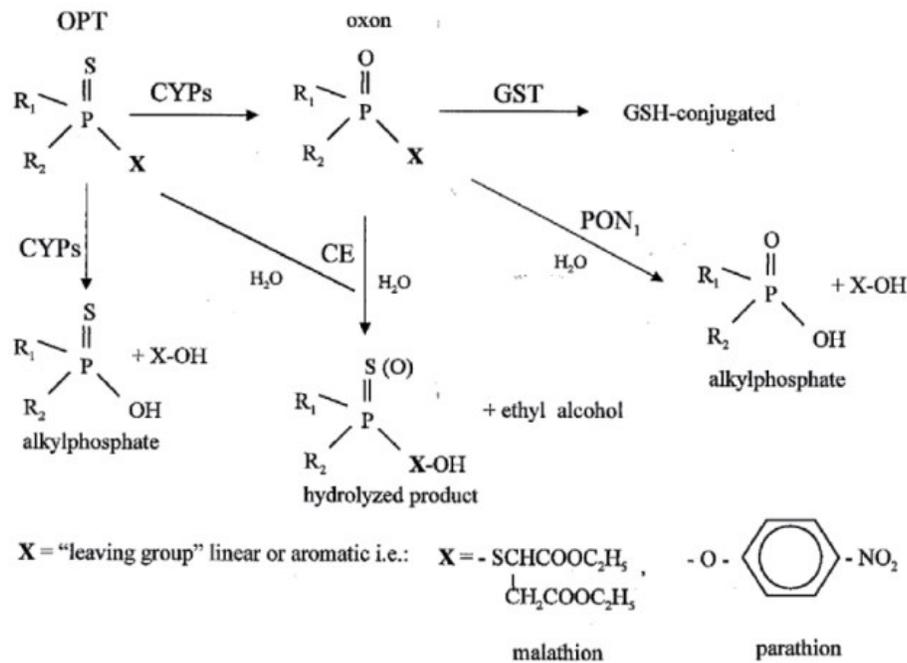
No se ha establecido una dosis de ingesta diaria admisible (IDA) para el Tem. Su elevado coeficiente de partición le permite que se absorba con relativa facilidad en el organismo. Sin embargo, después de una administración por vía oral de Tem en aceite de ajonjolí a ratas macho, se observó que la absorción fue muy baja y que se eliminó en gran medida sin metabolizar por las heces. Por otro lado, se reportó que, después de la exposición por vía dérmica en ratas, el Tem se absorbe aproximadamente en un 38%. La US-EPA considera que el modelo de la rata no es el adecuado para compararse con la posible absorción en seres humanos (US-EPA, 2008).

### **1.2.3.2 Distribución**

Hasta el momento solo se conoce un estudio en el que se analizó la distribución del Tem en dos ratas macho Sprague-Dawley adultas, a las que se les administró 970 y 1 357  $\mu\text{g}$  de Tem tritado por vía oral, respectivamente. En este estudio se observó que el Tem se distribuyó principalmente en el tejido graso, el hígado, los riñones y el estómago. Sin embargo, tras 72 h después de la administración el plaguicida se acumuló en tejido graso. El hígado fue el tercer órgano con mayor concentración de Tem con 0.19 mg/g a las 72 h (Blinn, 1969). Al ser el hígado el principal órgano con capacidad de metabolizar, los metabolitos que se generen al paso por este órgano pueden jugar un papel importante en la generación de posibles efectos tóxicos.

### 1.2.3.3 Biotransformación

El metabolismo es uno de los principales factores que determinan los efectos tóxicos de los POF. Los POF sufren reacciones de S-oxidación, que puede ser catalizada por monooxigenasas que contienen flavina (FMO) y por el citocromo P450 (CYP). Los POF se bioactivan mediante una reacción de desulfuración oxidativa a triésteres de fosfato u oxones, que son los inhibidores potentes de la AChE del cerebro y la eritrocitaria con un incremento en la inhibición de la AChE de hasta 1000 veces (Levi y Hodgson, 1988; Buratti et al., 2007) (Figura 4). Esta bioactivación de los compuestos organofosforados es mediada principalmente por el CYP.



**Figura 4. Ruta metabólica general de los POF:** los componentes pueden ser de estructura aromática (como en el paratión) como de cadenas lineales (como en el malatión). Tomado de Buratti y col., 2007.

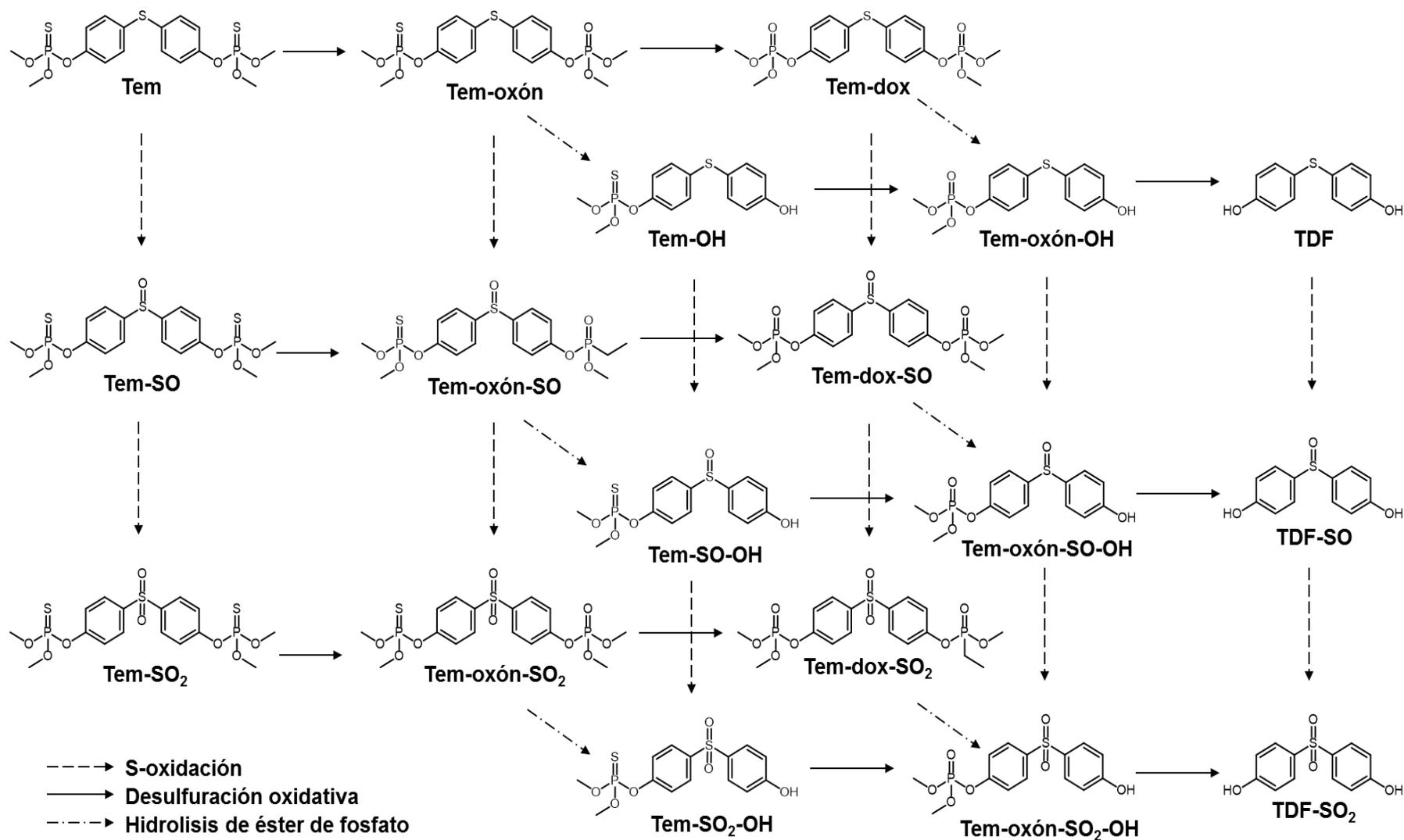
Hasta el momento no se ha establecido una ruta de biotransformación para el Tem ni se han estudiado las enzimas que participan en este proceso. A diferencia de la mayoría de los POF, se considera que el Tem se biotransforma a Tem-oxón incluyendo en los mamíferos, sin embargo, hasta el momento la presencia de este metabolito no ha sido reportada. La presencia de análogos asimétricos del Tem con un mono-oxón y un análogo simétrico con di-oxones solo ha sido observada en hojas de plantas como el frijol y en larvas del mosquito transmisor del dengue (Blinn, 1968, 1969; Leesch y Fukuto, 1972). En los

mamíferos, la formación del Tem-oxón se ha atribuido de manera indirecta a la inhibición de la AChE después de la exposición al plaguicida. Al parecer, los mamíferos tienen la capacidad para generar derivados S-oxidados de Tem, el Tem-sulfóxido (Tem-SO) y el Tem-sulfona (Tem-SO<sub>2</sub>), son ejemplos de estos metabolitos S-oxidados. Otro tipo de biotransformación que se ha podido observar es la hidrólisis de los grupos alquilfosfato para formar 4,4'-tiodifenol (TDF), 4,4'-sulfanildifenol (TDF-SO o SIDP) y 4,4'-sulfonildifenol (TDF-SO<sub>2</sub> o SODP, también llamado bisfenol-S o BPS), además, de un metabolismo de fase II por glucuronidación y sulfatación de los derivados hidrolizados del Tem, sin embargo, para que estos compuestos se generen por acción enzimática es necesaria la formación de oxones como precursores por el CYP (Blinn, 1969).

Para evaluar la relación entre el metabolismo de los mamíferos y la toxicidad del Tem, Ratas Sprague-Dawley hembras fueron sometidas a un tratamiento con Tem a dosis de 30 o 300 mg/kg, en exposición aguda (1 dosis) o subcrónica (1 dosis/d por 5 d). El tiempo de sueño inducido por hexobarbital (TSH) se usó para evaluar indirectamente el efecto del Tem sobre las enzimas metabolizadoras. El TSH fue correlacionado positivamente con la concentración plasmática de Tem y fue significativamente mayor después de la exposición aguda (136%) y subcrónica (192%), respecto al grupo control, indicando que el Tem posee efectos sobre el CYP que son dependientes de la dosis, similar a como ocurre con otros POF (Ferguson y col., 1985).

#### **1.2.3.3.1 Propuesta de la ruta de biotransformación del Tem**

Derivado de las investigaciones realizadas en nuestro laboratorio, se ha propuesto una posible ruta metabólica del Tem (Figura 5), en la cual se han tomado en cuenta los resultados ya referidos expuestos por Blinn (1969), la capacidad del Tem para generar análogos mono- y di-oxones y resultados previos pendientes de publicar de nuestro laboratorio (Verdin-Betancourt y col., 2020).



**Figura 5: Propuesta de ruta de biotransformación para el Tem.** Las flechas representan reacciones de S-oxidación, desulfuración oxidativa e hidrólisis de los ésteres de fosfato. Abrev.: Tem (Temefos), SO (sulfóxido), SO<sub>2</sub> (sulfona), OH (monohidrolizado), dox (dioxón), TDF (tiodifenol). Tomada de Verdín-Betancourt y col., 2020.

Esta ruta solo comprende el metabolismo de fase 1 y reúne reacciones de desulfuración oxidativa que da lugar a los oxones, la cual ha sido descrita para otros POF y S-oxidación del azufre central, ambas con posibilidad de ser llevadas a cabo por el CYP, así como reacciones de hidrólisis sobre los mono- y di-oxones, la cual se ha descrito es llevada a cabo principalmente por esterasas o carboxilesterasas (CE) como la paraoxonasa 1 (PON1) en otros POF.

#### **1.2.3.4 Eliminación**

La principal ruta de eliminación del Tem sin biotransformar y de sus metabolitos sulfoxidados, es a través de las heces, mientras que por la orina se eliminan los metabolitos conjugados o hidrolizados (Blinn, 1969). Se ha calculado un  $t_{1/2 \text{ elim}}$  del Tem de 7 a 10 h, con una eliminación completa de 48 a 72 h (Ferguson y col., 1985).

#### **1.2.4 Toxicidad del Tem**

Hasta ahora, el único mecanismo de toxicidad descrito para el Tem es por inhibición de la enzima AChE (Ferguson y col., 1985). Este efecto se observa comúnmente en animales cuando se exponen repetidamente a Tem a niveles suficientes. Por el contrario, en seres humanos expuestos por largos períodos a bajas concentraciones del plaguicida no se observó esta inhibición (Laws y col., 1967), por lo que se consideró que el Tem es un plaguicida seguro porque no es persistente en el agua y tiene una baja toxicidad aguda para los mamíferos (Aiub y col., 2002; Edward y Sogbesan, 2007).

En comparación con otros POF se considera que el Tem tiene una toxicidad aguda de baja a moderada en los mamíferos. Los signos de toxicidad observados en animales tratados con altas dosis de Tem son típicos de la toxicidad aguda inducidos por la inhibición de la AChE, que incluyen: hiperactividad del sistema nervioso central (SNC), dificultad para respirar, pelaje áspero, cromodiarrrea, salivación, espasmos musculares y temblores. En la rata, la  $DL_{50}$  tiene un rango de 4,000 (machos adultos) a 13,000 mg/kg (hembras adultas), mientras que en el ratón va de 2,062 a 4,700 mg/kg, en conejos de 2,000 a 2,378 mg/kg y en las aves es de 183 a 500 mg/kg, lo que ubica a estas últimas como la especie más sensible. En conejos expuestos por vía dérmica por 14 d, el Tem produjo una disminución de la actividad y pérdida de peso corporal a dosis menores de 200 mg/kg/d y a dosis mayores produjo diarrea, postración y anorexia. Durante la autopsia en estos animales se observó una patología grave a la dosis más alta: sangre en la cavidad abdominal (7 de 10

conejos), áreas hemorrágicas en los intestinos (8 de 10) y decoloración de los riñones (7 de 10) (US-EPA, 2008). En el estudio de Ferguson y col. se indica que la inhibición de la actividad de la AChE eritrocitaria se mantuvo hasta por 48 h posteriores al tratamiento y que ésta estaba inversamente relacionada con la concentración plasmática de Tem, sugiriendo la posible saturación e inhibición de las monooxigenasas de función mixta (MFM) hepáticas y resultando en una distribución del Tem a tejidos periféricos a altas dosis (Ferguson y col., 1985).

La toxicidad del Tem por vía inhalatoria es baja, este compuesto es ligeramente irritante para los ojos, pero no irrita la piel de los conejos ni es un sensibilizante dérmico (Renshaw y Bobbis, 2006).

La US-EPA estableció una NOAEL para el Tem de 0.3 mg/kg/d, mientras que el LOAEL fue de 0.9 mg/kg/d hasta por 90 d en la inhibición de la AChE en ambos sexos, mientras que la OMS estableció una NOAEL de 1.0 mg/kg/d y una LOAEL de 100 mg/kg/d hasta por 44 d tomando como base las evaluaciones de toxicidad aguda. Los datos disponibles son contradictorios y no concuerdan con la clasificación actual para este compuesto (US-EPA, 2000; WHO, 2008)

En un estudio llevado a cabo para evaluar la toxicidad del Tem sobre las células espermáticas, además, de evaluar la inhibición de la actividad de la AChE a distintas dosis, se observó que a la dosis de 1 mg/kg/d/7d hubo una inhibición de la actividad de esta enzima en un 22% al 3<sup>er</sup> día de tratamiento, que llegó a ser de 29 % al finalizar el período de estudio. A una dosis de 100 mg/kg/d/7d se observó una inhibición de a AChE de aproximadamente el 70% a partir del 3<sup>er</sup> día de tratamiento, el deceso del 41% de los animales incluidos en el estudio a partir de la 5<sup>ta</sup> dosis y una disminución del 11.5% del peso relativo del hígado al final del tratamiento (Camacho-Hernández, 2019).

Para evaluar la toxicidad subcrónica del Tem, grupos de 7 ratas recibieron dosis de Tem de 0, 1, 10 ó 100 mg/kg/d por sonda gástrica durante 44 d. Después de 11 d, se detuvo la administración del compuesto de prueba a algunos de los animales del grupo tratado a la dosis más alta. No se observó mortalidad en ninguno de los grupos. Las ratas que recibieron la dosis más alta desarrollaron síntomas típicos de intoxicación por POF después de 3 dosis cuando la actividad de la AChE eritrocitaria fue inhibida en un 64%. (Gaines y col., 1967).

La información toxicológica sobre los efectos crónicos del Tem es muy escasa. La Agencia Francesa de Seguridad Sanitaria de la Alimentación, el Medio Ambiente y el Trabajo (AFSSET) destaca que en la literatura especializada no existe suficiente información sobre el conjunto de los peligros potenciales subcrónicos y crónicos de Tem (AFSSET, 2006). Así mismo, la US-EPA considera que no se puede hacer una evaluación completa del potencial tóxico de Tem debido a la carencia de información relacionada con la toxicidad crónica (US-EPA, 2008).

Con respecto a la carcinogenicidad, sólo existe un trabajo realizado en ratas tratadas crónicamente con Tem (15 mg/kg/d) por dos años, en el cual no se observó la formación de tumores (US-EPA, 2008).

Se han desarrollado estudios para determinar si el Tem es mutagénico con varias cepas de bacterias, la conclusión general de estos estudios es que el Tem no es mutagénico. Otras pruebas en conejos tampoco han mostrado signos de mutagenicidad. No se observaron defectos de nacimiento en la descendencia de conejas preñadas alimentadas con Tem en dos estudios separados que utilizaron diferentes formulaciones de Tem, al 2% y 90%. En ambos estudios, se manifestó la toxicidad materna y la depresión de la actividad de la AChE. Estos datos sugieren que el Tem presenta poco riesgo teratogénico (AFSSET, 2006).

Con base a los resultados de estudios en ratas y conejos, la OMS considera al Tem como un compuesto no genotóxico y no mutagénico, aunque aclara que algunos de los estudios fundamentales en la evaluación no cumplieron con las buenas prácticas de laboratorio (Renshaw y Bobbis, 2006).

Un estudio reciente en un modelo *in vitro* reveló que la exposición al Tem produce efectos citotóxicos y genotóxicos en linfocitos humanos y células HepG2 que fueron expuestas a 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 y 10  $\mu\text{M}$  de Tem, pero también se observó un efecto citostático y apoptótico en ambos tipos celulares, y en las células hepáticas HepG2 (metabólicamente activas) se observó la presencia de micronúcleos, sugiriendo daños a nivel genético lo que sugiere una dependencia de la biotransformación del Tem (Benitez-Trinidad y col., 2015). Por otra parte, el Tem mostró ser genotóxico y mutagénico en un estudio con células de sangre completa de ratas Wistar macho de 8 semanas de edad a concentraciones similares a las utilizadas habitualmente para combatir el *Aedes aegypti* (Aiub y col., 2002).

#### 1.2.4.1 Hepatotoxicidad del temefos

En un estudio reportado a la OMS (reporte confidencial, Fischer, 1986), donde se administró Tem a grupos de 5 ratas macho y 5 hembras a dosis única de 2,500; 5,000 ó 10,000 mg/kg disuelto en aceite de maíz por sonda gástrica seguido de un período de observación de 14 d, se observó que a la dosis más alta el hígado de todos los animales se encontraba decolorado y con presencia de hemorragias en el lumen intestinal. Todos los machos a la dosis de 10,000 mg/kg murieron antes de finalizar el período de observación, lo cual no sucedió con ninguna de las hembras (Renshaw y Bobbis, 2006).

A un grupo de 8 conejos le fue administrada una dosis de Tem de 100 mg/kg/d por 5 d por vía oral, 3 de ellos murieron durante el período de dosificación. Aunque no se realizaron estudios microscópicos, se reportó necrosis difusa del hígado en 2 conejos y necrosis focalizada en otros 2 conejos del grupo tratado. Por el contrario, no se observó necrosis en el hígado de ninguno de los animales del grupo control (Gaines y col., 1967).

En el pez *Aphanius dispar*, un ciprodontiforme conocido como *killifish*, se realizaron estudios microscópicos de la hepatotoxicidad del Tem después de una exposición a 1, 5, 10 ó 25 ppm en el medio. El análisis por microscopía óptica y electrónica de transmisión mostró la degeneración de las células hepáticas la cual comenzó a partir de la exposición a 1 ppm y progresó constantemente para mostrar los cambios máximos a 25 ppm. En los peces de los grupos tratados los cambios histopatológicos incluyeron la dilatación de sinusoides, aumento en el número de gotas de lípidos y formación de vacuolas en el citoplasma, condensación de la cromatina, contracción del núcleo y necrosis focal (Ba-Omar y col., 2013).

En estudios preliminares de nuestro laboratorio, en ratas Wistar macho adultas tratadas con Tem a una dosis de 100 mg/kg/d emulsificado con solución salina por 7 d por sonda gástrica se evidenció una disminución de 11.5 % en el peso relativo del hígado, un aumento de los niveles de los diferentes tipos de bilirrubina (directa, indirecta y total) y un desbalance lipídico caracterizado por la disminución de los triglicéridos, el colesterol de muy baja densidad y los lípidos totales. En otros ensayos de biotransformación *in vitro* empleando microsomas hepáticos de ratas (MHR) previamente tratadas con Tem se observó una disminución en la biotransformación del Tem hacia sus metabolitos oxidados con respecto a MHR no tratadas, lo que sugirió que la exposición a Tem afecta las enzimas encargadas de su propio

metabolismo, entre ellas el CYP. Aunque es poca la literatura referente a la hepatotoxicidad del Tem, la acumulación del plaguicida en el hígado y los estudios comentados anteriormente sugieren que el hígado es un órgano blanco del Tem.

### **1.3 Citocromo P450 (CYP)**

#### **1.3.1 Generalidades**

Los CYP comprende una superfamilia de hemo-tiol proteínas presentes en todos los seres vivos (Lin y Lu, 1998). Son las enzimas principales que se encargan del metabolismo de esteroides, ácidos biliares y grasos y vitaminas (Bernhardt, 2006), así como de la biotransformación de xenobióticos, entre los que se incluyen fármacos y contaminantes ambientales. Más del 90% de todo el metabolismo de los xenobióticos en el hombre está mediado por el CYP (Pelkonen, 2004)

Los CYP involucrados en el metabolismo de xenobióticos son expresados mayoritariamente en el hígado y en menor magnitud en el intestino delgado, aunque están presentes en virtualmente todos los tejidos del organismo. Niveles bajos de algunas isoformas de CYP han sido encontrados en tejidos extrahepáticos como en el pulmón, riñón, piel y en el SNC. Se localizan principalmente en el retículo endoplásmico liso y en menor proporción en la membrana interior de la mitocondria (los involucrados en la biosíntesis de hormonas esteroideas y el metabolismo de la vitamina D), el citosol y la membrana plasmática (Chang y Kam, 1999; Peterson y Graham, 1998; Seliskar y Rozman, 2007).

Los CYP se nombran siguiendo un criterio en común, éstos se agrupan en familias y subfamilias en función de la similitud de la secuencia de aminoácidos. Para nombrarlos se coloca el prefijo CYP seguido de un número arábigo con el que se designa a la familia, la subfamilia se designa por una letra mayúscula después de la familia, finalmente se coloca un número con el que se designa al gen de la isoforma. Los miembros de una familia deben poseer una similitud en su secuencia de aminoácidos mayor al 40% y los de una subfamilia del 55%. Los CYP recibieron su nombre porque tienen un pico máximo de absorción de luz a 450 nm cuando se forma el complejo entre el grupo hemo reducido de la proteína y el monóxido de carbono (CO) (Chang y Kam, 1999). Su peso molecular se encuentra entre 48 y 56 KDa (Souček y Gut, 1992).

En los seres humanos y otras especies de mamíferos, las familias CYP1, 2 y 3 están asociadas principalmente con el metabolismo de fase I de compuestos exógenos, siendo

las isoformas más importantes en el humano los CYP3A4, 2D6, 2C9, 1A2 y 2C19, con alguna contribución de los CYP2E1, 2A6, 2C8 y 2B6 (Furge y Guengerich, 2006) y en la rata los CYP1A1/2, 2A1/2, 2D1/2, 2C11, 2E1 y 3A1/2 (Hodgson y Golstein, 2001; Souček y Gut, 1992).

La expresión de muchas isoformas de CYP es específica de tejido y algunas de ellas presentan ortólogos en otras especies; además, unas cuantas isoformas están presentes constitutivamente, mientras que otras son inducibles, es decir, su expresión puede ser incrementada, lo que usualmente ocurre en respuesta ante la presencia de xenobióticos en el organismo. Esta inducción de los CYP es un proceso mediado por un conjunto de receptores nucleares (RN) que se activan por ligandos, los cuales también son llamados xenosensores. Estos xenosensores poseen un dominio de unión a ligando y un dominio de unión al ADN y a través de una secuencia de eventos que incluye la disociación de proteínas accesorias y su asociación a coactivadores, regulan al alza la transcripción de varios genes que codifican enzimas metabolizadoras de xenobióticos, especialmente CYP, lo que generalmente aumenta varias veces las concentraciones de estas enzimas. La inducción es una respuesta reversible y adaptativa a la exposición a xenobióticos. Las enzimas inducidas (y los transportadores) generalmente aceleran la eliminación del xenobiótico que desencadenó el proceso de inducción, en cuyo caso se dice que el xenobiótico es un autoinductor (induce su propio metabolismo). Los xenobióticos a menudo inducen enzimas que no son capaces de metabolizarlos, en cuyo caso se dice que la inducción es “gratuita”. A menudo, la activación de los xenosensores lleva a la inducción de múltiples enzimas, lo que se conoce como respuesta pleiotrópica (Parkinson y col., 2013).

### **1.3.2 Actividad catalítica**

El CYP cataliza la biotransformación de una gran variedad de compuestos endógenos y exógenos estructuralmente diversos, proceso que se realiza principalmente en el hígado y el intestino delgado. La gran gama de reacciones químicas catalizada y la amplia variedad de clases estructurales de sus sustratos hacen del CYP uno de los catalizadores más versátiles conocidos, que pueden metabolizar miles de sustratos diferentes (Furge y Guengerich, 2006). La principal función del CYP es transformar un compuesto químico lipofílico, de fácil absorción en el TGI y otros sitios, en un compuesto hidrofílico que pueda ser rápidamente excretado en la orina y la bilis, participando así en su eliminación, también

participa en procesos de activación metabólica, de manera que compuestos inertes y poco reactivos son convertidos en otros de mayor reactividad química que pueden resultar tóxicos para el organismo. Igualmente son responsables de la activación de compuestos químicos carcinogénicos (Guengerich, 1995).

Por la capacidad de transferir un átomo de oxígeno al sustrato también los CYP son conocidos como mono-oxigenasas. La reacción general catalizada por los CYP es la siguiente:

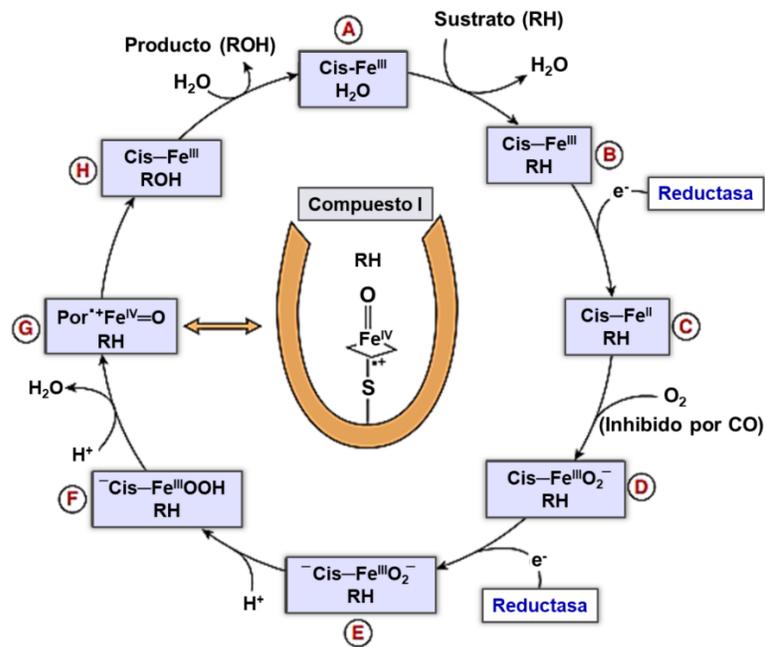


donde R representa el sustrato y R-OH el sustrato oxidado (Chang y Kam, 1999).

La actividad catalítica del CYP es absolutamente dependiente de NADPH y el oxígeno molecular para la monooxigenación del sustrato. Durante la catálisis, el CYP se une directamente al sustrato y al oxígeno molecular, pero no interactúa directamente con NADPH. El mecanismo por el cual el CYP recibe electrones de NADPH depende de la localización subcelular de CYP. En el retículo endoplásmico, que es donde se localizan la mayoría de las enzimas CYP involucradas en la biotransformación xenobiótica, los electrones se transmiten del NADPH al CYP a través de una flavoproteína llamada NADPH citocromo P450 reductasa (también conocida como oxidorreductasa). Dentro de esta flavoproteína, los electrones se transfieren del NADPH a CYP a través de FMN y FAD.

