



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Xochimilco

División Ciencias biológicas y de la salud
Licenciatura en química farmacéutica biológica

INFORME FINAL SERVICIO SOCIAL

**“Métodos Electroquímicos como una herramienta
alternativa en el estudio del metabolismo de fármacos”**

Presenta

Angelica Martinez Romero

Matricula

2172035686

Asesores

Dra. Georgina Alarcón Ángeles

Georgina Alarcón Angeles

Dra. María Teresa Ramírez Silva

[Handwritten signature]

Lugar de realización: Departamento de sistemas biológicos área farmacocinética y farmacodinamia

Periodo: 19 de abril 2021 al 19 de octubre 2021

Índice

Resumen	2
Introducción	3
Objetivos:	4
General:	4
Específicos:	4
Metodología	5
Fundamentos metabolismo de fármacos	6
Fases del metabolismo	8
Reacciones de fase I	8
Reacciones de fase II.	9
Enzimas metabolizadoras de fármacos	10
Citocromo P450 (CYP450)	11
Otras enzimas distintas al CYP450	12
las UDP-glucuroniltransferasas (UGT)	12
Aspectos para considerar en el metabolismo de fármacos in-vitro	13
Farmacocinética y farmacodinamia	13
Métodos convencionales	14
Microsomas hepáticas	14
Fracciones S9	16
Hepatocitos	17
Modelos de cultivo 3D: Esferoide de hepatocitos humanos primarios	18
Métodos electroquímicos	19
Métodos directos	20
Métodos electroquímicos indirectos	24
Biosensores enzimáticos	24
Biosensor electroquímico basado en enzimas	25
Parámetros para considerar en el estudio de metabolismo de fármacos	31
Nanotecnología	32

Retos en el estudio de los metabolitos in-vitro	35
Bibliografía	37

Resumen

En este proyecto se realizó una búsqueda bibliográfica sobre los métodos electroquímicos usados como una herramienta alternativa en el estudio del metabolismo de fármacos, se inició con los fundamentos generales del metabolismo para entender mejor el proceso que se lleva a cabo y sus principales enzimas metabolizadoras encontrando que la más importante es el CYP450. En este informe se mencionan los diferentes métodos convencionales usados para el estudio del metabolismo como los son los de microsomas hepáticos, fracciones S9, hepatocitos y otros más complejos como los modelos 3d de cultivo, describiendo de manera general estos métodos, mencionando sus ventajas y desventajas. También se describen y muestran ejemplos de los nuevos métodos electroquímicos que facilitan más el estudio del metabolismo siendo menos costosos y requiriendo menor tiempo en comparación con los convencionales, como lo son los biosensores enzimáticos, métodos que emplea la electroquímica acoplada en línea con espectroscopia de masas (EC/MS), electroquímica acoplada a cromatografía líquida- espectrometría de masas (EC / LC / MS) o métodos como el chip electroquímico de microfluídica. Después se mencionan los parámetros a considerar para proporcionar mejores resultados en el estudio y se da un ejemplo de la nueva investigación usando el acoplamiento de la nanotecnología con la electroquímica. Por último se presentan los retos que todavía se tienen en el estudio de los metabolitos in-vitro para mejorar la simulación del metabolismo.

Introducción

Este proyecto se enfocará en estudiar el metabolismo de los fármacos a través de métodos electroquímicos, durante el desarrollo de fármacos es muy importante el conocimiento de las vías metabólicas y el metabolismo de fármacos para explicar las rutas de degradación de nuevos compuestos activos y sustancias potencialmente tóxicas. (Portychová & Schug, 2017), el conocimiento a tiempo sobre los efectos farmacológicos y toxicológicos de los metabolitos de fármacos es deseable para evaluar su biodisponibilidad, actividad y perfiles de seguridad en humanos (Potęga et al., 2021).

En la actualidad existen muchos métodos in-vitro para el estudio del metabolismo, como se sabe la mayoría de los ingredientes farmacéuticos activos son transformados oxidativamente por el hígado en metabolitos, por lo que estos métodos se encargan de simular los procesos en el hígado humano, para lograr esto se requieren de las principales enzimas metabolizadoras de fármacos como el citocromo P450 (CYP), por lo que el enfoque principal para la identificación de compuestos terapéuticos útiles es la actividad metabólica de estas enzimas hepáticas (Krishnan., 2020). Debido a esto los estudios a menudo se basan en la incubación de fármacos con hepatocitos primarios, homogeneizados de hígado con enzimas hepáticas, y principalmente en microsomas hepáticos humanos o de rata. Esta es una de las aplicaciones más estudiadas y documentadas, sin embargo, estas estrategias son relativamente complejas, caras y requieren mucho tiempo. (Portychová & Schug., 2017).

Es por esto que se han establecido otros métodos de investigación, alternativos a los de materiales biológicos, para predecir el metabolismo de los fármacos. Uno de ellos es la electroquímica acoplada en línea con la espectrometría de masas (EC / MS) la cual es una técnica no enzimática que ha mostrado resultados muy prometedores en la generación de una variedad de metabolitos (Potęga et al., 2021). Debido a que la reactividad de una biomolécula o un fármaco a menudo se observa a través de la actividad de una enzima, las enzimas redox están siendo de gran importancia en muchas investigaciones electroquímicas, las cuales

comenzaron a partir de enfoques electroquímicos llevados a cabo directamente en estas enzimas (Buriez & Labbé., 2020). También se exploran los biosensores inspirados en la nanotecnología de los CYP o los microsomas hepáticos humanos para la biodetección de fármacos y la producción mejorada de metabolitos. (Krishnan., 2020). Aunque la electroquímica, se introdujo originalmente para producir metabolitos o para caracterizar los estados redox y la reactividad de una enzima específica, en la actualidad se ha considerado utilizar para describir el paso a paso de las vías metabólicas (Buriez & Labbé., 2020). De acuerdo con lo mencionado anteriormente este proyecto busca ayudar a mejorar los conocimientos y aplicación de los métodos electroquímicos actuales relacionados con el estudio del metabolismo de fármacos in-vitro.

Objetivos:

General:

Revisar los métodos electroquímicos para producción de metabolitos de fármacos.

Específicos:

- Discutir los fundamentos del metabolismo de los fármacos
- Estudiar los aspectos para la producción de metabolitos de los fármacos in vitro
- Revisar los procedimientos de métodos analíticos convencionales para el estudio de metabolismo de fármacos.
- Investigar sobre las ventajas y procedimientos para llevar a cabo los métodos electroquímicos en la obtención de los metabolitos
- Analizar los parámetros importantes en la obtención de los metabolitos por métodos electroquímicos
- Resaltar el impacto de la nanotecnología en el desarrollo del metabolismo in vitro
- Determinar los retos en el desarrollo de los metabolitos in vitro

Metodología

En este trabajo de investigación documental, se pretende obtener, revisar, analizar, interpretar y comparar información, mediante una revisión bibliográfica, utilizando base de datos como Bidi UAM, Google Scholar, SCOPUS, Science Direct, SciELO, Science Finder, Web of Science, Elsevier.

Se buscarán y utilizarán artículos recientes con no más de 5 años de antigüedad dando prioridad a los de años más recientes. También se dará prioridad a editoriales de revistas reconocidas.

Palabras claves que se incluirán en las búsquedas, en inglés y español, son:

- Inglés: cytochrome p450, metabolite, drug metabolism, electrochemical methods, electrochemistry, biosensors, electrolysis, in-vitro.
- Español: citocromo P450, metabolito, metabolismo de fármacos, métodos electroquímicos, electroquímica, biosensores, electrolisis, in-vitro.

Fundamentos metabolismo de fármacos

El destino de un fármaco en un organismo a menudo se describe en la farmacocinética mediante el acrónimo ADME o, más exactamente, LADME refiriéndose a la liberación, absorción, distribución, metabolismo, excreción (*figura 1*), este va a ser el proceso por el que tiene que pasar un fármaco al entrar en el organismo. (Buriez., 2020). Como se menciona el metabolismo es uno de los cuatro parámetros farmacocinéticos (Khan & Philip., 2018) mediante el cual los fármacos lipofílicos se convierten en productos hidrofílicos facilitando su eliminación, siendo un proceso de biotransformación complejo en el que los fármacos se modifican estructuralmente a diferentes moléculas con ayuda de diversas enzimas metabolizadoras (Zhang & Tang., 2018). Generalmente un fármaco se metaboliza de forma secuencial una vez administrado el fármaco original (activo), inicialmente se convierte en un metabolito primario el cual puede tener una segunda biotransformación generando un metabolito (Talevi & Quiroga., 2018). Este proceso se lleva a cabo principalmente en el retículo endoplásmico liso de las células hepáticas, pero también se puede producir en otros sitios en menor medida como son en las células epiteliales del tracto gastrointestinal, la piel, los riñones y los pulmones (Khan & Philip., 2018).

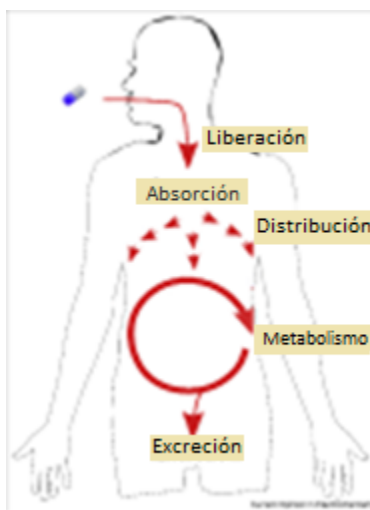


Figura 1 : Proceso ADME que lleva a cabo un fármaco al ingresar al organismo.

Buriez & Labbé. 2020. Adaptado con permiso de Elsevier

El metabolismo se encarga principalmente de eliminar las moléculas endógenas y exógenas del organismo. (Abdulhameed et al., 2017), generando que los fármacos se vuelven más polares, ionizables y, por tanto, más solubles en agua produciendo una mejor eliminación, además se encarga de llevar a cabo la desactivación es decir la desintoxicación (Khan & Philip., 2018). Además de la modificación fisicoquímica del fármaco administrado los metabolitos resultantes generalmente se inactivan o tienen una actividad menor pero en ciertos casos también pueden ser farmacológicamente activos (Talevi & Quiroga., 2018), generando metabolitos activos con actividad farmacológica similar o mayor ,esto mediante un proceso de bioactivación generando un producto metabólico con actividad contra la misma diana farmacológica que la molécula madre (Hrynychak et al., 2017).También en algunos casos, el metabolismo puede convertir los fármacos en metabolitos o intermedios químicamente reactivos, debido a una alta electrofilia, esos metabolitos reactivos pueden reaccionar con componentes de proteínas celulares , ADN, o incluso las enzimas metabolizadoras (que catalizan la formación de metabolitos reactivos) y pueden alterar las funciones celulares normales o desencadenar respuestas inmunes secuenciales causando toxicidad. (Zhang & Tang., 2018).

