



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA

Evaluación *in silico* de la biotransformación y toxicidad de temefos y sus metabolitos en seres humanos

Tesis que presenta

M. en C. ANDRÉS REYES CHAPARRO

Para obtener el grado de Doctor en Ciencias

En la Especialidad de Toxicología

Director de Tesis:

Dr. Adolfo Sierra Santoyo

Ciudad de México

Julio 2021

Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por la beca otorgada durante el transcurso del programa de doctorado (No. de apoyo 464670).

Este proyecto se realizó en el Laboratorio 17 del departamento de toxicología del Cinvestav bajo la dirección del Dr. Adolfo Sierra Santoyo.

Agradezco el tiempo de computo otorgado por LANCAD (Laboratorio Nacional de Cómputo de Alto Desempeño) y CONACYT en el Clúster Híbrido de Supercomputo "Xihcoatl" en COORDINACIÓN GENERAL DE TECNOLOGÍAS DE INFORMACIÓN Y COMUNICACIONES (CGSTIC) del CINVESTAV.

URL: <http://clusterhibrido.cinvestav.mx/>

Agradecimientos

A mi director de tesis el Dr. Adolfo Sierra Santoyo que me brindó toda la confianza para desarrollar un proyecto en esta nueva línea de investigación

A los integrantes de mi comité la Dra. Betzabet Quintanilla Vega, la Dra. María Isabel Hernández Ochoa, la Dra. María Fernanda López Gómez y la Dra. Gloria Arlette Méndez Maldonado que me orientaron en la realización de este proyecto y que con sus aportes me ayudaron a mejorar este trabajo y a resolver los problemas que se presentaron.

Al Ing. Hector Manuel Oliver Hernandez responsable del Área de Supercómputo de la CGSTIC del CINVESTAV quien me ayudó y orientó en todos los procesos relacionados al uso de supercomputo.

A la auxiliar Q.F.B. Ma. de Lourdes López González y el técnico Omar Rivera Arce que me ayudaron y orientaron en todas las actividades de laboratorio.

A mis excompañeros de laboratorio el Dr. Francisco Verdín y el M. en C. Adrián Hernández con quienes participé en las mejores discusiones sobre como analizar e interpretar los resultados que fui obteniendo.

A todo el colegio de profesores del departamento de toxicología quienes han dejado un conocimiento que ahora es parte de mi formación.

Al taller de dinámica molecular organizado por el Dr. Humberto Saint Martin Posada, donde aprendí sobre técnicas de dinámica y docking molecular gracias al Dr. Cesar Millan Pacheco.

Agradecimientos y dedicatoria

A mi querida familia que en cada paso que doy me muestran su respaldo, que están conmigo en las buenas y las malas, y por quien seguiré trabajando para llegar muy lejos.

A mi Dulce Princesa porque estuvo conmigo cada día de este proceso convenciéndome de que mis ideas y proyectos tenían futuro, porque siempre has creído en mi y mis proyectos y porque siempre que vamos codo a codo somos mucho más que dos.

A mis mejores amigos Elvira, Cristian, Soledad, Yadira, Ana y Arturo con quienes pasé las mejores aventuras que tengo para contar sobre el CINVESTAV. Ustedes se volvieron mi familia durante todo este camino desde que llegué al posgrado.

A los comités estudiantiles CETOX y CEC porque organizan eventos culturales que han hecho más alegre mi estancia en el CINVESTAV.

A la comunidad del CINVESTAV que crearon un espacio que acoge a todos los que llegamos con ilusión de estudiar, desde grupos tan pasajeros y numerosos como el de Pokémon Go, hasta el reducido y cálido grupo de tango que disfruté tanto.

A mis compañeros de generación, y otras generaciones que tuve oportunidad de conocer; pude aprender de ustedes muchas de las vicisitudes que acompañan a un estudiante de posgrado.

A la Lic. Lucina González de la Torre quien con toda paciencia me ayudó en todos los procesos administrativos durante el desarrollo de este proyecto.

Resumen

El temefos es un larvicida del grupo de los organofosforotioatos (OPT) que se utiliza para controlar a los mosquitos vectores de enfermedades como el dengue, el chikungunya y el Zika. Los OPT requieren activación metabólica mediada por el citocromo P540 (CYP) para causar efectos tóxicos, como la inhibición de la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE). La OMS recomendó su uso en agua potable a una concentración que no exceda 1 ppm, ya que representa un riesgo bajo de toxicidad. En un estudio reciente se reportó que los derivados oxidados del temefos causan inhibición de la AChE y diversos reportes muestran efectos tóxicos no asociados a la inhibición de la AChE, haciendo énfasis en que es necesario conocer la ruta de biotransformación del temefos en los seres humanos que serviría de referencia para interpretar los resultados obtenidos. El objetivo de este estudio fue proponer una vía de biotransformación del temefos en los seres humanos utilizando herramientas *in silico*, y hacer una evaluación de la toxicidad del compuesto padre y los metabolitos obtenidos. Para ello, se utilizaron herramientas de toxicología computacional para proponer una ruta de biotransformación y determinar su potencial toxicológico del temefos y sus metabolitos, así como la interacción de todos ellos con la AChE y los receptores PXR (receptor X pregnano) y CAR (receptor constitutivo de androstanos), que son dos reguladores de las enzimas del metabolismo. La vía metabólica se propuso con base en los resultados obtenidos con el software MetaUltra de MultiCase® y los servidores web Way2Drug y Xenosite. Los resultados muestran tres reacciones esenciales del metabolismo de fase I: 1) S-oxidación, 2) desulfuración oxidativa y 3) desfosforilación, así como la formación de 19 posibles metabolitos intermediarios. De acuerdo con las predicciones computacionales, la mayor probabilidad de biotransformación del temefos es la desfosforilación, de la que se generan los sustratos para la glucuronidación como principal reacción para el metabolismo de fase II, para su posterior eliminación sin producir efectos tóxicos colinérgicos. En el metabolismo dependiente de CYP se encontró que se puede formar el temefos-oxón y otros metabolitos intermediarios que pueden provocar efectos tóxicos en los mamíferos. Los CYP2B6, 2C9 y 2C19 son las principales isoformas involucradas en el metabolismo del temefos y una contribución menor de los CYP3A4 y 2D6. Las evaluaciones de toxicidad muestran que tanto el temefos como sus metabolitos tienen potencial de ser genotóxicos y hepatotóxicos, además, pueden ser inhibidores de los CYP2C19 y 2C9, y en menor medida de los CYP3A4 y 1A2; estas mismas isoformas son las que participan en su biotransformación. De acuerdo con los ensayos de interacción (*Docking*), los metabolitos oxidados del temefos tienen una mayor energía de afinidad, para inhibir a la AChE, que el compuesto padre. Los resultados se compararon con estudios experimentales en los que los compuestos con grupo oxón tienen una CI_{50} más baja respecto a otros OPTs, encontrando que la orientación de los metabolitos del temefos en el sitio de unión de la AChE es determinante para que se lleve a cabo la inhibición. Así mismo, los metabolitos oxidados del temefos tienen mayor energía de afinidad para activar a PXR y los metabolitos di-desfosforilados mostraron mayor afinidad para activar a CAR. En este estudio se generó un perfil completo sobre la toxicidad y metabolismo de temefos.

Abstract

Temephos is an organophosphorothioate (OPT) larvicide used to control mosquito vectors of diseases such as dengue, chikungunya, and Zika. OPTs require cytochrome P540 (CYP) mediated metabolic activation to cause toxic effects, such as inhibition of acetylcholinesterase (AChE) activity. The WHO recommended its use in drinking water in a concentration not exceeding 1 ppm, as it represented a low toxic risk. Information on the biotransformation of temephos and its toxicological properties of its metabolites in humans is limited. A recent study reported that oxidized derivatives of temephos cause AChE inhibition, and various reports show toxic effects not associated with AChE inhibition, emphasizing that it is necessary to know the biotransformation pathway of temephos in humans to serve as a reference to interpret the results obtained. The objective of this study was to propose a pathway for the biotransformation of temephos in humans using *in silico* tools, and to make an evaluation of the toxicity of the parent compound and the metabolites obtained. Computational toxicology tools were used to propose a biotransformation pathway and determine the toxicological potential of temephos and its metabolites, as well as the interaction of all of them with AChE and the PXR and CAR receptors. The metabolic pathway was proposed based on the results obtained with the MultiCase[®] MetaUltra software and the Way2Drug and Xenosite web servers. The results show three essential reactions of phase I metabolism: 1) S-oxidation, 2) oxidative desulfurization, and 3) dephosphorylation, as well as the formation of 19 possible intermediate metabolites. According to computational predictions, the highest probability of biotransformation of temephos dephosphorylation is the most probable reaction, of which the substrates for glucuronidation are generated as the main reaction for phase II metabolism to be subsequently eliminated without producing cholinergic toxic effects. However, CYP involvement is highly possible if this primary reaction is exhausted. CYP-dependent metabolism showed that temephos-oxon and other intermediate metabolites can be formed to produce toxic effects in mammals. CYP2B6, 2C9, and 2C19 are the main isoforms involved in temephos metabolism and a minor contribution from CYP3A4 and 2D6. Toxicity evaluations show that both temephos and its metabolites have the potential to be genotoxic and hepatotoxic, in addition, they can be inhibitors of CYP2C19, 2C9 and to a lesser extent of CYP3A4 and 1A2, being these same isoforms those that participate in their biotransformation. According to the Docking tests, the temephos-oxidized metabolites have a higher affinity energy to inhibit AChE than the parent compound. The results were compared with experimental studies in which the compounds with oxon group have a lower IC₅₀ compared to other OPTs and the orientation of the temephos metabolites at the AChE binding site is decisive for the inhibition. Likewise, the oxidized metabolites of temephos have higher affinity energy to activate PXR and the di-dephosphorylated metabolites showed higher affinity to activate CAR. In this study, a complete profile on temephos toxicity and metabolism was generated.

Contenido

	Página
AGRADECIMIENTOS	I
AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA	III
RESUMEN	IV
ABSTRACT	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 GENERALIDADES Y RIESGO DE EXPOSICIÓN DE LOS PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS	1
1.1.1 TOXICIDAD DE LOS ORGANOFOSFORADOS.....	2
1.1.2 <i>Temefos</i>	5
1.1.2.2 <i>Regulación y uso del temefos</i>	6
1.1.2.3 <i>Transformación ambiental del temefos</i>	7
1.1.2.4 <i>Exposición a temefos y sus metabolitos</i>	7
1.1.2.5 <i>Toxicocinética del temefos</i>	9
1.1.2.6 BIOTRANSFORMACIÓN DEL TEMEFOS Y OTROS OPTS EN LOS MAMÍFEROS	10
1.1.2.7 TOXICODINAMIA DEL TEMEFOS.....	14
1.1.2.7.1 <i>Efecto del temefos sobre la actividad de la AChE</i>	15
1.1.2.7.2 <i>Toxicidad sistémica del temefos</i>	16
1.1.2.8 <i>Ecotoxicología del temefos</i>	18
1.2 CARACTERÍSTICAS DE LA ACETILCOLINESTERASA	18
1.3 RECEPTORES NUCLEARES Y SU PAPEL EN LA RESPUESTA A XENOBIÓTICOS	19
1.4 MÉTODOS COMPUTACIONALES EN TOXICOLOGÍA	21
1.4.1 <i>Modelos de predicción estructura actividad</i>	22
1.4.2 <i>Docking, dinámica y modelado molecular</i>	23
1.5 JUSTIFICACIÓN.....	25
1.6 HIPÓTESIS.....	26
1.7 OBJETIVO GENERAL.....	26
1.11.1 <i>Objetivos particulares</i>	26
2. MATERIAL Y MÉTODOS	27
2.1 DISEÑO DEL ESTUDIO	27
2.2 RECOPIACIÓN Y CODIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS	28
2.3 PREDICCIÓN DE LA RUTA METABÓLICA	28
2.3.1 <i>Fundamento</i>	28
2.3.2 <i>Procedimiento</i>	29
2.4 PREDICCIÓN DE PARÁMETROS TOXICOCINÉTICOS DE TEMEFOS Y SUS METABOLITOS	33
2.4.1 <i>Fundamento</i>	33
2.4.2 <i>Procedimiento</i>	33
2.5 EVALUACIÓN DE LA TOXICODINAMIA DEL TEMEFOS Y SUS METABOLITOS	33
2.5.1 <i>Fundamento</i>	33
2.5.2 <i>Procedimiento</i>	34
2.6 EVALUACIÓN DE LA TOXICODINAMIA DEL TEMEFOS Y SUS METABOLITOS POR ENSAYOS DE <i>DOCKING</i> CON PROTEÍNAS CLAVE	34
2.6.1 <i>Fundamento</i>	34
2.6.2 <i>Procedimiento</i>	35
3. RESULTADOS.....	37
3.1 PREDICCIÓN DEL METABOLISMO DEL TEMEFOS	38
3.2 <i>Metabolismo de fase I</i>	40
3.2.1 <i>Predicción de las enzimas que participan en el metabolismo del temefos</i>	46
3.2.2 COMPARACIÓN DEL ABORDAJE <i>IN SILICO</i> CON OTROS PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS	51

3.3 METABOLISMO DE FASE II	52
3.5 PREDICCIÓN DE PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS Y TOXICOCINÉTICAS DEL TEMEFOS Y SUS METABOLITOS	55
3.5.1 <i>Propiedades físicoquímicas</i>	55
3.5.2 <i>Predicción in silico de la toxicocinética del temefos y sus metabolitos</i>	58
3.6 EVALUACIÓN TOXICODINÁMICA <i>IN SILICO</i> DEL TEMEFOS Y SUS METABOLITOS	59
3.6.1 <i>Predicción de la interacción del temefos y sus metabolitos con la AChE, PXR y CAR</i>	62
3.6.2 <i>Correlación entre los estudios in silico y experimentales sobre el efecto del temefos y sus metabolitos sobre la actividad de la AChE</i>	71
3.6.3 <i>Evaluación de la interacción de temefos y sus metabolitos con los receptores nucleares CAR y PXR</i>	71
4. DISCUSIÓN	74
4.1 BIOTRANSFORMACIÓN DEL TEMEFOS	75
4.1.1 <i>Metabolismo de fase I</i>	75
4.1.1.1 <i>Metabolismo del temefos mediado por el CYP</i>	78
4.1.2 <i>Metabolismo de fase II</i>	82
4.1.3 <i>Limitaciones en la predicción in silico sobre la biotransformación del temefos</i>	83
4.2 PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS Y SOLUBILIDAD DEL TEMEFOS Y SUS METABOLITOS	84
4.3 TOXICOCINÉTICA DEL TEMEFOS Y SUS METABOLITOS	86
4.4 TOXICODINAMIA DEL TEMEFOS Y SUS METABOLITOS	87
4.4.1 <i>Predicción de toxicidad basada en modelos QSAR</i>	88
4.4.2 <i>Evaluación de la interacción del temefos y sus metabolitos con la AChE</i>	92
4.4.3 <i>Ensayos de interacción con los receptores nucleares PXR y CAR</i>	95
5. CONCLUSIONES	98
6. PERSPECTIVAS.....	100
7 REFERENCIAS	102

Índice de figuras

	Página
Figura 1. Metabolismo general de los organofosforotioatos.....	3
Figura 2. Estructura química del temefos.....	6
Figura 3. Temefos y sus metabolitos generados en el ambiente, agua clorada, y por el metabolismo en ratas..	8
Figura 4. Propuesta de ruta metabólica del temefos en la rata.....	12
Figura 5. Estrategia experimental	27
Figura 6. Ruta Metabólica de temefos basada solamente en reacciones llevadas a cabo por los CYPs.....	43
Figura 7. Otras reacciones probables en temefos y sus metabolitos que pueden llevar a cabo los CYPs.....	44
Figura 8. Probabilidad de que la enzima paraoxonasa (PON) tome como sustrato al temefos y sus metabolitos	46
Figura 9. Sitios del metabolismo de temefos y sus metabolitos si éstos fueran tomados como sustratos por diferentes CYPs.	49
Figura 10. Predicción del SOM de temefos por las diferentes isoformas de CYP, mediante la herramienta “CYP metabolism prediction” del servidor Xenosite..	50
Figura 11. Predicción del SOM del temefos oxón sulfona (Tem-oxo-SO ₂) por las diferentes isoformas CYP, mediante la herramienta “CYP metabolism prediction” del servidor Xenosite..	51
Figura 12. Propuesta de biotransformación de fase I de temefos en humanos, obtenida usando predicciones in silico con los softwares MetaUltra, Way2Drug y Xenosite..	54
Figura 13. Esquema del sitio de unión (color anaranjado) de las proteínas (color azul) AChE, PXR y CAR..	64
Figura 14. Gráfica de la energía de afinidad de temefos y sus metabolitos con la AChE (6NEA). 67	67
Figura 15. Modelo del Sitio de Unión de la AChE.	67
Figura 16. Correlación entre la Cl ₅₀ experimental del temefos y sus metabolitos sobre la actividad de la AChE y la energía de afinidad calculada mediante estudios de Docking con Autodock VINA.	71
Figura 17. Resultados de interacción entre temefos y sus metabolitos con los receptores PXR y CAR.....	73

Índice de Tablas

Página

Tabla 1. Plataformas utilizadas para realizar la predicción del metabolismo de temefos.	32
Tabla 2. Códigos SMILES del temefos y sus metabolitos utilizados para los estudios de predicción del metabolismo y toxicidad.....	39
Tabla 3. Productos de reacción del temefos y sus metabolitos mediados por CYP.....	42
Tabla 4. Metabolismo de fase I de temefos y sus metabolitos.....	45
Tabla 5. Probabilidad de que la enzima paraoxonasa y los CYPs tomen a temefos y sus metabolitos como sustratos.....	47
Tabla 6. Tipos de reacciones que las isoformas de citocromos	48
Tabla 7. Comparación entre la probabilidad de metabolismo mediado	52
Tabla 8. Reacciones de Fase II del metabolismo del temefos y sus metabolitos.....	53
Tabla 9. Propiedades fisicoquímicas determinadas in silico del temefos y sus metabolitos.....	56
Tabla 10. Determinación de la solubilidad en agua in silico del temefos y sus metabolitos.	57
Tabla 11. Capacidad de absorción in silico del temefos y sus metabolitos en diferentes compartimentos.....	59
Tabla 12. Evaluación de la toxicodinámica general in silico del temefos y sus metabolitos.....	60
Tabla 13. Potencial toxicológico de temefos y sus metabolitos, asociado a la unión o inhibición de proteínas y receptores.	63
Tabla 14. Datos de comparación de los sitios activos de las proteínas AChE, PXR y CAR.	65
Tabla 15. Resultados de los ensayos de interacción de temefos y sus metabolitos con la AChE.	69
Tabla 16. Resultados de la interacción entre temefos y sus metabolitos con la enzima AChE.	70

Lista de abreviaturas

CYP: citocromos P450

AChE: Acetilcolinesterasa

BuChE: Butirilcolinesterasa

PXR: Receptor X de Pregnano

CAR: Receptor Constitutivo de Androstano

PON1: Paraoxonasa1

RG: Receptor de glucocorticoides

RT: Receptor tiroideo

PPAR: Receptor de peroxisoma profeliferador-activado

RE: Receptor de estrógenos

RA: Receptor de andrógenos

MDRP1: Receptor de resistencia a multifármacos

CE: Carboxil esterasas

OP: organofosforados

OPT: organofosforotioatos

DAP: dialquifosfato

DMTP: dialquiltiofosfato

OMS: Organización Mundial de la Salud

SMILES: simplified molecular-input line-entry system; sistema simplificado de entrada de línea de entrada molecular

XS: XenoSite

MU: MetaUltra

HLM: Microsomas hepáticos humanos

TPSA: Superficie de interacción polar

RM: Refractividad molar

1. Introducción

Los plaguicidas son sustancias químicas ampliamente usadas en todo el mundo para combatir vectores de enfermedades, plagas de cultivos, parásitos de plantas y animales y animales ponzoñosos para el humano y las especies de interés en la ganadería. Actualmente se utilizan cocteles variados de sustancias para combatir las especies no deseadas. En estimaciones recientes, se calcula que en 2020 se utilizaron 2 millones de toneladas, aunque también se cita que la cifra puede ser aún mayor por los datos no registrados (Sharma et al., 2020). Una gran cantidad de estos plaguicidas se extienden por el ambiente y afectan a especies no blanco, incluido el ser humano. La población humana se encuentra expuesta a plaguicidas vía inhalatoria cuando estos se encuentran en el aire, vía oral al ingerirlos en alimentos y agua contaminados y vía dérmica al estar en contacto con superficies que contienen el plaguicida o bien por exposición directa cuando se está aplicando (Bolognesi y Holland, 2016). Existen diversas clasificaciones de los plaguicidas, una de ellas es por el tipo de organismos contra los que se utiliza, teniendo así los herbicidas, fungicidas, alguicidas, insecticidas, larvicidas, etc. Una de las principales clasificaciones es con base en su composición química; en esta clasificación los plaguicidas más utilizados son los organoclorados, organofosforados (OP), carbamatos, piretroides y algunos pesticidas inorgánicos (Sharma et al., 2020).

1.1 Generalidades y riesgo de exposición de los plaguicidas organofosforados

De acuerdo con la clasificación química, los OP se caracterizan porque son ésteres del ácido fosfórico con propiedades electrofílicas, éstos presentan un grupo fosfato en su estructura ($-\text{PO}_3$) (Espinoza-Navarro et al., 2017). Los OP se encuentran entre los más utilizados en el mundo, se utilizan principalmente en la agricultura y para el control de vectores de enfermedades (Buratti et al., 2007; Sharma et al., 2020). La primera generación de OP se caracterizaba porque tenía un grupo $\text{P}=\text{O}$, debido a las consecuencias tóxicas de este grupo, la segunda generación fue denominada organofosforotioatos (OPT), ya que ahora el oxígeno había sido sustituido por un azufre ($\text{P}=\text{S}$) (Buratti et al., 2007). El grupo fosforotioato ($\text{P}=\text{S}$) se encuentra unido a lo que se denomina el grupo saliente, esta puede ser una estructura asociada con un anillo aromático como ocurre en el temefos, clorpirifos (CPF), diazinon, etil- y metil-paratión; el grupo saliente también

puede ser una cadena lineal de carbonos como ocurre con el malatión y dimetoato (Buratti et al., 2007). Los compuestos mencionados son de los principales OPT que se utilizan actualmente.

Debido a su amplio uso, la población se encuentra expuesta a los OP como residuos presentes en el alimento y el agua (Adgate et al., 2001; Cabras y Angioni, 2000). Se hizo una estimación sobre la exposición ambiental a CPF, en adultos y niños de Estados Unidos de Norteamérica (EUA), de 1.4 - 1.6 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ (Rigas et al., 2001; Shurdut et al., 1998). Las estimaciones sobre la exposición a malatión en aplicadores y recolectores es aún más crítica, éstas son de 1 a 3 $\text{mg}/\text{kg}/\text{d}$ y 1 a 270 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$, respectivamente (Krieger y Dinoff, 2000). En la población en general se han encontrado concentraciones urinarias de malatión α -mono-ácido de 3 $\mu\text{g}/\text{l}$ en adultos y 1.4 $\mu\text{g}/\text{l}$ en niños (Adgate et al., 2001; Kutz et al., 1992). También se ha reportado que incluso en dietas de estudiantes de preescolar de países desarrollados, como EUA, hay presencia de plaguicidas, siendo los OP de los grupos más frecuentes (Fenske et al., 2002). En poblaciones de mujeres embarazadas se mostró que hay una exposición constante, incluso si viven en zonas urbanas (Berkowitz et al., 2004). En otro estudio se reportó la presencia de OPT en el contenido intestinal de bebés recién nacidos, por lo que se cree que pueden pasar a través de la placenta y absorberse en el feto mediante el líquido amniótico (Whyatt y Barr, 2001). Hay pocos reportes de mediciones directas de OPT en el plasma de seres humanos, de los pocos reportes se sabe que la concentración plasmática de CPF alcanza una concentración de 90 nM (Nolan et al., 1984). Debido a su amplio uso y a la relación que guardan con los alimentos, la exposición a OP es muy alta y constante.

1.1.1 Toxicidad de los organofosforados

El mecanismo de acción de los OP es a partir de inhibir la enzima acetilcolinesterasa (AChE) de los insectos, y se considera que esta inhibición es selectiva; es decir, afecta solamente a las especies blanco, sin que otros grupos como los mamíferos, insectos de interés comercial y ambiental se vean afectadas (Buratti et al., 2007). Sin embargo, cada año hay miles de intoxicaciones relacionadas con los OP, por ejemplo, la población de abejas ha disminuido drásticamente debido al uso de plaguicidas, y además afecta a muchas otras especies no blanco, entre ellas el ser humano (Dermauw y Van Leeuwen, 2014; Dulin et al., 2012; Hackenberger et al.,

2008; Velki et al., 2013). Se sabe que para que los OP puedan ejercer su efecto tóxico es necesario que se bioactiven mediante la participación de las enzimas del citocromo P450 (CYP), ya que se requiere la formación del grupo oxón (Buratti et al., 2007). El principal mecanismo de depuración de los OP es mediante las oxonasas plasmáticas (ej. la paraoxonasa 1 - PON1) y las carboxilesterasas (CE) (Costa et al., 1999; Davies et al., 1996). En algunos casos también se ha observado que los CYPs pueden depurar a los OP mediante reacciones de O-desalquilación/desarilación como se muestra en la Fig. 1 (Sultatos, 1994; Sultatos et al., 1982).

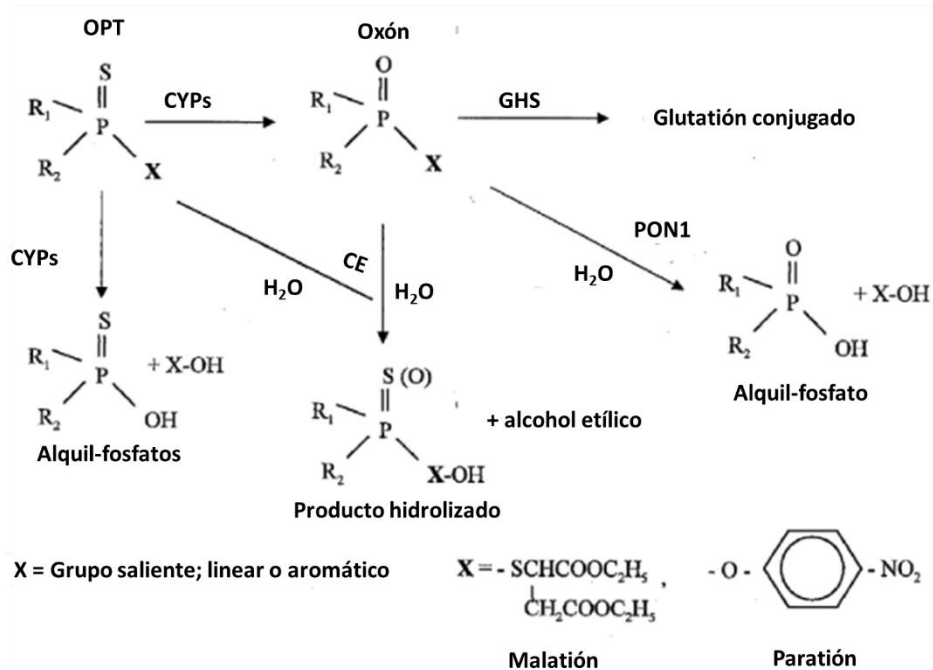


Figura 1. Metabolismo general de los organofosforotioatos. Tomado y modificado de Buratti et al. (2007).

La intoxicación aguda con los OP causa lo que se denomina síndrome colinérgico, éste se caracteriza por que hay una sobreestimulación de los receptores muscarínicos y nicotínicos, ya que no hay degradación del neurotransmisor acetilcolina (Forsyth y Chambers, 1989; Sultatos, 1994; Sultatos et al., 1984). El conjunto de síntomas son el efecto de las alteraciones al sistema nervioso autónomo, salivación, lagrimeo, micción y defecación, conocido como el síndrome SLUD (por sus siglas en inglés: Salivation, Lacrimation, Urination and Defecation). El sistema nervioso somático también se ve alterado causando temblores, y los efectos en el sistema nervioso central

inducen convulsiones (Chambers y Oppenheimer, 2004). Los casos fatales regularmente se atribuyen a la insuficiencia respiratoria causada por la constricción bronquio-alveolar, aumento de las secreciones bronquiales y parálisis de los músculos respiratorios (Aardema et al., 2008; Joshi y Sharma, 2011). Dependiendo del grado de la intoxicación, los antídotos deben ser administrados lo antes posible, ya que los efectos sistémicos conducen a la muerte rápidamente (Aardema et al., 2008; Jeyaratnam y Maroni, 1994). Los tratamientos clínicos para tratar las intoxicaciones consisten en la administración de atropina, oxima y diazepam, que son agonistas del receptor de acetilcolina, que contrarresta la acción del exceso de acetilcolina en los receptores muscarínicos, que son críticos para mantener la respiración normal (Eddleston et al., 2005; Marrs et al., 2006; Tafuri y Roberts, 1987).

Hay pocos reportes de efectos tóxicos de los OP que no sean de tipo neurotóxico-colinérgico, ya que es el principal blanco. Aunque en exposiciones crónicas el efecto de la inhibición no es evidente, si puede tener repercusiones a largo plazo (Ray y Richards, 2001). Se ha propuesto que la exposición crónica a OP está asociado con el desorden neuropsiquiátrico y la enfermedad de Parkinson (Jamal et al., 2002; Liu et al., 2003). También se ha visto que la exposición a bajas dosis en útero o en etapas tempranas de la vida se asocia con una concentración baja de PON1 materna en plasma y una circunferencia del cráneo reducida en la descendencia, con posibles problemas cognitivos que se ven reflejados durante el crecimiento del individuo (Berkowitz et al., 2004). En los fetos se expresa principalmente el CYP3A7, y éste tiene la capacidad de bioactivar a los OPT, por lo que se podrían tener efectos neurológicos desde el desarrollo embrionario (Buratti et al., 2006). Se considera que las primeras etapas de la vida hasta la juventud son las más susceptibles a la exposición a los OP debido ya que su metabolismo no ha madurado (Cole et al., 2003; Miller et al., 1996). En estos estudios queda de manifiesto la importancia del metabolismo para su toxicidad. Dentro del grupo de los OPT, el temefos es uno de los principales larvicidas usados en la actualidad alrededor del mundo desde hace aproximadamente 50 años, del cual hasta la fecha hay muy poca información toxicológica, por lo tanto, es el motivo de estudio en el presente trabajo.

1.1.2 Temefos

1.1.2.1 Generalidades de temefos

El temefos es un OP del grupo de los OPT que se caracteriza por tener dos grupos P=S. Se utiliza para combatir moscas negras y otros insectos en lagunas, marismas y pantanos; también se utiliza en contenedores de agua de consumo humano para controlar los mosquitos (WHO, 2003). El nombre comercial más común del temefos es Abate, aunque existen otras presentaciones. Sus identificadores químicos, de acuerdo a la IUPAC son: *O,O,O',O'*-tetrametil *O,O'*-tiodi-*p*-fenileno-bis(fosforotioato); *O,O,O',O'*-tetrametil-*O,O'*-tiodi-*p*-fenilenodifosforotioato; *O*-[4-({4-[(dimetoxifosforotioil)oxi]fenil}tio)fenil]-*O,O*-dimetil tiofosfato. Su identificador único CAS (*Chemical Abstracts Services*) es el número 3383-96-8. Su ID (*Identifier document*) en la base de datos PubChem es: 5392 (Kim et al., 2019). Tiene un peso molecular de 466.5 g/mol, presenta una estructura de sólido cristalino de color blanco, aunque a una temperatura mayor a 30 °C se encuentra como líquido, mientras que, el compuesto de grado técnico que se utiliza normalmente presenta una consistencia líquida viscosa de color café (NIOSH, 1997).

La estructura química del temefos es muy particular respecto a otros OP, ya que es el único plaguicida del grupo que posee dos grupos tiofosfato en los extremos de la molécula (Figura 2). Su estructura característica hace que el temefos sea una molécula simétrica. La simetría molecular se puede visualizar si se traza una línea vertical en el azufre central, ambos extremos de la molécula conservarían los mismos grupos y propiedades. La simetría molecular de la molécula influye en propiedades como su momento dipolar y transiciones espectroscópicas permitidas (Housecroft y Sharpe, 2010). Sin embargo, si sufre un cambio en alguno de sus grupos fosfatos, como la formación de los oxones, su simetría se perderá. Otra característica del temefos, es que posee un tercer azufre, el azufre central, además de los incorporados en los grupos tiofosfato. Este tercer azufre oxidable en los OP también puede ser metabolizado por los CYPs o espontáneamente en el ambiente (Buratti et al., 2007).

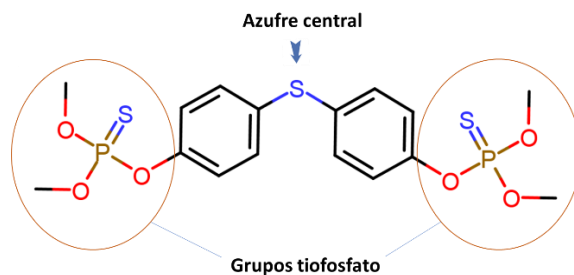


Figura 2. Estructura química del temefos. En la figura se señalan los grupos tiofosfato y el azufre central, de los que se hará mención en el resto del escrito

1.1.2.2 Regulación y uso del temefos

El temefos se utiliza ampliamente desde 1972 para el control de las larvas de mosquitos, moscas y polillas, que son plagas de diversos cultivos (FAO, 2015). Actualmente, su más amplio uso es para combatir mosquitos de la familia Culicidae que son vectores de enfermedades como el zika, dengue y Chikungunya. La decisión de aplicar temefos se basó en estudios que mostraban que el temefos tenía toxicidad baja en los seres humanos y animales (Gaines et al., 1967; Laws et al., 1967). Adicionalmente, se determinó que se requerían concentraciones bajas (1 ppm) en el agua para poder eliminar las larvas de moscas y mosquitos y era seguro para los seres humanos (Bowman y Orloski, 1966). Debido a su toxicidad baja reportada y a la relativamente baja concentración en el agua que se requiere para combatir a los mosquitos, la Organización Mundial de la Salud (OMS) determinó que era seguro colocar el temefos en recipientes domésticos, aun cuando éstos contuvieran agua de consumo, a una concentración que no excediera 1 ppm (WHO, 2009). Su uso ha sido recientemente limitado: en EUA, la Unión Europea y el Reino Unido ya se ha prohibido su aplicación (FAO, 2015; U.S. EPA, 2011). Sin embargo, este plaguicida se sigue usando de forma constante y abundante en el resto del mundo, principalmente en países como India, China y Brasil, además su uso se extiende por todo Africa y Australia (APVM, 2021; Lopes et al., 2019; U.S. EPA, 2011). En México el temefos ha sido el plaguicida de primera elección para combatir a los vectores del dengue hasta el 2020, actualmente se sigue aplicando aunque en combinación con otros OPs como el CPF, además de carbamatos y piretroides (CENAPRECE, 2020a; 2020b). Para sustituir el uso del temefos se ha planteado al Spinosad como una alternativa más segura para la población, sin embargo, su eficacia combatiendo las larvas de mosquitos aún

se está probando, los resultados reportados muestran una buena eficacia respecto al uso de otros plaguicidas en las campañas de salud (Al-azab y Shaalan, 2018; Marina et al., 2018).

1.1.2.3 Transformación ambiental del temefos

El temefos es un compuesto inestable, en diversos estudios se ha determinado que se oxida en el ambiente y que se biotransforma en plantas, insectos y mamíferos (Blinn, 1968; Buratti et al., 2007; Lacorte et al., 1996). En el ambiente, el temefos se transforma generando principalmente compuestos oxidados, siendo las reacciones predominantes la S-oxidación y la desulfuración oxidativa. El temefos sufre la oxidación para formar compuestos estables, como el temefos-sulfóxido (Tem-SO), temefos-dioxón-sulfóxido (Tem-dox-SO) y el temefos-dioxón-sulfona (Tem-dox-SO₂). Por otra parte, en un ensayo realizado en agua clorada se encontró que cuando el plaguicida se agregaba en este medio, el temefos se oxidaba gradualmente y desde las primeras mediciones (4 h) se detectó al Tem-dox-SO₂, siendo éste el producto más oxidado reportado de la transformación del temefos, así como a otros productos oxidados (Figura 3) (Kamel et al., 2009). En este mismo estudio también reportaron que el temefos se oxida aún en agua no clorada, es decir, este compuesto es inestable en agua y tiende a oxidarse fácilmente. En este sentido, en muestras de agua colectadas en campos de cultivos de arroz se detectó la presencia del temefos y de sus productos oxidados (Lacorte et al., 1997; 1996). Sin embargo, existen discrepancias para la determinación del temefos en muestras ambientales de agua debido a ciertas incongruencias sobre su solubilidad en agua, lo cual ha limitado el estudio de este compuesto en el ambiente, para medir su concentración y su degradación (Barceló y Hennion, 1997).

1.1.2.4 Exposición a temefos y sus metabolitos

Debido a su amplio uso, la exposición a temefos es constante pero muy diversa en la población. La principal fuente de exposición es el agua de bebida en las poblaciones de zonas endémicas de dengue. La principal fuente de exposición directa es el agua de bebida, por lo tanto, si consideramos a una persona de 70 kg que toma 2 l/d a una concentración de 1 ppm, la exposición sería de 28.5 µg/kg/d (WHO, 2009). Además del agua de bebida, el temefos también puede estar presente en alimentos comunes; en Polonia encontraron contaminación de temefos en 11% de las muestras de alimentos evaluadas a una concentración de 19.5 ng/g, y solo se evaluó el

compuesto padre, pero adicionalmente diversos metabolitos podrían estar presentes (Bargańska et al., 2013). La exposición laboral es principalmente en trabajadores de la agricultura que aplican el plaguicida, o bien trabajadores de la salud encargados de aplicar este plaguicida como parte de las campañas para combatir el mosquito del dengue (Singh et al., 2012; 2011a; 2011b; WHO, 2003).

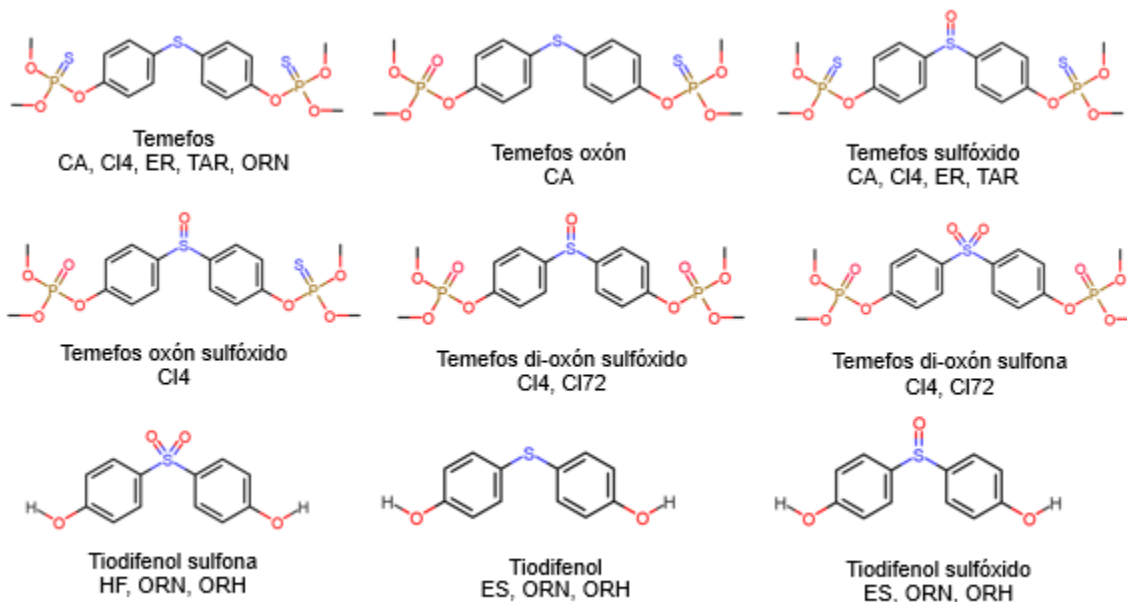


Figura 3. Temefos y sus metabolitos generados en el ambiente, agua clorada, y por el metabolismo en ratas. CA= contaminantes ambientales acuáticos, CI4 y CI72= metabolitos que se generan en agua clorada después de 4 y 72 h, respectivamente, ER= heces de rata, TAR= tejido adiposo de rata, ORN= orina no hidrolizada de rata, ORH= orina hidrolizada de rata.