El CYP cataliza una amplia variedad de reacciones, incluyendo epoxidaciones, *O*-, *S*- y *N*-desalquilaciones, *N*- y *S*-oxidaciones e hidroxilaciones de sustratos aromáticos y alifáticos y, dependiendo de la disponibilidad de oxígeno en el tejido, reacciones de reducción (Guengerich, 2001). El centro catalítico del CYP es el átomo de hierro hexa-coordinado con los 4 anillos pirrólicos de la protoporfirina IX, con el grupo tiol de un residuo de cisteína de la cadena polipeptídica y con el disolvente, normalmente agua.

Aunque existe consenso en que el ciclo catalítico del CYP no está completamente dilucidado, la Figura 7 muestra un esquema reciente sobre el mecanismo generalmente aceptado que describe el ciclo catalítico, que involucra varios pasos.



**Figura 6. Ciclo catalítico del CYP.** El CYP se representa como Cis-Fe<sup>III</sup>, donde Cis representa el quinto ligando (un tiolato de cisteína) al hierro férrico del grupo hemo. RH: sustrato. ROH: producto (metabolito hidroxilado). Modificado de Parkinson y col., 2013.

El ciclo comienza con la unión del sustrato (RH) al CYP (A → B), el hierro del hemo se reduce del estado férrico (Fe<sup>3+</sup>) al ferroso (Fe<sup>2+</sup>) mediante la introducción de un electrón provisto por la NADPH-CYP reductasa (B → C), cambiando el estado del hierro hemo de spin bajo a spin alto. Esto facilita que el CYP se pueda unir al oxígeno. En el tercer paso (C → D), el oxígeno se une al hierro ferroso, que transfiere un electrón al oxígeno para formar el anión superóxido unido al hierro (Cys-Fe<sup>3+</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup>). En la cuarta etapa (D → E), se introduce un segundo electrón desde la NADPH-CYP reductasa, reduciendo el aducto de Fe<sup>3+</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup> para formar un intermediario supernucleofílico ferroperoxo (<sup>-</sup>Cys-Fe<sup>3+</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup>) breve. El desacople en esta etapa libera peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). En la quinta etapa (E → F), la adición de un protón (H<sup>+</sup>) convierte el intermediario supernucleofílico ferroperoxo en su hidroperóxido correspondiente, el intermediario ferrohidroperóxido (<sup>-</sup>Cys-Fe<sup>3+</sup>OOH). En el sexto paso (F → G), la adición de un segundo protón y la liberación de agua convierte el intermediario ferrohidroperoxo en el compuesto I (Por<sup>•+</sup>Fe<sup>IV</sup>=O), una especie de catión radical de hierro<sup>IV</sup>-oxo (o ferrilo) porfirina, que es altamente reactiva. Se ha sugerido que puede ocurrir un rompimiento heterolítico del átomo de oxígeno para producir el compuesto

Lo cual coloca al hierro en el estado de oxidación del perferrilo ( $\text{Fe}^{\text{V}}$ ), que es un oxidante considerablemente más fuerte que el formado por la escisión homolítica del oxígeno, pero no hay evidencia suficiente para soportar esta hipótesis. En la séptima etapa ( $\text{G} \rightarrow \text{H}$ ), el oxígeno altamente electrofílico del compuesto I se transfiere al sustrato (RH) para producir el metabolito (ROH). En el paso final ( $\text{H} \rightarrow \text{A}$ ), se libera el metabolito oxidado, que restaura la enzima a su estado de reposo inicial (férico).

Debido al papel primordial del CYP en el metabolismo de compuestos endógenos (como las hormonas y las vitaminas) y de xenobióticos, la inducción o inhibición de los CYP puede afectar la biosíntesis y el metabolismo normales de las moléculas endógenas y exógenas y, por lo tanto, interferir con los procesos biológicos regulares que conducen a consecuencias toxicológicas o generar un desbalance no deseado entre la generación de metabolitos tóxicos y la detoxificación de un xenobiótico, provocando una respuesta beneficiosa o peligrosa para la salud (Lin y Lu, 1998).

### **1.3.3 Familias del CYP**

Las familias CYP1, 2, 3 y parcialmente la 4 se encargan de metabolizar la mayor parte de los xenobióticos conocidos, aunque es importante mencionar que también participan en el metabolismo de diversos compuestos endógenos. Aunque cada isoforma de CYP presenta su propia especificidad de sustrato, un xenobiótico puede ser sustrato de diferentes isoformas, que pueden generar el mismo metabolito o bien producir metabolitos diferentes (Seliskar y Rozman, 2007).

#### **1.3.3.1 Familia CYP1**

En todas las especies de mamíferos que se han evaluado hasta el momento, esta familia posee 2 subfamilias que poseen similitud de función y regulación altamente conservada: el CYP1A y 1B. Esta familia posee considerable atención toxicológica porque el control transcripcional del CYP ocurre a través de la vía del receptor de hidrocarburos aromáticos (AhR), por lo que es altamente inducible por agonistas de este receptor, como la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) y los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y porque poseen un papel trascendental en la activación de compuestos carcinogénicos y mutagénicos como los propios HAPs, la aflatoxina B<sub>1</sub>, entre otros.

Las isoformas CYP1A1 y 1A2 poseen sustratos comunes en todas las especies y aunque poseen estructura primaria similar y un inductor común que es el 3-metilcolantreno, se ha

demostrado que poseen diferencias en su sitio catalítico, pues metabolizan sustratos diferentes. Otra de las diferencias radica en su distribución entre los diferentes tejidos, mientras que el CYP1A2 está expresado altamente en el hígado y no en tejidos extrahepáticos, el CYP1A1 está expresado en un gran número de tejidos extrahepáticos como el pulmón, el riñón y las células sanguíneas periféricas, pero se expresa en concentración baja en el hígado. Solo el CYP1A2 contribuye significativamente al aclaramiento *in vivo* de xenobióticos (Shimada, 2006). El CYP1B1 está también expresado solo en tejidos extrahepáticos, se ha descrito su presencia de manera importante en el riñón fetal, el corazón, el cerebro, el bazo, el timo, la próstata, el pulmón, los ovarios, el intestino delgado, el colón, el útero y las glándulas mamarias (Guengerich, 2005).

### 1.3.3.2 Familia CYP2

En la rata, esta familia está conformada por 6 subfamilias (CYP2A, 2B, 2C, 2D, 2E y 2J). Los miembros de esta familia tienen una gran diversidad de sustratos, comprenden desde moléculas pequeñas de peso molecular bajo hasta moléculas de peso molecular elevado y de estructura química diversa.

**CYP2A.** Las enzimas que pertenecen a la subfamilia del gen *CYP2A* muestran marcadas diferencias en la función catalítica y la inducibilidad entre especies e incluso entre cepas.

En la rata, esta subfamilia contiene 3 isoformas que difieren en la especificidad de sustrato, la distribución de tejido y la respuesta a inductores e inhibidores. El CYP2A1 hidroxila la testosterona en la posición 7 $\alpha$ - y 6 $\alpha$ - y se expresa principalmente en el hígado de ratas hembra (Nagata y col., 1987), mientras que el CYP2A2 hidroxila la testosterona en la posición 15 $\alpha$ - y es preferentemente expresada en ratas macho (Matsunaga y col., 1988). El CYP2A3 lleva a cabo la reacción de hidroxilación de la coumarina en la posición 7 $\alpha$ - y se expresa principalmente en el pulmón tanto de ratas macho como hembras (Kimura y col., 1989). Solo el CYP2A1 y el CYP2A3 son inducibles por 3-metilcolantreno. En el humano, las principales isoformas de esta subfamilia son el CYP2A6, 2A7 y 2A13 (Parkinson y col., 2013). La expresión de la subfamilia es inducible por fenobarbital (Fb) (Guengerich, 2005). Las características generales de los sustratos del CYP2A muestran cierto grado de superposición con las del CYP2B y 2E1.

**CYP2B.** Esta subfamilia está presente en la rata con las isoformas CYP2B1, 2B2 y 2B3, las cuales son altamente inducidas por el Fb. Los niveles en hígado son bajos y muy variables,

en general representa un contenido < 1% del CYP total. Su inducción está mediada por el RN CAR (receptor constitutivo de androstano) y probablemente también por PXR (receptor X de pregnano) (Donato y O'Connor, 2004). El CYP2B1 ha sido detectado en el pulmón, el hígado, el testículo y el cerebro. Mientras que el CYP2B2 se ha encontrado en el hígado y el cerebro. Algunos de los principales sustratos para esta subfamilia son la pentoxiresorufina y la etoxicoumarina, otros sustratos son también el bromobenceno, el benzo(a)pireno y la aflatoxina B<sub>1</sub>. Esta subfamilia parece tener importancia limitada en seres humanos siendo el CYP2B6, la principal isoforma expresada en esta especie (DeBethizy y Hayes, 2001).

**CYP2C.** Esta es la subfamilia más abundante en la rata, al menos 13 miembros de esta subfamilia han sido identificados en esta especie (CYP2C6, 2C7, 2C11, 2C12, 2C13, 2C22, 2C23, 2C24, 2C46, 2C77, 2C79, 2C80, 2C81) (Parkinson y col., 2013). En esta especie algunos de los CYP2C son específicos del género, lo que no ocurre en los humanos, como es el caso de los CYP2C11 y 2C13, los cuales son específicos de los machos y el CYP2C12 de las hembras, debido a que la expresión de esta subfamilia está regulada por la hormona del crecimiento (GH, por sus siglas en Inglés) que presenta un patrón dimórfico (Mode y col., 1998). Los CYP2C7 y 2C22 también son regulados por la GH (Sasamura y col., 1990; Nagata y col., 1991). Otro aspecto importante en la rata es que los integrantes de esta familia se expresan principalmente en el hígado. El CYP2C11 es la isoforma específica de los machos más abundante en la rata adulta, la cual aparece en el hígado cuatro semanas después del nacimiento y llega a constituir aproximadamente 50% del contenido de CYP total hepático en la edad adulta (Ryan y Levin, 1990), hasta la senescencia de la rata donde sus niveles vuelven a decaer significativamente (Kamatagi y col., 1985). Esta isoforma puede ser considerada como el homólogo funcional del CYP2C9 humano (Wójcikowski y col., 2013).

Cuatro isoformas de esta subfamilia han sido detectadas en el humano: CYP2C8, 2C9, 2C18 y 2C19. El CYP2C8 está presente en el intestino delgado (duodeno), la piel, las glándulas adrenales y mamarías, el cerebro, el útero y los ovarios, en el hígado su expresión es relativamente baja y en el riñón alta por lo que puede ser el órgano de principal expresión. Parece ser que la expresión de esta subfamilia está regulada por CAR y PXR, por lo que sus agonistas, tales como Fb y rifampicina las inducen considerablemente (Parkinson y col., 2013).

**CYP2D.** La rata tiene 6 miembros de esta subfamilia que son: CYP2D1, 2D2, 2D3, 2D4, 2D5 y 2D18, los cuales se han encontrado principalmente en el hígado y el riñón (Hiroi y col., 2002; Parkinson y col., 2013). Mientras que en el humano solo se ha detectado el CYP2D6 y dos pseudogenes *CYP2D7* y *2D8*. El CYP2D6 se expresa principalmente en el hígado adulto, aunque también ha sido detectada en niveles bajos en las neuronas del cerebro, el pulmón (mucosa bronquial y parénquima) y el hígado fetal. La expresión de esta isoforma aumenta de manera importante en la etapa perinatal y disminuye en la etapa adulta. En el humano corresponde 5% del total del CYP (con una variación amplia). Sin embargo, está involucrada en la oxidación de 25% de todos los fármacos oxidados por el CYP y también cataliza hidroxilaciones aromáticas y alifáticas (Guengerich, 2005). Esta isoforma desempeña un papel importante en el metabolismo de los xenobióticos, solo superado por el CYP3A4 en términos de la gran cantidad de medicamentos que metaboliza y posee preferencia a metabolizar aminas lipofílicas, que es la estructura fundamental de la mayoría de los fármacos cardiovasculares y del SNC (Parkinson y col., 2013).

**CYP2E.** Hasta el momento esta subfamilia está conformada por sólo 2 isoformas, los CYP2E1 y 2E2, este último detectado únicamente en el conejo, por lo tanto, el CYP2E1 es considerado el único miembro de esta subfamilia y parece estar restringido a los mamíferos con una función y regulación relativamente bien conservada entre las diferentes especies de mamíferos (Parkinson y col., 2013). Se expresa constitutivamente en el hígado y el riñón, aunque se le puede encontrar a niveles bajos en el pulmón, el esófago, el intestino delgado, el cerebro, la mucosa nasal, los testículos y el páncreas (Souček y Gut, 1992). Representa menos del 10% del total de CYP en el hígado del ser humano, aunque puede alcanzar hasta 50% en algunas personas, además, presenta polimorfismo entre las razas; por ejemplo, los japoneses presentan niveles más bajos que los caucásicos (Guengerich, 2005). El CYP2E1 de la rata y el ser humano presentan una similitud elevada en cuanto a la especificidad por sustratos. Esta isoforma ha mostrado metabolizar más de 70 diferentes compuestos con diferente estructura química caracterizados casi todos por un bajo peso molecular, tales como: alcoholes, aldehídos, hidrocarburos alifáticos, éteres, ácidos grasos, hidrocarburos halogenados (anestésicos), cetonas y heterociclos (DeBethizy y Hayes, 2001). Esta isoforma es relativamente inducible (<5 veces) y entre sus mejores sustratos se encuentra el etanol, la isoniazida, el tetracloruro de carbono, el cloroformo, el halotano y el acetaminofén (Parkinson y col., 2013).

### **1.3.3.3 Familia CYP3**

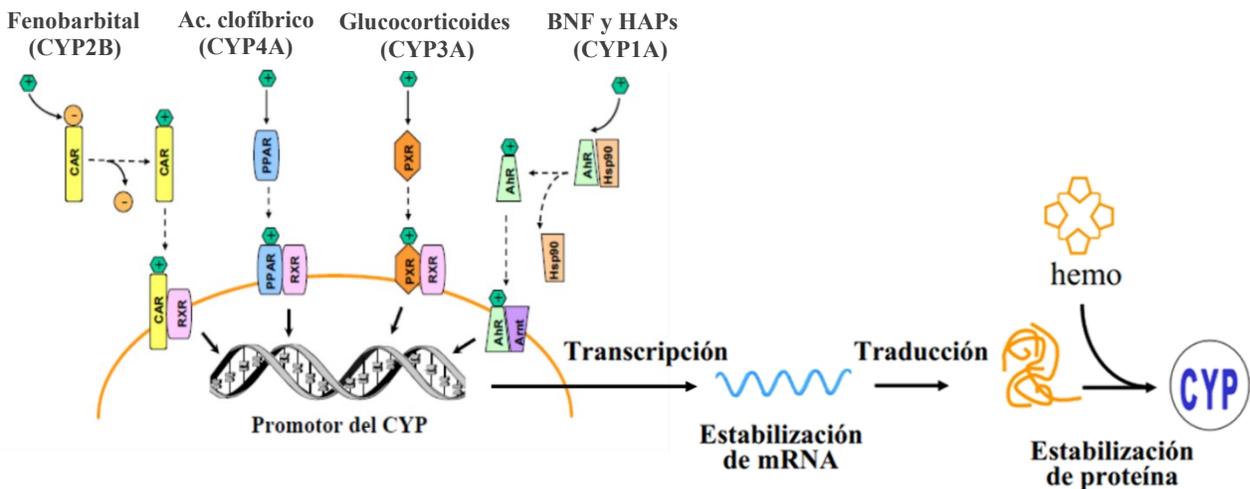
Esta familia incluye las isoformas CYP3A1 y 3A2 como las importantes en las ratas. En el humano se han identificado los CYP3A3, 3A4, 3A5 y 3A7, además, de otras isoformas en especies como los conejos, los perros, etc. La función y regulación de las enzimas CYP3A está bastante bien conservada entre los mamíferos, con algunas excepciones notables. Numerosos medicamentos, derivados de plantas, aditivos de alimentos y xenobióticos en general inhiben o inducen a las subfamilias CYP3A1/2, convirtiéndolo en el centro de muchas interacciones toxicológicas (Parkinson y col., 2013). Se encuentra principalmente expresada en el hígado y el intestino delgado, lo que permite que los integrantes de esta familia jueguen un papel fundamental en la detoxificación y eliminación presistémica de los xenobióticos (Parkinson y col., 2013).

En términos del número de compuestos que metaboliza, esta familia es la más importante entre los CYP, pues el CYP3A metaboliza cerca de la mitad de todos los xenobióticos conocidos (Gonzalez y col., 2011) Los compuestos que biotransforma incluyen una gran variedad de sustratos tanto endógenos (hormonas esteroideas, esteroides y vitamina D) como numerosas clases de xenobióticos, con amplia diversidad estructural y de relativo peso molecular alto, como el omeprazol, el midazolam, la quinidina, las ciclosporinas y las dihidropiridinas. Las principales reacciones llevadas a cabo por el CYP3A1/2 para estos sustratos incluyen la oxidación, la desalquilación, la nitrorreducción y la hidroxilación. Las isoformas de esta familia en el hígado alcanzan hasta un 30% del total. El CYP3A1/2 también se ha encontrado en cantidades pequeñas en el riñón, la piel, el pulmón, el estómago y el colon (Guengerich, 2005; DeBethizy y Hayes, 2001).

### **1.3.4 Regulación de la expresión de los CYP450**

La expresión de cada CYP está influenciada por una combinación única de mecanismos y factores que incluyen polimorfismos genéticos, inducción por xenobióticos, regulación por citocinas, hormonas y durante estados de enfermedad, así como sexo, edad y otros (Zanger y Schwab, 2013). En los roedores y seres humanos, la expresión de los CYP de las familias 1-4 está regulada por varios mecanismos, de los cuales la mayoría requiere de una transcripción génica y son mediados por varios factores nucleares, incluyendo proteínas receptoras que actúan en el núcleo (Lewis, 2001). Los RN incluyen moléculas de señalización que funcionan como factores de transcripción de unión a ligando, los que una

vez activados se unen a secuencias específicas en el ADN regulando la transcripción de diversos genes de CYP (Figura 8). Dentro de los RN involucrados en la regulación de CYP se encuentra CAR, PXR y el receptor activador de la proliferación de peroxisomas (PPAR- $\alpha$ ). El PXR y el CAR son particularmente importantes en la expresión de las subfamilias CYP2B y 3A y PPAR- $\alpha$  es importante en la expresión de la subfamilia 4A. Otra clase de RN involucrados en la expresión de los CYP es la superfamilia bHLH/PAS (hélice-asa-hélice básica/Per-ARNT-Sim), de los cuales el AhR participa de manera importante en la modulación de la expresión de la subfamilia CYP1A en distintas especies (Hankinson, 2005). De igual manera la expresión de algunas isoformas de CYP está regulada por hormonas, como es el caso de la subfamilia CYP2C11.



**Figura 7. Mecanismo de regulación génica de la expresión del CYP.** Modificado de Donato, 2004.

### 1.3.5 Inducción del CYP

La inducción ha sido clásicamente definida como la síntesis de *novoo* de nuevas moléculas como resultado de un incremento en la transcripción del respectivo gen después de un estímulo apropiado. Sin embargo, en la investigación de metabolismo de xenobióticos ha sido usado como un término genérico que describe un incremento en la cantidad y/o actividad de una enzima que metaboliza xenobióticos como resultado de una exposición a un “inductor”, cualquiera que sea el mecanismo subyacente (Pelkonen, 2004).

La inducción produce una resistencia transitoria a la toxicidad de muchos compuestos al ser estos metabolizados en corto tiempo; sin embargo, éste no es el caso de aquellos compuestos que requieren activación metabólica para generar metabolitos tóxicos. El resultado tóxico de este incremento en el metabolismo será dependiente del xenobiótico y de su vía metabólica. Como es fácil suponer, el rango de fármacos y compuestos químicos que tienen la habilidad de inducir el metabolismo hepático de xenobióticos ha sido más directamente estudiado en animales de laboratorio que en el ser humano. Algunos de los inductores más conocidos son el Fb que induce frecuentemente a los CYP2B y 3A, la BNF que induce a la familia CYP1 y el etanol que induce al CYP2E1 (Parkinson y col., 2013).

El efecto de los diferentes tipos de plaguicidas sobre los CYP muestra una variabilidad alta y depende de la estructura química de cada grupo. Los CYP son más sensibles a los POF que a cualquier otro grupo de plaguicidas (Abass y col., 2009), esto debido al mecanismo de inhibición suicida demostrado para estos compuestos (Neal y Halpert, 1982; Butler y Murray, 1997) y a la variedad de tipos de átomos (ej. C, O, P, N, S y Cl) y de grupos (ej. ácidos, alcoholes, ésteres y éteres) presentes en los POF, lo cual aumenta las oportunidades para las reacciones de fase 1 (Abass y Pelkonen, 2013)

En el caso del Tem, prácticamente no hay información sobre el efecto que puede ejercer sobre la expresión de los CYP en el hígado y la inducción o inhibición del metabolismo de xenobióticos y la poca información existente es controversial. El único reporte al respecto fue realizado por Ennin y Franklin después de administrar a grupos de ratas CFHB-Wistar a dosis de Tem de 10 y 300 mg/kg/d por períodos de 4, 7 ó 10 d, indicando que el Tem incrementó los niveles de CYP cuando se administró a la dosis de 300 mg/kg/d durante 4 d y que hubo una ligera reducción de sus niveles a los 7 y 10 d de tratamiento con ambas dosis (Ennin y Franklin, 1979). En este reporte se sugiere un efecto dependiente de la dosis y el tiempo de tratamiento y no se hace referencia a que influencia tuvo el Tem sobre las isoformas de CYP, lo que indica la necesidad de realizar estudios con el fin de determinar el efecto del Tem sobre las actividades enzimáticas inducidas o inhibidas asociadas a los CYP. Otro reporte es el de Ferguson (1985), quién también trató ratas Sprague-Dawley en forma aguda y subcrónica y observó un aumento en el TSH, este efecto lo consideró como una saturación de las monooxigenasas hepáticas involucradas en su biotransformación sin inducción del CYP total.

### **1.3.6 Inhibición de CYP**

Cuando existe interés en identificar a la(s) enzima(s) involucrada(s) en una reacción enzimática, el uso de inhibidores químicos o anticuerpos representa una excelente herramienta. Los inhibidores enzimáticos son moléculas que se unen a las enzimas disminuyendo su actividad catalítica. La unión de un inhibidor a la enzima puede impedir la entrada del sustrato al sitio activo y/u obstaculizar que la enzima catalice su reacción. Dentro del grupo de inhibidores de CYP se tienen disponibles 2 tipos: a) los inhibidores químicos generales y selectivos y b) los anticuerpos para isoformas de CYP (Khojasteh y col., 2011)

#### **1.3.6.1 Inhibidores químicos**

Son numerosos los ejemplos de xenobióticos considerados como inhibidores de los CYP, pero son pocos los capaces de inhibir a toda esta superfamilia, tales como el monóxido de carbono, la *N*-octilamina y el *N*-benzilimidazol (Grothusen y col., 1996). Algunos inhibidores químicos son moléculas que, tras unirse al centro catalítico de la enzima, son oxidados a muy baja velocidad o son compuestos que se unen reversible o irreversiblemente al centro catalítico. Los inhibidores más útiles desde el punto de vista experimental son los que inhiben una isoforma individual de CYP (Donato y O'Connor, 2004). Como por ejemplo la  $\alpha$ -naftoflavona, la furafilina, la pilocarpina, el sulfafenazol, la quinidina, el disulfiram y el ketoconazol, los cuales son inhibidores específicos de las isoformas CYP1A1, 1A2, 2A6, 2C9, 2D6, 2E1 y 3A4, respectivamente (Guengerich, 2005).

## **1.4 Justificación**

El Tem es un insecticida OF empleado como larvicida para el control del mosquito transmisor de arbovirus como el dengue, el Zika y el chikungunya. En México y otros países tropicales se comenzó a usar desde 1972, cuando la OMS recomendó su uso en agua potable a una concentración no mayor a 1 ppm debido a que se considera inocuo o de muy baja toxicidad en exposiciones agudas.

Los POF (P=S) requieren de una reacción de desulfuración oxidativa dependiente del CYP para generar oxones (P=O) que son los responsables de su actividad biológica aumentada. En su estructura molecular el Tem tiene 3 átomos de azufres oxidables y posee la capacidad para producir hasta un análogo dioxón. La presencia del mono-oxón y di-oxones del Tem solo ha sido reportada en plantas como el frijol y en larvas de mosquitos, la formación del Tem-oxón solo ha sido evidenciada de manera indirecta por la inhibición de la AChE. En la literatura se ha descrito la presencia de derivados S-oxidados del Tem, así como de otros productos aromáticos de la hidrólisis de éstos en ratas tratadas con Tem, estos compuestos poseen escaso efecto inhibitor sobre la actividad de la AChE.

La información sobre la inducción de los CYP hepáticos por la exposición repetida a Tem es controversial y muy limitada. El hígado es un órgano blanco del Tem, ya que provoca la disminución en el peso relativo de este órgano y altera el patrón metabólico del Tem, lo que sugiere que el Tem afecta algunas isoformas del CYP. A la fecha, no existen reportes que nos indiquen de manera contundente si el Tem es capaz de afectar la expresión del CYP y la participación de estas enzimas en la bioactivación del plaguicida, por lo que resulta de suma importancia su caracterización para comprender la toxicidad de dicho compuesto.

## **1.5 Hipótesis**

La exposición de ratas a dosis repetidas de Tem provocará cambios en los niveles y la actividad de isoformas de CYP hepáticos, lo que alterará su propia biotransformación.

## **1.6 Objetivos**

### **1.6.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto de la exposición repetida a Tem sobre la expresión de isoformas del CYP hepático de rata Wistar macho y la participación de estas enzimas en la biotransformación del plaguicida.

### **1.6.2 Objetivos específicos**

- I. Evaluar el efecto de la exposición repetida a Tem sobre la expresión de las principales isoformas de CYP hepático por medio de su actividad enzimática.
- II. Evaluar el efecto de la exposición repetida a Tem sobre las enzimas encargadas de su propia biotransformación, mediante el empleo de microsomas hepáticos.
- III. Determinar la participación de las principales isoformas de CYP hepático en la ruta de biotransformación del Tem, mediante el empleo de ensayos *in vitro* con microsomas hepáticos empleando inductores e inhibidores químicos.

## **2. Materiales y Métodos**

### **2.1 Origen de los reactivos**

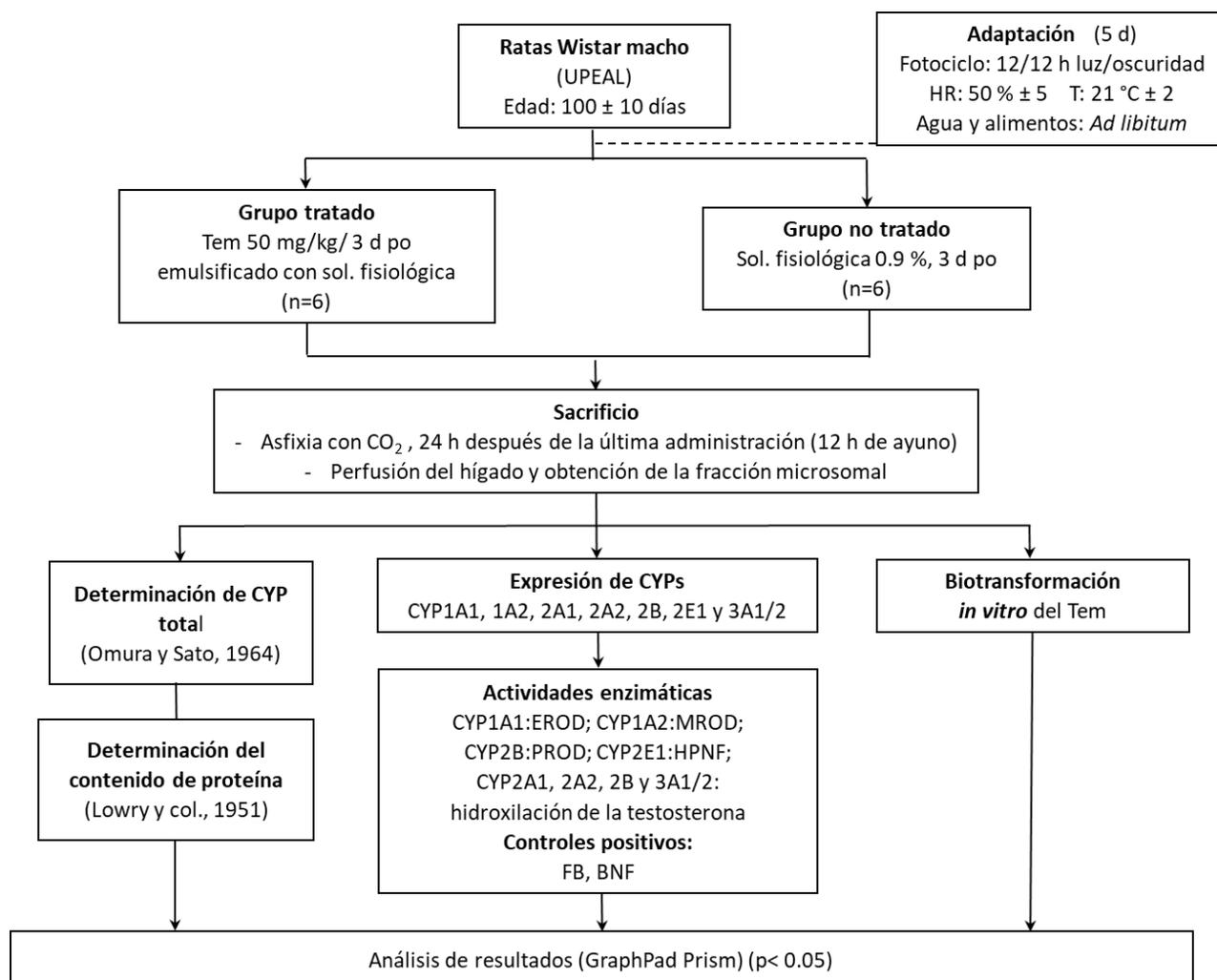
El Temefos (T.M. FOS<sup>®</sup> (46% de pureza) fue adquirido de Agromundo, S.A de C.V (Ciudad de México, México). La ditionita de sodio, el hidróxido de sodio, el sulfato de cobre, el tartrato de sodio y potasio, el carbonato de sodio y el dimetilsulfóxido (DMSO) fueron adquiridos de Merck (Darmstadt, Alemania). El NADPH fue adquirido de USB (USA). La albúmina de suero bovino (BSA) fue adquirida de Equitech-Bio, Inc (Texas, USA). El Tris-HCl<sup>®</sup>, el reactivo de Folin-Ciocalteu, la 6 $\beta$ -hidroxitestosterona (-OHT), la cortexolona (Ctx), el Tem, el TDF y el TDF-SO<sub>2</sub> ó BPS fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO., USA). Los productos oxidados del Tem como el Tem-SO, Tem-dioxón-sulfóxido (Tem-dox-SO), Tem-dioxón-sulfona (Tem-dox-SO<sub>2</sub>) y 4,4'-sulfanildifenol (SIDF) fueron sintetizados, purificados e identificados en nuestro laboratorio (Verdín-Betancourt y col., 2019). La Testosterona (T), la 16 $\beta$ -OHT, 16 $\alpha$ -OHT, la 6 $\alpha$ -OHT, la 7 $\alpha$ -OHT, la 2 $\alpha$ -OHT, la 2 $\beta$ -OHT, la 6-dihidrottestosterona (6-DHT) y la androstenediona (AD) fueron adquiridas de Steraloids Inc. (Newport, RI, USA). El metanol, el acetonitrilo y el agua grado HPLC se obtuvieron de Fisher Chemical (Fair Lawn, NJ, USA). El cloruro de magnesio hexahidratado se adquirió de J. B. Baker (Xalostoc, Edo. de México, Mexico). El agua Milli-Q (Resistencia 18.2  $\Omega$ ) se obtuvo de un equipo Milli-Q (Millipore de México, México).