Como se comentó anteriormente los medicamentos se convierten en varios metabolitos al metabolizar las enzimas en el cuerpo , a continuación, se muestra una lista de los diferentes productos que se puede producir durante el metabolismo de fármacos:

- Inactivación o desintoxicación del fármaco.
- Metabolito (s) con actividad similar.
- Metabolito con actividad diferente.
- Intoxicación por drogas.
- Activación de drogas.

- Metabolito con una actividad farmacológica completamente nueva (Khan & Philip., 2018).

La generación de metabolitos activos o metabolitos tóxicos pueden provocar importantes efectos secundarios por lo que es importante conocer los mecanismos de biotransformación de nuevos candidatos a fármaco, la identificación de metabolitos ayudará a eliminar los candidatos inapropiados en un etapa temprana, antes de seguir con las fases de desarrollo más costosas. Por medio del estudio del metabolismo de fármacos nos permite explicar la activación metabólica así como las rutas de desactivación de nuevos compuestos biológicamente activos, especialmente con respecto a su posible toxicidad (Potega et al., 2019), es decir, se encarga de determinar los efectos farmacológicos y toxicológicos de un fármaco en humanos. Siendo procesos clave para mejorar los compuestos principales, obtener propiedades óptimas, identificar nuevas entidades químicas basadas en el hallazgo de metabolitos activos, minimizar las posibles responsabilidades de seguridad debido a la formación de metabolitos reactivos o tóxicos (Zhang & Tang., 2018).

- **Fases del metabolismo**

El metabolismo o biotransformación de fármacos por enzimas metabolizadoras se puede clasificar en reacciones de fase I o reacciones de funcionalización y fase II o reacciones de conjugación (Li et al., 2018). La mayoría de los ingredientes farmacéuticos activos son oxidativamente transformado por el hígado en metabolitos produciendo reacciones de biotransformación en el hígado conduciendo principalmente a la hidrólisis u oxidación (fármaco de fase 1 del metabolismo) y reacciones biosintéticas que conjugan metabolismo con glutatión, sulfatos, aminoácidos o acetatos (fase-2 metabolismo de fármacos, conduce a metabolitos desactivados) (Gutmann et al., 2020).

- **Reacciones de fase I**

Se reconoce como las reacciones de funcionalización, en esta fase se suele transformar un fármaco en otro más soluble y fácil de eliminar, durante esta fase

del metabolismo se llevan a cabo reacciones de oxidación, reducción, hidrólisis e hidratación (Hrynchak et al., 2017), donde las reacciones enzimáticas introducen grupos funcionales, como pueden ser grupos -O-, -OH, -COOH, -NH₂ o -SH y mediante la adición de estos grupos funcionales puede alterar significativamente las propiedades biológicas del fármaco o no encontrar una mejora drástica en la solubilidad acuosa del fármaco. Por lo tanto, las reacciones de fase I alteran la actividad farmacológica y pueden producir metabolitos del fármaco biológicamente inactivos, activos o incluso tóxicos. (Khan & Philip., 2018). Produciendo metabolitos químicamente similares aunque son distintos químicamente al fármaco original tienen una actividad similar al compuesto original y en ocasiones se puede tener un metabolito con mayor potencia que el fármaco original (Talevi & Quiroga.,2018).

En esta fase I del metabolismo las enzimas metabolizadoras de fármacos más comunes que participan son las de la superfamilia CYP450 (tabla 2) desempeñando un papel importante en las reacciones permitiendo la modificación químicamente de los fármacos. (Abdulhameed et al., 2017) (Hrynchak et al., 2017).

Tabla 1 Principales enzimas de la superfamilia del CYP450

Enzima	Fármacos
CYP3A4	Diazepam , eritromicina
CYP2D6	Amitriptilina, dextrometorfano
CYP2C9	Naproxeno, warfarina
CYP1A2	Paracetamol, cafeína
CYP2C19	Omeprazol , mefenitoína

(Talevi & Quiroga., 2018: Rocamora., 2021: Li et al., 2019)

o **Reacciones de fase II.**

La fase II del metabolismo son conocidas como reacciones de conjugación llevando se acabó reacciones de glucuronidación, sulfatación, conjugación de aminoácidos, acetilación, metilación o conjugación de glutatión con ello se facilita

la eliminación (Hrynychak et al., 2017). Generando productos farmacológicamente inactivos y químicamente no reactivos generando solo un 10% de metabolitos tóxicos. En esta etapa el fármaco o sus metabolitos forman conjugados con sustancia endógenas de pequeño polar produciendo metabolitos más hidrófilos y grandes que no son capaces de difundirse a través de la membrana celular necesitando de cofactores. (Khan & Philip., 2018 ; Talevi & Quiroga., 2018). Durante esta fase las enzimas más comunes que participan se presentan en la tabla a continuación.

Tabla 2 Principales enzimas de la fase II metabolismo.

Enzima	Tipo de reacción	Fármaco
UDP-glucuronosiltransferasas (UGT)	Glucuronidación	Oxazepam, Acetaminofeno
Sulfotransferasas (SULT)	Sulfonación	Acetaminofeno, Tibolona, budesonida
N-acetiltransferasas (NAT),	Acetilación	Isonazina, hidracina
Catecol O-metiltransferasas (COMT)	metilación	Noradrenalina, dopamina
Glutación S-transferasas (GST)	Conjugación de glutatión	Ácido etacrínico
Transferasas de glicina	Conjugación de glicina	

(Talevi & Quiroga., 2018: Rocamora., 2021: Li et al., 2019).

Enzimas metabolizadoras de fármacos

Como se ha mencionado, la mayoría de los fármacos se eliminan principalmente del organismo mediante procesos de metabolización mediados por enzimas (Zhang & Tang., 2018). Existen diferentes clases de enzimas que catalizan diferentes pasos de las vías metabólicas y estas enzimas catalizan la

biotransformación de los xenobióticos, incluidos los fármacos (Hrynychak et al., 2017). Las enzimas metabolizadoras de fármacos median el metabolismo de sustancias exógenas y endógenas. A través de la transformación metabólica la mayoría de los fármacos pierden sus actividades farmacológicas. Por tanto, las enzimas metabolizadoras juegan un papel extremadamente importante en el control de la farmacocinética (Li et al., 2018). A continuación, se resumen algunas de las enzimas más comunes en el metabolismo de fármacos durante la fase 1 y la fase 2.

- **Citocromo P450 (CYP450)**

Los citocromos P450 (CYP) pertenecen a la superfamilia de hemetiolato mono oxigenasas, que cataliza la biotransformación de más de 200,000 sustancias químicas. Las enzimas CYP juegan un papel importante en la desintoxicación de compuestos bioactivos exógenos, xenobióticos hidrófobos (carcinógenos, fármacos, contaminantes ambientales, complementos alimenticios, medicamentos, productos vegetales) y en la biotransformación de compuestos bioactivos endógenos (aminoácidos, colesterol, eicosanoides, ácidos grasos saturados / insaturados, melatonina, esteroides) (Shumyantseva et al., 2018).El CYP450 es el sistema metabolizador de fármacos de fase 1 más importante participando en la eliminación del 70 al 85 % de los fármacos conocidos (Talevi & Quiroga., 2018). Se encuentran principalmente en la membrana interna de las mitocondrias o en el retículo endoplásmico liso (Li et al., 2019) de los hepatocitos principalmente y de los epitelios del intestino delgado, y en menor medida en los túbulos proximales de los riñones. Pero también se distribuyen a través de varios tejidos y órganos, incluidas las células de sangre periférica, plaquetas, aorta, glándulas suprarrenales, tejidos adiposos, tejido nasal, tejidos vaginales, vesículas seminales, cerebro, pulmón, riñones, intestino e hígado. Siendo los cuatro últimos los que tienen mayor nivel de expresión de esta enzima (Abdulhameed et al., 2017).

Las CYP son una clase de enzimas que catalizan una variedad de biotransformaciones oxidativas y reductoras, que incluyen hidroxilación de

carbono, oxidación de heteroátomos, oxidación de enlaces, desaturación de hidrocarburos, deshalogenación de halocarbonos (Zhang & Tang., 2018), siendo la oxidación la reacción principal en este proceso, en donde el oxígeno molecular (O_2) se utiliza como aceptor de electrones formando agua (H_2O) o peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como subproductos (Khan & Philip., 2018).

- **Otras enzimas distintas al CYP450**

La contribución de las enzimas distintas del P450 al metabolismo de los fármacos puede ser significativa y afectar el desarrollo general de los fármacos. Las enzimas no CYP se pueden dividir en cuatro categorías generales: oxidativas, reductoras, conjugativas e hidrolíticas. Las enzimas oxidativas no CYP incluyen monooxigenasas que contienen flavina (FMO), monoamino oxidasas (MAO), peroxidasas, xantina oxidasas (XO), aldehído oxidasa (AO), alcohol deshidrogenasa (ADH) y aldehído deshidrogenasa (ALDH) (Li et al., 2019).

- **las UDP-glucuroniltransferasas (UGT)**

Las UDP-glucuroniltransferasas (UGT) son una familia de enzimas unidas al retículo endoplásmico que son responsables del proceso de glucuronidación, (Li et al., 2019) la cual es la principal vía del metabolismo de los fármacos de fase II, y aproximadamente entre el 40% y el 70% de los compuestos humanos endógenos y exógenos se conjugan con productos finales glucuronidados. La actividad funcional de las UGT está controlada por la cantidad de enzimas disponibles. y la cantidad de cosustrato disponible para conjugar el fármaco o el metabolito (Abdulhameed., 2017).

Las UGT humanas incluyen 22 enzimas funcionales diferentes y se clasifican en cuatro familias de genes, UGT1, UGT2, UGT3 y UGT8 . Las familias UGT1 y UGT2 son principalmente enzimas involucradas en la glucuronidación de fármacos, mientras que la contribución de las familias UGT3 y UGT8 al metabolismo de fármacos es mínima (Li et al., 2019).