La contaminación de alimentos por temefos se ha evaluado midiendo solamente el compuesto padre, sin embargo, en el ambiente se puede oxidar generando una diversa gama de compuestos como resultado del metabolismo bacteriano, la fotocatalisis y la oxidación espontánea (Lacorte et al., 1997; 1996; 1995; Lacorte y Barceló, 1995). Los metabolitos reportados incluyen oxones, sulfóxidos, sulfonas y dialquifosfatos (DAP), como el dimetilfosfato (DMP) y el dimetilditiofosfato (DMTP). No obstante, los DAP son productos inespecíficos del metabolismo de los OPs y no se

puede tener certeza del compuesto al que se expuso el individuo (Kavvalakis y Tsatsakis, 2012; Knipe et al., 2016; Tsatsakis et al., 2010; Whyatt y Barr, 2001).

1.1.2.5 Toxicocinética del temefos

En un estudio publicado recientemente se describió que el temefos emulsificado con solución salina se absorbe rápidamente ($t_{1/2 \text{ abs}}=0.38 \text{ h}$) y casi en su totalidad en la rata, alcanzando su concentración máxima en sangre a las 2 h (Verdín-Betancourt et al., 2021). Este resultado contrasta con el reportado por Blinn (1969), quién calculó una absorción de aproximadamente el 40% del total de la dosis administrada de temefos disuelto en aceite de cacahuate. En este mismo estudio se hizo una comparación con cobayos tratados; éstos tuvieron una mayor tasa de eliminación en heces que las ratas, lo que sugiere que pueden existir diferencias interespecie que hacen que el temefos se absorba menos en el intestino de cobayos.

En el estudio de Verdín-Betancourt et al. (2021) también se describe que el temefos se distribuye amplia y prácticamente a todos los órganos y tejidos en las ratas tratadas por vía oral. El hígado fue el órgano en el que inicialmente (2 h) se detectó la mayor cantidad de temefos. Otros órganos en los que se observó una distribución importante del plaguicida fueron el riñón y el cerebro. Sin embargo, el tejido adiposo fue el principal órgano donde se acumuló gradualmente el temefos durante las primeras 24 h después de la administración. La concentración determinada en este tejido fue muy superior a la observada en otros órganos y tejidos. La lipofiliidad del temefos puede ser la responsable de la amplia distribución y acumulación en el tejido adiposo. Por su parte, Blinn (1969) observó también la presencia del temefos en el tejido adiposo, hígado, riñones, estómago, músculo e intestinos de rata tratada con una sola dosis del plaguicida. Los cobayos en comparación con las ratas, presentan niveles de temefos en sangre más bajos, por ejemplo, a las 8 h los cobayos presentan una concentración de 0.66 ppm y las ratas de entre 8 y 20 ppm (Blinn, 1969). Esto puede ser resultado de una eficiencia baja en la absorción o una tasa de depuración alta en los cobayos con respecto a las ratas. También se ha mostrado que en los ratones, el temefos puede atravesar la barrera placentaria y llegar a los embriones (Vani et al., 2018).

La acumulación elevada del temefos en la grasa puede ayudar a explicar la baja toxicidad aparente en los mamíferos y la toxicidad elevada en las larvas de los insectos. En las larvas, el

principal órgano involucrado en la reserva de energía es el cuerpo graso, además de estar también involucrado en el metabolismo de xenobióticos. El cuerpo graso representa entre 40 y 60% del peso corporal total en las larvas. Durante la etapa larvaria, la energía se acumula en el cuerpo graso para ser utilizadas durante otras etapas de la metamorfosis y para proporcionar energía para la etapa adulta (Roma et al., 2010).

Los estudios en los que se evaluó la excreción del temefos muestran que después de una exposición aguda (100 o 300 mg/kg) en ratas, la vida media ($t_{1/2 \text{ elim}}$) del compuesto padre fue de 7 a 10 h administrado por sonda gástrica y disuelto en aceite de cacahuate o emulsificado con solución salina (Blinn, 1969; Ferguson et al., 1985; Verdín-Betancourt et al., 2021). Mientras que, después de una exposición subcrónica (300 mg/kg/d por 5 d) su $t_{1/2 \text{ elim}}$ en sangre fue de 24 h (Ferguson et al., 1985). También se reportó que el temefos se elimina eficientemente en la orina y las heces, aunque también se probó que el aumento en la dosis administrada no cambia el modo ni la tasa de depuración (Blinn, 1969; Ferguson et al., 1985). En este caso, una de las limitantes que los autores mencionan es que fue eliminado más del 95% del compuesto en el aceite de cacahuate, por lo que el vehículo en el que se administró jugó un papel importante en la absorción y eliminación del temefos. En el caso de los cobayos se presentó una mayor tasa de eliminación de temefos respecto a las ratas debido a que tienen un mayor aporte de metabolismo biliar. También se reportó que en los cobayos expuestos a temefos, la concentración del compuesto es cien veces más alta en la bilis que en la sangre (21.6 y 0.21 ppm, respectivamente) a las 4 h, la proporción disminuye con el tiempo pero se mantiene por encima de 40 veces (Blinn, 1969).

1.1.2.6 Biotransformación del temefos y otros OPTs en los mamíferos

Hay poca información sobre la biotransformación del temefos en los seres humanos, aunque recientemente se propuso una ruta de biotransformación para el temefos en la rata (Verdín-Betancourt et al., 2021). Blinn (1969) había descrito, además del temefos, solo la presencia del metabolito Tem-SO en el tejido adiposo y en las heces, y en estas últimas también se detectó la presencia de los productos desfosforilados (hidrolizados) como el tiodifenol (TDF), el tiodifenil sulfóxido (TDF-SO) y la tiodifenol sulfona (TDF-SO₂), conocida también como bisfenol S (BPS).

Estos derivados desfosforilados también fueron detectados después de la hidrólisis enzimática con glucuronidasa/sulfatasa en la orina y las heces. La formación de otros metabolitos en la rata, como el temefos-oxón (Tem-oxón) o temefos-dioxón (Tem-dox) solo había sido evidenciada de manera indirecta por la inhibición de la AChE en los animales tratados (Ferguson et al., 1985). En el estudio de Verdín-Betancourt *et al.* (2021) se muestra que el temefos es ampliamente y eficientemente biotransformado en la rata (Figura 4). El temefos se biotransforma a por lo menos 11 productos metabólicos de fase I, los cuales fueron detectados en la sangre, órganos y tejidos a los 30 min después de la administración del plaguicida. Entre ellos se incluyen oxones, dioxones, sulfóxidos, sulfonas y productos mono- y di-desfosforilados oxidados, correspondiendo todos ellos a productos de reacciones consecutivas del metabolismo de fase I, como son la desulfuración oxidativa, la S-oxidación y la desfosforilación. En el metabolismo de fase II del temefos se incluiría la conjugación de los productos fenólicos oxidados originados a partir de las reacciones de mono- y di-desfosforilación, que serían eliminados por la orina y las heces como derivados glucuronidados y sulfatos, tal como fue propuesto por Blinn (1969).

En resumen, la biotransformación del temefos incluye las tres reacciones típicas para el metabolismo general de los OPT: la desulfuración oxidativa, la S-oxidación y la desfosforilación (Figura 4). La desulfuración oxidativa es una sustitución del azufre de los grupos tiofosfato por un oxígeno, esta reacción da origen a los oxones (Buratti et al., 2007). La segunda reacción es la oxidación del azufre central, que da origen al sulfóxido si es una oxidación y a la sulfona si ocurre una doble oxidación. Por último, el grupo fosfato se puede hidrolizar para formar los derivados fenólicos y los DAP (Blinn, 1969). La información descrita hasta ahora sobre las enzimas que participan en la bioactivación (formación de oxones) o desulfuración oxidativa y la S-oxidación para los OPT son diversas isoformas del CYP (Buratti et al., 2007). Sin embargo, en el caso del temefos, la información sobre qué enzimas llevan a cabo estas reacciones es muy limitada hasta el momento. La única información disponible hasta ahora es que las reacciones de desulfuración oxidativa, S-oxidación y mono- y di-desfosforilación del temefos fueron observadas en un modelo *in vitro* usando microsomas hepáticos de rata (MHR). Los productos metabólicos generados en estas reacciones indican la participación de las enzimas presentes en esta fracción subcelular, como los CYPs, las monooxigenasas que contienen flavina (FMO) y algunas esterasas (Hernández-

Estéris, 2020). De acuerdo con este estudio, los CYP2B1/2 y 3A1 pueden ser las principales isoformas del CYP involucradas en las reacciones de fase I y las CE y algunas isoformas del CYP las involucradas en las reacciones de desfosforilación que conducen a la formación de los derivados fenólicos del temefos en la rata.

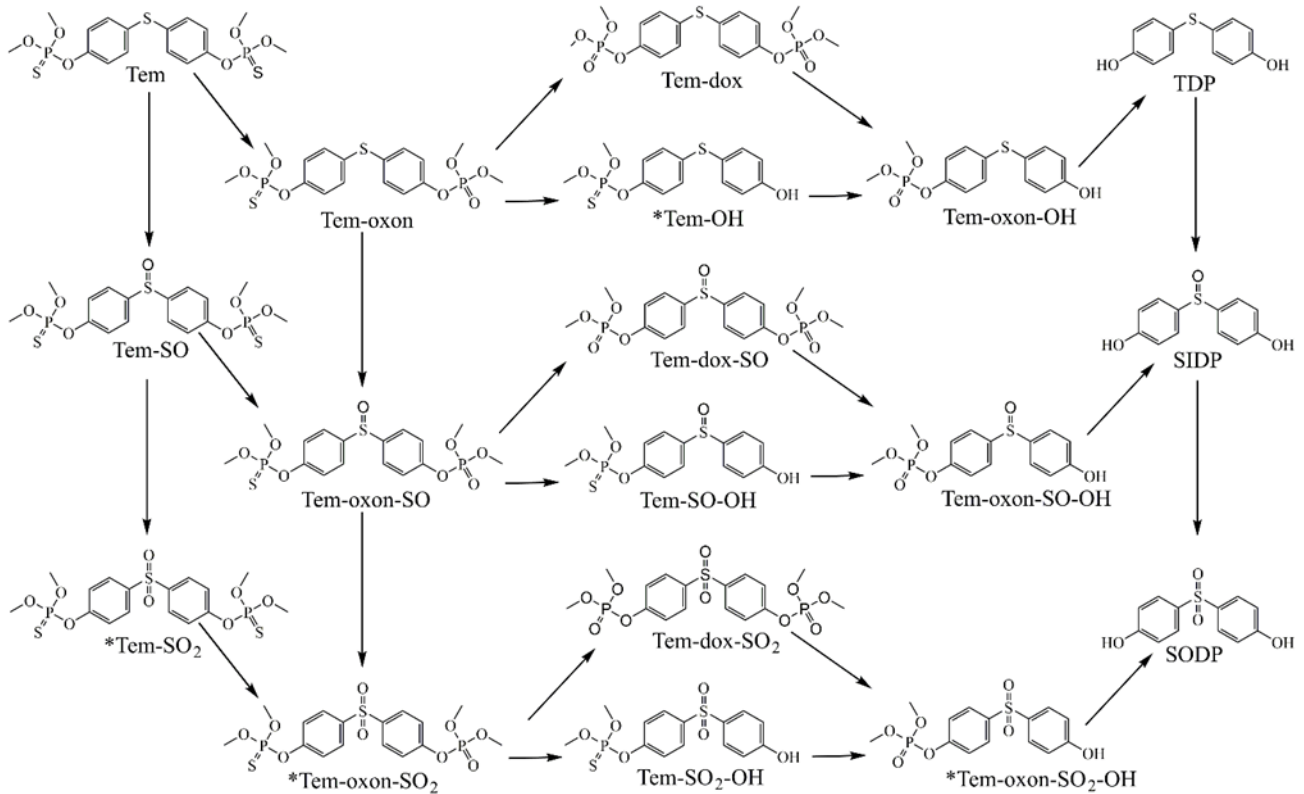


Figura 4. Propuesta de ruta metabólica del temefos en la rata. Tomado de Verdín-Betancourt *et al.*, 2021.

La participación de los CYPs en el metabolismo del temefos es controversial, aún no hay suficientes estudios sobre la participación de las diversas isoformas y cuál es su papel en la bioactivación y depuración. Los CYPs pueden llevar a cabo reacciones de S-oxidación y desulfuración oxidativa, dos reacciones clave en la bioactivación, pero también pueden llevar a cabo la O-desalquilación/desarilación, las cuales son necesarias para su depuración. En estudios con sistemas de expresión heteróloga de CYPs se ha mostrado que las isoformas CYP1A2, 2B6 y 2C19 son las principales involucradas en la reacción de desulfuración oxidativa de azinfos, CPF, DIA, paratión, malatión y dimetoato a concentraciones bajas (Buratti *et al.*, 2003). Sin embargo,

a concentraciones altas, el CYP3A4 tiene la mayor contribución en el aclaramiento de los OPT debido a que las otras isoformas se saturan, mientras que el CYP3A4 mantiene una cinética lineal con la concentración de OPT (Buratti et al., 2005, 2002). La participación de los CYPs en las reacciones es compleja, ya que depende de la concentración del OPT y cada isoforma del CYP tiene una afinidad diferente por cada una de las reacciones de bioactivación/depuración. En un estudio se encontró que los CYP1A2, 3A4 y 2C9 llevan a cabo reacciones de desulfuración y S-oxidación en proporción similar, mientras que el CYP2B6 realiza preferencialmente la desulfuración y el CYP2C19 la S-oxidación (Tahara et al., 2010). Los resultados obtenidos con los microsomas hepáticos humanos (MHH) y los estudios de expresión heteróloga de CYPs indican que el CYP3A4 es la principal isoforma involucrada en la reacción de sulfoxidación. Por otra parte, los CYP2B6 y 2C19 son isoformas involucradas en la bioactivación de OPT como el CPF y el DIA, respectivamente (Kappers et al., 2001; Tang et al., 2001).

Los OPT con un segundo átomo de azufre, como el fentión y el temefos, pueden sufrir una oxidación y sus metabolitos formados se denominan sulfóxido ($S=O$) y sulfona ($O=S=O$), estas reacciones se llevan a cabo por los CYPs y por las FMO (Buratti et al., 2007). En el caso del fentión, el CYP1A2 es la principal enzima implicada en la formación del sulfóxido a concentraciones bajas; sin embargo, el CYP3A4 es el que tiene una mayor aportación en esta reacción a concentraciones altas (Buratti et al., 2005, 2002). Las FMO también participan en la S-oxidación de los OPT, se considera que la FMO1 es la principal isoforma que hace esta reacción en tejidos extrahepáticos, mientras que en el tejido hepático es la FMO3 (Buratti et al., 2007). Aunque tienen participación, en estudios comparativos se ha mostrado que los CYPs tienen una mayor participación en la S-oxidación que las FMO (Usmani et al., 2004). El papel de los CYPs en la bioactivación de los OPT propicia una inducción de los propios CYPs implicados, se ha propuesto que los CYP1A2 y 2B6 son las isoformas que podrían funcionar como biomarcadores de exposición a OPT, ya que participan de forma constante en el metabolismo de diferentes OPT (Buratti et al., 2007).

Para poder realizar la depuración de los OPT se debe hidrolizar el grupo fosfato, estas reacciones las puede llevar a cabo la enzima plasmática PON1 dando origen a los compuestos hidrolizados que entran al metabolismo de fase II (Blinn, 1969; Costa et al., 1999, 1990). Una alternativa a la

hidrólisis es que los grupos oxones sean “secuestrados” por las enzimas B-esterasas, principalmente las CE (Chambers y Oppenheimer, 2004; Forsyth y Chambers, 1989). Así, tenemos que en la depuración del malatión, las CE tienen capacidad de hidrolizar al malaoxón y al compuesto padre (Dauterman, 1971). Otras esterasas como la arilesterasa tienen una participación relevante en la destoxificación de diversos OP (Clement, 1984).

1.1.2.7 Toxicodinamia del temefos

Una de las principales formas de evaluar la toxicidad de los OP ha sido mediante la inhibición de la actividad de la AChE; la inhibición de esta enzima por los OP y otros plaguicidas produce un conjunto de signos y síntomas que se denominan efectos colinérgicos (Chambers y Oppenheimer, 2004). La magnitud de la inhibición de la AChE por el temefos fue la base para el cálculo de la dosis de no efecto observable (NOAEL) y la dosis de efecto mínimo observable (LOAEL), tanto para la U.S. EPA como para la OMS (U.S. EPA, 2017; WHO, 2006). Los efectos sistémicos no colinérgicos no fueron considerados en estas determinaciones debido a que los pocos resultados publicados en ese momento se consideraron que no cumplían con las buenas prácticas de laboratorio, por lo tanto, no eran confiables (WHO, 2006).

Debido a la limitada información publicada sobre la toxicidad del temefos en las fechas en las que se evaluó a este larvicida se considera que el temefos tiene una toxicidad baja en general. La OMS ha clasificado al temefos en la categoría III, que es ligeramente tóxico, mientras que la U.S. EPA lo clasifica como un tóxico sistémico en la categoría II que es moderadamente tóxico (Lewis et al., 2016; WHO, 2003). El reporte de la OMS en el que muestra los datos de la toxicidad baja del temefos se reporta que la DL_{50} en ratas está entre 4,000 y 13,000 mg/kg y en ratones de 2,062 mg/kg (WHO, 2006). En este mismo documento se reporta que no causa irritación ocular ni en la piel, ni es sensibilizador dérmico; además, la NOAEL es de 10 mg/kg/d basada en la inhibición de la actividad de la AChE de ratas y conejos. Con todo el conjunto de datos se llega a la conclusión en el reporte de que la NOAEL para los seres humanos es de 2.3 mg/kg/d, proponiendo que una concentración de 1 mg/l (1 ppm) en el agua de bebida no tendrá efecto tóxico en la población que la consume. Aunque en otros estudios se han hecho estimaciones de Cl_{50} inferiores; en ratones expuestos a temefos grado técnico disuelto en agua se reportó una DL_{50} de 444 mg/kg

y una dosis máxima tolerable de 111 mg/kg (Mélo et al., 2008). Diversos estudios realizados en la década de los 60, cuando se comenzaba a usar el temefos, mostraron nulos efectos tóxicos en los seres humanos y han sido escasos los estudios posteriores (Gaines et al., 1967; Laws et al., 1967).

1.1.2.7.1 Efecto del temefos sobre la actividad de la AChE

Hay pocos estudios sobre la toxicidad de temefos, y los más relevantes se hicieron hace bastante tiempo. En los seres humanos se han hecho dos estudios principales, el primero de ellos se realizó en 28 voluntarios de una prisión de Puerto Rico donde se expusieron a una dosis de 256 mg/persona/d por 5 d y 64 mg/persona/d por cuatro semanas; en los resultados de estos estudios los autores reportaron que no hay síntomas relacionados a la exposición, y además, no encontraron efectos sobre la actividad de la AChE eritrocitaria (Laws et al., 1967). En el otro estudio se colocó temefos en agua de bebida en una localidad de 2,000 habitantes de Puerto Rico durante 19 meses, durante este periodo se hicieron mediciones del estado de la actividad de la AChE eritrocitaria, encontrando que no había ningún efecto asociado a la exposición a temefos (Laws et al., 1968).

Por otra parte, Ferguson *et al.* (1985) reportaron que la actividad de la AChE sanguínea de rata Sprague-Dawley se inhibió al 100% a las 48 h después de la última exposición tras un tratamiento subcrónico a una dosis de 300 mg/kg/d durante 5 d. También se evaluó la exposición aguda (300 mg/kg) y observaron una inhibición del 67% a las 4 h y de 47 % a las 48 h. Estos investigadores sugieren que, si bien el pico máximo de inhibición de la AChE es a las 4 h, la recuperación no se logra totalmente comparado con la actividad respecto a los controles que recibieron solo aceite de maíz, por lo que concluyeron que la inhibición de la AChE es irreversible. En otro estudio realizado en conejos se observó una inhibición de la AChE, después de una exposición a 10 mg/kg/d por 7 d del 26 %; y después de 35 d de exposición de 47 %, lo que sugiere que las exposiciones crónicas podrían aumentar el porcentaje de inhibición de la AChE (Gaines et al., 1967). Hasta hace poco no había evidencia de la inhibición de la AChE humana; recientemente nuestro grupo de investigación reportó la inhibición *in vitro* de la actividad de la AChE humana por el temefos y sus metabolitos siendo el derivado más oxidado del temefos, el

Tem-dox-SO₂ , el más potente (CI₅₀ = 24.87 nM), y más aun que el paraoxón (CI₅₀ = 88.16 nM) (Verdín-Betancourt et al., 2019). Estos datos ponen de manifiesto el potencial inhibitorio de los metabolitos del temefos sobre la AChE, aunque resultan ser contradictorios respecto a los observados *in vivo*.

1.1.2.7.2 Toxicidad sistémica del temefos

Los efectos no colinérgicos son aquellos que no están asociados a la inhibición de la AChE, por lo que los mecanismos de acción del temefos y sus metabolitos para producir daño son muy distintos y la mayoría de ellos son desconocidos. Un estudio realizado en 8 conejos mostró que tras una exposición a temefos a una dosis de 100 mg/kg/d por 5 d, tres de estos animales murieron, pero no se determinó la causa de sus muerte; adicionalmente, otros dos conejos mostraron necrosis focal y dos más necrosis difusa en el hígado (Gaines et al., 1967). Otro estudio en el que ha quedado manifiesto un daño hepático es el realizado en *Aphanius dispar*, un pez cipodontiforme conocido como “killifish”. En este estudio los peces se expusieron a 0, 1, 5, 10 o 25 ppm mostrando un efecto dependiente de la concentración sobre la degeneración de las células hepáticas, que incluyeron la dilatación de los 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 et al., 2013). En ratas tratadas con temefos a una dosis única de 300 mg/kg no mostraron inducción del CYP total hepático, pero sí hubo un aumento en el tiempo de sueño inducido por el hexobarbital, lo que sugiere una posible saturación e inhibición de las monooxigenasas de función mixta (MFM) hepáticas que metabolizan al hexobarbital (Ferguson et al. 1985). Estos resultados contrastan con los de Ennin y Franklin (1979), quiénes reportaron un aumento en la concentración de CYP total y la inducción de algunas isoformas de CYP. Todos estos resultados sugieren que el temefos es hepatotóxico, por lo tanto, puede afectar las funciones hepáticas y el metabolismo de xenobióticos.

Otro de los efectos observados en organismos expuestos a temefos es el daño al DNA (Cobanoglu y Cayir, 2020; Ojha y Srivastava, 2014). El daño genético ha mostrado estar asociado con enfermedades relacionadas al cáncer, envejecimiento, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Kastan, 2008). En un estudio *in vitro* se determinó que el temefos causa

daño al ADN, de acuerdo a tres diferentes pruebas que realizaron con *E. Coli* y *S. tyohimurium* (Fortes-Aiub et al., 2002); en este estudio incubaron al temefos con la fracción S9 hepática y observaron una disminución en la mutagenicidad del temefos, lo que indica que después de un tratamiento con enzimas del metabolismo de temefos disminuye la genotoxicidad. En otro estudio en linfocitos periféricos se mostró que el temefos tiene una baja citotoxicidad, pero puede causar daño genético (Cobanoglu y Cayir, 2020). Así mismo, en estudios de citotoxicidad en linfocitos y células HepG2 muestran que hay una diferencia en los efectos que puede producir el temefos en estas células. Mientras que se observó un daño genético no reversible en las células HepG2, esto no ocurrió en los linfocitos, poniendo de manifiesto que las células metabólicamente competentes son más susceptibles al daño genético por temefos (Benitez-Trinidad et al., 2015). Un estudio en ratonas gestantes mostró que éstas presentan daño al DNA por exposición a temefos (Vani et al., 2018). Además, la exposición a varios plaguicidas, incluido el temefos, puede causar alteraciones en el patrón normal de metilación del DNA, traduciéndose en cambios en la expresión genética (Benitez-Trinidad et al., 2018). Hasta el momento, no está claro cuál es el mecanismo de los efectos asociados a la genotoxicidad causada por la exposición al temefos; sin embargo, en estudios realizados en ratas expuestas a malatión se observó un daño tisular en el hígado y la sangre, lo que se asoció con un aumento en el estrés oxidante y peroxidación lipídica (Akbel et al., 2018; Possamai et al., 2007). Por lo tanto, se requiere ampliar los estudios para dilucidar el mecanismo mediante el cual el temefos puede causar daño genético.

En estudios multigeneracionales en ratones se observó que el temefos puede atravesar la placenta y causar alteraciones en el desarrollo del embrión; aunque no se observó daño al sistema reproductivo de las ratonas madre, si se observó daño al DNA en las crías (Vani et al., 2018). Así mismo, la exposición intrauterina a temefos produjo una conducta anormal y una alteración en las interacciones sociales de las crías (Martins et al., 2019). Por otra parte, el temefos ha mostrado afectar la función reproductiva masculina afectando la fertilización y el desarrollo temprano del embrión (Kim et al., 2020). Los efectos del temefos sobre la función reproductiva podrían estar asociados a la generación del metabolito TDF-SO₂ o BPS, el cual está descrito como un disruptor endocrino (Molina-Molina et al., 2013; Verdín-Betancourt et al., 2019).

1.1.2.8 Ecotoxicología del temefos

Hay diversos datos ecotoxicológicos que ponen de manifiesto el efecto que puede tener el temefos en especies susceptibles. Uno de los principales abordajes y preocupaciones sobre el uso del temefos es el efecto que tiene en especies no blanco de interés comercial, como el caso de las abejas para las que se considera altamente tóxico (Dulin et al., 2012; NIPA, 2019). En estudios de monitoreo se ha encontrado la presencia de temefos y otros plaguicidas en la miel de abeja, considerando que serían las larvas las más susceptibles por estar más expuestas al temefos (Bargańska et al., 2013). Para otros organismos de vida silvestre como las sanguijuelas (*Hirudinaria manillensis*), se observó que una dosis de 1 mg/l causa alteración en la maduración de los gametos y disminución en la cuenta total de ellos (Singhal y Davies, 1996). En otros estudios también se observó que el temefos es tóxico para el pez *Aplocheilus lineatu* (Cyprinodontiformes: Aplocheilidae) y para *Aphanius dispar* (Pisces: Cyprinodontidae), que mostraron también sensibilidad al fention (Ba-Omar et al., 2011; Jacob et al., 1982). Las especies acuáticas corren alto riesgo de ser afectadas por el temefos, ya que es el medio donde se aplica y las concentraciones se pueden ir acumulando en los cuerpos de agua, tal como se ha observado en estudios en aguas de ríos y estuarios (Lacorte et al., 1995; Lacorte y Barceló, 1995). Incluso toda la estructuración taxonómica de un río puede verse afectada por la aplicación de temefos, como se observó en un estudio donde se hicieron evaluaciones previas y posteriores a la aplicación, observándose un desequilibrio ecológico después de la aplicación; la comunidad de invertebrados fue la más afectada (Crosa et al., 1998; Yaméogo et al., 2001). Los efectos del temefos en el ambiente y los mamíferos está altamente relacionado a la inhibición de la AChE de cada especie, la susceptibilidad puede variar por cambios genéticos-estructurales de la propia enzima, esto propicia un abanico de posibilidades en la susceptibilidad de cada especie (Dulin et al., 2012).

1.2 Características de la acetilcolinesterasa

La enzima AChE (EC 3.1.1.7) es una serina-hidrolasa encargada de degradar el neurotransmisor acetilcolina en las sinapsis colinérgicas del cerebro y las neuromusculares, a acetato y colina para detener el estímulo postsináptico (Soreq y Seidman, 2001; Zimmerman y Soreq, 2006). La AChE

humana (hAChE) trabaja como monómero y tiene 12 láminas β centrales que están rodeadas por 14 α -hélices; su forma es elipsoide, con un sitio de unión que se abre en su base y penetra hasta la mitad de la enzima. En la base hay principalmente aminoácidos aromáticos que conforman varios subsitios de unión y es donde se une la colina; mientras que en la parte profunda del sitio se une el acilo (Manavalan et al., 1985). Debido a que la neurotransmisión colinérgica se encuentra en casi todo el reino animal, la inhibición de la AChE ha sido el blanco de numerosos plaguicidas como son los OP y los carbamatos (Ranjan et al., 2018). La hAChE es inhibida por estos compuestos, su inhibición aguda está asociada al síndrome colinérgico que puede llevar a la muerte, mientras que la inhibición crónica se ha asociado con la enfermedad de Alzheimer y atrofia multisistémica (Polinsky et al., 1989; Wright et al., 1993). Se ha determinado que el mecanismo de inhibición de la AChE es a través de la fosforilación irreversible por parte de moléculas como los OP, éstos son sustratos análogos a la acetilcolina y se unen al sitio activo de la AChE que al realizar la hidrólisis forma un enlace covalente entre el OP y el grupo -OH de la serina 203 (Ser203) dejando a la enzima disfuncional (Namba et al., 1971; Worek et al., 2007). En estudios recientes se ha buscado tener más inhibidores de la AChE para combatir las especies resistentes a los plaguicidas actuales del mercado, y hacer que los plaguicidas sean más selectivos y específicos para no afectar especies como las abejas; también se buscan derivados que inhiban a la AChE de forma terapéutica para tratar el Alzheimer (Gholivand et al., 2014; Silman y Sussman, 2017; V. da Costa et al., 2019).

1.3 Receptores nucleares y su papel en la respuesta a xenobióticos

Los receptores nucleares PXR (Receptor X Retinoide) y CAR (Receptor Constitutivo de Androstanos) pertenecen a la superfamilia de los receptores nucleares (RN) y se consideran dentro de la familia de los factores de transcripción que controlan la expresión de múltiples genes después de ser activados por un ligando (Mangelsdorf et al., 1990). Son parte de la subfamilia de los RN huérfanos, ya que comparten la mayoría de las características químicas con el resto de los RN, pero hasta hace poco tiempo no se les conocían ligandos fisiológicos (Kretschmer y Baldwin, 2005). Actualmente son considerados RN huérfanos adoptados, debido a que ya se les han descrito diversos ligando endógenos (Mukherjee y Mani, 2010).

El PXR es también conocido como *SXR (Steroid and Xenobiotic Sensor)* o NR1I2 (Kliewer et al., 1998). Se le dio el nombre de PXR debido a su activación en presencia de altas concentraciones de pregnanos (esteroides de 21 carbonos). Desde su descubrimiento, ha sido ampliamente estudiado en los seres humanos, así como en varias especies de mamíferos, aves y peces (Blumberg et al., 1998; Handschin et al., 2000; Jones et al., 2000; Lehmann et al., 1998; Savas et al., 2000; Zhang et al., 1999). En el genoma de varias especies se ha encontrado un solo gen de PXR, sin embargo, en el caso de los seres humanos se han caracterizado algunas variantes consideradas como raras, debido principalmente a diferencias en la activación mediada por moléculas pequeñas (Hustert et al., 2001; Zhang et al., 2001). Por su parte, CAR fue descrito en 1994 y originalmente fue llamado MB67 (Baes et al., 1994). Inicialmente se describió como un receptor que podía activar la transcripción sin ser activado por un ligando exógeno (Choi et al., 1997). Posteriormente fue propuesto como un sensor de xenobióticos (SX) a partir de estudios de inducción con fenobarbital (FB) y la expresión de la subfamilia *CYP2B* (Zelko y Negishi, 2000).

PXR y el CAR regulan la expresión de las subfamilias de *CYP3A* y *2B*, respectivamente, en varias especies como el ser humano y la rata. Los miembros de estas subfamilias del CYP son particularmente importantes en el metabolismo de xenobióticos, ya que metabolizan una gama muy amplia de sustratos con estructuras químicas muy diversas (Willson y Kliewer, 2002). Solo la isoforma *CYP3A4* participa en el metabolismo de entre 50 y 60% de los fármacos de prescripción y de muchos xenobióticos, por lo tanto, cualquier compuesto que aumente la expresión del *CYP3A4*, vía PXR o CAR, acelerará de manera indirecta el metabolismo de los xenobióticos. De este modo es como se cumple la premisa de que un xenobiótico que actúa regularmente como sustrato del CYP, también actúa como inductor. Este mecanismo le confiere al organismo un sistema de detoxificación en respuesta a exposiciones prolongadas a un tipo de xenobiótico y de ahí que estos receptores actúen como SX (Denison y Whitlock, 1995). Desde un punto de vista farmacológico, éste es un problema muy común, ya que se consumen numerosos compuestos que son potencialmente inductores de *CYP3A4* y *2B*, vía CAR o PXR, lo que provoca una disminución en la efectividad de los medicamentos prescritos debido al aumento en su aclaramiento, o a una bioactivación si se generan metabolitos tóxicos (Kuhlmann and Mück, 2001). Por tal motivo, se ha buscado que los nuevos fármacos no activen a PXR o a CAR; no obstante,

este problema no solo se presenta con los fármacos, ya que muchos de los xenobióticos a los que estamos expuestos también pueden activar estos receptores, derivando en un aumento en la resistencia a fármacos, además, de los propios efectos que cada xenobiótico pueda causar.

Por otra parte, es importante también considerar, que además del papel del PXR y CAR como SX e inductores del CYP, también tienen un papel como protectores de la toxicidad de los ácidos biliares, ya que cuando hay acumulación de éstos, se observa una activación del PXR por ligandos endógenos (Goodwin et al., 2003). Estudios *in vivo* han mostrado que la activación del PXR previene la hepatotoxicidad de los ácidos biliares, tanto CAR como PXR regulan la formación de ácidos biliares a través de modular la actividad del CYP7A (Staudinger et al., 2001). PXR y CAR también regulan el metabolismo de otros compuestos endógenos como las hormonas esteroideas y tiroideas; se ha mostrado que la exposición a xenobióticos afecta la regulación del metabolismo hormonal mediado por estos receptores (Kretschmer y Baldwin, 2005). Un caso estudiado es que después de la exposición a FB aumenta la sensibilidad a la insulina, lo que puede desencadenar experimentalmente la diabetes tipo II (no insulina dependiente) (Lahtela et al., 1985). El mecanismo propuesto a este fenómeno es a partir de FoxO1 (caja de horquilla O1, en inglés: Forkhead Box O1), ya que CAR puede regular la unión de FoxO1 a los sitios de respuesta del receptor de insulina (IRS), efecto similar al que tiene la propia insulina. Esta es la vía propuesta por la que los xenobióticos que inducen la activación de CAR, como el FB, causen sensibilidad a la insulina, efecto que puede participar en la generación de la diabetes tipo II (Timsit y Negishi, 2007). De la misma forma, PXR reprime la actividad transcripcional de genes encargados del metabolismo de la glucosa, que son regulados por la misma vía de FoxO1 en los IRS (Kodama et al., 2004).

1.4 Métodos computacionales en toxicología

Los métodos computacionales o *in silico* permiten la simulación de mecanismos de acción y la predicción de valores de toxicidad humana y ambiental mediante el uso de modelos matemáticos (Gozalbes et al., 2014). Inicialmente, el modelado computacional solo se utilizaba en situaciones donde la experimentación en el laboratorio era inapropiada o imposible, sin embargo, hoy en día se utiliza en numerosos procesos gracias a las nuevas herramientas computacionales disponibles

y su potencia de cálculo, la disponibilidad de grandes bases de datos y los métodos estadísticos que permiten analizar los resultados, aunado a la atractiva ventaja de reducción de costos (Nicolotti et al., 2014).

En toxicología, los ensayos *in vitro* e *in silico* son denominados métodos alternativos y se promueven con la finalidad de sustituir la experimentación animal. Actualmente se busca promover y validar el uso de los métodos alternativos, ya que los estudios *in vivo* tienen una fuerte desaprobación, y la cantidad de compuestos nuevos es cada vez mayor, lo que demanda un gran número de animales para todas las pruebas que se exigen en su regulación (Rovida y Hartung, 2009).

Además de las cuestiones éticas sobre experimentación animal, el uso de modelos *in silico* en toxicología representa un ahorro significativo de tiempo y recursos, tanto experimentales como económicos, ya que los modelos resultantes se pueden aplicar a nuevas estructuras químicas, que incluso aún no hayan sido sintetizadas (Modi et al., 2012). Los costos de realizar estudios *in silico* son mucho más bajos que los experimentos *in vitro* o *in vivo* (Gozalbes et al., 2014). Los costos bajos se deben a que solo se utiliza una computadora y dependiendo de la cantidad de datos que se desea procesar será la capacidad computacional requerida, pudiéndose usar desde una PC personal de costo accesible, a supercomputadoras y clústeres muy avanzados.

1.4.1 Modelos de predicción estructura actividad

Los primeros estudios de análisis de estructura-actividad o QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationships*) fueron realizados en 1969 (Leo et al., 1969), y en la década de los 80's del siglo XX es cuando se comienza a utilizar ampliamente para el diseño de fármacos gracias a los avances tecnológicos de computación y a la aparición del modelado molecular. En 1997 aparecen las técnicas de HTS (cribado de alto-rendimiento, del inglés: *High-Throughput Screening*) y con ello las quimiotecas, generando una gran cantidad de datos sobre compuestos químicos (Zhu, 2013).

La premisa en la que se basan los QSAR es que los compuestos que son químicamente similares podrán tener efectos similares (Keith, 2017). El objetivo es predecir los datos toxicológicos que puedan causar los compuestos químicos que no han sido aún estudiados, o siquiera sintetizados

(OECD, 2007). Los QSAR desarrollados se basan en modelos bayesianos, redes neuronales, regresiones múltiples, *machine learning*, etc. que recogen datos de los estudios existentes (Langdon et al., 2010).

Las predicciones realizadas con modelos QSAR pueden tener diferentes puntos finales (*end-points*), desde la predicción de la actividad enzimática, potencial toxicológico y reacciones del metabolismo (Rusyn y Daston, 2010). La predicción del metabolismo se puede abordar de diferentes organismos vivos, aunque en este estudio se enfocó a las enzimas de los seres humanos. La utilidad de las predicciones del metabolismo radica en saber qué metabolitos se generan y qué enzimas están implicadas para tenerse como referencia sobre la toxicidad de los metabolitos que se generan. Las principales predicciones se basan en conocer la probable actividad de los CYPs que son las principales enzimas involucradas en el metabolismo (Clark, 2018). Conocer las isoformas de CYPs involucradas en el metabolismo nos permite diseñar estudios experimentales dirigidos a ciertas isoformas y tener una idea de las moléculas que se deben encontrar en las muestras experimentales.

1.4.2 Docking, dinámica y modelado molecular

En conjunto, las técnicas de modelado, *docking* y dinámica molecular (DM) son técnicas que implican la simulación de todos los componentes del sistema que se quiere evaluar. Por ejemplo, para realizar un ensayo de interacción (*docking*) es necesario tener un modelo de la proteína y del ligando para realizar la búsqueda de la interacción más estable. La DM es una técnica de simulación por computadora que permite evaluar el comportamiento de átomos y moléculas por un tiempo determinado, como un microscopio virtual con alta resolución espacial y temporal (Ekins, 2014) y también nos permite acceder a todas las escalas de tiempo. Para esto se debe seleccionar apropiadamente el algoritmo y definir las características de búsqueda, ya que el comportamiento dependerá totalmente de los datos ingresados. A diferencia de los modelos QSAR, las técnicas de simulación tratan de replicar la realidad de lo que ocurre basándose en ecuaciones y el poder de cómputo, no teniendo en cuenta una base de datos para hacer comparaciones como los QSAR (Raies y Bajic, 2016).

La mayoría de los softwares se basan en la mecánica molecular para realizar los ensayos de interacción y simulación computacional. La mecánica molecular requiere de una descripción del sistema de átomos utilizando las leyes de física clásica. Para realizar los cálculos se utilizan parámetros experimentales como cargas, ángulos de torsión y geométricos, al utilizar datos experimentales como una referencia se pueden generar predicciones más confiables (Lopes et al., 2015). Cuando los datos experimentales son limitados se utilizan ecuaciones matemáticas para parametrizar las moléculas con base en cálculos semiempíricos y teóricos *ab initio* de mecánica cuántica. Con el conjunto de datos experimentales o de mecánica cuántica se obtienen campos de fuerza que son conjuntos de ecuaciones de física clásica, con diferentes parámetros que describen al sistema molecular que se quiere evaluar (Prieto-Martínez et al., 2018). La mayoría de los campos de fuerza se basan en 5 propiedades físicas: energía potencial, propiedades de torsión, geometría de enlace, energía electrostática y energía potencial de Lenard-Jones (Monticelli y Tieleman, 2013). Gracias a la implementación de los campos de fuerza, el modelado molecular de proteínas se comenzó a usar desde la década de los 80s, y con el aumento en la disponibilidad de datos experimentales y poder de computo se comenzaron a realizar ensayos de interacción entre moléculas, describiendo y mejorando los algoritmos de predicción computacional, llegando hoy a ser una herramienta útil y confiable para predecir el comportamiento de un sistema molecular (Prieto-Martínez et al., 2018).