### **2.2 Estrategia experimental**

En la Figura 9 se presenta la estrategia experimental seguida para el desarrollo de este proyecto.

### **2.3 Animales**

Como modelo experimental se usaron ratas Wistar macho adultas de 100  $\pm$  10 d de edad obtenidas de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) del Cinvestav-IPN. Previo al tratamiento, los animales fueron sometidos a un proceso de aclimatación de 5 d. Durante el desarrollo experimental, los animales permanecieron en un cuarto con temperatura controlada con ciclos de luz-obscuridad de 12 h (7:00 – 7:00), a una temperatura de 22  $\pm$  1 °C y una humedad relativa de 50-60%, con libre acceso a agua y alimento. El cuidado de los animales se realizó de acuerdo con los protocolos de trabajo de la UPEAL, que corresponden a lo establecido en la NOM-062-ZOO-1999.



**Figura 8. Diseño experimental del estudio.**

### 2.3.1 Tratamiento de los animales

Para la investigación se emplearon 4 grupos de animales:

1. *Grupo tratado con Tem*: Seis ratas fueron tratadas durante 3 d con Tem emulsificado en solución salina 0.9%, con una dosis diaria de 50 mg/kg/d por vía oral empleando sonda gástrica. La dosis fue ajustada diariamente al peso del animal.
2. *Grupo control*: Seis ratas fueron tratadas con solución salina (NaCl al 0.9%) por vía oral empleando sonda gástrica en una cantidad equivalente a la empleada para tratar a los animales del grupo tratado con Tem.

3. *Grupo tratado con Fb*: Cuatro ratas fueron tratadas durante 3 d con Fb disuelto en solución salina, con una dosis diaria de 80 mg/kg/d por vía intraperitoneal (*i.p*). La dosis fue ajustada diariamente al peso del animal.
4. *Grupo tratado con BNF*: Cuatro ratas fueron tratadas durante 2 d con BNF suspendida en aceite de maíz, con una dosis diaria de 80 mg/kg/d por *i.p*. La dosis fue ajustada diariamente al peso del animal.

Los animales de los grupos 1, 2 y 3 fueron sacrificados 24 h después de la última dosis con un ayuno de 12 h. Los animales del grupo 4 fueron sacrificados 48 h después de la última dosis también con un ayuno previo de 12 h, debido a que a este tiempo se manifiesta la mayor inducción de CYP en ratas tratadas con este compuesto (Boobis y col, 1977) . Para el sacrificio los animales fueron eutanizados en cámara de CO<sub>2</sub>. El hígado de cada rata fue perfundido con solución salina fría, se pesó y se procesó para obtener la fracción microsomal.

## **2.4 Obtención de la fracción microsomal**

### **2.4.1 Principio**

La fracción microsomal está compuesta de vesículas provenientes del retículo endoplásmico liso generada a partir de un homogenado del tejido. Las fracciones subcelulares se pueden separar por centrifugación diferencial en base al coeficiente de sedimentación de cada uno de los componentes celulares, su identificación se realiza por medio de la determinación de alguna proteína o actividad enzimática específica. La fracción microsomal contiene una gran variedad de enzimas totales involucradas en el metabolismo de xenobióticos de Fase I y II (Mayer y col., 1990).

### **2.4.2 Soluciones**

1. Agua desionizada obtenida en un sistema de purificación Milli-Q (Millipore de México, MX) con una resistencia de 18.2 MΩ, que fue empleada en la preparación de todas las soluciones.
2. Solución fisiológica de NaCl al 0.9%: 9 g de NaCl se disolvieron en 1,000 mL de agua desionizada. La solución fue mantenida a 4 °C.
3. Solución amortiguadora 1: Tris-HCl 20 mM, KCl 150 mM y EDTA-Na<sub>2</sub> 1 mM, pH 7.6: 3.15 g de Tris-HCl, 11.18 g de KCl y 372.13 mg de EDTA-Na<sub>2</sub>, fueron disueltos en 800 mL de

agua desionizada, se ajustó el pH a 7.6 con NaOH 1 N y finalmente se ajustó a 1,000 mL con agua desionizada. Esta solución se conservó en refrigeración a 4 °C.

4. Solución 2: Tris-HCl 20 mM, KCl 150 mM y MgCl<sub>2</sub> 3 mM, pH 7.6: 3.15 g de Tris-HCl, 11.18 g de KCl y 0.61 g de MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, se disolvieron en 800 mL de agua, se ajustó el pH a 7.6 con NaOH 1 N y finalmente se llevaron a 1,000 mL con agua desionizada. Esta solución se conservó en refrigeración a 4 °C.
5. Solución 3: Tris-HCl 20 mM, KCl 150 mM y MgCl<sub>2</sub> 3 mM en glicerol al 15%, pH 7.6: se disolvieron 3.15 g de Tris-HCl en 650 mL de agua desionizada, 11.18 g de KCl, 0.61 g de MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O y 150 mL de glicerol, se ajustó el pH a 7.6 y finalmente se ajustó a 1,000 mL con agua desionizada. Esta solución se conservó en congelación a -20 °C.

### **2.4.3 Procedimiento**

Después de la eutanasia en cámara de CO<sub>2</sub>, el hígado de cada uno de los animales fue perfundido con solución fisiológica de NaCl al 0.9 % fría a través de la vena porta usando una bomba peristáltica. Se extrajo el hígado, del cual se eliminaron los tejidos conectivo y adiposo y se pesó el órgano, posteriormente fue colocado en un volumen de la solución amortiguadora 1, en proporción 1:5 (m/v), se trituró finamente con tijeras y el sobrenadante fue decantado. Después se homogenizó en solución amortiguadora 1, en proporción 1:3 (m/v) empleando un homogenizador tipo Potter-Elvehjem con pistilo de teflón con 6 golpes. El homogenado se centrifugó a 9,000 x g en una centrífuga refrigerada por 30 min, posteriormente el sobrenadante se ultracentrifugó a 105,000 x g durante 1 h. El sobrenadante fue desechado y el precipitado se lavó en la solución amortiguadora 2, en proporción 1:4 (m/v) con 4 golpes en el homogenizador y nuevamente se centrifugó a 105,000 x g durante 1 h. El sobrenadante se desechó y el precipitado se resuspendió en la solución amortiguadora 3, en una relación de 1 g de tejido por mL. La suspensión microsomal fue dividida en alícuotas de 0.5 mL e introducidas inmediatamente en nitrógeno líquido para su congelación y fueron conservadas a -70 °C hasta su uso. Todo el procedimiento se realizó de 0 a 4 °C para evitar la desnaturalización de las proteínas (Mayer y col., 1990).

## **2.5 Determinación del contenido de proteína microsomal total**

### **2.5.1 Principio**

Cuando se compara la habilidad de las fracciones de tejidos para catalizar la biotransformación de xenobióticos se requiere la medición del contenido de proteína en dichos tejidos. Entre los métodos más empleados para la determinación de proteínas se encuentra el propuesto por Lowry y col., que es un método colorimétrico con referencia a una gráfica estándar de albúmina de suero bovino (BSA). La determinación se realiza con base en la formación de un complejo colorido del  $\text{Cu}^{2+}$ , el reactivo de fenol en medio alcalino y los aminoácidos aromáticos tirosina y triptófano de las proteínas, dicha reacción comprende dos etapas: 1) reacción de las proteínas con iones cúpricos en medio alcalino y 2) reducción del reactivo de los ácidos fosfomolibdico-fosfotúngstico a azul tungsteno por el complejo proteínas-Cu, tirosina y triptófano (Lowry y col., 1951).

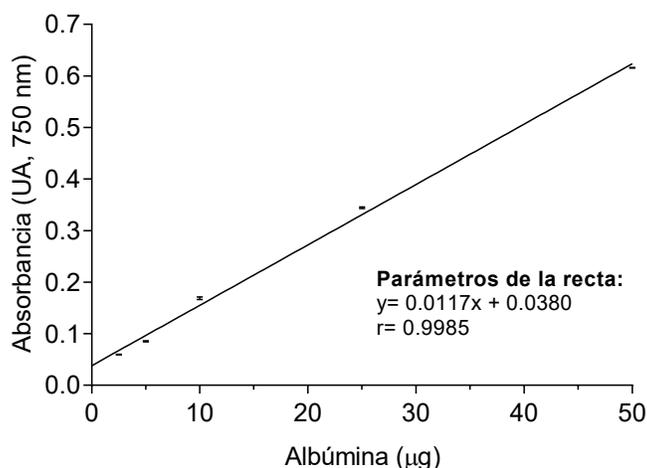
### **2.5.2 Soluciones**

1. Solución patrón de albúmina de 1 mg/mL: 10 mg de BSA se disolvieron en 10 mL de agua desionizada. La solución se guardó en alícuotas de 1 mL en congelación a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
2. Solución A:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2%, NaOH 0.1 N y tartrato de sodio y potasio 0.02%: 20 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 4 g de NaOH y 0.2 g de tartrato de sodio y potasio se disolvieron en 900 mL de agua desionizada, posteriormente se llevaron a un volumen final de 1000 mL.
3. Solución B, sulfato de cobre al 1%: 1 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  se disolvieron en 90 mL de agua desionizada, posteriormente se ajustó a 100 mL.
4. Solución C: se mezclaron 50 mL de la solución A y 1 mL de la solución B. Esta solución se preparó inmediatamente antes de usarla.
5. Reactivo de Folin-Ciocalteu 1 N: el reactivo de Folin-Ciocalteu 2 N se diluyó 1:1 con agua desionizada. Esta solución se preparó inmediatamente antes de usarla.
6. Gráfica de calibración de proteínas 2.5, 5, 10, 25 y 50  $\mu\text{g}$ : se tomaron 2.5, 5, 10, 25 ó 50  $\mu\text{l}$  de solución patrón de BSA y se llevaron a 100  $\mu\text{l}$  con agua desionizada

### **2.5.3 Procedimiento**

Las muestras de microsomas se diluyeron 1:20 con agua, para la reacción se tomaron 20  $\mu\text{l}$  y se llevaron a 0.1 mL con agua desionizada. A las muestras diluidas de microsomas y a

los estándares se les agregó 1 mL de la solución C, se agitó en vórtex y se dejó reposar 10 min; transcurrido este tiempo se agregó 0.1 mL del reactivo de Folin 1 N, se agitó en vórtex y se dejó reposar por 30 min. Al terminar este tiempo, se determinó la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro. La concentración original se obtuvo a partir de la concentración calculada en la gráfica de calibración usando los parámetros de regresión lineal y corrigiendo por los factores de dilución utilizados. Los resultados se obtuvieron en mg/mL (Figura 10).



**Figura 9. Gráfica de calibración de BSA para la determinación de proteínas.**

#### **2.5.4 Control de calidad**

Todas las muestras y estándares se prepararon por triplicado. Las determinaciones en las cuales se observó un coeficiente de variación superior al 10% se analizaron nuevamente.

#### **2.6 Determinación del CYP total**

##### **2.6.1 Principio**

En esta determinación se utiliza el hecho de que cuando el hierro de la hemoproteína se reduce con ditionita de sodio y se acompleja con CO, se obtiene un espectro de absorción característico con máximo de absorción a 450 nm (Omura y Sato, 1964). Este máximo de absorbancia se conoce como pico de Soret y no aparece en la forma oxidada del CYP. El grupo tiol de un residuo de cisteína ligado al átomo de hierro es el responsable de este pico de Soret en los CYP. En el resto de las hemoproteínas, en las que la histidina y no la cisteína

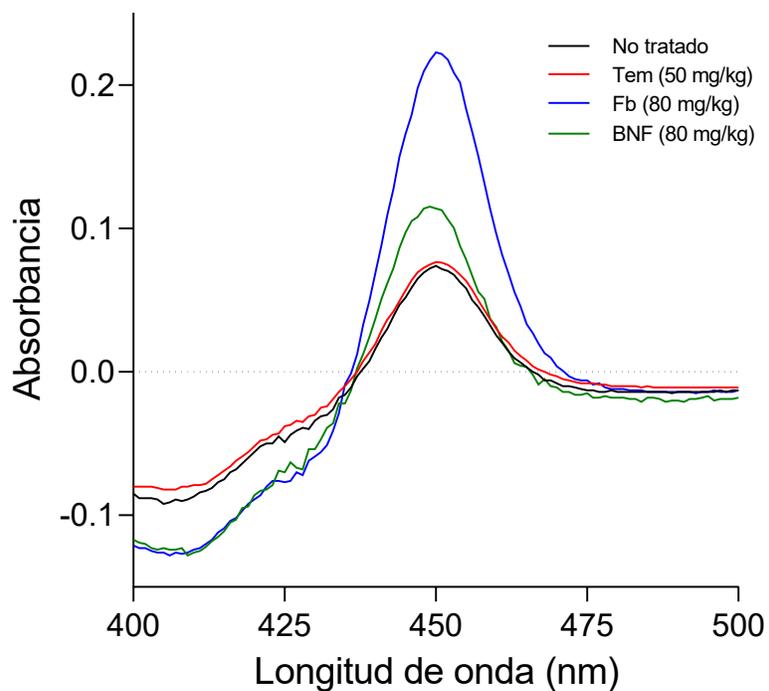
actúa como ligando, el máximo de absorbancia aparece a 420 nm.

### 2.6.2 Soluciones

1. Solución amortiguadora de Tris-HCl 66 mM y glicerol 20%, pH 7.4: 5.2 g de Tris-HCl y 100 mL de glicerol se disolvieron en 350 mL de agua desionizada, se ajustó el pH a 7.4 y se aforó a 500 mL con agua desionizada. Esta solución se conservó en refrigeración.

### 2.6.3 Procedimiento

Los microsomas se diluyeron 1:10 con solución amortiguadora de Tris-HCl 66 mM y glicerol 20%, pH 7.4 (concentración final de proteína diluida 1-2 mg/mL), se le agregó una pizca de ditionita de sodio y se agitó ligeramente por inversión. La suspensión se repartió en dos celdas (blanco y problema) y se corrigió el fondo en un rango de 500 a 400 nm, posteriormente, la celda problema se burbujeó durante 30 seg con CO e inmediatamente se hizo el barrido de 500 a 400 nm. Se registraron las absorbancias a 450 y 490 nm. El análisis se realizó en un espectrofotómetro. La Figura 11 muestra un espectro representativo de la determinación del contenido del CYP total en la fracción microsomal de cada uno de los grupos de tratamiento empleados en el estudio.



**Figura 10. Espectros representativos obtenidos de la determinación del contenido de CYP total en los diferentes grupos de tratamientos empleados en el estudio.**

## 2.6.4 Cálculos

La concentración del CYP hepático total (nmoles/mg de proteína) se calculó en base a la absorbancia a 450 nm, la cual se corrigió restándole la absorbancia observada a 490 nm, se multiplicó por 1,000 y se dividió entre el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) ( $91 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). El valor obtenido (nmol/mL de muestra diluida) se multiplicó por el factor de dilución y se dividió entre el contenido de proteína de la muestra original, como se muestra en la siguiente fórmula.

$$[CYP] = \frac{\left( \frac{(Abs_{450} - Abs_{490}) * 1,000}{\epsilon} \right) * FD}{[Proteína]}$$

## 2.6.5 Control de Calidad

La determinación para cada rata se hizo por duplicado. Las determinaciones en las cuales se observó un coeficiente de variación superior al 10% se analizaron nuevamente.

## 2.7 Actividades enzimáticas

### 2.7.1 O-desalquilación de los éteres de resorufina

#### 2.7.1.1 Principio

Algunas isoformas de CYP están asociadas a ciertas actividades enzimáticas de monooxigenasas de función mixta, las cuales tienen cierta especificidad por algún sustrato. La O-desalquilación de los éteres de resorufina tiene una buena correlación con algunos CYP, el producto de la O-desalquilación de esta serie de derivados es la resorufina, la cual, al ser determinada a través del tiempo por la intensidad de la fluorescencia emitida, refleja la actividad enzimática de algún tipo de CYP en particular (Burke y col., 1985; Lubet y col., 1985; Nerurkar y col., 1993).

#### 2.7.1.2 Soluciones

1. Solución patrón de resorufina 1  $\mu\text{M}$ : 1.176 mg de resorufina sódica se disolvieron en 5 mL de agua desionizada, cuya concentración equivale a 1  $\mu\text{mol/mL}$ . Esta solución se conservó en refrigeración a 4  $^{\circ}\text{C}$  y en frasco ámbar para evitar su exposición a la luz.
2. Solución de trabajo de resorufina 1 nmol/mL: la solución patrón de resorufina se diluyó 1:1,000 con agua desionizada. Esta solución se conservó en la oscuridad.

3. Solución amortiguadora de Tris-HCl 50 mM y MgCl<sub>2</sub> 25 mM, pH 7.6: 7.88 g de Tris-HCl y 5.08 g de MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O se disolvieron en 800 mL de agua, se ajustó el pH a 7.6 y finalmente se ajustó a 1,000 mL con agua desionizada. Esta solución se conservó en refrigeración a 4 °C.
4. Gráfica de calibración de resorufina de 2.5, 5, 10, 25 y 50 pmol/mL: de la solución de trabajo de la resorufina se tomó 12.5, 25, 50, 125 ó 250 µL y se llevó a 5 mL con solución amortiguadora Tris-HCl.
5. Solución de 7-etoxiresorufina 1 mM: 241.25 µg de 7-etoxiresorufina se disolvieron en 1 mL de DMSO. Esta solución se conservó en refrigeración a 4 °C y en frasco ámbar.
6. Solución de 7-metoxiresorufina 0.5 mM: 113.6 µg de 7-metoxiresorufina se disolvieron en 1 mL de DMSO. Esta solución se conservó en refrigeración a 4 °C y en frasco ámbar.
7. Solución de 7-pentoxiresorufina 1 mM: 283.3 µg de 7-pentoxiresorufina se disolvieron en 1 mL de DMSO. Esta solución se conservó en refrigeración a 4 °C y en frasco ámbar.
8. Solución de NADPH 50 mM: Se preparó disolviendo 20.84 mg de NADPH en 500 µL de solución amortiguadora de Tris-HCl 50 mM y MgCl<sub>2</sub> 25 mM. Esta solución se preparó inmediatamente antes de su uso y se conservó entre 0 y 4 °C.

### **2.7.1.3 Procedimiento**

Se trata de una reacción de fluorescencia con sustratos específicos para evaluar la actividad individual de las enzimas. La mezcla de reacción para las actividades enzimáticas se preparó en placas multipozos de 24 pocillos, como se indica en la Tabla 2:

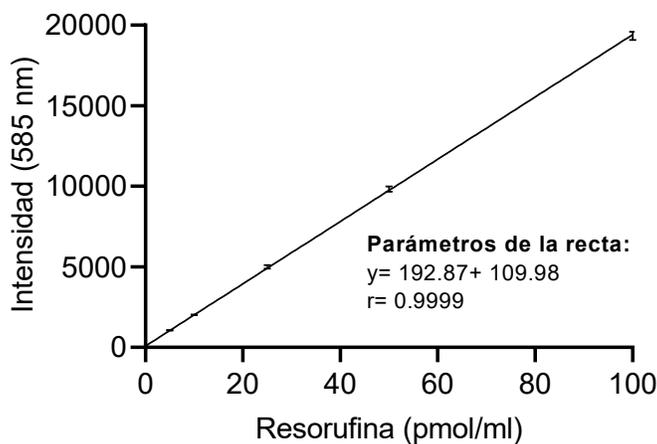
La mezcla de la solución amortiguadora, el sustrato y la suspensión microsomal fueron preincubadas por 3 min a 37 °C. La reacción enzimática se inició con la adición de 20 µL de NADPH 50 mM. La producción de resorufina se siguió por 3 min a 37 °C registrando su intensidad a 585 nm después de ser excitada a una  $\lambda$  de 530 nm, una amplitud de rendija de 9 nm y una ganancia de 100.

**Tabla 2. Volumen de reactivos para la determinación de la actividad de O-desalquilación de diversos éteres de resorufina por isoformas de CYP.**

CYP	Actividad Enzimática	Vol. de sol amortiguadora (μL)	Vol. del sustrato (μL)	Vol. de suspensión microsomal (μL)
1A1	EROD	1975	5	10
1A2	MROD	1975	5	10
2B1/2	PROD	1975	5	10

#### 2.7.1.4 Cálculos

La actividad específica de la O-desalquilación de los éteres de resorufina (pmoles de resorufina/min/mg de proteína) se calculó en base a la intensidad observada a 585 nm, la cual se transformó de intensidad/seg a intensidad/min, el valor obtenido se interpoló en la gráfica de calibración de resorufina (Figura 12) y se corrigió por la cantidad de proteína y el volumen de la reacción.



**Figura 11. Gráfica de calibración de la resorufina.**

#### 2.7.2 Hidroxilasa de *p*-nitrofenol (HPNF)

##### 2.7.2.1 Principio

El CYP2E1 lleva a cabo la biotransformación de compuestos orgánicos aromáticos y

alifáticos de peso molecular bajo. El CYP2E1 cataliza la hidroxilación del *p*-nitrofenol en la posición orto- formándose el 4-nitrocatecol. Este compuesto puede ser medido a 546 nm en condiciones alcalinas en las que el *p*-nitrofenol no absorbe, por lo tanto, la formación de 4-nitrocatecol leído a esta longitud de onda, constituye un método preciso y confiable para determinar la actividad del CYP2E1 (Reinke y Moyer, 1985).

### 2.7.2.2 Soluciones

1. Solución amortiguadora de Tris-HCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM y *p*-nitrofenol 0.2 mM, pH 7.4: 0.79 g de Tris-HCl, 0.102 g de MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O y 2.782 mg de *p*-nitrofenol se disolvieron en 80 mL de agua desionizada, a esta solución se le ajustó el pH a 7.4 y finalmente se ajustó a 100 mL con agua desionizada. Esta solución se conservó en refrigeración a 4 °C.
2. Ácido perclórico 0.6 N: Se disolvieron 2.54 mL de HClO<sub>4</sub> grado analítico en 47.46 mL de agua desionizada.
3. Hidróxido de sodio 10 N: 20 g de NaOH se disolvieron en 40 mL de agua desionizada. La solución se dejó enfriar y finalmente se aforó a 50 mL.
4. Solución de NADPH 50 mM: Se preparó disolviendo 20.84 mg de NADPH en 500 µL de solución amortiguadora de Tris-HCl 50 mM y MgCl<sub>2</sub> 25 mM. Esta solución se preparó inmediatamente antes de su uso y se conservó entre 0 y 4 °C.
5. Solución patrón de 4-nitrocatecol (1 µmol/mL): 1.551 mg de 4-nitrocatecol se disolvieron en 10 mL de agua desionizada.
6. Gráfica de calibración de 4-nitrocatecol (5, 10, 25 y 50 nmoles/mL): de la solución patrón de 4-nitrocatecol se tomaron 5, 10, 25 y 50 µL y se completaron a 1 mL con solución amortiguadora de Tris-HCl, MgCl<sub>2</sub> y *p*-nitrofenol.

### 2.7.2.3 Procedimiento

La mezcla de 930 µL de solución amortiguadora de Tris-HCl, MgCl<sub>2</sub> y *p*-nitrofenol y 50 µL de suspensión microsomal se preincubó durante 5 min a 37 °C. La reacción enzimática se inició con la adición de 20 µL de la solución de NADPH 50 mM, se dejó incubar durante 10 min y posteriormente se detuvo con la adición de 0.5 mL de HClO<sub>4</sub> 0.6 N. La mezcla de reacción se centrifugó a 3,000 rpm durante 5 min. Del sobrenadante se tomó 1 mL que fue colocado en un vial Eppendorf, se le agregó 0.1 mL de NaOH 10 N y se centrifugó 3 min a

12,000 rpm. Se determinó la absorbancia a 546 nm.

#### 2.7.2.4 Cálculos

La actividad específica de la HPNF (nmoles de 4-nitrocatecol/min/mg de proteína) se calculó a partir de la absorbancia observada a 546 nm, la cual fue corregida por el blanco, después se interpoló en la gráfica de calibración de 4-nitrocatecol (Figura 13) para tener el valor como nmol/mL, posteriormente se corrigió por el factor de dilución y se ajustó con base a la cantidad de proteína usada en la reacción y el tiempo de reacción.

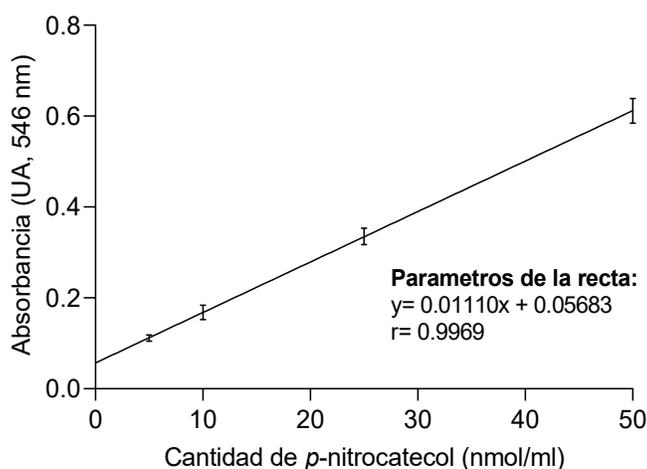


Figura 12. Gráfica de calibración de *p*-nitrocatecol.