Aspectos para considerar en el metabolismo de fármacos in-vitro

- **Farmacocinética y farmacodinamia**

La farmacocinética (PK) se encarga del estudio cualitativo de todo el proceso ADME por lo que es indispensable para establecer las relaciones y los mecanismos subyacentes de un fármaco con sus actividades y beneficios clínicos (Li et al., 2019). En los estudios farmacocinéticos *in vitro* generalmente se utilizan varios modelos de líneas celulares cultivada utilizando en la investigación del metabolismo hepatocitos (Jaroch et al., 2018), lo que nos permitiendo obtener información sobre el comportamiento farmacocinético in vivo de una molécula antes de realizarlos un estudio in vivo ,siendo importantes para el diseño de nuevas moléculas,(Rock & Foti., 2019)

Durante los estudios in-vitro se determina la solubilidad cinética en diferentes tampones, estabilidad metabólica en microsomas hepáticos, inhibición de CYP en microsomas hepáticos, permeabilidad, perfiles preliminares en hepatocitos (Shankar & Vuppu, 2020). Un aspecto importante en la farmacocinética in-vitro es el aclaramiento el cual es evaluado con diferentes modelos basados en células .Todo esto se estudia para comprender los parámetros farmacocinéticos de un medicamento (Jaroch et al., 2018). Siendo el estudio del metabolismo un proceso muy importante para mejorar los compuestos principales obteniendo propiedades óptimas de PK / PD, mediante estos estudios poder identificar nuevas entidades químicas basadas en el a partir del conocimiento de activos, minimizar las posibles responsabilidades de seguridad debido a la formación de metabolitos reactivos o tóxicos (Zhang & Tang., 2018)

Para el control de la farmacocinética son importantes las enzimas y transportadores metabolizadores de fármacos. También los factores transcripcionales y postranscripcionales, como los receptores nucleares y los ARN no codificantes (ncRNA), son fundamentales en la PK por que nos permite resolver problemas farmacocinéticos debido a que nos proporcionan información detallada sobre la comprensión de los mecanismos reguladores .Estos estudios de

farmacocinética pueden mejorar el éxito del desarrollo de fármacos relacionados con su eficacia y seguridad y mejorar el uso racional de los medicamentos en la práctica clínica (Li et al., 2019)

Métodos convencionales

Existen varias técnicas metabólicas in vitro, para activar o simular el metabolismo que se lleva a cabo en el hígado humano mediante estos estudios se imitan la acción de un grupo fundamental de proteínas hepáticas conocidas como enzimas metabolizadoras de fármacos (DEM) (Ooka et al., 2020), siendo los sistemas biocatalíticos por fracciones subcelulares los más versátiles para generar metabolitos (Shanu-Wilson et al., 2020)

Uno de los métodos mejor establecidos se basa generalmente en enzimas CYP que se originan en el hígado (Portychová & Schug., 2017), con los cuales se puede evaluar la biotransformación hepática in vitro , incluida la biotransformación tanto de fase I como de fase II, esto mediante diferentes modelos, que se pueden agrupar en función de si se utiliza un método de células enteras o de fracciones subcelulares, en las primeras se utilizan hepatocitos, rodajas de hígado o hígado perfundido aislado, en las segundas están incluidos microsomas hepáticos, fracciones citosólicas ,fracción S9 y enzimas recombinantes expresadas por ADNc (Peeters et al., 2020: Rahman et al., 2019).Pero uno de los modelos más utilizados son los microsomas hepáticas (HLM) (Portychová & Schug., 2017)

- **Microsomas hepáticas**

Son utilizados generalmente para estudiar la actividad de importantes enzimas hepáticas metabolizadoras de fármacos como el citocromo P450 (fase I) y las UGT (fase II) (Horspool et al., 2020) debido a que son las enzimas responsables del metabolismo de la mayoría de los fármacos (Ooka et al., 2020).

Estos estudios se basan en la incubación de fármacos con microsomas hepáticos humanos o de rata en donde posteriormente se realiza el aislamiento y detección de los productos metabólicos. (Portychová & Schug., 2017). Se realiza la

incubación in-vitro del compuesto principal con microsomas de hígado humano en distintos intervalos de tiempo. Primero se prepara una solución la cual contiene microsomas y un tampón adecuado, posterior a esto se inicia la reacción añadiendo cofactor (ejemplo NADPH) y el fármaco, después se realiza una pre-incubación y se añade NADPH para iniciar la reacción enzimática. Luego se detiene la reacción a distintos intervalos de tiempo (ejemplo 0,15,30,45,60,90,120 min) mediante la adición de metanol y se realiza un proceso de ultracentrifuga a las suspensiones de HLM para eliminar reactivos y contaminantes separando las HLM de la solución de incubación y por último es analizada por UPCL para la detección de metabolitos. (Husain et al., 2021; Horspool et al., 2020).

Este método tiene la ventaja de tener un costo bajo y con una buena calidad debido al aumento de productos HLM disponibles en el mercado (Horspool et al., 2020), otra ventaja es que tiene una vida útil larga logrando su conservación hasta 10 años a una temperatura -70°C , también muestran menor citotoxicidad facilitando la aplicación en sistemas de alto rendimiento (HTS). Una deficiencia es que requiere de cofactores para activar su metabolismo (Ooka et al., 2020). También un punto importante a considerar en este estudio es la concentración óptima a utilizar de proteína HLM para aumentar la actividad enzimática y disminuir la unión inespecífica, al igual también cuidar la duración de la incubación para evitar efectos de auto inactivaciones (Horspool et al., 2020)

También se han utilizados modelos combinados de microsomas hepático junto con fracciones citosólicas (*figura 2*) para simular la biotransformación en donde se utilizó los microsomas hepáticos humanos en la biotransformación de fase I y después se realiza una incubación secundaria con fracciones microsomales o citosólicas para conjugaciones de fase II, en el cual se encontró que los metabolitos de fase I de incubaciones de HLM también podrían identificarse en incubaciones con fracciones S9, aunque en concentraciones más bajas debido a que HLM tienen mayor concentración de CYP (Peeters et al., 2020)

- **Fracciones S9**

Usadas para simular de manera in-vitro la biotransformación hepática imitando las reacciones tanto de fase I y II. Este método se realiza utilizando fracciones S9 humanas combinadas, iniciando con la mezcla de un tampón adecuado, fracciones S9 de hígado humano y la sustancia de prueba. Posteriormente se comienza la reacción añadiendo un sistema de regeneración de NADPH, también se puede añadir un reactivo a la mezcla de reacción para aumentar la permeabilidad y mejorar las reacciones de glucuronidación de fase II como puede ser la alameticina. Luego se añade cofactores después de determinados tiempos (5,60,120 min) para exponer la mezcla a la conjugación de fase II. Después de 1 o 3 horas la reacción se inhibe añadiendo un reactivo (ejemplo acetonitrilo) y se almacena en tubos de hielo. Posteriormente, los tubos se centrifugaron y se recoge el sobrenadante, por último se analiza mediante cromatografía líquida /espectroscopia de masas (LC-MS) *Figura 2* (Peeters et al., 2020)

La fracción S9 actualmente es una buena opción para los estudios de metabolismo in vitro ya que contiene la mayoría de las enzimas importantes que metabolizan los fármacos (Jyrkäs & Tolonen., 2021) incluyendo enzimas metabólicas como CYP,UGT, aldehído oxidasa, sulfotransferasas, metiltransferasas, glutatión transferasas y N-acetil transferasa , ofreciendo un mejor perfil metabólico en comparación con los microsomas o fracciones citosólicas (Ooka et al., 2020), teniendo una representación más completa del perfil metabólico debido a que combina la actividad de la Fase I y II, lo que reduce los costos y el tiempo de análisis siendo un método favorable (Peeters et al., 2020) , otro punto a favor es que las enzimas puede estudiarse alterando los cofactores en la incubación (Jyrkäs & Tolonen., 2021).Pero una desventajas es que requiere de pasos de lavado adicionales para evitar daños celulares dificultando que se utilizado para protocolos de alto rendimiento (Ooka et al., 2020) y también se a encontrado que tiene una menor actividad enzimática en comparación con los microsomas o el citosol, por lo que algunos metabolitos pueden pasarse por alto (Peeters et al., 2020)

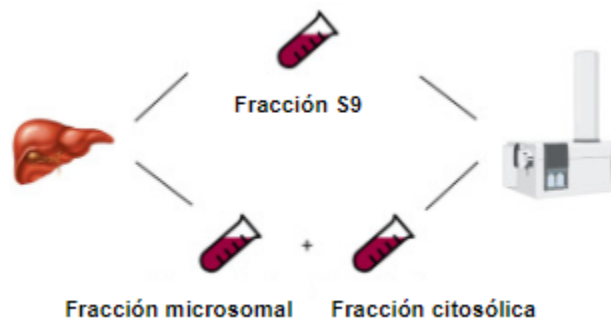


Figura 2 Esquema de los modelos de fracciones subcelulares utilizando fracciones S9 y microsomas hepáticas. Peeters et al. 2020. Adaptado con permiso de Elsevier

- **Hepatocitos**

El uso de modelos *in vitro* como son los cultivos celulares son importante para el descubrimiento de nuevos fármacos. Los modelos de ensayo de hepatocitos 2D son utilizados para analizar el metabolismo y excreción de un fármaco *figura 3*, siendo los cultivos adherentes de hepatocitos humanos (PHH) primario el modelo de primera elección para los estudios del metabolismo. Debido a que los hepatocitos primarios *crio* preservados conservan la actividad de las enzimas del metabolismo de fase I y fase II (Milner et al., 2020; Jaroch et al., 2018).

Este método se inicia descongelando los hepatocitos de humanos *crio* conservados después las células se centrifugan para obtener un sedimento de hepatocitos, el cual se transfiere a un medio. Los compuestos de estudio se pre incubaron en un medio de incubación durante 6 min a 37° y las reacciones se inician mezclando las células y el medio del compuesto a estudiar obteniendo la solución final la cual se incuba, posteriormente las muestras se recolectan en distintos puntos de tiempo (0 min, 10 min, 20 min, 40 min y 60 min) y la reacción se termina mediante la adición de dos veces el volumen de acetonitrilo frío. Por último, se centrifugó cada muestra y se recogió el sobrenadante para su análisis mediante el método UPLC / HR-MS (Jyrkäs & Tolonen., 2021).