1.5 Justificación

El temefos es un plaguicida OP utilizado ampliamente como larvicida alrededor del mundo, del cual se conoce muy poco acerca de su metabolismo y, por lo tanto, del potencial toxicológico de sus metabolitos. Diversos estudios han reportado que el temefos causa genotoxicidad y atribuyen un importante papel al metabolismo del compuesto para aumentar o disminuir su potencial toxicológico. Sin embargo, no hay una ruta metabólica descrita, y la formación de los oxones no se ha reportado en los seres humanos, los cuales son compuestos clave en el mecanismo de toxicidad del temefos. En estudios previos se ha reportado que el temefos es seguro para los seres humanos, incluso para usarse en el agua de bebida, sin embargo, no hay datos sobre si los metabolitos que se forman por oxidación del compuesto también sean seguros, y ya se ha reportado que esto ocurre de forma espontánea en el ambiente y agua clorada y sin clorar. Los compuestos con grupo oxón son muy inestables, es complicado medir su efecto en estudios en animales, por esta razón y la imposibilidad de hacer experimentación en los seres humanos, se plantea una estrategia de modelos computacionales que permitirá estudiar la biotransformación del temefos en los seres humanos y evaluar el potencial toxicológico de los metabolitos resultantes. Con una estrategia computacional se puede evaluar el efecto de los compuestos con grupo oxón de forma experimental, los cuales tienen una $t_{1/2}$ muy reducida. Además, permite obtener resultados directos tomando en cuenta enzimas humanas en lugar de hacer comparaciones con modelos de otros mamíferos. Los ensayos *in silico* tienen las ventajas de tener un bajo costo económico y de tiempo, además representan la primera aproximación para conocer los efectos que un xenobiótico puede producir. Con el objetivo de proponer una ruta de biotransformación del temefos en los seres humanos, y evaluar el potencial toxicológico de los metabolitos de los que no se tienen ningún dato sobre su toxicidad, el planteamiento con modelos QSAR y modelado molecular podrá arrojar datos que orienten las estrategias experimentales.

1.6 Hipótesis

El temefos se metaboliza en los seres humanos generando metabolitos intermediarios capaces de producir efectos tóxicos colinérgicos y no colinérgicos, como mutagenicidad y hepatotoxicidad, y además con capacidad para interactuar con macromoléculas como enzimas y receptores.

1.7 Objetivo general

Proponer una ruta de biotransformación del temefos en los seres humanos y evaluar la toxicodinamia del temefos y sus metabolitos resultantes por medio herramientas computacionales.

1.11.1 Objetivos particulares

1. Realizar la predicción de la biotransformación del temefos
 - ✓ Describir los metabolitos probables del metabolismo
 - ✓ Determinar las probables enzimas involucradas en la ruta metabólica
 - ✓ Proponer una ruta de biotransformación de temefos en los seres humanos

2. Predecir la toxicocinética del temefos
 - ✓ Describir las propiedades físico-químicas del temefos y sus metabolitos
 - ✓ Determinar las variables de absorción, distribución, acumulación y excreción mediante modelos QSAR

3. Predecir la toxicodinamia del temefos y sus metabolitos
 - ✓ Realizar la predicción general de toxicidad por modelos QSAR
 - ✓ Evaluar la interacción con la AChE y los receptores nucleares PXR y CAR por *docking* molecular

2. Material y métodos

2.1 Diseño del estudio

Este estudio se realizó en tres fases, en cada una se determinaron propiedades diferentes del temefos (figura 5). En la primera se hizo una amplia revisión bibliográfica de la información reportada hasta el momento sobre todos los metabolitos del temefos descritos en la literatura, esta información se fue enriqueciendo con otros metabolitos que se fueron detectando en estudios experimentales desarrollados en el laboratorio y con los resultados obtenidos durante el desarrollo de este estudio, lo que permitió proponer una ruta metabólica. En la segunda fase, luego de determinar todos los probables metabolitos, a éstos se les determinaron las propiedades físico-químicas para predecir su probable comportamiento toxicocinético y toxicodinámico. Finalmente, en la tercera fase se hicieron los ensayos de interacción (*docking*) entre los metabolitos del temefos y la AChE, así como con los receptores nucleares PXR y CAR.

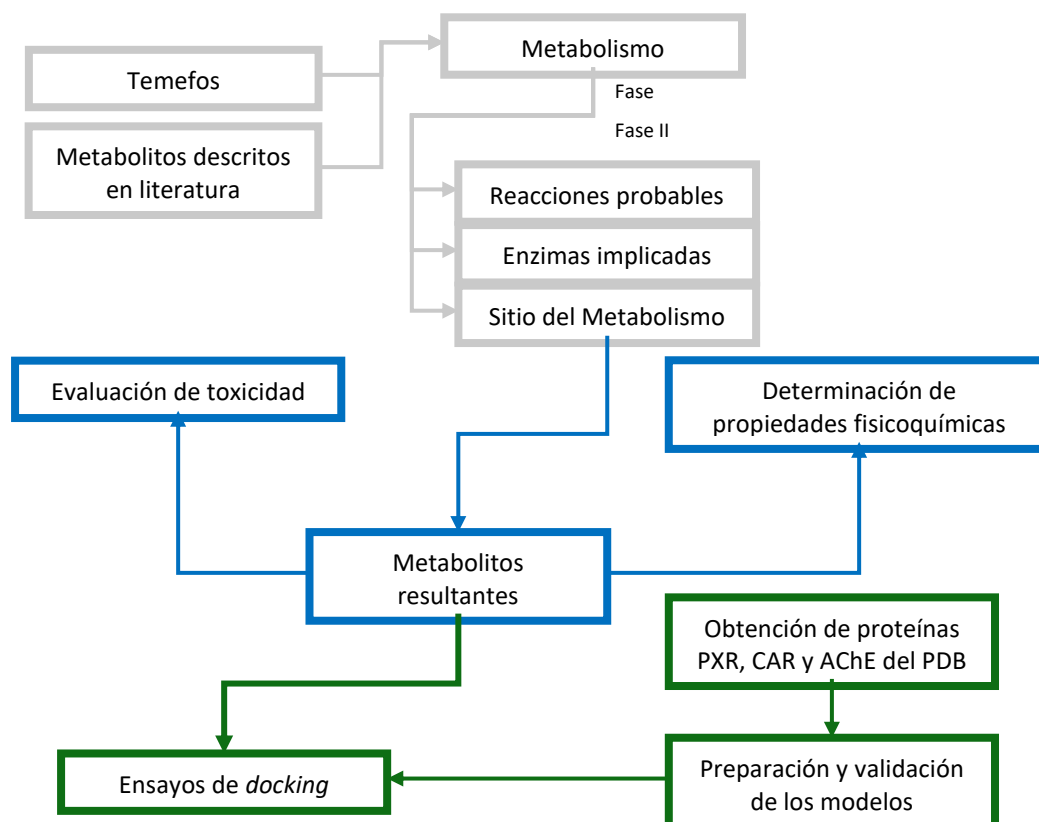


Figura 5. Estrategia experimental

2.2 Recopilación y codificación de los metabolitos

Para las predicciones sobre el metabolismo del temefos se partió de la información disponible en la literatura acerca de los metabolitos, se tomaron en cuenta los reportes de contaminación ambiental de ríos y la transformación de temefos en el ambiente y en cuerpos de agua dulce clorada y no clorada (Kamel et al., 2009; Lacorte et al., 1997, 1996, 1995; Lacorte y Barceló, 1995), así como de los metabolitos que se han observado en los mamíferos y otras especies (figura 3 y 4) (Blinn, 1968; Verdín-Betancourt et al., 2019, 2021).

Con las estructuras recopiladas derivadas de temefos se procedió a construir las moléculas en el software Avogadro en el que se exportaron en formato .mol2 (Hanwell et al., 2012). Posteriormente se procedió a generar los códigos SMILES (*Simplified Molecular Input Entry System*) usando el software OpenBabel y éstos fueron corroborados en el software ChemSketch (Advanced Chemistry Development Inc., 2020; O'Boyle et al., 2011). El código SMILES es la forma de representar a cada compuesto químico que nos permite integrarlo a algoritmos computacionales para su análisis

2.3 Predicción de la Ruta Metabólica

2.3.1 Fundamento

Las plataformas de predicción del metabolismo y toxicidad se basan en modelos QSAR que parten de una base de datos experimentales reportados y se realiza un algoritmo que nos permite predecir la actividad de un compuesto de forma teórica. Los algoritmos se basan en una comparación de los descriptores moleculares del compuesto que se está estudiando con los de la base de datos. Los descriptores moleculares son todas las propiedades con las que se puede caracterizar un compuesto: físico-químicas, estructurales, topológicas, cuánticas, atómicas, etc. La cantidad de descriptores que utiliza cada algoritmo se relaciona a las propiedades determinantes para la actividad a evaluar, además, también el tipo de descriptores varía por cada actividad calculada.

Aunque generar un algoritmo puede resultar un trabajo complejo debido a la cantidad de datos que se deben procesar, actualmente existen plataformas bien estructuradas que nos permiten realizar predicciones usando únicamente el código SMILES. Estas plataformas nos arrojan un

resultado de probabilidad (P) que varía entre 0 y 1, donde 1 indica que hay una alta probabilidad de que el fenómeno evaluado se pueda observar de forma experimental, y de forma contraria 0 significa que es muy poco probable que ocurra. Para este trabajo se consideró una línea base (*threshold*) de $P > 0.5$ para considerar que un evento tenía probabilidad de que ocurriera de forma experimental. Principalmente para puntos de comparación entre probabilidades, ya que diversos softwares tienen su propio sistema para asignar si el evento puede ocurrir de forma experimental, en cada caso se indicará.

2.3.2 Procedimiento

Plataformas usadas para la predicción del metabolismo

La predicción del metabolismo se realizó utilizando 10 softwares distintos de licencia comercial y libre que tienen como fundamento diferentes bases de datos y algoritmos, además, están bajo la dirección de diferentes instituciones e investigadores (**Tabla 1**). Cada uno de los softwares funcionan de manera diferente, algunos predicen cuáles son las enzimas que pueden tomar como sustrato a temefos o sus metabolitos, pero no indican qué reacción llevarán a cabo ni el metabolito que resultará. Del mismo modo, otros softwares nos dan información sobre la reacción más probable, sin embargo, no nos dan información sobre las enzimas que pueden estar implicadas o cómo será el metabolito resultante. Por esta razón, se han dividido los resultados en secciones con los mismos puntos finales, con el objetivo de poder comparar los resultados de varios softwares. En algunos casos como MetaUltra (MU) se encontrará en varias secciones, ya que permite calcular una información más completa y tiene varios puntos de comparación. El uso de diversos softwares permitió robustecer los resultados y hacer que las hipótesis que se generan a partir de métodos *in silico* sean más confiables.

Para predecir las reacciones más probables que sufren el temefos y sus metabolitos se utilizaron varios servidores. Éstos se agruparon en dos categorías: aquellos que calculan la reacción más probable de forma directa y los que lo hacen de forma indirecta con base en el sitio del metabolismo (SOM). Las herramientas “RA” (Reactive Atom), “SOMP” (Site of Metabolism Predictor) y PASS Online de la plataforma Way2Drug (W2D) se caracterizan porque calculan dos probabilidades de forma independiente: P_a y P_i que significan probabilidad de actividad e

inactividad, respectivamente. La probabilidad de que un resultado se pueda observar de forma experimental aumenta conforme aumenta la P_a , y a su vez disminuye conforme aumenta la P_i . En todos los casos y para obtener una sola probabilidad que pudiera ser comparable al resto de resultados de otras plataformas se utilizó el ΔP , que resulta de la diferencia entre la P_a y la P_i ($\Delta P = P_a - P_i$). Es importante tener en cuenta que las herramientas de W2D presentan una ventaja en la robustez de sus cálculos debido a que el valor de P_i no se calcula en el resto de los softwares.

Para predecir las reacciones de fase I y II más probables de forma directa se utilizaron las herramientas “RA”, “Rainbow Phase I” de Xenosite (XS) y MU de MultiCase (MC). El concepto “RA” es un término acuñado por Rudik *et al.* (2016) y hace referencia al sitio de la molécula en el cual un fragmento particular será agregado o removido, el cual permite asociar las reacciones que se llevarán a cabo en la molécula. Los fragmentos que se agregan en “RA” incluyen el grupo oxo (C-, N- y S-oxidación), hidroxilo (reacciones de hidroxilación alifática y aromática), carbonilo o carboxilo (reacciones de C-oxidación) y conjugación (glucuronidación, sulfatación y acetilación). La remoción de un fragmento está considerada como una desalquilación (O- y N-), mientras que la hidrólisis es el rompimiento de diferentes tipos de ésteres. El algoritmo que utiliza es de tipo bayesiano y usa un sistema de predicción de P_a y P_i . Por otro lado, la herramienta “Rainbow Phase I” del servidor XS también nos indica la reacción más probable que se llevará a cabo. En este caso, la reacción descrita como oxigenación estable (*stable oxygenation*) fue interpretada como una S-oxigenación cuando tenía lugar en el azufre central, del mismo modo, la hidrólisis se consideró como una desfosforilación. Esto con la finalidad de unificar el nombre de la reacción en el escrito, se debe tener en cuenta que el producto y el fundamento de la reacción son los mismos en el caso de temefos.

Para predecir los posibles metabolitos del temefos se utilizó también el software comercial MU y la plataforma libre GLORY. Los resultados obtenidos con MU nos indicaron los probables metabolitos, el tipo de reacción que se llevará a cabo, las enzimas asociadas y los órganos dónde puede llevarse a cabo esta reacción, así como la literatura asociada. Los resultados se expresan como una probabilidad entre 0 y 1, donde 1 representa la mayor probabilidad de reacción. Con esta plataforma, se obtuvo información sobre dos generaciones del metabolismo de reacciones

consecutivas, lo que nos permitió armar la ruta de biotransformación. Los resultados obtenidos de la plataforma GLORY fueron la combinación de la predicción del SOM y un algoritmo propio basado en reglas sobre reacciones catalizadas por los CYPs (de Bruyn Kops et al., 2019).

Una vez que se tuvieron los probables metabolitos que se generan a partir del metabolismo de temefos en los seres humanos, se procedió a determinar las enzimas que podrían estar implicadas en este metabolismo. Aunque la plataforma MU nos dio información sobre las enzimas, se buscó corroborar esa información con la herramienta PASS online. Ésta nos permitió conocer más de 4,000 tipos de actividades biológicas diferentes con una precisión del 95%. Esta herramienta fue utilizada para determinar si el temefos y sus metabolitos son tomados como sustrato por la enzima PON1 y los CYP2B6, 2D6, 2C9, 2C19, 3A4 y 1A2. Hay que tomar en cuenta que la plataforma PASS online solamente predice la probabilidad de que la molécula sea tomada por sustrato, y no nos da información sobre la posible reacción que se llevará a cabo, tampoco sobre los posibles metabolitos que se van a generar. Fue necesario complementar la información con las otras herramientas.

Las herramientas SOMP (W2D) y “CYP metabolism” de XS se utilizaron para predecir el metabolismo de forma indirecta a partir de predecir el sitio más probable del SOM. El SOM es el átomo en la molécula donde la reacción química se llevará a cabo, es decir, se refiere al átomo que tiene un mayor potencial de sufrir un cambio (Rudik et al., 2015). Sin embargo, el SOM no hace referencia a la posible reacción que ocurrirá, o al metabolito que se va a generar, por lo que se debe complementar con otros softwares que nos den estos datos. Para el metabolismo de temefos se consideró una reacción de desulfuración oxidativa cuando el SOM se encontraba en el grupo P=S y como una S-oxidación cuando se encontraba en el azufre central para producir el sulfóxido y la sulfona.

Tabla 1. Plataformas utilizadas para realizar la predicción del metabolismo del temefos.

Nombre	Tipo de licencia	Base de datos	Algoritmo	Referencia	Página web
MetaUltra	Comercial	15,000 reacciones metabólicas conocidas en seres humanos	machine-learning		http://www.multicase.com/meta-ultra
PASS	Libre para académicos	300,000 compuestos biológicamente activos (Poroikov et al., 2007)	Bayesian	Filimonov et al., 2014	http://way2drug.com/passonline/
Reactive Atom	Libre para académicos	No especificado	Bayesian	Rudik et al., 2016	http://way2drug.com/ra/
SOMP	Libre para académicos	Alrededor de 1000 xenobióticos metabolizados	Bayesian	Rudik et al., 2015	http://way2drug.com/somp/
XenoSite Rainbow phase I v1	Libre	20,736 registros de reacciones de fase I en seres humanos	neural network	Dang et al., 2020	
Xenosite CYP metabolism	Libre	680 sustratos únicos de CYPs	neural network	Zaretzki et al., 2013	https://swami.wustl.edu/xenosite/
Xenosite UGT v1	Libre	2839 sustratos únicos de la UGT	Heuristic model	Le Dang et al., 2016	
Glory	Libre	144 reglas de metabolismo	Sistema de reglas	de Bruyn Kops et al., 2019	https://nerdd.zbh.uni-hamburg.de/glory/

2.4 Predicción de parámetros toxicocinéticos de temefos y sus metabolitos

2.4.1 Fundamento

Las propiedades toxicocinéticas de un compuesto están muy relacionadas con las propiedades físico-químicas principalmente con el coeficiente de partición octanol-agua (Kow) y la superficie de interacción polar (TPSA). Adicionalmente, otras propiedades también son clave para predecir las interacciones que cada compuesto puede tener con otras moléculas y el ambiente fisiológico, algunas de estas son el peso molecular (PM), el número y el tipo de átomos que pueden funcionar como aceptores de puentes de hidrógeno (H- A) y donadores de puentes de hidrógeno (H- D), y la refractividad molar (RM). La información toxicocinética del compuesto nos permite conocer conforme al tiempo el comportamiento de la molécula en los diferentes compartimentos como la sangre, plasma y demás líquidos acuosos del cuerpo.

2.4.2 Procedimiento

Las propiedades físicoquímicas y toxicocinéticas del temefos y sus metabolitos se determinaron por medio de las plataformas SwissADME, ADMETSar y T.E.S.T. de la EPA (Cheng et al., 2012; USEPA, 2010; Yang et al., 2019). La SwissADME es una plataforma de libre acceso para realizar predicciones de las propiedades físico-químicas y farmacocinéticas para moléculas orgánicas (Daina et al., 2017). Los parámetros determinados fueron: el PM, el número de átomos que pueden funcionar como (H- A) y (H- D), la RM, la TPSA, el Kow y la solubilidad, la cual se determinó por medio de tres algoritmos diferentes integrados en SwissADME: ESOL, Ali y Silicos-IT (Ali et al., 2012; Delaney, 2004). Cada algoritmo tiene su propio sistema de clasificación para determinar qué tan soluble es una molécula en el agua. Así como se hizo en secciones anteriores, tener varios algoritmos diferentes para calcular un mismo parámetro nos permitió hacer comparaciones y sacar resultados con mayor sustento y conclusiones más sólidas.

2.5 Evaluación de la toxicodinamia del temefos y sus metabolitos

2.5.1 Fundamento

Los datos de toxicodinamia de un compuesto obtenidos por herramientas *in silico* nos permiten predecir los probables efectos tóxicos que se pueden producir en un organismo con base a un mecanismo de acción del compuesto en estudio de manera dependiente de su estructura

química. Los resultados varían entre la interacción con diversas macromoléculas, donde pueden actuar como inhibidores o como sustratos de enzimas, interactuar con receptores, estimular rutas de señalización, etc. La interacción con proteínas como los RN representa un potencial efecto en la inducción de genes que son regulados por estos RN. La inhibición de alguna enzima implicaría una alteración de las funciones endógenas asociadas a estas moléculas debido a un desbalance de los sustratos y los productos de estas reacciones enzimáticas. Por su parte, la inhibición de algún transportador puede conducir a la acumulación intracelular de las moléculas que requieren ser excretados por la célula por esos acarreadores.

2.5.2 Procedimiento

Para predecir el potencial toxicológico del temefos y sus metabolitos se usaron las plataformas ADMETSar y SwissADME. Estas plataformas son de base SAR, lo que nos indica que no se emite valor de la variable, el resultado es solamente si es positivo para el punto final o no, este punto final puede ser que sea un agente mutagénico, carcinogénico, hepatotóxico, etc., o bien su interacción con una proteína como ligando, inhibidor o sustrato. Los resultados se representaron con signo positivo (+) y negativo (-), si cumplían o no ese parámetro. La plataforma en línea ADMETSar permite hacer predicciones de 47 propiedades relacionadas con el desarrollo de fármacos, utilizan los datos de diversas bases como DrugBank, ChEMBL y CPDB, mientras que sus algoritmos van de redes neuronales a machine learning (Yang et al., 2019).

2.6 Evaluación de la toxicodinamia del temefos y sus metabolitos por ensayos de *docking* con proteínas clave

2.6.1 Fundamento

Los ensayos de acoplamiento molecular conocidos como *docking* son un método computacional utilizado para evaluar la interacción de dos moléculas a partir de un modelo de interacción; los ensayos más comunes son entre un ligando orgánico, en este caso el temefos y sus metabolitos y una proteína que funciona como receptor (Prieto-Martínez et al., 2018). Los programas utilizados se basan en la mecánica molecular, descrita previamente en la introducción. Los softwares utilizados para los ensayos de interacción fueron Autodock4 y VINA, ambos de licencia académica. El software Autodock4 se utilizó a través de la interfaz de Autodock Tools. El

algoritmo que utiliza es de tipo genético Lamarkiano; mientras que VINA utiliza un algoritmo de optimización local (Morris et al., 2009; Trott y Olson, 2009).

2.6.2 Procedimiento

Para evaluar la interacción entre el temefos y sus metabolitos con la AChE, PXR y CAR se hicieron diferentes ensayos de interacción con las proteínas. Para ello se descargó el cristal de las proteínas AChE, PXR y CAR (códigos: 6NEA, 6DUP y 1XNX, respectivamente). Se prepararon las proteínas usando el servidor CHARMM-gui con la herramienta “PBD-reader” que permite modelar los aminoácidos ausentes, corregir los átomos no enlazados y limpiar la proteína de otras moléculas (Jo et al., 2014, 2008). Una vez preparadas las proteínas se sometieron a una dinámica molecular por 1 μ s, 10 ns o 1 ns en el software Gromacs (sistema NPT) en el Cluster híbrido de súper cómputo Xihucoatl. Se realizaron los análisis de las trayectorias de la dinámica molecular y la estructura final obtenida se utilizó para los ensayos de docking. También se realizó un análisis de los sitios activos utilizando DoGSiteScorer, esta herramienta nos permitió analizar el sitio activo de las proteínas sobre su forma, tamaño, superficie y los aminoácidos y átomos que los componen (Fährrolfes et al., 2017; Volkamer et al., 2012).

Los ensayos de interacción se validaron por el método de re-*docking*, el cual consiste en hacer un ensayo con el ligando que viene en el cristal y obtener un resultado muy similar al cristalizado (RMSD > 5). El RMSD es la desviación cuadrática media (*root-mean-square deviation*) de las posiciones de los átomos que componen la molécula de referencia. En este caso la posición del ligando cristalizado con la AChE y la posición de este ligando como resultado de *docking*. Para el cristal 6NEA el ligando es el HLO (1-[[2,4-Bis[(E)-(hidroxilimino)-metil]piridinio-1-Yl]-metoxi]metil]-4-carbamoilpiridinio), con éste se hicieron las aproximaciones por *docking* para obtener un RMSD < 3.5 Å, en concordancia con lo reportado en otros estudios (Morris et al., 2009; Prieto-Martínez et al., 2018). Enseguida, se utilizaron las mismas dimensiones de la caja para hacer los ensayos de interacción de temefos y sus metabolitos con la AChE. En primer lugar, se hicieron ensayos con el software Autodock VINA utilizando a la AChE con el temefos y los metabolitos como ligandos. La proteína se preparó en AutodockTools, donde se agregaron los hidrógenos polares y se removieron los no polares, las cargas no se agregaron, ya que Autodock

VINA no toma en cuenta las cargas que provee el usuario, una vez realizado esto, se procedió a guardar la proteína en formato .pdbqt (Trott y Olson, 2009). Por su parte, el ligando se preparó a partir de los formatos de código SMILES que se utilizaron para obtener las moléculas en el software Avogadro, se agregaron todos los hidrógenos y se realizó una optimización estructural con la herramienta “Optimize geometry” hasta obtener un $dE < 1 \times 10^{-9}$ kJ/mol, y se procedió a exportar la molécula en formato mol2. Posteriormente, esta molécula se abrió en Autodock Tools y el ligando se procesó agregando la cargas de Gasteiger, quitando los hidrógenos no polares y guardándola en formato .pdbq. Las dimensiones de la caja de muestreo (grid) resultantes de los ensayos de *re-docking*, y que se utilizaron para los ensayos de *docking* fueron las siguientes: tamaño por coordenada: $x = 18$, $y = 21$, $z = 18$; con un centro en $x = 53.802$, $y = 45.671$ y $z = 44.173$. El grado de exhaustividad en las búsquedas fue de 8. Se realizaron un total de 1000 ensayos de *docking* de manera independiente para evaluar las diferentes orientaciones que el temefos podía tomar en el sitio de unión. Esto debido a que el temefos es una molécula simétrica con un grupo tiofosfato en cada extremo, no obstante, cuando se forma un oxón deja de ser asimétrica y resulta de interés conocer cuál es el grupo más próximo al sitio de unión. Una vez realizados los ensayos, se hicieron mediciones de la distancia entre los átomos de la Ser203 y el grupo fosforotioato o el oxón.

Una segunda prueba se realizó utilizando el software Autodock4, el cual es parte del mismo grupo de software que Autodock VINA, pero utiliza un algoritmo diferente y se pueden determinar parámetros adicionales como la eficiencia de ligando, constante de inhibición (K_i) y la energía intermolecular. Con este software se hizo una sola evaluación con una exhaustividad de 25 millones de evaluaciones por ensayo. El análisis de los resultados obtenidos se hizo con Autodock Tools, Ligplot y DogSiteScorer.

3. Resultados

Para iniciar el estudio, se recopiló la información de los compuestos reportados producidos por la transformación del temefos en el ambiente en los diferentes cuerpos de agua, agua clorada, productos de oxidación y luz solar (Kamel et al., 2009; Lacorte et al., 1997; 1996; 1995; Lacorte y Barceló, 1995), así como de los metabolitos que se generan en las ratas tratadas con el larvicida (figura 3) (Blinn, 1968). La base de datos de los metabolitos potenciales se fue complementando durante el desarrollo de este estudio con nuevos derivados del temefos obtenidos de las predicciones computacionales. Con las estructuras recopiladas de los derivados del temefos se construyeron las moléculas con el software Avogadro (Hanwell et al., 2012) y se generaron los códigos SMILES con el software OpenBabel y fueron corroborados con el software ChemSketch (O'Boyle et al., 2011). Para todas las predicciones realizadas en las plataformas basadas en modelos QSAR se utilizó el mismo código, y los resultados pueden ser replicados usando este mismo en cualquier plataforma (

Tabla 2).

3.1 Predicción del metabolismo del temefos

Tal como que se indicó en la metodología, los resultados serán divididos de acuerdo con las predicciones que pueden realizar cada uno de los softwares. En la descripción de los resultados cobra importancia esta distribución, ya que para poder hacer comparaciones entre softwares se debe tomar como punto de comparación el mismo punto final de la predicción. Por esta razón, en varias secciones se mencionará continuamente al software MU, el cual es de los más completos, ya que puede predecir varios puntos finales como los metabolitos que se generan, las enzimas implicadas y la reacción que se lleva a cabo.

Tabla 2. Códigos SMILES del temefos y sus metabolitos utilizados para los estudios de predicción del metabolismo y toxicidad.

Nombre del compuesto	Abreviación	Código SMILES
Temefos	Tem	<chem>S(c1ccc(OP(=S)(OC)OC)cc1)c1ccc(OP(=S)(OC)OC)cc1</chem>
Temefos oxón	Tem-oxon	<chem>S(c1ccc(OP(=S)(OC)OC)cc1)c1ccc(OP(=O)(OC)OC)cc1</chem>
Temefos dioxón	Tem-dox	<chem>S(c1ccc(OP(=O)(OC)OC)cc1)c1ccc(OP(=O)(OC)OC)cc1</chem>
Temefos sulfóxido	Tem-SO	<chem>S(=O)(c1ccc(OP(=S)(OC)OC)cc1)c1ccc(OP(=S)(OC)OC)cc1</chem>
Temefos oxón sulfóxido	Tem-oxon-SO	<chem>c1(S(=O)c2ccc(OP(=S)(OC)OC)cc2)ccc(OP(=O)(OC)OC)cc1</chem>
Temefos dioxón sulfóxido	Tem-dox-SO	<chem>S(=O)(c1ccc(OP(=O)(OC)OC)cc1)c1ccc(OP(=O)(OC)OC)cc1</chem>
Temefos sulfona	Tem-SO ₂	<chem>S(=O)(=O)(c1ccc(OP(=S)(OC)OC)cc1)c1ccc(OP(=S)(OC)OC)cc1</chem>
Temefos oxón sulfona	Tem-oxon-SO ₂	<chem>S(=O)(=O)(c1ccc(OP(=S)(OC)OC)cc1)c1ccc(OP(=O)(OC)OC)cc1</chem>
Temefos dioxón sulfona	Tem-dox-SO ₂	<chem>S(=O)(=O)(c1ccc(OP(=O)(OC)OC)cc1)c1ccc(OP(=O)(OC)OC)cc1</chem>
Tiodifenol	TDP	<chem>S(c1ccc(O)cc1)c1ccc(O)cc1</chem>
Tiodifenol sulfóxido	TDP-SO	<chem>O=S(c1ccc(O)cc1)c1ccc(O)cc1</chem>
Tiodifenol sulfona	TDP-SO ₂	<chem>C1=CC(=CC=C1O)S(=O)(=O)C2=CC=C(C=C2)O</chem>
Temefos mono-hidrolizado	Tem-OH	<chem>S(c1ccc(OP(=S)(OC)OC)cc1)c1ccc(O)cc1</chem>
Temefos sulfóxido mono-hidrolizado	Tem-SO-OH	<chem>S(=O)(c1ccc(OP(=S)(OC)OC)cc1)c1ccc(O)cc1</chem>
Temefos sulfona mono-hidrolizado	Tem-SO ₂ -OH	<chem>S(=O)(=O)(c1ccc(OP(=S)(OC)OC)cc1)c1ccc(O)cc1</chem>
Temefos oxón mono-hidrolizado	Tem-oxon-OH	<chem>S(c1ccc(OP(=O)(OC)OC)cc1)c1ccc(O)cc1</chem>
Temefos oxón sulfóxido mono-hidrolizado	Tem-oxon-SO-OH	<chem>S(=O)(c1ccc(OP(=O)(OC)OC)cc1)c1ccc(O)cc1</chem>
Temefos oxón sulfona mono-hidrolizado	Tem-SO ₂ -OH	<chem>S(=O)(=O)(c1ccc(OP(=O)(OC)OC)cc1)c1ccc(O)cc1</chem>

Notas: los compuestos se generaron en Avogadro, posteriormente se obtuvieron los códigos SMILES de *OpenBabel* y fueron corroborados usando *ChemSketch*.

3.2. Metabolismo de fase I

Con base en los resultados obtenidos con los softwares MU y Glory que indican el metabolito resultante, así como de “RA” de W2D y “Rainbow Phase I” que indican la reacción más probable, se predijo la formación de 19 probables metabolitos resultantes del metabolismo del temefos en los seres humanos. Estos metabolitos se pueden agrupar en dos categorías, los oxidados y los hidrolizados o desfosforilados. Los metabolitos oxidados se caracterizan por tener un grupo oxón ($P=O$) en su estructura. Debido a que el temefos tiene dos grupos fosforotioato que pueden oxidarse para formar un oxón, los compuestos resultantes se designaron como oxón o dioxón cuando estuviera oxidado uno o dos de los grupos fosfato, respectivamente. Se encontraron en total nueve metabolitos que tienen al menos un grupo oxón. Por otro lado, los compuestos desfosforilados son aquellos en los que al menos uno de los grupos fosforotioato se ha desprendido de la molécula, dejando disponible un grupo -OH unido al anillo aromático. Un total de nueve metabolitos encontrados en los seres humanos han tenido por lo menos una desfosforilación. Adicionalmente, se encontraron dos DAP derivados de la hidrólisis del grupo fosforotioato u oxón, éstos fueron el dimetilditiofosfato (DMTP) y el DMP, respectivamente. Los metabolitos oxidados y desfosforilados se ven modificados por la oxidación del azufre central que puede oxidarse con uno o dos oxígenos que forman un doble enlace con este azufre formando el sulfóxido (-SO) y la sulfona (-SO₂), respectivamente (Figura 12).

Con el software MU se obtuvieron dos reacciones principales: (1) la hidrólisis o desfosforilación y (2) la *S*-oxidación del azufre central, con una probabilidad de 1 y 0.208, respectivamente (Tabla 3). La reacción de desfosforilación se lleva a cabo por las enzimas mono-, di- y triéster hidrolasas y por las di- y tri-fosfomonoéster hidrolasas en la sangre, hueso, cerebro, riñón, hígado, pulmón, placenta y suero. Mientras que la *S*-oxidación se lleva a cabo por las enzimas *S*-oxidasas en el cerebro, corazón, riñón, hígado, placenta y músculo esquelético. El software MU hizo cálculos para dos generaciones consecutivas del metabolismo, es decir, la reacción de desfosforilación del temefos genera el metabolito temefos mono-hidrolizado (Tem-OH) que se hidroliza nuevamente y genera el tiodifenol y dos DMTP. De acuerdo con este software, la reacción más probable fue la desfosforilación ($P= 1$), sin llevar a cabo la desulfuración oxidativa. La segunda reacción más probable fue la *S*-oxidación del azufre central ($P = 0.208$) que da como producto al Tem-SO que

puede ser nuevamente oxidado y dar como resultado al Tem-SO₂. Se realizaron las combinaciones de los resultados de forma iterativa hasta obtener todas las combinaciones probables, teniendo como metabolito final al TDF-SO₂. En este software se destaca la ausencia de la reacción de desulfuración oxidativa que da origen a los oxones.

El servidor “Glory” nos permitió hacer una evaluación del metabolismo del temefos y sus metabolitos solamente basada en las reacciones catalizadas por los CYPs. Los resultados muestran que la reacción más probable fue la desulfuración oxidativa (puntajes de 4.05 a 3.62) siempre que puede llevarse a cabo. En segundo lugar, la S-oxidación del azufre central (puntajes de 3.6 a 2.3) y, por último, la desfosforilación (puntajes de 0.81 a 0.19). Estos puntajes representan la probabilidad de que la reacción se lleve a cabo con respecto al resto de las reacciones. Se debe tener en cuenta que en *Glory* no hay información sobre las isoformas del CYP que llevan a cabo cada reacción, y cuál es la probabilidad de que éstos tomen por sustrato al temefos o sus metabolitos. A partir de los resultados obtenidos con la plataforma *Glory* únicamente, se planteó una ruta de biotransformación del temefos en un sistema donde predominan los CYPs (Figura 6). Destaca que la formación de los metabolitos oxidados tiene una gran probabilidad respecto a los desfosforilados.

Algunos metabolitos que arrojó la plataforma *Glory* tienen una baja probabilidad de formarse, y no se han reportado en la literatura, éstos no se consideraron para proponer las reacciones de la ruta de biotransformación. Sin embargo, la posibilidad de esas reacciones se confirmó con XS, éstas solo se llevan a cabo con la participación de los CYPs. Destacan las hidroxilaciones aromáticas y alifáticas, así como las desalquilaciones (Figura 7). El metabolito señalado en la Figura 7D podría ser un intermediario en la formación del oxón, aunque la estabilidad de este compuesto es cuestionable. Con esto, cabe destacar que no todas las reacciones y metabolitos propuestos por el software resultan viables, se debe tener en consideración lo reportado en la literatura sobre metabolismo de xenobióticos y los conceptos básicos de química orgánica.

Tabla 3. Productos de reacción del temefos y sus metabolitos mediados por el CYP.

Compuesto	Puntaje	Metabolito resultante	Reacción
Tem	3.62	Tem-oxon	Desulfuración oxidativa
	2.39	Tem-SO	S-oxidación
	0.724	Tem-OH	Desfosforilación
Tem-oxon	3.62	Tem-dox	Desulfuración oxidativa
	2.39	Tem-oxon-SO	S-oxidación
	0.724	Tem-oxon-OH	Desfosforilación
	0.192	Tem-OH	Desfosforilación
Tem-dox	2.39	Tem-dox-SO	S-oxidación
	0.192	Tem-oxon-OH	Desfosforilación
Tem-SO	3.62	Tem-oxon-SO	Desulfuración oxidativa
	3.44	Tem-SO ₂	S-oxidación
	0.724	Tem-SO-OH	Desfosforilación
Tem-oxon-SO	3.62	Tem-dox-SO	Desulfuración oxidativa
	3.44	Tem-SO ₂	S-oxidación
	0.724	Tem-SO-OH	Desfosforilación
	0.192	Tem-oxon-OH	Desfosforilación
Tem-dox-SO	3.44	Tem-dox-SO ₂	S-oxidación
	0.192	Tem-oxon-SO-OH	Desfosforilación
Tem-SO ₂	3.61	Tem-oxon-SO ₂	Desulfuración oxidativa
	0.722	Tem-SO ₂ -OH	Desfosforilación
Tem-oxon-SO ₂	3.61	Tem-oxon-SO ₂ -OH	Desulfuración oxidativa
	0.722	Tem-SO ₂ -OH	Desfosforilación
	0.192	Tem-SO ₂ -OH	Desfosforilación
Tem-dox-SO ₂	0.192	Tem-oxon-SO ₂ -OH	Desfosforilación
TDP	2.7	TDP-SO	S-oxidación
TDP-SO	3.59	TDP-SO ₂	S-oxidación
Tem-OH	4.06	Tem-oxon-OH	Desulfuración oxidativa
	2.79	Tem-SO-OH	S-oxidación
	0.812	TDP	Desfosforilación
Tem-SO-OH	4.06	Tem-oxon-SO-OH	Desulfuración oxidativa
	3.68	Tem-SO ₂ -OH	S-oxidación
	0.812	TDP-SO	Desfosforilación
Tem-SO ₂ -OH	4.05	Tem-oxon-SO ₂ -OH	Desulfuración oxidativa
	0.81	TDP-SO ₂	Desfosforilación
Tem-oxon-OH	2.78	Tem-oxon-SO-OH	S-oxidación
	0.194	TDP	Desfosforilación
Tem-oxon-OH	3.67	Tem-oxon-SO ₂ -OH	S-oxidación
	0.194	TDP-SO	Desfosforilación
Tem-oxon-SO ₂ -OH	0.194	TDP-SO ₂	Desfosforilación

Notas: La nomenclatura de los compuestos es con base en la Tabla 2. El puntaje de cada reacción es calculado con base en predicciones del sitio del metabolismo (SOM) que se obtiene de FAME2 y un valor asignado a cada reacción de acuerdo con que tan comunes son.