#### 2.7.2.5 Control de calidad

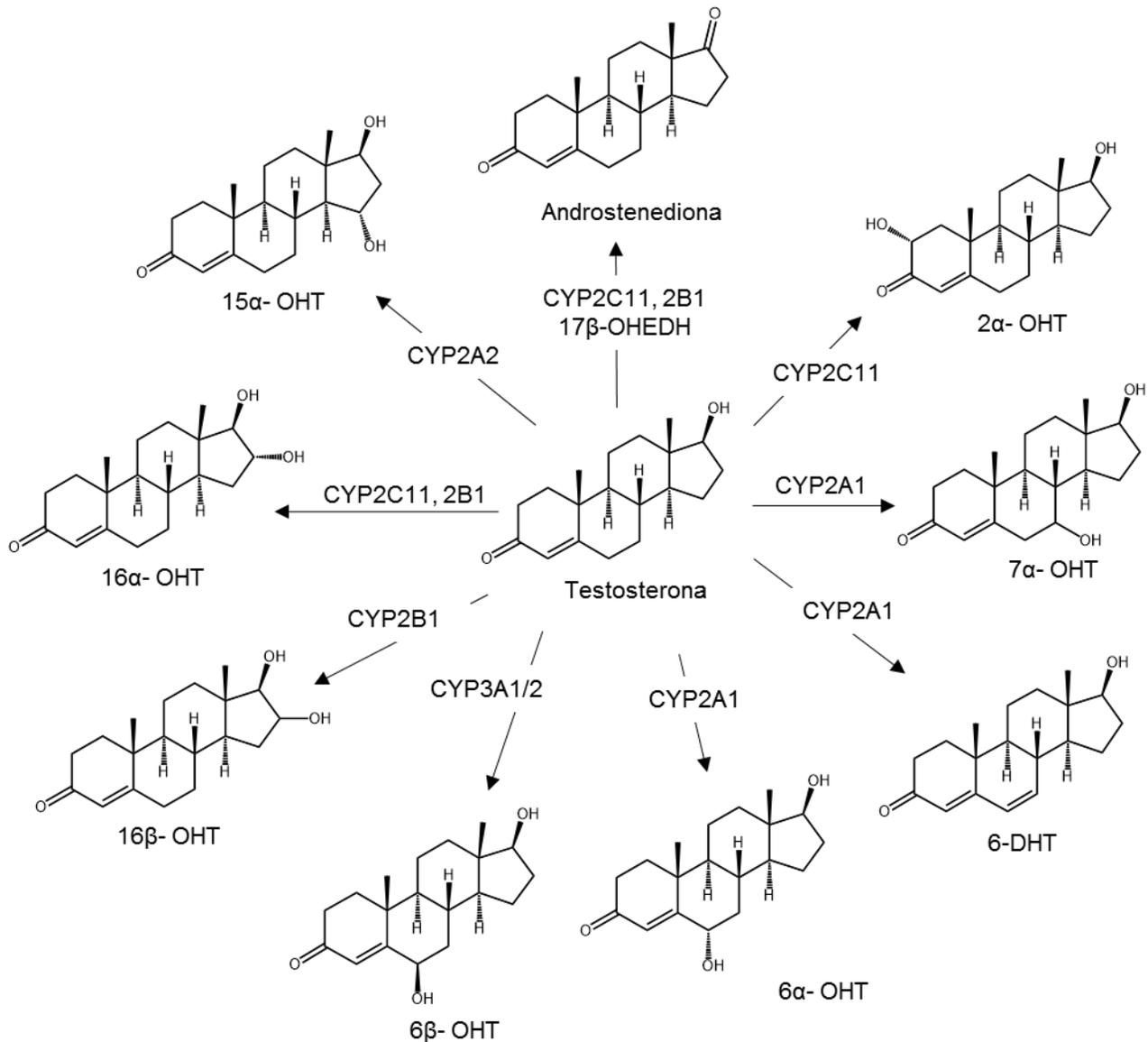
Las determinaciones enzimáticas en las muestras y los estándares se realizaron por triplicado. Las muestras en las que se observó un coeficiente de variación mayor del 10% se analizaron nuevamente. Se realizaron blancos sin NADPH, los cuales se procesaron de la misma manera que las muestras y sirvieron para corregir las lecturas de la muestra problema.

### 2.7.3 Hidroxilación de la testosterona

#### 2.7.3.1 Principio

Diversas isoformas de CYP forman esteroides hidroxilados altamente específicos tanto estéreo- como regio-selectivamente. Por lo tanto, una alteración en el metabolismo de la

hidroxilación de esteroides en los microsomas hepáticos indica una expresión alterada de varios CYP (Choi y col., 2005). El patrón de hidroxilación de la testosterona empleando microsomas hepáticos obtenidos de animales ha resultado una herramienta muy útil para el monitoreo de concentraciones relativas del CYP individuales y para determinar la actividad enzimática de estos CYP (Waxman, 1991) (Figura 14).



**Figura 13. Hidroxilación de la testosterona por diferentes isoformas de CYP.**

El proceso de biotransformación hepática por los CYP puede ser modulado por la exposición a agentes químicos, lo que podría ocasionar un impacto en el metabolismo de sustancias endógenas.

### 2.7.3.2 Reactivos y soluciones

1. Solución amortiguadora de fosfato de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 100 mM y  $\text{MgCl}_2$  5 mM a pH 7.4: 13.609 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 1.0165 g de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  se disolvieron en 800 mL de agua desionizada, a la disolución se le ajustó el pH a 7.4 con HCl 1 N y se ajustó con agua desionizada a un volumen de 1,000 mL. Esta solución se conservó en refrigeración a 4 °C.
2. Solución patrón de testosterona 10 mM: 2.884 mg de testosterona se disolvieron en 1 mL de metanol. La solución fue almacenada a -20 °C.
3. Solución de 100 ng/mL de testosterona: A partir de la disolución de 1 mg de T en 1 mL de metanol (1 mg/mL), se realizaron disoluciones seriadas 1:10 hasta llegar a la concentración de trabajo de 0.0001 mg/mL (100 ng/mL). Las soluciones fueron almacenadas a -20 °C y en la oscuridad.
4. Soluciones de 1, 0.1 y 0.01 mg/mL de metabolitos de T (6 $\alpha$ -OHT, 7 $\alpha$ -OHT, 6 $\beta$ -OHT, 16 $\alpha$ -OHT, 16 $\beta$ -OHT, 2 $\alpha$ -OHT, 15 $\alpha$ -OHT, AD y 6-DHT): a partir de la disolución individual de 1 mg/mL de cada uno de los metabolitos de la T en metanol, se realizaron disoluciones seriadas 1:10 hasta llegar a la concentración de trabajo de 0.01 mg/mL (10 ng/ $\mu$ L). Las soluciones fueron almacenadas a -20 °C y en la oscuridad.
5. Solución concentrada de Cortexolona (Ctx, estándar interno) 100  $\mu$ g/mL: a partir de la disolución de 1 mg de Ctx en 1 mL de metanol (1 mg/mL), se realizó una disolución 1:10 hasta llegar a la concentración de trabajo de 0.1 mg/mL (100  $\mu$ g/mL). La solución fue almacenada a -20 °C. De esta solución se tomó la cantidad correspondiente para tener una concentración final de 2  $\mu$ g/mL en la mezcla de reacción.
6. NADPH 20 mM: 9.070 mg de NADPH se disolverán en 500  $\mu$ L de la solución amortiguadora de fosfato de potasio 100 mM y  $\text{MgCl}_2$  5 mM a pH 7.4. Esta solución se preparó inmediatamente antes de su uso. De ella se tomó la cantidad correspondiente para tener una concentración final de 1 mM en la mezcla de reacción.
7. Metanol, agua y Acetonitrilo (ACN) grado HPLC: Se filtraron por separado y 2 veces 1 L de cada uno de estos reactivos a través de una membrana de nylon con un tamaño de poro de 0.2  $\mu$ m. Posteriormente se desgasificaron durante 5 min por medio de ultrasonido.

8. Agua desionizada Milli-Q 18.2 MΩ.

### **2.7.3.3 Procedimiento**

En un vial Eppendorf de 1.5 mL de capacidad se añadieron los componentes de la mezcla de reacción con un volumen final de 200 µL. La mezcla estaba compuesta por solución amortiguadora de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  100 mM y  $\text{MgCl}_2$  5 mM, pH 7.4, 0.5 mg de proteína microsomal de cada rata y T a una concentración de 250 µM. La mezcla fue preincubada durante 5 min a 37 °C, posteriormente se añadió 10 µL de NADPH 20 mM (concentración= 1 mM) para iniciar la reacción, la cual se mantuvo por 30 min a 37 °C. La reacción se detuvo con la adición de 200 µL de metanol que contenía Ctx a una concentración de 2 µg/mL, los viales fueron agitados en vórtex durante 1 min y posteriormente fueron centrifugados a 14,000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Del sobrenadante se inyectaron 40 µL para determinar los metabolitos de la T por la técnica de cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) de acuerdo al método de Wang y Zhang (2007), con algunas modificaciones.

### **2.7.3.4 Determinación de los metabolitos de la testosterona por HPLC**

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla o matriz en base a su coeficiente de partición en dos fases, una estacionaria no polar (columna) y una fase móvil (disolvente o mezcla de ellos). La tasa de migración de un compuesto es inversamente proporcional a su coeficiente de distribución entre las dos fases; es decir, los componentes con una distribución grande en la fase estacionaria se moverán más lentamente que aquellos que presenten una distribución pequeña, logrando así la separación de los analitos presentes en una muestra en estudio.

La identificación y cuantificación de los compuestos se realiza en base al tiempo de retención ( $t_{ret}$ ) usando estándares puros y por medio de sus propiedades físico-químicas y espectrofométricas, haciendo uso de detectores que se acoplan al sistema cromatográfico (Hamilton y Sewell, 1982)

### **2.7.3.5 Condiciones cromatográficas para el análisis de la testosterona y sus metabolitos**

Los productos de la reacción se analizaron usando un cromatógrafo de líquidos Agilent modelo 1200 (Agilent, Palo Alto, CA, USA), equipado con un detector de arreglo de diodos

(HPLC/DAD), usando una columna de fase reversa ZORBAX Eclipse XDB-C18 (150 x 4.6 mm, con tamaño de partícula de 5  $\mu$ m). Los solventes empleados como fase móvil fueron agua, metanol y ACN en gradientes lineales de los solventes en 5 etapas a diferente flujo (Tabla 3), con una presión máxima de 400 bares y a una temperatura de 21 °C. El tiempo total de corrida fue de 23 min con la inclusión de una etapa de 3 min para equilibrar la columna antes de la próxima inyección. La detección se llevó a cabo a una  $\lambda$  de 247 nm, debido a que ésta corresponde a la máxima absorbancia del grupo carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado de la T y sus metabolitos. Para la identificación y cuantificación de los metabolitos se realizaron las gráficas de calibración usando estándares de cada uno de los metabolitos, con base en su  $t_{ret}$ .

**Tabla 3. Programa de solventes para análisis de metabolitos de testosterona.**

Tiempo (min)	Proporción (%)			Flujo (mL/min)
	Metanol	ACN	Agua	
<b>0</b>	5	20	75	0.8
<b>14.7</b>	10	30	60	
<b>15.0</b>	10	30	60	1.25
<b>20.0</b>	20	40	40	
<b>23.0</b>	5	20	75	0.8

### 2.7.3.6 Gráficas de calibración

Se realizaron gráficas de calibración para la Ctx (E.I), la T y cada uno de sus metabolitos hidroxilados. Estas gráficas se conformaron de 5 valores de concentración de cada uno de los estándares, en un rango de 0.05 a 1 ng para la T y de 5 a 100 ng para los metabolitos de la T y la Ctx. Cada punto de la gráfica fue evaluado por triplicado. En las figuras 15 y 16 se presentan las gráficas de calibración de los estándares de la T, sus metabolitos y la Ctx.

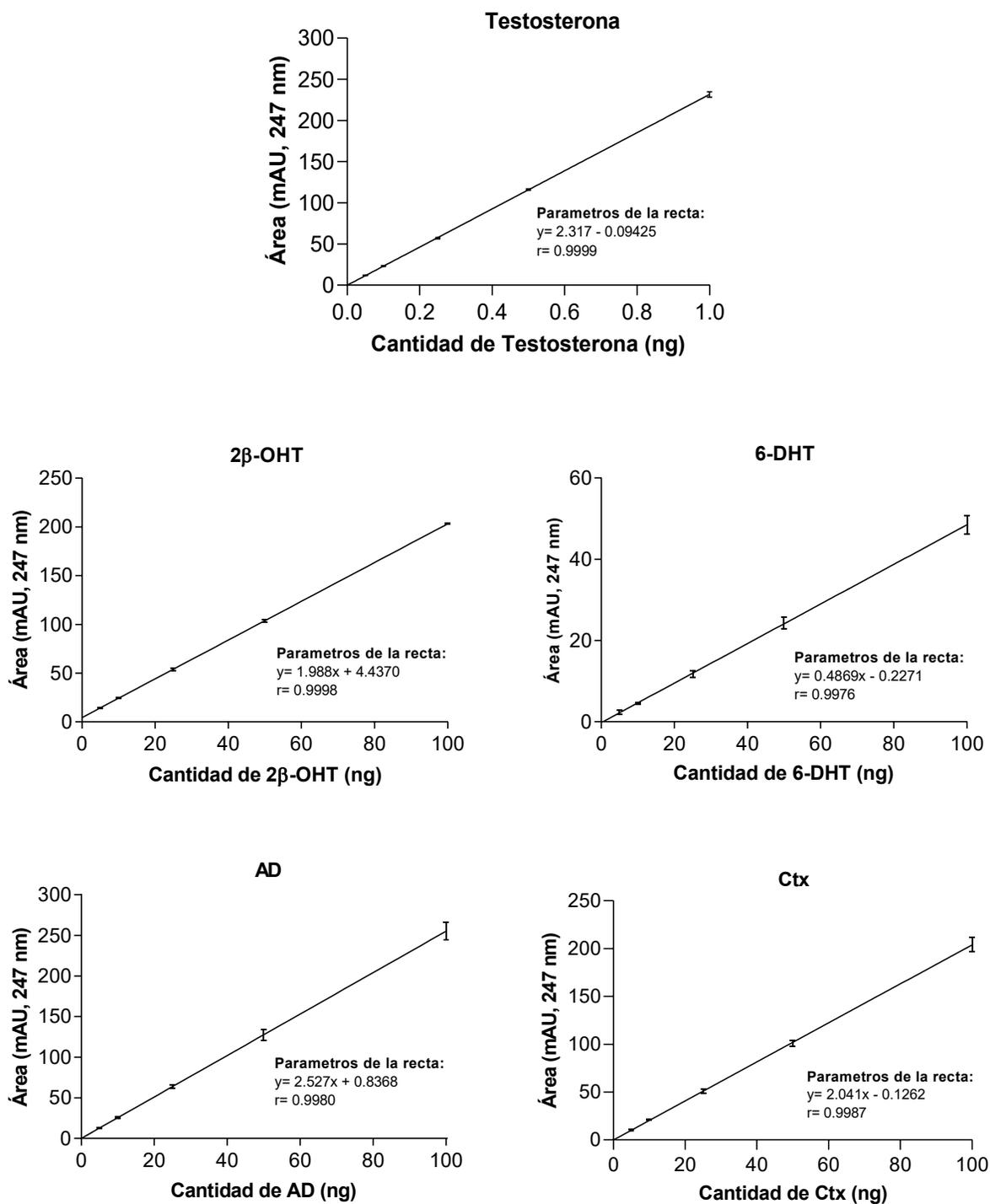


Figura 15. Gráfica de calibración de la testosterona, sus metabolitos 2β-OHT, 6-DHT, Androstenediona y el estándar interno Cortexolona. Los valores representan la media ± D.E. de 6 réplicas por punto.

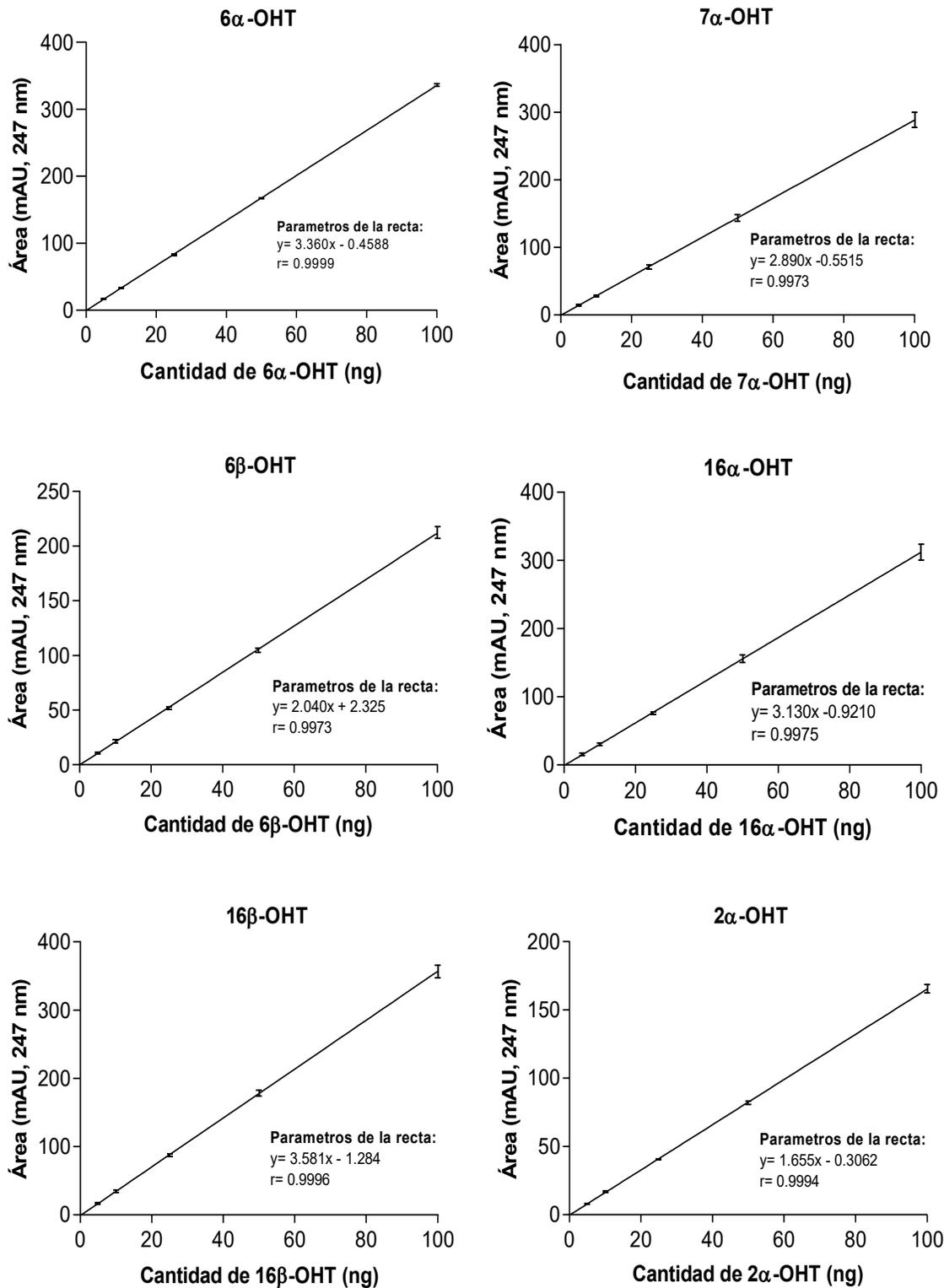


Figura 15. Gráfica de calibración de los metabolitos de la testosterona 6 $\alpha$ -OHT, 7 $\alpha$ -OHT, 6 $\beta$ -OHT, 16 $\alpha$ -OHT, 16 $\beta$ -OHT y 2 $\alpha$ -OHT. Los valores representan la media  $\pm$  D.E. de 6 réplicas por punto.

### 2.7.3.7 Cálculos

Para la determinación de la concentración de la T y sus metabolitos en las muestras analizadas, se empleó el área del pico para cada uno de los analitos. El valor obtenido fue interpolado en la gráfica de calibración para obtener la cantidad del metabolito (Figura 14). El resultado obtenido en ng fue convertido a pmoles y posteriormente a pmoles/mg de proteína/min, al multiplicarlo por la cantidad de proteína empleada y dividirlo entre el tiempo de reacción.

## 2.8 Reacción enzimática de biotransformación del Tem empleando MHR.

### 2.8.1 Principio

El uso de sistemas *in vitro* para evaluar el metabolismo de xenobióticos ha ido en aumento en los últimos años. Esto relacionado con el hecho de que son ensayos muy rápidos, relativamente económicos y que muestran las transformaciones que podría sufrir un compuesto padre generando sus productos de su biotransformación o metabolitos. Otra razón es la disminución en el uso de animales de experimentación para ensayos de metabolismo.

Aunque el Tem es un compuesto usado desde hace cerca de 50 años, es poca la información reportada con respecto a su metabolismo. En los mamíferos, solo un estudio identificó algunos de los productos de la biotransformación del Tem en muestras de orina de ratas, como son el Tem-SO, TDF, SIDF y BPS (Blinn, 1969). Hasta la actualidad no se ha reportado la generación del oxón del Tem en mamíferos, pero estos oxones se reconocen como los responsables del efecto tóxico de los POF, por lo que resulta una interrogante científica si se forma como metabolito del Tem, considerando que por la estructura del Tem, éste puede sufrir desulfuración oxidativa en 2 lugares y, por lo tanto, se pueden generar derivados oxones, dioxones, sulfóxidos y sulfonas.

### 2.8.2 Soluciones

1. Solución amortiguadora de fosfato de potasio ( $\text{KH}_2\text{P}_0_4$ ) 100 mM y  $\text{MgCl}_2$  5 mM a pH 7.4: 13.609 g de  $\text{KH}_2\text{P}_0_4$  y 1.0165 g de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  se disolvieron en 800 mL de agua desionizada, a la disolución se le ajustó el pH a 7.4 con HCl 1 N y se aforó con agua a un volumen de 1,000 mL. Esta solución se conservó en refrigeración a 4 °C.
2. Solución amortiguadora de ácido fórmico/formiato de amonio 0.1 M pH 3: 377.2  $\mu\text{L}$  de

ácido fórmico y 0.6305 g de formiato de amonio fueron disueltos en 80 mL de agua, se ajustó el pH a 3 y se completó con agua desionizada hasta un volumen de 100 mL.

3. Solución de Tem 1 mg/mL: Se realizó una disolución de 7.57  $\mu$ L de Tem en 10 mL de metanol (10 mg/mL), se realizó una disolución 1:10 en metanol para obtener la solución de trabajo a una concentración de 1 mg/mL (2.14 mM). Las soluciones fueron almacenadas a -20 °C y en la oscuridad. De esta última solución se tomó la cantidad correspondiente para tener una concentración final de 20  $\mu$ M en la mezcla de reacción.
4. Mezcla de estándares de Tem y los metabolitos Tem-SO, Tem-dox-SO, Tem-dox-SO<sub>2</sub>, TDF, TDF-SO y TDF-SO<sub>2</sub>: A partir de la disolución individual de 1 mg/mL de cada uno de los metabolitos del Tem en metanol, se realizaron disoluciones seriadas 1:10 hasta llegar a la concentración de trabajo de 0.01 mg/mL (10 ng/ $\mu$ l). Las soluciones fueron almacenadas a -20 °C y en la oscuridad.
5. Solución de NADPH 50 mM: Se preparó disolviendo 20.84 mg de NADPH en 500  $\mu$ L de solución amortiguadora de Tris-HCl 50 mM y MgCl<sub>2</sub> 25 mM, pH 7.4. Esta solución se preparó inmediatamente antes de su uso y se conservó entre 0 y 4 °C. De ella se tomó la cantidad correspondiente para tener una concentración final de 1 mM en la mezcla de reacción.
6. Ditionita de sodio.
7. Monóxido de carbono (CO).
8. Solución stock de ketoconazol (10 mM): Se disolvieron 0.5314 mg mg de ketoconazol en 1 mL de metanol. Esta solución se conservó en refrigeración y en frasco ámbar.
9. Solución stock de proadifen (10 mM): Se disolvieron 3.9 mg de Clorhidrato de proadifen en 500  $\mu$ L de metanol. Esta solución se conservó en refrigeración y en frasco ámbar.
10. Acetonitrilo, Acetato de Etilo, Agua desionizada Milli-Q 18.2 M $\Omega$  y Metanol grado HPLC (filtrado con membrana de 0.2  $\mu$ m).

### **2.8.3 Procedimiento**

En tubos de vidrio de 12 mL con tapa se colocó 1 mg de proteína microsomal, 9.33  $\mu$ L de Tem 1 mg/mL (20  $\mu$ M), 20  $\mu$ L de NADPH (1  $\mu$ M) y solución amortiguadora de KH<sub>2</sub>P0<sub>4</sub> 100 mM y MgCl<sub>2</sub> 5 mM, pH 7.4 para completar 1 mL de volumen final de la mezcla de reacción.

La reacción se desarrolló durante 30 min a 37 °C en baño de maría. Pasado el tiempo de incubación, a cada tubo se le colocó 5 mL de ACN para detener la reacción. La mezcla se agitó vigorosamente en vórtex por 5 min y se centrifugó a 1,600 x g durante 10 min. El sobrenadante se separó y al precipitado se le realizó una segunda extracción con 5 mL de ACN. Posterior a esto, el precipitado se desechó y el sobrenadante de ambas extracciones se evaporó bajo una corriente suave de N<sub>2</sub>. El residuo se disolvió empleando 5 mL de acetato de etilo, después se agregó 0.5 mL de agua desionizada y 0.5 mL de solución amortiguadora de ácido fórmico/formiato de amonio 0.1 M, pH 3. Los tubos se agitaron vigorosamente en vórtex durante 5 min y se centrifugaron a 1,600 x g durante 10 min. La fase orgánica se separó y colocó en otro tubo y a la fase acuosa se le hizo otra extracción con 5 mL de acetato de etilo, se agitó nuevamente por 5 min y se centrifugó, la fase orgánica de ambas extracciones se juntó y el disolvente se evaporó bajo una corriente suave de N<sub>2</sub>. Al residuo se le realizaron 2 disoluciones cada una con 50 µl de metanol, las que se juntaron en un vial de vidrio con inserto para su análisis por HPLC/DAD.

#### **2.8.4 Ensayos de inhibición enzimática**

Un inhibidor enzimático es cualquier compuesto que reduce la velocidad de una reacción catalizada por una enzima. Los estudios de inhibición son una herramienta que indica la arquitectura física y química del sitio activo, la especificidad de una enzima y el mecanismo cinético de la reacción. Los microsomas hepáticos son frecuentemente usados en la investigación del metabolismo de xenobióticos de fase 1, debido a que en esta fracción se encuentran las principales enzimas metabolizadoras tales como el CYP y las FMO. Estos sistemas enzimáticos en ocasiones llegan a compartir sustratos y el método común para distinguir entre ellos es el uso de la inactivación térmica para las FMO y la inhibición de los CYP con CO por la formación del complejo Fe<sup>2+</sup>-CO.

Los CYP son una familia de enzimas que cuenta con una gran variedad de isoformas con diversa estructura, distribución, expresión polimórfica que son dependientes de la edad, el género y el ambiente, además, en muchas ocasiones llegan a compartir sustratos por lo que el uso de inhibidores químicos para isoformas específicas ayuda a determinar su contribución en el metabolismo de un compuesto determinado. Sin embargo, frecuentemente no se alcanza el 100 % de la inhibición aún a concentraciones elevadas del inhibidor (Grothusen y col., 1996; Rock y col., 2008; Shou y Lu, 2009)

### **2.8.3.1 Inhibición de las monooxigenasas dependientes de flavina**

El ensayo enzimático y el procesamiento de las muestras se realizaron de la misma manera descrita en la sección 2.8.2 empleando una concentración de Tem de 20  $\mu\text{M}$  y microsomas hepáticos de las ratas del grupo control y del grupo inducido con Fb inactivados para las FMO, por calentamiento a 50 °C por 90 seg y enseguida se colocaron en hielo por 30 seg. (Tynes y Hodgson, 1983)

### **2.8.3.2 Inhibición de las monooxigenasas dependientes del CYP**

El ensayo enzimático y el procesamiento de las muestras se realizaron de la misma manera descrita en la sección 2.8.2 empleando una concentración de Tem de 20  $\mu\text{M}$  y microsomas hepáticos de las ratas del grupo control y del grupo inducido con Fb inactivados para los CYP, para lo cual los mismos fueron reducidos con una pizca de ditionita de sodio y después se les burbujeó con CO durante 1 min (Grothusen y col., 1996).

### **2.8.3.3 Inhibición de isoformas de CYP con inhibidores químicos**

El ensayo enzimático y el procesamiento de las muestras se realizaron de la misma manera descrita en la sección 2.8.2 empleando una concentración de Tem de 20  $\mu\text{M}$  y microsomas hepáticos de las ratas del grupo control y del grupo inducido con Fb. Se emplearon diferencialmente los inhibidores ketoconazol (10  $\mu\text{M}$ ), que inhibe selectivamente las isoformas CYP3A1/2 y el proadifen (SKF-525A) (160  $\mu\text{M}$ ) que es un inhibidor no selectivo del CYP.

### **2.8.5 Análisis de Tem y sus metabolitos por HPLC/DAD en extractos de ensayos enzimáticos *in vitro*.**

La determinación de los productos de la reacción enzimática se realizó por HPLC/DAD, empleando un equipo marca Agilent, modelo 1200 (Agilent, Palo Alto, CA, USA). Se usó una columna de fase reversa ZORBAX Eclipse XDB-C18 (150 mm x 4.6 mm, con tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ ), la detección se llevó a cabo a una  $\lambda$  de 240 y 254 nm, las cuales corresponden a la máxima absorbancia de los metabolitos oxidados y de los metabolitos hidroxilados del Tem, respectivamente. Los disolventes empleados como fase móvil fueron agua, metanol y ACN a un flujo de 1 mL/min en un modo de gradiente lineal con las proporciones que se muestran en la Tabla 4. El tiempo total de corrida fue de 14 min y se permitió un tiempo de 5 min entre muestras para equilibrar la columna. La identificación de

los metabolitos se hizo por medio del  $t_{ret}$  y el espectro UV y para la cuantificación de ellos se realizaron gráficas de calibración empleando estándares de los metabolitos sintetizados, identificados y aislados en nuestro laboratorio.