Los principales beneficios de esta técnica son la elevada actividad específica del hígado, la expresión de las enzimas CYP y fase II, la inducible a corto plazo de las enzimas CYP y la transferencia eficaz de datos de hepatocitos humanos (Milner et al., 2020). Los PHH son un tipo de célula fisiológicamente relevante que exhibe todas las enzimas, cofactores y transportadores característicos, teniendo unas capacidades para realizar pruebas de alto rendimiento. Sin embargo, los monocultivos de PHH muestran una rápida disminución de la capacidad metabólica (Kanebratt et al., 2021) , también el tiempo para la producción de metabolitos puede ser larga y no todos los metabolitos son fácilmente identificable (Shanu-Wilson et al., 2020)

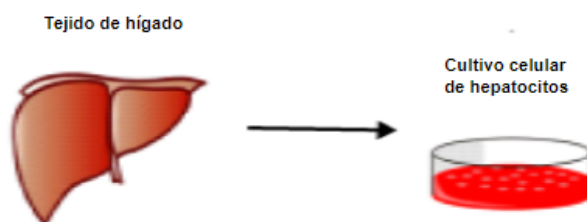


Figura 3 Esquema modelo de cultivo celular de hepatocitos

- **Modelos de cultivo 3D: Esferoide de hepatocitos humanos primarios**

En este método las células como hepatocitos se cultivan en esferoides para crear un sistema fisiológicamente más importante representando mejor lo que pasa de manera in-vivo (Ooka et al., 2020)

Para este método se utilizan placas de 96 pocillos procesadas para la formación de esferoides. Primero se inicia descongelando los hepatocitos y se agregando a un medio de siembra normoglucémico, luego las células se siembran en las placas de unión ultra baja de 96 pocillos y se realiza una incubación manteniendo los esferoides en medio libre de suero hasta el día 22 después de la siembra, en este momento los hepatocitos forman esferoides con una morfología celular adecuada con niveles de expresión de ARNm de múltiples enzimas metabolizadoras de fármacos. Luego los esferoides se colocan junto con una solución que contiene las sustancias de prueba disueltas en su disolvente correspondiente, posteriormente se

incuba en pocillos separados y se toman muestras a 5 intervalos distintos de tiempo añadiendo una solución de parada (acetonitrilo enfriado con hielo) para la inactivación y se centrifuga. Por último, los metabolitos se analizan a distintos tiempos (ejemplo 2 y 7 días de exposición al fármaco) mediante Cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem (LC-MS / MS) (Kanebratt et al., 2021; Mizoi et al., 2020). Con este método la actividad metabólica de CYP es mayor que en modelos 2d, pero una desventaja es que el costo es mayor y sus resultados son menos reproducibles que con cultivos 2D (Ooka et al., 2020)

Todos estos métodos son utilizados con mayor frecuencia en la actualidad para el estudio del metabolismo de fármacos durante el descubrimiento de nuevos medicamentos debido a que nos brindan información sobre el metabolismo de un fármaco que se lleva a cabo en el cuerpo, pero tienen sus limitaciones como es que en ninguno de los casos se puede tener una cantidad preparativa del metabolito, por lo que se han empezado a utilizar otros métodos como son los métodos electroquímicos.

Métodos electroquímicos

Son métodos de investigación alternativos a los de materiales biológicos, utilizados para simular el metabolismo de los fármacos, los cuales se han desarrollado debido a los inconvenientes que tienen los métodos convencionales siendo estos relativamente complejas, caras y requieren mucho tiempo. Con el desarrollo de los métodos electroquímicos se pueden simular reacciones de metabolismo de fase I catalizadas por las enzimas del citocromo P450 (CYP450) superando los inconvenientes de los métodos convencionales. (Potęga et al., 2021; Zhu et al., 2018). Estos sistemas de oxidación electroquímica imitan con éxito las reacciones catalizadas por CYP450, como N-desalquilación, S-oxidación, P-oxidación, oxidación de alcohol, deshidrogenación e hidroxilación de anillos aromáticos que contienen grupos donantes de electrones.

- **Métodos directos**

Es un método que emplea la electroquímica acoplada en línea con la espectrometría de masas (EC / MS) siendo muy importante debido a que mediante la combinación de la electroquímica (EC) acoplada en línea con espectrometría de masas (MS) permite a través de una celda electroquímica generar una serie de metabolitos incluyendo metabolitos reactivos que por medio de la espectroscopia de masa puede ser detectados (figura 4)(Potęga et al., 2021; Potęga et al., 2020). Esto a través de una síntesis electroquímica, en donde se pasa una corriente eléctrica a través de una solución conductora para transformar una estructura orgánica en otra (Rahman et al., 2019).

En un estudio donde se identifica metabolitos electroquímicos, de tres fármacos cardiovasculares utilizaron la combinación en línea de electroquímica y espectrometría de masas (EC-MS) para monitorear los productos de degradación. El procedimiento se realizó con una configuración directa *que* consta de una celda electroquímica equipada con un electrodo de trabajo (diamante dopado con boro electrodo (MD), carbono vítreo (GC), oro (Au) o platino (Pt)), uno de referencia dependiente del electrodo (Pd / H₂) y un electrodo auxiliar de grafito, acoplada directamente a un espectrómetro de masas con ionización por electropulverización (ESI/MS). También se utilizó un tampón adecuado en ese estudio usando formiato de amonio como electrolito óptimo el cual permite conducir la corriente eléctrica. Posteriormente la solución de analito se bombeó a través de la celda amperométrica de capa fina a flujo bombeando la cantidad de 2–10 µL / min, y a la salida de la celda se conectó directamente al ESI-MS, mediante un aumento continuo de voltaje al electrodo de trabajo (en este caso de 0 a 3000 mV a una velocidad de 10m (V/s) se va registrando los espectros de cada producto electroquímico generado.(Szultka-Młyńska et al., 2018).

Este método permite realizar estudios completos sobre el metabolismo y toxicología del fármaco encontrando buenos resultados en la generación de distintos metabolitos(Potęga et al., 2021). Aunque la simulación electroquímica no

puede predecir perfectamente el metabolismo real de la fase I, el enfoque basado en la CE tiene el potencial de imitar la mayoría de las reacciones del metabolismo oxidativo (Zhu et al., 2018) generando una aproximación a lo que ocurre in-vivo en el cuerpo humano (Szultka-Młyńska et al., 2018).

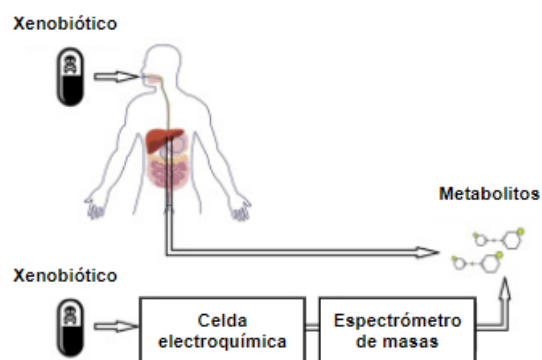


Figura 4 Procedimiento para la generación de metabolitos. Portychová & Schug. 2017. Adaptado con permiso de Elsevier

Se ha reportado la electroquímica acoplada a cromatografía líquida-espectrometría de masas (EC / LC / MS) siendo de gran utilidad debido a que LC/MS en conjunto ayuda a obtener fracciones más puras de la solución y permite tener una especificidad mayor en la identificación de compuestos y mayor sensibilidad de detección (Beccaria & Cabooter., 2020). Mediante este método nos permite simular el metabolismo dando información sobre los mecanismos de reacción ayudándonos a conocer los productos oxidativos que se forman (Mekonnen et al., 2018).

Este proceso es similar al método anterior EC/MS pero la diferencia es que los productos generados se separan y detectan con el uso de HPLC, para ello a la salida de la celda electroquímica se acopla a un HPLC mediante una válvula de inyección. El proceso se inicia inyectando la solución estándar a través de la CE y se aplica un potencial de corriente (2000 a 2700 mV durante un tiempo dado) para controlar la oxidación, después de la oxidación se cambia la válvula al HPLC y los productos quedan retenidos por la válvula de inyección externa. Por último se

identificaron utilizando ESI-MS *Fig. 5.* (Mekonnen et al., 2018). Para obtener un mayor rendimiento de producto y una presión baja para el electrodo de trabajo, se suelen usar volúmenes de inyección pequeños comúnmente de 5 μ l para la reacción de EC con un flujo 0.5 ml/min para la separación de los productos de oxidación, manteniendo la temperatura del compartimento de la columna de 25°C (Szultka-Młyńska et al., 2018)

LC-MS nos permite la identificación rápida y caracterización estructural parcial de metabolitos, con una alta sensibilidad para la mayoría de los fármacos candidatos y metabolitos (Beccaria & Cabooter., 2020) esto debido a que a través de EC/LC/MS se generan los productos oxidativos que se obtienen durante el proceso de biotransformación del CYP450 y además se puede conocer los mecanismos metabólicos y los intermediarios de vida corta (Mekonnen et al., 2018), Una desventaja es que requieren decenas de minutos y tiempo adicional para la generación electroquímica de los productos de transformación (Korzhenko et al., 2021)

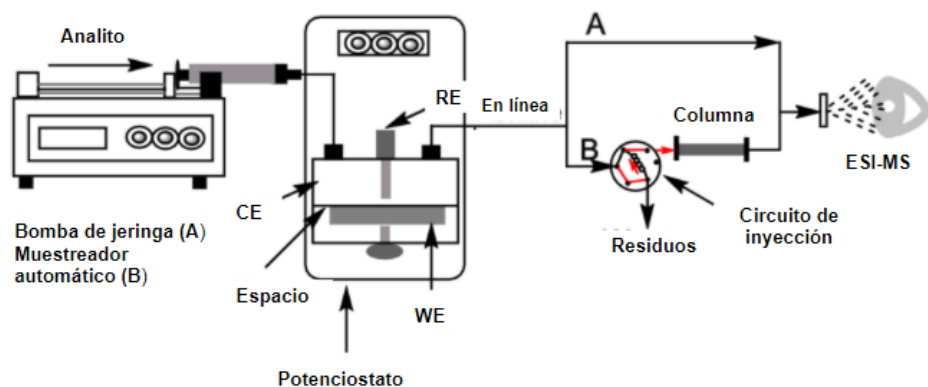


Figura 5 Esquema del método (EC / HPLC / MS) : CE(contraelectrodo), WE (electrodo de trabajo), RE (Electrodo de referencia). Mekonnen et al. 2018.