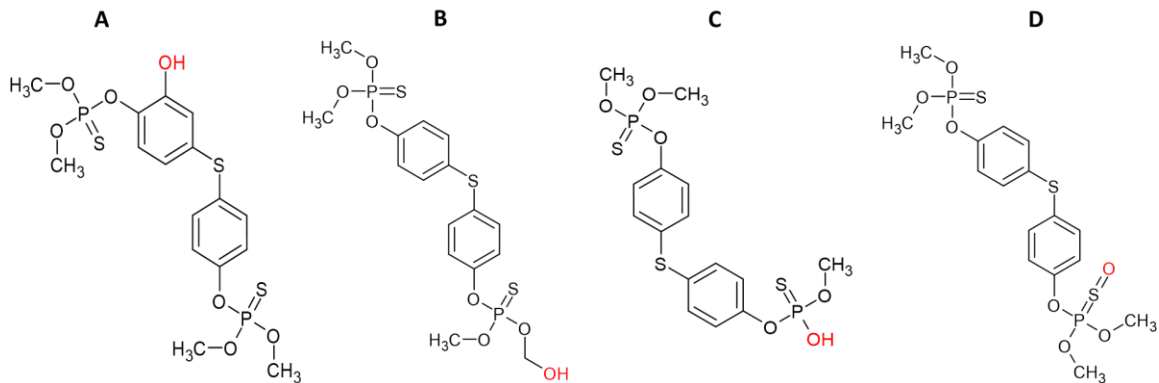


Figura 7. Otras reacciones probables en temefos y sus metabolitos que pueden llevar a cabo los CYPs. Las figuras se representan con el temefos, sin embargo, varios metabolitos pueden sufrir las mismas reacciones. A y B son hidroxilaciones aromáticas y alifáticas. C es una desalquilación. D es una S-oxidación. En todos los casos la probabilidad de llevarse a cabo fue baja ($P < 0.3$).

Los resultados obtenidos de “Reactive Atom” y “Rainbow Phase I” fueron similares a los obtenidos con MU, donde la reacción más probable fue la desfosforilación, seguido de la S-oxidación. Cuando se probaron los metabolitos con grupo oxón que se generan en el ambiente, el resultado indicó que también la desfosforilación era la reacción más probable, seguida de la S-oxidación. La comparación de los resultados entre los tres softwares nos muestra una prevalencia que la desfosforilación es la reacción más probable (**Tabla 4**). Estos softwares toman en cuenta una gama de diferentes reacciones, y la comparación de los resultados muestra que MU asigna una misma probabilidad para cada reacción sin considerar las diferencias entre los metabolitos, que en general puede ser de uno a varios átomos. Se pueden observar algunas consistencias lógicas, de manera que una vez desfosforilados ambos fosforotioatos, la reacción de hidrólisis ya no se presentaba como una posibilidad, de la misma forma, una vez que se obtenía la sulfona, la oxidación del azufre central ya no figuraba como una posibilidad.

Tabla 4. Metabolismo de fase I del temefos y sus metabolitos

Compuesto	Desfosforilación			S-Oxidación		
	MU*	W2D	XS	MU	W2D	XS
Tem	1	0.953	0.527	0.208	0.689	0.462
Tem-oxon	1	0.987	0.547	0.208	0.471	0.462
Tem-dox	1	0.91	0.547	0.208	0.247	0.462
Tem-SO	1	0.722	0.528	0.064	0.983	0.238
Tem-oxon-SO	1	0.951	0.549	0.064	0.917	0.238
Tem-dox-SO	1	0.628	0.549	0.065	0.883	0.239
Tem-SO ₂	1	0.961	0.528	nr	nr	nr
Tem-oxon-SO ₂	1	0.987	0.549	nr	nr	nr
Tem-dox-SO ₂	1	0.932	0.549	nr	nr	nr
TDP	nr	nr	nr	0.208	0.342	0.533
TDP-SO	nr	nr	nr	0.064	0.977	0.315
TDP-SO ₂	nr	nr	nr	nr	nr	nr
Tem-OH	1	0.768	0.575	0.208	0.55	0.448
Tem-SO-OH	1	0.481	0.576	0.064	0.957	0.192
Tem-SO ₂ -OH	1	0.812	0.574	nr	nr	nr
Tem-oxon-OH	1	0.688	0.590	0.208	0.164	0.449
Tem-oxon-SO-OH	1	0.36	0.592	0.064	0.727	0.192
Tem-SO ₂ -OH	1	0.742	0.591	nr	nr	nr

Notas. *Tres diferentes softwares se utilizaron para calcular la probabilidad de las reacciones de fase I en el temefos y sus metabolitos. Las reacciones evaluadas fueron la desfosforilación y la S-oxidación. Los valores del software MetaUltra (MU) son la probabilidad de que la reacción ocurra (P_a). Los datos de Way2Drug (W2D) fueron calculados con la herramienta “Reactive Atom”, los valores representan el ΔP que es la diferencia entre la probabilidad de actividad (P_a) y de inactividad (P_i) ($\Delta P = P_a - P_i$). Los resultados de XenoSite (XS) son los valores de probabilidad de cada reacción obtenidos con la herramienta “The Rainbow Phase 1”. nr significa que no hubo resultados para esa reacción en el software.

3.2.1. Predicción de las enzimas que participan en el metabolismo del temefos

En la sección anterior se describieron las reacciones más probables que puede sufrir el temefos y sus metabolitos, aunque en estos softwares, excepto MU, no se obtuvieron datos sobre las enzimas implicadas. Los resultados muestran que el temefos tiene una alta probabilidad ($\Delta P > 0.5$) de ser sustrato de los CYP2B6, 2C9 y 2C19, además, los CYP3A4, 1A2 y 2D6 también presentaron una probabilidad de tomar al temefos como sustrato, aunque con una $\Delta P < 0.5$ (Tabla 5). En general, los metabolitos con un grupo oxón tienen una baja probabilidad de ser sustratos de los CYPs ($\Delta P < 0.5$), y aquellos con doble grupo oxón no tenían ninguna probabilidad de serlo ($P_i > P_a$). Los resultados muestran que los CYPs toman al temefos, pero no a los compuestos con grupo oxón. Por el contrario, la enzima PON1 toma principalmente a los compuestos con grupo oxón y no a aquellos con el grupo fosforotioato (Figura 8). Con estos datos se puede ir dilucidando el tipo de reacción que se puede llevar a cabo. No obstante, el software *PASS Online* solo indica que el temefos y algunos metabolitos pueden ser sustratos de los CYPs, y no nos indica qué tipo de reacción se puede llevar a cabo o si éstos pueden realizar diversas reacciones en los OP.

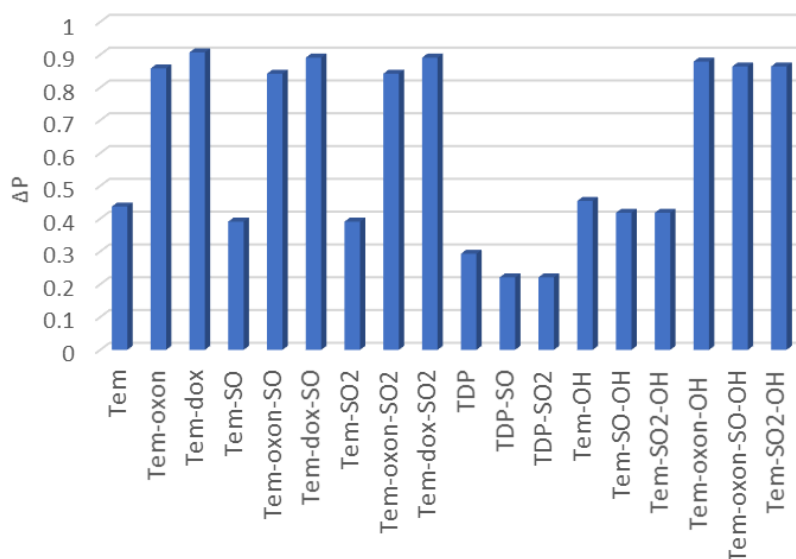


Figura 8. Probabilidad de que la enzima paraoxonasa 1 (PON1) tome como sustrato al temefos y sus metabolitos. Los resultados se obtuvieron usando la herramienta "PASS online" de la plataforma Way2Drug. Los valores son el ΔP ($P_a - P_i$); diferencia entre la probabilidad de actividad (P_a) y de inactividad (P_i).

Tabla 5. Probabilidad de que la enzima PON1 y los CYPs tomen a temefos y sus metabolitos como sustratos.

Compuesto	Paraoxonase	CYP2B6	CYP2D6	CYP2C9	CYP2C19	CYP3A4	CYP1A2
Tem	0.437	0.581*	0.41	0.574*	0.526*	0.345	0.415
Tem-oxon	0.858*	0.156		0.104	0.084		
Tem-dox	0.907*						
Tem-SO	0.391	0.495	0.366	0.556*	0.506*	0.299	0.364
Tem-oxon-SO	0.842*	0.101		0.078	0.058		
Tem-dox-SO	0.891*						
Tem-SO ₂	0.391	0.425	0.559*	0.738*	0.679*	0.486	0.318
Tem-oxon-SO ₂	0.842*	0.049	0.052	0.332	0.335	0.114	
Tem-dox-SO ₂	0.891*						
TDP	0.293	0.264	0.187		0.252		
TDP-SO	0.221	0.202	0.133	0.31	0.221	0.083	0.116
TDP-SO ₂	0.221	0.15	0.332	0.542*	0.489	0.243	0.069
Tem-OH	0.454	0.653*	0.477	0.647*	0.577*	0.428	0.49
Tem-SO-OH	0.418	0.599*	0.417	0.626*	0.56*	0.377	0.425
Tem-SO ₂ -OH	0.418	0.523*	0.604*	0.802*	0.726*	0.546*	0.369
Tem-oxon-OH	0.879*						
Tem-oxon-SO-OH	0.864*						
Tem-SO ₂ -OH	0.864*			0.073	0.073		0.415

Notas: Los resultados se obtuvieron usando la herramienta "PASS online" de la plataforma Way2Drug. Los valores son el ΔP ($P_a - P_i$), diferencia entre la probabilidad de actividad (P_a) y de inactividad (P_i). $\Delta P > 0.5$ estos valores se tomaron en cuenta para generar la ruta metabólica de la Figura 12.

Para determinar el tipo de reacción que llevarían a cabo los CYPs sobre el temefos y sus metabolitos, se utilizaron los servidores de predicción del SOM. Los resultados obtenidos de SOMP indican que el CYP2D6, 3A4 y 2C19 catalizan principalmente la reacción de desulfuración oxidativa (Tabla 6). Mientras que el CYP2C9 participa en la S-oxidación del azufre central. Además de la desulfuración oxidativa y la S-oxidación, los CYPs pueden catalizar también la O-desalquilación, que en otros OPT, como el paratión, es una de las reacciones para remover el grupo fosfato y depurar este xenobiótico (Butler y Murray, 1997). Empero, la O-desalquilación no fue una de las reacciones probables en los resultados obtenidos con SOMP. Una de las limitaciones de SOMP es que no tiene un algoritmo de predicción para el CYP2B6, por lo que se complementaron los resultados con el software XS (Figura 9). Con esta plataforma se obtuvieron

resultados similares; los CYP2B6, 2C9 y 2C19 participan en la desulfuración oxidativa con mayor probabilidad.

Tabla 6. Tipos de reacciones que las isoformas de citocromos pueden llevar a cabo en temefos y sus metabolitos

Compuesto	CYP2D6	CYP2C19	CYP3A4	CYP2C9
	Desulfuración oxidativa			S-Oxidación
Tem		0.951		0.938
Tem-SO		0.950		0.946
Tem-SO ₂	0.955	0.959		
Tem-OH		0.974		0.884
Tem-SO-OH		0.974		0.905
Tem-SO ₂ -OH	0.977	0.975	0.983	

Notas: Las reacciones metabólicas que puede llevar a cabo cada isoforma de CYP fueron calculadas con base en el Sitio del Metabolismo (SOM) resultante para cada molécula usando la herramienta “Site of Metabolism Predictor” (SOMP) del servidor Way2Drug. Los valores son el $\Delta P (P_a - P_i)$; diferencia entre la probabilidad de actividad (P_a) y de inactividad (P_i). Si el SOM se encontraba en el grupo P=S se consideró como desulfuración oxidativa, mientras que si el SOM se encontraba en el azufre central se consideró S-oxidación.

En el software XS se probaron, además, todas las isoformas de CYPs para el temefos y cada uno de los metabolitos. En la Figura 10 se observa que los CYPs toman principalmente como SOM al grupo P=S, seguido del azufre central y como una opción con baja probabilidad ($P < 0.4$) a los grupos metilo del fosfato. Se puede distinguir que los compuestos una vez que se les sustituye el azufre por oxígeno (oxón), ya no presentan el SOM en el oxígeno (Figura 11). De la misma forma, el azufre central una vez que ha tenido dos oxigenaciones para formar la sulfona, ya no representa un posible SOM para los CYPs. En la Figura 11 se ven estos contrastes en el metabolismo del Tem-oxón-SO₂. El resto de los metabolitos fueron procesados por XS, pero los resultados fueron muy similares, por esta razón se muestran solo las Figura 10 y 11 como representativas.

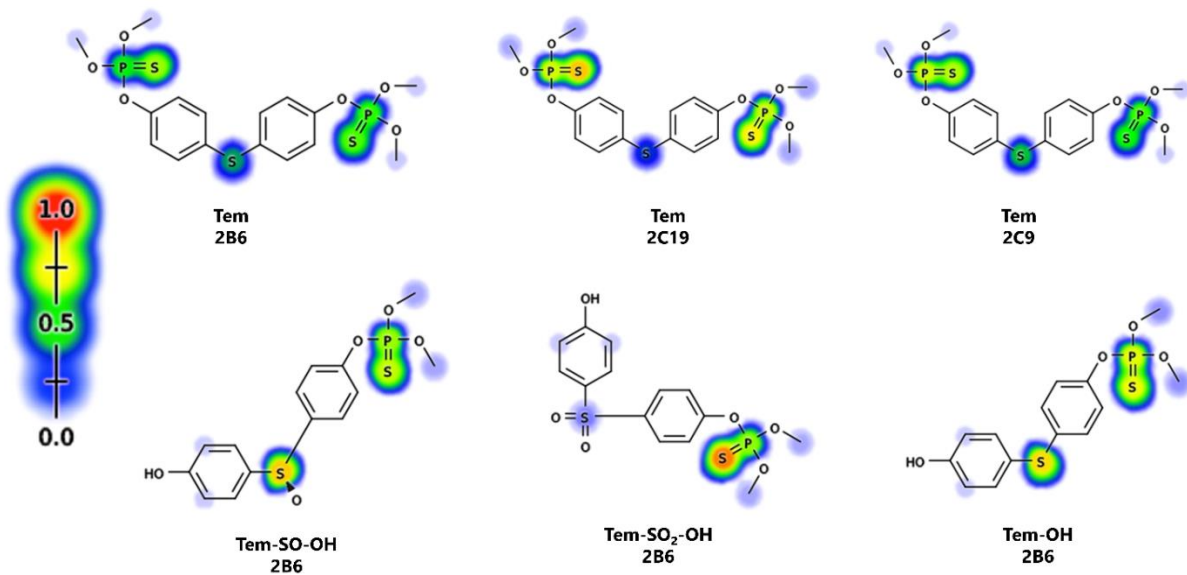


Figura 9. Sitios del metabolismo del temefos y sus metabolitos si éstos fueran tomados como sustratos por diferentes CYPs. Las predicciones se hicieron con XenoSite. Los resultados se muestran como un mapa de calor sobre la molécula, donde los colores representan las siguientes probabilidades: rojo ($P = 0.8 \sim 1$), amarillo ($P = 0.6 \sim 0.8$), verde ($P = 0.4 \sim 0.6$) y azul ($P = 0.2 \sim 0.4$). Mientras que la ausencia de color representa que no hay probabilidad de que una reacción se lleve a cabo en estos átomos.

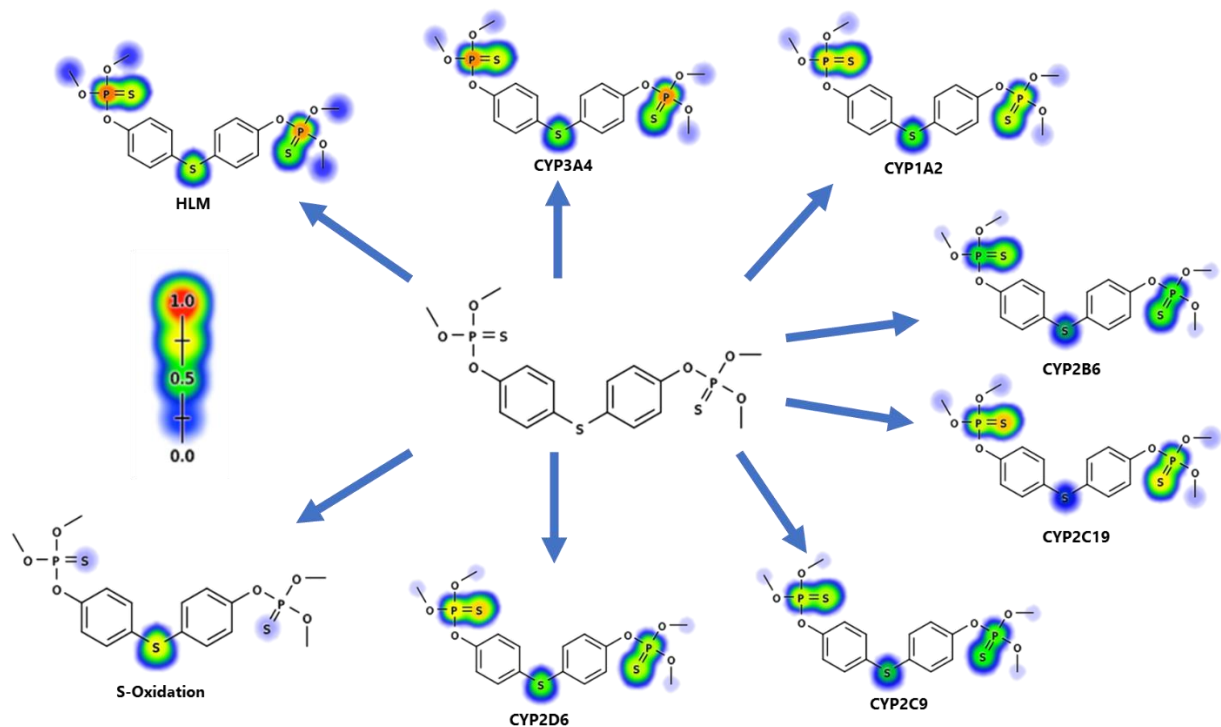


Figura 10. Predicción del SOM del temefos por las diferentes isoformas de CYPs, mediante la herramienta "CYP metabolism prediction" del servidor XenoSIt. Los resultados se muestran como un mapa de calor sobre la molécula, donde los colores representan las siguientes probabilidades: rojo ($P = 0.8 \sim 1$), amarillo ($P = 0.6 \sim 0.8$), verde ($P = 0.4 \sim 0.6$) y azul ($P = 0.2 \sim 0.4$). Mientras que la ausencia de color representa que no hay probabilidad de que una reacción se lleve a cabo en estos átomos. HLM, metabolismo general por microsomas hepáticos humanos.

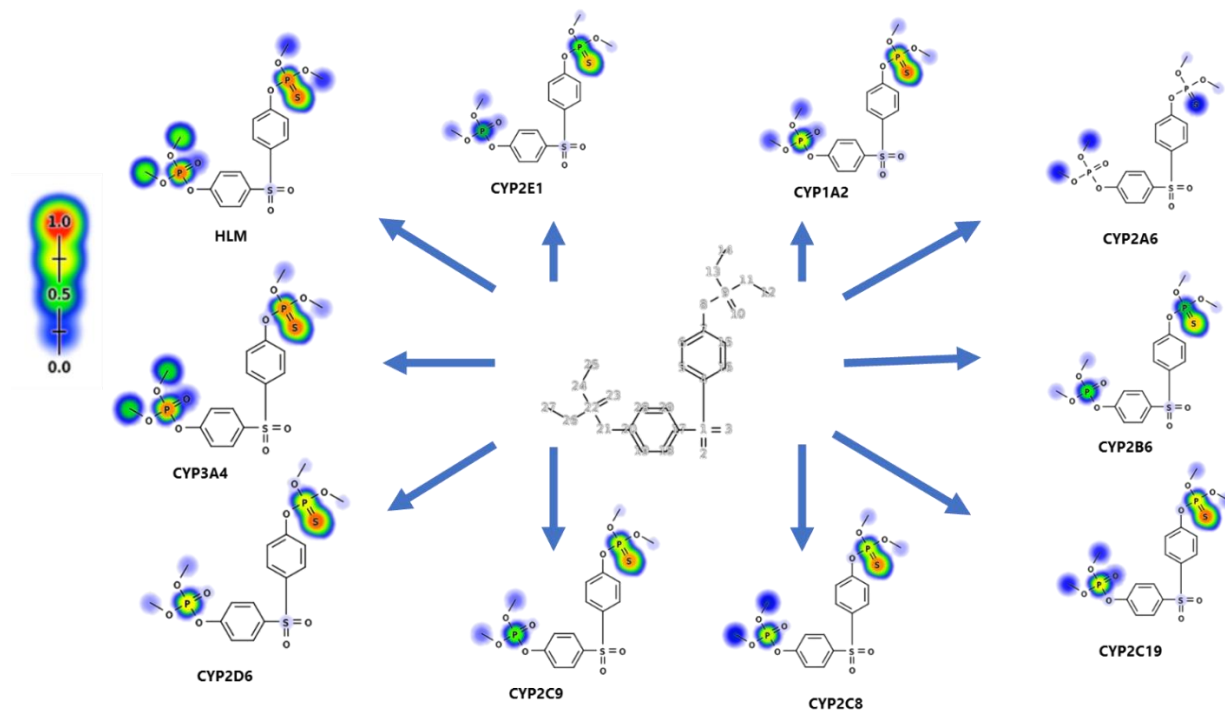


Figura 11. Predicción del SOM del temefos oxón sulfona (Tem-oxo-SO₂) por las diferentes isoformas de CYPs, mediante la herramienta “CYP metabolism prediction” del servidor Xenosite. Los resultados se muestran como un mapa de calor sobre la molécula, donde los colores representan las siguientes probabilidades: rojo (P = 0.8 ~ 1), amarillo (P = 0.6 ~ 0.8), verde (P = 0.4 ~ 0.6) y azul (P = 0.2 ~ 0.4). Mientras que la ausencia de color representa que no hay probabilidad de que una reacción se lleve a cabo en estos átomos. HLM, metabolismo general por microsomas hepáticos humanos.

3.2.2 Comparación del abordaje *in silico* con otros plaguicidas organofosforados

Con el objetivo de tener un punto de comparación con los resultados obtenidos para el temefos, se probaron diferentes compuestos OP usando la metodología de la predicción del metabolismo asociado a los CYPs. Los compuestos estudiados fueron CPF, paratión y diazinon; para ello se utilizó la plataforma *PASS online* que predice la probabilidad de que los CYP1A2, 2B6, 3A4 y 2C19 los tomaran como sustrato. Los resultados muestran que el CPF, paratión y DIA tienen una probabilidad mucho mayor de ser sustrato de los CYPs en comparación con el temefos (**Tabla 7**).

Tabla 7. Comparación entre la probabilidad de metabolismo mediado por CYP de tres organofosforados bien conocidos contra el temefos.

Isoforma de CYP	Clorpirifos	Diazinón	Paratión	Temefos
1A2	0.965	0.936	0.963	0.415
2B6	0.943	0.934	0.818	0.581
3A4	0.849	0.834	0.732	0.345
2C19	0.945	0.943	0.749	0.951

Notas: Las predicciones se realizaron con la herramienta “PASS online” del servidor Way2Drug. Los valores representan el ΔP ($P_a - P_i$); diferencia entre la probabilidad de actividad (P_a) y de inactividad (P_i). Los códigos SMILES utilizados para los diferentes organofosforados fueron:

Clorpirifos: CCOP(=S)(OCC)OC1=NC(=C(C=C1)Cl)Cl

Diazinon: CCOP(=S)(OCC)OC1=NC(=NC(=C1)C)C(C)C

Paratión: CCOP(=S)(OCC)OC1=CC=C(C=C1)[N+](=O)[O-]

3.3 Metabolismo de fase II

Todos los resultados obtenidos sugieren que el metabolismo de fase II de los metabolitos del temefos solo es posible en los grupos -OH resultantes de la hidrólisis del grupo fosfato. Esto indica que la reacción de desfosforilación es necesaria para poder llevar a cabo el metabolismo de fase II. Las reacciones probables fueron tres, de acuerdo con MU: glucuronidación ($P = 0.441$), la cual se lleva a cabo por la enzima Uridil-Glucuronidil-Transferasa (UGT) en el hígado, riñón, intestino, el pulmón, la piel, la próstata y el cerebro. La siguiente reacción más probable fue la acetilación ($P = 0.441$) que se lleva a cabo por las enzimas acetiltransferasas en el hígado, pulmón, bazo, mucosa gástrica, eritrocitos y linfocitos. La tercera reacción, aunque poco probable, fue la sulfatación ($P = 0.079$), esta reacción se lleva a cabo por las enzimas sulfotransferasas en el hígado, riñón y intestino. Aunque los resultados para la sulfatación tienen una probabilidad muy baja se tomaron en cuenta, ya que se ha reportado que en las ratas es la principal reacción de fase II (Blinn, 1969). La glucuronidación y la sulfatación también fueron calculados con la herramienta “RA” de W2D, los resultados muestran que el TDP tiene la mayor probabilidad de sufrir una glucuronidación, pero si este compuesto se oxida, esta probabilidad disminuye (Tabla 8). Por otro lado, la sulfatación solo arrojó resultado para el TDP con una $P = 0.28$, lo que indica que la sulfatación no tiene un gran papel en el metabolismo de fase II del temefos en los seres humanos.

Tabla 8. Reacciones de fase II del metabolismo del temefos y sus metabolitos.

Metabolito	Glucuronidación		UGT-SOM	
	MU	W2D/RA	W2D/SOMP	XS
TDP	0.442	0.558	0.889	0.922
TDP-SO	0.442		0.872	0.915
TDP-SO ₂	0.442	0.355	0.826	0.913
Tem-OH	0.442		0.874	0.996
Tem-SO-OH	0.442		0.854	0.996
Tem-SO ₂ -OH	0.442		0.805	0.996
Tem-oxon-OH	0.442		0.926	0.997
Tem-oxon-SO-OH	0.442		0.914	0.996
Tem-SO ₂ -OH	0.442		0.882	0.996

Notas: Las reacciones de fase II fueron calculadas con MetaUltra (MU) y la herramienta “Reactive Atom” (RA) de la plataforma Way2Drug. Adicionalmente se complementaron los resultados con la predicción del sitio del metabolismo (SOM) en XenoSite (XS) y Way2Drug/SOMP. El SOM-UGT representa la probabilidad de glucuronidación en el grupo -OH que está disponible solo en compuestos que han tenido una hidrólisis. Los valores de RA y SOMP representan el $\Delta P (Pa-Pi)$; diferencia entre la probabilidad de actividad (Pa) y de inactividad (Pi). Mientras que los resultados de MU y XS representan una probabilidad de actividad directa (Pa).

El metabolismo de fase II también fue calculado de forma indirecta mediante la predicción del SOM en las plataformas XS y SOMP. En todos los casos, el SOM fue en el oxígeno del grupo -OH disponible, y la reacción más probable fue la glucuronidación. Solamente hay algoritmos disponibles para evaluar la glucuronidación, los resultados muestran que todos los metabolitos hidrolizados pueden ser potenciales sustratos de la UGT y conjugarse en el grupo -OH (Tabla 8).

3.4 Propuesta de Ruta Metabólica

Con base en los resultados obtenidos con los diferentes softwares utilizados y el análisis lógico y consecutivo de ellos se construyó la ruta de biotransformación en los seres humanos como se presenta en la Figura 12.

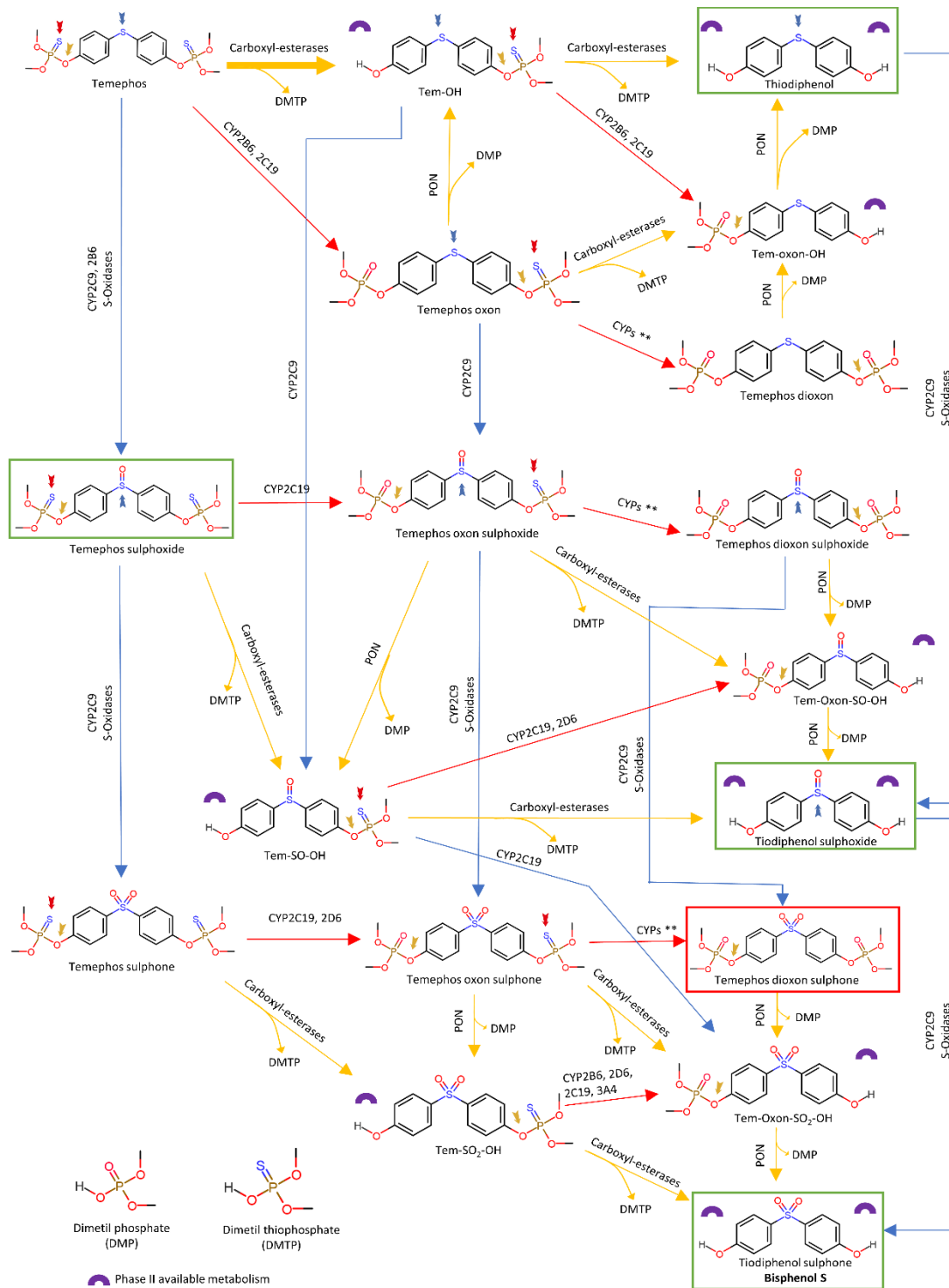


Figura 12. Propuesta de biotransformación de fase I del temefos en seres humanos, obtenida usando predicciones *in silico* con los softwares MetaUltra, Way2Drug y Xenosite. Las flechas amarillas representan desfosforilación, las rojas desulfuración oxidativa, y las azules S-oxidación. Los rectángulos verdes enmarcan metabolitos que han sido reportados en mamíferos. El rectángulo rojo enmarca al metabolito con mayor potencial inhibitorio de la actividad de la acetilcolinesterasa. La ruta fue diseñada con base en los resultados de las tablas 2 a 5. La probabilidad mínima para considerar una reacción probable para esta ruta fue de 0.5. ** $P < 0.5$. PON1, paraoxonasa 1.

3.5 Predicción de propiedades fisicoquímicas y toxicocinéticas del temefos y sus metabolitos

3.5.1 Propiedades fisicoquímicas

Como se aprecia en los resultados anteriores, el temefos se puede metabolizar a por lo menos 19 metabolitos de fase I, todos ellos con diferentes grados de oxidación conteniendo uno o dos grupos fosfato y productos de la mono- y di-desfosforilación y en consecuencia con diferente potencial toxicológico. Por lo tanto, para poder predecir este potencial toxicológico, primeramente se procedió a determinar las propiedades físico-químicas de todos ellos, ya que muestran variaciones principalmente entre el grupo de los compuestos que han sido hidrolizados y los que aún conservan uno o ambos grupos fosfato. Para ello, se utilizó el software SwissADME, con el cual se predijeron sus propiedades físico-químicas (Tabla 9). Hay algunos metabolitos que comparten el mismo PM, en otros, éste aumentó y en otros bajó debido a la pérdida de grupos funcionales. También se observa que en todos ellos la cantidad de aceptores de puentes de hidrógeno disminuye, ya que se encuentran en el grupo fosfato saliente, así como también, la RM, la TPSA y los Kow disminuyen. Otra característica que se puede apreciar es que después de la desfosforilación, los metabolitos son más solubles y pequeños, lo que facilita su transporte.

Los cálculos de solubilidad en agua muestran que la oxidación de la molécula hace que ésta pueda disolverse mejor; sin embargo, la desfosforilación mostró aún mayor efecto en cuanto al cambio de solubilidad. En otras palabras, los compuestos doblemente hidrolizados tienen la mayor solubilidad, lo que hace que el TDF-SO y la TDF-SO₂ sean los compuestos más solubles en ambientes acuosos. Además, los compuestos doblemente oxidados serían más solubles. En todos los casos los metabolitos son más solubles que el compuesto padre (Tabla 10).

Tabla 9. Propiedades fisicoquímicas determinadas *in silico* del temefos y sus metabolitos.

Molécula	Fórmula	PM (g/mol)	H- A	H- D	RM	TPSA (Å ²)	Kow
Tem	C16H20O6P2S3	466.47	6	0	115.08	164.48	4.84
Tem-oxon	C16H20O7P2S2	450.4	7	0	108.18	149.46	3.99
Tem-dox	C16H20O8P2S	434.34	8	0	101.27	134.44	3.25
Tem-SO	C16H20O7P2S3	482.47	7	0	115.77	175.46	3.99
Tem-oxon-SO	C16H20O8P2S2	466.4	8	0	108.86	160.44	3.21
Tem-dox-SO	C16H20O9P2S	450.34	9	0	101.96	145.42	2.51
Tem-SO ₂	C16H20O8P2S3	498.47	8	0	116.45	181.7	3.96
Tem-oxon-SO ₂	C16H20O9P2S2	482.4	9	0	109.55	166.68	3.12
Tem-dox-SO ₂	C16H20O10P2S	466.34	10	0	102.64	151.66	2.46
TDP	C12H10O2S	218.27	2	2	61.05	65.76	2.82
TDP-SO	C12H10O3S	234.27	3	2	61.74	76.74	1.99
TDP-SO ₂	C12H10O4S	250.27	4	2	62.43	82.98	1.88
Tem-OH	C14H15O4PS2	342.37	4	1	88.07	115.12	3.85
Tem-SO-OH	C14H15O5PS2	358.37	5	1	88.75	126.1	2.98
Tem-SO ₂ -OH	C14H15O6PS2	374.37	6	1	89.44	132.34	2.98
Tem-oxon-OH	C14H15O5PS	326.3	5	1	81.16	100.1	3.05
Tem-oxon-SO-OH	C14H15O6PS	342.3	6	1	81.85	111.08	2.27
Tem-SO ₂ -OH	C14H15O7PS	358.3	7	1	82.54	117.32	2.21

Notas: Las propiedades físico-químicas se calcularon con el servidor SwissADME usando los códigos SMILES de la Tabla 2. PM: masa molecular; H- A: aceptores de puentes de hidrógeno; H- D: donadores de puentes de hidrógeno; RM: refractividad molar; TPSA: superficie de interacción polar; Kow: coeficiente de partición octanol agua. Los datos son los valores directos de la predicción.

Tabla 10. Determinación de la solubilidad en agua *in silico* del temefos y sus metabolitos.

Molécula	ESOL			Ali			Silicos-IT		
	Log S	Solubilidad (µg/ml)	Clase	Log S	Solubilidad (µg/ml)	Clase	Log Sw	Solubilidad (µg/ml)	Clase
Tem	-6.16	0.326	pob. soluble	-9.19	0.000301	pob. soluble	-5.32	2.25	mod. soluble
Tem-oxón	-4.97	4.8	mod. soluble	-7.09	0.0366	pob. soluble	-5.13	3.33	mod. soluble
Tem-dox	-3.78	71.6	Soluble	-4.98	4.56	mod. soluble	-4.94	4.95	mod. soluble
Tem-SO	-5.43	1.79	mod. soluble	-8.08	0.004	mod. soluble	-5.21	2.99	mod. soluble
Tem-oxón-SO	-4.25	26.4	mod. soluble	-5.98	0.487	mod. soluble	-5.02	4.44	mod. soluble
Tem-dox-SO	-3.25	251	Soluble	-4.19	28.9	mod. soluble	-4.83	6.58	mod. soluble
Tem-SO ₂	-5.53	1.47	mod. soluble	-8.23	0.00291	pob. soluble	-5.1	3.99	mod. soluble
Tem-oxón-SO ₂	-4.34	22	mod. soluble	-6.12	0.363	pob. soluble	-4.91	5.91	mod. soluble
Tem-dox-SO ₂	-3.35	209	Soluble	-4.33	21.6	mod. soluble	-4.73	8.76	mod. soluble
TDP	-3.76	38.2	Soluble	-4.4	8.73	mod. soluble	-3.88	28.6	Soluble
TDP-SO	-2.97	252	Soluble	-3.23	139	Soluble	-3.79	38.1	Soluble
TDP-SO ₂	-2.98	263	Soluble	-3.27	136	Soluble	-3.69	50.5	Soluble
Tem-OH	-5.1	2.71	mod. soluble	-7.09	0.0275	pob. soluble	-4.63	7.97	mod. soluble
Tem-SO-OH	-4.22	21.4	mod. soluble	-5.75	0.64	mod. soluble	-4.53	10.6	mod. soluble
Tem-SO ₂ -OH	-4.37	16	mod. soluble	-5.98	0.389	mod. soluble	-4.42	14.1	mod. soluble
Tem-oxón-OH	-3.91	39.9	Soluble	-4.98	3.38	mod. soluble	-4.44	11.9	mod. soluble
Tem-oxón-SO-OH	-3.19	223	Soluble	-3.89	44.4	Soluble	-4.34	15.8	mod. soluble
Tem-SO ₂ -OH	-3.27	191	Soluble	-4.03	33.6	mod. soluble	-4.23	21	mod. soluble

Notas: *La solubilidad fue calculada con tres algoritmos diferentes, integrados en SwissADME: ESOL, Ali y Silicos-IT. Los valores obtenidos son índices propios de cada algoritmo y cada uno tiene su propia clasificación. El valor mientras más negativo sea, menor solubilidad en agua tiene.

3.5.2 Predicción *in silico* de la toxicocinética del temefos y sus metabolitos

Después de haber determinado las propiedades físico-químicas del temefos y sus metabolitos se continuó con la predicción de algunas propiedades toxicocinéticas de todos ellos. Los algoritmos disponibles para determinar la absorción se basan principalmente en la absorción intestinal. Los resultados muestran que el temefos y todos sus metabolitos pueden ser absorbidos en el intestino; sin embargo, la prueba de absorción en células Caco-2, una línea celular inmortalizada de adenoma colo-rectal, muestra que el compuesto padre y los metabolitos con un solo oxón no se absorben en estas células; por otra parte, la permeabilidad dérmica disminuye con el metabolismo de los compuestos y una menor capacidad para absorberse por la piel, como lo indican los valores más negativos de Log K_p (índice de permeabilidad dérmica) (**Tabla 11**, columnas 1 – 3).

Los algoritmos disponibles para evaluar la distribución y la excreción son muy escasos. Aunque se pueden generar modelos farmacocinéticos con base fisiológica (PBPK, por sus siglas en inglés) para calcular las variables de la toxicocinética, se requieren datos experimentales para poder realizar los cálculos. En los servidores evaluados solo se encontró la opción para determinar la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica como un parámetro de la distribución. Los resultados muestran que todas las moléculas pueden atravesarla (**Tabla 11** columna 4). En el caso de la excreción, solo se encontró la opción para determinar la capacidad de que los compuestos sean sustratos de la glucoproteína-P (Gp-p), la cual es un receptor para excretar compuestos del interior de la célula. De este análisis se observó que ninguna de las moléculas evaluadas son sustrato de este transportador, lo que sugiere la baja capacidad de este transportador para depurar al temefos y sus metabolitos (**Tabla 11**).

Tabla 11. Capacidad de absorción *in silico* del temefos y sus metabolitos en diferentes compartimentos.

Compuesto	Absorción intestinal	Absorción en células Caco-2	log Kp (cm/s)	Barrera hematoencefálica	Gp-P sustrato
Tem	+	-	-4.91	+	-
Tem-oxón	+	-	-6.04	+	-
Tem-dox	+	+	-7.17	+	-
Tem-SO	+	-	-5.93	+	-
Tem-oxón-SO	+	-	-7.05	+	-
Tem-dox-SO	+	+	-7.96	+	-
Tem-SO ₂	+	-	-6.01	+	-
Tem-oxón-SO ₂	+	-	-7.14	+	-
Tem-dox-SO ₂	+	+	-8.05	+	-
TDP	+	+	-5.26	+	-
TDP-SO	+	+	-6.32	+	-
TDP-SO ₂	+	+	-6.48	+	-
Tem-OH	+	-	-4.88	+	-
Tem-SO-OH	+	+	-6.06	+	-
Tem-SO ₂ -OH	+	-	-6.08	+	-
Tem-oxón-OH	+	+	-6.01	+	-
Tem-oxón-SO-OH	+	+	-7.02	+	-
Tem-SO ₂ -OH	+	+	-7.11	+	-

Notas: Las predicciones se realizaron con ADMETSar, a excepción del Log Kp que se hizo con SwissADME. Se utilizaron los códigos SMILES de la Tabla 2. Los signos positivos indican que puede ocurrir el evento y los negativos que no puede ocurrir. Log Kp es un índice de permeabilidad dérmica, entre más negativo el valor menos permeable es la molécula.

3.6 Evaluación toxicodinámica *in silico* del temefos y sus metabolitos

El potencial toxicológico del temefos y sus metabolitos se evaluó con la plataforma ADMETSar, la cual utiliza diversos descriptores para obtener resultados de numerosos puntos finales. Las pruebas se agruparon en 2 secciones, la primera de ellas está relacionada a la toxicidad general en órganos y sistemas (**Tabla 12**) y la segunda está relacionada a la unión e inhibición de una proteína en particular (**Tabla 13**).

Los resultados muestran que ni el temefos ni sus metabolitos tienen un potencial elevado para causar mutagénesis de acuerdo con la prueba de Ames (**Tabla 12**). Sin embargo, el temefos y 5 de sus metabolitos pueden causar carcinogénesis y todos tienen probabilidad alta de ser genotóxicos, ya que pueden inducir micronúcleos. En cuanto a la toxicidad aguda, todos ellos fueron clasificados en el grupo 3 ($500 \text{ mg/kg} < DL_{50} \leq 5,000 \text{ mg/kg}$), lo que significa que tienen una toxicidad moderada, ya que se estima una $DL_{50} > 500 \text{ mg/kg}$. En cuanto a la corrosión e irritación ocular, los metabolitos que han sufrido una hidrólisis tienen mayor probabilidad de causar este efecto. Uno de los puntos a destacar es que el temefos y todos sus metabolitos pueden causar hepatotoxicidad generando una nueva hipótesis sobre el mecanismo de toxicidad del temefos, adicional a la inhibición de la AChE. Por último, la inhibición del canal iónico de potasio (hERG) implica que no hay expresión adecuada de una subunidad del canal de potasio que es clave en la contracción cardíaca; estos resultados indican que el temefos y sus metabolitos no hidrolizados pueden estar implicados en alteraciones del ritmo cardíaco por la inhibición del canal hERG (**Tabla 12**), aunque hasta el momento no hay ninguna evidencia experimental sobre estos datos.

Tabla 12. Evaluación de la toxicodinámica general *in silico* del temefos y sus metabolitos.

Efecto	Tem	Tem-oxón	Tem-dox	Tem-SO	Tem-oxón-SO	Tem-dox-SO	Tem-SO ₂	Tem-oxón-SO ₂	Tem-dox-SO ₂	TDP	TDP-SO	TDP-SO ₂	Tem-OH	Tem-SO-OH	Tem-SO ₂ -OH	Tem-oxón-OH	Tem-oxón-SO-	Tem-SO ₂ -OH
Mutagenicidad (Ames)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Carcinogenicidad	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Micronúcleos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Toxicidad aguda	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Corrosión ocular	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+
Irritación ocular	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hepatotoxicidad	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inhibición de hERG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Notas: Las predicciones se realizaron con ADMETSar utilizando los códigos SMILES de la Tabla 2. Los signos positivos indican que puede ocurrir el evento y los negativos que no puede ocurrir.

La unión de una molécula a un RN u hormonal implica la activación o inactivación de una vía de señalización que implica la regulación genética de otras proteínas. Los resultados muestran que el temefos y todos sus metabolitos pueden ser potenciales ligandos de la aromatasa, el receptor de estrógenos (RE) y el receptor de andrógenos (RA) (**Tabla 13**). Estas tres proteínas están implicadas en la regulación de las hormonas sexuales, por ello, podría establecerse la hipótesis de que la exposición al temefos implica una potencial disrupción endócrina que puede afectar caracteres sexuales y el metabolismo de la molécula no disminuye el riesgo. Los receptores de glucocorticoides (RG) y tiroideo (RT) están asociados a procesos fisiológicos regulados por hormonas. Se observó que el temefos y algunos de sus metabolitos pueden ser ligandos de estos receptores, lo que implica una posible activación no regulada debido a la exposición de temefos. Por último, el receptor PPAR γ (receptor activado por proliferación de peroxisoma gamma) también es un blanco potencial del temefos y sus metabolitos, ya que varios de estos compuestos pueden interactuar con él, la unión a este receptor causaría una alteración de la expresión de los genes reguladores por este receptor y afectar algunas funciones, tales como el almacenamiento de ácidos grasos y metabolismo de la glucosa (Ahmadian et al., 2013).

Otro efecto que se evaluó fue la inhibición de las enzimas involucradas en el metabolismo de xenobióticos, la cual, si ocurre, causa que se detengan vías de regulación y depuración éstos. Los resultados muestran que el temefos y sus metabolitos tienen el potencial de inhibir a los CYP1A2, 2C19, 2C9, 2D6 y 3A4. Solo el CYP2D6 parece ser la isoforma que tiene una probabilidad menor de ser inhibida por estas moléculas. En este caso, que se utilizaron dos servidores, se observó que hay algunos resultados contradictorios, los cuales están señalados con colores rosa y gris en la **Tabla 13**. Esto ocurrió solo en algunas moléculas y los resultados se deben manejar con cautela, ya que no son concluyentes. En este caso se confirma nuevamente que la generación de hipótesis a partir de los estudios *in silico* deben ser evaluados con diversos softwares debido a casos como éste.

La inhibición del metabolismo de fase III causa que el compuesto no pueda ser eliminado de la célula para posteriormente ser excretado por la orina y/o las heces, causando una acumulación intracelular y sistémica. Además de la participación de los transportadores en el metabolismo de

fase III, también cumplen funciones fisiológicas para un adecuado funcionamiento celular. Los resultados de la evaluación sobre esta fase del metabolismo muestran que el temefos y todos sus metabolitos pueden inhibir a los transportadores de los péptidos aniónicos (OATP, por sus siglas en inglés), OATP1B1 y 2B1 (**Tabla 13**). Los OATP están presentes en la bicapa lipídica actuando como compuertas y su inhibición causa un desajuste en el equilibrio iónico celular. Se observó que el metabolismo del temefos no altera la probabilidad de inhibir a los receptores OATP. No obstante, sí hay un cambio relacionado con el metabolismo en la inhibición del receptor de resistencia a multidrogas 1 (MDRP1, por sus siglas en inglés) y la bomba de excreción de sales biliares (BSEP, por sus siglas en inglés), ya que solo los metabolitos que han sufrido al menos una desfosforilación presentaron una probabilidad alta de inhibición.

3.6.1 Predicción de la interacción del temefos y sus metabolitos con la AChE, PXR y CAR

Los estudios del sitio activo nos muestran algunas diferencias entre las proteínas AChE, PXR y CAR. Los reportes indican que el volumen del sitio activo de PXR varía entre 1416 y 1644 Å³, mientras que el sitio de unión de CAR es de 675 Å³ (Watkins et al., 2002; Zhang et al., 2001). La diferencia con lo que se encontró en nuestro estudio es que los sitios integraron algunos subsitios, generando una estructura más amplia (Figura 13). En cuanto a los descriptores de los elementos que componen al sitio activo, se pudo distinguir que, si bien el número de C, N y O son similares en los tres tipos, destaca que solo los RN tienen azufre presente (Tabla 14). Esto es relevante porque los grupos azufre pueden ser susceptibles de inhibición mediada por los OP (Buratti et al., 2007). Los descriptores de grupos funcionales nos muestran que el receptor CAR tiene una menor cantidad de donadores de puentes de hidrógeno respecto a las otras dos proteínas y también destaca que los RN pueden establecer una mayor cantidad de interacciones hidrofóbicas, lo que permite unirse a compuestos hidrofóbicos, aunque en la relación las tres proteínas tienen una mayor afinidad por compuestos hidrofílicos.

Tabla 13. Potencial toxicológico del temefos y sus metabolitos, asociado a la unión o inhibición de proteínas y receptores.

Molécula	Tem	Tem-oxón	Tem-dox	Tem-SO	Tem-oxón-SO	Tem-dox-SO	Tem-SO ₂	Tem-oxón-SO ₂	Tem-dox-SO ₂	TDP	TDP-SO	TDP-SO ₂	Tem-OH	Tem-SO-OH	Tem-SO ₂ -OH	Tem-oxón-OH	Tem-oxón-SO-OH	Tem-SO ₂ -OH
	Potencial ligando o sustrato																	
Tiroideo	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
PPAR γ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Aromatasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RG	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-
RA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inhibidor de las siguientes enzimas del metabolismo																		
CYP1A2 (A)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+
(S)	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
CYP2C19 (A)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
(S)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
CYP2C9 (A)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
(S)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
CYP2D6 (A)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(S)	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CYP3A4 (A)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
(S)	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
Inhibidor de transportadores																		
BRCP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BSEP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MATE1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OATP1B1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OATP1B3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OATP2B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OCT1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OCT2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MDRP1	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Notas: Las predicciones se realizaron con ADMETSar (A) y SwissADME (S) utilizando los códigos SMILES de la Tabla 2. Los signos positivos indican que puede ocurrir el evento, y los negativos que no puede ocurrir. En los casos que no hay punto de comparación no se colocó ninguna letra, pero pertenecen a ADMETSar. Los colores gris y rosa indican resultados contradictorios entre ambas plataformas.

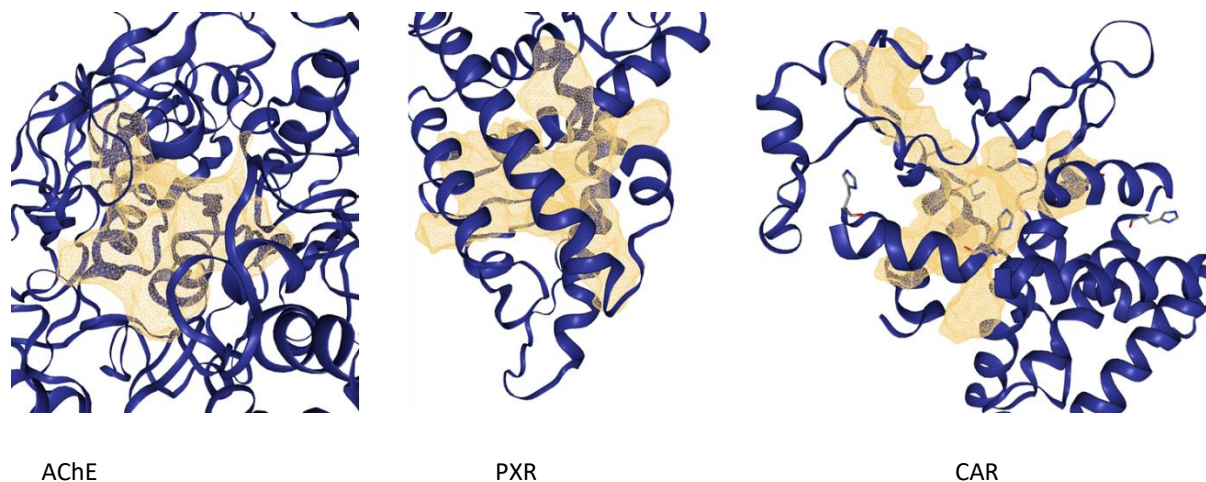


Figura 13. Esquema del sitio de unión (color crema) de las proteínas (color azul) AChE, PXR y CAR. Las imágenes y análisis se obtuvieron con DoGSiteScorer.

Como parte de la evaluación toxicodinámica del temefos y sus metabolitos y debido a que es el único mecanismo descrito para el temefos, se realizaron ensayos de *docking* entre el temefos y sus metabolitos con la AChE. Estos estudios se hicieron con dos softwares y metodologías diferentes; en primer lugar, se muestran los resultados obtenidos con el software VINA y posteriormente con AutoDock4. En el primer caso se destaca que el número de repeticiones fue de 1000 del ensayo en el mismo sitio de unión con las mismas condiciones. Estos resultados muestran que hay una variación entre prueba y prueba debido a una característica propia del software que es la semilla (*seed*). Este es un número aleatorio del que se parte para realizar los cálculos. Se puede interpretar como una colisión del ligando en diferente conformación en cada ocasión, aunque en realidad solo es un número aleatorio del que parte el algoritmo de búsqueda genético. Los resultados se promediaron y se muestran en la Figura 14.

Tabla 14. Datos de comparación de los sitios activos de las proteínas AChE, PXR y CAR.

Parámetros de comparación	AChE (6NEA)	PXR (6DUP)	CAR (1XNX)
Comparación de tamaño y forma			
Volumen [\AA^3]	1416	1590	1644
Superficie [\AA^2]	1413	2061	2228
Profundidad [\AA]	26.26	28.70	25.57
Relación del eje principal del elipsoide c/a	0.18	0.13	0.24
Relación del eje principal del elipsoide b/a	0.41	0.40	0.70
Recinto	0.05	0.03	0.06
Descriptores de elementos			
Número (#) de átomos en el pocket	339	350	357
# carbonos (C)	242	254	264
# nitrógenos (N)	48	42	38
# oxígenos (O)	49	49	49
# azufres (S)	0	5	6
# Otros elementos	0	0	0
Descriptores de grupos funcionales			
# Donadores de puentes de hidrógeno	36	33	22
# Aceptores de puentes de hidrógeno	88	94	98
# metales	0	0	0
# Interacciones hidrofóbicas	54	84	80
Relación de hidrofobicidad	0.30	0.40	0.40
Composición de aminoácidos			
Relación de aminoácidos apolares	0.43	0.54	0.63
Relación de aminoácidos polares	0.46	0.32	0.22
Relación de aminoácidos positivos	0.04	0.11	0.07
Relación de aminoácidos negativos	0.07	0.03	0.07

Notas. Los datos se obtuvieron con DoGSiteScorer. Las proteínas fueron preprocesadas en Charmm-Gui con la herramienta “*pdb reader*”. Posteriormente se corrió 10 ns de dinámica molecular en Gromacs. AChE: acetilcolinesterasa; PXR: receptor X pregnano; CAR: Receptor constitutivo de androstano. Entre paréntesis se indica el código de la proteína utilizada del PDB.

La energía de afinidad es una medida de la estabilidad de la interacción entre el ligando y el receptor. Tomando como referencia al temefos se observó que el metabolismo aumenta la energía de afinidad entre los metabolitos y la AChE. Las moléculas más oxidadas tienen una

energía de afinidad mayor (Figura 14). Sin embargo, también las moléculas que han perdido el grupo fosfato tienen una energía de afinidad mayor. Los resultados no fueron concluyentes en cuanto al efecto del metabolismo, solo se observó que entre más se oxida la energía de afinidad es mayor, pero la ausencia de los grupos no disminuye esta energía. Lo que si fue muy evidente es que la presencia del sulfóxido y la sulfona aumentan considerablemente la energía de afinidad y aunque los fosfatos no estén oxidados la energía sigue siendo alta. La energía de afinidad de los compuestos hidrolizados también aumentó, y estos pueden tener una gran energía de afinidad, pero es principalmente por interacciones de Van der Vals, ya que se forman pocos puentes de hidrógeno.

Debido a que la semilla de cada ensayo es diferente, la molécula podría interactuar con la proteína en una conformación diferente. En el caso del temefos, esto resultó de interés, ya que el compuesto padre es una molécula simétrica, e incluso después de la formación del sulfóxido y la sulfona. En estos compuestos simétricos, la orientación de la molécula no afecta sobre el resultado final. Sin embargo, cuando uno de los dos **fosforotioatos** se metaboliza y forma un oxón, se vuelve una molécula asimétrica. Los reportes en la literatura indican que la inhibición de la AChE por los OP es debido a la interacción con el grupo oxón (P=O), y que el grupo fosforotioato (P=S) no tiene o es muy pobre el efecto sobre la inhibición. Cuando se analizaron las conformaciones de los ligandos en el sitio de unión se observó que el Tem-oxón se orientaba del lado del fosforotioato hacia el interior del sitio de unión de la AChE (Figura 15). En la imagen se observa al Tem-oxón en el sitio de unión, y se ve que el sitio de unión es estrecho y que la molécula no podría cambiar de orientación en el interior del sitio de unión. Esto implica que en la interacción del Tem-oxón con la triada catalítica (Ser203, Glu327 e His440) es principalmente con el grupo fosforodiéster y no con el oxón. Este fenómeno puede estar relacionado con la baja toxicidad descrita para el temefos, ya que el principal parámetro que se utiliza es la inhibición de la AChE.

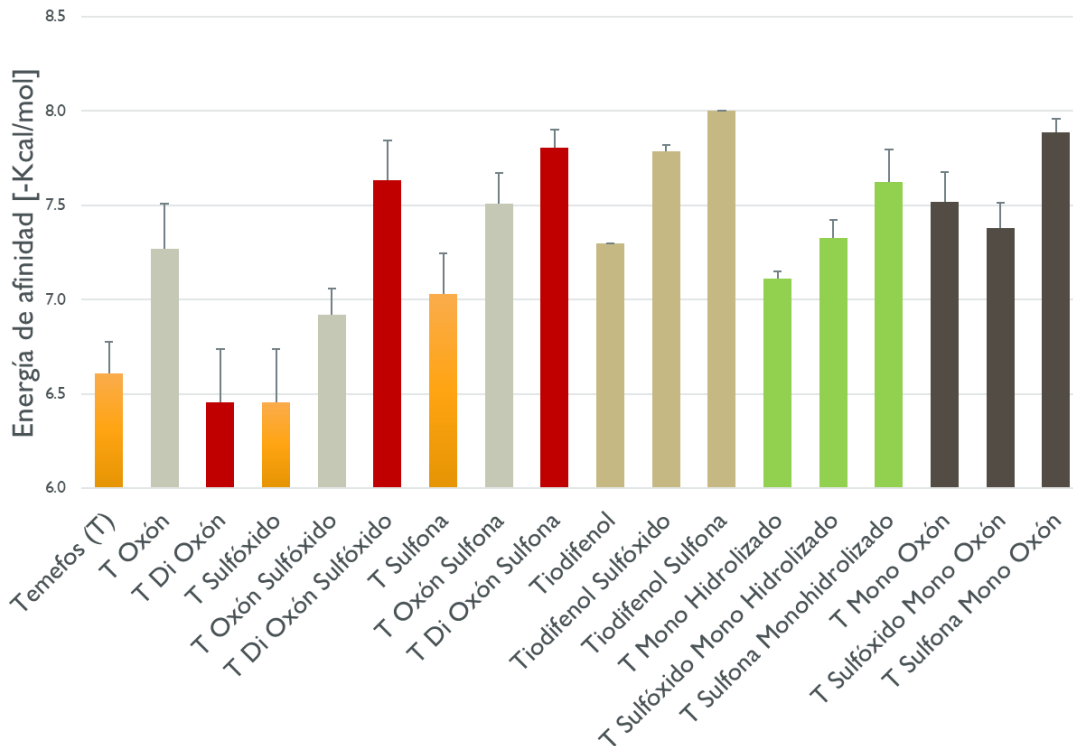


Figura 14. Gráfica de la energía de afinidad del temefos y sus metabolitos con la AChE (6NEA). Los resultados se obtuvieron de 1,000 corridas independientes con las mismas dimensiones de caja y mismos parámetros de búsqueda. Los valores representan la media \pm desviación estándar.

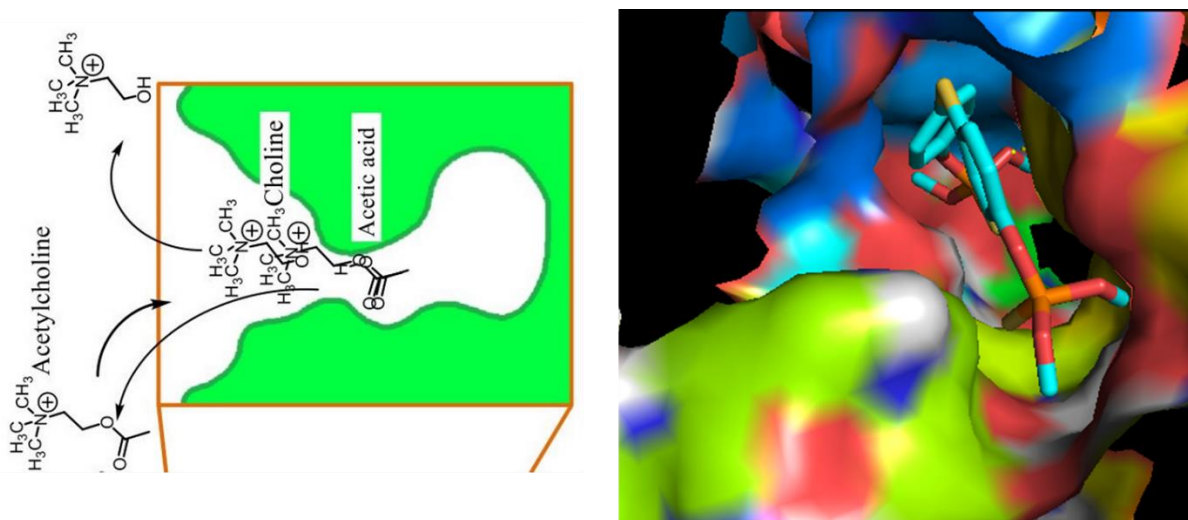


Figura 15. Modelo del sitio de unión de la AChE. A la izquierda se observa el sitio en 2D con el neurotransmisor acetilcolina y a la derecha el sitio en 3D con el temefos en su interior.

Analizando todos los metabolitos por separado se observó que los metabolitos no simétricos (**Tabla 15** con un sombreado amarillo) tienen una proporción diferente en cuanto a la orientación que pueden tomar en el sitio de unión. Los metabolitos asimétricos son aquellos que tienen un grupo oxón y un grupo fosforotioato a cada extremo, estos son el Tem-oxón, Tem-oxón-SO y Tem-oxón-SO₂, así también, los metabolitos que ya han sufrido una desfosforilación y solo cuentan con un grupo fosfato. En comparación, se observó que las moléculas simétricas como el temefos tienen una proporción muy similar en la orientación en la que entran en el sitio de unión: 446 – 544, estos valores representan las veces que el temefos se orientó con un grupo fosfato u otro más cerca del sitio activo. En las moléculas simétricas, la orientación del compuesto en el sitio de unión es aleatoria. Sin embargo, en las moléculas asimétricas, la orientación es determinada por la conformación en la que tiene una energía de afinidad mayor. En el caso del temefos y sus metabolitos, es un conjunto de moléculas simétricas y asimétricas que interactúan de forma diferencial en el sitio de unión de las enzimas. La orientación de la molécula propicia que el grupo oxón pueda estar cerca o no de los aminoácidos catalíticos, especialmente en la Ser203 que es el blanco de inhibición.

Tabla 15. Resultados de los ensayos de interacción de temefos y sus metabolitos con la AChE.

Compuesto	Átomo	Conteo de orientaciones	Energía de afinidad [-Kcal/mol]			
			Media n=1000	DESV	Min	Max
Tem	S10	456	7.6	3.0	3.4	16.3
	S23	544	8.0	2.6	3.4	13.1
Tem-oxon	S10	885	11.4	2.6	5.6	13.9
	O23	115	5.7	3.4	3.4	13.6
Tem-dox	O10	502	8.1	3.7	3.3	13.2
	O23	498	9.6	3.5	3.6	13.3
Tem-SO	S11	639	10.2	2.7	4.1	14.0
	S24	361	7.4	2.3	3.6	13.1
Tem-oxon-SO	S11	711	9.3	3.0	3.2	12.7
	O24	289	8.3	2.9	5.7	13.6
Tem-dox-SO	O11	218	7.4	2.5	5.7	12.7
	O24	782	9.0	1.7	3.3	12.6
Tem-SO ₂	S12	517	8.9	2.8	3.5	14.0
	S25	483	8.4	2.3	3.5	13.8
Tem-oxon-SO ₂	S12	843	11.9	2.1	5.3	12.8
	O25	157	7.1	1.5	3.7	13.7
Tem-dox-SO ₂	O12	493	9.4	3.2	5.2	12.7
	O25	507	9.4	3.2	5.3	12.8
TDP	O16	569	6.4	3.1	2.8	9.1
	O8	431	5.5	3.1	2.8	9.1
TDP-SO	O17	0	2.9	0.0	2.8	2.9
	O9	1000	8.8	0.0	8.8	8.8
TDP-SO ₂	O10	9	2.8	0.0	2.8	2.8
	O18	991	9.3	0.0	9.3	9.3
Tem-OH	OH 8	4	7.3	0.5	3.6	7.5
	S18	996	13.8	0.1	13.4	13.8
Tem-oxon-OH	OH 8	776	9.0	0.9	5.8	9.5
	O18	224	6.4	3.2	4.8	13.8
Tem-SO-OH	OH 9	55	7.8	1.5	7.2	13.2
	S19	945	12.7	2.7	2.8	13.5
Tem-oxon-SO-OH	OH 9	544	8.8	2.5	5.8	12.4
	O19	456	6.2	3.2	2.7	13.7
Tem-SO ₂ -OH	S20	935	13.5	1.6	7.0	14.6
	OH 10	65	7.2	1.0	5.7	11.8
Tem-SO ₂ -OH	O20	63	6.1	1.3	5.6	12.7
	OH 10	937	12.3	2.5	2.9	13.3

Notas: Los resultados se obtuvieron con el software VINA. El sombreado anaranjado resalta las moléculas asimétricas y la orientación que estas toman en el sitio de unión de la AChE.

Tabla 16. Resultados de la interacción entre temefos y sus metabolitos con la enzima AChE.

Molécula	Energía de afinidad	Energía intermolecular	Energía interna	Cl₅₀ de la AChE	Energía libre de torsión	Energía de Van der Waals	Eficiencia de ligando	Energía de unión
Tem	-8.732	-9.23	0.5	26.2	2.98	-9.23	-0.23	-6.25
Tem-oxón	-9.545	-9.26	-0.29	25.09	2.98	-9.29	-0.23	-6.28
Tem-dox	-9.983	-8.91	-1.07	44.95	2.98	-8.9	-0.22	-5.93
Tem-SO	-9.693	-8.93	-0.76	43.37	2.98	-8.79	-0.21	-5.95
Tem-oxón-SO	-9.861	-9.2	-0.66	27.72	2.98	-9.02	-0.22	-6.22
Tem-dox-SO	-9.186	-8.82	-0.36	52.27	2.98	-8.92	-0.11	-5.84
Tem-SO ₂	-9.689	-8.85	-0.84	49.9	2.98	-8.72	-0.2	-5.87
Tem-oxón-SO ₂	-9.839	-9.48	-0.36	17.31	2.98	2.98	-0.22	-6.5
Tem-dox-SO ₂	-8.893	-8.87	-0.02	48.33	-7.52	-8.92	-0.2	-5.89
TDP	-8.282	-7.62	-0.66	87.44	2.09	-7.64	-0.26	-5.54
TDP-SO	-8.614	-7.87	-0.74	57.66	2.09	-7.69	-0.26	-5.78
TDP-SO ₂	-8.577	-7.97	-0.61	49.11	2.09	-7.96	-0.26	-5.88
Tem-OH	-8.717	-8.24	-0.47	30.78	2.09	-8.19	-0.29	-6.16
Tem-SO-OH	-8.174	-7.45	-0.72	116.87	2.09	-7.37	-0.24	-5.36
Tem-SO ₂ -OH	-8.972	-8.22	-0.75	31.76	2.09	-8.14	-0.27	-6.14
Tem-oxón-OH	-7.017	-6.75	-0.27	84.7	1.19	-6.59	-0.37	-5.56
Tem-oxón-SO-OH	-6.78	-7.143	-0.36	80.41	1.19	-6.59	-0.35	-5.59
Tem-SO ₂ -OH	-7.256	-6.92	-0.34	63.71	1.19	-6.76	-0.34	-5.72
Paratión	-7.214	-6.61	-0.61	486.28	2.09	-6.84	-0.25	-4.52
Paraoxón	-7.167	-6.63	-0.54	467.24	2.09	-6.87	-0.25	-4.54

Notas: Los resultados se obtuvieron con Autodock4 a partir de una corrida con las mismas condiciones para cada metabolito. Además, se utilizó al paratión y al paraoxón para tener un punto de comparación con compuestos mejor estudiados.

3.6.2 Correlación entre los estudios *in silico* y experimentales sobre el efecto del temefos y sus metabolitos sobre la actividad de la AChE

Los ensayos *in silico* tienen diversas limitaciones, en consecuencia, la comparación con los estudios experimentales es un paso necesario. Por lo tanto, se determinó la correlación entre la IC_{50} reportada experimentalmente del temefos y sus metabolitos sobre la actividad de AChE reportada por Verdín-Betancourt et al. (2019) y la energía de afinidad encontrada en los ensayos de *docking* mediante el software Autodock VINA. En un primer intento, la correlación no resultó con una R mayor de 0.35 involucrando a todos los metabolitos, sin embargo, cuando se eliminaron las moléculas asimétricas (marcadas con amarillo en la **Tabla 15**) de la correlación, ésta alcanzó una R^2 de 0.88 (Figura 16). Aunque la energía de afinidad no variaba demasiado, en los resultados experimentales había diferencias de órdenes de magnitud, por esta razón, la gráfica se hizo en escala logarítmica. El significado de esto es que la energía de afinidad puede tener un efecto exponencial en cuanto a la IC_{50} .

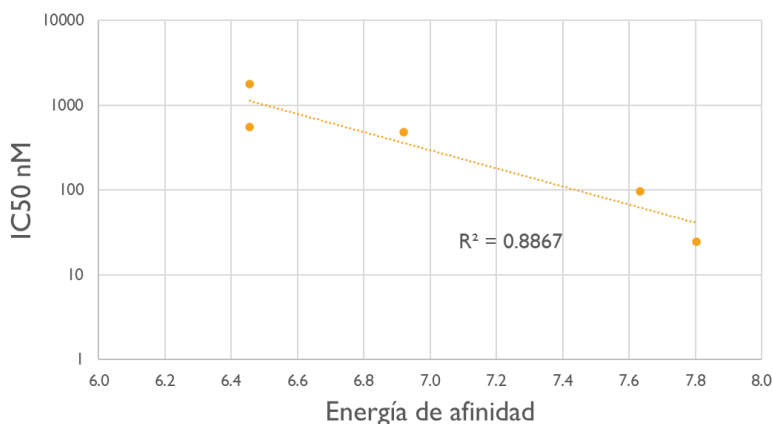


Figura 16. Correlación entre la IC_{50} experimental del temefos y sus metabolitos sobre la actividad de la AChE y la energía de afinidad calculada mediante estudios de *Docking* con *Autodock VINA*.

3.6.3 Evaluación de la interacción de temefos y sus metabolitos con los receptores nucleares CAR y PXR

Los resultados del metabolismo muestran que, aunque la probabilidad de la participación de los CYPs es baja respecto a otras enzimas, su participación es viable y los productos que se generan, los oxones, son los más tóxicos. Por esta razón, se hicieron evaluaciones con los RN PXR y CAR,

ya que éstos son los principales xenosensores y reguladores de la expresión de los CYPs hepáticos y extrahepáticos. Los resultados obtenidos muestran que el estado de oxidación de los metabolitos es dependiente de la afinidad por el receptor PXR. En la Figura 17A se muestra que los compuestos sin oxones (naranjas) tienen una afinidad más baja respecto a los oxonados, y los compuestos con doble oxón muestran la más alta afinidad. También se observa que la presencia de grupo sulfóxido y la sulfona aumentan la afinidad por el receptor. Por el contrario, la afinidad disminuye en los metabolitos que han sufrido la hidrólisis y los compuestos doblemente hidrolizados (café) presentan la energía de afinidad más baja. La comparación entre los estudios experimentales de inhibición de la AChE permitió observar que la variación en la energía de afinidad podía traducirse de forma logarítmica en la CI_{50} experimental. En este caso, si el comportamiento fuera similar, habría una diferencia de dos órdenes de magnitud entre la activación causada por el Tem-dox-SO₂ y la del compuesto padre.

Los resultados de los ensayos de *docking* con el receptor CAR mostraron un panorama diferente. La energía de afinidad del temefos y los metabolitos oxidados varía entre 5.4 y 6 kcal/mol, en comparación con la interacción con el PXR que fue mínimo de 6.4 y llegó a tener una energía de afinidad de 7.2 kcal/mol. Esto significa que la interacción con el CAR es con menor afinidad y es probable que no cause una activación e inducción en la expresión de los genes de respuesta como los CYPs. Los compuestos con mayor energía de afinidad son el TDF-SO y el TDF-SO₂, siendo estos los dos metabolitos que podrían inducir con mayor probabilidad la activación de CAR y la consecuente expresión de genes de respuesta como los CYPs.

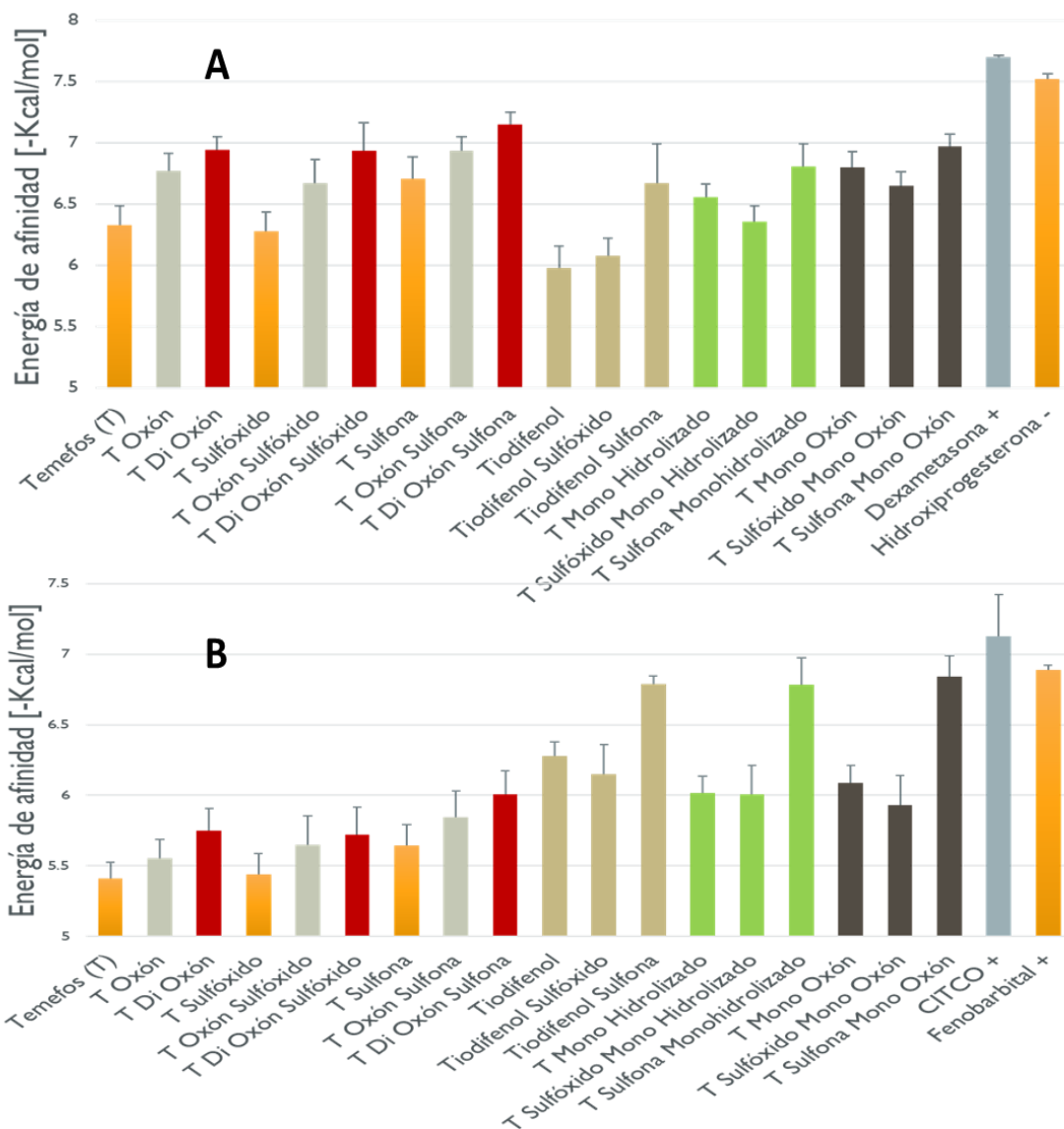


Figura 17. Resultados de la interacción entre el temefos y sus metabolitos con los receptores PXR y CAR. Los resultados se obtuvieron de 1000 corridas independientes con las mismas dimensiones de caja y mismos parámetros de búsqueda. Los valores representan la media \pm desviación estándar.

4. Discusión

El temefos es un plaguicida que se usa ampliamente en varios países para controlar vectores de enfermedades como el dengue, Zika y Chikungunya; en los países donde se comercializa se usa de manera masiva y permanente, y se seguirá usando mientras no haya una alternativa más eficiente y de costo bajo (PAHO, WHO, 2019). A pesar de su amplio uso desde la década de los 60, la información sobre su biotransformación y toxicidad es limitada, y la mayoría de los estudios se realizaron antes del año 2000 (Blinn, 1969; Ferguson et al., 1985; Gaines et al., 1967; Laws et al., 1967). La información es todavía más limitada en relación con los seres humanos. Con base en estos antecedentes, en este trabajo se propuso determinar la ruta de biotransformación del temefos en el ser humano, así como predecir los efectos tóxicos que pueden producir tanto los metabolitos como el compuesto padre en los seres humanos por medio de estudios de QSAR y SAR usando métodos computacionales. Para ello se utilizaron diversos softwares con diferentes fundamentos y alcance. Los resultados obtenidos se integraron en base al conocimiento de cada una de las áreas descritas para otros OPT y de esta manera, predecir la toxicidad asociada a la exposición a este plaguicida.

Se recopiló la información disponible sobre los productos oxidados generados en el ambiente y los metabolitos reportados de los estudios en mamíferos. El temefos es un compuesto inestable, se oxida fácilmente en el ambiente a varios productos oxidados (oxones, sulfóxidos y sulfonas) por la luz solar, el agua y el aire (Lacorte et al., 1996; 1997). Algunos de estos productos también se generan cuando el temefos se adiciona en agua clorada (Kamel, 2008). Es importante señalar que en nuestro país y en varios países alrededor del mundo, la cloración es el método más común para la potabilización del agua destinada para el consumo humano. Recientemente, nuestro grupo de trabajo reportó que los productos oxidados del temefos generados en el agua clorada (Tem-SO, Tem-dox-SO, Tem-dox-SO₂ y Tem-ox-SO) son capaces de inhibir a la AChE, y el grado de inhibición es dependiente del grado de oxidación del temefos. Así tenemos que el metabolito más oxidado, el Tem-dox-SO₂ fue el más potente y resultó ser aún más potente que el etilparaoxón, compuesto con gran capacidad para inhibir a la AchE (Verdín-Betancourt et al., 2019). Estos antecedentes sugieren que la población residente en zonas endémicas de dengue, donde

se aplica el temefos para el control del mosquito, está potencialmente expuesta a los derivados oxidados y es susceptible de sufrir alguna afectación asociada al temefos. En México, el temefos fue el plaguicida de primera elección para combatir a los vectores del dengue hasta el año 2020, actualmente se sigue aplicando aunque en combinación con otros OP como el CPF, además de carbamatos y piretroides (CENAPRECE 2020a; 2020b).

En el reporte de Blinn (1969) se describió solo la presencia del metabolito Tem-SO en el tejido adiposo y en las heces y la presencia de productos desfosforilados como el TDF, TDF-SO y TDF-SO₂, conocido también como bisfenol S (BPS), después de la hidrólisis enzimática con glucuronidasa/sulfatasa en la orina y las heces. Con estos metabolitos y los productos oxidados del temefos se obtuvieron los códigos SMILES, los cuales permiten integrar los compuestos a todas las bases de predicción. En la actualidad, el código SMILES de un compuesto es el más utilizado y aceptado por la comunidad científica para iniciar o ampliar cualquier investigación en las plataformas, e incluso verificar todas las predicciones realizadas en este estudio si se utilizan los mismos servidores (Gupta et al., 2010).

4.1 Biotransformación del temefos

4.1.1 Metabolismo de fase I

El metabolismo de un xenobiótico tiene como finalidad hacer que los compuestos sean más solubles para permitir su excreción por el sistema urinario o digestivo (Phang-Lyn y Llerena, 2020). A partir del uso de las herramientas informáticas se determinó un total de 19 metabolitos probables derivados del temefos, éstos se producen a partir de la combinación de tres reacciones principales: 1) desfosforilación, 2) S-oxidación y 3) desulfuración oxidativa. Se describieron otras reacciones como la hidroxilación de los anillos aromáticos (Figura 7), sin embargo, la probabilidad de estas reacciones fue baja, por lo que fueron descartadas; además, no hay ningún reporte de este tipo de reacciones en los anillos aromáticos de otros OPT. Se construyeron dos esquemas de biotransformación, uno general considerando todas las enzimas y otro considerando solamente las reacciones catalizadas por los CYPs. En el esquema general, la principal reacción fue la desfosforilación, generando al TDF para que se lleve a cabo el metabolismo de fase II sin haber pasado por la formación de los oxones (Figura 12). El TDF puede sufrir la oxidación del azufre

central para formar primeramente al TDF-SO y una segunda para que se forme la TDF-SO₂ o BPS, los cuales pueden ser sustratos para reacciones metabólicas de fase II. La formación de los productos fenólicos coincide con lo reportado en la literatura, al ser éstos los metabolitos principales del metabolismo del temefos en las ratas, sin que se detectara la formación del Tem-oxón (Blinn, 1969). Este esquema de metabolismo, donde la formación del Tem-oxón tiene una probabilidad de formación baja, podría ser una explicación de la toxicidad baja del temefos en los escasos estudios en seres humanos (Laws et al., 1968; 1967). Sin embargo, además, esto solo explicaría parcialmente la toxicidad colinérgica baja. No así para los otros efectos descritos para el temefos, como la genotoxicidad y alteraciones reproductivas (Benitez-Trinidad et al., 2015; Kim et al., 2020; Vani et al., 2018).

La desfosforilación del temefos encontrada en este estudio sin pasar por la formación del oxón, que representa al mismo tiempo una reacción que favorecería su eliminación, es una reacción cuestionable, ya que la formación del oxón es un paso constante en diversos OPT como el paratión, malatión, CPF, etc. (Buratti et al., 2007). En diversos estudios se da por hecho que se puede formar el DMTP a partir del temefos, utilizando esta molécula como marcador de exposición a temefos y otros OPT (Kavvalakis y Tsatsakis, 2012; Prapamontol et al., 2014; Whyatt y Barr, 2001). En el caso del temefos no hay evidencias de las reacciones de desalquilación, ya que no se ha determinado la formación de los DAP, por lo que se requiere realizar estudios enfocados para comprobar esta predicción. Para otros OP se ha descrito que las CE hepáticas pueden realizar una reacción de desfosforilación directa sobre el tiofosfato, y en otros también se ha propuesto la participación de los CYPs en las reacciones equivalentes de *O*-desalquilación u *O*-desarilación (Buratti et al., 2003). Una evidencia directa de estas reacciones sería determinar la formación de los DMP y los DMTP como productos del metabolismo del temefos después de la exposición al larvicida. Es relevante comentar que ésta es una de las primeras hipótesis a comprobar en estudios subsecuentes como producto de este estudio *in silico*, aunque en este caso es importante considerar el reporte de Murphy y Cheever (1972), en el que se describe la inhibición de las CE por el temefos.

La reacción de desfosforilación se ha manejado como la opción segura en el metabolismo del temefos, sin embargo, en esta ruta se genera el BPS, que es considerado un disruptor endócrino (da Silva et al., 2019; Herrero et al., 2018; Molina-Molina et al., 2013). En estudios *in vitro* se ha demostrado que el BPS es un agonista de ambos RE (ER α y ER β) en seres humanos, además del AR (Molina-Molina et al., 2013). Los estudios para evaluar la disrupción endócrina después de una exposición al temefos son muy limitados, ya que no se consideraba un efecto potencial, solo hay reportes de que el temefos causa problemas en la fertilidad masculina, afectando la movilidad espermática y la tasa de fertilización y desarrollo del embrión (Kim et al., 2020). Así mismo, en estudios de ratas gestantes expuestas al BPS se observó un cuadro de hipotrigliceridemia e hipertiroxinemia en la descendencia masculina al destete, mientras que las hembras presentaron un nivel elevado de 1,25-dihidroxitamina D (1,25-diOH-vitD) (da Silva et al., 2019). Posteriormente, en la edad adulta ambos sexos presentaron una menor ingesta de alimento, alteraciones en el metabolismo y almacenamiento de lípidos y problemas cognitivos; además, las ratas madre presentaron alteraciones en la cantidad de hormonas sexuales y tiroideas. La formación del BPS en los mamíferos a partir del metabolismo del temefos ya se había reportado previamente desde los primeros estudios (Blinn, 1969) y fue comprobado recientemente (Verdín-Betancourt et al., 2021). Por lo tanto, esta ruta de desfosforilación no es tan segura para la desintoxicación del temefos.

La segunda vía más probable fue la oxidación del azufre central que da origen al sulfóxido (Tem-SO) y a la sulfona (Tem-SO₂), se cree que la formación del sulfóxido es casi inmediata en el ambiente y que es uno de los compuestos mayoritarios en las primeras horas después de su aplicación (Kamel et al., 2009; Lacorte y Barceló, 1995). En los resultados obtenidos en este estudio se detectó una discordancia entre los obtenidos con MU, XS y W2D. Los resultados de MU y XS indican que cuando ya ocurrió la primera oxidación del azufre central, la segunda tiene una menor probabilidad (0.2 a 0.06 y 0.46 a 0.23, respectivamente), mientras que W2D muestra que la probabilidad de la segunda oxidación aumenta (de 0.68 a 0.98) (Tabla 4). Esta discordancia es muy relevante porque si la segunda oxidación del azufre central es más probable respecto a la primera, el consumo de Tem-SO por medio del agua tendría un efecto estimulador de su propio metabolismo, favoreciendo así el metabolismo oxidativo y, en consecuencia, la formación de

compuestos potencialmente más tóxicos. Esta aseveración está de acuerdo con lo recientemente publicado, donde los metabolitos del temefos con mayor grado de oxidación son inhibidores más potentes de la actividad de la AChE eritrocitaria humana (Verdín-Betancourt et al., 2019). Sobre esta misma vía, los resultados indican una probabilidad baja para la formación de oxones en el metabolismo humano. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que estos metabolitos oxidados ya fueron generados en el ambiente, y por las condiciones de potabilización del agua, por lo que son ingeridos junto con el compuesto padre por la población residente en las zonas endémicas de dengue después del uso y aplicación del temefos (Kamel et al., 2009; Lacorte et al., 1996).

4.1.1.1 Metabolismo del temefos mediado por el CYP

La formación de oxones mediante la desulfuración oxidativa de los OPT es la reacción principal para producir la inhibición de la AChE (Muthusamy et al., 2013). Los CYPs son enzimas implicadas en este paso de bioactivación de los OPT para causar los efectos tóxicos característicos de este grupo de plaguicidas (Buratti et al., 2007). Los CYPs participan en el metabolismo de más de 90% de los compuestos que actualmente se encuentran en el mercado (Guengerich, 2006; Nebert y Russell, 2002). En los primeros resultados obtenidos en el desarrollo este trabajo, usando los softwares MU y “Reactive Atom”, se encontró que la desulfuración oxidativa para la formación de los oxones tenía una probabilidad baja. Ante esta situación se decidió usar softwares que únicamente evalúan el metabolismo mediado por CYPs, tales como XS y Glory. Estos softwares tienen la ventaja de que fueron desarrollados principalmente para evaluar cuáles isoformas del CYP son las encargadas del metabolismo de cualquier sustrato con base en su afinidad y cuáles son los átomos más propensos a sufrir la reacción catalizada por ellos. Esto quiere decir, que no importa la molécula que se coloque en el servidor, éste buscará cuál es la reacción más probable y las isoformas que potencialmente podrían llevarlo a cabo, sin tener en cuenta la afinidad real (Matlock et al., 2015; Zaretski et al., 2013). Para verificar la afinidad de los CYPs, por el temefos y sus metabolitos, se usó el servidor PASS Online (Tabla 5).

En los resultados del presente trabajo se observó que hay diferencias relevantes en la probabilidad de que el temefos y sus metabolitos puedan ser tomados como sustratos por los CYPs (Tabla 5). Los compuestos con un grupo tiofosfato tienen una mayor probabilidad de ser

tomados como sustratos, respecto a los que ya tienen un grupo oxón, incluso los que tienen ambos grupos oxón no muestran probabilidad de ser sustratos de los CYPs. Esto indica que la depuración del temefos mediante las reacciones de *O*-desalquilación prácticamente no ocurre, adicionalmente se puede decir que los CYPs participarán principalmente en la bioactivación del temefos de forma similar a como se ha descrito para otros OPT (Buratti et al., 2007). También se observó que la presencia del sulfóxido influye negativamente en la probabilidad de ser sustrato de los CYPs, lo que sugiere que la ingestión de compuestos oxidados del ambiente podría disminuir la probabilidad de que se forme el oxón y, por lo tanto, la toxicidad colinérgica. Por lo tanto, esta propuesta se debe probar experimentalmente en estudios posteriores.

La bioactivación del temefos mediada por los CYPs exhibió la probabilidad más baja según las predicciones computacionales, lo que contrasta con lo reportado a partir de los ensayos *in vivo* sobre la biotransformación de otros OPT para formar sus respectivos oxones (Buratti et al., 2007). Los estudios *in vitro* utilizando microsomas hepáticos humanos (HLM) han demostrado que el CYP3A4 está involucrado en la *S*-oxidación de los OP con segundo azufre oxidable, y que los CYP2B6 y 2C19 son las principales isoformas que participan en la bioactivación del CPF y diazinón (Kappers et al., 2001; Tang et al., 2001). En el metabolismo del CPF, el CYP2B6 exhibió una tasa alta en la desulfuración oxidativa, por el contrario, el CYP2C19 cataliza principalmente la reacción de desarilación y el CYP3A4 cataliza ambas reacciones (Tang et al., 2001). De acuerdo a los datos obtenidos de la base de datos ToxCast de la EPA, los estudios *in vitro* muestran que el temefos regula la actividad catalítica de los CYP2C9, 2C19, 1A2 y 3A5, pero no hay datos disponibles sobre el CYP2D6, 2B6 o 3A4 (U.S. EPA, 2020). En conjunto, estos resultados sugieren que los CYP2C9, 2C19, 3A4 y 2D6 podrían ser las principales isoformas involucradas en el metabolismo del temefos, tal como ocurre con otros OPT (Buratti et al., 2007). No obstante, es importante considerar que la contribución de cada isoforma del CYP en la biotransformación del temefos es relativa, lo que significa que en una exposición *in vivo* la participación real de cada CYP depende de varios factores internos y externos que regulan la expresión de los propios CYPs, así como de la presencia de polimorfismos, la afinidad y la concentración del temefos y sus metabolitos en el hígado y en otros órganos (Seliskar y Rozman, 2007).

Los resultados sobre el metabolismo del temefos realizados únicamente con softwares específicos para las reacciones catalizadas por los CYPs muestran que la línea de metabolismo será principalmente oxidativa (Figura 6). Esta ruta es contraria a lo encontrado en este trabajo cuando se consideran todas las enzimas y reacciones posibles de un sistema fisiológico, donde la ruta principal es la de desfosforilaciones (Figura 12); sin embargo, aunque parezcan propuestas contradictorias, en realidad son complementarias. Los CYPs son enzimas muy promiscuas, su sitio de unión es grande y flexible lo que permite la unión de moléculas de muy diversa estructura y pueden catalizar reacciones muy variadas (Ekroos y Sjogren, 2006). Con base en los resultados obtenidos y la información descrita en la literatura se puede concluir que los CYPs si pueden catalizar la bioactivación del temefos, ya que la probabilidad para otras reacciones es muy baja y una vez bioactivados disminuyen fuertemente su probabilidad de ser sustratos de los CYPs. No obstante, en un sistema donde, además de los CYPs, está presente toda la maquinaria enzimática de un organismo y existirá una competencia por el o los sustratos entre las CE y las MOF (principalmente para la S-oxidación) y el resto de las enzimas, puede disminuir la participación de los CYPs. Este efecto se puede observar en que en los individuos donde los CYPs estén sobre-expresados, su participación aumentaría la ruta oxidativa del temefos favoreciendo la formación de compuestos más oxidados como el Tem-dox-SO₂, el cual es un potente inhibidor de la AChE (Verdín-Betancourt et al., 2019). Un ejemplo lo representa la inducción de CYPs por xenobióticos, éste es un problema común que no es deseable para los fármacos, ya que disminuyen su vida útil en el cuerpo debido a un aumento en su biotransformación y aclaramiento; en el caso de los OPT tampoco es deseable el metabolismo por CYPs porque inducen la bioactivación generando más metabolitos tóxicos (Kiametis et al., 2017; Lin, 2006). Desde otro enfoque, si se inhiben las CE y la PON1, esto provocaría una mayor participación de los CYPs causando efectos colinérgicos similares a una sobre expresión de CYPs. Tal como se ha observado cuando la exposición crónica a OP causa una inhibición de las esterasas, lo que propicia un aumento la toxicidad de estos compuestos (López-Flores et al., 2009; Murphy et al., 1972; Singh et al., 2011b). Se requieren estudios adicionales tanto experimentales como computacionales para esclarecer cual es el papel del estado metabólico del individuo y saber cuáles podrían ser los efectos tras la exposición a

temefos. Con estos conocimientos se podría generar un perfil metabólico de las personas que son más susceptibles a los efectos de temefos.

Para tener un punto de comparación de los resultados obtenidos en el presente trabajo a partir de los estudios *in silico* para el temefos, se realizaron estudios predictivos para compuestos que han sido estudiados experimentalmente. De esta manera, se corroboró qué tan precisas son las predicciones obtenidas para el temefos. Los modelos ya han sido validados en su proceso de publicación, (Silva et al., 2015; Walczak et al., 2010). Sin embargo, el poder predictivo puede variar de un grupo a otro de compuestos químicos, por lo que para evaluar su efectividad en el grupo de los organofosforados se realizaron predicciones con 3 OP ampliamente conocidos en cuanto a su toxicidad y biotransformación (CPF, diazinón y paratión). Los resultados obtenidos para estos plaguicidas muestran que tienen una mayor probabilidad de ser sustratos de los CYPs respecto al temefos (Tabla 7). Como se discutió anteriormente, los CYPs son clave en la bioactivación de los OPT para ejercer el efecto tóxico, pero en el caso del temefos se observó una probabilidad baja respecto a los otros OPT. Si el temefos tiene una probabilidad menor de ser tomado como sustrato por los CYPs, y si presenta una probabilidad menor de formar el oxón, entonces, la toxicidad colinérgica asociada se vería reducida. Por lo tanto, esta baja probabilidad podría ayudar a explicar la toxicidad aguda baja reportada para el temefos y de ahí su recomendación para que se siga usando hasta la fecha, incluso en agua destinada al consumo humano (WHO, 2009). Estos resultados indican que se deben realizar estudios experimentales de afinidad por medio de ensayos enzimáticos para aclarar esta discrepancia y comprobar si el temefos y sus metabolitos realmente no son buenos sustratos de los CYPs, y de esta manera validar estos estudios de predicción metabólica.

Los resultados obtenidos sugieren que es probable que la presencia de dos grupos fosfato en su estructura disminuya la afinidad para ser metabolizado por los CYPs, por lo tanto, el temefos representaría a una nueva generación de plaguicidas que presenten buena eficacia para combatir plagas, pero con una toxicidad baja en los seres humanos (Reegan et al., 2016). Ya se ha planteado la idea de buscar análogos del temefos, para ser inhibidores de la AChE y poder utilizarlos como tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, en las que se requiere inhibir

a la enzima en una proporción baja (Gholivand et al., 2014). Para todo esto, en diversos estudios de toxicidad colinérgica y no colinérgica sobre el temefos publicados recientemente se ha determinado que este compuesto no es inocuo, sin embargo, si es catalogado como de toxicidad baja. Al generar conocimiento sobre los mecanismos de acción de él y sus metabolitos y las razones de su toxicidad baja se podrían plantear análogos que conserven las mejores propiedades y disminuyan su toxicidad.

La ruta metabólica de fase I del temefos propuesta en este estudio *in silico* representa la primera propuesta para determinar cuáles metabolitos se podrían formar y pueden encontrarse en la población expuesta al temefos, así como cuáles enzimas están involucradas en esta biotransformación. Esta ruta metabólica es similar, aunque también presenta algunas diferencias, a la descrita recientemente en la rata (Verdín-Betancourt et al., 2021), ya que comparten varios de los metabolitos intermediarios y se llega a los mismos productos finales. En ambas rutas ocurre la formación de oxones, dioxones, sulfóxidos y sulfonas. Por lo tanto, la mayoría de los metabolitos pueden estar involucrados en el desarrollo de una amplia variedad de efectos tóxicos, con base en sus mecanismos de acción similares en ambas especies. Una de las diferencias importantes es que en este estudio se proponen las enzimas que podrían participar en la mayoría de las reacciones, tales como diferentes isoformas del CYP, CE y la PON1, mientras que en estudios preliminares solo se ha propuesto la participación de los CYP2B1/2 y 3A en algunas de las reacciones en la rata como fue determinado en un ensayo *in vitro* usando microsomas hepáticos (Hernández-Estéris, 2020). Sin embargo, ambas rutas propuestas son complementarias a pesar de las diferencias entre especies y algunos metabolitos podrían ser monitoreados en los seres humanos con base en su toxicocinética determinada en la rata (Verdín-Betancourt et al., 2021).

4.1.2 Metabolismo de fase II

Los resultados sobre el metabolismo de fase II muestran que la glucuronidación es la reacción más probable en los seres humanos (Tabla 8), y siempre se lleva a cabo en los grupos hidroxilo (-OH) de los metabolitos generados por las reacciones de desfosforilación. Estos resultados coinciden parcialmente con el único reporte descrito en la literatura en el que se han identificado

a los productos conjugados del metabolismo de fase II del temefos en ratas macho adultas tratadas con una sola dosis del larvicida (Blinn, 1969). En este estudio se mostró que la mayoría de los compuestos que se encuentran en la orina están conjugados con sulfato. Es bien conocido que hay diferencias interespecie entre el metabolismo de seres humanos y ratas para algunos xenobióticos, y el temefos puede no ser la excepción; sin embargo, no se puede tener la certeza de que no ocurra la sulfatación en seres humanos. Los resultados obtenidos con el software MU indican que la sulfatación tiene una probabilidad baja de que ocurra ($P = 0.079$) y con los software XS y RA no se presentaron como una opción debido a la falta de datos disponibles para generar un algoritmo confiable (Matlock et al., 2015; Poroikov et al., 2007). En este caso se requiere de una base de datos más amplia para poder construir más y mejores algoritmos que permitan hacer las predicciones más confiables sobre el metabolismo de compuestos de interés, como en este caso el temefos.

4.1.3 Limitaciones en la predicción *in silico* sobre la biotransformación del temefos

Este estudio *in silico* es la primera aproximación para caracterizar la vía de biotransformación del temefos en los seres humanos y determinar qué metabolitos probablemente se forman y podrían encontrarse en la población expuesta, además de cuáles enzimas están probablemente involucradas. Sin embargo, existen algunas limitaciones que son difíciles de resolver en los estudios *in silico*, y están relacionados principalmente a la cantidad de variables que se pueden incluir en cada algoritmo. Estas limitaciones incluyen algunos aspectos relacionados con la cinética enzimática y parámetros toxicocinéticos, además de la interacción del temefos con otras moléculas en las coexposiciones, que es como realmente ocurre; o bien diversas condiciones fisiopatológicas que alteren el metabolismo basal. Otros aspectos que no se abarcaron en este estudio, pero que pueden estimarse con otras técnicas, son el efecto que tienen las exposiciones crónicas y los polimorfismos de las enzimas del metabolismo. Por ejemplo, López-Flores et al. (2009) reportaron que la exposición crónica a los OP causa un agotamiento de la actividad de la PON1, esto exagera los efectos colinérgicos asociados con la formación de oxones. En el mismo sentido, un polimorfismo de la PON1 modula la magnitud del daño del ADN causado por la exposición a OP, como se ha descrito para otros OPT como el CPF, paratión, forato y fonofos (Abass et al., 2009; Rojas-García et al., 2009; Singh et al., 2011c). Todos estos factores podrían

modificar el aporte de cada reacción y cambiar la proporción final de los metabolitos formados. La ruta de biotransformación propuesta en este trabajo es como un mapa en el que se describen diversas vías, si una ruta se ve afectada, existen otras que se magnificarán y serán reacciones más probables.

Los softwares que se utilizaron para la predicción del metabolismo también presentaron algunas discrepancias importantes e incluso errores que se tuvieron que corregir. Uno de los primeros conflictos fue unificar las reacciones que cada servidor arroja, el caso más evidente fue para la desfosforilación, que en RA y MU es considerada como hidrólisis, pero es una reacción conocida como desfosforilación oxidativa o como *O*-desalquilación cuando se lleva a cabo por los CYPs. En este caso, se decidió usar el término desfosforilación en todo el escrito debido a que es el nombre más común usado en la literatura al respecto (Buratti et al., 2007). Otro punto a tener en cuenta es que cada software solo puede tener un punto final (*endpoint*) diferente y aunque sea similar podría llevar a numerosos falsos positivos (Yousefinejad y Hemmateenejad, 2015). Tal es el caso de los predictores del SOM, los softwares como XS, SOMP y Fame2 que permiten hacer predicciones sobre cuál sería el átomo que tendría una reacción catalítica si la enzima lo tomara por sustrato, sin embargo, no hace un sondeo de la afinidad de la enzima por el sustrato general. La deficiencia radica en el propio funcionamiento del software; se ha hecho un punto de comparación entre las reacciones que normalmente se metabolizan por la enzima y se hace un símil en el compuesto de estudio (Matlock et al., 2015; Zaretski et al., 2013). Por esta razón, es recomendable ampliar la cantidad de softwares que se utilicen para predecir un mismo punto final, y si es posible, usar un software como PASS online para saber cuál es la probabilidad de que la enzima tome por sustrato a la molécula de estudio. Solo entonces, cuando se ha probado que cumple con las características de ser sustrato es recomendable usar otros servidores para predecir las posibles reacciones y metabolitos que se formarán.

4.2 Propiedades fisicoquímicas y solubilidad del temefos y sus metabolitos

Las propiedades fisicoquímicas de los compuestos nos dan información sobre su comportamiento en sistemas fisiológicos, su interacción con el medio acuoso y con macromoléculas (Leo et al., 1969). Para tener una idea de los parámetros adecuados que deben

tener las moléculas, se tomaron en cuenta las leyes de Lipinsky en su versión mejorada por Ghose et al. (1999). Las moléculas que tienen una absorción intestinal buena e interacción buena con macromoléculas tienen un PM entre 160 y 500 g/mol; en el caso del temefos se observa que la molécula más pesada es el Tem-SO₂ con un PM de 498.4 g/mol y la más pequeña es el TDF con un peso de 218.2 g/mol, así que tanto el temefos como sus metabolitos tienen un peso dentro de los intervalos adecuados.

La cantidad de donadores (átomos de nitrógeno y oxígeno con al menos un átomo de hidrógeno) y aceptores (átomos de nitrógeno, oxígeno o flúor) de puente de hidrógeno nos permite evaluar la posibilidad de las interacciones que se formarán entre el compuesto y las macromoléculas; los puentes de hidrógeno estabilizan las interacciones en el sitio de unión y permiten orientar la molécula para la catálisis (Chen et al., 2016). De acuerdo con las Leyes de Lipinsky, las moléculas no deben tener más de cinco donadores de puentes de hidrógeno ni más de 10 aceptores. En los resultados del presente trabajo se observó que solo los -OH disponibles después de la desfosforilación pueden funcionar como donadores de puentes de hidrógeno, y se tiene como máximo dos en los compuestos didesfosforilados. En el caso de los aceptores de puentes de hidrógeno vemos que tienen desde dos hasta 10, en particular para el Tem-dox-SO₂ que puede formar hasta 10 puentes en caso de macromoléculas que sean prioritariamente donadoras. Una propiedad relacionada a lo anterior es el Kow, para el cual los resultados del temefos y sus metabolitos indican que todos son liposolubles, lo que favorece una tendencia para acumularse en el tejido graso. Este resultado ha sido recientemente comprobado de forma experimental en ratas, en las cuales el temefos mostró una acumulación preferente en el tejido adiposo, así como de otros metabolitos (Verdín-Betancourt et al., 2021). Los análisis de las propiedades físico-químicas descritas en este estudio indica que el temefos y sus metabolitos tienen una afinidad mayor por proteínas que tienen un sitio de unión hidrofóbico, pero con donadores de puentes de hidrógeno.

Propiedades adicionales a las leyes de Lipinski, como la TPSA y la RM, también se han considerado clave para determinar la interacción con macromoléculas. De acuerdo con las leyes mejoradas de Lipinski, los valores de la RM se deben encontrar entre 40 y 130 m³/mol, mientras que la TPSA

entre 100 y 150 Å² para ejercer una actividad biológica de forma efectiva. Los resultados de este estudio indican que el temefos y todos sus metabolitos están dentro de los valores adecuados para ejercer efecto biológico en cuanto a la RM, ya que nos indica la polarizabilidad de la molécula. Por otra parte, respecto a la TPSA se puede observar que el temefos y sus metabolitos Tem-oxón-SO, Tem-SO, Tem-SO₂, Tem-oxón-SO₂ y Tem-dox-SO₂ tienen una superficie de interacción mayor a 150 Å², lo que indica una capacidad limitada para atravesar las membranas celulares para estos compuestos, aunque en complemento con el PM y el Kow podría considerarse que si son capaces de pasar las membranas celulares. Todos estos parámetros han sido utilizados principalmente en la generación de fármacos, pero también se pueden utilizar desde el punto de vista toxicológico para evaluar la viabilidad de un xenobiótico para causar su efecto tóxico en un organismo.

La solubilidad en agua es un parámetro que engloba propiedades fisicoquímicas como el Kow y la TPSA. Para su determinación se utilizaron tres algoritmos diferentes y los resultados fueron congruentes en que el metabolismo oxidativo aumenta la solubilidad del compuesto, propiciando que esté mayormente disponible en soluciones acuosas como el plasma y el citoplasma celular (**Tabla 10**). Sin embargo, en el caso de los derivados fenólicos (TDF, TDF-SO y TDF-SO₂), mientras que la hidrólisis de los grupos fosfato disminuyen su solubilidad, lo que podría asociarse a una tasa de excreción menor, la disponibilidad del grupo -OH permite el metabolismo de fase II y que las moléculas puedan excretarse más fácilmente después de la conjugación. En un sistema en el que el metabolismo de fase II se vea inhibido, los compuestos hidrolizados no serían eficientemente excretados, propiciando el metabolismo de TDP a TDF-SO y TDP-SO₂.

4.3 Toxicocinética del temefos y sus metabolitos

La toxicocinética es un área en la que la toxicología computacional tiene todavía algunas limitaciones y pocas aplicaciones, se pueden generar diversos modelos compartamentales, pero se requiere de datos experimentales para partir y empezar a crear los modelos, los cuales para el temefos son limitados y recientes para que hayan sido incluido en estas plataformas (Raies y Bajic, 2016). Los algoritmos disponibles son para pruebas de absorción e interacción con proteínas que participan en la absorción y excreción; con esta información no se pueden calcular parámetros como la $t_{1/2}$ y tasa de aclaramiento, entre otros, pero nos permite tener una idea de lo que

ocurrirá con el compuesto en el medio fisiológico (Cheng et al., 2012). En los resultados obtenidos se observó que tanto el temefos como sus metabolitos se absorben fácilmente en el intestino y atraviesan la barrera hematoencefálica, lo que implica que los derivados oxidados que se están formando en el ambiente como productos de la fotocatalisis y el metabolismo bacteriano pueden ingresar al cuerpo humano e incluso llegar al cerebro para tener un efecto como inhibidores de la AChE (Buratti et al., 2007; Kamel et al., 2009; Lacorte et al., 1995; Lacorte y Barceló, 1995). El Log Kp es una medida de la permeabilidad dérmica de los compuestos, donde entre más negativo sea el valor hay una menor permeabilidad dérmica (Daina et al., 2017). En los resultados de este estudio se observó que el compuesto que tiene una probabilidad mayor de permeabilidad dérmica es el temefos, lo que representa un alto riesgo para los aplicadores de los plaguicidas, ya que son éstos los que están expuestos al compuesto padre directamente.

4.4 Toxicodinamia del temefos y sus metabolitos

Actualmente hay cierta discrepancia acerca de la toxicidad del temefos. Mientras que la OMS lo considera de toxicidad baja en exposiciones agudas y sigue recomendando su uso, la EPA lo clasifica como un tóxico sistémico y ha prohibido su uso en los EUA (US EPA., 2020; WHO, 2009). Se debe realizar una caracterización toxicológica del temefos y sus metabolitos cumpliendo con los requerimientos de calidad para tener resultados confiables y actuales.

Los parámetros de NOAEL y LOAEL para el temefos han sido establecidos con base en los estudios de inhibición de la AChE (Gaines et al., 1967; WHO, 2009). Una de las ventajas de la toxicología computacional es que puede hacerse un perfil toxicológico muy completo de manera general, evaluando aspectos variados de la toxicología en una misma prueba (Yang et al., 2019). Además, se puede hacer la evaluación del potencial toxicológico de metabolitos que en condiciones experimentales podría no ser viable por la reactividad alta, como es el caso de los derivados con oxones de los OPT (Buratti et al., 2007). Las predicciones computacionales permiten crear hipótesis para realizar estudios experimentales dirigidos a un punto específico, o bien para evaluar procesos que de forma experimental son inviables, como es la toxicidad en seres humanos.

Actualmente hay una gran cantidad de opciones disponibles para evaluar la toxicidad de compuestos orgánicos. Las predicciones se realizaron con dos metodologías diferentes, la primera consistió en utilizar predictores basados en modelos QSAR y la segunda fue basada en ensayos de interacción (*docking*) con las proteínas AChE, PXR y CAR. Existen dos diferencias fundamentales entre estas técnicas. La primera es una predicción de un valor basado en un algoritmo que compara el compuesto de estudio con una base de datos experimentales y arroja un valor del parámetro que se está evaluando (Gozalbes et al., 2014). El segundo método se basa en mecánica estadística, donde se coloca el compuesto de estudio con una proteína con la que se desea evaluar la actividad y se someten a un campo de fuerza que tiene parámetros para cada uno de los átomos y se realizan cálculos basados en leyes físicas (Jo et al., 2014). En el primer caso se debe tener una base de datos de comparación, mientras que en el segundo caso todo se basa en cálculos de leyes físicas para predecir el comportamiento de las moléculas.

4.4.1 Predicción de toxicidad basada en modelos QSAR

Los resultados de estos análisis en modelos QSAR sobre el temefos y sus metabolitos nos muestran que no causan mutagenicidad por medio de la prueba de Ames, pero seis de sus metabolitos si pueden causar carcinogenicidad y solo uno no causa formación de micronúcleos (Tabla 12). Estos resultados están parcialmente de acuerdo con lo descrito en la literatura. La exposición al temefos causó un daño irreversible al DNA de células HepG2 a una concentración de 10 μM , también se observó daño genético en células de médula ósea de ratón y en otro estudio resultó ser genotóxico y mutagénico utilizando una concentración de 1.34 μM en tres ensayos diferentes (Benitez-Trinidad et al., 2015; Fortes-Aiub et al., 2002; Mélo et al., 2008). En un estudio en trabajadores ocupacionalmente expuestos se encontró que presentaban daño genético, sin embargo, en este estudio se reporta que el efecto podría deberse también por la exposición a malatión y CPF, además del temefos (Singh et al., 2011a). En este mismo sector de la población se ha encontrado que hay cambios en el patrón de metilación debido a la exposición a plaguicidas (Benitez-Trinidad et al., 2018). Estudios con otros OP han mostrado que la exposición a este tipo de compuestos causa genotoxicidad y el posible mecanismo es la producción de ROS como producto de su metabolismo (Ojha y Srivastava, 2014). Sin embargo, existen algunas evidencias de que el temefos no es genotóxico, de acuerdo a un reporte de la

OMS con base en estudios realizados *in vivo* e *in vitro* (WHO, 2009). En el mismo sentido, en un estudio más reciente también se reportó que el temefos no es citotóxico, pero si tiene efectos genotóxicos (Cobanoglu y Cayir, 2020).

Sobre el resto de los parámetros de toxicidad del temefos, destaca que todos los metabolitos y el compuesto padre pueden causar hepatotoxicidad (Tabla 12). Algunos de los compuestos pueden causar corrosión e irritación ocular, no obstante, no es la principal vía de exposición y los compuestos con actividad son los dihidrolizados principalmente; de acuerdo a la literatura, los derivados dihidrolizados no se forman ni en el agua clorada ni en el ambiente, por lo que no hay riesgo por esta vía de exposición, estos compuestos solo se forman como producto del metabolismo de mamíferos (Blinn, 1969; Kamel et al., 2009; Lacorte et al., 1995; Verdín-Betancourt et al., 2021). La hepatotoxicidad es una hipótesis que fue descartada por la OMS, a pesar de que encontraron algunos resultados sobre la hepatotoxicidad en conejos, pero reportaron que no se observó ninguna evidencia de hepatotoxicidad a 30 mg/kg de peso (WHO, 2009). Los estudios de la OMS no son concluyentes, ya que no se publican muchos detalles de las pruebas. Lamentablemente tampoco hay estudios disponibles en la literatura que reporten si el temefos tiene la capacidad de producir hepatotoxicidad en mamíferos; solo hay un estudio en peces en el que se muestra que si hay cambios estructurales, acumulación de lípidos de forma extracelular e intracelular, e incluso necrosis (Ba-Omar et al., 2013). En el mismo sentido, estudios preliminares de nuestro laboratorio han mostrado una disminución del peso relativo del hígado y un aumento de la concentración de triglicéridos y de las bilirrubinas séricas (Hernández-Estéris, 2020; Ramos-Flores et al., 2021). Todo esto sugiere la necesidad de llevar a cabo estudios experimentales para evaluar la hepatotoxicidad del temefos, particularmente sobre el metabolismo, ya que una exposición crónica que altere el metabolismo de lípidos puede causar enfermedades crónico-degenerativas que no serán ligadas a la exposición a plaguicidas.

Utilizando las mismas herramientas de base QSAR se determinó que el temefos y sus metabolitos pueden ser ligandos de la aromatasa y algunos receptores como el RT, así como los RE, RA y RG (Tabla 13). La formación del complejo ligando-receptor no implica la activación de estos receptores, bien podría darse una inhibición o una competencia de sustrato (Yang et al., 2019).

En cualquier caso, la activación o inhibición de estos receptores implica una disrupción endócrina, ya que se activa o inhibe una vía de señalización por un agente externo; en el caso de los RN PPAR, RE, RA y RG, éstos son reguladores maestros del metabolismo energético y hormonal del organismo, y su alteración afectaría una gama amplia de procesos (Gunderson et al., 2001; Kliewer et al., 1998; Timsit y Negishi, 2007). En un estudio realizado en células HepG2 se encontró que la exposición a OP puede modular la actividad del RA, así también, en ratas tratadas se han observado alteraciones sobre la modulación de este receptor (Altamash et al., 2020; Mnif et al., 2011; Tamura et al., 2003). No obstante, hay muy pocos estudios sobre el efecto que el temefos puede producir y el efecto de sus metabolitos no se ha abordado aún.

Anteriormente, en la sección del metabolismo, se mostró que el temefos y sus derivados no oxidados tienen probabilidad alta de ser sustrato de los CYPs, sin embargo, también pueden ser inhibidores de estas enzimas del metabolismo. El temefos y algunos de sus metabolitos son potenciales inhibidores de los CYPs, específicamente de las isoformas 1A2, 2C19, 2C9 y 3A4 (Tabla 13). Para esta prueba se utilizaron dos plataformas que tienen el mismo punto final, la inhibición de CYPs, sin embargo, su base de datos y algoritmos son diferentes; en algunos casos los resultados coinciden, pero en otros se contradicen, dejando en evidencia una de las principales limitantes de los estudios computacionales, los errores de predicción (Yamashita y Hashida, 2004). El CYP1A2 es el que presentó más contradicciones, con un total de 9, seguido del CYP3A4 con 6, CYP2C9 y 2D6 con 3 y el 2C19 con 2. La concordancia de los resultados entre los softwares depende de la robustez de la base de datos y el poder predictivo de su algoritmo; entre más grandes sean las bases de datos que se emplean, existe un mejor punto de referencia para entrenar al algoritmo (Yamashita y Hashida, 2004). Sin embargo, también diferentes algoritmos pueden variar en su poder predictivo dependiendo de los descriptores moleculares a los que les da más peso, y el método mismo de clasificación (Daina et al., 2017; Gozalbes et al., 2014; Raies y Bajic, 2016). En este caso es recomendable tomar en cuenta los resultados congruentes entre los diferentes algoritmos y sobre ellos construir las hipótesis, nuevamente, una ventaja de utilizar diferentes softwares para hacer las predicciones es que permite detectar estas inconsistencias y tomar ciertas precauciones al respecto (Yamashita y Hashida, 2004).

Tomando en cuenta solo los resultados congruentes, observamos que los CYP2C19 y 2C9 son los que pueden ser inhibidos por una cantidad mayor de derivados del temefos, seguido del CYP3A4 y 1A2 en donde se encontró la cantidad mayor de inconsistencias, y por último, el CYP2D6 que no mostró alguna probabilidad de inhibición (Tabla 13). Con base en los reportes de la literatura para otros OP, se demostró que el fenitrotión es un inhibidor potente de los CYP1A y 2C, y tiene un efecto menor en los CYP2D y 3A, mientras que, el CPF es un potente inhibidor del CYP1A, pero con actividad moderada en los CYP2C y 3A. Por su parte, el diclorvos no mostró efecto para inhibir a los CYPs evaluados (Abdou et al., 2020). En diversos estudios se ha mostrado que los compuestos con el grupo fosforotioato (P=S) tienen la capacidad de inhibir la actividad catalítica de los CYPs, sin embargo, el grado de inhibición varía para cada OPT y cada isoforma que se evalúa, como los casos mencionados anteriormente (Hodgson y Rose, 2006). Por esta razón no se puede descartar o dar por hecho la inhibición de los CYPs, por lo tanto, se debe evaluar la actividad que tienen los diversos metabolitos sobre cada isoforma del CYP.

El temefos y sus metabolitos mostraron que pueden ser inhibidores de los transportadores OATP1B1 y 1B3, además, los metabolitos oxidados son potenciales inhibidores de los transportadores BSEP y MDRP1 (Tabla 13). No hay estudios experimentales del temefos y su interacción con BSEP o MDRP1. Pero estudios en OATP1B1 muestran que el temefos puede inhibir más del 50% su actividad, y también tiene un efecto sobre el OATP2B1 aunque en menor medida (Chedik et al., 2019). En este último estudio también se mostró que temefos inhibe en ~75% la actividad de los transportadores OCT1 y OCT2, y no mostró efecto en MATE1 y MATE2K. Con estos resultados se pretende crear un antecedente que incite nuevos estudios experimentales para determinar los posibles efectos tóxicos que el temefos y sus metabolitos pueden causar en la población debido a la interacción con estos transportadores. El transportador OATP1B1 se encuentra en la membrana sinusoidal del hepatocito, su papel es transportar sustancias entre la sangre y el hepatocito; una inhibición del OATP1B1 induce una alteración de la concentración de fármacos en plasma (Shitara, 2011). La inhibición de los transportadores involucrados en la depuración de xenobióticos causa una interacción medicamentosa que afecta la $t_{1/2}$ del compuesto; de la misma forma, los contaminantes también podrían aumentar su vida media si no hay un metabolismo de fase III activo (Ruiz Gómez et al.,

2002). Es importante conocer cuál es el efecto que tiene el temefos sobre su propio metabolismo y el de otros xenobióticos, cuáles serán las consecuencias en el caso de una co-exposición a otros plaguicidas, que es la situación real cuando se aplica (Buratti et al., 2007; Chedik et al., 2019).

4.4.2 Evaluación de la interacción del temefos y sus metabolitos con la AChE

Las predicciones basadas en simulaciones son el resultado de aplicar fórmulas físicas para predecir el comportamiento de la proteína y el ligando, al conjunto de fórmulas se le denomina campo de fuerza y se enfoca en ciertos parámetros para simular situaciones diversas (Jo et al., 2014). Las simulaciones han mostrado un buen poder predictivo y se utilizan ampliamente en la industria farmacéutica para el diseño de nuevas moléculas con potencial terapéutico (Prieto-Martínez et al., 2018). En este estudio se utilizaron las herramientas VINA y Autodock4 para evaluar los ensayos de interacción entre la AChE y el temefos y sus metabolitos. El software AutoDock4 permite calcular una CI_{50} teórica, sin embargo, cuando se compararon los resultados con los estudios experimentales, éstos no presentaron concordancia (Tabla 14). El cálculo de los parámetros derivados de la energía de afinidad resultante del *docking* se basa en pruebas estandarizadas con otros compuestos que conforman una base de datos similar a la que se describió en los estudios de base QSAR (Morris et al., 2009). Las aproximaciones disponibles no han mostrado un buen poder predictivo para el grupo de los OP y se deben tomar con reserva. Los estudios de predicción aún muestran deficiencias fuertes en su poder predictivo, en este caso los datos de predicción eran mucho menores a los encontrados de forma experimental, es decir, los resultados computacionales arrojaron un falso positivo sobre el potencial inhibitor del temefos y sus metabolitos. El caso más evidente es el del temefos, que de forma experimental se encontró que tenía una $CI_{50} > 20,000$ nM, llegando a la conclusión de que no es un inhibidor de la AChE (Verdín-Betancourt et al., 2019); en cambio, las predicciones computacionales mostraron un valor de CI_{50} de 26 nM. En resumen, no se lograron hacer predicciones que coincidan con lo que se ha encontrado de forma experimental. Los estudios *in silico* son principalmente para generar hipótesis y hacer estudios experimentales dirigidos y mejor enfocados, o bien para comprobar o explicar los hallazgos experimentales (Kirchmair et al., 2015).

La enzima AChE es el blanco principal conocido de los OP, su inhibición causa todos los síntomas característicos de la intoxicación por este tipo de compuestos y de algunos otros plaguicidas (Aardema et al., 2008). El abordaje en este estudio fue a partir del modelo de la proteína de la AChE depositada en el PDB (6NEA). Es bien conocido que el sitio activo de la AChE tiene una triada catalítica que es clave en la inhibición por los OP, ya que se forma un enlace covalente con el grupo -OH de la Ser203 (Cheng et al., 2008). Los resultados muestran que, a un nivel de oxidación del compuesto mayor, hay una energía de afinidad por la AChE mayor (Figura 14). Esto está muy relacionado a la naturaleza de su sitio de unión en el que encontramos donadores de puentes de hidrógeno, y los oxones y los sulfóxidos tienen oxígenos que funcionan como aceptores de hidrógeno para estabilizar a la molécula (Prieto-Martínez et al., 2018). También se observó que los compuestos dihidrolizados tienen una energía de afinidad por la AChE alta, sin embargo, no forman interacciones por puentes de hidrógeno por la ausencia de aceptores de puente de hidrógeno, ya que solo tienen el oxígeno en el sulfóxido y la sulfona; en estos compuestos predominan las interacciones de Van der Waals que estabilizan a la molécula pero no inducen ningún efecto en la AChE (Cheng et al., 2008). Mientras que los resultados de los compuestos de los cuales se conoce su actividad inhibitoria varían entre -8 y -12 kcal/mol, los resultados del temefos y sus metabolitos obtenidos en este estudio se encuentran entre -6.4 y -8 kcal/mol (Figura 14) (Simeon et al., 2016). Esto sugiere que el temefos y sus metabolitos tendrían una probabilidad baja de inhibir a la AChE. En el mismo sentido, haciendo una comparación con los resultados descritos en la literatura sobre la energía de afinidad, el temefos y sus metabolitos mostraron una energía de afinidad baja, lo que fortalecería esta premisa; sin embargo, los resultados obtenidos en ensayos *in vitro* con AChE eritrocitaria humana indican que algunos metabolitos oxidados del temefos como el Tem-dox-SO₂ y el Tem-dox-SO son potentes inhibidores de la AChE (Verdín-Betancourt et al., 2019). Estos resultados dejan de manifiesto que la energía de afinidad, que es el principal parámetro que se obtiene de los modelos de *docking*, tiene una estrecha relación con la Cl₅₀ (Figura 16), donde se observó una correlación buena de la energía de afinidad y la Cl₅₀. No todas las moléculas tienen una relación buena con la Cl₅₀ experimental, los metabolitos asimétricos no presentan esta relación. Estas discordancias indican

nuevamente la necesidad de validar los resultados obtenidos a partir de estudios *in silico*, llevando a cabo estudios experimentales.

Hasta el momento, los datos sobre la inhibición de la AChE en los seres humanos muestran que no hay un efecto asociado al temefos, incluso en una exposición crónica cuando se coloca en el agua de bebida (Laws et al., 1968). No obstante, estos estudios deben revalorarse con las nuevas herramientas disponibles que tienen una mayor sensibilidad e incluir otros parámetros. En este estudio se muestra que el Tem-dox-SO₂ y el Tem-dox-SO pueden generarse en el cuerpo humano, aunque con una probabilidad baja. Aun cuando la concentración que se alcance de estos compuestos sea baja puede ser suficiente para producir un efecto en exposiciones agudas. Por otra parte, hay que considerar que en exposiciones crónicas las enzimas que participan en su depuración, como la PON1 y las CE, son inhibidas por la exposición a algunos OP (Murphy et al., 1972; Sams y Mason, 1999; Wheelock et al., 2005). Por lo tanto, se compromete la vía de depuración del temefos y la vía de activación tendrá un papel más relevante en el metabolismo y la inhibición de la AChE sería más evidente.

Durante los ensayos de *docking* se observó un fenómeno sobre la orientación de la molécula del temefos en el sitio de unión. El temefos es una molécula simétrica, es decir, tiene un eje en el que se pueden distinguir dos partes iguales y en cada extremo se encuentra un grupo tiofosfato que puede metabolizarse a formar un oxón. Cuando una molécula como el temefos, el Tem-dox, el Tem-dox-SO y el Tem-dox-SO₂ entran en el sitio de unión, no hay una preferencia por algún extremo. No obstante, cuando se metaboliza un extremo formando una molécula asimétrica se queda en un extremo el grupo tiofosfato y en el otro el grupo oxón, en este grupo de moléculas asimétricas se observó una preferencia por orientarse con el grupo tiofosfato hacia el interior del sitio de unión. Esta orientación se podría explicar por el elevado valor de la Cl₅₀ encontrada de forma experimental, ya que, si la orientación preferencial es con el tiofosfato orientado al interior, no habría una inhibición causada por el grupo oxón, a menos que ambos extremos hubieran sido metabolizados. Esta última hipótesis tiene una probabilidad baja de ocurrir de acuerdo con nuestros estudios del metabolismo, ya que la formación de las moléculas dioxón es poco probable (figura 11). En conjunto, la probabilidad baja de formar los dioxones, y la afinidad por

orientarse con el tiofosfato hacia el sitio activo podría explicar los pocos efectos de inhibición de la AChE que se han observado en los estudios en seres humanos (Gaines et al., 1967; Laws et al., 1967). Esta hipótesis podría ser una probable explicación a lo que se observó en esos estudios realizados hace muchos años, aún cuando estuvo acompañada de varias limitaciones, y no fueron considerados otros efectos no colinérgicos que de acuerdo con el presente estudio representan un riesgo asociado a la exposición al temefos.

4.4.3 Ensayos de interacción con los receptores nucleares PXR y CAR

La interacción con los RN PXR y CAR se evaluó por la importancia que representan en el metabolismo de xenobióticos, ya que las subfamilias CYP3A y 2B son regulados genéticamente por estos receptores (Kato et al., 2017; Medina-Díaz et al., 2007). A diferencia del análisis de los ensayos de interacción con la AChE, los RN tienen un sitio de unión diferente, PXR y CAR poseen solamente un sitio de unión para xenobióticos hidrofóbicos; es grande y flexible comparado con el sitio de unión de la AChE que es estrecho. Estas características del gran tamaño del sitio de unión así como su flexibilidad le permiten tener un gran número de ligandos que se le pueden unir (Timsit y Negishi, 2007). Se han encontrado diferencias en la secuencia de aminoácidos en el sitio de unión del PXR, indicando que esta proteína tiene un índice alto de mutación y divergencia (Handschin et al., 2004). Por su parte, el sitio de unión de CAR tiene solo pequeñas zonas conservadas entre el ser humano y el ratón, lo que también indica un alto índice de mutación (Choi et al., 1997). La gran variabilidad de estos receptores dificulta la interpretación de los ensayos de *docking*, ya que no hay una activación descrita, y la energía de afinidad obtenida en los ensayos no necesariamente se refleja como activación de la molécula. Por otro lado, PXR y CAR tienen diferentes ajustes inducidos, es decir, una posición diferente de un ligando podría inducir un cambio conformacional en PXR y CAR, pero no necesariamente una activación (Jones et al., 2000; Shan et al., 2004).

Una consideración adicional es que no hay una triada catalítica o aminoácidos clave de interacción. El dominio de unión a ligando de PXR (PXR-LBD) está conformado por 28 aminoácidos que son capaces de interactuar para formar complejos con el ligando, de los cuales 20 son hidrofóbicos (Watkins et al., 2002). Sin embargo, en todos los modelos obtenidos por

cristalografía de Rayos X se observa que un ligando interacciona con máximo 19 aminoácidos (Watkins et al., 2003; 2002; Xue et al., 2007). Un mismo ligando puede unirse en diversas orientaciones, por ejemplo, el SR12813 es capaz de unirse al PXR en tres diferentes orientaciones (Watkins et al., 2002). Se ha propuesto que esta capacidad es gracias a los ocho aminoácidos polares que están distribuidos en el sitio de unión, los cambios de distribución o de tipo de aminoácidos es lo que determina las respuestas que tienen diferentes especies a un mismo compuesto (Ngan et al., 2010). Además de la capacidad de interaccionar con diferentes aminoácidos, el sitio de unión de PXR tiene la capacidad de expandir su volumen para facilitar la interacción con moléculas más grandes, esta capacidad es gracias al movimiento de una línea de 28 residuos, de los cuales seis pueden interactuar con el ligando: Met243, Ser247, Gln285, Trp299, His407 y Phe420 (Orans et al., 2005). Un caso bien estudiado es el de la rifampicina, que es tan grande que interactúa con dos residuos adicionales: la Ser208 y la Arg410 (Chrencik et al., 2005). Esta región flexible del PXR humano tiene los aminoácidos 309 al 321 y puede reestructurarse reemplazando a la α -hélice 6 y permitir la unión de ligandos de varios tamaños como hiperforina, rifampicina y el SR12813 (Watkins et al., 2002). En el caso del CAR no está muy clara su flexibilidad, de hecho, a partir de estudios de cristalización se ha hipotetizado que requiere rigidez estructural para interactuar correctamente con los co-reguladores en la región AF-2 (Timsit y Negishi, 2007). Se conoce que uno de los principales componentes en la capacidad de respuesta del CAR es la hélice 12/AF-2 (aminoácidos 350-358) que medía los efectos represores del androstenol en la actividad transcripcional en el caso del ratón, sin embargo, no ocurre lo mismo en seres humanos (Kawamoto et al., 2000).

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que el PXR es activado principalmente por los metabolitos oxidados del temefos, lo que indica que son potenciales inductores de las isoformas de la subfamilia CYP3A. En contraparte, los metabolitos dihidrolizados tienen una mejor energía de afinidad por el receptor CAR, lo que induciría la expresión de los CYP2B (Figura 17). Existen evidencias de que la exposición a algunos OPT induce la expresión de CYPs (Buratti et al., 2007). No obstante, en el caso del temefos y aun en roedores esta información es controvertida. Mientras que Ennin y Franklin (1979) reportaron un incremento en la concentración de CYP total hepático, Ferguson et al. (1985) reportaron que el temefos produce la inhibición de las

monooxigenasas hepáticas, pero no induce la expresión del CYP total en el hígado. Algunos resultados preliminares obtenidos por nuestro grupo de trabajo indican la inducción de las isoformas CYP3A y 2C en ratas expuestas a 50 mg/kg/d por 3 d, pero no se modifica la concentración del CYP total (Hernández-Esteris, 2020). Los resultados no son concluyentes para el temefos, ya que se desconoce aún mucha información sobre el mecanismo de activación de estos RN y como su ajuste inducido regula la expresión genética diferencial (Chai et al., 2016; Torimoto-Katori et al., 2017). Por lo tanto, es necesario realizar más estudios al respecto para determinar si hay efecto dependiente de la dosis y del tiempo de exposición al temefos.

5. Conclusiones

1. Con base en las predicciones computacionales se ha hecho una propuesta de la ruta de biotransformación del temefos en los seres humanos, en la que se describe la formación de 19 posibles metabolitos intermediarios a partir de tres reacciones consecutivas de biotransformación de fase I: desfosforilación, desulfuración oxidativa y S-oxidación.

2. Los CYP2B6, 2C9 y 2C19 son las principales isoformas del CYP involucradas en el metabolismo del temefos y los CYP3A4 y 2D6 también participan, pero con una contribución menor. La principal reacción que realizan los CYPs es la desulfuración oxidativa, pero la isoforma CYP2C9 realiza principalmente la S-oxidación del azufre central del temefos.

3. Las CE y la PON1 también participan en la biotransformación del temefos, particularmente en las reacciones de desfosforilación de los metabolitos con grupos oxón y las esterasas en la hidrólisis del grupo tiofosfato (P=S).

4. Se plantearon dos vías de metabolismo que pueden ocurrir de manera simultánea, la primera, mediada por los CYPs, en las reacciones de desulfuración oxidativa para formar oxones, la cual está asociada con la generación de efectos tóxicos tipo colinérgicos; y la segunda, mediada por las CE y la PON1, en reacciones de desfosforilación para formar compuestos disponibles para el metabolismo de fase II para su posterior eliminación.

5. El metabolismo de fase II del temefos solo es viable en los grupos hidroxilo (-OH) resultantes de las reacciones de desfosforilación. La principal reacción de fase II es la glucuronidación, aunque también es posible la sulfatación y glutatiónación, pero con una probabilidad baja.

6. La evaluación de las propiedades fisicoquímicas del temefos y sus metabolitos muestra que el metabolismo reduce el Kow y aumenta el TPSA, lo que aumenta la solubilidad en agua de las moléculas y fomenta la excreción de la molécula. El temefos y sus metabolitos oxidados tienen principalmente aceptores de puentes de hidrógeno, pero cuando se hidrolizan presentan

donadores de puentes de hidrógeno en los -OH resultantes. Estas propiedades determinan la interacción con macromoléculas y la estabilidad de esta interacción.

7. Las evaluaciones de toxicidad muestran que tanto el temefos como sus metabolitos tienen potencial de ser genotóxicos y hepatotóxicos, además, también pueden actuar como inhibidores de los CYP2C19 y 2C9 y en menor medida de los CYP3A4 y 1A2, siendo estas mismas isoformas las que participan en su biotransformación.

8. Existe una correlación importante entre la energía de afinidad por la AChE con el valor experimental de la Cl_{50} experimental de los metabolitos oxidados del temefos. Sin embargo, se encontró que la orientación del ligando en el sitio de unión es determinante para causar la inhibición; el temefos y sus metabolitos simétricos muestran una misma probabilidad de orientarse de un extremo u otro, pero los metabolitos con un solo oxón tienden a orientarse con el grupo tiofosfato hacia el interior de la enzima, lo que origina que la interacción con el grupo oxón sea poco probable.

9. Los metabolitos oxidados del temefos tienen energía de afinidad mayor para activar a PXR y los metabolitos di-desfosforilados mostraron una afinidad mayor para activar a CAR.

10. Hay propiedades que aún no se pueden evaluar a partir de estudios computacionales, lo que limita el poder predictivo de los modelos actuales. En general, las limitaciones se basan en la cantidad de variables que se pueden tomar en cuenta en estos modelos y de esta manera crear los algoritmos más robustos.

6. Perspectivas

Los estudios computacionales han servido en gran medida para orientar los estudios experimentales, en consecuencia, a partir de este trabajo se hacen propuestas de los dos tipos:

6.1 Perspectivas experimentales

1. Validar experimentalmente la propuesta de la ruta de biotransformación del temefos en el ser humano. Una de las principales incógnitas es verificar la formación de los di-oxones, los cuales *in silico* presentaron una probabilidad baja de formarse. Una segunda incógnita es si se puede llevar a cabo la desfosforilación sin la formación del oxón, determinar qué enzimas humanas lo estarían haciendo y cuál es su efectividad respecto a la formación del oxón.
2. Determinar cuáles son las isoformas del CYP involucradas en la biotransformación del temefos. Esta evaluación sería para las isoformas del CYP con la mayor probabilidad de participación e incluiría determinar su cinética enzimática usando diversos metabolitos intermediarios, todo esto con la finalidad de obtener datos sobre la afinidad y la probable inhibición que se encontró en este estudio.
3. Evaluar la hepatotoxicidad y las alteraciones metabólicas, principalmente sobre los lípidos, del temefos en exposiciones agudas, crónicas y subcrónicas.
4. Evaluar la activación de los receptores CAR y PXR por el temefos, por medio de la traslocación al núcleo de los receptores CAR y PXR, y por medio de la expresión de los mRNA de genes de respuesta regulados por estos receptores.
5. Determinar los metabolitos de fase I y de fase II del temefos en orina en exposiciones agudas, crónica y subcrónicas en modelos experimentales para proponer un marcador de exposición al temefos en los seres humanos.

6.2 Propuestas computacionales

1. Realizar la dinámica molecular de los complejos ligando-receptor obtenidos de los ensayos de *docking* para evaluar la estabilidad de las interacciones del ligando en el sitio de unión. Hacer una comparativa entre las diferentes orientaciones que presentan las moléculas asimétricas y evaluar su efecto sobre el potencial inhibitorio de cada uno.
- 2.- Realizar un modelo QSAR de la inhibición de la AChE, pero orientado solo a los OP. Este modelo debe tomar como base de datos a OP que se sabe son inhibidores de esta enzima, y priorizar los descriptores estructurales para aumentar la fiabilidad de las predicciones.
- 3.- Diseñar análogos del temefos con uso terapéutico para inhibir la AChE en enfermedades neurodegenerativas, mejorando sus características para que sean menos tóxicos, y que la inhibición no sea total, como ocurre con este compuesto. También diseñar nuevas moléculas como insecticidas, donde se busque que sean altamente específicas para la AChE de mosquitos y no afecten a las abejas, seres humanos u otras especies de importancia ecológica y económica.

7. Referencias

- Aardema, H., Meertens, J.H.J.M., Ligtenberg, J.J.M., Peters-Polman, O.M., Tulleken, J.E., Zijlstra, J.G., 2008. Organophosphorus pesticide poisoning: Cases and developments. *Neth. J. Med.* 66, 149–153.
- Abass, K., Turpeinen, M., Pelkonen, O., 2009. An evaluation of the cytochrome P450 inhibition potential of selected pesticides in human hepatic microsomes. *J. Environ. Sci. Heal. - Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes* 44, 553–563. <https://doi.org/10.1080/03601230902997766>
- Abdou, R.H., Elbadawy, M., Khalil, W.F., Usui, T., Sasaki, K., Shimoda, M., 2020. Effects of several organophosphates on hepatic cytochrome P450 activities in rats. *J. Vet. Med. Sci.* 82, 598–606. <https://doi.org/10.1292/jvms.19-0452>
- Adgate, J.L., Barr, D.B., Clayton, C.A., Eberly, L.E., Freeman, N.C.G., Lioy, P.J., Needham, L.L., Pellizzari, E.D., Quackenboss, J.J., Roy, A., Sexton, K., 2001. Measurement of children's exposure to pesticides: Analysis of urinary metabolite levels in a probability-based sample. *Environ. Health Perspect.* 109, 583–590. <https://doi.org/10.1289/ehp.01109583>
- Advanced Chemistry Development Inc., 2020. ChemSketch.
- Ahmadian, M., Suh, J.M., Hah, N., Liddle, C., Atkins, A.R., Downes, M., Evans, R.M., 2013. Ppary signaling and metabolism: The good, the bad and the future. *Nat. Med.* 19, 557–566. <https://doi.org/10.1038/nm.3159>
- Akbel, E., Arslan-Acaroz, D., Demirel, H.H., Kucukkurt, I., Ince, S., 2018. The subchronic exposure to malathion, an organophosphate pesticide, causes lipid peroxidation, oxidative stress, and tissue damage in rats: The protective role of resveratrol. *Toxicol. Res. (Camb)*. 7, 503–512. <https://doi.org/10.1039/c8tx00030a>
- Al-azab, A.M., Shaalan, E.A., 2018. Efficacy of Spinosad and Flubex against Dengue Fever Vector *Aedes aegypti* in Jeddah Governorate, Saudi Arabia. *PMS Vet. Res.* 3, 15–21.
- Ali, J., Camilleri, P., Brown, M.B., Hutt, A.J., Kirton, S.B., 2012. In silico prediction of aqueous solubility using simple QSPR models: The importance of phenol and phenol-like moieties. *J. Chem. Inf. Model.* 52, 2950–2957. <https://doi.org/10.1021/ci300447c>
- Altamash, T., Amhamed, A., Aparicio, S., Atilhan, M., 2020. Effect of Hydrogen Bond Donors and Acceptors on CO₂ Absorption by Deep Eutectic Solvents. *Processes* 8, 1–15. <https://doi.org/10.3390/pr8121533>
- Australian Pesticides and Veterinary Medicines, 2021. Authority Temephos Chemical Review [WWW Document]. URL <https://apvma.gov.au/node/12741>
- Ba-Omar, T.A., Al-Jardani, S., Victor, R., 2011. Effects of pesticide temephos on the gills of *Aphanius dispar* (Pisces: Cyprinodontidae). *Tissue Cell* 43, 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2010.11.002>
- Ba-Omar, T.A., Al-Kharusi, I., Victor, R., 2013. Effects of Pesticide Temephos on the Liver of *Aphanius dispar* (Rüppell 1828) (Pisces: Cyprinodontidae): A Microscopic Study. *Sultan Qaboos Univ. J. Sci. [SQUJS]* 18, 11. <https://doi.org/10.24200/squjs.vol18iss0pp11-18>
- Baes, M., Gulick, T., Choi, H.S., Martinoli, M.G., Simha, D., Moore, D.D., 1994. A new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily that interacts with a subset of retinoic acid response elements. *Mol. Cell. Biol.* 14, 1544–52. <https://doi.org/10.1128/MCB.14.3.1544>. Updated
- Barceló, D., Hennion, M.C., 1997. Sampling of polar pesticides from water matrices. *Anal. Chim.*

- Acta 338, 3–18. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(96\)00440-0](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(96)00440-0)
- Bargańska, Z., Ślebioda, M., Namieśnik, J., 2013. Pesticide residues levels in honey from apiaries located of Northern Poland. *Food Control* 31, 196–201. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.049>
- 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., Barrón-Vivanco, B.S., Robledo-Marengo, M.L., Salazar, A.M., Rojas-García, A.E., 2015. Cytostatic and genotoxic effect of temephos in human lymphocytes and HepG2 cells. *Toxicol. Vitr.* 29, 779–786. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.02.008>
- Benitez-Trinidad, A.B., Medina-Díaz, I.M., Bernal-Hernández, Y.Y., Barrón-Vivanco, B.S., González-Arias, C.A., Herrera-Moreno, J.F., Alvarado-Cruz, I., Quintanilla-Vega, B., Rojas-García, A.E., 2018. Relationship between LINE-1 methylation pattern and pesticide exposure in urban sprayers. *Food Chem. Toxicol.* 113, 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.01.035>
- Berkowitz, G.S., Wetmur, J.G., Birman-Deych, E., Obel, J., Lapinski, R.H., Goldbold, J.H., Holzman, I.R., Wolff, M.S., 2004. In Utero pesticides exposure, maternal paraoxonase activity, and head circumference. *Environ. Health Perspect.* 112, 388–391. <https://doi.org/10.1289/ehp.6414>
- Blinn, R.C., 1969. Metabolic fate of abate insecticide in the rat. *J. Agric. Food Chem.* 17, 118–122. <https://doi.org/10.1021/jf60161a614>
- Blinn, R.C., 1968. Abate Insecticide. The Fate of O,O,O',O'-Tetramethyl O,O'-Thiodi-p-phenylene Phosphorothioate on Bean Leaves. *J. Agric. Food Chem.* 16, 441–445. <https://doi.org/10.1021/jf60157a026>
- Blumberg, B., Sabbagh, W., Juguilon, H., Bolado, J., Van Meter, C.M., Ong, E.S., Evans, R.M., 1998. SXR, a novel steroid and xenobiotic-sensing nuclear receptor. *Genes Dev.* 12, 3195–3205. <https://doi.org/10.1101/gad.12.20.3195>
- Bolognesi, C., Holland, N., 2016. The use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay for monitoring pesticide-exposed populations. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* 770, 183–203. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.04.006>
- Bowman, J.S., Orloski, E.J., 1966. Abate insecticide residues in streams and ponds treated for control of mosquito larvae. *Mosq. News* 26, 557–561.
- Buratti, F.M., D'Aniello, A., Volpe, M.T., Meneguz, A., Testai, E., 2005. Malathion bioactivation in the human liver: The contribution of different cytochrome P450 isoforms. *Drug Metab. Dispos.* 33, 295–302. <https://doi.org/10.1124/dmd.104.001693>
- Buratti, F.M., Leoni, C., Testai, E., 2007. The Human Metabolism of Organophosphorothionate Pesticides: Consequences for Toxicological Risk Assessment. *J. fur Verbraucherschutz und Leb.* 2, 37–40. <https://doi.org/10.1007/s00003-006-0109-z>
- Buratti, F.M., Leoni, C., Testai, E., 2006. Foetal and adult human CYP3A isoforms in the bioactivation of organophosphorothionate insecticides. *Toxicol. Lett.* 167, 245–255. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2006.10.006>
- Buratti, F.M., Volpe, M.T., Fabrizi, L., Meneguz, A., Vittozzi, L., Testai, E., 2002. Kinetic parameters of OPT pesticide desulfuration by c-DNA expressed human CYPs. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 11, 181–190. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00010-8](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00010-8)
- Buratti, F.M., Volpe, M.T., Meneguz, A., Vittozzi, L., Testai, E., 2003. CYP-specific bioactivation of

- four organophosphorothioate pesticides by human liver microsomes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 186, 143–154. [https://doi.org/10.1016/S0041-008X\(02\)00027-3](https://doi.org/10.1016/S0041-008X(02)00027-3)
- Butler, A.M., Murray, M., 1997. Biotransformation of parathion in human liver: participation of CYP3A4 and its inactivation during microsomal parathion oxidation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 280, 966–73.
- Cabras, P., Angioni, A., 2000. Pesticide residues in grapes, wine, and their processing products. *J. Agric. Food Chem.* 48, 967–973. <https://doi.org/10.1021/jf990727a>
- CENAPRECE, 2020a. Productos recomendados por el CENAPRECE para el combate de insectos vectores de enfermedades a partir de 2020, Subsecretaría De Prevención Y Promoción De La Salud.
- CENAPRECE, 2020b. Guía metodológica para Estudios Entomológicos en Fase Larvaria y Pupal.
- Chai, S.C., Cherian, M.T., Wang, Y.M., Chen, T., 2016. Small-molecule modulators of PXR and CAR. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 1859, 1141–1154. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2016.02.013>
- Chambers, J.E., Oppenheimer, S.F., 2004. Organophosphates, serine esterase inhibition, and modeling of organophosphate toxicity. *Toxicol. Sci.* 77, 185–187. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh060>
- Chedik, L., Bruyere, A., Fardel, O., 2019. Interactions of organophosphorus pesticides with solute carrier (SLC) drug transporters. *Xenobiotica* 49, 363–374. <https://doi.org/10.1080/00498254.2018.1442030>
- Chen, D., Oezguen, N., Urvil, P., Ferguson, C., Dann, S.M., Savidge, T.C., 2016. Regulation of protein-ligand binding affinity by hydrogen bond pairing. *Sci. Adv.* 2. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1501240>
- Cheng, F., Li, W., Zhou, Y., Shen, J., Wu, Z., Liu, G., Lee, P.W., Tang, Y., 2012. AdmetSAR: A comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties. *J. Chem. Inf. Model.* 52, 3099–3105. <https://doi.org/10.1021/ci300367a>
- Cheng, Y.H., Cheng, X.L., Radić, Z., McCammon, J.A., 2008. Acetylcholinesterase: Mechanisms of covalent inhibition of H447I mutant determined by computational analyses. *Chem. Biol. Interact.* 175, 196–199. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.04.044>
- Choi, H.S., Chung, M., Tzamelis, I., Simha, D., Lee, Y.K., Seol, W., Moore, D.D., 1997. Differential transactivation by two isoforms of the orphan nuclear hormone receptor CAR. *J. Biol. Chem.* 272, 23565–23571. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.38.23565>
- Chrencik, J.E., Orans, J., Moore, L.B., Xue, Y., Peng, L., Collins, J.L., Wisely, G.B., Lambert, M.H., Kliewer, S.A., Redinbo, M.R., 2005. Structural Disorder in the Complex of Human Pregnane X Receptor and the Macrolide Antibiotic Rifampicin. *Mol. Endocrinol.* 19, 1125–1134. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0346>
- Clark, R.D., 2018. Predicting mammalian metabolism and toxicity of pesticides in silico. *Pest Manag. Sci.* 74, 1992–2003. <https://doi.org/10.1002/ps.4935>
- Clement, J.G., 1984. Role of aliesterase in organophosphate poisoning. *Toxicol. Sci.* 4, 96–105. <https://doi.org/10.1093/toxsci/4.2part2.96>
- Cobanoglu, H., Cayir, A., 2020. Assessment of the genotoxic potential of temephos. *Pestic. Phytomed.* 35, 183–191. <https://doi.org/10.2298/PIF2003183C>
- Cole, T.B., Jampsa, R.L., Walter, B.J., Arndt, T.L., Richter, R.J., Shih, D.M., Tward, A., Lulis, A.J., Jack, R.M., Costa, L.G., Furlong, C.E., 2003. Expression of human paraoxonase (PON1) during

- development. *Pharmacogenetics* 13, 357–364. <https://doi.org/10.1097/00008571-200306000-00007>
- Costa, L.G., Li, W.F., Richter, R.J., Shih, D.M., Lulis, A., Furlong, C.E., 1999. The role of paraoxonase (PON1) in the detoxication of organophosphates and its human polymorphism. *Chem. Biol. Interact.* 119–120, 429–438. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(99\)00055-1](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(99)00055-1)
- Costa, L.G., McDonald, B.E., Murphy, S.D., Omenn, G.S., Richter, R.J., Motulsky, A.G., Furlong, C.E., 1990. Serum paraoxonase and its influence on paraoxon and chlorpyrifos-oxon toxicity in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 103, 66–76. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(90\)90263-T](https://doi.org/10.1016/0041-008X(90)90263-T)
- Crosa, G., Yameogo, L., Calamari, D., Hougard, J.M., 1998. Long term quantitative ecological assessment of insecticides treatments in four African rivers: A methodological approach. *Chemosphere* 37, 2847–2858. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(98\)00327-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(98)00327-0)
- da Silva, B.S., Pietrobon, C.B., Bertasso, I.M., Lopes, B.P., Carvalho, J.C., Peixoto-Silva, N., Santos, T.R., Claudio-Neto, S., Manhães, A.C., Oliveira, E., de Moura, E.G., Lisboa, P.C., 2019. Short and long-term effects of bisphenol S (BPS) exposure during pregnancy and lactation on plasma lipids, hormones, and behavior in rats. *Environ. Pollut.* 250, 312–322. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.100>
- Daina, A., Michielin, O., Zoete, V., 2017. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci. Rep.* 7, 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep42717>
- Dang, N. Le, Hughes, T.B., Matlock, M.K., Swamidass, S.J., 2020. The Metabolic Rainbow: Deep Learning Phase i Metabolism in Five Colors. *FASEB J.* <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00836>
- Dauterman, W.C., 1971. Biological and nonbiological modifications of organophosphorus compounds. *Bull. World Health Organ.* 44, 133–150.
- Davies, H.G., Richter, R.J., Keifer, M., Broomfield, C.A., Sowalla, J., Furlong, C.E., 1996. The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. *Nat. Genet.* 14, 334–336. <https://doi.org/10.1038/ng1196-334>
- de Bruyn Kops, C., Stork, C., Šícho, M., Kochev, N., Svozil, D., Jeliaskova, N., Kirchmair, J., 2019. GLORY: Generator of the structures of likely cytochrome P450 metabolites based on predicted sites of metabolism. *Front. Chem.* 7, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00402>
- Delaney, J.S., 2004. ESOL: Estimating aqueous solubility directly from molecular structure. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 44, 1000–1005. <https://doi.org/10.1021/ci034243x>
- Denison, M.S., Whitlock, J.P.J., 1995. Xenobiotic-inducible Transcription of Cytochrome P450 Genes. *J. Biol. Chem.* 270, 18175–18178.
- Dermauw, W., Van Leeuwen, T., 2014. The ABC gene family in arthropods: Comparative genomics and role in insecticide transport and resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 45, 89–110. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2013.11.001>
- Dulin, F., Halm-Lemeille, M.P., Lozano, S., Lepailleur, A., Sopkova-de Oliveira Santos, J., Rault, S., Bureau, R., 2012. Interpretation of honeybees contact toxicity associated to acetylcholinesterase inhibitors. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 79, 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.01.007>
- Eddleston, M., Eyer, P., Worek, F., Mohamed, F., Senarathna, L., Von Meyer, L., Juszcak, E., Hittarage, A., Azhar, S., Dissanayake, W., Sheriff, M.H.R., Szinicz, L., Dawson, A.H., Buckley,

- N.A., 2005. Differences between organophosphorus insecticides in human self-poisoning: A prospective cohort study. *Lancet* 366, 1452–1459. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67598-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67598-8)
- Ekins, S., 2014. Progress in computational toxicology. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 69, 115–140. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2013.12.003>
- Ekroos, M., Sjogren, T., 2006. Structural basis for ligand promiscuity in cytochrome P450 3A4. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
- Ennin, M.A., Franklin, C.S., Ennin M. and Franklin, 1979. Some sub-cellular effects of an organophosphorus insecticide, Abate. *Br. J. Pharmacol.* 66, 72–73.
- Espinoza-Navarro, O., Ponce-LaRosa, C., Bustos-Obregón, E., 2017. Organophosphorous Pesticides: Their Effects on Biosentinel Species and Humans. Control and Application in Chile. *Int. J. Morphol.* 35, 1069–1074. <https://doi.org/10.4067/s0717-95022017000300041>
- Fährrolfes, R., Bietz, S., Flachsenberg, F., Meyder, A., Nittinger, E., Otto, T., Volkamer, A., Rarey, M., 2017. Proteins Plus: A web portal for structure analysis of macromolecules. *Nucleic Acids Res.* 45, W337–W343. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx333>
- FAO, 2015. Progress in pesticide risk assessment and phasing-out of highly hazardous pesticides in Asia.
- Fenske, R.A., Kedan, G., Lu, C., Fisker-Andersen, J.A., Curl, C.L., 2002. Assessment of organophosphorous pesticide exposures in the diets of preschool children in Washington State. *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.* 12, 21–28. <https://doi.org/10.1038/sj/jea/7500197>
- Ferguson, P.W., Medon, P.J., Nasri, E., 1985. Temephos (Abate) Metabolism and Toxicity in Rats 147, 143–147.
- Filimonov, D.A., Lagunin, A.A., Glorizova, T.A., Rudik, A. V., Druzhilovskii, D.S., Pogodin, P. V., Poroikov, V. V., 2014. Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the pass online web resource. *Chem. Heterocycl. Compd.* 50, 444–457. <https://doi.org/10.1007/s10593-014-1496-1>
- Forsyth, C.S., Chambers, J.E., 1989. Activation and degradation of the phosphorothionate insecticides parathion and EPN by rat brain. *Biochem. Pharmacol.* 38, 1597–1603. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(89\)90307-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(89)90307-9)
- Fortes-Aiub, C.A., Alves-Coelho, E.C., Sodr e, E., Ribieiro-Pinto, L.F., Felzenszwalb, I., 2002. Genotoxic evaluation of the organophosphorous pesticide temephos. *Genet. Mol. Res.* 1, 159–166. <https://doi.org/1676-5680>
- Gaines, T.B., Kimbrough, R., Laws, E.R., 1967. Toxicology of Abate in Laboratory Animals. *Arch. Environ. Health* 14, 283–288. <https://doi.org/10.1080/00039896.1967.10664732>
- Gholivand, K., Ebrahimi Valmoozi, A.A., Bonsaii, M., 2014. Synthesis and crystal structure of new temephos analogues as cholinesterase inhibitor: Molecular docking, qsar study, and hydrogen bonding analysis of solid state. *J. Agric. Food Chem.* 62, 5761–5771. <https://doi.org/10.1021/jf5011726>
- Ghose, A.K., Viswanadhan, N.V., Wndoloski, J.J., 1999. A Knowledge-Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery. 1. A Qualitative and Quantitative Characterization of Known Drug Databases. *J. Comb. Chem.* 1, 55–68. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.655-657.578>
- Goodwin, B., Gauthier, K.C., Umetani, M., Watson, M.A., Lochansky, M.I., Collins, J.L., Leitersdorf, E., Mangelsdorf, D.J., Kliewer, S.A., Repa, J.J., 2003. Identification of bile acid precursors as

- endogenous ligands for the nuclear xenobiotic pregnane X receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 223–228. <https://doi.org/10.1073/pnas.0237082100>
- Gozalbes, R., Ortiz, J., López, F., 2014. Métodos computacionales en toxicología predictiva : aplicación a la reducción de ensayos con animales en el contexto de la legislación comunitaria REACH. *Rev. Toxicol.* 31, 157–167.
- Guengerich, F.P., 2006. Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *AAPS J.* 8, E101–E111. <https://doi.org/10.1208/aapsj080112>
- Gunderson, M.P., Leblanc, G.A., Guillette, L.J., 2001. Alterations in sexually dimorphic biotransformation of testosterone in juvenile American alligators (*Alligator mississippiensis*) from contaminated lakes. *Environ. Health Perspect.* 109, 1257–1264. <https://doi.org/10.1289/ehp.011091257>
- Gupta, R.R., Gifford, E.M., Liston, T., Waller, C.L., Hohman, M., Bunin, B.A., Ekins, S., 2010. Using Open Source Computational Tools for Predicting Human Metabolic Stability and Additional Absorption , Distribution , Metabolism , Excretion , and Toxicity Properties ABSTRACT : *Pharmacology* 38, 2083–2090. <https://doi.org/10.1124/dmd.110.034918>.based
- Hackenberger, B.K., Jarić-Perkušić, D., Stepić, S., 2008. Effect of temephos on cholinesterase activity in the earthworm *Eisenia fetida* (Oligochaeta, Lumbricidae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 71, 583–589. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.11.008>
- Handschin, C., Blättler, S., Roth, A., Looser, R., Oscarson, M., Kaufmann, M.R., Podvinec, M., Gnerre, C., Meyer, U.A., 2004. The evolution of drug-activated nuclear receptors: One ancestral gene diverged into two xenosensor genes in mammals. *Nucl. Recept.* 2, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1478-1336-2-7>
- Handschin, C., Podvinec, M., Meyer, U.A., 2000. CXR, a chicken xenobiotic-sensing orphan nuclear receptor, is related to both mammalian pregnane X receptor (PXR) and constitutive androstane receptor (CAR). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 10769–10774. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.20.10769>
- Hanwell, M.D., Curtis, D.E., Lonie, D.C., Vandermeersch, T., Zurek, E., Hutchison, G.R., 2012. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J. Cheminform.* 1–17.
- Hernández-Estéris, A., 2020. 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. CINVESTAV.
- Herrero, Ó., Aquilino, M., Sánchez-Argüello, P., Planelló, R., 2018. The BPA-substitute bisphenol S alters the transcription of genes related to endocrine, stress response and biotransformation pathways in the aquatic midge *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). *PLoS One* 13, 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193387>
- Hodgson, E., Rose, R.L., 2006. Organophosphorus chemicals: Potent inhibitors of the human metabolism of steroid hormones and xenobiotics. *Drug Metab. Rev.* 38, 149–162. <https://doi.org/10.1080/03602530600569984>
- Housecroft, C.E., Sharpe, A.G., 2010. Chapter 3: An introduction to molecular symmetry, en: *Inorganic Chemistry*. p. 98.
- Hustert, E., Zibat, A., Presecan-Siedel, E., Eiselt, R., Mueller, R., Fuß, C., Brehm, I., Brinkmann, U., Eichelbaum, M., Wojnowski, L., Burk, O., 2001. Natural protein variants of pregnane X receptor with altered transactivation activity toward CYP3A4. *Drug Metab. Dispos.* 29,

1454–1459.

- Jacob, S.S., Nair, N.B., Balasubramanian, N.K., 1982. Toxicity of certain pesticides found in the habitat to the larvivorous fishes *Aplocheilus lineatus* (Cuv. & Val.) and *Macropodus cupanus* (Cuv. & Val.). *Proc. Anim. Sci.* 91, 323–328. <https://doi.org/10.1007/BF03185024>
- Jamal, G.A., Hansen, S., Julu, P.O.O., 2002. Low level exposures to organophosphorus esters may cause neurotoxicity. *Toxicology* 181–182, 23–33. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00447-X](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00447-X)
- Jeyaratnam, J., Maroni, M., 1994. Organophosphorus compounds. *Toxicology* 91, 15–27.
- Jo, S., Cheng, X., Islam, S.M., Huang, L., Rui, H., Zhu, A., Lee, H.S., Qi, Y., Han, W., Vanommeslaeghe, K., MacKerell, A.D., Roux, B., Im, W., 2014. CHARMM-GUI PDB manipulator for advanced modeling and simulations of proteins containing nonstandard residues. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 96, 235–265. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2014.06.002>
- Jo, S., Kim, T., Iyer, V.G., Im, W., 2008. CHARMM-GUI: A Web-Based Graphical User Interface for CHARMM. *J. Comput. Chem.* 29, 174–182. <https://doi.org/10.1002/jcc>
- Jones, S.A., Moore, L.B., Shenk, J.L., Wisely, G.B., Hamilton, G.A., McKee, D.D., Tomkinson, N.C., LeCluyse, E.L., Lambert, M.H., Willson, T.M., Kliewer, S.A., Moore, J.T., 2000. The pregnane X receptor: a promiscuous xenobiotic receptor that has diverged during evolution. *Mol. Endocrinol.* 14, 27–39. <https://doi.org/10.1210/mend.14.1.0409>
- Joshi, S.C., Sharma, P., 2011. Male reproductive toxicity of organophosphorous compounds: A review. *Toxicol. Environ. Chem.* 93, 1486–1507. <https://doi.org/10.1080/02772248.2011.581874>
- Kamel, A., Byrne, C., Vigo, C., Ferrario, J., Stafford, C., Verdin, G., Siegelman, F., Knizner, S., Hetrick, J., 2009. Oxidation of selected organophosphate pesticides during chlorination of simulated drinking water. *Water Res.* 43, 522–534. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.10.038>
- Kappers, W.A., Edwards, R.J., Murray, S., Boobis, A.R., 2001. Diazinon is activated by CYP2C19 in human liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 177, 68–76. <https://doi.org/10.1006/taap.2001.9294>
- Kastan, M.B., 2008. DNA damage responses: Mechanisms and roles in human disease 2007 - G.H.A. Clowes Memorial Award lecture. *Mol. Cancer Res.* 6, 517–524. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-08-0020>
- Kato, H., Yamaotsu, N., Iwazaki, N., Okamura, S., Kume, T., Hirono, S., 2017. Precise prediction of activators for the human constitutive androstane receptor using structure-based three-dimensional quantitative structure–activity relationship methods. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 32, 179–188. <https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2017.02.001>
- Kavvalakis, M.P., Tsatsakis, A.M., 2012. The atlas of dialkylphosphates; assessment of cumulative human organophosphorus pesticides' exposure. *Forensic Sci. Int.* 218, 111–122. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.10.019>
- Kawamoto, T., Kakizaki, S., Yoshinari, K., Negishi, M., 2000. Estrogen Activation of the Nuclear Orphan Receptor CAR (Constitutive Active Receptor) in Induction of the Mouse *Cyp2b10* Gene. *Mol. Endocrinol.* 14, 1897–1905. <https://doi.org/10.1210/mend.14.11.0547>
- Keith, J.M., 2017. *Bioinformatics*, Second Edi. ed. Humana Press.
- Kiametis, A.S., Silva, M.A., Romeiro, L.A.S., Martins, J.B.L., Gargano, R., 2017. Potential acetylcholinesterase inhibitors: molecular docking, molecular dynamics, and in silico prediction. *J. Mol. Model.* 23. <https://doi.org/10.1007/s00894-017-3228-9>
- Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B.A., Thiessen, P.A., Yu,

- B., Zaslavsky, L., Zhang, J., Bolton, E.E., 2019. PubChem 2019 update: Improved access to chemical data. *Nucleic Acids Res.* 47, D1102–D1109. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1033>
- Kim, S.H., Bae, J.W., Kim, D.H., Jeong, D.J., Ha, J.J., Yi, J.K., Kwon, W.S., 2020. Detrimental effects of temephos on male fertility: An in vitro study on a mouse model. *Reprod. Toxicol.* 96, 150–155. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2020.06.008>
- Kirchmair, J., Göller, A.H., Lang, D., Kunze, J., Testa, B., Wilson, I.D., Glen, R.C., Schneider, G., 2015. Predicting drug metabolism: Experiment and/or computation? *Nat. Rev. Drug Discov.* <https://doi.org/10.1038/nrd4581>
- Kliwer, S.A., Moore, J.T., Wade, L., Staudinger, J.L., Watson, M.A., Jones, S.A., McKee, D.D., Oliver, B.B., Willson, T.M., Zetterström, R.H., Perlmann, T., Lehmann, J.M., 1998. An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. *Cell* 92, 73–82. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80900-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80900-9)
- Knipe, D.W., Jayasumana, C., Siribaddana, S., Priyadarshana, C., Pearson, M., Gunnell, D., Metcalfe, C., Tzatzarakis, M.N., Tsatsakis, A.M., 2016. Feasibility of hair sampling to assess levels of organophosphate metabolites in rural areas of Sri Lanka. *Environ. Res.* 147, 207–211. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.02.011>
- Kodama, S., Koike, C., Negishi, M., Yamamoto, Y., 2004. Nuclear receptors CAR and PXR cross talk with FOXO1 to regulate genes that encode drug-metabolizing and gluconeogenic enzymes. *Mol. Cell. Biol.* 24, 7931–7940. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.18.7931-7940.2004>
- Kretschmer, X.C., Baldwin, W.S., 2005. CAR and PXR: Xenosensors of endocrine disrupters? *Chem. Biol. Interact.* 155, 111–128. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.06.003>
- Krieger, R.I., Dinoff, T.M., 2000. Malathion deposition, metabolite clearance, and cholinesterase status of date dusters and harvesters in California. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 38, 546–553. <https://doi.org/10.1007/s002449910071>
- Kutz, F.W., Cook, B.T., Carter-Pokras, O.D., Brody, D., Murphy, R.S., 1992. Selected pesticide residues and metabolites in urine from a survey of the u.s. general population. *J. Toxicol. Environ. Health* 37, 277–291. <https://doi.org/10.1080/15287399209531670>
- Lacorte, S., Barceló, D., 1995. Determination of organophosphorus pesticides and their transformation products in river waters by automated on-line solid-phase extraction followed by thermospray liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 712, 103–112. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)00425-M](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)00425-M)
- Lacorte, S., Ehresmann, N., Barceló, D., 1996. Persistence of temephos and its transformation products in rice crop field waters. *Environ. Sci. Technol.* 30, 917–923. <https://doi.org/10.1021/es9503589>
- Lacorte, S., Jeanty, G., Marty, J.L., Barcelo, 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. *J. Chromatogr. a* 777, 99–114. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00557-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00557-8)
- Lacorte, S., Lartiges, S.B., Garrigues, P., Barceló, D., 1995. Degradation of Organophosphorus Pesticides and Their Transformation Products in Estuarine Waters. *Environ. Sci. Technol.* 29, 431–438. <https://doi.org/10.1021/es00002a020>
- Lahtela, J.T., Arranto, A.J., Sotaniemi, E.A., 1985. Enzyme inducers improve insulin sensitivity in non-insulin-dependent diabetic subjects. *Diabetes* 34, 911–916.
- Langdon, S.R., Mulgrew, J., Paolini, G. V., Van Hoorn, W.P., 2010. Predicting cytotoxicity from

- heterogeneous data sources with Bayesian learning. *J. Cheminform.* 2, 1–18. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-2-11>
- Laws, E.R., Morales, F.R., Hayes, W.J., Joseph, C.R., 1967. Toxicology of Abate in Volunteers. *Arch. Environ. Health* 14, 289–291. <https://doi.org/10.1080/00039896.1967.10664733>
- Laws, E.R., Sedlak, V.A., Miles, J.W., Joseph, C.R., Lacomba, J.R., Diaz Rivera, A., 1968. Field study of the safety of abate for treating potable water and observations on the effectiveness of a control programme involving both abate and malathion. *Bull. World Health Organ.* 38, 439–445.
- Le Dang, N., Hughes, T.B., Krishnamurthy, V., Swamidass, S.J., 2016. A simple model predicts UGT-mediated metabolism. *Bioinformatics* 32, 3183–3189. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw350>
- Lehmann, J.M., McKee, D.D., Watson, M.A., Willson, T.M., Moore, J.T., Kliewer, S.A., 1998. The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *J. Clin. Invest.* 102, 1016–1023. <https://doi.org/10.1172/JCI3703>
- Leo, A., Hansch, C., Church, C., 1969. Comparison of Parameters Currently Used in the Study of Structure-Activity Relationships. *J. Med. Chem.* 12, 766–771. <https://doi.org/10.1021/jm00305a010>
- Lewis, K.A., Tzilivakis, J., Warner, D.J., Green, A., 2016. An international database for pesticide risk assessments and management. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 22, 1050–1064. <https://doi.org/10.1080/10807039.2015.1133242>
- Lin, J.H., 2006. CYP induction-mediated drug interactions: In vitro assessment and clinical implications. *Pharm. Res.* 23, 1089–1116. <https://doi.org/10.1007/s11095-006-0277-7>
- Liu, B., Gao, H.M., Hong, J.S., 2003. Parkinson's disease and exposure to infectious agents and pesticides and the occurrence of brain injuries: Role of neuroinflammation. *Environ. Health Perspect.* 111, 1065–1073. <https://doi.org/10.1289/ehp.6361>
- Lopes, P.E.M., Guvench, O., MacKerell, A.D., 2015. Current Status of Protein Force Fields for Molecular Dynamics. *Methods Mol. Biol.* 47–71. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1465-4_3
- Lopes, R.P., Lima, J.B.P., Martins, A.J., 2019. Insecticide resistance in *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 in Brazil: A review. *Parasites and Vectors.* <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3850-8>
- López-Flores, I., Lacasaña, M., Blanco-Muñoz, J., Aguilar-Garduño, C., Sanchez-Villegas, P., Pérez-Méndez, O.A., Gamboa-Ávila, R., 2009. Relationship between human paraoxonase-1 activity and PON1 polymorphisms in Mexican workers exposed to organophosphate pesticides. *Toxicol. Lett.* 188, 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.03.010>
- Manavalan, P., Taylor, P., Curtis Johnson, W., 1985. Circular dichroism studies of acetylcholine esterase conformation. Comparison of the 11 S and 5.6 S species and the differences induced by inhibitory ligands. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Protein Struct. Mol.* 829, 365–370. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(85\)90246-8](https://doi.org/10.1016/0167-4838(85)90246-8)
- Mangelsdorf, D.J., Ong, E.S., Dyck, J.A., Evans, R.M., 1990. Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature* 345, 224–229. <https://doi.org/10.1038/345224a0>
- Marina, C.F., Bond, J.G., Muñoz, J., Valle, J., Quiroz-Martínez, H., Torres-Monzón, J.A., Williams, T., 2018. Efficacy of larvicides for the control of dengue, Zika, and chikungunya vectors in an

- urban cemetery in southern Mexico. *Parasitol. Res.* 117, 1941–1952. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5891-x>
- Marrs, T.C., Rice, P., Vale, J.A., 2006. The role of oximes in the treatment of nerve agent poisoning in civilian casualties. *Toxicol. Rev.* 25, 297–323. <https://doi.org/10.2165/00139709-200625040-00009>
- Martins, A.O., Durante de Mdeiros, F., de Oliveira, J., da Rosa, N., Mateus Gomes, T., de Medeiros Peretti, E., Somariva Prophiro, J., Fortunato, J.J., 2019. Effects of prenatal exposure to temephos on behavior and social interaction. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 15, 669–673.
- Matlock, M.K., Hughes, T.B., Swamidass, S.J., 2015. XenoSite server: A web-available site of metabolism prediction tool. *Bioinformatics* 31, 1136–1137. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu761>
- Medina-Díaz, I.M., Arteaga-Illán, G., Bermudez de León, M., Cisneros, B., Sierra-Santoyo, A., Vega, L., Gonzalez, F.J., Elizondo, G., 2007. Pregnane X Receptor-Dependent Induction of the CYP3A4 Gene by α , β -Trichloro-2, 2-Bis (p-Chlorophenyl)ethane. *Drug Metab. Dispos.* 35, 95–102. <https://doi.org/10.1124/dmd.106.011759.hormones>
- Mélo, M.E.B. de, Merlo, K. da C., Fernandes, R.R. de C., Luna, C.F., Diniz, G.T.N., Catanho, M.T.J. de A., Regis, L., 2008. Ação mutagênica do inseticida organofosforado temefós em células de medula óssea de camundongos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 67, 196–201.
- Miller, M.S., Juchau, M.R., Guengerich, F.P., Nebert, D.W., Raucy, J.L., 1996. Drug metabolic enzymes in developmental toxicology. *Fundam. Appl. Toxicol.* 34, 165–175. <https://doi.org/10.1006/faat.1996.0187>
- Mnif, W., Hassine, A.I.H., Bouaziz, A., Bartegi, A., Thomas, O., Roig, B., 2011. Effect of endocrine disruptor pesticides: A review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 8, 2265–2303. <https://doi.org/10.3390/ijerph8062265>
- Modi, S., Hughes, M., Garrow, A., White, A., 2012. The value of in silico chemistry in the safety assessment of chemicals in the consumer goods and pharmaceutical industries. *Drug Discov. Today*. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2011.10.022>
- Molina-Molina, J.M., Amaya, E., Grimaldi, M., Sáenz, J.M., Real, M., Fernández, M.F., Balaguer, P., Olea, N., 2013. In vitro study on the agonistic and antagonistic activities of bisphenol-S and other bisphenol-A congeners and derivatives via nuclear receptors. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 272, 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.05.015>
- Monticelli, L., Tieleman, D.P., 2013. Force fields for classical molecular dynamics. *Methods Mol. Biol.* 924, 197–213. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-17-5_8
- Morris, G.M., Ruth, H., Lindstrom, W., Sanner, M.F., Belew, R.K., Goodsell, D.S., Olson, A.J., 2009. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* 30, 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
- Mukherjee, S., Mani, S., 2010. Orphan nuclear receptors as targets for drug development. *Pharm. Res.* <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0117-7>
- Murphy, S.D., Cheever, K.L., 1972. Carboxylesterase and cholinesterase inhibition in rats: Abate and interaction with malathion. *Arch. Environ. Health* 24, 107–114. <https://doi.org/10.1080/00039896.1972.10666059>
- Murphy, S.D., L., C.K., Boston, M.S., 1972. Carboxylesterase and Cholinesterase Inhibition in Rats. *Arch Env. Heal.* 24, 107–114.
- Muthusamy, R., Suganya, R., Gowri, M., Shivakumar, M.S., 2013. Biochemical mechanisms of

- organophosphate and pyrethroid resistance in red hairy caterpillar *Amsacta albistriga* (Lepidoptera: Arctiidae). *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* 12, 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2012.06.002>
- Namba, T., Nolte, C.T., Jackrel, J., Grob, D., 1971. Poisoning due to organophosphate insecticides. Acute and chronic manifestations. *Am. J. Med.* 50, 475–492. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(71\)90337-8](https://doi.org/10.1016/0002-9343(71)90337-8)
- National Institute for Occupational Safety and Health, 1997. NIOSH pocket guide to chemical hazards [WWW Document]. URL <https://www.cdc.gov/niosh-rtecs/TF692210.html>
- Nebert, D.W., Russell, D.W., 2002. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* 360, 1155–1162. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)11203-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)11203-7)
- Network International Pesticide Action, 2019. PAN International List of Highly Hazardous Pesticides (PAN List of HHP).
- Ngan, C.-H., Beglov, D., Vajda, S., 2010. The structural basis of pregnane X receptor binding promiscuity. *Biochemistry* 48, 11572–11581. <https://doi.org/10.1021/bi901578n>
- Nicolotti, O., Benfenati, E., Carotti, A., Gadaleta, D., Gissi, A., Mangiatordi, G.F., Novellino, E., 2014. REACH and in silico methods: An attractive opportunity for medicinal chemists. *Drug Discov. Today*. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.06.027>
- Nolan, R.J., Rick, D.L., Freshour, N.L., Saunders, J.H., 1984. Chlorpyrifos: in Human Volunteers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 73, 8–15.
- O’Boyle, N.M., Banck, M., James, C.A., Morley, C., Vandermeersch, T., Hutchison, G.R., 2011. Open Babel: An Open chemical toolbox. *J. Cheminform.* 3, 33. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-3-33>
- OECD, 2007. Guidance document on the validation of (quantitative) structure-activity relationship [QSAR] models. Environment Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment.
- Ojha, A., Srivastava, N., 2014. In vitro studies on organophosphate pesticides induced oxidative DNA damage in rat lymphocytes. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 761, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.01.007>
- Orans, J., Teotico, D.G., Redinbo, M.R., 2005. The nuclear xenobiotic receptor pregnane X receptor: recent insights and new challenges. *Mol. Endocrinol.* 19, 2891–900. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0156>
- PAHO, WHO, 2019. Epidemiological Update Dengue.
- Phang-Lyn, S., Llerena, V.A., 2020. Biochemistry, Biotransformation, StatPearls. StatPearls Publishing.
- Polinsky, R.J., Holmes, K. V., Brown, R.T., Weise, V., 1989. CSF acetylcholinesterase levels are reduced in multiple system atrophy with autonomic failure. *Neurology* 39, 40–44. <https://doi.org/10.1212/wnl.39.1.40>
- Poroikov, V., Filimonov, D., Lagunin, A., Glorizova, T., Zakharov, A., 2007. PASS: Identification of probable targets and mechanisms of toxicity. *SAR QSAR Environ. Res.* 18, 101–110. <https://doi.org/10.1080/10629360601054032>
- Possamai, F.P., Fortunato, J.J., Feier, G., Agostinho, F.R., Quevedo, J., Wilhelm Filho, D., Dal-Pizzol, F., 2007. Oxidative stress after acute and sub-chronic malathion intoxication in Wistar rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 23, 198–204. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2006.09.003>
- Prapamontol, T., Sutan, K., Laoyang, S., Hongsibsong, S., Lee, G., Yano, Y., Hunter, R.E., Ryan, P.B.,

- Barr, D.B., Panuwet, P., 2014. Cross validation of gas chromatography-flame photometric detection and gas chromatography-mass spectrometry methods for measuring dialkylphosphate metabolites of organophosphate pesticides in human urine. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 217, 554–566. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2013.10.005>
- Prieto-Martínez, F.D., Arciniega, M., Medina-Franco, J.L., 2018. Acoplamiento Molecular: Avances Recientes y Retos. *TIP Rev. Espec. en Ciencias Químico-Biológicas* 21, 65–87. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.0.143>
- Raies, A.B., Bajic, V.B., 2016. In silico toxicology: computational methods for the prediction of chemical toxicity. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* 6, 147–172. <https://doi.org/10.1002/wcms.1240>
- Ramos-Flores, Á., Camacho-Hernández, I., Sierra-Santoyo, Adolfo Solís-Heredia, M. de J., Verdín-Betancourt, F.A., Parra-Forero, Lyda Yuliana López-González, M. de L., Hernández-Ochoa, Isabel Quintanilla-Vega, B., 2021. Temephos decreases sperm quality and fertilization rate and is metabolized in rat reproductive tissues at low dose exposure. Submitted.
- Ranjan, A., Chauhan, A., Jindal, T., 2018. In-silico and in-vitro evaluation of human acetylcholinesterase inhibition by organophosphates. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 57, 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.12.014>
- Ray, D.E., Richards, P.G., 2001. The potential for toxic effects of chronic, low-dose exposure to organophosphates. *Toxicol. Lett.* 120, 343–351. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(01\)00266-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(01)00266-1)
- Reegan, A.D., Stalin, A., Paulraj, M.G., Balakrishna, K., Ignacimuthu, S., Al-Dhabi, N.A., 2016. In silico molecular docking of niloticin with acetylcholinesterase 1 (AChE1) of *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae): a promising molecular target. *Med. Chem. Res.* 25, 1411–1419. <https://doi.org/10.1007/s00044-016-1579-x>
- Rigas, M.L., Okino, M.S., Quackenboss, J.J., 2001. Use of a pharmacokinetic model to assess chlorpyrifos exposure and dose in children, based on urinary biomarker measurements. *Toxicol. Sci.* 61, 374–381. <https://doi.org/10.1093/toxsci/61.2.374>
- Rojas-García, A.E., Sordo, M., Vega, L., Quintanilla-Vega, B., Solís-Heredia, M., Ostrosky-Wegman, P., 2009. The Role of Paraoxonase Polymorphisms in the Induction of Micronucleus in Paraoxon-Treated Human Lymphocytes. *Environ. Mol. Mutagen.* 50, 823–829. <https://doi.org/10.1002/em>
- Rovida, C., Hartung, T., 2009. Re-evaluation of animal numbers and costs for in vivo tests to accomplish REACH legislation requirements for chemicals - A report by the transatlantic think tank for toxicology (t 4). *ALTEX* 26, 187–208. <https://doi.org/10.14573/altex.2009.3.187>
- Rudik, A., Dmitriev, A., Lagunin, A., Filimonov, D., Poroikov, V., 2015. SOMP: Web server for in silico prediction of sites of metabolism for drug-like compounds. *Bioinformatics* 31, 2046–2048. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv087>
- Rudik, A. V., Dmitriev, A. V., Lagunin, A.A., Filimonov, D.A., Poroikov, V. V., 2016. Prediction of reacting atoms for the major biotransformation reactions of organic xenobiotics. *J. Cheminform.* 8, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13321-016-0183-x>
- Ruiz Gómez, M.J., Souviron Rodríguez, A., Martínez Morillo, M., 2002. La glicoproteína-P una bomba de membrana que representa una barrera a la quimioterapia de los pacientes con cáncer. *An. Med. Interna* 19, 477–485. <https://doi.org/10.4321/s0212-71992002000900011>

- Rusyn, I., Daston, G.P., 2010. Computational toxicology: Realizing the promise of the toxicity testing in the 21st century. *Environ. Health Perspect.* 118, 1047–1050. <https://doi.org/10.1289/ehp.1001925>
- Sams, C., Mason, H.J., 1999. Detoxification of organophosphates by A-esterases in human serum. *Hum. Exp. Toxicol.* 18, 653–658. <https://doi.org/10.1191/096032799678839581>
- Savas, U., Wester, M.R., Griffin, K.J., Johnson, E.F., Savas, Ü., Wester, M.R., Griffin, K.J., Johnson, E.F., Savas, U., Wester, M.R., Griffin, K.J., Johnson, E.F., 2000. Rabbit pregnane X receptor is activated by rifampicin. *Drug Metab. Dispos.* 28, 529–537.
- Seliskar, M., Rozman, D., 2007. Mammalian cytochromes P450-Importance of tissue specificity. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.09.016>
- Shan, L., Vincent, J., Brunzelle, J.S., Dussault, I., Lin, M., Ianculescu, I., Sherman, M.A., Forman, B.M., Fernandez, E.J., 2004. Structure of the murine constitutive androstane receptor complexed to androsteno: A molecular basis for inverse agonism. *Mol. Cell* 16, 907–917. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.11.037>
- Sharma, A.K., Sharma, D., Chopra, A.K., 2020. An overview of pesticides in the development of agriculture crops. *J. Appl. Nat. Sci.* 12, 101–109. <https://doi.org/10.31018/jans.v12i2.2254>
- Shitara, Y., 2011. Clinical importance of OATP1B1 and OATP1B3 in drugdrug interactions. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 26, 220–227. <https://doi.org/10.2133/dmpk.DMPK-10-RV-094>
- Shurdt, B.A., Barraj, L., Francis, M., 1998. Aggregate exposures under the food quality protection act: An approach using chlorpyrifos. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 28, 165–177. <https://doi.org/10.1006/rtph.1998.1250>
- Silman, I., Sussman, J.L., 2017. Recent developments in structural studies on acetylcholinesterase. *J. Neurochem.* 142, 19–25. <https://doi.org/10.1111/jnc.13992>
- Silva, F.C., Varlamova, E. V, Braga, R.C., Andrade, C.H., 2015. SciForum Development of QSAR Models for Identification of CYP3A4 Substrates and Inhibitors 1, 1–6.
- Simeon, S., Anuwongcharoen, N., Shoombuatong, W., Malik, A.A., Prachayasittikul, V., Wikberg, J.E.S., Nantasenamat, C., 2016. Probing the origins of human acetylcholinesterase inhibition via QSAR modeling and molecular docking. *PeerJ* 2016. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.2322>
- Singh, S., Kumar, V., Singh, P., Banerjee, B.D., Rautela, R.S., Grover, S.S., Rawat, D.S., Pasha, S.T., Jain, S.K., Rai, A., 2012. Influence of CYP2C9, GSTM1, GSTT1 and NAT2 genetic polymorphisms on DNA damage in workers occupationally exposed to organophosphate pesticides. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 741, 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.11.001>
- Singh, S., Kumar, V., Thakur, S., Banerjee, B.D., Chandna, S., Rautela, R.S., Grover, S.S., Rawat, D.S., Pasha, S.T., Jain, S.K., Ichhpujani, R.L., Rai, A., 2011a. DNA damage and cholinesterase activity in occupational workers exposed to pesticides. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 31, 278–285. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2010.11.005>
- Singh, S., Kumar, V., Thakur, S., Banerjee, B.D., Rautela, R.S., Grover, S.S., Rawat, D.S., Pasha, S.T., Jain, S.K., Ichhpujani, R.L., Rai, A., 2011b. Paraoxonase-1 genetic polymorphisms and susceptibility to DNA damage in workers occupationally exposed to organophosphate pesticides. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 252, 130–137. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.01.014>
- Singh, S., Kumar, V., Vashisht, K., Singh, P., Banerjee, B.D., Rautela, R.S., Grover, S.S., Rawat, D.S., Pasha, S.T., Jain, S.K., Rai, A., 2011c. Role of genetic polymorphisms of CYP1A1, CYP3A5,

- CYP2C9, CYP2D6, and PON1 in the modulation of DNA damage in workers occupationally exposed to organophosphate pesticides. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 257, 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.08.021>
- Singhal, R.N., Davies, R.W., 1996. Effects of an organophosphorus insecticide (Temephos) on gametogenesis in the leech *Hirudinaria manillensis* (Hirudinidae). *J. Invertebr. Pathol.* 67, 100–101. <https://doi.org/10.1006/jipa.1996.0014>
- Soreq, H., Seidman, S., 2001. Acetylcholinesterase — new roles for an old actor. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 294–302. <https://doi.org/10.1038/35067589>
- Staudinger, J.L., Goodwin, B., Jones, S.A., Hawkins-Brown, D., MacKenzie, K.I., LaTour, A., Liu, Y., Klaassen, C.D., Brown, K.K., Reinhard, J., Willson, T.M., Koller, B.H., Kliewer, S.A., 2001. The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 3369–3374. <https://doi.org/10.1073/pnas.051551698>
- Sultatos, L.G., 1994. Mammalian toxicology of organophosphorus pesticides. *J. Toxicol. Environ. Health* 43, 271–289. <https://doi.org/10.1080/15287399409531921>
- Sultatos, L.G., Costa, L.G., Murphy, S.D., 1982. Determination of organophosphorus insecticides, their oxygen analogs and metabolites by high pressure liquid chromatography. *Chromatographia* 15, 669–671. <https://doi.org/10.1007/BF02279499>
- Sultatos, L.G., Shao, M., Murphy, S.D., 1984. The role of hepatic biotransformation in mediating the acute toxicity of the phosphorothionate insecticide chlorpyrifos. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 73, 60–68. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(84\)90053-X](https://doi.org/10.1016/0041-008X(84)90053-X)
- Tafari, J., Roberts, J., 1987. Organophosphate poisoning. *Ann. Emerg. Med.* 16, 193–202. [https://doi.org/10.1016/S0196-0644\(87\)80015-X](https://doi.org/10.1016/S0196-0644(87)80015-X)
- Tahara, M., KUBOTA, R., SHIMIZU, K., SUGIMOTO, N., NISHIMURA, T., 2010. Risk Assessment of Fenthion Oxide Derivatives in Aqueous Environment. *J. Water Environ. Technol.* 8, 215–221. <https://doi.org/10.2965/jwet.2010.215>
- Tamura, H., Yoshikawa, H., Gaido, K.W., Ross, S.M., DeLisle, R.K., Welsh, W.J., Richard, A.M., 2003. Interaction of organophosphate pesticides and related compounds with the androgen receptor. *Environ. Health Perspect.* 111, 545–552. <https://doi.org/10.1289/ehp.5671>
- Tang, J., Cao, Y., Rose, R.L., Brimfield, A.A., Dai, D., Goldstein, J.A., Hodgson, E., 2001. Metabolism of chlorpyrifos by human cytochrome p450 isoforms and human, mouse, and rat liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.* 29, 1201–1204.
- Timisit, Y.E., Negishi, M., 2007. CAR and PXR: The xenobiotic-sensing receptors. *Steroids* 72, 231–246. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2006.12.006>
- Torimoto-Katori, N., Huang, R., Kato, H., Ohashi, R., Xia, M., 2017. In Silico Prediction of hPXR Activators Using Structure-Based Pharmacophore Modeling. *J. Pharm. Sci.* 106, 1752–1759. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.03.004>
- Trott, O., Olson, A.J., 2009. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* 31, NA-NA. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
- Tsatsakis, A.M., Barbounis, M.G., Kavalakis, M., Kokkinakis, M., Terzi, I., Tzatzarakis, M.N., 2010. Determination of dialkyl phosphates in human hair for the biomonitoring of Exposure to organophosphate pesticides. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 878, 1246–1252. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.02.021>
- U.S. Environmental Protection Agency, 2020. Chemistry Dashboard [WWW Document]. URL

- <https://comptox.epa.gov/dashboard/DTXSID1032484> (consultado 10.24.19).
- U.S. Environmental Protection Agency, 2011. Temephos Proposed Registration Review Final Decision.
- USEPA, 2010. T.E.S.T. (Toxicity Estimation Software Tool).
- 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 Metab. Dispos.* 32, 333–339. <https://doi.org/10.1124/dmd.32.3.333>
- V. da Costa, G., Ferreira, E.F.B., da S. Ramos, R., B. da Silva, L., M. F. de Sá, E., K. P. da Silva, A., M. Lobato, C., N. P. Souto, R., T. de P. da Silva, C.H., B. Federico, L., M. C. Rosa, J., B. R. dos Santos, C., 2019. Hierarchical Virtual Screening of Potential Insecticides Inhibitors of Acetylcholinesterase and Juvenile Hormone from Temephos. *Pharmaceuticals* 12, 61. <https://doi.org/10.3390/ph12020061>
- Vani, J.M., de Carvalho Schweich, L., de Oliveira, K.R.W., Auharek, S.A., Cunha-Laura, A.L., Antonioli-Silva, A.C.M.B., Nazario, C.E.D., Oliveira, R.J., 2018. Evaluation of the effects of the larvicides temephos on reproductive performance, embryofetal development and DNA integrity of Swiss mice. *Pestic. Biochem. Physiol.* 148, 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.03.010>
- Velki, M., Stepić, S., K. Hackenberger, B., 2013. Effects of formalin on some biomarker activities of earthworms pre-exposed to temephos. *Chemosphere* 90, 2690–2696. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.11.048>
- 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. *Sci. Rep.* 9, 14758. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51261-2>
- Verdín-Betancourt, F.A., Figueroa, M., Soto-Ramos, A.G., de Lourdes López-González, M., Castañeda-Hernández, G., Bernal-Hernández, Y.Y., Rojas-García, A.E., Sierra-Santoyo, A., 2021. Toxicokinetics of temephos after oral administration to adult male rats. *Arch. Toxicol.* 95, 935–947. <https://doi.org/10.1007/s00204-021-02975-8>
- Volkamer, A., Kuhn, D., Grombacher, T., Rippmann, F., Rarey, M., 2012. Combining global and local measures for structure-based druggability predictions. *J. Chem. Inf. Model.* 52, 360–372. <https://doi.org/10.1021/ci200454v>
- Walczak, B., Daszykowski, M., Stanimirova, I., 2010. Robust Methods in Qsar, Recent Advances in QSAR Studies SE - 6. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9783-6_6
- Watkins, R.E., Maglich, J.M., Moore, L.B., Wisely, G.B., Noble, S.M., Davis-Searles, P.R., Lambert, M.H., Kliewer, S.A., Redinbo, M.R., 2003. 2.1 Å crystal structure of human PXR in complex with the St. John's wort compound hyperforin. *Biochemistry* 42, 1430–1438. <https://doi.org/10.1021/bi0268753>
- Watkins, R.E., Noble, S.M., Redinbo, M.R., 2002. Structural insights into the promiscuity and function of the human pregnane X receptor. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 5, 150–8.
- Wheelock, C.E., Shan, G., Ottea, J., 2005. Overview of Carboxylesterases and Their Role in the Metabolism of Insecticides. *J. Pestic. Sci.* 30, 75–83. <https://doi.org/10.1584/jpestics.30.75>
- 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.

- Whyatt, R.M., Barr, D.B., 2001. Measurement of Organophosphate Metabolites in Postpartum Meconium as a Potential Biomarker of Prenatal Exposure: A Validation Study. *Environ. Health Perspect.* 109, 417. <https://doi.org/10.2307/3454902>
- Willson, T.M., Kliewer, S.A., 2002. Pxr, Car and Drug Metabolism. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 259–266. <https://doi.org/10.1038/nrd753>
- Worek, F., Aurbek, N., Thiermann, H., 2007. Reactivation of organophosphate-inhibited human AChE by combinations of obidoxime and HI 6 in vitro. *J. Appl. Toxicol.* 27, 511–518. <https://doi.org/10.1002/jat>
- World Health Organization, 2003. WHO specifications and evaluations for public health pesticides, Temephos.
- Wright, C.I., Geula, C., Mesulam, M. -Marsel, 1993. Neuroglial cholinesterases in the normal brain and in Alzheimer's disease: Relationship to plaques, tangles, and patterns of selective vulnerability. *Ann. Neurol.* 34, 373–384. <https://doi.org/10.1002/ana.410340312>
- Xue, Y., Chao, E., Zuercher, W.J., Willson, T.M., Collins, J.L., Redinbo, M.R., 2007. Crystal structure of the PXR-T1317 complex provides a scaffold to examine the potential for receptor antagonism. *Bioorganic Med. Chem.* 15, 2156–2166. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.12.026>
- Yamashita, F., Hashida, M., 2004. In silico approaches for predicting ADME properties of drugs. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 19, 327–338. <https://doi.org/10.2133/dmpk.19.327>
- Yaméogo, L.L., Crosa, G.G., Samman, J.J., Nabé, K.K., Kondé, F.F., Tholley, D.D., Calamari, D.D., 2001. Long-term assessment of insecticides treatments in West Africa: Aquatic entomofauna. *Chemosphere* 44, 1759–1773. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(00\)00496-3](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(00)00496-3)
- Yang, H., Lou, C., Sun, L., Li, J., Cai, Y., Wang, Z., Li, W., Liu, G., Tang, Y., 2019. AdmetSAR 2.0: Web-service for prediction and optimization of chemical ADMET properties. *Bioinformatics* 35, 1067–1069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty707>
- Yousefinejad, S., Hemmateenejad, B., 2015. Chemometrics tools in QSAR/QSPR studies: A historical perspective. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 149, 177–204. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2015.06.016>
- Zaretski, J., Matlock, M., Swamidass, S.J., 2013. XenoSite: Accurately predicting cyp-mediated sites of metabolism with neural networks. *J. Chem. Inf. Model.* 53, 3373–3383. <https://doi.org/10.1021/ci400518g>
- Zelko, I., Negishi, M., 2000. Phenobarbital-elicited activation of nuclear receptor CAR in induction of cytochrome P450 genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277, 1–6. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3557>
- Zhang, H., LeCulyse, E., Liu, L., Hu, M., Matoney, L., Zhu, W., Yan, B., 1999. Rat Pregnane X Receptor: Molecular Cloning, Tissue Distribution, and Xenobiotic Regulation. *Arch. Biochem. Biophys.* 368, 14–22. <https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1307>
- Zhang, J., Kuehl, P., Green, E.D., Touchman, J.W., Watkins, P.B., Daly, A., Hall, S.D., Maurel, P., Relling, M., Brimer, C., Yasuda, K., Wrighton, S.A., Hancock, M., Kim, R.B., Strom, S., Thummel, K., Russell, C.G., Hudson, J.R., Schuetz, E.G., Boguski, M.S., 2001. The human pregnane X receptor: Genomic structure and identification and functional characterization of natural allelic variants. *Pharmacogenetics* 11, 555–572.

<https://doi.org/10.1097/00008571-200110000-00003>

Zhu, H., 2013. From QSAR to QSIR: Searching for Enhanced Computational Toxicology Models. *Methods Mol Biol* 930, 53–65. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-059-5>

Zimmerman, G., Soreq, H., 2006. Termination and beyond: Acetylcholinesterase as a modulator of synaptic transmission. *Cell Tissue Res.* <https://doi.org/10.1007/s00441-006-0239-8>

8. Productos de la tesis

Artículo científico en la revista Chemical Research in Toxicology.

Human Biotransformation Pathway of Temephos Using an *In Silico* Approach

Andrés Reyes-Chaparro, Francisco Alberto Verdín-Betancourt, and Adolfo Sierra-Santoyo*

Cite This: <https://dx.doi.org/10.1021/acs.chemrestox.0c00105>

Read Online

ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

ABSTRACT: Temephos is an organophosphorothioate (OPT) larvicide used for controlling vectors of diseases such as dengue, chikungunya, and Zika. OPTs require a metabolic activation mediated by cytochrome P540 (CYP) to cause toxic effects, such as acetylcholinesterase (AChE) activity inhibition. There is no information about temephos biotransformation in humans, and it is considered to have low toxicity in mammals. Recent studies have reported that temephos-oxidized derivatives cause AChE inhibition. The aim of this study was to propose the human biotransformation pathway of temephos using *in silico* tools. The metabolic pathway was proposed using the MetaUltra program of MultiCase software as well as the Way2Drug and Xenosite web servers. The results show the following three essential reactions of phase I metabolism: (1) S-oxidation, (2) oxidative desulfurization, and (3) dephosphorylation, as well as the formation of 19 possible intermediary metabolites. Temephos dephosphorylation is the most likely reaction, and it enables phase II metabolism for glucuronidation to be excreted. However, the CYP-dependent metabolism showed that temephos oxon can be formed, which could lead to toxic effects in mammals. CYP2B6, 2C9, and 2C19 are the main isoforms involved in temephos metabolism, and CYP3A4 and 2D6 have minor contributions. According to computational predictions, the highest probability of temephos metabolism is dephosphorylation and phase II reactions that do not produce cholinergic toxic effects; nonetheless, the participation of CYPs is highly possible if the primary reaction is depleted.