**Tabla 4. Programa de solventes para el análisis de la biotransformación de Tem y sus metabolitos.**

Tiempo (min)	Proporción (%)			Flujo (mL/min)
	Agua	Metanol	ACN	
0	34	6	60	
8	74	6	20	
11	65	30	5	1
13	65	30	5	
14	34	6	60	

### 2.8.6 Metabolitos no identificados del Tem

Al realizar los ensayos con microsomas hepáticos de ratas se detectó la aparición de nuevos picos en el cromatograma que no correspondían con los incluidos en la mezcla de estándares. Para la identificación química de los metabolitos no identificados del Tem, estos se aislaron empleando un HPLC acoplado a un colector de fracciones (Agilent 1200). Las fracciones fueron analizadas por cromatografía líquida acoplada a un detector selectivo de masas (HPLC/MSD, por sus siglas en inglés) utilizando un equipo Agilent modelo 1260 Infinity II equipado con un espectrómetro de masas (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). No se utilizó columna en este análisis. Los solventes del sistema consistieron en 0.1% de ácido fórmico en acetonitrilo (A) y 0.1% de ácido fórmico en agua (B). Se estableció un programa de solventes isocrático a 80% de A: 20% de B durante 10 min a una velocidad de 0.05 mL/min a temperatura ambiente. El espectrómetro de masas se hizo funcionar en modo de ionización por electropulverización positiva (ESI); temperatura de secado de 300 °C; presión del nebulizador de 15 psi; gas seco a 11 L/min; rango de escaneo de 100-600  $m/z$ ; tiempo de escaneo de 500 ms; voltaje del capilar de 4 kV y voltaje del fragmentador de 150 V (Verdin-Betancourt y col., 2020)

Con estas condiciones se pudieron identificar los metabolitos Tem-oxón-sulfóxido monohidrolizado (Tem-oxón-SO-OH) con un  $t_{ret}$  de 4.7 min, Tem-oxón-sulfóxido (Tem-oxón-

SO) con  $t_{ret}$  de 7.9 min, Tem-oxón (Tem-oxón) con  $t_{ret}$  11.3 min y Tem-sulfona monohidrolizado (Tem-SO<sub>2</sub>-OH) con un  $t_{ret}$  de 11.6 min.

### 2.8.7 Cálculos

Para la determinación de la concentración del Tem y sus metabolitos en las muestras analizadas, se empleó el área del pico para cada uno de los analitos, la cual se interpoló con las ecuaciones de regresión lineal ( $r^2 > 0.9876$ ) obtenidas previamente en nuestro laboratorio y que fueron preparadas a partir del análisis por triplicado de los compuestos de interés disueltos en metanol en un rango de concentración de 5 a 500 ng (Verdín-Betancourt y col., 2019) (Tabla 5). Para el caso de los metabolitos no identificados se empleó la ecuación obtenida para el Tem y el valor obtenido en ng fue convertido a pmoles y posteriormente a pmoles/mg de proteína/min, al multiplicarlo por la cantidad de proteína empleada y dividirlo entre el tiempo de reacción.

**Tabla 5. Ecuaciones de regresión lineal empleadas para el cálculo de la concentración de los metabolitos del Tem en el ensayo de biotransformación empleando MHR.**

Compuesto	$t_{ret}$ (min)	Ecuaciones	LDD (ng)	LDC (ng)
Tem	12.6	$y = 1.20x + 3.83$	0.917	2.787
Tem-SO	10.1	$y = 0.92x - 1.20$	0.480	1.459
Tem-dox-SO	5.3	$y = 0.97x - 1.92$	0.526	1.500
Tem-dox-SO <sub>2</sub>	6.2	$y = 1.32x - 3.09$	1.155	3.510
TDF	7.7	$y = 2.33x - 6.42$	1.452	4.414
TDF-SO	3.6	$y = 1.30x - 3.61$	0.849	2.580
TDF-SO <sub>2</sub>	4.1	$y = 3.34x - 8.34$	0.853	2.593

### 2.8.8 Control de calidad

Los ensayos con cada muestra se realizaron por duplicado, observando que el coeficiente de variación no fuera mayor al 10 % entre muestras de una misma rata y en los casos en que esto sucedió, las muestras se repitieron a fin de garantizar la precisión. En cada set de muestras se realizaron blancos de matriz (sin NADPH), de tiempo cero y de reactivos. Adicionalmente, se realizaron cartas control de recuperación para evaluar la estabilidad del equipo y de los estándares. Con base en los resultados obtenidos se determinó el

coeficiente de variación para cada uno de los compuestos analizados, el cual fue menor al 10%. La exactitud se evaluó por medio de muestras enriquecidas con estándares de cada metabolito. El rango de exactitud fue de 95 a 103%. Además, de manera individual se inyectaron la mezcla de estándares del Tem y sus metabolitos para confirmar los  $t_{ret}$ .

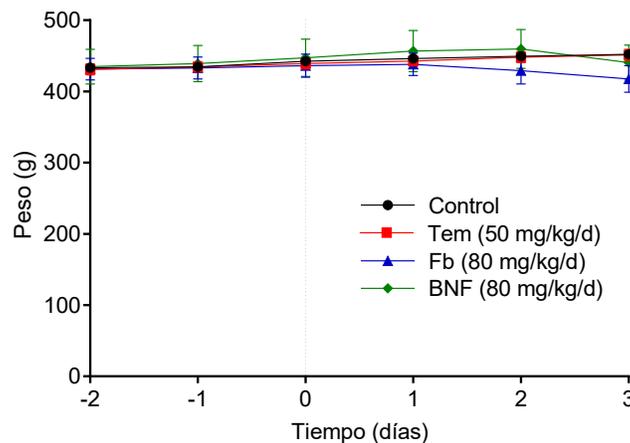
## **2.9 Análisis de resultados**

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  D.E. Para determinar si existía diferencia significativa entre los grupos de tratamiento se utilizó la ANOVA seguida de la prueba *post hoc* de Dunnett. Los datos paramétricos fueron analizados por la prueba de “*t*” de Student cuando se realizó la comparación solo entre 2 grupos. Para todos los análisis se utilizó el Software GraphPad Prism versión 8.0.1. La significancia estadística se estableció en un valor de  $p < 0.05$ .

### 3. Resultados

#### 3.1 Toxicidad sistémica del Tem

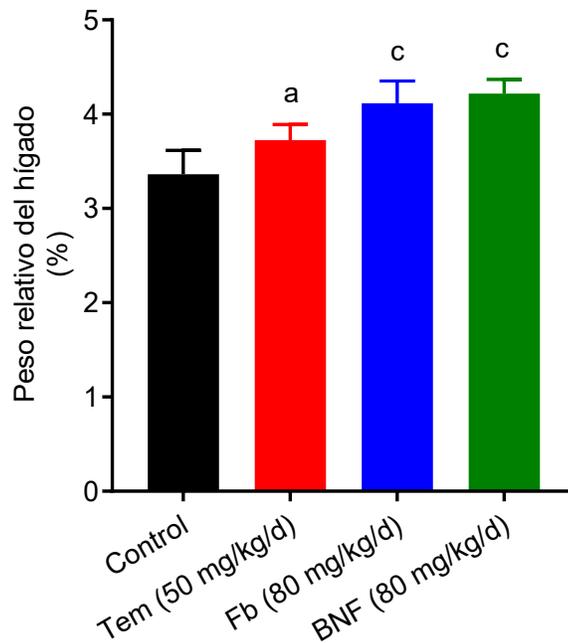
El peso de los animales se registró diariamente durante el período de adaptación y durante el período de tratamiento, para ajustar la dosis a este peso. Ningún signo de toxicidad sistémica fue observado en los animales del grupo control administrado con solución salina ni los tratados con Tem a la dosis de 50 mg/kg/d durante 3 d. Durante el período de tratamiento tampoco hubo diferencias en cuanto a la ganancia de peso. Con el tratamiento con inductores típicos del CYP como el Fb (80 mg/kg/d por 3 d) y la BNF (80 mg/kg/d por 2 d) tampoco se evidenció toxicidad sistémica ni se afectó significativamente la ganancia diaria de peso corporal (Figura 16).



**Figura 16. Efecto de los diferentes tratamientos sobre la ganancia diaria de peso corporal.** Los animales fueron tratados con vehículo (●); con Tem a una dosis de 50 mg/kg/d durante 3 d (■) (n=6); con Fb a una dosis de 80 mg/kg/d durante 3 d (▲) (n=4) y con BNF a una dosis de 80 mg/kg/d durante 2 d (◆) (n=4). El día 0 representa el inicio del período de tratamiento. Los resultados representan la media  $\pm$  D.E.

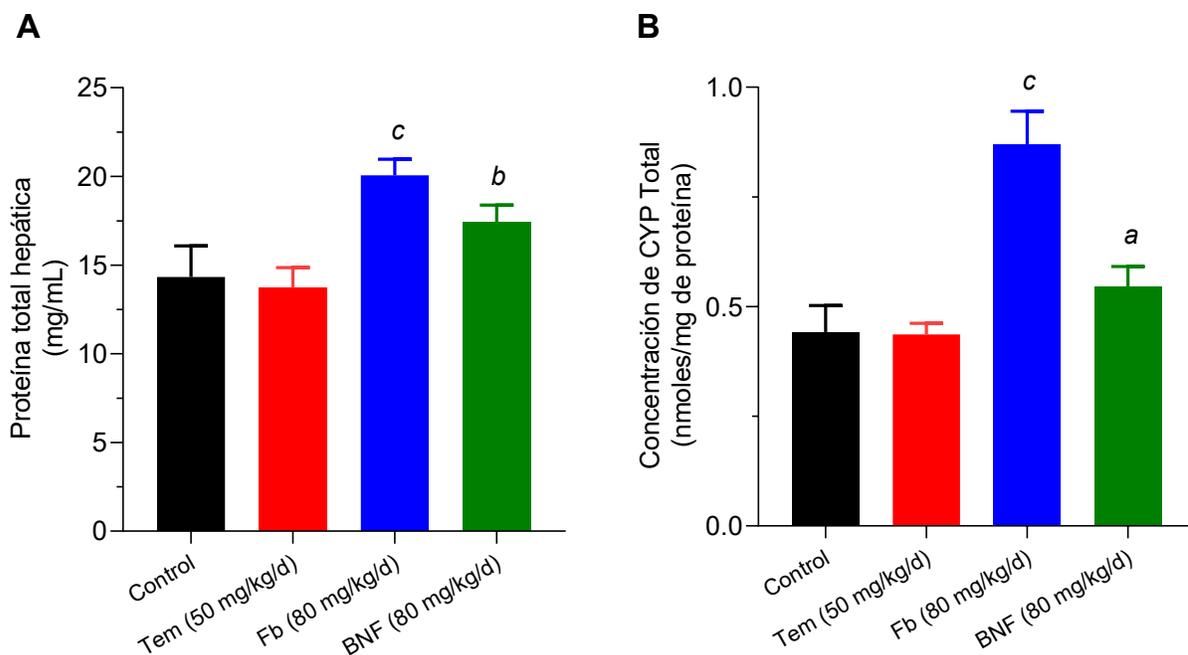
#### 3.2 Toxicidad hepática del Tem

En la Figura 17 se presenta el peso relativo de los hígados después de la perfusión en los diferentes grupos en los diferentes grupos de tratamiento. La exposición a Tem aumentó significativamente 12% el peso relativo del hígado, respecto al grupo al que solo se le administró el vehículo. El tratamiento con Fb y BNF también aumentó significativamente el peso relativo de este órgano, los aumentos observados fueron de 22 y 25%, respectivamente.



**Figura 17. Efecto de los diferentes tratamientos sobre el peso relativo del hígado.** Grupos control y Tem, n=6; grupos FB y BNF, n=4. Los resultados representan la media  $\pm$  D.E. <sup>a</sup> $p < 0.05$ , <sup>c</sup> $p < 0.001$ , diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control. Prueba de ANOVA seguido de la prueba *post hoc* de Dunnett.

A los microsomas obtenidos con los diferentes tratamientos se les determinó la concentración de proteína y la de CYP total. En las ratas tratadas con Tem no se observó un efecto significativo tanto del contenido de proteína total como del CYP total al compararlo con el grupo control. La concentración de proteína aumentó 40% en las ratas tratadas con Fb y aproximadamente 22% en las tratadas con BNF (Figura 18A). En el hígado de las ratas tratadas con Fb y BNF se observó un aumento en la concentración del CYP total, siendo estos de 90 y 20%, respectivamente (Figura 18B).



**Figura 18. Efecto de los diferentes tratamientos sobre el contenido de proteína microsomal hepática (A) y la concentración de CYP total hepático (B).** Grupos control y Tem, n=6; grupos FB y BNF, n=4. Los resultados representan la media  $\pm$  D.E. <sup>a</sup> $p < 0.05$ , <sup>b</sup> $p < 0.01$ , <sup>c</sup> $p < 0.001$ , diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control. Prueba de ANOVA seguido de la prueba *post hoc* de Dunnett.

### 3.3 Efecto del Tem sobre la actividad enzimática de los CYP hepáticos.

#### 3.3.1 Optimización y validación del método analítico de cromatografía de líquidos para la determinación de los productos de biotransformación de la T.

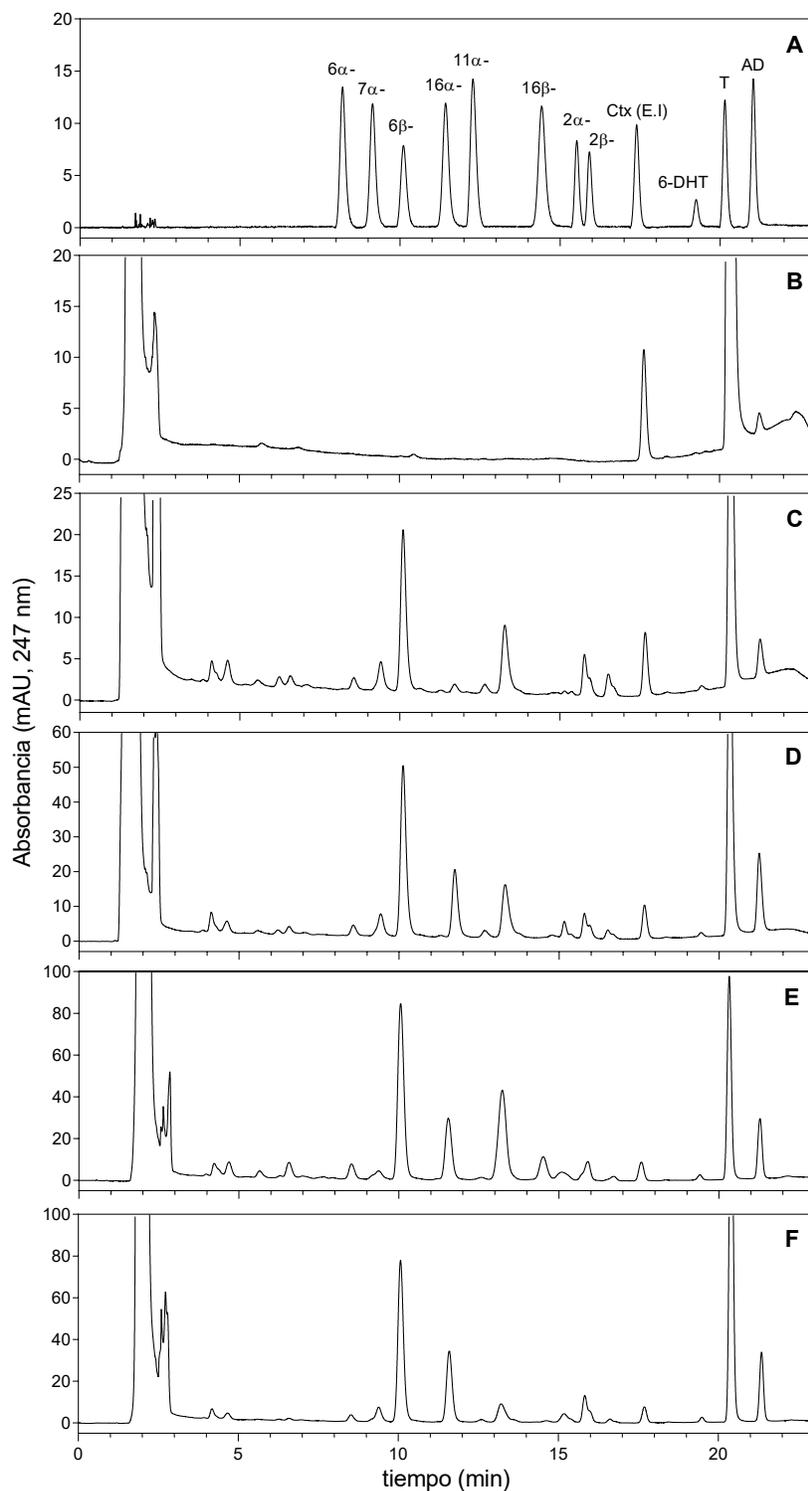
En la Figura 19 se presenta un cromatograma típico obtenido con el método analítico desarrollado para la determinación de los metabolitos de testosterona. En él se puede observar una buena resolución para 12 picos correspondientes a la T, sus metabolitos hidroxilados, la AD y el estándar interno, la Ctx. Todos ellos eluyeron en una ventana estrecha de tiempo y con adecuada resolución y definición, también se observan los picos con una base estrecha y una línea base estable lo que permite una correcta integración de estos. El primer compuesto que eluyó fue la 6 $\alpha$ -OHT con un  $t_{ret}$  de 8.2 min y el último correspondió a la AD con un  $t_{ret}$  de 21.1 min. (Figura 19A, Tabla 6). A partir de cada uno de los picos se obtuvo el espectro UV de cada uno de los estándares, los cuales junto con los  $t_{ret}$  sirvieron para identificarlos en las muestras analizadas.

Después de establecer las condiciones cromatográficas para el análisis de la T y sus metabolitos se realizaron las gráficas de calibración de 5 puntos a partir de las mediciones del área de pico para todos los analitos. Las curvas mostraron correlaciones lineales ( $r^2 > 0.9952$ ) en el rango de 5 a 100 ng (Figura 14 y Tabla 7). Los límites de detección (LDD) se calcularon a partir de la D.E. multiplicada por 3.29/pendiente (curva de calibración) y los límites de cuantificación (LDC) de la D.E multiplicada por 10/pendiente. Los LDD y LDC para todos los analitos variaron de 0.574 a 2.993 y de 1.741 a 9.069 ng, respectivamente (Tabla 7). La D.E. para cada metabolito se calculó inyectando 6 réplicas de cada estándar a la concentración más baja de la gráfica de calibración. La T fue el compuesto más sensible ya que mostró el límite de detección más bajo y el compuesto que presentó la menor sensibilidad fue la 6-DHT.

**Tabla 6. Tiempos de retención de la testosterona y sus metabolitos.**

<b>Compuesto</b>	<b><math>t_{ret}</math> (min)</b>	<b>C.V (%)</b>
6 $\alpha$ -OHT	8.19 $\pm$ 0.05*	0.63
7 $\alpha$ -OHT	9.13 $\pm$ 0.02	0.22
6 $\beta$ -OHT	10.08 $\pm$ 0.06	0.66
16 $\alpha$ -OHT	11.41 $\pm$ 0.02	0.21
16 $\beta$ -OHT	14.42 $\pm$ 0.02	0.16
2 $\alpha$ -OHT	15.49 $\pm$ 0.06	0.40
2 $\beta$ -OHT	15.91 $\pm$ 0.02	0.13
Ctx	17.40 $\pm$ 0.06	0.38
6-DHT	19.25 $\pm$ 0.01	0.07
T	20.12 $\pm$ 0.05	0.28
AD	21.30 $\pm$ 0.01	0.05

\* Los resultados representan la media  $\pm$  D. E



**Figura 19. Cromatogramas representativos de la biotransformación de la T empleando MHR.** A) mezcla de estándares de T (0.5 ng/mL), sus metabolitos y la Ctx (50 ng/mL); B) extracto del ensayo enzimático del grupo control sin NADPH; C) extracto del ensayo enzimático del grupo control; D) extracto del ensayo enzimático de ratas tratadas con Tem durante 3 d a una dosis de 50 mg/kg/d; E) extracto del ensayo enzimático de ratas tratadas con Fb durante 3 d a una dosis de 80 mg/kg/d; F) extracto del ensayo enzimático de ratas tratadas con BNF durante 2 d a una dosis de 80 mg/kg/d.

**Tabla 7. Ecuaciones de las gráficas de calibración, LDD, LDC y valores de la regresión lineal para la determinación de los metabolitos de la testosterona en el ensayo de metabolismo empleando MHR.**

Compuesto	Ecuaciones	r <sup>2</sup>	LDD (ng)	LDC (ng)
6α-OHT	y= 3.360x – 0.459	0.9999	0.744	2.254
7α-OHT	y= 2.890x – 0.552	0.9973	1.614	4.892
6β-OHT	y= 2.040x + 2.325	0.9996	1.551	4.6984
16α-OHT	y= 3.130x – 0.921	0.9975	1.947	5.900
16β-OHT	y= 3.581x – 1.284	0.9996	1.399	4.242
2α-OHT	y= 1.655x – 0.306	0.9994	0.784	2.376
2β-OHT	y= 1.988x + 4.437	0.9998	0.851	2.578
Ctx	y= 2.041x – 0.126	0.9976	1.735	5.259
6-DHT	y= 0.487x – 0.227	0.9952	2.993	9.069
T	y= 2.317x – 0.094	0.9996	0.574	1.741
AD	y= 2.527x + 0.837	0.9980	1.009	3.059

### 3.3.1.1 Control de calidad y exactitud

Durante la realización de las gráficas de calibración se observó una variación menor al 10% en los  $t_{ret}$  de los diferentes estándares (Tabla 6), lo cual se mantuvo al incluir los extractos correspondientes a las muestras de cada una de las ratas, demostrándose precisión intra e inter-día en los  $t_{ret}$ .

Para determinar la exactitud del método se realizaron ensayos de recuperación de muestras de microsomas hepáticos de ratas no tratadas enriquecidas con T a 2 y 5 ng/mL. Los valores de recuperación fueron de  $95.2 \pm 7.6$  % y un coeficiente de variación de 7.5 %. Este ensayo se realizó en dos experimentos independientes.

### 3.3.2 Efecto del Tem sobre las hidroxilasas de la T

Una vez que se contaba con un método cromatográfico adecuado se procedió a evaluar la actividad enzimática de las isoformas de CYP que participan en la biotransformación de la T usando los MHR obtenidos con los diferentes tratamientos de los animales. En la Figura 19B se apreció que, en ausencia de NADPH, los microsomas hepáticos no pudieron llevar a cabo la biotransformación de la T, lo que demuestra que este cofactor es indispensable

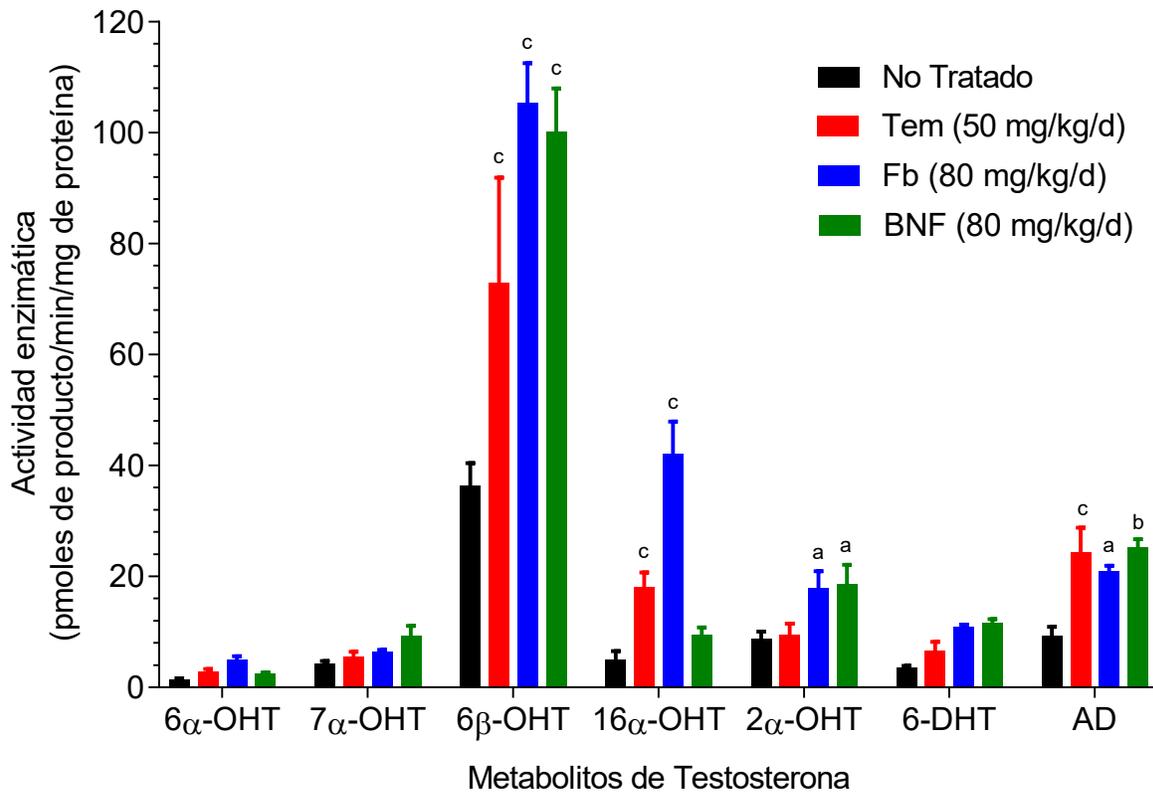
para el metabolismo de la T con la participación de los CYP. De ello se exceptúa la formación de la AD ( $t_{ret} \approx 21.3$  min) cuya formación depende también de la 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 $\beta$ -OHEDH), además del CYP. Con las condiciones experimentales que se usaron para el metabolismo *in vitro* de la T se observó la formación de al menos 7 metabolitos de la T, siendo ellos la 6 $\alpha$ -, 7 $\alpha$ -, 6 $\beta$ -, 16 $\alpha$ - y 2 $\alpha$ -OHT, así como la 6-DHT y la AD (Figuras 19C y 20), cuando se usaron los MHR del grupo control. En todos los extractos analizados correspondientes a los grupos de estudio, se generó un compuesto con  $t_{ret} \approx 13.3$  min cuyas características se asemejan a la de los metabolitos de la T (Figura 19C-F), es decir, posee un máximo de absorción a 247 nm y un espectro ultravioleta de 210 a 400 nm similar al de los metabolitos hidroxilados, pero no corresponde con ninguno de los estándares con los que se cuenta y que fueron incluidos en la mezcla; por esta razón queda pendiente su identificación.

El tratamiento con Tem provocó un aumento significativo en la actividad de las enzimas hepáticas que hidroxilan la T en las posiciones 6 $\beta$ - (CYP3A1/2) y 16 $\alpha$ - (CYP2C11), de 2.0 y 3.6 veces, respectivamente, al compararlas con el control. Igualmente provocó un aumento de 2.6 veces en la producción de la AD como reflejo de un aumento en la actividad enzimática del CYP2C11. Las actividades enzimáticas involucradas en la 2 $\alpha$ -, 6 $\alpha$ - y 7 $\alpha$ -hidroxilación de la T, así como de la 6-DHT no fueron modificadas significativamente por el tratamiento con Tem (Figuras 19D y 20).

En los microsomas hepáticos de ratas tratadas con Fb se observó un aumento en las actividades enzimáticas involucradas en la hidroxilación de la T en las posiciones 6 $\beta$ - (CYP3A1/2), 16 $\alpha$ - y 2 $\alpha$ - (CYP2C11), estos aumentos fueron de 2.9, 5.8 y 2.0 veces, respectivamente, en comparación con el grupo no tratado; también se evidenció un aumento de la AD (CYP2C11) de 2.2 veces, respectivamente (Figuras 19E y 20). Es de destacar que solo en los microsomas hepáticos de ratas inducidas con Fb se detectó el metabolito 16 $\beta$ -OHT, que es generado por el CYP2B1, lo que comprueba la inducción típica en estos animales.

En las ratas previamente tratadas con BNF se encontraban inducidas las enzimas involucradas en la hidroxilación de la T en las posiciones 6 $\beta$ - (CYP3A1/2) y 2 $\alpha$ - (CYP2C11), en comparación con el grupo no tratado en 2.8 y 2.1 veces, respectivamente, también se

encontró aumentada la actividad asociada a la formación de la AD (CYP2C11) en 2.7 veces (Figuras 19F y 20).