Adaptado con permiso de Springer Nature

Otro método es el chip electroquímico de microfluidos con un mezclador integrado acoplado en línea a espectrometría de movilidad de iones atrapados (TIMS) y espectrometría de masas de alta resolución de tiempo de vuelo (ToF-HRM), es

decir. chipEC-TIMS-ToF- HRMS, el cual fue usado para evaluar la oxidación del paracetamol (Korzhenko et al., 2021)

Este método consta de un chip de microfluído el cual está conformado por un electrodo de trabajo (WE) de diamante dopado con boro (BDD) y el contraelectrodo (CE), que se encuentran separados por canales los cuales ayudan a mejorar la pureza de la muestra y la calidad de los datos del análisis. Para comenzar por medio de una jeringa de microfluidos se inyecta el analito lo cual da inicio a la oxidación electroquímica , para este proceso de transformación se utiliza un potencial de 0 a +1 V frente a un electrodo de referencia incluido en el WE con una velocidad de $10 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$,luego se produce los iones mediante la ionización por electropulverización (ESI) y los productos formados se separaron y se detectan mediante TIMS-ToF-HRMS , realizando la separación por TIMS y la detección por HRMS. Finalmente al acoplar el chip con TIMS-ToF-HRMS, los iones extraídos seleccionados se pueden presentar frente al potencial de celda aplicado a través de voltamogramas utilizados para estudiar e identificar los productos formados en el proceso electroquímico *Fig.6* (Korzhenko et al., 2021).

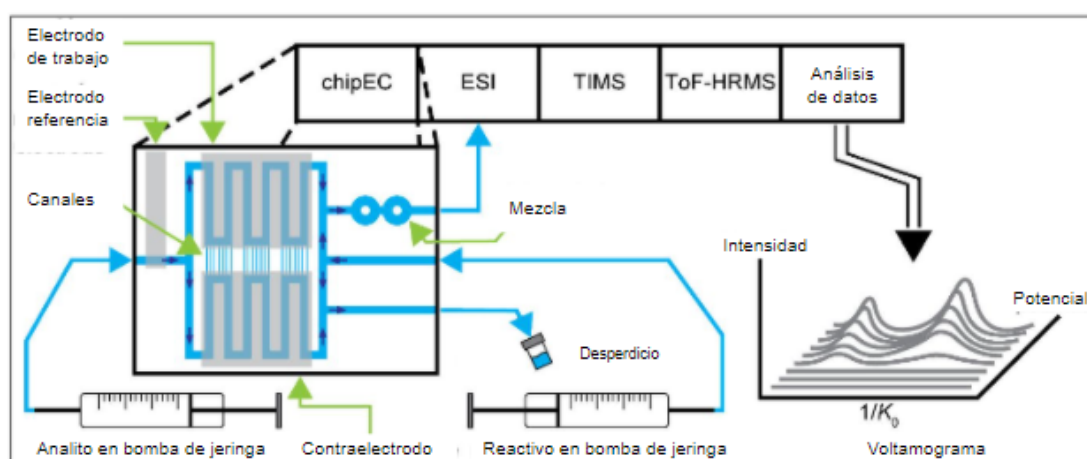


Figura 6 Esquema del método chipEC-TIMS-ToF-HRMS en línea, chipEC: Chip electroquímico, ESI: ionización por electropulverización, TIMS: espectrometría de movilidad de iones atrapados, ToF-HRMS: espectrometría de masas de alta

resolución de tiempo de vuelo. Korzhenko et al .2021. Adaptado con permiso de American Chemical Society

Este método da información sobre el metabolismo de fármacos más rápido que el basado en HPLC. debido a que toma solo 5 minutos para que el primer producto de oxidación sea detectado en el espectrómetro de masas y toma máximo 7 minutos en realizar todo el experimento de un analito desde la oxidación, separación (TIMS) y detección (HRMS). Otra ventaja es que necesita bajas cantidades de analito, siendo un método de detección valioso para reducir el tiempo, los gastos económicos y los experimentos con animales para el desarrollo de fármacos(Korzhenko et al., 2021).

- **Métodos electroquímicos indirectos**

- **Biosensores enzimáticos**

Un biosensor se compone generalmente de tres componentes; un elemento de reconocimiento biológico, un transductor y un sistema de procesamiento de señal (Nguyen et al., 2019) ,el procedimiento que siguen estos dispositivos comienza con la inmovilización de una molécula de reconocimiento biológico como puede ser una enzima (CYP450) en el electrodo, luego a través de la unión del analito al elemento de reconocimiento biológico se produce un cambio en las propiedades eléctricas, proporcionando así la señal del sensor (Srivastava et al., 2020), esta señal de detección se basa en el sustratos que se consumen o producto que se forman durante la catálisis enzimática y posteriormente a través del transductor convierte los cambios en señales de acuerdo a la concentración de analito de interés (Nguyen et al., 2019) .

Mediante los biosensores electroquímicos se pueden realizar mediciones utilizando pequeños volúmenes de muestras o bajas concentraciones de componentes biológicos. (Harrad et al., 2018). Otras ventajas son su alta sensibilidad, límites de detección más bajos, automatización, costos reducidos, los sensores electroquímicos no se ven afectados por la turbidez de la muestra o la

interferencia de compuestos absorbentes y fluorescentes como las técnicas basadas en espectroscopía (Srivastava et al., 2020). También como las enzimas tienen una alta especificidad, los biosensores enzimáticos son muy selectivos (Nguyen et al., 2019). Este sistema también permite controlar la electroactividad de las enzimas y se puede acoplar con otras técnicas analíticas, como LC / MS, para obtener una imagen más completa del sistema. Pero también tiene desventajas como son la lenta difusión de un sustrato a la superficie del electrodo puede ser limitante y pueden producirse cambios estructurales de las enzimas durante la inmovilización (Portychová & Schug., 2017).

Los biosensores electroquímicos son sistemas de biodetección que se basan principalmente en reacciones catalizadas por enzimas, en las cuales se genera una diferencia de corriente o potencial que luego puede ser detectado permitiendo el estudio de los fármacos. Siendo una herramienta analítica que ofrecen información cuantitativa o semicuantitativa mediante un elemento de reconocimiento biológico en contacto con un transductor adecuado. Estos biosensores electroquímicos utilizan muchas enzimas y la vía más estudiada es la de los fármacos en la vía metabólica de los organismos vivos. (Srivastava et al., 2020; Harrad et al., 2018). Debido a esto son nombrados también sistemas enzimáticos impulsados electroquímicamente en donde el electrodo es usado como fuente de suministro de electrones y mediante la utilización de películas de tensioactivo capa por capa o bicapas de lípidos se inmovilizan las enzimas (CYP) en el electrodo, permitiendo actuar como biosensores para la detección del metabolismo fármacos (Portychová & Schug., 2017).

- Biosensor electroquímico basado en enzimas

Los biosensores electroquímicos basados en enzimas son generalmente amperométricos los cuales se conforman de una capa delgada de enzima inmovilizada en la superficie de un material conductor como pueden ser oro, platino, plata o carbono, incluidos grafito, carbono vítreo (GC), nanotubos de

carbono (CNT) y dopado con boro. diamante, que actúa como electrodo de trabajo. La unión de la enzima al electrodo se puede realizar mediante distintos métodos de inmovilización (Zuccarello et al., 2021).

En el desarrollo de biosensores de enzimas metabolizadoras de fármacos (p450), los P450 utilizados son principalmente de origen humano y son encapsulados en polímeros o membranas lipídicas, en el cual la solución enzimática es inmovilizada en un electrodo desnudo o modificado mediante adsorción física, dejando incubar durante un período de tiempo determinado y las moléculas débilmente adsorbidas se eliminan por lavado, para posteriormente realizar el análisis del analito de interés. (Zuccarello et al., 2021). En un estudio se empleó un biosensor electroquímico de propofol basado en la enzima citocromo p450 2B6, en este método la enzima (CYP450) es expresada mediante una célula de levadura desactivada, esta enzima es inmovilizada junto con nanopartículas de oro en una solución de quitosano (polímero). Posteriormente esta mezcla se deposita sobre la superficie de un electrodo serigrafado (SPE) (Ferrier et al., 2021), los cuales son sensores desechables de bajo costo con una configuración de tres electrodos (Electrodos de Trabajo de grafito, de Referencia plata/cloruro de plata (Ag/AgCl) y Contraelectrodo de grafito), proporcionando de esta manera una Celda electroquímica miniaturizada (Vasiliadou., 2018).

En este estudio se menciona que la adición de las nanopartículas de oro proporciona una estabilización adicional a la enzima (Ferrier et al., 2021), esto debido a que se prepararon electrodos similares pero sin la adición de nanopartículas de oro y en su lugar se agregó un volumen equivalente de tampón de fosfato (pH 7), encontrando que los sensores fabricados de esta manera muestran signos claros de ensuciamiento de electrodos mostrando que la enzima se ha desnaturalizado. Así se puede ver que la presencia de las nanopartículas de oro es fundamental para mantener la estabilidad del citocromo P450 2B6. (Ferrier et al., 2021). Se ha observado que las nanopartículas de oro en la superficie de un electrodo desempeñan el papel de un conjunto de nano electrodos, lo que facilita

el transporte de electrones desde el electrodo hasta el hemo del citocromo P450 aumentando la respuesta del sistema (Kulsharova., 2019). Recientemente también se han realizado numerosos estudios de reacciones de oxidación catalizadas por metaloporfirina/porfina, los cuales consisten en complejos de porfirina con iones metálicos (manganeso, hierro y cromo), junto con compuestos donadores de oxígeno (óxidos de amina N).Encontrando que con la utilización de metaloporfirinas (Ejemplo: porfirina de hierro (III) soluble en agua) como catalizadores. Se puede imitar el sitio activo de CYP450 en los experimentos (Pereira et al., 2018).

Por otra parte, el uso de quitosano como medio de inmovilización resulta interesante, ya que es abundante, biocompatible y altamente poroso. (Ferrier et al., 2021),al ser un material biocompatible (quitosano que es un polímero) impide el contacto directo con electrodos de carbón o de metal desnudo lo cual puede causar la desnaturalización de las enzimas encontrando que con la utilización electrodos con materiales biocompatibles se evita este inconveniente (Zuccarello et al., 2021). Por lo que, un primer paso para el desarrollo de biosensores para la generación de metabolitos es la inmovilización de la enzima.

Para la evaluación del metabolismo de fármacos de fase I y Fase II se han propuesto diversas estrategias, entre ellas destaca el empleo de chip microfluídico integrado con biosensor P450, el cual fue desarrollado para imitar el metabolismo de fármacos antipalúdicos.

En este estudio la imitación del metabolismo se realizó con un chip microfluídico fabricado con poli(metacrilato de metilo) (PMMA) (*Fig. 7. A*) el cual consta de dos canales , en el primer canal integró un electrodo de oro serigrafiado en donde se inmoviliza la enzima P450 lo cual sirve para imitar el metabolismo de fármacos de fase I , posteriormente para la integración del biosensor p450 al dispositivo de flujo se coloca el electrodo en la parte inferior del dispositivo se adhirió con la ayuda de un adhesivo de doble cara con un aspensor actuando el adhesivo como capa de conexión entre la superficie del electrodo y el dispositivo de PMMA (*Fig.*

7. B) (Kulsharova., 2019). El segundo compartimento del chip modular se usó para simular el metabolismo de fármacos de fase II , se colocó en el canal la enzima UGT inmovilizada en micropartículas magnéticas recubiertas de estreptavidina y con la ayuda de un imán alineado con la parte inferior del chip se mantuvo dentro del canal (*Fig. 7. C*). Para la unión de los 2 compartimientos del chip a la salida del canal integrado del biosensor P450 se conectó un tubo convencional a la entrada del segundo microcanal diseñado para el metabolismo de fármacos enzimáticos de fase II (Kulsharova,2019).Posteriormente para el análisis del fármaco en este caso uno antipalúdico (Artemeter (AM)) , primero se inyectó la solución que contiene el fármaco y la solución buffer de fosfatos (PBS) a través del microcanal la cual fluye hasta llegar a la celda del electrodo p450, luego utilizando un potencióstato se aplica un potencial (-500 mV) al electrodo integrado comenzando la reacción catalizada por P450 produciendo metabolitos primarios , después el compartimento de fase I del chip de microfluidos se acopló al microcanal de imitación de fase II el cual se lleno de perlas superparamagnéticas inmovilizadas con enzima UGT y se dejó fluir la solución de sustrato /buffer , luego se aplicó un potencial de -500 mV al electrodo integrado con el fin de dar inicio a la electrólisis en el chip .Por último se analizó la reacción final generada para ver la presencia de metabolitos de fase II (Kulsharova., 2019).

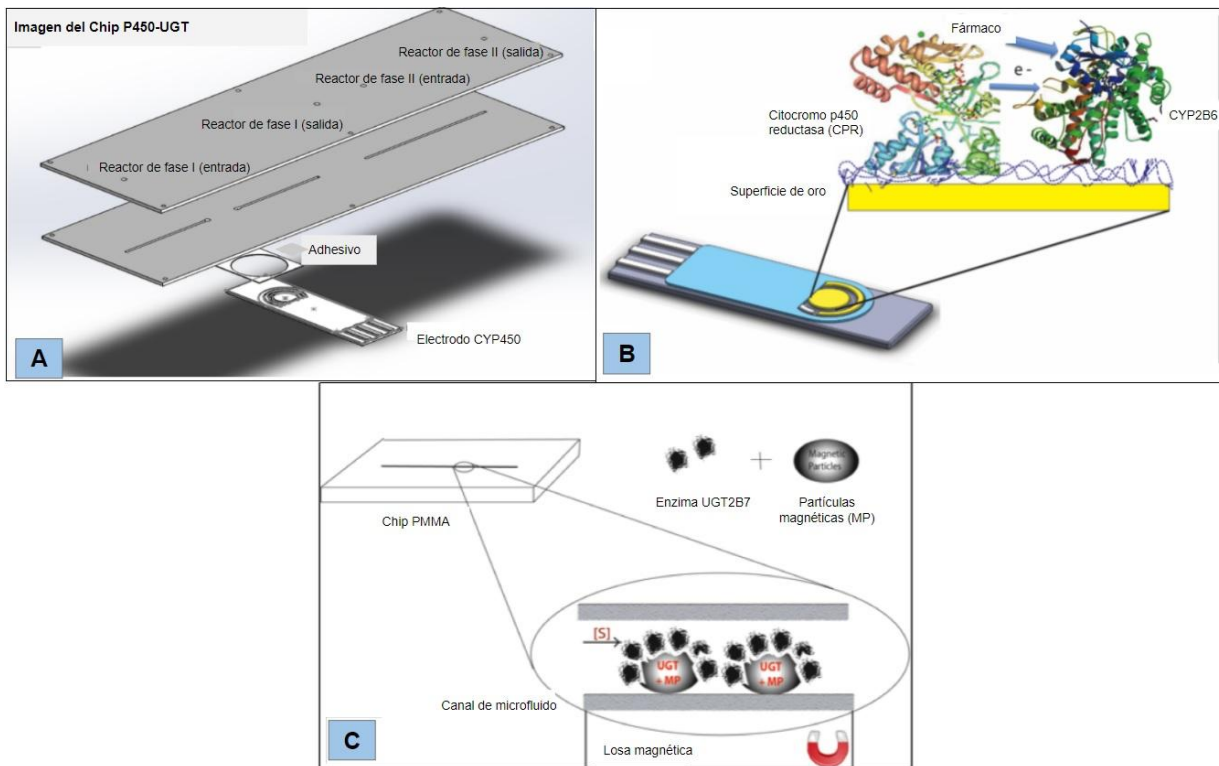


Fig 7. A. Esquema del chip microfluídico fabricado con poli(metacrilato de metilo) (PMMA) en donde se muestra la adhesión del biosensor P450. B. Comportamiento 1 del Chip P450- UGT biosensor p450 Para el estudio de fase I. C. Compartimento 2 del el Chip P450- UGT inmovilización UGT para imitar la reacción catalizada por UGT de la fase II del metabolismo. Kulsharova, 2019.

Este chip microfluídico se encontró que ayuda a establecer el metabolismo de distintos medicamentos antipalúdicos, también puede usarse para la detección de medicamentos y la eliminación temprana de compuestos tóxicos en la línea de desarrollo de medicamentos. Esto se logra gracias a la simulación de las reacciones de dos pasos logrando realizar primero una conversión a un metabolito de fase I a través de catálisis impulsada electroquímicamente, luego por conversión a su metabolito final en el chip. dando con esto una idea de la ruta metabólica que lleva el fármaco de interés (Kulsharova., 2019).

Todos los métodos electroquímicos mencionados anteriormente para el estudio de metabolismo de fármacos tiene distintas ventajas que pueden ser que tiene

una alta capacidad de generar variedad de metabolitos de fármacos de manera controlada y suave, también debido a que no se estudia en un ambiente celular se facilita la escalabilidad y reproducibilidad (Raham et al., 2019) Es una técnica instrumental que permite generar y detectar metabolitos de fármacos en ausencia de matrices biológicas en el medio de reacción eliminando tareas relacionadas con el aislamiento y la identificación de productos metabólicos formado in vitro (hepatocitos cultivados, microsomas hepáticos, enzimas purificadas) o in vivo (orina)(Potęga et al., 2018).En la siguiente tabla se pueden ver distintos fármacos que fueron estudiados mediante métodos electroquímicos.

Tabla 3. Ejemplos de metabolismo de fármacos imitado por EC y sus metabolitos generados

Fármaco	Potencial (mV)	Metabolito
Triapina	1800 mV	-----
Diclofenaco	700 mV	4-OH-DCL5-OH-DCL
Clozapina	475 mV	Norclozapina N-óxido de clozapina
Flupirtina	443 mV	glucurónidos derivados del ácido mercaptúrico D13223
Acebutolol	1002 mV	diacetolol hidroxilamina
Warfarina	280 mV	hidroxi warfarina
Paracetamol	595 mV	N-acetil-p-benzoquinona(NAPQ)
Cafeína	1500 mV	teobromina paraxantina teofilina
Amodiaquina	970 mV	menaquinona
Lidocaína	1150 mV	N-dietilada
Entacapona	1250 mV	glucurónido isómero Z
Propanidid	1450 mV	ácido (4-(2-[dietilamino]-2-oxo etoxi)-3-metoxi-benceno acético (DOMA)
Propranolol	1500 mV	-----

(Fuchigami, et al. 2020, Pelivan, et al. 2017, Korzhenko, et al. 2021, Szultka-Młyńska, et al. 2018).

- **Parámetros para considerar en el estudio de metabolismo de fármacos**

Existen distintos parámetros a considerar en el estudio del metabolismo de fármaco como lo son el material del electrodo , la fase móvil , la velocidad de flujo y la concentración de fármacos para detectar y proporcionar mejores resultados de la biotransformación de los fármacos. También es muy importante el valor del potencial aplicado debido a que de este depende el inicio de la reacción redox que genera la creación de los metabolitos. (Szultka-Młyńska, et al 2018). Se ha encontrado que las velocidades de flujo más altas pueden ayudar a eliminar las especies reducidas y mejorar la absorción, ya que se produce una menor difusión en la superficie del electrodo, pero al contrario un bajo flujo de las fuerzas mecánicas externas que impulsan el transporte de masa a través de la convección pueden afectar la uniformidad de las enzimas P450 inmovilizadas en la superficie del biosensor alterando el rendimiento del biosensor electroquímico (Kulsharova., 2019).

En la utilización de biosensores es de gran relevancia poner atención en los tipos de electrodos y los transductores de superficie para aumentar la transferencia de electrodos entre el citocromo p450 y el electrodo (Harrad et al., 2018). También las enzimas son importantes de analizar debido a que es lo que facilita la transferencia de electrones entre el electrodo y la molécula de sustrato. Para mejorar la eficiencia de la transferencia de electrones, a menudo se utilizan complejos de transferencia de carga (ejemplo tetratiafulvaleno) (Nguyen et al., 2019).

- **Nanotecnología**

En la actualidad también se comienza a investigar el acoplamiento de la nanotecnología y la electroquímica en el cual se desarrollan métodos en donde se nanoestructura los electrodos, (Shumyantseva et al., 2018) generando nuevos biosensores que contengan en la superficie del electrodo nanotubos de carbono y nanopartículas metálicas (*Fig. 8*) (Harrad et al., 2018) , estos bioelectrodos inspirados en la nanotecnología de los CYP o los microsomas hepáticos humanos son usados para la detección de fármacos/contaminantes y la producción mejorada de metabolitos (Krishnan., 2020).

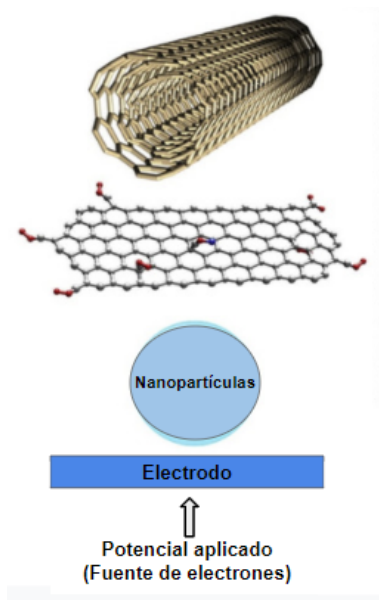


Figura 8 Diseños de bioelectrodos inspirados en la nanotecnología de CYP solubles purificados y microsomas de CYP unidos a membrana. Krishnan .2020.

Adaptado con permiso de Elsevier

A través de los nanotubos de carbono se proporciona un rendimiento de metabolitos de fármacos mayor, las nanoestructuras debido a su gran tamaño y conductividad facilita la inmovilización de una gran cantidad de microsomas hepáticos. Otro punto a favor es que tiene una interacción buena con los grupos polares y apolares de las membranas de fosfolípidos de los microsomas ofrecen una estabilidad de vida media electrocatalítica de más de 10 h de duración

(Krishnan., 2020). En el diseño de biosensores del citocromo P450 con nanotubos se mejora la sensibilidad, lo que permite alcanzar límites de detección bajos y, mejorar la detección y el seguimiento de fármacos (Harrad et al., 2018).

Un ejemplo del empleo de la nanotecnología es en un estudio en el que se analizó el metabolismo del omeprazol en el cual se utilizó un método que imita la vía metabólica catalítica de los CYP in vitro mediante una vía impulsada electroquímicamente, empleando nanopartículas de cerio (CeNP). Para iniciar el proceso se prepararon nanopartículas de cerio (CeNP) por el método de microemulsión inversa y se mezclaron con grafeno (GO) y quitosano (CS) formando láminas de nanocompuestos las cuales permite formar una película con buena conductividad y biocompatibilidad en un electrodo de carbono vítreo (GC). Posteriormente se unió covalentemente la enzima modelo CYP al electrodo de carbono vítreo (GC) modificado con CS / CeNP / RGO y por último se podría analizar mediante cromatografía líquida / espectrometría de masas (LC / MS). Encontrando en este estudio que con el electrodo modificado exhibió una excelente actividad enzimática alta afinidad y eficiencia catalítica hacia omeprazol debido a la excelente propiedad amortiguadora de oxígeno de cerio, y la excelente conductividad eléctrica y biocompatibilidad del grafeno (Tian et al., 2017). La ventaja que se puede encontrar con estos métodos en comparación con los electroquímicos es que se puede lograr una transferencia directa de electrones de una enzima sin que sufra ninguna modificación en la superficie del electrodo (Harrad et al., 2018).

Otro ejemplo en el que se utiliza la nanotecnología es en un estudio que se realizó para analizar el metabolismo de hormonas esteroideas donde se construye un nanoreactor enzimático electroquímico (CYP3A4/PNGFs) mediante la inmovilización de CYP3A4 dentro de espumas de grafeno nanoporosas modificadas con poli dopamina (PNGFs). Primero se prepararon espumas tridimensionales de grafeno nanoporoso (NGF) con tamaños de poro controlados los cuales se sintetizaron con plantillas duras de esferas de sílice metilada y los productos finales se obtuvieron eliminando la plantilla de sílice, posteriormente

para aumentar la hidrofiliya y la biocompatibilidad de los NGF se recubrieron con poli dopamina (PDA) mediante el método de polimerización in situ y se dejó polimerizar por un día ,obteniendo espumas de grafeno nanoporosas modificadas con poli dopamina (PNGFs) las cuales actúan como medio de transferencia de electrones. Para finalizar se moviliza el CYP3A4_dentro de PNGFs esto mediante la mezcló de la enzima CYP3A4 y la suspensión del PNGF agitandola para obteniendo una solución de CYP3A4/PNGFs la cual se colocó sobre electrodo de carbono vítreo modificado (GCE) y se dejó secar generando el nanoreactor CYP3A4/PNGFs/GCE el cual es utilizó para realizar ensayos rápidos de metabolismo de hormonas esteroides como la testosterona estrona y progesterona (Fig. 9) (Xu et al., 2018)

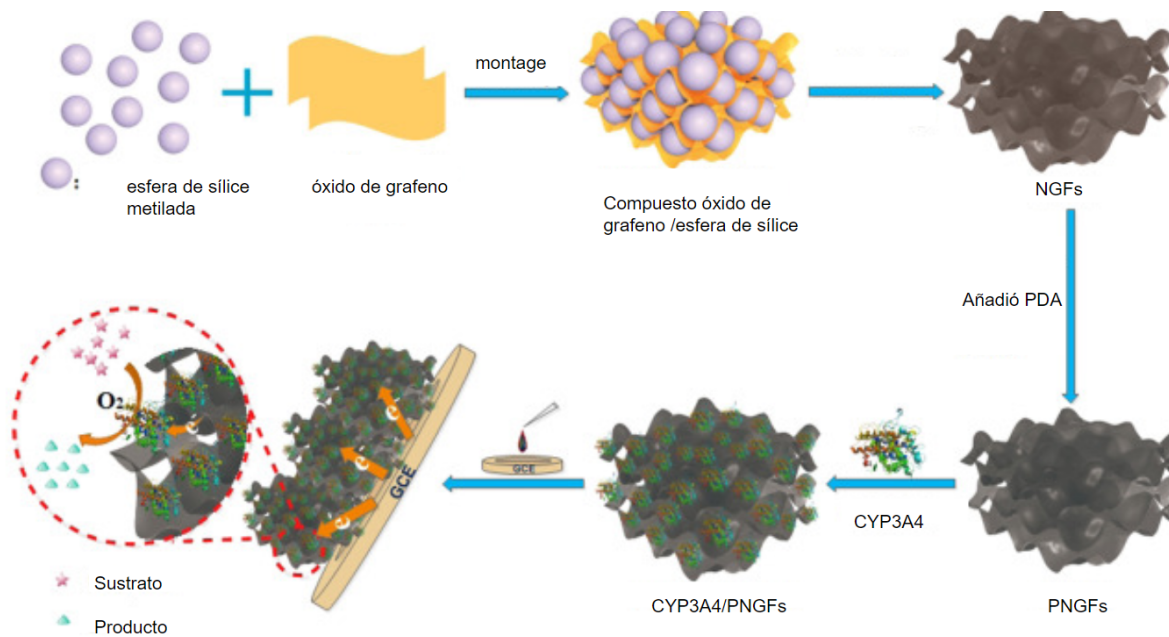


Figura 9. Esquema del proceso de realización del nanoreactor enzimático electroquímico (CYP3A4/PNGFs). Xu et al. 2018. Adaptado con permiso de Elsevier

Este reactor diseñado nos genera un nuevo método para la imitación eficiente de la ruta metabólica natural de P450 a bajo costo y puede ser usado para ensayos rápidos de metabolismo.(Xu et al., 2018), las ventajas de este método es que tienen alta estabilidad y bioactividad debido a la estructura tridimensional de los

NGF y el agente reticulante ideal de PD. También la actividad enzimática de CYP3A4 se puede regular de manera efectiva cambiando el diámetro de los poros de los PNGF, ya que se puede ser controlado mediante la plantilla de esferas de sílice.(Xu et al., 2018), siendo de gran utilidad debido a que se encontró que cuando el diámetro de poro del huésped coincidía con el tamaño de la enzima, la enzima inmovilizada mostraba la mayor actividad y estabilidad térmica .También el nanoreactor P450 eficiente debida a que es impulsado por electrodos basado en PNG en ausencia del costoso NADPH.(Xu et al., 2018)

- **Retos en el estudio de los metabolitos in-vitro**

En el estudios del metabolismos los métodos empleados para simular este proceso son diversos los cuales tienen ventajas y desventajas, pero es de suma importancia tener un método adecuado para tener un mayor acercamiento a la biotransformación que sucede en el cuerpo, por lo cual como se menciona anteriormente se ha ido evolucionando las técnicas empleadas para la simulación llegando hasta el empleo de la nanotecnología por lo cual aún se sigue investigando métodos más eficaces basado en esto para tener un mejor resultado del ya encontrado .

Existen numerosos ejemplos de estudios de metabolismo que proporcionan conocimientos del metabolismo y metabolitos generados pero los avances recientes en los reactores de electrosíntesis y la adopción más generalizada de la electroquímica por parte de la comunidad solo acelerará el desarrollo de nuevos métodos siendo uno de los retos encontrar una celda o reactor electroquímico que optimice una mayor cantidad de reacciones a las que ya se han encontrado en estudios anteriores (Raham et al., 2019).En los métodos electroquímicos los instrumentos que se usan mayormente para el análisis son los electrodos de trabajo de diamante dopado con boro y las celdas de flujo continuo coulométricas, generalmente construidas a partir de electrodos de trabajo de carbono vítreo poroso y electrodos de referencia de estado sólido pero en la actualidad ya se está comenzando a investigar implementar microchips y dispositivos de micro

fluido (Portychová & Schug., 2017). También para investigaciones futuras se ha encontrado que el desarrollo de métodos nanoestructuración de electrodos ,y el uso de micro y nano electrodos son una forma de estudio con mucho futuro sobre la electrocatálisis , electroquímica molecular y transferencia de electrones en sistemas biológicos (Shumyantseva et al., 2018). Se ha encontrado que sencillo bionano reactor como son los CYP3A4/PNGF-1 para el metabolismo impulsado por electrodos conducirá a un avance prometedor en el análisis de toxicidad de distintas hormonas y fármacos para la síntesis química y el desarrollo de fármacos (Xu et al., 2018) por lo que sería interesante seguir investigando sobre estos métodos.

Aunque todavía los métodos experimentales in vitro simples , como los experimentos con electrodos , no siempre indican los procesos in vivo los investigadores siguen desarrollando sistemas modelo más precisos y comparativos con el cuerpo humano siendo de suma importancia mejorar los conocimientos sobre los métodos electroquímicos para el estudio del metabolismo.

Bibliografia

- Abdulhameed, A. O., Miah, M. K., & Venkataramanan, R. (2017). Drug metabolism in the liver. *Clinics in liver disease*, 21, 1-20.
- Beccaria, M., & Cabooter, D. (2020). Current developments in LC-MS for pharmaceutical analysis. *Analyst*, 145(4), 1129-1157.
- Buriez, O., & Labbé, E. (2020). Disclosing the redox metabolism of drugs: The essential role of electrochemistry. *Current Opinion in Electrochemistry*, 24, 63-68
- Ferrier, D. C., Kiely, J., & Luxton, R. (2021). Cytochrome P450 2B6 Amperometric Biosensor for Continuous Monitoring of Propofol. *IEEE Sensors Journal*, 21(21), 23730-23736.
- Fuchigami, H., Bal, M. K., Brownson, D. A., Banks, C. E., & Jones, A. M. (2020). Voltammetric behaviour of drug molecules as a predictor of metabolic liabilities. *Scientia Pharmaceutica*, 88(4), 46.
- Harrad, L., Bourais, I., Mohammadi, H., & Amine, A. (2018). Recent advances in electrochemical biosensors based on enzyme inhibition for clinical and pharmaceutical applications. *Sensors*, 18(1), 164.
- Horspool, A. M., Wang, T., Scaringella, Y.-S., Taub, M. E. & Chan, T. S. (2020). Human Liver Microsomes Immobilized on Magnetizable Beads: A Novel Approach to Study In Vitro Drug Metabolism. *Drug metabolism and disposition*, 48 (8), 645–654.
- Hrynychak, I., Sousa, E., Pinto, M., & Costa, V. M. (2017). The importance of drug metabolites synthesis: the case-study of cardiotoxic anticancer drugs. *Drug metabolism reviews*, 49,158-196.

Husain, A., Iram, F., Siddiqui, A. A., Almutairi, S. M., Mohammed, O. B., Khan, S. A., ... & Rahman, N. (2021). Identification of metabolic pathways involved in the biotransformation of eslicarbazepine acetate using UPLC-MS/MS, human microsomal enzymes and in silico studies. *Journal of King Saud University-Science*, 33(2), 101281.

Jaroch, K., Jaroch, A., & Bojko, B. (2018). Cell cultures in drug discovery and development: The need of reliable in vitro-in vivo extrapolation for pharmacodynamics and pharmacokinetics assessment. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 147, 297-312.

Jyrkäs, J., & Tolonen, A. (2021). Hepatic in vitro metabolism of peptides; Comparison of human liver S9, hepatocytes and Upcyte hepatocytes with cyclosporine A, leuprorelin, desmopressin and cetorelix as model compounds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 196, 113921.

Kanebratt, K. P., Janefeldt, A., Vilén, L., Vildhede, A., Samuelsson, K., Milton, L., & Hilgendorf, C. (2021). Primary human hepatocyte spheroid model as a 3D in vitro platform for metabolism studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 110(1), 422-431.

Khan, M. O. F., & Philip, V. (2018). *Fundamentals of Medicinal Chemistry and Drug Metabolism*. Sharjah, UAE: Bentham Science Publishers.

Korzhenko, O., Führer, P., Göldner, V., Olthuis, W., Odijk, M., & Karst, U. (2021). Microfluidic Electrochemistry Meets Trapped Ion Mobility Spectrometry and High-Resolution Mass Spectrometry—In Situ Generation, Separation, and

- Detection of Isomeric Conjugates of Paracetamol and Ethoxyquin. *Analytical chemistry*, 93(37), 12740-12747.
- Krishnan, S. (2020). Bioelectrodes for evaluating molecular therapeutic and toxicity properties. *Current Opinion in Electrochemistry*, 19, 20-26.
- Kulsharova, G. K. (2019). Mimicking Human Drug Metabolic Reactions using Microfluidic Platforms [Doctoral dissertation, UCL (University College London)]. UCL Discovery .
- Li, Y., Meng, Q., Yang, M., Liu, D., Hou, X., Tang, L., & Bi, H. (2019). Current trends in drug metabolism and pharmacokinetics. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 9, 1113-1144.
- Mekonnen, T. F., Panne, U., & Koch, M. (2018). Prediction of biotransformation products of the fungicide fluopyram by electrochemistry coupled online to liquid chromatography-mass spectrometry and comparison with in vitro microsomal assays. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 410(10), 2607-2617.
- Milner, E., Ainsworth, M., McDonough, M., Stevens, B., Buehrer, J., Delzell, R., ... & Barnhill, J. (2020). Emerging three-dimensional hepatic models in relation to traditional two-dimensional in vitro assays for evaluating drug metabolism and hepatotoxicity. *Medicine in Drug Discovery*, 8, 100060.
- Mizoi K, Arakawa H, Yano K, Koyama S, Kojima H, Ogihara T.(2020) Utility of Three-Dimensional Cultures of Primary Human Hepatocytes (Spheroids) as Pharmacokinetic Models. *Biomedicines*; 8(10):374.
- Nguyen, H. H., Lee, S. H., Lee, U. J., Fermin, C. D., & Kim, M. (2019). Immobilized enzymes in biosensor applications. *Materials (Basel)*, 12(1), 121.

- Ooka, M., Lynch, C. & Xia, M. (2020). Application of In Vitro Metabolism Activation in High-Throughput Screening. *International journal of molecular sciences*, 21 (21), 8182.
- Peeters, L., Vervliet, P., Foubert, K., Hermans, N., Pieters, L., & Covaci, A. (2020). A comparative study on the in vitro biotransformation of medicagenic acid using human liver microsomes and S9 fractions. *Chemico-Biological Interactions*, 328.
- Pelivan, K., Frensemeier, L., Karst, U., Koellensperger, G., Bielec, B., Hager, S., & Kowol, C. R. (2017). Understanding the metabolism of the anticancer drug Triapine: electrochemical oxidation, microsomal incubation and in vivo analysis using LC-HRMS. *Analyst*, 142(17), 3165-3176.
- Pereira, M. M., Dias, L. D., & Calvete, M. J. (2018). Metalloporphyrins: bioinspired oxidation catalysts. *Acs Catalysis*, 8(11), 10784-10808
- Portychová, L., & Schug, K. A. (2017). Instrumentation and applications of electrochemistry coupled to mass spectrometry for studying xenobiotic metabolism: A review. *Analytica chimica acta*, 993, 1-21
- Potęga, A., Garwolińska, D., Nowicka, A. M., Fau, M., Kot-Wasik, A., & Mazerska, Z. (2019). Phase I and phase II metabolism simulation of antitumor-active 2-hydroxyacridinone with electrochemistry coupled on-line with mass spectrometry. *Xenobiotica*, 49, 922-934.
- Potęga, A., Paczkowski, S., Paluszkiewicz, E., & Mazerska, Z. (2021). Electrochemical simulation of metabolic reduction and conjugation reactions of unsymmetrical bisacridine antitumor agents, C-2028 and C-2053. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 197.

- Rahman, M. H., Bal, M. K. & Jones, A. M. (2019). Metabolism-Inspired Electrosynthesis. *Chemelectrochem*, 6 (16), 4093–4104.
- Rocamora Pons, D.(2021).Diferentes respuestas a los fármacos entre hombres y mujeres. Facultad de Farmacia Decanato, 5-12
- Rock, B. M., & Foti, R. S. (2019). Pharmacokinetic and drug metabolism properties of novel therapeutic modalities. *Drug Metabolism and Disposition*, 47, 1097-1099.
- Shankar, S., & Vuppu, S. (2020). In vitro drug metabolism and pharmacokinetics of a novel thiazolidinedione derivative, a potential anticancer compound. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 179
- Shanu-Wilson, J., Evans, L., Wrigley, S., Steele, J., Atherton, J., & Boer, J. (2020). Biotransformation: impact and application of metabolism in drug discovery. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 11(11), 2087-2107.
- Shumyantseva, V. V., Kuzikov, A. V., Masamrekh, R. A., Bulko, T. V., & Archakov, A. I. (2018). From electrochemistry to enzyme kinetics of cytochrome P450. *Biosensors and Bioelectronics*, 121, 192-204.
- Srivastava, K. R., Awasthi, S., Mishra, P. K., & Srivastava, P. K. (2020). Biosensors/molecular tools for detection of waterborne pathogens. *Waterborne Pathogens*, 237-277.
- Szultka-Młyńska, M., Bajkacz, S., Kaca, M., Baranowska, I., & Buszewski, B. (2018). Electrochemical simulation of three novel cardiovascular drugs phase I metabolism and development of a new method for determination of them by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 1093, 100-112.

- Szultka-Młyńska, M., Bajkacz, S., Baranowska, I., & Buszewski, B. (2018). Structural characterization of electrochemically and in vivo generated potential metabolites of selected cardiovascular drugs by EC-UHPLC/ESI-MS using an experimental design approach. *Talanta*, 176, 262-276.
- Talevi, A., & Quiroga, P.A. (2018). ADME Processes in pharmaceutical Sciences. Springer Nature .55-70
- Tian, J., Wang, J., Li, Y., Huang, M., & Lu, J. (2017). Electrochemically Driven Omeprazole Metabolism via Cytochrome P450 Assembled on the Nanocomposites of Ceria Nanoparticles and Graphene. *Journal of the Electrochemical Society*, 164(7), H470.
- Vasiliadou, R. (2018). Electrochemistry of Eugenol and its Metabolism on a Bare Screen-Printed Electrode. *ATHENS JOURNAL OF SCIENCES*, 5 (1), 39–52.
- Xu, X., Zheng, Q., Bai, G., Dai, Q., Cao, X., Yao, Y., ... & Yao, C. (2018). Polydopamine functionalized nanoporous graphene foam as nanoreactor for efficient electrode-driven metabolism of steroid hormones. *Biosensors and Bioelectronics*, 119, 182-190.
- Zhang, Z., & Tang, W. (2018). Drug metabolism in drug discovery and development. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 8, 721-732
- Zhu, L., Shao, Y., Xiao, H., Santiago-Schübel, B., Meyer-Alert, H., Schiwy, S., & Küppers, S. (2018). Electrochemical simulation of triclosan metabolism and toxicological evaluation. *Science of the Total Environment*, 622, 1193-1201.
- Zuccarello, L., Barbosa, C., Todorovic, S. & Silveira, C. M. (2021). Electrocatalysis by Heme Enzymes—Applications in Biosensing. *Catalysts*, 11 (2),218.