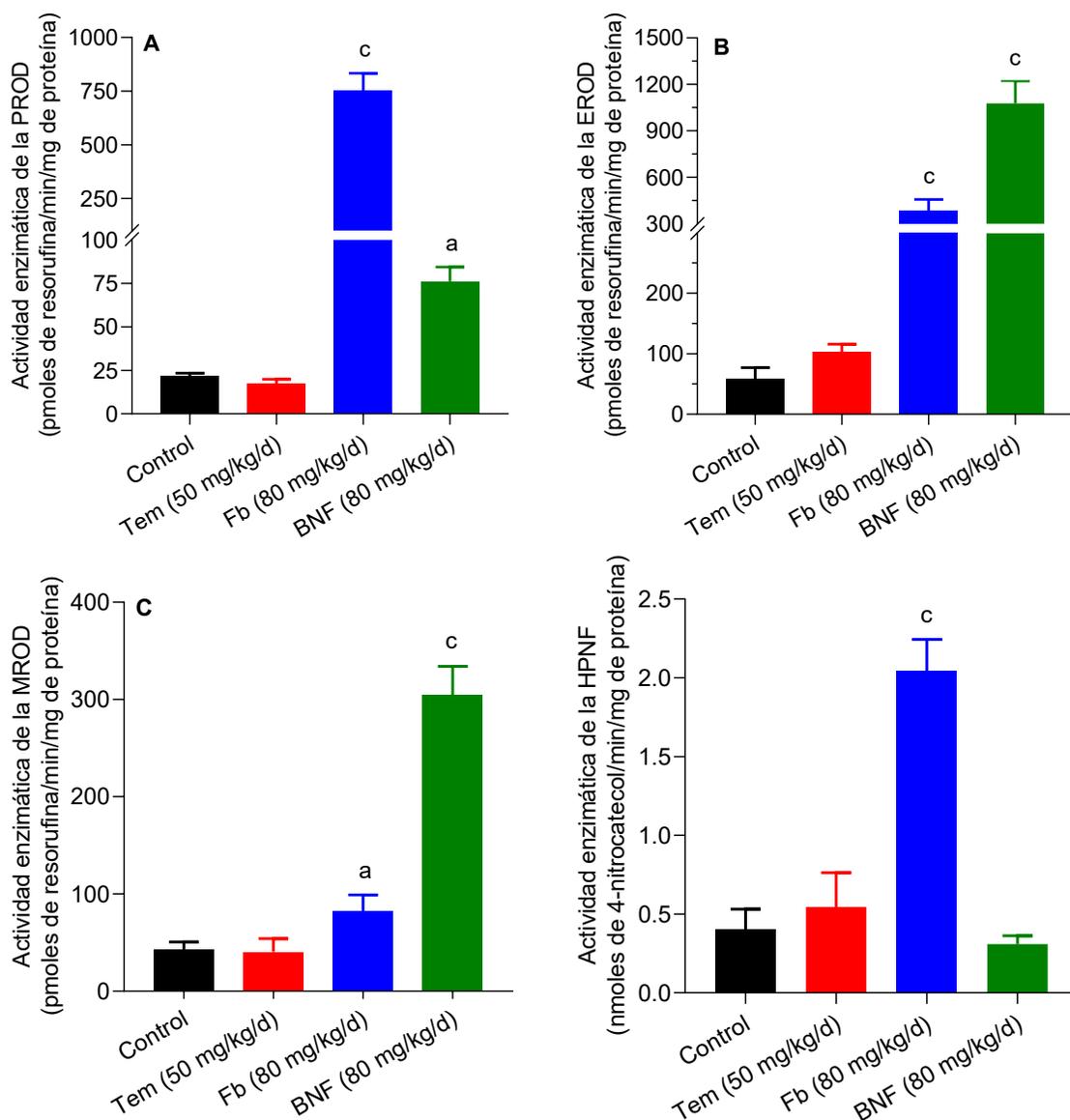
**Figura 20. Efecto de los diferentes tratamientos sobre la actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo de la testosterona.** Grupos control y Tem, n=6; grupos FB y BNF, n=4. Los resultados representan la media  $\pm$  D.E. <sup>a</sup> $p < 0.05$ , <sup>b</sup> $p < 0.01$ , <sup>c</sup> $p < 0.001$ , diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control. Prueba de ANOVA seguido de la prueba *post hoc* de Dunnett.

### 3.3.3 Efecto sobre la actividad enzimática de la PROD, EROD, MROD y HPNF

Continuando con la evaluación del efecto del Tem sobre las actividades enzimáticas asociadas a diversas isoformas del CYP, se analizaron los CYP involucrados en la O-desalquilación de la serie homóloga de las alcóxiresorufinas, las cuales se distinguen por mostrar correlación muy buena con isoformas específicas del CYP, así como también la HPNF que ha sido asociada con el CYP2E1.

La Figura 21 muestra que el tratamiento con Tem no modificó significativamente la actividad enzimática de la EROD, MROD, PROD o HPNF con respecto al grupo control. Las ratas

tratadas con Fb mostraron la inducción característica de la actividad de la PROD asociada al CYP2B1/2, con un aumento de 34 veces con respecto al grupo control. En las ratas tratadas con BNF se observó un aumento de la actividad enzimática de la EROD y MROD, de 18 y 6.5 veces, respectivamente. La actividad de estas enzimas ha sido asociada a la subfamilia CYP1A (Figura 21). La actividad de la HPNF aumentó solo en los microsomas hepáticos de las ratas tratadas con Fb (el cual fue de 5 veces), respecto al grupo control.



**Figura 21. Efecto de los diferentes tratamientos sobre la actividad enzimática de la PROD (A), EROD (B), MROD (C) e HPNF (D).** Grupos control y Tem, n=6; grupos Fb y BNF, n=4. Los resultados representan la media  $\pm$  D.E. <sup>a</sup> $p < 0.05$ , <sup>c</sup> $p < 0.001$ , diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control. Prueba de ANOVA seguido de la prueba *post hoc* de Dunnett.

### 3.4 Biotransformación *in vitro* del Tem

Se realizaron ensayos enzimáticos *in vitro* para determinar la biotransformación del Tem por la fracción microsomal hepática de las ratas con los diferentes tratamientos. La Figura 22 muestra los cromatogramas representativos de la biotransformación de Tem empleando MHR de cada uno de los tratamientos empleados en este estudio, los cuales se compararon con la mezcla de estándares del Tem y de los metabolitos disponibles. Todos los estándares de la mezcla eluyeron en una ventana estrecha de tiempo y con adecuada resolución y definición, también se observan picos con una base estrecha y una línea base estable lo que permite una correcta integración de éstos (Figura 22A). El primer compuesto en eluir fue el TDF y el último correspondió al Tem con  $t_{ret}$  de 3.6 y 12.6 min, respectivamente.

En ausencia de NADPH, no se llevó a cabo la biotransformación del Tem por los microsomas hepáticos, lo cual confirma la participación de enzimas dependientes de este cofactor en el metabolismo del Tem (Figura 22B). En estas condiciones solo se generó el Tem-SO, lo que nos indica que el Tem es inestable y este metabolito se forma de manera abiótica durante el ensayo enzimático, muy probablemente como consecuencia del pH y el oxígeno del ambiente. De las enzimas metabolizadoras de xenobióticos presentes en la fracción microsomal, solo las FMO y los CYP pueden convertir tioéteres a sulfóxidos y fosfortioatos a oxones, pero ambas familias de enzimas son dependientes de NADPH para llevar a cabo la oxidación del sustrato (Parkinson y col., 2013).

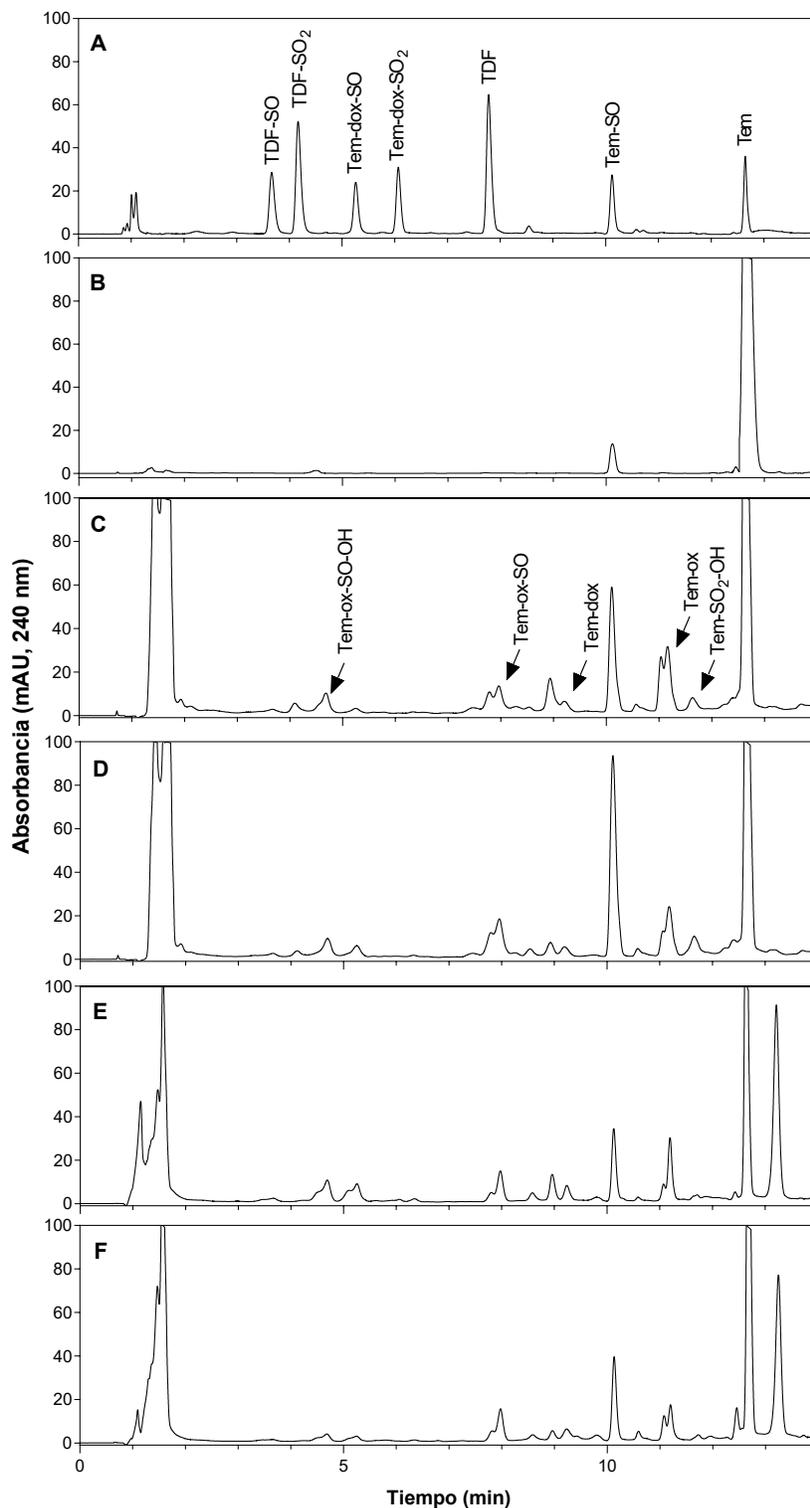
El análisis de los extractos de los ensayos enzimáticos con MHR no tratada mostró la formación de 10 metabolitos, los cuales fueron Tem-SO, Tem-oxón, Tem-oxón-SO, Tem-dox, Tem-dox-SO, Tem-oxón-SO-OH, Tem-SO-OH, Tem-SO<sub>2</sub>-OH, TDF y TDF-SO (Figuras 22C y 23). Las enzimas hepáticas involucradas en el metabolismo del Tem no fueron afectadas por el tratamiento previo con Tem, esto se refleja en que los microsomas hepáticos de las ratas tratadas con Tem no mostraron alteraciones en su patrón metabólico ni en las cantidades de los metabolitos, respecto a las ratas control (Figuras 22D y 23). Los microsomas hepáticos de ratas tratadas con Fb si mostraron cambios en la biotransformación del Tem, los que se reflejaron en una disminución significativa en la formación de los metabolitos Tem-SO y TDF (58 y 64 %, respectivamente), así como el aumento del Tem-dox-SO (2.6 veces) (Figuras 22E y 23). Por su parte, los microsomas hepáticos inducidos con BNF reflejaron una disminución en la producción de Tem-SO y

Tem-oxón, de 23 y 45 %, respectivamente comparado con el grupo control (Figuras 22F y 23). Como un dato sorprendente, los microsomas de las ratas inducidas con Fb y BNF reflejaron la formación de un nuevo metabolito con un  $t_{ret}$  de 13.1 min y que se encuentra pendiente de ser identificado (Figuras 22E y F).

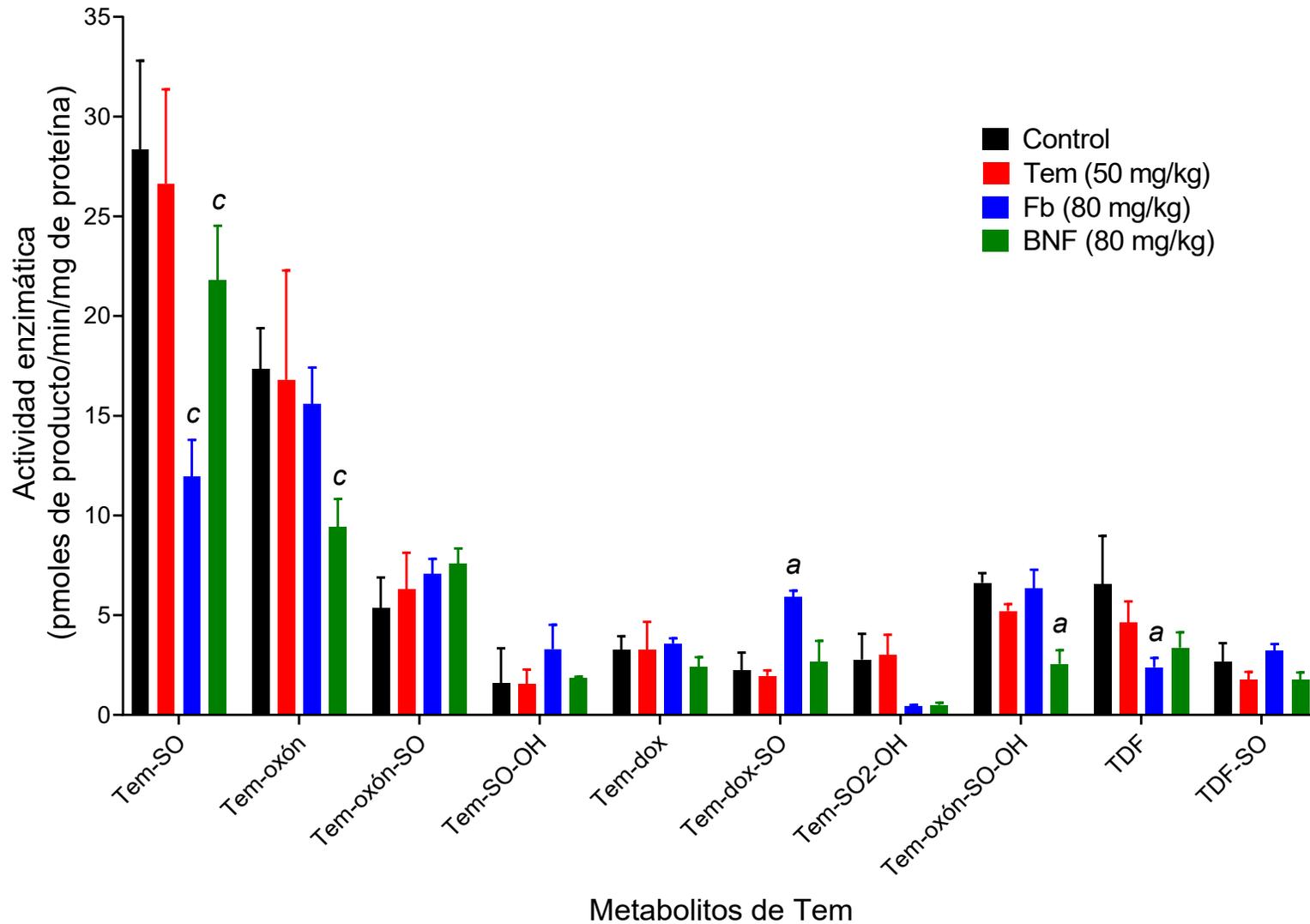
### **3.4.1 Inhibición de los CYP y de las FMO**

Con el fin de determinar cuáles sistemas enzimáticos están involucrados en el metabolismo del Tem, se inhibió diferencialmente a las FMO y a los CYP. Para este ensayo se empleó la fracción microsomal de las ratas del grupo control y de las ratas inducidas con Fb. La inhibición de las enzimas dependientes del CYP se llevó a cabo mediante la formación del complejo  $Fe^{2+}$ , reducido con ditionita de sodio, del grupo hemo con CO, mientras que para las FMO se realizó por calentamiento a 50 °C por 90 seg (Tynes y Hodgson, 1983; Grothusen y col, 1996;).

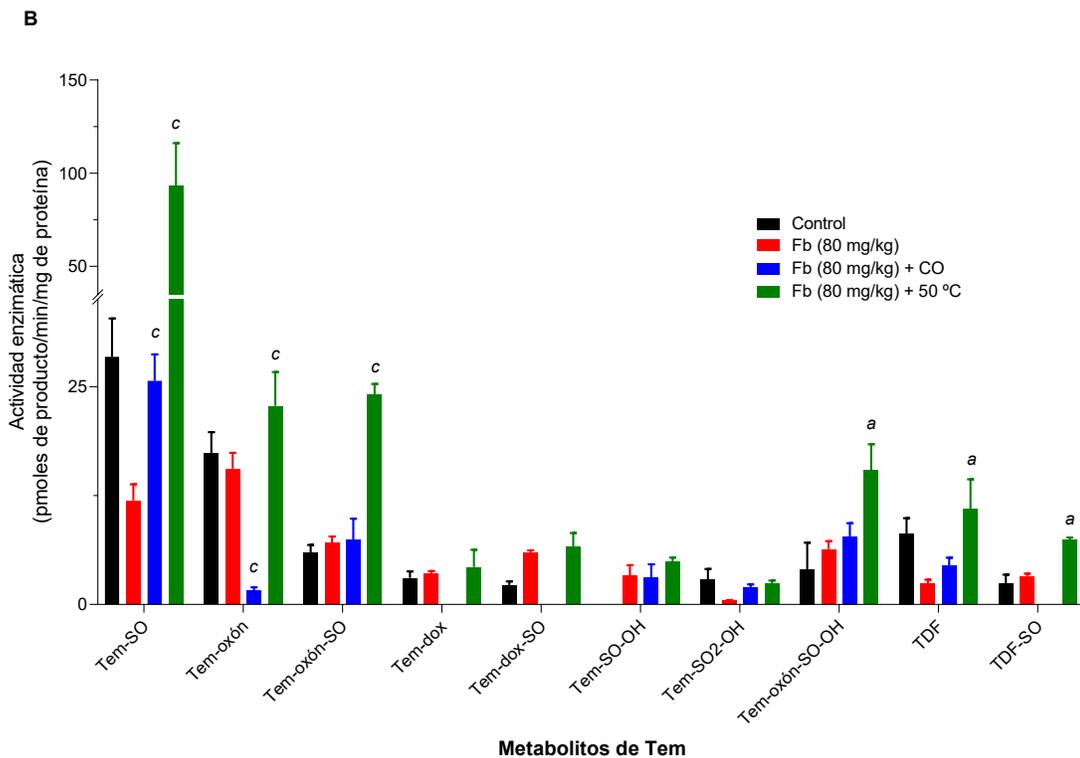
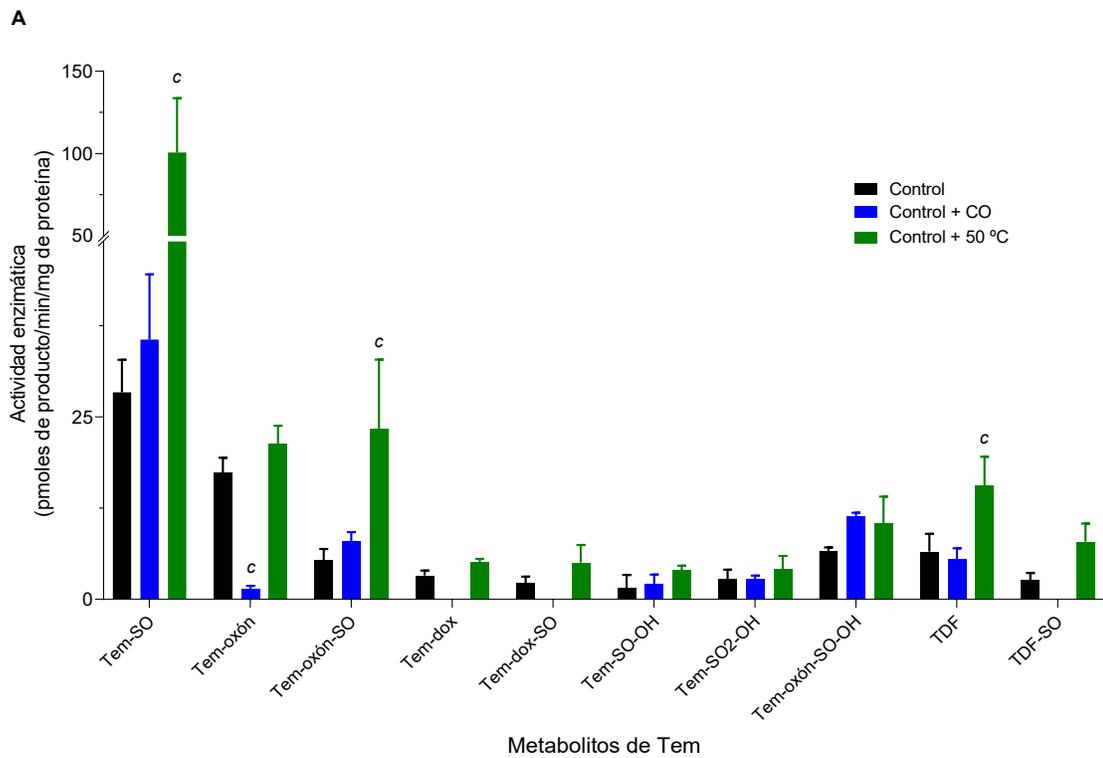
El tratamiento de la suspensión microsomal con CO disminuyó la formación de Tem-oxón en 90%, mientras que la formación de los metabolitos Tem-dox, Tem-dox-SO y TDF-SO fue inhibida en un 100%. Por su parte, la inactivación de las FMO por calentamiento provocó un aumento del metabolismo del Tem, reflejado en un aumento significativo en la formación de los metabolitos Tem-SO, Tem-oxón, Tem-oxón-SO, Tem-oxón-SO-OH y TDF, de 6.7, 1.5, 2.4, 1.4 y 3.6 veces, respectivamente (Figura 24).



**Figura 22. Cromatogramas representativos de la biotransformación de Tem empleando MHR.** A, mezcla de estándares de Tem y sus metabolitos y extractos del ensayo enzimático empleando MHR; B, grupo control sin NADPH; C, grupo control; D, tratadas con Tem a una dosis de 50 mg/kg/d/3d; E, tratadas con Fb a una dosis de mg/kg/d/3d; F, tratadas con BNF a una dosis de 80 mg/kg/d/2d.



**Figura 23. Efecto de los diferentes tratamientos sobre el metabolismo del Tem por MHR.** Grupos control y Tem, n=6; grupos Fb y BNF, n=4. Los resultados representan la media  $\pm$  D.E. <sup>a</sup> $p < 0.05$ , <sup>c</sup> $p < 0.001$ , diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control. Prueba de ANOVA seguido de la prueba *post hoc* de Dunnett.

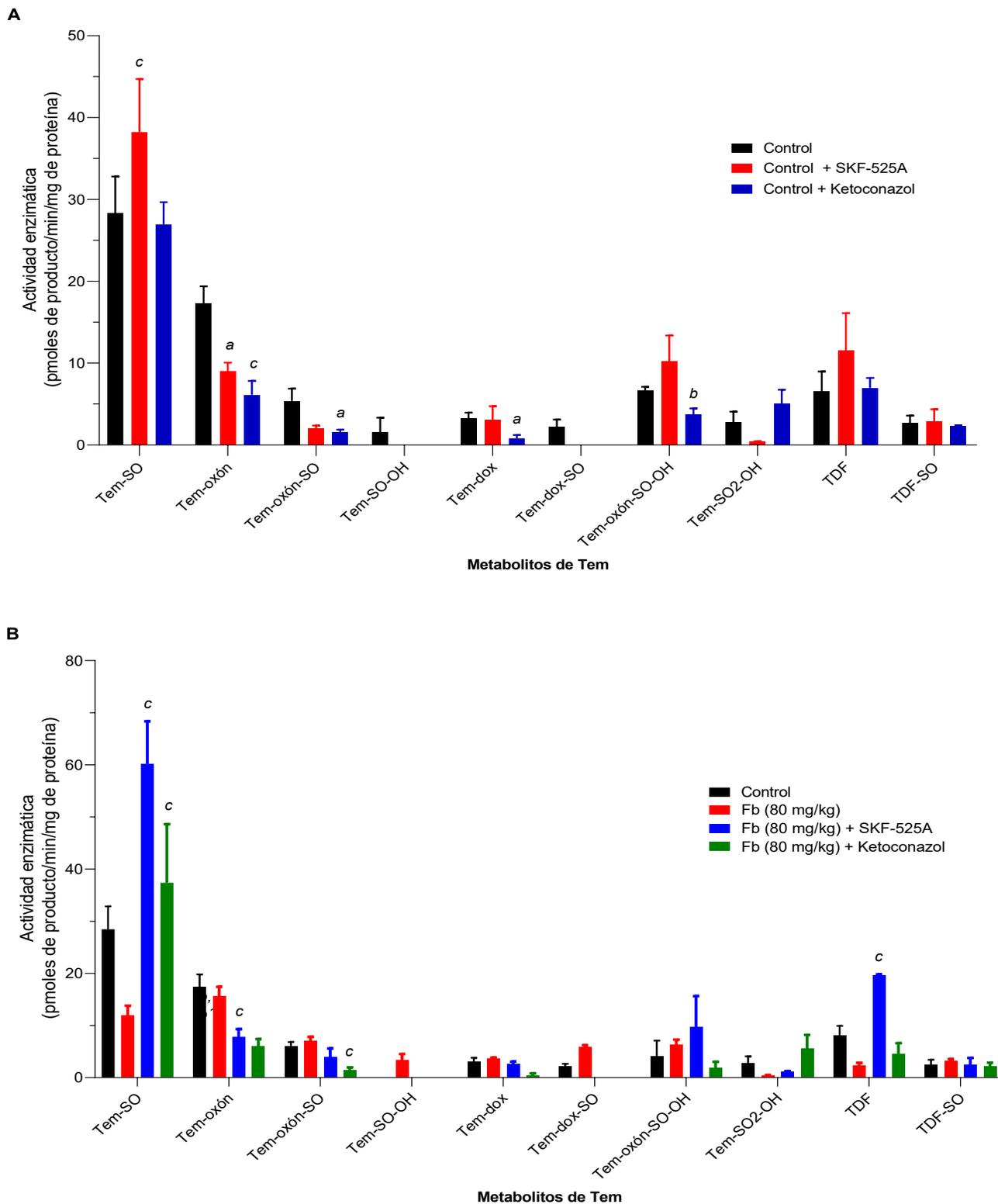


**Figura 24. Efecto de la inhibición de las monooxigenasas dependientes del CYP (A) y de las FMO (B) presentes en la fracción microsomal de ratas inducidas con Fb.** Grupos control y Tem, n=6; grupos Fb y BNF, n=4. Los resultados representan la media  $\pm$  D.E. <sup>a</sup> $p < 0.05$ , <sup>c</sup> $p < 0.001$ , diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control y al grupo inducido con Fb, respectivamente. Prueba de ANOVA seguido de la prueba *post hoc* de Dunnett.

### **3.4.2 Participación de isoformas específicas de CYP en el metabolismo del Tem**

Con base en los resultados de inhibición total de CYP y a fin de identificar cuales isoformas de CYP participan en el metabolismo del Tem se procedió a hacer ensayos enzimáticos usando los MHR del grupo no tratado y el tratado con Fb en las mismas condiciones experimentales, pero en presencia de los inhibidores químicos ketoconazol (CYP3A1/2) o SKF-525A (inhibidor inespecífico del CYP).

El uso de los inhibidores en la reacción provocó cambios en el patrón metabólico del Tem. En los ensayos en los que se empleó el SKF-525A se observó la inhibición de la generación del Tem-oxón en un 50%, mientras que la generación del Tem-dox-SO y el Tem-SO-OH fue inhibida al 100%. Por su parte, se apreció un aumento en la producción del Tem-SO y del TDF, de 4.0 y 7.2 veces, respectivamente. Cuando fue empleado el ketoconazol como inhibidor químico, disminuyó la generación de los metabolitos Tem-oxón (62%), Tem-oxón-SO (80%), Tem-dox (89%) y Tem-oxón-SO-OH (70%), mientras que la generación de los metabolitos Tem-dox-SO y Tem-SO-OH fue del 100%. La generación del Tem-SO mostró un aumento de 2.1 veces con respecto a los microsomas sin inhibir (Figura 25).



**Figura 25. Efecto del SKF-525A y el ketoconazol sobre la formación de los metabolitos del Tem usando MHR no tratados (A) y tratados con Fb (B).** Los resultados representan la media  $\pm$  D.E. Grupos control y Tem,  $n=6$ ; grupos Fb y BNF,  $n=4$ . <sup>a</sup> $p<0.05$ , <sup>c</sup> $p<0.001$ , diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control y al grupo inducido con Fb, respectivamente. Prueba de ANOVA seguido de la prueba *post hoc* de Dunnett.

## 4. Discusión

Desde la introducción del paratión en el año 1944, los POF han sido los compuestos más utilizados a nivel mundial para combatir las plagas que afectan a la agricultura y la salud de los animales y del hombre. Si bien el uso de estos compuestos ha mejorado el rendimiento de las cosechas y disminuido las enfermedades transmitidas por vectores, su uso ocasiona efectos adversos a la salud de la población en general y al ambiente en particular, ya sea por exposición directa o indirecta (WHO, 1986). Dentro del grupo de los POF se encuentra el Tem, el cual se ha usado ampliamente a nivel mundial desde la década de 1970, incluyendo en México. Este compuesto se ha descrito como de toxicidad baja para los mamíferos mientras que presenta un buen efecto como larvicida. Estudios *in vitro* e *in vivo* demuestran que el Tem posee la capacidad para inhibir la AChE, pero es incierto su mecanismo de acción en los mamíferos debido a que para este compuesto no se ha descrito la generación de un derivado oxón, que es el metabolito responsable de la toxicidad de los plaguicidas organofosforotioatos (POFT). Del mismo modo es insuficiente la información referente a su metabolismo y presenta contradicciones sobre su efecto sobre la expresión de los CYP hepáticos. A la fecha, se conoce muy poco acerca de la toxicidad de este compuesto.

### 4.1 Efecto del Tem sobre el peso corporal y el hígado de los animales

En el estudio desarrollado por Camacho-Hernández (2019), se observó que los animales expuestos a la dosis de Tem de 100 mg/kg/d los animales mostraron evidentes signos de toxicidad colinérgica, con parálisis muscular, debilidad muscular, cromodaciorrea, salivación y epistaxis. La exposición al plaguicida provocó una disminución en la ganancia de peso corporal de los animales a partir del 5<sup>to</sup> día de administración, que llegó a ser del 11.5 % al final del período de tratamiento (7 d). La toxicidad del Tem sobre el hígado fue evidente y se caracterizó por producir una decoloración y la disminución significativa de 12% en el peso relativo del órgano, lo cual provocó alteraciones en el patrón metabólico del Tem en ensayos *in vitro* con microsomas hepáticos y causó la muerte en el 41% de los animales tratados a esa dosis.

Debido a que los resultados anteriores evidenciaron que el hígado es un órgano blanco del Tem, en este estudio se empleó un esquema de administración menor que no afectara significativamente al hígado, pero que nos permitiera evaluar los posibles efectos sobre la

expresión del CYP hepático. A la dosis de Tem empleada en este estudio (50 mg/kg/d/3d), los animales no mostraron signos colinérgicos de toxicidad sistémica ni se registraron alteraciones en cuanto a la ganancia de peso, respecto al grupo control tratado solo con el vehículo. Al evaluar la toxicidad sobre el hígado, se observó que el tratamiento con Tem provocó un aumento de 12% en el peso relativo de este órgano comparado al grupo control, pero no se alteró ni el contenido de proteína microsomal ni la concentración de CYP total hepático (Figura 11). Este aumento en el peso relativo del hígado se ha asociado con consecuencias toxicológicas tempranas y ha sido descrito previamente en procesos de exposición a xenobióticos. Este efecto puede deberse a varios factores, tales como inflamación, hipertrofia e hiperplasia hepatocelular, ya que son los mecanismos compensatorios del hepatocito frente al estrés (Carthew y col., 1998). Este evento también puede estar relacionado con la generación de esteatosis (debido a la acumulación de lípidos en el órgano mayor a 5% de su peso), como ha sido demostrado en peces expuestos a Tem (Ba-Omar y col., 2013). En el estudio preliminar realizado con ratas tratadas con Tem a la dosis de 100 mg/kg/d/7d se observó, además, una disminución significativa de los niveles séricos de triglicéridos, lípidos de muy baja densidad y lípidos totales de las ratas tratadas con respecto a las ratas del grupo control. El análisis de estos resultados sugiere un desequilibrio en la tasa de síntesis y la tasa de liberación de los lípidos por el hepatocito, conllevando a una acumulación de éstos en el hígado de los animales expuestos al Tem. De este estudio llama la atención que los efectos sobre los niveles séricos de lípidos ocurran con tan solo 5 d de tratamiento a la LOAEL propuesta por la OMS (100 mg/kg/d). Todos estos resultados indican que el hígado es un órgano blanco del Tem y su efecto es dependiente de la dosis y del tiempo de exposición. Por lo tanto, hace falta realizar más estudios enfocados en la caracterización del daño hepático para aclarar el efecto del Tem sobre el metabolismo de los lípidos, así como de otros posibles daños debido a la importancia de este órgano en el metabolismo.

#### **4.2 Efecto del Tem sobre las principales isoformas hepáticas del CYP**

Se estudió el efecto de la exposición repetida a este plaguicida sobre las principales isoformas de CYP encargadas del metabolismo de xenobióticos. Para garantizar la funcionalidad de los CYP, al momento de realizar la determinación del CYP total se revisó que en los espectros de barrido de 500 a 400 nm no apareciera el pico a 420 que corresponde al CYP degradado. En ninguno de los microsomas de los animales tratados y

no tratados se observó tal pico (Figura 11), además, la concentración de CYP total calculado para los animales no tratados está dentro del rango normal descrito en la literatura (Figura 17) (Gibson y Skett, 1994). Estos resultados nos dieron la seguridad para continuar con nuestros objetivos, ya que los CYP no estaban degradados y su concentración era adecuada.

Uno de los métodos más ampliamente descrito para llevar a cabo esta evaluación es el estudio del patrón de hidroxilación de la T por la fracción microsomal hepática obtenida de animales de experimentación, lo cual ha resultado muy útil para monitorear la actividad específica de diversas isoformas del CYP (Waxman, 1991). La detección de los metabolitos de la T se ha realizado principalmente por la técnica de HPLC.

La técnica de HPLC constituye el método más adecuado para la identificación de los metabolitos hidroxilados de la T, debido que ofrece la detección simultánea de varios metabolitos, los cuales además, se pueden cuantificar con toda seguridad (Cawood y col., 2005; Snyder y col., 2012), pero presenta algunas dificultades analíticas. Primeramente, la mayoría de los métodos de HPLC/DAD reportados requieren complejos gradientes y tiempos de corrida largos (usualmente 30 min o más) para obtener una separación de los productos hidroxilados de la T (Wang y Zhang, 2007); además, muchos de los métodos reportados requieren del uso de tetrahidrofurano (THF) como un componente de la mezcla de disolventes en la fase móvil, el cual posee una absorbancia alta en el UV, presenta lenta equilibración de la columna y es muy reactivo, lo cual es un inconveniente cuando se trabaja con un equipo cuyas tuberías, empaques y sellos son de polímeros como el PEEK. Por otro lado, los metabolitos hidroxilados de la T presentan características fisicoquímicas muy parecidas y un espectro de absorción UV muy similar, lo que dificulta su identificación.

En ese sentido, se desarrolló un método analítico para evitar este tipo de problemas. Para ello se empleó una columna de fase reversa con tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro y se diseñó un sistema de disolventes compuesto por ACN, metanol y agua con gradientes lineales con diferente proporción en 5 etapas, cada una a diferente flujo y a una temperatura constante de 21 °C. Bajo estas condiciones se pudo detectar a la T y los metabolitos en un rango de tiempo de 23 min con una buena reproducibilidad, sensibilidad y resolución. Además, la línea base prácticamente no sufrió cambios, tales como subidas o bajadas, los cuales son un problema referido comúnmente por algunos autores cuando se emplea una

mezcla de disolventes (Purdon y Lehman-McKeeman, 1997). Otra de las ventajas del método establecido fue que no se requirió emplear una fase móvil amortiguada, ya que esto puede traer inconvenientes en la estabilidad del sistema por susceptibilidad a los cambios de pH.

Con las condiciones analíticas empleadas, el orden de elución de la T y sus metabolitos fue consistente con el referido por otros autores (Whalley y col., 2001; Wang y Zhang, 2007; Escobar-Wilches, 2011). La detección se realizó a una  $\lambda$  de 247 nm que corresponde a la  $\lambda_{\text{máx}}$  de absorción del grupo carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado localizado en el anillo A de la T. La Ctx, que se empleó como estándar interno (Purdon y Lehman-McKeeman, 1997; Escobar-Wilches, 2011), eluyó en una posición favorable sin solaparse con ninguno de los picos de interés (Figura 19).

Después de haber desarrollado y validado el método analítico para la determinación de los metabolitos de la T, se procedió a analizar el efecto del Tem sobre los CYP que participan en la hidroxilación. Aunque la exposición a Tem no alteró la concentración de CYP hepático total, en nuestro ensayo se evidenció un aumento de 2.0 veces en la generación del metabolito 6 $\beta$ -OHT que está asociado al CYP3A1/2 en la rata. La inducción de la subfamilia CYP3A es particularmente importante tanto en animales como en el hombre, debido a que ésta se considera la principal isoforma de CYP y se estima que está involucrada en el metabolismo de aproximadamente el 50% de los medicamentos comercializados (Dickins, 2004).

La inducción de CYP se conoce desde hace varias décadas. Sin embargo, los mecanismos subyacentes de esta inducción aún no se han entendido completamente. El mecanismo principal de la inducción del CYP3A1/2 en la rata es a través de una mayor tasa de transcripción génica mediada por el PXR. De forma resumida, el mecanismo de inducción del CYP3A1/2 implica la unión de un inductor a PXR, la formación de un complejo PXR/RXR unido al inductor, la translocación del complejo al núcleo y la unión del complejo a elementos de respuesta en el ADN en la región reguladora 5' del gen que codifica para el CYP, lo que desencadena la transcripción de este gen (Li y col., 2012).

De igual modo, en nuestro ensayo se evidenció el aumento de 3.6 y 2.6 veces en la generación de los metabolitos 16 $\alpha$ -OHT y AD, respectivamente, cuya generación en la rata macho se han asociado a la actividad enzimática del CYP2C11. La inducción de esta

isoforma es también importante debido a que comprende aproximadamente 50% del contenido del CYP hepático total en la rata macho adulta, representando la isoforma más abundante en esta especie. Esta isoforma está involucrada en el metabolismo de numerosos xenobióticos (Guengerich y col., 1982) y, además de hidroxilar a la T, participa en la biosíntesis de numerosos compuestos endógenos, llevando a cabo reacciones como la epoxigenación del ácido araquidónico y la hidroxilación de la vitamina D (Wójcikowski y col., 2013). La expresión del *CYP2C11* depende de la secreción pulsátil de la GH, así como de la frecuencia, duración y amplitud adecuadas del pulso. A nivel molecular, esta isoforma está regulada por la mencionada hormona a través del transductor de señal Janus quinasa 2 (JAK2) y el activador de la vía de transcripción 5b (STAT5b) (Choi y Waxman, 2000)

Se ha descrito que el *CYP2C11* también lleva a cabo la hidroxilación de la T en la posición 2 $\alpha$ - (Chovan y col., 2007), sin embargo, a diferencia del resultado obtenido con el metabolito 16 $\alpha$ -OHT, la generación de este metabolito no fue significativamente diferente en los microsomas de ratas tratadas con Tem. Una explicación para este evento podemos encontrarla en los parámetros de cinética enzimática de las reacciones de la formación de cada uno de los metabolitos. Empleando el concepto de aclaramiento intrínseco (CL<sub>i</sub>) empleado por Rane y col., (1977), que se describe por el cociente entre la  $V_{max}$  y la  $K_m$  de la reacción de formación de cada uno de los metabolitos y empleando los valores que obtuvo Chovan (2007) de un estudio en que empleó *CYP2C11* de rata expresado en cDNA, podemos concluir que la eficiencia metabólica de la reacción de formación del metabolito 16 $\alpha$ -OHT (233/37) es  $\approx 1.5$  veces más alta que la del metabolito 2 $\alpha$ -OHT (161/40), lo que se traduce en una mayor cantidad de metabolito formado, en las mismas condiciones experimentales. Estos resultados sugieren que la exposición repetida al Tem puede alterar la homeostasis de compuestos endógenos y exógenos, así como también los mecanismos que regulan la expresión de esta isoforma lo que puede tener implicaciones en la salud, para lo cual se requiere realizar estudios mejor enfocados para su caracterización.

Las actividades enzimáticas de los CYP involucrados en la 2 $\alpha$ -, 6 $\alpha$ - y 7 $\alpha$ - hidroxilación de la T, así como en la formación de la 6-DHT, no fueron modificadas significativamente por el tratamiento con Tem. En el mismo sentido, las actividades enzimáticas asociadas a los *CYP1A1* (EROD), *1A2* (MROD), *2B1/2* (PROD) y *2E1* (HPNF) no fueron alteradas por el tratamiento con Tem, lo que sumado a los resultados antes descritos sugiere que el Tem a

la dosis de 50 mg/kg/d por 3 d afecta selectivamente y de manera discreta la expresión de algunas isoformas de CYP hepáticas.

De la literatura consultada, solo el reporte realizado por Ennin y Franklin (1979) contiene información acerca del efecto del Tem sobre el CYP total hepático. A la dosis de 10 mg/kg/d administrado por 10 d, no se reportaron efectos sobre la concentración hepática del CYP, mientras que cuando se empleó una dosis de 300 mg/kg/d ocurrió un incremento de la concentración del CYP total desde el 4<sup>to</sup> día de tratamiento, aunque no se mencionó la magnitud del efecto. Por otra parte, Ferguson y col. (1985), refieren que después de una exposición a Tem a la dosis de 300 mg/kg/d/5 d existió un incremento en el tiempo de vida media de eliminación plasmática del plaguicida y un aumento del TSH, lo cual atribuyeron a la saturación e inhibición de las isoformas del CYP encargadas de la biotransformación del hexobarbital y del Tem, y favoreciendo la distribución del plaguicida a los tejidos periféricos. El presente estudio es el primero en el que se ha evaluado el efecto del plaguicida Tem sobre la expresión de las principales isoformas del CYP hepático encargadas de la biotransformación de xenobióticos en la rata. Además, de la evaluación de la actividad enzimática realizada en este estudio, resulta necesario determinar los niveles de proteína de las principales isoformas de CYP encargadas del metabolismo de xenobióticos, a fin de tener una idea más clara del efecto del plaguicida Tem para determinar a qué nivel de la regulación de los CYP podría estar siendo afectado.

Como se puede apreciar, hay algunos factores pendientes a ser evaluados en estudios posteriores que permitan asegurar que realmente el Tem no afecta la expresión de los CYP hepáticos que no fueron afectados. Entre ellos se deben considerar tratamientos más largos a dosis bajas cuidando de no afectar la función hepática, tal como se detectó en otros POFT que mostraron comportamiento bifásico para que fuera evidente el efecto sobre la expresión del CYP en el hígado (Jokanovic, 2001; Buratti y col., 2003).

#### **4.3 Efecto de la exposición repetida a Tem sobre su propia biotransformación**

El metabolismo *in vitro* del Tem por MHR no tratadas mostró la formación de por lo menos 10 metabolitos en una serie de reacciones consecutivas de fase I que incluye oxones, dioxones, sulfóxidos, sulfonas y productos mono- y di-hidrolizados generados por la hidrólisis de los difosfoésteres del plaguicida. El metabolito mayoritario de los productos del Tem fue el Tem-SO, seguido del Tem-oxón, los cuales son varias veces más altos que el

resto de los metabolitos (Figura 23). Esto sugiere que el Tem es amplia y eficientemente metabolizado, generando una gran variedad de compuestos con diversa estructura química y diferente potencial toxicológico. Una gran cantidad de xenobióticos tienen la habilidad de inducir la expresión de las enzimas que participan en su propio metabolismo, proceso que usualmente acelera la eliminación del xenobiótico (Parkinson y col., 2013). Con el fin de comprobar si la exposición repetida a Tem a la dosis de 50 mg/kg/d por 3 d podía alterar los niveles de las enzimas que lo metabolizan, se realizaron ensayos de metabolismo *in vitro* empleando a la fracción microsomal hepática obtenida de las ratas de nuestro estudio usando al Tem como sustrato. Como ya se mencionó previamente, de acuerdo a este esquema experimental, el Tem solo alteró de manera discreta la expresión de los CYP2C11 y 3A1/2, no obstante, estas alteraciones no se reflejaron en un cambio sobre el perfil metabólico del Tem *in vitro*. El evento observado en el CYP2C11 ha sido descrito anteriormente para otros xenobióticos que poseen la habilidad de inducir enzimas que no son capaces de metabolizarlo, en cuyo caso se dice que la inducción es “gratuita” (Parkinson y col., 2013).

Los resultados obtenidos sobre el patrón metabólico del Tem *in vitro* por la administración de Tem en este estudio fueron distintos a los obtenidos en el estudio preliminar en el que los MHR se obtuvieron de ratas tratadas a la dosis de 100 mg/kg/d por 7 d, y se observó una disminución en el número y la concentración de los metabolitos del Tem. Una posible explicación sobre esta diferencia entre los resultados podría ser que a la dosis más elevada (100 mg/kg/d) el Tem altere la funcionalidad de las enzimas encargadas de su propio metabolismo debido a la inhibición de los CYP, como se ha observado para otros POFT, como el paratión, malatión y el clorpirifos, como producto de su biotransformación (Jokanovic, 2001), los cuales actúan como sustratos suicidas provocando la inactivación de los CYP involucrados en su metabolismo, con la consecuentemente alteración el patrón metabólico, además, del daño hepático severo reflejado por la disminución del peso relativo del órgano y la muerte de un porcentaje elevado de los animales tratados a esa dosis. El análisis de todos estos resultados indica que los efectos del Tem son dependientes de las dosis con un margen de diferencia entre dosis muy estrecho, ambas dosis están muy lejos del valor de la  $DL_{50}$  y los efectos pueden ser muy distintos, por lo tanto, se impone la necesidad de realizar más estudios para clarificar el tipo de efecto a diferentes dosis y diferentes tiempos de tratamiento.

#### 4.4 Efecto de la inducción de isoformas específicas de CYP sobre el metabolismo del Tem

De forma paralela al tratamiento con Tem, se emplearon en este estudio ratas tratadas con BNF y Fb, los cuales son conocidos como inductores típicos de las subfamilias CYP1A y 2B, respectivamente. Los microsomas hepáticos obtenidos de estas ratas mostraron la inducción descrita para las referidas subfamilias por lo que fueron empleados como controles positivos en este estudio.

El perfil metabólico del Tem se modificó al emplear los MHR inducidas preferencialmente para las subfamilias CYP1A y 2B. En el caso de los microsomas inducidos con BNF, se apreció una disminución en la generación del Tem-SO (23%), Tem-oxón (46%) y Tem-oxón-SO-OH (62%), mientras que los niveles del resto de los metabolitos se mantuvieron sin cambios significativos (Figura 23). Aunque con la inducción de esta subfamilia se altera el perfil metabólico del Tem, al parecer su participación en la bioactivación del plaguicida es limitada. Esta menor capacidad de participación se puede explicar en base a la afinidad de sustratos, los CYP1A tienen mayor afinidad por moléculas planares y de dimensiones determinadas tipo de la *p*-TCDD y el Tem y sus metabolitos no son planares y su distribución espacial parece ser en forma de "V", una distribución espacial típica para los sustratos e inductores del tipo Fb (Lewis, 2001)..

Al emplear microsomas inducidos con Fb se observó un aumento de 1.6 veces en la formación del metabolito Tem-dox-SO y la disminución en los niveles detectados de Tem-SO y TDF (58 y 65%, respectivamente). En este caso, la disminución de un metabolito nos estaría indicando que ese metabolito es un sustrato con mayor afinidad para ser metabolizado por los CYP presentes y, por el contrario, un aumento nos sugiere poca afinidad, por lo tanto, será poco metabolizado. Con esta premisa se puede asumir que el Tem-SO y el TDF son mejores sustrato para ser metabolizados más eficientemente en presencia de los CYP2B, llevando a cabo la desulfuración oxidativa del Tem-SO y la S-oxidación del TDF. En este caso, la secuencia de reacciones conduciría hasta la formación del Tem-dox-SO (Figura 23). Este resultado sugiere que los CYP2B1/2 podrían ser las isoformas principales en la formación del Tem-oxón en la rata. Estos resultados indican que los xenobióticos que actúan como inductores tipo Fb favorecerían la desulfuración oxidativa,

además, de modificar el patrón metabólico del Tem y por ende su toxicidad al favorecer la formación de oxones.

#### **4.5 Identificación de las enzimas que participan en el metabolismo del Tem**

La desulfuración oxidativa no es la única reacción que sufren los POFT en su proceso metabólico. Los plaguicidas que contienen tioéteres pueden también sufrir la S-oxidación, dando lugar a un metabolito sulfóxido con poca o nula actividad tóxica sobre la AChE (Levi y Hodgson, 1988). Ambas reacciones (desulfuración oxidativa y S-oxidación) pueden ocurrir sobre un determinado POF y la tasa de ocurrencia de cada una de ellas puede tener implicaciones en la toxicidad del compuesto. Un hallazgo interesante en nuestro estudio resultó el hecho de que se generaron varios derivados oxidados del Tem (oxones, dioxones, sulfóxidos y sulfonas), pero para su formación requieren de NADPH. Solo el Tem-SO ha mostrado ser formado en condiciones abióticas, ya que se puede formar por medio del oxígeno ambiental, el pH y luz solar (Lacorte y col., 1996; 1997). De las enzimas metabolizadoras de xenobióticos presentes en la fracción microsomal, solo las FMO y los CYP pueden convertir tioéteres a sulfóxidos y fosforotioatos a oxones, pero ambas familias de enzimas son dependientes de NADPH para llevar a cabo la catálisis del sustrato (Levi y Hodgson, 1988; Grothusen y col., 1996; Henderson y col., 2004; Parkinson y col., 2013).

Para determinar la participación específica de estos grupos de enzimas en el metabolismo del Tem, se inactivaron selectivamente los dos tipos de monooxigenasas presentes en la fracción microsomal (Tynes y Hodgson, 1985; Grothusen y col., 1996). La formación del complejo entre el  $Fe^{2+}$  del grupo hemo de los CYP con el CO inhibió aproximadamente en 90% la generación del metabolito Tem-oxón, mientras que la formación de los metabolitos Tem-dox, Tem-dox-SO y TDF-SO fue inhibida completamente, incluso empleando microsomas de ratas inducidos con Fb. Esta disminución en las reacciones de desulfuración oxidativa estuvo acompañada por un aumento en la generación del metabolito Tem-SO, el cual se relaciona con un aumento en la oxidación del azufre central del Tem y fue un evento todavía más evidente cuando se utilizaron microsomas hepáticos de ratas tratadas con Fb. Este método de inhibición de las monooxigenasas dependientes del CYP ha sido frecuentemente utilizado para determinar su participación en el metabolismo de una gran variedad compuestos químicos como es el caso de la mirtazapina, el DDT, entre otros (Störmer y col., 2000; Kitamura y col., 2002).

Por otra parte, al inhibir selectivamente las FMO con temperatura (50 °C por 90 seg), se apreció un aumento del metabolismo del Tem, caracterizado por un incremento significativo de los metabolitos Tem-oxón-SO, TDF y TDF-SO; los metabolitos Tem-oxón y Tem-oxón-SO-OH también mostraron un aumento en comparación con el grupo control, pero éstos solo fueron significativos cuando se emplearon MHR inducidas con Fb. Acompañado de este aumento en la formación de metabolitos por reacciones de desulfuración oxidativa, se apreció en todos los análisis un aumento significativo en los niveles de generación del Tem-SO. Estos resultados confirman que ambas familias de enzimas, los CYP y las FMO, presentes en la fracción microsomal hepática de la rata participan en el metabolismo del Tem. Además, confirman que en la formación de los oxones del Tem hay una participación muy importante de los CYP hepáticos y una participación muy baja o nula de las FMO y para la formación de los sulfóxidos participan tanto los CYP como las FMO. A pesar de las diferencias interespecie debido a la presencia de diferentes isoformas de CYP y de FMO específicas para cada especie que pueden tener una afinidad distinta por sustratos, estos resultados sugieren que los CYP y las FMO son las principales familias de enzimas que participan en el metabolismo del Tem en todas las especies, y con grandes posibilidades de que se formen los mismos productos metabólicos (Levi y Hodgson, 1988; Usmani y col., 2004; Martignoni y col., 2006).

#### **4.6 Identificación de las isoformas específicas de CYP que participan en el metabolismo del Tem**

Inhibir individualmente una enzima es una herramienta ampliamente usada en la investigación que permite elucidar el papel de enzimas específicas en el metabolismo de un xenobiótico. Esta inhibición tradicionalmente se ha realizado por 2 métodos, empleando inhibidores químicos o anticuerpos específicos para cada isoforma a evaluar. Dado que en muchas ocasiones no se alcanza el 100% de la inhibición de la isoforma, se ha propuesto que la combinación de un anticuerpo con un inhibidor químico podría asegurar con mayor fidelidad la participación de una isoforma en el metabolismo de un xenobiótico (Rock y col., 2008; Shou y Lu, 2009).

Los xenobióticos con capacidad para inhibir las isoformas de CYP se clasifican en dos grupos, los de acción específica sobre una isoforma o los generales (inespecíficos). Estos últimos inhiben más de una isoforma del CYP, pero muestran diferencias en la potencia

inhibitoria sobre cada una de las enzimas. Ese es el caso del SKF-525A o proadifen, el cual es reconocido como un inhibidor general de CYP pero que Ono y col. (1996) demostraron que bloquea en más de un 40% las actividades metabólicas de todas las isoformas de los CYP humanos evaluadas (CYP1A2, 2A6, 2B6, 2E1, subfamilias CYP2C, 2D y 3A), pero que este efecto fue de diferente grado dependiendo de la isoforma. La mayor inhibición se registró sobre las subfamilias CYP2D y CYP2B ( $\approx 100\%$ ); sobre la subfamilia CYP3A posee una capacidad inhibitoria de  $\approx 70\%$ . Aunque el estudio se realizó empleando microsomas hepáticos de humano e isoformas específicas del CYP humanos expresados en células HepG2, el hecho de que muchas de estas isoformas posean homólogos funcionales en la rata (Parkinson y col., 2013) nos permite suponer que el evento puede ocurrir con los CYP hepáticos de la rata, aunque con diferencias en la potencia inhibitoria.

Al tratar los microsomas de ratas del grupo control con el inhibidor proadifen, el patrón metabólico del compuesto se alteró con respecto a los mismos microsomas sin inhibir, mostrando una disminución significativa de 50% en la generación del Tem-oxón, mientras que la generación del Tem-dox-SO y el Tem-SO-OH fue inhibida al 100%. Por su parte, los niveles detectados de Tem-SO fueron mayores. Estos resultados fueron consistentes con lo observado cuando se inhibieron los CYP con CO y reflejan el aumento en la S-oxidación del compuesto en detrimento de las reacciones de desulfuración oxidativa que dan lugar al oxón y dioxón del Tem. Un fenómeno similar fue observado con los microsomas de ratas tratadas con Fb, pero con un aumento significativo de 4 veces en la generación del Tem-SO y de 8 veces en la generación del TDF. Para estos últimos metabolitos no se ha descrito algún efecto tóxico agudo, por lo que se confirma que los xenobióticos con capacidad para modificar la actividad de los CYP pueden modificar la toxicidad del Tem.

El ketoconazol es un xenobiótico con efecto inhibidor específico sobre la subfamilia de CYP3A de humanos y de rata, aunque la potencia inhibitoria sobre las isoformas humanas CYP3A4/5 ( $IC_{50} = 0.04 \mu M$ ) es mayor que sobre las isoformas de rata CYP3A1/2 ( $IC_{50} = 0.29 \mu M$ ) (Eagling y col., 1998). Al usar esta herramienta farmacológica en la reacción enzimática del metabolismo *in vitro* del Tem con MHR no tratadas se observó una inhibición significativa de 62% en la formación del metabolito Tem-oxón, la cual resultó ser mayor que la observada cuando se empleó el proadifen. De igual modo se inhibió significativamente la formación de los metabolitos Tem-oxón-SO, Tem-oxón-SO-OH, Tem-dox, Tem-dox-SO y Tem-SO-OH

desde el 70 hasta el 100%. El mismo efecto fue observado al emplear microsomas inducidos preferencialmente para la subfamilia CYP2B con Fb.

Los resultados obtenidos en este proyecto ayudan a determinar cuáles pueden ser las principales isoformas de CYP involucradas en el metabolismo del Tem. No obstante, es importante considerar que los MHR son una mezcla de varias isoformas de CYP y FMO, pero también es necesario considerar la promiscuidad metabólica del modelo experimental como son los MHR. Ante esta situación es necesario realizar más estudios usando inhibidores de otras isoformas y complementarlas con ensayos de inhibición con anticuerpos, lo que nos permitirá con mayor seguridad caracterizar a las enzimas participantes en esta compleja ruta metabólica del Tem.

En resumen, el Tem no indujo las actividades enzimáticas asociadas a los CYP1A1, 1A2, 2B1/2 y 2E1, pero si alteró la expresión de los CYP2C11 y 3A1/2 de manera discreta, sin embargo, estas alteraciones no modificaron el patrón metabólico *in vitro* del Tem usando MHR. Los resultados de este estudio indican que la ruta de biotransformación del Tem es mucho más amplia y compleja que se caracteriza por una serie de reacciones consecutivas de fase I formando varios metabolitos intermediarios con diferentes grados de oxidación hasta llegar finalmente a los productos fenólicos oxidados como resultado de la hidrólisis de los ésteres de fosfato. Los CYP3A1/2 y CYP2B1/2 juegan un papel importante en la ruta de biotransformación del Tem, pues están involucradas en la formación de los derivados mono-oxón y di-oxón (bioactivación) del Tem. Al no inhibirse por completo la formación del Tem-oxón y Tem-dox con los inhibidores químicos ketoconazol y el proadifen nos permite suponer la participación de otras isoformas de CYP presentes en los MHR, lo cual confirma la promiscuidad metabólica de la superfamilia del CYP, sin descartar tampoco la participación de las FMOs. Los resultados de este estudio pueden ayudar a explicar la toxicidad asociada a este plaguicida por exposiciones agudas, subcrónicas y crónicas.

## 5. Conclusiones

- ✓ La administración del Tem a una dosis de 50 mg/kg/d por 3 d no provocó signos evidentes de toxicidad sistémica en los animales tratados, pero sí aumentó el peso relativo del hígado sin afectar la concentración del CYP total hepático.
- ✓ El Tem afectó de manera diferencial la regulación de las actividades enzimáticas de algunos CYP hepáticos, indujo de manera discreta la expresión de los CYP2C11 y 3A1/2 y no afectó a los CYP1A1, 1A2, 2A1, 2B1/2 y 2E1. Sin embargo, estos efectos no modificaron su propio metabolismo *in vitro*.
- ✓ El Tem es metabolizado ampliamente *in vitro* por reacciones consecutivas de Fase 1, como son la desulfuración oxidativa, la S-oxidación y la desfosforilación.
- ✓ En el metabolismo del Tem están involucrados tanto las monooxigenasas dependientes de CYP como las monooxigenasas dependientes de flavina.
- ✓ Los CYP3A1/2 y los CYP2B1/2 juegan un papel importante en la bioactivación del Tem ya que están involucradas en la formación de los derivados mono-oxón y di-oxón del Tem.

## 6. Perspectivas

- ✓ Complementar los estudios de participación de las principales isoformas de CYP en la ruta de biotransformación *in vitro* del Tem con MHR, mediante ensayos de inhibición empleando inhibidores químicos y anticuerpos específicos.
- ✓ Determinar mediante la técnica de Western Blot el efecto del Tem sobre los niveles de proteína de las isoformas de CYP evaluadas en este estudio.
- ✓ Determinar si el Tem o sus metabolitos tienen la capacidad de actuar como un sustrato suicida como se ha descrito para otros POFT, inhibiendo la actividad enzimática de las isoformas de CYP participantes en la ruta metabólica.
- ✓ Determinar el metabolismo del Tem por microsomas de hígado humano.

## 7. Referencias

- Abass, K., & Pelkonen, O. (2013). The inhibition of major human hepatic cytochrome P450 enzymes by 18 pesticides: Comparison of the N-in-one and single substrate approaches. *Toxicology in Vitro*, 27(5), 1584–1588. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.05.003>
- Abass, K., Turpeinen, M., & Pelkonen, O. (2009). An evaluation of the cytochrome P450 inhibition potential of selected pesticides in human hepatic microsomes. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 44(6), 553–563. <https://doi.org/10.1080/03601230902997766>
- AFSSET. (2006). *Synthèse des données disponibles en matière de propriétés physico-chimiques, toxicologiques et écotoxicologiques et évaluation des risques pour l'Homme et l'Environnement du Téméphos* (2006/001). <https://www.anses.fr/fr/system/files/BIOC2006et0001Ra.pdf>
- Aiub, C. A. F., Coelho, E. C. A., Sodr , E., Pinto, L. F. R., & Felzenszwalb, I. (2002). Genotoxic evaluation of the organophosphorous pesticide temephos. *Genetics and Molecular Research*, 1(2), 159–166.
- Ba-Omar, T. A., Al-Kharusi, I., & Victor, R. (2013). Effects of Pesticide Temephos on the Liver of *Aphanius dispar* (R ppell 1828) (Pisces: Cyprinodontidae): A Microscopic Study. *Sultan Qaboos University Journal for Science [SQUJS]*, 18, 11. <https://doi.org/10.24200/squjs.vol18iss0pp11-18>
- Benitez-Trinidad, A. B., Herrera-Moreno, J. F., Vázquez-Estrada, G., Verdín-Betancourt, F. A., Sordo, M., Ostrosky-Wegman, P., Bernal-Hernández, Y. Y., Medina-Díaz, I. M., Barr n-Vivanco, B. S., Robledo-Marenco, M. L., Salazar, A. M., & Rojas-García, A. E. (2015). Cytostatic and genotoxic effect of temephos in human lymphocytes and HepG2 cells. *Toxicology in Vitro*, 29(4), 779–786. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.02.008>
- Bernhardt, R. (2006). Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *Journal of Biotechnology*, 124(1), 128–145. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.01.026>
- Blinn, R. C. (1968). Abate Insecticide. The Fate of O,O,O',O'-Tetramethyl O,O'-Thiodi-p-phenylene Phosphorothioate on Bean Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 16(3), 441–445.
- Blinn, R. C. (1969). Metabolic fate of abate insecticide in the rat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 17(1), 118–122. <https://doi.org/10.1021/jf60161a614>
- Boobis, A. R., Nebert, D. W., & Felton, J. S. (1977). Comparison of  $\beta$  naphthoflavone and 3 methylcholanthrene as inducers of hepatic cytochrome(s) P 448 and aryl hydrocarbon (benzo[a]pyrene) hydroxylase activity. *Molecular Pharmacology*, 13(2), 259–268.
- Buratti, F. M., Leoni, C., & Testai, E. (2007). The Human Metabolism of Organophosphorothionate Pesticides: Consequences for Toxicological Risk Assessment. *Journal F r Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit*, 2(1), 37–44. <https://doi.org/10.1007/s00003-006-0109-z>
- Buratti, F. M., Volpe, M. T., Meneguz, A., Vittozzi, L., & Testai, E. (2003). CYP-specific bioactivation of four organophosphorothionate pesticides by human liver microsomes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 186(3), 143–154. [https://doi.org/10.1016/S0041-008X\(02\)00027-3](https://doi.org/10.1016/S0041-008X(02)00027-3)
- Burke, M. D., Thompson, S., Elcombe, C. R., Halpert, J., Haaparanta, T., & Mayer, R. T.

- (1985). Ethoxy-, pentoxy- and benzyloxyphenoxazones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P-450. *Biochemical Pharmacology*, 34(18), 3337–3345. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(85\)90355-7](https://doi.org/10.1016/0006-2952(85)90355-7)
- Butler, A. M., & Murray, M. (1997). Biotransformation of parathion in human liver: participation of CYP3A4 and its inactivation during microsomal parathion oxidation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 280(2), 966–973. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9023313>
- Camacho-Hernández, I. (2019). *Efecto de la exposición repetida al plaguicida Temefos sobre las células espermáticas y la presencia del plaguicida y sus metabolitos en tejidos reproductivos*. Cinvestav-IPN.
- Carthew, P., Edwards, R. E., & Nolan, B. M. (1998). The quantitative distinction of hyperplasia from hypertrophy in hepatomegaly induced in the rat liver by phenobarbital. *Toxicological Sciences*, 44(1), 46–51. <https://doi.org/10.1006/toxs.1998.2473>
- Cawood, M. L., Field, H. P., Ford, C. G., Gillingwater, S., Kicman, A., Cowan, D., & Barth, J. H. (2005). Testosterone Measurement by Isotope-Dilution Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry: Validation of a Method for Routine Clinical Practice. *Clinical Chemistry*, 51(8), 1472–1479. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2004.044503>
- CENAPRECE. (2010). Guía de nebulización (rociado espacial) para la aplicación de insecticidas a volumen ultra bajo (ULV) con equipo pesado. In *Programa de infecciones transmitidas por vectores* (Issue 55).
- Chang, G. W. M., & Kam, P. C. A. (1999). The physiological and pharmacological roles of cytochrome P450 isoenzymes. *Anaesthesia*, 54(1), 42–50. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2044.1999.00602.x>
- Choi, H. K., & Waxman, D. J. (2000). Plasma Growth Hormone Pulse Activation of Hepatic JAK-STAT5 Signaling: Developmental Regulation and Role in Male-Specific Liver Gene Expression. *Endocrinology*, 141(9), 3245–3255. <https://doi.org/10.1210/endo.141.9.7638>
- Choi, M. H., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., & Tannenbaum, S. R. (2005). Characterization of testosterone 11 $\beta$ -hydroxylation catalyzed by human liver microsomal cytochromes P450. *Drug Metabolism and Disposition*, 33(6), 714–718. <https://doi.org/10.1124/dmd.104.003327>
- Chovan, J. P., Ring, S. C., Yu, E., & Baldino, J. P. (2007). Cytochrome P450 probe substrate metabolism kinetics in Sprague Dawley rats. *Xenobiotica*, 37(5), 459–473. <https://doi.org/10.1080/00498250701245250>
- Costa, L. G. (2008). Toxic effects of pesticides. In C. D. Klaassen (Ed.), *Cassarett & Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons* (7th ed., pp. 883–930). McGraw-Hill. <https://doi.org/https://doi.org/10.1036/0071470514>
- DeBethizy, & Hayes. (2001). Metabolism: A determinant of toxicity. In Hayes AW (Ed.), *Principles and Methods of Toxicology* (4th edn). Taylor and Francis Press.
- Dickins, M. (2004). Induction of Cytochromes P450. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 4(16), 1745–1766. <https://doi.org/10.2174/1568026043387115>
- Donato, M., & O'Connor, J. (2004). Métodos de evaluación del citocromo P-450 y de su papel en el metabolismo de fármacos. In *Monografía XIV: Citocromo P450* (pp. 313–332). Real Academia Nacional de Farmacia.

- [https://www.uv.es/jcastell/Metodos\\_de\\_evaluacion\\_del\\_citocromo\\_P450.pdf](https://www.uv.es/jcastell/Metodos_de_evaluacion_del_citocromo_P450.pdf)
- Donato, T. (2018). El metabolismo de Xenobióticos por los Organismos. Reacciones de Fase I y de Fase II. *Centro de Investigación, Hospital La Fe*.
- Eagling, V. A., Tjia, J. F., & Back, D. J. (1998). Differential selectivity of cytochrome P450 inhibitors against probe substrates in human and rat liver microsomes. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 45(2), 107–114. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.1998.00679.x>
- Edward, J. B., & Sogbesan, O. A. (2007). Toxicity Effect of Temephos on *Bulinus globosus* and *Lymnaea natalensis*. *Advances in Biological Research*, 1(3–4), 130–133. [http://idosi.org/abr/1\(3-4\)/8.pdf](http://idosi.org/abr/1(3-4)/8.pdf)
- Ennin, M. A., & C.S.Franklin. (1979). *Some sub-cellular effects of an organophosphorus insecticide, Abate*. 66(1), 72–73.
- Ferguson, P. W., Medon, P. J., & Nasri, E. (1985). Temephos (Abate) Metabolism and Toxicity in Rats. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 147, 143–147.
- Furge, L. L., & Guengerich, F. P. (2006). Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism and chemical toxicology: An introduction. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 34(2), 66–74. <https://doi.org/10.1002/bmb.2006.49403402066>
- Gaines, T. ., Kimborough, R., & Laws, E. R. J. (1967). Toxicology of Abate in laboratory animals. *Archives of Environmental Health*, 14, 283–288.
- Gibson, G. G., & Skett, P. (1994). *Introduction to drug metabolism* (2nd ed.). Chapman & Hall.
- Gonzalez, F. ., Coughtrie, M., & Tukey, R. H. (2011). Drug Metabolism. In Brunton L., B. Chabner, & B. Knollmann (Eds.), *Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics* (pp. 123–144). McGraw-Hill.
- Grothusen, A., Hardt, J., Bräutigam, L., Lang, D., & Böcker, R. (1996). A convenient method to discriminate between cytochrome P450 enzymes and flavin-containing monooxygenases in human liver microsomes. *Archives of Toxicology*, 71(1–2), 64–71. <https://doi.org/10.1007/s002040050359>
- Guengerich, F. P. (1995). Cytochromes P450 of human liver. Classification and activity profiles of the major enzymes. In Pacifici GM & F. GN (Eds.), *Advances in drug metabolism in man* (pp. 179–231). Office for the Official Publications of the European Communities.
- Guengerich, F. P. (2001). Uncommon P450-Catalyzed Reactions. *Current Drug Metabolism*, 2(2), 93–115. <https://doi.org/doi:10.2174/1389200013338694>
- Guengerich, F. P. (2005). Human Cytochrome P450 Enzymes. In Ortiz de Montellano P.R. (Ed.), *Cytochrome P450* (pp. 377–530). Springer US. [https://doi.org/10.1007/0-387-27447-2\\_10](https://doi.org/10.1007/0-387-27447-2_10)
- Guengerich, F. P., Dannan, G. A., Wright, S. T., Martin, M. V., & Kaminsky, L. S. (1982). Purification and characterization of microsomal cytochrome P-450s. *Xenobiotica*, 12(11), 701–716. <https://doi.org/10.3109/00498258209038945>
- Hamilton, R. J., & Sewell, P. A. (1982). Introduction to high performance liquid chromatography. In *Introduction to high performance liquid chromatography* (pp. 1–12). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-009-5938-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-94-009-5938-5_1)

- Hankinson, O. (2005). Role of coactivators in transcriptional activation by the aryl hydrocarbon receptor. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 433(2), 379–386. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.09.031>
- Henderson, M. C., Krueger, S. K., Siddens, L. K., Stevens, J. F., & Williams, D. E. (2004). S-oxygenation of the thioether organophosphate insecticides phorate and disulfoton by human lung flavin-containing monooxygenase 2. *Biochemical Pharmacology*, 68(5), 959–967. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.05.051>
- Hiroi, T., Chow, T., Imaoka, S., & Funae, Y. (2002). Catalytic specificity of CYP2D2 isoforms in rat and human. *Drug Metabolism and Disposition*, 30(9), 970–976. <https://doi.org/10.1124/dmd.30.9.970>
- Hodgson, E., & Golstein, J. A. (2001). Metabolism of Toxicants: Phase 1 Reactions and Pharmacogenetics. In E. Hodgson & R. C. Smart (Eds.), *Introduction to Biochemical Toxicology* (3rd ed., pp. 67–113). John Wiley and Sons Ltd. <https://www.bookdepository.com/Introduction-Biochemical-Toxicology-Ernest-Hodgson/9780471333340>
- Jokanovic, M. (2001). Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology*, 166(3), 139–160. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00463-2](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00463-2)
- Kamatani, T., Maeda, K., Shimada, M., Kitani, K., Nagai, T., & Kato, R. (1985). Age-related alteration in the activities of drug-metabolizing enzymes and contents of sex-specific forms of cytochrome P-450 in liver microsomes from male and female rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 233(1), 222–228. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3981456>
- Khojasteh, S. C., Prabhu, S., Kenny, J. R., Halladay, J. S., & Lu, A. Y. H. (2011). Chemical inhibitors of cytochrome P450 isoforms in human liver microsomes: A re-evaluation of P450 isoform selectivity. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 36(1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s13318-011-0024-2>
- Kimura, S., Kozak, C. A., & Gonzalez, F. J. (1989). Identification of a Novel P450 Expressed in Rat Lung: cDNA Cloning and Sequence, Chromosome Mapping, and Induction by 3-Methylcholanthrene. *Biochemistry*, 28(9), 3798–3803. <https://doi.org/10.1021/bi00435a026>
- Kitamura, S., Shimizu, Y., Shiraga, Y., Yoshida, M., Sugihara, K., & Ohta, S. (2002). Reductive Metabolism of p,p'-DDT and o,p'-DDT by Rat Liver Cytochrome P450. *Drug Metabolism and Disposition*, 30(2), 113–118. <https://doi.org/10.1124/dmd.30.2.113>
- Lacorte, Silvia, Ehresmann, N., & Barceló, D. (1996). Persistence of temephos and its transformation products in rice crop field waters. *Environmental Science and Technology*, 30(3), 917–923. <https://doi.org/10.1021/es9503589>
- Lacorte, Sílvia, Jeanty, G., Marty, J. L., & Barceló, D. (1997). Identification of fenthion and temephos and their transformation products in water by high-performance liquid chromatography with diode array detection and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 777(1), 99–114. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00557-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00557-8)
- Laws, E. R., Morales, F. R., Hayes, W. J., & Joseph, C. R. (1967). Toxicology of Abate in Volunteers. *Archives of Environmental Health*, 14(2), 289–291. <https://doi.org/10.1080/00039896.1967.10664733>

- Leesch, J. G., & Fukuto, T. R. (1972). The metabolism of abate in mosquito larvae and houseflies. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2(2), 223–235. [https://doi.org/10.1016/0048-3575\(72\)90025-9](https://doi.org/10.1016/0048-3575(72)90025-9)
- Levi, P. E., & Hodgson, E. (1988). Stereospecificity in the oxidation of phorate and phorate sulphoxide by purified FAD-containing mono-oxygenase and cytochrome p-450 isozymes. *Xenobiotica*, 18(1), 29–39. <https://doi.org/10.3109/00498258809055134>
- Lewis, D. F. V. (2001). *Guide to Cytochromes P450. Structure and Function* (1st ed.). Taylor & Francis Inc.
- Li, L., Li, Z., Deng, C., Ning, M., Li, H., Bi, S., Zhou, T., & Lu, W. (2012). A mechanism-based pharmacokinetic/pharmacodynamic model for CYP3A1/2 induction by dexamethasone in rats. *Acta Pharmacologica Sinica*, 33(1), 127–136. <https://doi.org/10.1038/aps.2011.161>
- Lin, J. H., & Lu, A. Y. (1998). Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clinical Pharmacokinetics*, 35(5), 361–390.
- Lubet, R. A., Mayer, R. T., Cameron, J. W., Nims, R. W., Burke, M. D., Wolff, T., & Guengerich, F. P. (1985). Dealkylation of pentoxyresorufin: A rapid and sensitive assay for measuring induction of cytochrome(s) P-450 by phenobarbital and other xenobiotics in the rat. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 238(1), 43–48. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(85\)90138-9](https://doi.org/10.1016/0003-9861(85)90138-9)
- Martignoni, M., Groothuis, G. M. M., & de Kanter, R. (2006). Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 2(6), 875–894. <https://doi.org/10.1517/17425255.2.6.875>
- Matsunaga, T., Nagata, K., Holsztynska, E. J., Lapenson, D. P., Smith, A., Kato, R., Gelboin, H. V., Waxman, D. J., & Gonzalez, F. J. (1988). Gene Conversion and Differential Regulation in the Rat P-450 IIA Gene Subfamily. Purification, Catalytic Activity, cDNA and Deduced Amino Acid Sequence, and Regulation of an Adult Male-Specific Hepatic Testosterone 15 Alpha-Hydroxylase. *Journal of Biological Chemistry*, 263, 17995–18002.
- Mayer, R. T., Netter, K. J., Heubel, F., Hahnemann, B., Buchheister, A., Mayer, G. K., & Burke, M. D. (1990). 7-alkoxyquinolines: New fluorescent substrates for cytochrome p450 monooxygenases. *Biochemical Pharmacology*, 40(7), 1645–1655. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(90\)90467-Y](https://doi.org/10.1016/0006-2952(90)90467-Y)
- Mode, A., Ahlgren, R., Lahuna, O., & Gustafsson, J.-Å. (1998). Gender differences in rat hepatic CYP2C gene expression — regulation by growth hormone. *Growth Hormone & IGF Research*, 8(2), 61–67. [https://doi.org/10.1016/S1096-6374\(98\)80025-7](https://doi.org/10.1016/S1096-6374(98)80025-7)
- Nagata, K., Matsunaga, T., Gillette, J., Gelboin, H. V., & Gonzalez, F. J. (1987). Rat Testosterone 7 Alpha-Hydroxylase. Isolation, Sequence, and Expression of cDNA and Its Developmental Regulation and Induction by 3-methylcholanthrene. 262(6), 2787–2793.
- Nagata, K., Shimada, M., Yamazoe, Y., & Kato, R. (1991). Regulations of Male-Dominant P-450md mRNA in Rat Liver by Hormonal Factors and Xenobiotics. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 57(1), 123–126. <https://doi.org/10.1254/jjp.57.123>
- Neal, R. A., & Halpert, J. (1982). Toxicology of Thiono-Sulfur Compounds. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 22(1), 321–339.

<https://doi.org/10.1146/annurev.pa.22.040182.001541>

- Nerurkar, P. V., Park, S. S., Thomas, P. E., Nims, R. W., & Lubet, R. A. (1993). Methoxyresorufin and benzyloxyresorufin: substrates preferentially metabolized by cytochromes P4501A2 AND 2B, respectively, in the rat and mouse. *Biochemical Pharmacology*, 46(5), 933–943. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(93\)90504-P](https://doi.org/10.1016/0006-2952(93)90504-P)
- Parkinson, A., Ogilvie, B. W., Buckley, D. B., Kazmi, F., Czerwinski, M., & Parkinson, O. (2013). Biotransformation of Xenobiotics. In P. Curtis D. Klaassen (Ed.), *Cassarett & Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons* (8th ed., p. 1424). McGraw Hill Education.
- Pehkonen, S. O., & Zhang, Q. (2002). The Degradation of Organophosphorus Pesticides in Natural Waters: A Critical Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 32(1), 17–72. <https://doi.org/10.1080/10643380290813444>
- Pelkonen, O. (2004). Induction and inhibition of cytochrome P-450 \*. *Monografias de La Real Academia Nacional de Farmacia*, 123–147.
- Perry, M. J. (2008). Effects of environmental and occupational pesticide exposure on human sperm: A systematic review. *Human Reproduction Update*, 14(3), 233–242. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmm039>
- Peterson, J. A., & Graham, S. E. (1998). A close family resemblance: The importance of structure in understanding cytochromes P450. *Structure*, 6(9), 1079–1085. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(98\)00109-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(98)00109-9)
- Purdon, M. P., & Lehman-McKeeman, L. D. (1997). Improved high-performance liquid chromatographic procedure for the separation and quantification of hydroxytestosterone metabolites. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 37(2), 67–73. [https://doi.org/10.1016/S1056-8719\(97\)00013-0](https://doi.org/10.1016/S1056-8719(97)00013-0)
- Rane, A., Wilkinson, G. R., & Shand, D. G. (1977). Prediction of hepatic extraction ratio from in vitro measurement of intrinsic clearance. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 200(2), 420–424.
- Reinke, L. A., & Moyer, M. J. (1985). *p-Nitrophenol Hydroxylation: A Microsomal Oxidation wich is highly inducible by Ethanol*. 13(05), 548–552.
- Renshaw, D. W., & Bobbis, A. (2006). Temephos. In *Pesticides residues in food - 2006* (1st ed., pp. 403–427). Joint meeting of the FAO and WHO.
- Rock, D. A., Foti, R. S., & Pearson, J. T. (2008). The Combination of Chemical and Antibody Inhibitors for Superior P450 3A Inhibition in Reaction Phenotyping Studies. *Drug Metabolism and Disposition*, 36(12), 2410–2413. <https://doi.org/10.1124/dmd.108.023572>
- Rozendaal, J. A. (1997). Vector Control (Houseflies). *WHO, Geneva*, 302–323.
- Ryan, D. E., & Levin, W. (1990). Purification and characterization of hepatic microsomal cytochrome P-450. *Pharmacology & Therapeutics*, 45(2), 153–239. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(90\)90029-2](https://doi.org/10.1016/0163-7258(90)90029-2)
- Sasamura, H., Nagata, K., Yamazoe, Y., Shimada, M., Saruta, T., & Kato, R. (1990). Effect of growth hormone on rat hepatic cytochrome P-450f mRNA: a new mode of regulation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 68(1), 53–60. [https://doi.org/10.1016/0303-7207\(90\)90169-9](https://doi.org/10.1016/0303-7207(90)90169-9)
- Secretaría de Salud. (2019). *Panorama Epidemiológico de Dengue , 2019* (Vol. 52).

- [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/524262/Pano\\_dengue\\_52\\_2019.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/524262/Pano_dengue_52_2019.pdf)
- Seliskar, M., & Rozman, D. (2007). Mammalian cytochromes P450-Importance of tissue specificity. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1770(3), 458–466. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.09.016>
- Shimada, T. (2006). Xenobiotic-Metabolizing Enzymes Involved in Activation and Detoxification of Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 21(4), 257–276. <https://doi.org/10.2133/dmpk.21.257>
- Shou, M., & Lu, A. Y. H. (2009). Minireview Antibodies as a Probe in Cytochrome P450 Research. *Drug Metabolism and Disposition*, 37(5), 925–931. <https://doi.org/10.1124/dmd.108.025718>
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Glajch, J. L. (2012). Non-Ionic Samples: Reversed- and Normal-Phase HPLC. In *Practical HPLC Method Development* (pp. 233–291). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781118592014.ch6>
- Souček, P., & Gut, I. (1992). Cytochromes P-450 in rats: structures, functions, properties and relevant human forms. *Xenobiotica*, 22(1), 83–103. <https://doi.org/10.3109/00498259209053106>
- Störmer, E., von Moltke, L. L., Shader, R. I., & Greenblatt, D. J. (2000). Metabolism of the antidepressant mirtazapine in vitro: contribution of cytochromes P-450 1A2, 2D6, and 3A4. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 28(10), 1168–1175. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10997935>
- Tynes, R. E., & Hodgson, E. (1983). Oxidation of thiobenzamide by the fad-containing and cytochrome P-450-dependent monooxygenases of liver and lung microsomes. *Biochemical Pharmacology*, 32(22), 3419–3428. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(83\)90371-4](https://doi.org/10.1016/0006-2952(83)90371-4)
- Tynes, R. E., & Hodgson, E. (1985). Magnitude of Involvement of the Mammalian Flavin-Containing Monooxygenase in the Microsomal Oxidation of Pesticides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33(3), 471–479. <https://doi.org/10.1021/jf00063a036>
- US-EPA. (2000). *Reregistration Eligibility Decision (RED) for Temephos*. [http://www.epa.gov/phttps://www3.epa.gov/pesticides/chem\\_search/reg\\_actions/reregistration/red\\_PC-059001\\_1-Jun-00.pdf](http://www.epa.gov/phttps://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/red_PC-059001_1-Jun-00.pdf)
- US-EPA. (2008). *Environmental Protection Agency. Reregistration Eligibility Decision (RED) of temephos. [Consultado en Enero de 2017]*.
- Usmani, K. A., Karoly, E. D., Hodgson, E., & Rose, R. L. (2004). In vitro sulfoxidation of thioether compounds by human cytochrome P450 and flavin-containing monooxygenase isoforms with particular reference to the CYP2C subfamily. *Drug Metabolism and Disposition*, 32(3), 333–339. <https://doi.org/10.1124/dmd.32.3.333>
- Verdin-Betancourt, F. A. (2020). *Toxicocinética del plaguicida organofosforado Temefos en ratas macho adultas*. Cinvestav-IPN.
- Verdín-Betancourt, F. A., Figueroa, M., López-González, M. de L., Gómez, E., Bernal-Hernández, Y. Y., Rojas-García, A. E., & Sierra-Santoyo, A. (2019). In vitro inhibition of human red blood cell acetylcholinesterase (AChE) by temephos-oxidized products. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51261-2>
- Wang, D., & Zhang, M. (2007). Rapid quantitation of testosterone hydroxyl metabolites by ultra-performance liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of*

*Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 855(2 SPEC. ISS.), 290–294. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.05.022>

Waxman, D. J. (1991). P450-catalyzed steroid hydroxylation: Assay and product identification by thin-layer chromatography. *Methods in Enzymology*, 206(C), 462–476. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)06115-J](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)06115-J)

Whalley, P. M., Bakes, D., Grime, K., & Weaver, R. J. (2001). Rapid high-performance liquid chromatographic method for the separation of hydroxylated testosterone metabolites. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 760(2), 281–288. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(01\)00286-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(01)00286-9)

WHO. (1986). *Organophosphorus insecticides: a general introduction*.

WHO. (2008). *WHO specifications and evaluations for public health pesticides temephos O , O , O ' O ' -tetramethyl O , O ' -thiodi- p -phenylene bis ( phosphorothioate )*. 1–35.

WHO. (2009). Temephos in Drinking-water: Use for Vector Control in Drinking-water Sources and Containers Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. WHO. [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/chemicals/temephos.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/temephos.pdf)

Wilches, D. C. E. (2011). *Efecto de la Vinclosolina sobre el hígado y la excreción de la testosterona y sus metabolitos en ratas macho adultas*. Cinvestav-IPN.

Wójcikowski, J., Haduch, A., & Daniel, W. A. (2013). Effect of antidepressant drugs on cytochrome P450 2C11 (CYP2C11) in rat liver. *Pharmacological Reports*, 65(5), 1247–1255. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(13\)71482-8](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(13)71482-8)

Zanger, U. M., & Schwab, M. (2013). Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology and Therapeutics*, 138(1), 103–141. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.007>

El jurado designado por el Departamento de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional aprueba la tesis:

“Efecto del plaguicida organofosforado Temefos sobre la expresión de los citocromos P450 hepáticos de rata macho adulta y la participación de éstos en su biotransformación”

Que presenta el Lic. en Tecnología de la Salud con Perfil en Servicios Farmacéuticos, Adrián Hernández Esteris para su examen final de Maestro en Ciencias en la Especialidad de Toxicología, el día 26 de agosto del año 2020.

---

Dr. Adolfo Sierra Santoyo

---

Dra. María Betzabet Quintanilla Vega

---

Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre