Aproximación Computacional de la Biotransformación y Toxicidad de la Cipermetrina y sus Metabolitos

Fleitas-Ibarrola, Lucas[1,2]; Gayozo, Elvio[1,*]

[1]*Universidad Nacional de Asunción- Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biología, San Lorenzo, Paraguay*

Resumen: En las últimas décadas, se han llevado a cabo numerosos estudios que involucran a la Cipermetrina y al ácido 3-fenoxibenzoico (3-PBA), sin embargo, se desconoce la biotransformación de la misma en el ser humano, así como la toxicidad que presentan sus metabolitos. El objetivo de este estudio fue analizar la biotransformación de la Cipermetrina y la toxicidad de sus metabolitos en el ser humano, así como las afinidades de unión a enzimas involucradas en el metabolismo Fase I y Fase II, mediante métodos bioinformáticos. Se realizaron aproximaciones de biotransformación de la Cipermetrina en metabolismo Fase I y II, y se evaluaron los sitios de metabolismo y el potencial tóxico de los metabolitos, para ello se emplearon métodos de aprendizaje de máquina y QSAR (relación cuantitativa estructura-actividad). También se realizaron simulaciones de acoplamiento molecular entre la Cipermetrina, sus metabolitos y las enzimas involucradas en la biotransformación. Las aproximaciones sugieren que la Cipermetrina podría ser metabolizada en Fase I por la CYP1A2, CYP2B6 y la UDP-glucuronosiltransferasa, mediante hidroxilaciones, oxidaciones, oxigenaciones y conjugación química. Además, las aproximaciones indican riesgo predictivo de hepatotoxicidad, toxicidad respiratoria, toxicidad ocular, inhibición de aromatasa e inducción de cambios en los potenciales de membrana mitocondrial. Las simulaciones de acoplamiento molecular sugieren afinidades de interacción con la CYP1A2, y la CYP2B6. Los hallazgos *in silico* predicen que la biotransformación de la Cipermetrina ocurre en el metabolismo de Fase I y II, mediante reacciones de oxigenación y oxidación mediadas por la CYP1A2 y la CYP2B6, sugiriendo el potencial tóxico en sus metabolitos.

Palabras clave: Cipermetrina, biotransformación, *in silico*, acoplamiento molecular, sitios de metabolismo

Computational Approximation of the Biotransformation and Toxicity of Cypermethrin and its Metabolites

Abstract: In recent decades, numerous studies have been performed involving Cypermethrin and 3-phenoxybenzoic acid (3-PBA); however, the biotransformation of Cypermethrin in humans, as well as the toxicity of its metabolites, remains unknown. The objective of this study was to analyze the biotransformation of Cypermethrin and the toxicity of its metabolites in humans, as well as their binding affinities to enzymes involved in Phase I and Phase II metabolism, using bioinformatics methods. Biotransformation predictions of Cypermethrin in Phase I and Phase II metabolisms were developed, and the sites of metabolism and the toxic potential of the metabolites were evaluated using machine learning methods and QSAR (quantitative structure-activity relationship). Molecular docking simulations were also performed between Cypermethrin, its metabolites, and the enzymes involved in biotransformation. The results suggest that Cypermethrin could be metabolized in Phase I by CYP1A2, CYP2B6, and UDP-glucuronosyltransferase through hydroxylation, oxidation, oxygenation, and chemical conjugation. Furthermore, approximations indicate a predictive risk of hepatotoxicity, respiratory toxicity, ocular toxicity, aromatase inhibition, and induction of changes in mitochondrial membrane potentials. The molecular binding simulations suggest binding affinities to CYP1A2 and CYP2B6 protein structure. *In silico* findings predict that the biotransformation of cypermethrin occurs in Phase I and II metabolisms through oxygenation and oxidation reactions mediated by CYP1A2 and CYP2B6, suggesting toxic potential in its metabolites.

Keywords: Cypermethrin, biotransformation, *in silico*, molecular docking, metabolism sites

1. INTRODUCCIÓN

La Cipermetrina es un insecticida piretroide de clase II, que actúa por contacto e ingestión, ampliamente utilizado para el control poblacional de insectos y de vectores de enfermedades

*elviologo@gmail.com
Recibido:16/04/2026
Aceptado: 10/07/2026
Publicado en línea el 31/08/2026

10.33333/rp.vol58n1.10
CC BY 4.0

de interés mundial como el Zika, Dengue, Chikungunya y Chagas (Falah & Burr, 2024).

Debido a su gran efectividad a bajas concentraciones, fácil degradación y toxicidad relativamente baja, estos insecticidas fueron elegidos por sobre encima de los insecticidas organoclorados, organofosforados y carbamatos, sin embargo, no se conoce bien la toxicidad de los metabolitos generados como producto de su biotransformación metabólica en organismos animales y el ser humano (Oda & El-Maddawy, 2012).

Los antecedentes revelan que entre los efectos adversos más comunes conocidos y reportados en la literatura científica son la irritación de piel y ojos, el entumecimiento y sensación de quemazón, aunque el resto de animales tiende a demostrar más tolerancia a la Cipermetrina que los humanos, en contacto directo o exposición oral, es igual de tóxico para el organismo (Sharma et al., 2018).

Se ha reportado que la Cipermetrina puede causar bloqueo en canales de sodio que intervienen en el impulso nervioso, lo que genera un desequilibrio en los niveles de ácido γ-aminobutírico (GABA) e inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) (Kumar Singh et al., 2012; Mcdaniel & Moser, 1993).

Varios estudios posicionan a la Cipermetrina con potenciales actividades citotóxicas, genotóxicas y carcinogénicas (AlKahtane et al., 2018; Shukla et al., 2002). También se han llevado a cabo estudios toxicológicos en modelos murinos neonatales y adultos con este compuesto, los cuales evidenciaron una toxicidad mayor en los individuos neonatales con valores de DL50 entre 14.9-49.3 mg/kg; en contraste, la toxicidad fue menor en adultos con una DL50 de 250 mg/kg en ratas adultas (Cantalamessa, 1993).

Igualmente, se ha reportado, en organismos terrestres, actividades potencialmente neurotóxicas, desbalance hormonal, daños al ADN y reducción en la producción espermática (Kaur & Singh, 2021; L. Zhou et al., 2020). En estudios anteriores, han reportado que la Cipermetrina es rápidamente metabolizada, en organismos superiores, principalmente en el hígado donde se generan metabolitos potencialmente hidrosolubles para excretarlos por la orina (Edwards et al., 1987; Hartnik & Styrishave, 2008; Manna et al., 2005).

Numerosas investigaciones han propuesto varias vías de biodegradación de la Cipermetrina mediado por bacterias como *Bacillus* sp. cepa SG2, *Bacillus cereus* ZH-3, *Bacillus subtilis* y *Streptomyces aureus* HP-S-01, mediado principalmente por hidrólisis y oxidaciones de la Cipermetrina con la finalidad de reducir su toxicidad (Chen et al., 2012; Gangola et al., 2018; Pankaj et al., 2016).

Un estudio que explora el metabolismo de la Cipermetrina ha reportado al ácido 3-fenoxibenzoico (3-PBA) como metabolito principal generado por la hidrólisis de la molécula mediada por la Carboxilesterasa 1 (CES1), presentes en tejido hepático y sanguíneo de los mamíferos, lo cual favorece a la posterior eliminación de la misma por la orina (Crow et al., 2007).

A pesar de ello, la ruta de biotransformación de la Cipermetrina en humanos ante una potencial exposición es aún poco explorada, así como el potencial toxicológico de los metabolitos generados en su metabolismo. Debido a esto, la presente investigación tiene por objetivo principal evaluar la ruta de biotransformación y el riesgo toxicológico predictivo de la Cipermetrina y sus metabolitos en el ser humano mediante aproximaciones computacionales.

Este tipo de estudios computacionales se ha llevado a cabo con otros pesticidas organofosforados como el Temefos, y se ha explorado la ruta de biotransformación de este compuesto en el ser humano ante una posible exposición (Reyes-Chaparro et al., 2020). Los investigadores sugieren que las predicciones generadas con herramientas informáticas y algoritmos computacionales son de gran ayuda para la evaluación de riesgos de los compuestos y desarrollo de nuevas moléculas útiles para el uso humano (Reyes-Chaparro et al., 2020; Seal et al., 2025).

2. METODOLOGÍA

Predicción de las rutas de biotransformación de la Cipermetrina en el metabolismo humano

La construcción de la ruta de biotransformación de la Cipermetrina fue llevada a cabo creando dos generaciones de metabolitos mediante simulaciones de metabolismo de Fase I y Fase II. Para ello, se emplearon tres iteraciones de reacciones (i=3), junto con un modo combinado de métodos de aprendizaje de máquina supervisado (*supervised machine learning*) y sistemas de reglas basadas en conocimiento de metabolismo (*rule-based*), y se utilizó el programa BioTransformer v. 3.0 (Djoumbou-Feunang et al., 2019; Wishart et al., 2022).

Predicción de toxicidad de la Cipermetrina y sus metabolitos

Las predicciones de toxicidad de la Cipermetrina y sus metabolitos fueron analizadas utilizando un modelo de plantilla *Model-View-Template* y aprendizaje profundo (*deep learning*). Con este fin, se empleó el programa ADMETlab v. 3.0 (Xiong et al., 2021). Se consideró que existía el riesgo predictivo de toxicidad en aquellos resultados con una probabilidad mayor a 0.70 (*Probabilidad*>0.70) fueron consideradas como actividades positivas.

Identificación de sitios de metabolismo

Los sitios de metabolismo de la Cipermetrina y los metabolitos fueron evaluados empelando un modelo de metabolismo de Citocromo P450 en conjunto con métodos de redes neuronales y aprendizaje profundo (*deep learning*), a modo de predecir sitios de reacciones de metabolismo Fase I, N-desalquilación y Epoxidación. Para ello, se empleó el programa XenoSite v. 0a1 (Dang et al., 2016; Matlock et al., 2015; Zaretzki et al., 2013).

Simulaciones de acoplamiento molecular

Las simulaciones de acoplamiento molecular se llevaron a cabo empleando como proteínas dianas las estructuras proteicas de las isoformas de la Citocromo P450 y la UDP-glucuronosiltransferasa 2B15, las cuales se encuentran involucradas en el metabolismo de xenobióticos y de piretroides [CYP1A2 (PDB:2HI4), CYP2B6 (PDB: 5UDA), CYP2C19 (PDB: 4GQS), CYP2C9 (PDB: 4NZ2), CYP2D6 (PDB: 4WNW), CYP3A4 (PDB: 9BV5), UDP-glucuronosiltransferasa 2B15 (UGT2B15) (AlphaFoldDB: AF-P54855-F1) (Crettol et al., 2010; Hedges et al., 2018), junto con la estructura de la Carboxilesterasa 1 (CES1) (PDB: 1MX1)], la cual fue descrita previamente como enzima con acción metabólica sobre la estructura molecular de la Cipermetrina (Crow et al., 2007), dichas estructuras fueron obtenidas de las bases de datos Protein Data Bank y de AlphaFold Protein Structure Database (Bhutani et al., 2021; Berman et al., 2002).

La estructura de la Cipermetrina (PubChem CID: 2912) fue obtenido de la base de datos PubChem (Kim et al., 2016). Asimismo, las estructuras moleculares de los metabolitos fueron obtenidas utilizando el programa ChemSketch v. 2021.2.0 (ACD/Labs, Toronto, Canadá).

La minimización energética de los compuestos fue llevada a cabo mediante el algoritmo MMFF94 (Merck Molecular Force Field 94) y el método de gradientes conjugados con un ciclo de 100.000 etapas, junto con un criterio de convergencia de 0.001 kcal/mol.Å. También se dotaron de cargas parciales e hidrógeno polares presentes a un pH de 7.4, para ello, se utilizó el programa Avogadro 2.0 (Hanwell et al., 2012).

Posteriormente, se llevaron a cabo las simulaciones de acoplamiento molecular en un número de iteraciones igual a 50 (i=50) y una exhaustividad igual a 20 (e=20), con el propósito de minimizar el grado de incertidumbre en las pruebas computacionales (Gayozo-Melgarejo & Rojas-Aguadé, 2023). Para las simulaciones, se utilizó una caja de interacción con dimensiones de 68x47x73 $Å^3$ con las isoformas del Citocromo P450 (CYP), 113x116x66 $Å^{3,}$ con la UDP-glucuronosiltransferasa 2B15, y 54x67x70 $Å^{3,}$ con la Carboxilesterasa 1, y para ello se empleó el programa AutoDock Vina v1.2.x (Trott & Olson, 2010). Finalmente, fueron seleccionados para su análisis estructural aquellos complejos con menor valor promedio de energía libre de unión (ΔG).

La visualización y el análisis tridimensional y bidimensional de los complejos seleccionados se llevaron a cabo utilizando el programa PoseView v. 1.9 (Stierand & Rarey, 2010) y el programa UCSF Chimera v. 1.17.1 (Pettersen et al., 2004). El protocolo empleado en las pruebas computacionales fue validado mediante simulaciones de redocking mediante estructuras co-cristalizados con ligandos de CYP1A2 (PDB: 2HI4) y CYP2B6 (PDB: 5UDA), bajo los mismos protocolos de simulación.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en las aproximaciones computacionales sugieren biotransformaciones con cuatro tipos de reacciones bioquímicas involucradas en el metabolismo de Fase I, las cuales fueron reacciones de hidroxilaciones, oxidaciones de grupo alcohol a grupo aldehído, hidrólisis, y una cuarta reacción de glucuronidación involucrada en el metabolismo de Fase II (Figura 1, Archivos suplementarios Tabla S1, y Tabla S2).

Se registraron un total de 16 metabolitos generados como producto de la biotransformación de la Cipermetrina en el metabolismo humano, distribuidas en cinco vías de reacciones, exceptuando la 3-PBA que es producto de la hidrólisis mediada por la Carboxilesterasa 1 (CES1) (Crow et al., 2007).

De igual manera, el análisis estructural de la molécula de Cipermetrina no indicó hidroxilaciones en los sitios de oxigenación inestable correspondiente a los enlaces covalentes con los átomos de Cloro (halógenos). Sin embargo, si se identificó una alta probabilidad de hidrólisis en la estructura molecular central de la Cipermetrina, correspondiente al enlace tipo éster, lo cual concuerda con el sitio de escisión de la Carboxilesterasa 1 (Figura 2) (Crow et al., 2007).

Estudios anteriores han reportado la ocurrencia de reacciones de hidrólisis e hidroxilación durante el metabolismo de piretroides como la Cipermetrina (Mikata et al., 2012; Nishi et al., 2006).

De igual manera, los análisis aproximativos computacionales llevados a cabo en este estudio sugieren sitios probables de N-Desalquilación y Epoxidación, los cuales son mediados por la acción de isoformas del Citocromo P450 (CYP3A4, CYP2D6, CYP1A2, CYP2C19, CYP2B6). En general, estas reacciones tienen como finalidad aumentar la reactividad de los compuestos para su posterior conjugación y excreción. Sin embargo, este tipo de modificaciones estructurales moleculares podría terminar aumentando la toxicidad de los xenobióticos en el organismo humano (Figura 2) (Guengerich, 2018; Guengerich, 2003).

Las modificaciones estructurales más frecuentes obtenidas en las aproximaciones fueron principalmente hidroxilaciones, exceptuando al metabolito 14 en la que fue registrado la oxidación de un grupo hidroxilo (-OH) a uno aldehído (-CH=O) (Figura 1).

Estos resultados concuerdan con las aproximaciones del análisis de los sitios de metabolismo de la Cipermetrina, los cuales sugieren sitios de oxigenación tanto estable como inestable. Es importante resaltar que entre los tipos de oxigenación que sufren las moléculas, se encuentra las hidroxilaciones (Ortiz de Montellano, 2010).

Los sitios de oxigenación estables se ajustan a las adiciones de grupos hidroxilos en la Cipermetrina y sus metabolitos generados en la simulación de metabolismo, siendo principalmente los afectados los anillos aromáticos y grupos metilos presentes en el anillo ciclopropano de la molécula (Figura 2).

El metabolismo de sustancias exógenas y xenobióticos son rápidamente metabolizadas dentro del hígado mediante reacciones del metabolismo de Fase I en compuestos más hidrofílicos con la finalidad de aumentar la solubilidad para su excreción vía orina (Garza et al., 2023; Phang-Lyn & Llerena, 2023).

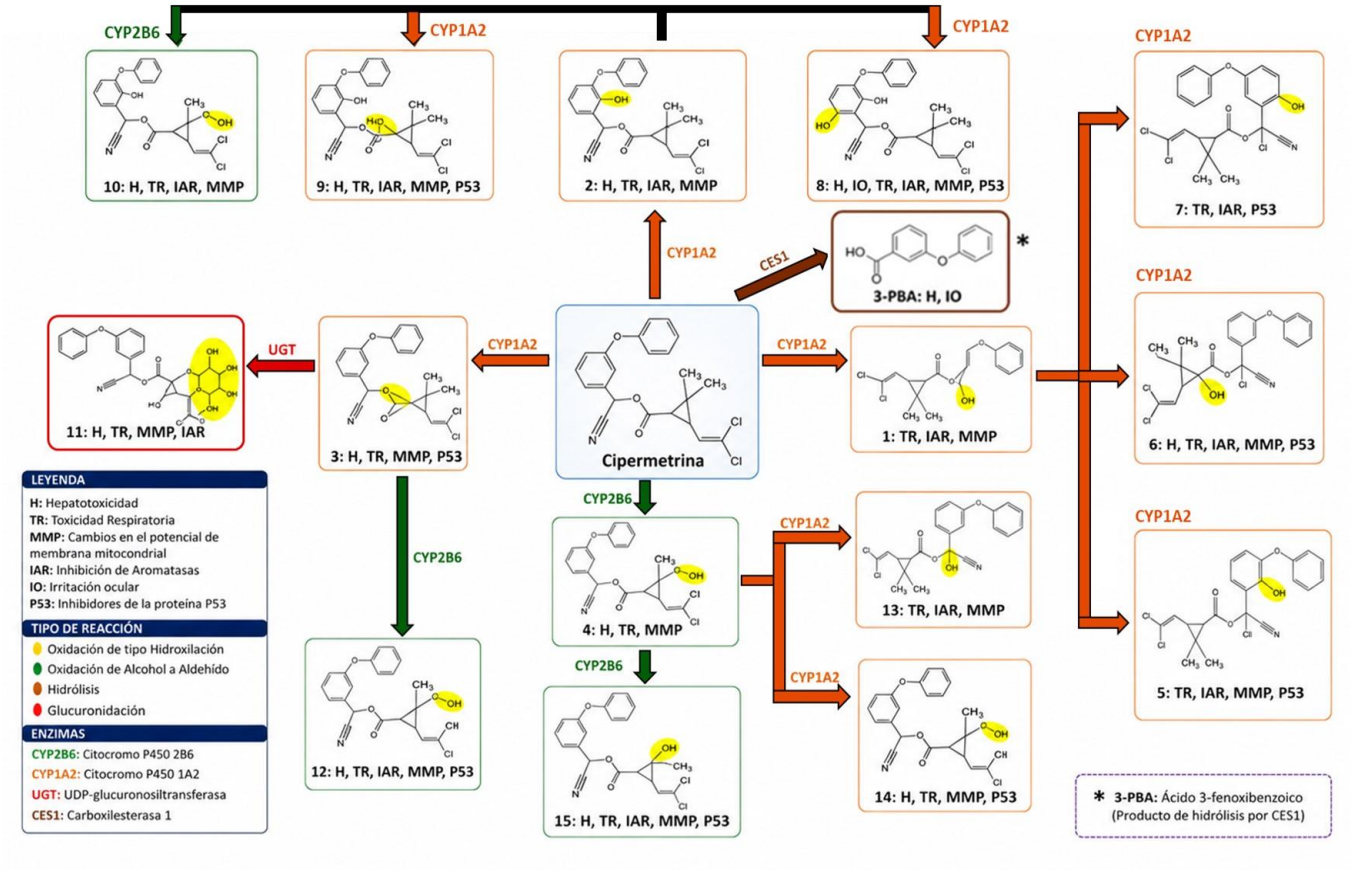

Figura 1. Aproximaciones computacionales de la ruta de biotransformación y riesgo predictivo de toxicidad de la Cipermetrina y metabolitos en el ser humano. Resaltado en amarillo se encuentran las modificaciones moleculares generadas en la estructura molecular de los metabolitos por enzimas del metabolismo de Fase I y Fase II. CES1: Carboxilesterasa 1, UGT: UDP-glucuronosiltransferasa. *Crow et al. (2007)

En el metabolismo de Fase I, ocurren principalmente reacciones de funcionalización química como oxidación, reducción e hidrólisis, catalizadas por enzimas del sistema Citocromo P450, lo que incrementa la polaridad de los compuestos para su posterior eliminación del organismo. El metabolismo de Fase II involucra reacciones de conjugación química principalmente, permitiendo la formación de compuestos más hidrosolubles, los cuales favoreciendo su transporte y excreción (van Vugt-Lussenburg et al., 2022).

Un estudio anterior ha reportado que individuos adultos de *Jenynsia multidentata* expuestos por 96 horas a la Cipermetrina (grado técnico), presentaron bioacumulación solo en tejido muscular. Los autores sugieren que dicho evento se podría deber a actividades de la CYP1A1 las cuales se expresan en los hepatocitos, dando lugar a la rápida biotransformación del compuesto en dicho organismo (Bonansea et al., 2017).

En otras investigaciones llevadas a cabo en la década de los 80's con modelos murinos expuestas a Cipermetrina, se evidenciaron modificaciones estructurales como la escisión del enlace éster, hidroxilación, glucuronidación, así como la sulfatación de los compuestos ácido ciclopropílico y 3-fenoxibencilo como producto de su metabolismo. También se ha reportado la lenta eliminación del tejido adiposo y piel (Crawford et al., 1981; Hutson & Logan, 1986; Rhodes et al., 1984).

En otros estudios con mamíferos superiores, se ha registrado la excreción de dos metabolitos, el 3-PBA y el 4OH3-PBA [ácido 3-(4-hidroxifenoxi) benzoico] presentes en la orina y generados por el clivaje del grupo éster. Asimismo, los autores detallan que las cantidades excretadas dependen de la forma de absorción del compuesto (Eadsforth & Baldwin, 1983; Mikata et al., 2012; Woollen et al., 1992).

Las aproximaciones computacionales de riesgo predictivo toxicológico de los metabolitos predicen acciones como hepatotoxicidad, toxicidad respiratoria, irritación ocular, cambios en el potencial de la membrana mitocondrial, actividades inhibitorias de aromatasas, y actividades inhibitorias de la proteína p53 (Figura 1).

En un estudio anterior, se ha reportado actividades hepatotóxicas, neurotóxicas, nefrotóxicas y toxicidad ocular de la Cipermetrina en ratas tratadas por administración oral 25,

50 y 75 mg/kg/día/rata (Sharma et al., 2014; Shuklan et al., 2023; Ullah et al., 2006).

Otra investigación llevada a cabo mediante administración intraperitoneal de Cipermetrina (50, 100, y 150 mg/kg) a conejos, se evidenciaron actividades tóxicas respiratorias junto con lesiones pulmonares (Ahmad et al., 2023).

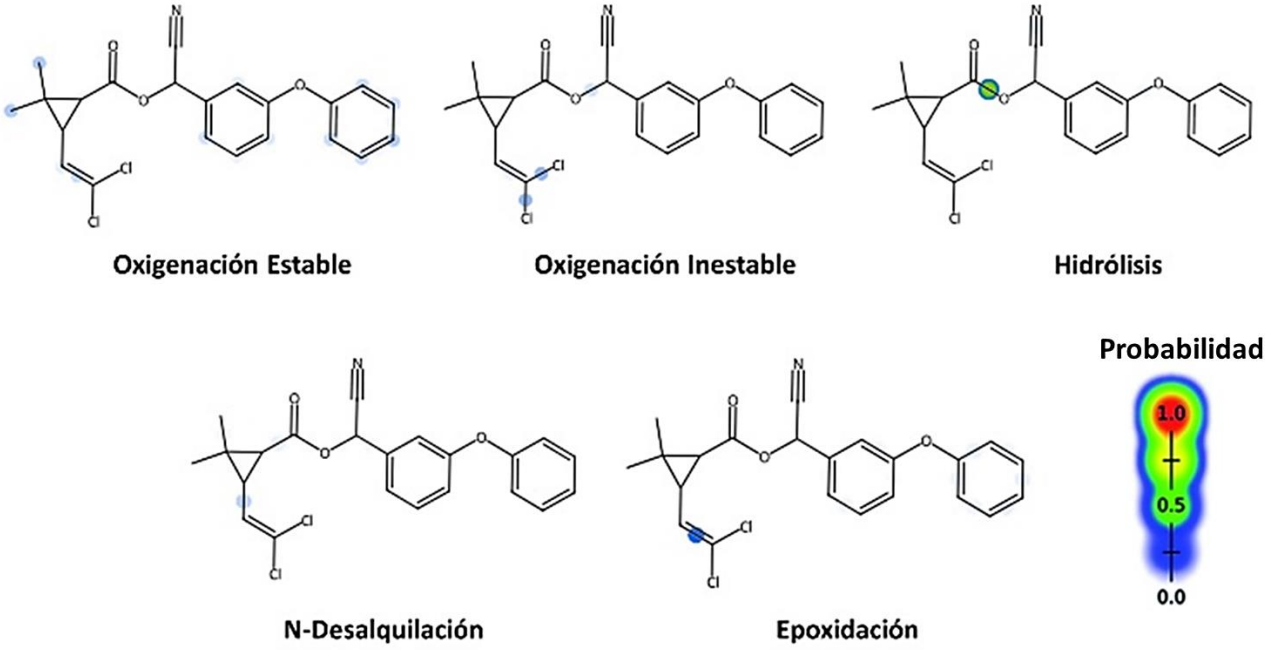

Figura 2. Sitios de metabolismo y de reacción de la Cipermetrina

Otro estudio señala que una de las vías de daño pulmonar por exposición a la Cipermetrina se da por la desregulación en la expresión del gen *Apaf1*, que participa en la muerte de células pulmonares dañadas (Shaikh & Sethi, 2023).

Igualmente, en otra investigación realizada con células TM4 de Sertoli de ratas se reportó un decremento significativo en los potenciales de membrana mitocondrial generado por la Cipermetrina, lo que afectó directamente a la producción de moléculas de ATP (adenosín trifosfato) (Wang et al., 2021; Zorova et al., 2018). En los mamíferos, el decremento en la producción de ATP está relacionado con daños a varios órganos (sistema nervioso, corazón y riñones, principalmente) (Althaher & Alwahsh, 2023).

En estudios previos se ha descrito el potencial de la Cipermetrina para afectar negativamente la producción de esteroides mediante la inhibición de las actividades de la aromatasa (Shepelska et al., 2021). Así también, otra investigación realizada con células de coriocarcinoma reportó una inducción de la actividad aromatasa mediada por la Cipermetrina (Laville et al., 2006).

También, en estudios *in vitro* se ha reportado a la molécula 3-PBA como un producto metabólico de la Cipermetrina, el cual demuestra actividades anti-androgénicas (Sun et al., 2007). Además, se han registrado efectos inmunotóxicos del metabolito 3-PBA principalmente al inhibir la diferenciación celular de los granulocitos en mamíferos (He et al., 2018).

Estudios llevados a cabo con células PC12 diferenciadas han demostrado que la Cipermetrina es capaz de ejercer una transactivación de la proteína p53 correlacionada con la expresión del microARN miR-200 (Pandey et al., 2015).

Así también, se ha reportado que la Cipermetrina ejerce alteraciones en la expresión del gen de la p53, observándose de la misma forma una regulación negativa de la sobreexpresión del mismo (Abd El-Hameed & Mahmoud, 2020; Molavi et al., 2014).

Los resultados obtenidos en las aproximaciones de acoplamiento molecular sugieren que los metabolitos generados por simulación en este estudio demuestran valores favorables de afinidades de interacción computacional con las enzimas utilizada, con un rango de entre -6.3 a -11.4 kcal/mol (Tabla 1). La validación del protocolo de simulación de los acoplamientos moleculares mediante redocking demostró valores de RMSD (*Root Mean Square Deviation, Raíz de la Desviación Cuadrática Media*) de 0.2729-0.3795 Å (Archivos suplementarios Figura S1).

Entre las enzimas evaluadas en este estudio, las predicciones indican a la CYP1A2 con afinidades de unión a la mayor parte de los metabolitos generados (01, 02, 03, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14 y 15) junto con la Cipermetrina y la 3-PBA, no así el metabolito 04 que sugiere una afinidad de interacción con la enzima CYP2B6 (Tabla 1). Es importante resaltar que, a pesar de los valores teóricos generados en el análisis computacional de acoplamiento molecular, esto no es una prueba fehaciente de que estos metabolitos son metabolizados por estas proteínas, o que inhiban las actividades de una proteína como potencial ligando (Chen, 2015).

Tabla 1. Simulaciones de acoplamiento molecular

Metabolitos	Energía libre de unión ΔG (kcal/mol)							
	CYP1A2	CYP2B6	UGT2B15	CES1	CYP2C19	CYP2C9	CYP2D6	CYP3A4
Ciperm	-10.8±0.23	-9.8±0.33	-7.4±0.17	-7.1±0.18	-9.3±0.38	-9.8±0.31	-7.6±0.14	-9.04±0.18
3-PBA	-9.2±0.51	-8.0±0.64	-7.0±0.36	-6.3±0.35	-7.05±0.27	-7.6±0.27	-6.6±0.21	-7.1±0.33
Metb1	-9.8±0.32	-9.3±0.27	-8.8±0.19	-7.3±0.28	-8.6±0.37	-9.3±0.48	-7.6±0.35	-9.05±0.39
Metb2	-10.6±0.32	-9.7±0.25	-8.2±0.34	-7.5±0.26	-9.0±0.56	-8.6±0.16	-8.6±0.44	-8.5±0.32
Metb3	-10.5±0.48	-9.1±0.79	-8.4±0.37	-7.6±0.32	-10.1±0.61	-9.7±0.49	-7.3±0.67	-9.3±0.36
Metb4	-7.0±0.20	-9.4±0.61	-8.0±0.28	-6.7±0.25	-7.8±0.79	-8.0±0.37	-6.3±0.24	-8.8±0.28
Metb5	-10.5±0.21	-9.7±0.50	-8.4±0.28	-7.4±0.20	-9.3±0.33	-7.6±0.25	-8.5±0.30	-9.3±0.28
Metb6	-9.8±0.38	-9.8±0.69	-8.9±0.53	-7.1±0.17	-8.7±0.72	-9.3±0.65	-7.8±0.16	-9.5±0.80
Metb7	-10.4±0.13	-9.0±0.13	-8.8±0.10	-7.4±0.94	-9.3±0.48	-7.9±0.46	-7.1±0.19	-9.2±0.66
Metb8	-10.1±0.23	-9.5±0.36	-8.5±0.23	-8.0±0.86	-8.3±0.54	-8.2±0.49	-7.7±0.18	-9.6±0.31
Metb9	-10.3±0.54	-8.7±0.49	-8.6±0.39	-7.4±0.35	-8.1±0.55	-8.6±0.23	-8.0±0.30	-9.0±0.23
Metb10	-10.8±0.29	-9.4±0.57	-8.9±0.41	-7.9±0.77	-8.3±0.60	-7.2±0.44	-7.4±0.11	-9.5±0.44
Metb11	-11.4±0.78	-9.9±0.48	-8.1±0.60	-7.7±0.16	-8.9±0.22	-8.1±0.61	-6.5±0.84	-9.1±0.58
Metb12	-10.3±0.45	-9.6±0.23	-7.7±0.42	-7.2±0.62	-8.0±0.14	-9.2±0.22	-7.1±0.14	-9.5±0.78
Metb13	-10.9±0.22	-9.1±0.31	-8.0±0.19	-6.8±0.44	-8.9±0.44	-8.3±0.34	-7.6±0.42	-8.7±0.40
Metb14	-9.7±0.69	-9.0±0.29	-7.9±0.53	-6.9±0.57	-9.0±0.16	-8.0±0.16	-7.4±0.50	-9.8±0.57
Metb15	-10.9±0.18	-9.5±0.20	-8.6±0.42	-7.2±0.21	-8.6±0.32	-8.8±0.54	-8.2±0.65	-8.6±0.70

Metb: Metabolito, Ciperm: Cipermetrina, UGT2B15: UDP-glucuronosiltransferasa 2B15, CES1: Carboxilesterasa 1

Estos resultados se ajustan a lo observado en las aproximaciones de la simulación de biotransformación de la Cipermetrina en la que en la mayoría de las reacciones fueron mediadas por la CYP1A2, sin embargo, esto no excluye afinidades de unión con otras enzimas como la CES1 y otras isoformas del Citocromo P450 (Figura 1, Tabla 1).

El análisis estructural de los complejos formados entre los metabolitos mencionados y la estructura de la CYP1A2 predicen la formación de interacciones de puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas que involucran a orbitales π de residuos aromáticos y los anillos aromáticos presentes en la estructura principal de la Cipermetrina y de sus metabolitos. Igualmente, sugieren la formación de interacciones de van der Waals con residuos presentes en el sitio de unión de la enzima (Figura 3, Archivos suplementario Figura S2).

Entre los residuos activos predichos en las interacciones con la Cipermetrina y sus metabolitos, se encuentran a la Arg108, el Thr124, el Asp313, la Phe226, el Asp320, la Thr321, la Leu382 y la Ile386, los cuales se han reportado en estudios anteriores que cumplen roles fundamentales en la fisiología de la proteína, principalmente en la interacción con los ligandos y la estabilización de la estructura del complejo (Figura 3, Archivos suplementarios Figura S2) (Zhou et al., 2009; Zhou et al., 2010).

Es importante destacar que el papel que cumplen estos residuos se debe principalmente a que los mismos se encuentran presentes en las estructuras de la hélice-α F y la hélice-α I de las enzimas, los cuales forman dos plataformas de unión al sustrato, sitios en donde se exponen las cadenas laterales, lo que favorece la formación de interacciones como puentes de hidrógeno y junto con el potencial de hidratación del sistema, el cual posibilita reacciones como las hidroxilaciones y oxigenaciones del sustrato/ligando (Zhou et al., 2009; Zhou et al., 2010).

A su vez, el análisis predictivo del complejo formado entre el metabolito 04 y la enzima CYP2B6, sugiere principalmente interacciones hidrofóbicas que involucran orbitales π entre la cadena aromática de la Phe115 y el grupo aromático del metabolito. También se predijo la formación de interacciones de van der Waals con los residuos Ile114 y la Phe115 (Figura 4).

Entre los residuos predichos como activos se encuentran la Ile114 y la Phe115. En el caso de la Ile114, se ha reportado en otros estudios que cumple con una función importante para la estabilización de la unión del ligando en el sitio activo de la enzima, esto debido a su naturaleza apolar y a su hidrofobicidad (Lewis et al., 1999; Lu et al., 2018; Niu et al., 2011).

Es importante resaltar que también el residuo Phe115 aporta a la interacción predicha entre el ligando y el sitio activo de la CYP2B6. Esto es principalmente debido a las interacciones sugeridas entre los orbitales π del residuo y del metabolito 04, este tipo de uniones da lugar a una contribución electrostática e induce a la estabilización de la estructura del complejo proteína-ligando (Carter-Fenk et al., 2023; Carter-Fenk & Herbert, 2020).

Es necesario denotar que entre las interacciones predichas en los complejos mencionados se encuentran los puentes de hidrógeno, un tipo de interacción intermolecular que genera un aporte no muy significativo (1-3 kcal/mol) a la energía total

del complejo. Sin embargo, estas interacciones favorecen a la estabilización del ligando en interacción con la proteína (Chen et al., 2016; Bitencourt-Ferreira et al., 2019).

De igual manera, las interacciones hidrofóbicas predichas incrementan su aporte energético a medida que aumenta la superficie hidrofóbica de contacto de la enzima. Además, aportan considerablemente en la estabilización de la estructura molecular de los ligandos en el sitio de unión de la proteína, con aportes energéticos de entre 1.5-2 kcal/mol (Myslinski et al., 2011; Patil et al., 2010; Zhou et al., 2012).

Asimismo, se ha reportado que las interacciones de van der Waals constituyen uno de los principales factores que más contribuyen en la unión entre los compuestos y la proteína en un modelo proteína-ligando. Estas interacciones influyen directamente en la sustitución de las interacciones entre el disolvente y las moléculas de ligandos, lo que favorece la formación y estabilización del complejo. Estas interacciones se dan principalmente con residuos presentes en el sitio bolsillo de unión de las enzimas, generando un aporte energético estimado de aproximadamente 100 kJ/mol (Barratt et al., 2005).

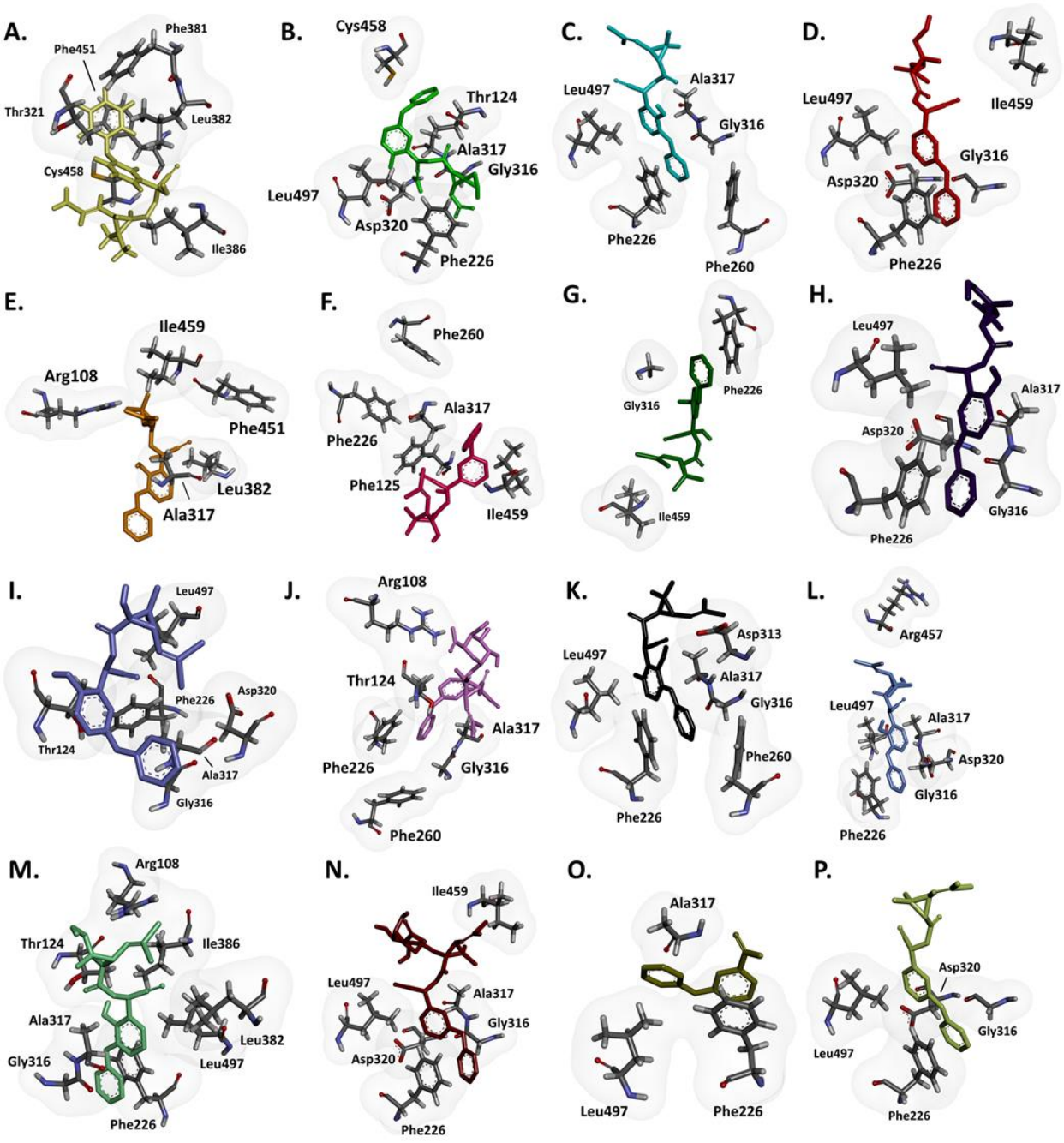

Figura 3. Representaciones tridimensionales de los residuos activos de la enzima CYP1A2 en interacción con los compuestos evaluados en este estudio. **A.** Metabolito 01. **B.** Metabolito 02. **C.** Metabolito 03. **D.** Metabolito 05. E**.** Metabolito 06. **F.** Metabolito 07. **G.** Metabolito 08. **H.** Metabolito 09. **I.** Metabolito 10. **J.** Metabolito 11. **K.** Metabolito 12. **L.** Metabolito 13. **M.** Metabolito 14. **N.** Metabolito 15. **O.** 3-PBA. **P.** Cipermetrina

Esta investigación *in silico* representa el primer intento predictivo de caracterización reportado acerca de la ruta de biotransformación de la Cipermetrina en seres humanos expuestos a este compuesto. De igual forma, aporta las

primeras aproximaciones computacionales estructurales de los posibles metabolitos generados durante el metabolismo, así como la predicción de las proteínas (enzimas) implicadas en dicho evento metabólico mediante herramientas quimioinformáticas y bioinformáticas.

Igualmente, se hace un enfoque puntual en las predicciones computacionales de efectos tóxicos que los metabolitos podrían ocasionar en el organismo expuesto. No obstante, se plantean varias limitaciones existentes en las aproximaciones computacionales que incluyen principalmente a datos farmacocinéticos y cinética de reacción de las enzimas. Estos procesos son eventos que dependen de las condiciones celulares, así como de la concentración del sustrato que puede variar de un tejido a otro, y de un individuo a otro (Kapeleka et al., 2019).

A pesar de la gran utilidad que nos ofrecen los modelos QSAR a la hora de predecir actividades biológicas de compuestos, una de las principales limitaciones que aparecen son los problemas de extrapolación sujeto a la complejidad molecular principalmente y la falta de información con respecto al tiempo de exposición, así como la dosis de exposición. Esto dificulta las predicciones e inserta cierto grado de incertidumbre (Gleeson et al., 2012; Raies & Bajic, 2016).

Estos factores pueden modificar drásticamente la frecuencia de cada reacción y cambiar la proporción final de los metabolitos formados en el organismo humano. Los resultados obtenidos en este estudio son una aproximación computacional predictiva de lo que pasaría con estos compuestos al estar expuesto al ser humano.

4. CONCLUSIONES

Los hallazgos representan una predicción computacional de la potencial ruta de biotransformación de la Cipermetrina en seres humanos expuestos por enzimas del metabolismo de Fase I y Fase II. Los resultados sugieren la formación de 16 metabolitos mediante reacciones bioquímicas metabólicas de hidroxilación (oxigenación), hidrólisis, oxidaciones de grupos hidroxilos a carbonilos y conjugaciones químicas.

Los análisis estructurales indican que los metabolitos presentan riesgos predictivos tóxicos entre los que se incluyen hepatotoxicidad, toxicidad respiratoria, irritación ocular, cambios en el potencial de la membrana mitocondrial, actividades inhibitorias de aromatasas, e inhibiciones a la proteína p53.

Igualmente, las simulaciones de acoplamiento molecular predicen afinidades de unión de la Cipermetrina y sus metabolitos principalmente con la isoforma CYP1A2, también se sugiere que el metabolito 04 presenta afinidades de interacción a la isoforma CYP2B6.

Se recomienda llevar a cabo ensayos con modelos *in vivo* a modo de evaluar la ruta de biotransformación de la Cipermetrina y reconfirmar los resultados obtenidos en estas aproximaciones computacionales.

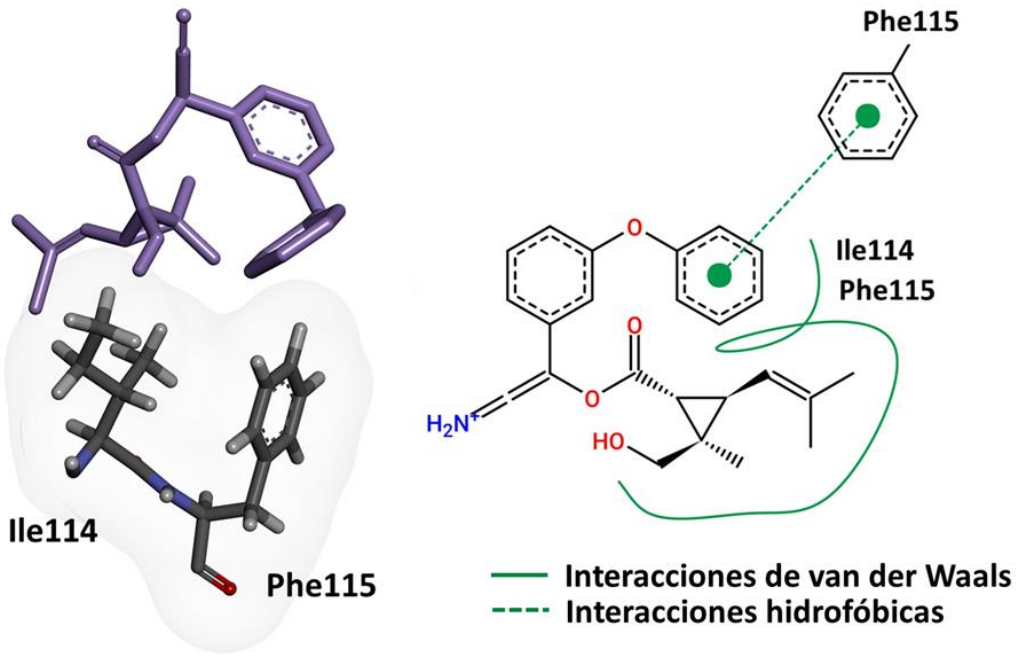

Figura 4. Representación bidimensional del complejo formado entre la enzima CYP2B6 y el metabolito 04

DECLARACIÓN DE INTERESES CONCURRENTES

Los autores declaran que no existen conflicto de intereses.

CONTRIBUCIÓN DE AUTORES

Fleitas-Ibarrola Lucas: Conceptualización, Curación de datos, Investigación, Metodología, Análisis formal, Redacción – borrador original. **Gayozo Elvio**: Metodología, Curación de

datos, Investigación, Análisis formal, Supervisión, Redacción – revisión y edición.

REFERENCIAS

Abd El-Hameed, A. M., & Mahmoud, H. S. (2020). Cypermethrin induced apoptosis and testicular toxicity by upregulation of p53 in the brain and testis of male rats is alleviated by sesame oil. *Journal of Taibah University for Science*, 14(1), 1342–1349. https://doi.org/10.1080/16583655.2020.1822057

Ahmad, L., Gul, S. T., Du, X., Hussain, R., Khanani, M. R., Iram, S., Rehman, A. U., & Khan, A. (2023). Dose- and dosage-dependent spectrum of respiratory toxicity of cypermethrin in rabbits. *Toxin Reviews*, 42(3), 573-582. https://doi.org/10.1080/15569543.2023.2204334

AlKahtane, A. A., Alarifi, S., Al-Qahtani, A. A., Ali, D., Alomar, S. Y., Aleissia, M. S., & Alkahtani, S. (2018). Cytotoxicity and genotoxicity of cypermethrin in hepatocarcinoma cells: A dose- and time-dependent study. *Dose-Response*, 16(2), 1559325818760880. https://doi.org/10.1177/1559325818760880

Althaher, A. R., & Alwahsh, M. (2023). An overview of ATP synthase, inhibitors, and their toxicity. *Heliyon*, 9(11), e22459. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e22459

Barratt, E., Bingham, R. J., Warner, D. J., Laughton, C. A., Phillips, S. E. V., & Homans, S. W. (2005). Van der Waals interactions dominate ligand−protein association in a protein binding site occluded from solvent water. *Journal of The American Chemical Society*, 127(33), 11827-11834. https://doi.org/10.1021/ja0527525

Berman, H. M., Battistuz, T., Bhat, T. N., Bluhm, W. F., Bourne, P. E., Burkhardt, K., Feng, Z., Gilliland, G. L., Iype, L., Jain, S., Fagan, P., Marvin, J., Padilla, D., Ravichandran, V., Schneider, B., Thanki, N., Weissig, H., Westbrook, J. D., & Zardecki, C. (2002). The Protein Data Bank. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 58(6), 899-907. https://doi.org/10.1107/s0907444902003451

Bhutani, P., Joshi, G., Raja, N., Bachhav, N., Rajanna, P. K., Bhutani, H., Paul, A. T., & Kumar, R. (2021). U.S. FDA approved drugs from 2015–june 2020: a perspective. *Journal of Medicinal Chemistry*, 64(5), 2339-2381. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01786

Bitencourt-Ferreira, G., Veit-Acosta, M., de Azevedo, W.F. (2019). Hydrogen bonds in protein-ligand complexes. En: de Azevedo Jr., W. (eds) Docking screens for drug discovery. *Methods in Molecular Biology*, vol 2053. Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9752-7_7

Bonansea, R. I., Marino, D. J. G., Bertrand, L., Wunderlin, D. A., & Amé, M. V. (2017). Tissue-specific bioconcentration and biotransformation of cypermethrin and chlorpyrifos in a native fish (*Jenynsia multidentata*) exposed to these insecticides singly and in mixtures. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(7), 1764-1774. https://doi.org/10.1002/etc.3613

Cantalamessa, F. (1993). Acute toxicity of two pyrethroids, permethrin, and cypermethrin in neonatal and adult rats. *Archives of Toxicology*, 67(7), 510-513. https://doi.org/10.1007/BF01969923

Carter-Fenk, K., Liu, M., Pujal, L., Loipersberger, M., Tsanai, M., Vernon, R. M., Forman-Kay, J. D., Head-Gordon, M., Heidar-Zadeh, F., & Head-Gordon, T. (2023). The energetic origins of Pi–Pi contacts in proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 145(45), 24836-24851. https://doi.org/10.1021/jacs.3c09198

Carter-Fenk, K., & M. Herbert, J. (2020). Electrostatics does not dictate the slip-stacked arrangement of aromatic π–π interactions. *Chemical Science*, 11(26), 6758-6765. https://doi.org/10.1039/D0SC02667K

Chen, S., Luo, J., Hu, M., Lai, K., Geng, P., & Huang, H. (2012). Enhancement of cypermethrin degradation by a coculture of Bacillus cereus ZH-3 and Streptomyces aureus HP-S-01. *Bioresource Technology*, 110, 97-104. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.106

Chen, Y. C. (2015). Beware of docking!. *Trends In Pharmacological Sciences*, 36(2), 78-95. http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2014.12.001

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. *Science Advances*, 2(3), e1501240. https://doi.org/10.1126/sciadv.1501240

Crawford, M. J., Croucher, A., & Hutson, D. H. (1981). The metabolism of the pyrethroid insecticide cypermethrin in rats; excreted metabolites. *Pesticide Science*, 12(4), 399-411. https://doi.org/10.1002/ps.2780120406

Crettol, S., Petrovic, N., & Murray, M. (2010). Pharmacogenetics of phase I and phase II drug metabolism. *Current Pharmaceutical Design*, 16(2), 204-219. https://doi.org/10.2174/138161210790112674

Crow, J. A., Borazjani, A., Potter, P. M., & Ross, M. K. (2007). Hydrolysis of pyrethroids by human and rat tissues: Examination of intestinal, liver and serum carboxylesterases. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 221(1), 1-12. https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.03.002

Dang, N. L., Hughes, T. B., Krishnamurthy, V., & Swamidass, S. J. (2016). A simple model predicts UGT-mediated metabolism. *Bioinformatics*, 32(20), 3183-3189. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw350

Djoumbou-Feunang, Y., Fiamoncini, J., Gil-de-la-Fuente, A., Greiner, R., Manach, C., & Wishart, D. S. (2019). BioTransformer: A comprehensive computational tool for small molecule metabolism prediction and metabolite identification. *Journal of Cheminformatics*, 11(1), 2. https://doi.org/10.1186/s13321-018-0324-5

Eadsforth, C. V., & Baldwin, M. K. (1983). Human dose-excretion studies with the pyrethroid insecticide, cypermethrin. *Xenobiotica*, 13(2), 67-72. https://doi.org/10.3109/00498258309052238

Edwards, R., Millburn, P., & Hutson, D. H. (1987). Factors influencing the selective toxicity of cis- and trans-cypermethrin in rainbow trout, frog, mouse and quail: Biotransformation in liver, plasma, brain and intestine. *Pesticide Science*, 21(1), 1-21. https://doi.org/10.1002/ps.2780210102

Falah, M. M., & Burr, S. A. (2024). Cypermethrin. En P. Wexler (Ed.), Encyclopedia of Toxicology (Fourth Edition) (pp. 445-448). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824315-2.00524-8

Gangola, S., Sharma, A., Bhatt, P., Khati, P., & Chaudhary, P. (2018). Presence of esterase and laccase in *Bacillus subtilis* facilitates biodegradation and detoxification of cypermethrin. *Scientific Reports*, 8(1), 12755. https://doi.org/10.1038/s41598-018-31082-5

Garza, A. Z., Park, S. B., & Kocz, R. (2023). Drug elimination. En StatPearls. StatPearls Publishing. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547662/

Gayozo-Melgarejo, E., & Rojas-Aguadé, L. (2023). Evaluación computacional de las interacciones de compuestos naturales y el dominio unión al ARN de las nucleolinas utilizando acoplamiento molecular y simulaciones de dinámica molecular. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 47(183), 385-399. https://doi.org/10.18257/raccefyn.1830

Gleeson, M. P., Modi, S., Bender, A., L. Marchese Robinson, R., Kirchmair, J., Promkatkaew, M., Hannongbua, S., & C. Glen, R. (2012). The challenges involved in modeling toxicity data *in silico*: a review. *Current Pharmaceutical Design*, 18(9), 1266-1291. https://doi.org/10.2174/138920012799362819

Guengerich, F. P. (2018). Mechanisms of cytochrome P450-catalyzed oxidations. *ACS Catalysis*, 8(12), 10964-10976. https://doi.org/10.1021/acscatal.8b03401

Guengerich, P. F. (2003). Cytochrome P450 oxidations in the generation of reactive electrophiles: Epoxidation and related reactions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 409(1), 59-71. https://doi.org/10.1016/S0003-9861(02)00415-0

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. *Journal of Cheminformatics*, 4(1), 17. https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17

Hartnik, T., & Styrishave, B. (2008). Impact of biotransformation and bioavailability on the toxicity of the insecticides α-cypermethrin and chlorfenvinphos in earthworm. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(22), 11057-11064. https://doi.org/10.1021/jf8017904

He, B., Wang, X., Wei, L., Kong, B., Jin, Y., Xie, X., & Fu, Z. (2018). β-Cypermethrin and its metabolite 3-phenoxybenzoic acid induce cytotoxicity and block granulocytic cell differentiation in HL-60 cells. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 50(8), 740-747. https://doi.org/10.1093/abbs/gmy068

Hedges, L., Brown, S., MacLeod, A. K., Vardy, A., Doyle, E., Song, G., Moreau, M., Yoon, M., Osimitz, T. G., & Lake, B. G. (2018). Metabolism of deltamethrin and cis- and trans-permethrin by human expressed cytochrome P450 and carboxylesterase enzymes. *Xenobiotica*, 49(5), 521-527. https://doi.org/10.1080/00498254.2018.1474283

Hutson, D. H., & Logan, C. J. (1986). The metabolic fate in rats of the pyrethroid insecticide WL85871, a mixture of two isomers of cypermethrin. *Pesticide Science*, 17(5), 548-558. https://doi.org/10.1002/ps.2780170513

Kaur, R., & Singh, J. (2021). Toxicity, monitoring, and biodegradation of cypermethrin insecticide: A review. Nature Environment and Pollution Technology, 20(5), 1997-2005. https://doi.org/10.46488/NEPT.2021.v20i05.016

Kapeleka, J. A., Sauli, E., Sadik, O., & Ndakidemi, P. A. (2019). Biomonitoring of acetylcholinesterase (AChE) activity among smallholder horticultural farmers occupationally exposed to mixtures of pesticides in Tanzania. *Journal of Environmental and Public Health*, 2019, 1-11. https://doi.org/10.1155/2019/3084501

Kim, S., Thiessen, P. A., Bolton, E. E., Chen, J., Fu, G., Gindulyte, A., Han, L., He, J., He, S., Shoemaker, B. A., Wang, J., Yu, B., Zhang, J., & Bryant, S. H. (2016). PubChem substance and compound databases. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D1202-D1213. https://doi.org/10.1093/nar/gkv951

Kumar Singh, A., Nath Tiwari, M., Prakash, O., & Pratap Singh, M. (2012). A current review of cypermethrin-induced neurotoxicity and nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration. *Current Neuropharmacology*, 10(1), 64-71. https://doi.org/10.2174/157015912799362779

Laville, N., Balaguer, P., Brion, F., Hinfray, N., Casellas, C., Porcher, J.-M., & Aït-Aïssa, S. (2006). Modulation of aromatase activity and mRNA by various selected pesticides in the human choriocarcinoma JEG-3 cell line. *Toxicology*, 228(1), 98-108. https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.08.021

Lewis, D. F. V., Lake, B. G., Dickins, M., Eddershaw, P. J., Tarbit, M. H., & Goldfarb, P. S. (1999). Molecular modelling of CYP2B6, the human CYP2B isoform, by homology with the substrate-bound CYP102 crystal structure: evaluation of CYP2B6 substrate characteristics, the cytochrome b5 binding site and comparisons with CYP2B1 and CYP2B4. *Xenobiotica*, 29(4), 361-393. https://doi.org/10.1080/004982599238560

Lu, N., Meng, F., Xu, W., Tang, L., & Xu, Y. (2018). Molecular simulation study of CYP2B6 polymorphism with and without psoralen. *Molecular Simulation*, 44(17), 1402-1410. https://doi.org/10.1080/08927022.2018.1513646

Manna, S., Bhattacharyya, D., Mandal, T. K., & Dey, S. (2005). Neuropharmacological effects of alfa-cypermethrin in rats. *Indian Journal of Pharmacology*, 37(1), 18. https://doi.org/10.4103/0253-7613.13849

Matlock, M. K., Hughes, T. B., & Swamidass, S. J. (2015). XenoSite server: A web-available site of metabolism prediction tool. *Bioinformatics*, 31(7), 1136-1137. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu761

Mcdaniel, K. L., & Moser, V. C. (1993). Utility of a neurobehavioral screening battery for differentiating the effects of two pyrethroids, permethrin and cypermethrin. *Neurotoxicology and Teratology*, 15(2), 71-83. https://doi.org/10.1016/0892-0362(93)90065-V

Mikata, K., Isobe, N., & Kaneko, H. (2012). Biotransformation and enzymatic reactions of synthetic pyrethroids in mammals. En N. Matsuo & T. Mori (Eds.), Pyrethroids: from Chrysanthemum to modern industrial insecticide (pp. 113-135). Springer. https://doi.org/10.1007/128_2011_254

Molavi, M., Razi, M., Malekinejad, H., Amniattalab, A., & Rezaie, H. (2014). Vitamin E improved cypermethrin-induced damages in the ovary of rats; evidence for

angiogenesis and p53 involvement. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 110, 27-35. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.02.004

Myslinski, J. M., DeLorbe, J. E., Clements, J. H., & Martin, S. F. (2011). Protein–Ligand interactions: Thermodynamic effects associated with increasing nonpolar surface area. *Journal of The American Chemical Society*, 133(46), 18518-18521. https://doi.org/10.1021/ja2068752

Nishi, K., Huang, H., Kamita, S. G., Kim, I.-H., Morisseau, C., & Hammock, B. D. (2006). Characterization of pyrethroid hydrolysis by the human liver carboxylesterases hCE-1 and hCE-2. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 445(1), 115-123. https://doi.org/10.1016/j.abb.2005.11.005

Niu, R. J., Zheng, Q. C., Zhang, J. L., & Zhang, H. X. (2011). Analysis of clinically relevant substrates of CYP2B6 enzyme by computational methods. *Journal of Molecular Modeling*, 17(11), 2839-2846. https://doi.org/10.1007/s00894-011-0970-2

Oda, S. S., & El-Maddawy, Z. Kh. (2012). Protective effect of vitamin E and selenium combination on deltamethrin-induced reproductive toxicity in male rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 64(7), 813-819. https://doi.org/10.1016/j.etp.2011.03.001

Ortiz de Montellano, P. R. (2010). Hydrocarbon hydroxylation by cytochrome P450 enzymes. *Chemical Reviews*, 110(2), 932-948. https://doi.org/10.1021/cr9002193

Pandey, A., Jauhari, A., Singh, T., Singh, P., Singh, N., Srivastava, A. K., Khan, F., Pant, A. B., Parmar, D., & Yadav, S. (2015). Transactivation of P53 by cypermethrin induced miR-200 and apoptosis in neuronal cells. *Toxicology Research*, 4(6), 1578-1586. https://doi.org/10.1039/c5tx00200a

Pankaj, Sharma, A., Gangola, S., Khati, P., Kumar, G., & Srivastava, A. (2016). Novel pathway of cypermethrin biodegradation in a *Bacillus* sp. Strain SG2 isolated from cypermethrin-contaminated agriculture field. *3 Biotech*, 6(1), 45. https://doi.org/10.1007/s13205-016-0372-3

Patil, R., Das, S., Stanley, A., Yadav, L., Sudhakar, A., & Varma, A. K. (2010). Optimized hydrophobic interactions and hydrogen bonding at the target-ligand interface leads the pathways of drug-designing. *PLoS ONE*, 5(8), e12029. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012029

Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605-1612. https://doi.org/10.1002/jcc.20084

Phang-Lyn, S., & Llerena, V. A. (2023). Biochemistry, biotransformation. En StatPearls. StatPearls Publishing. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544353/

Raies, A. B., & Bajic, V. B. (2016). *In silico* toxicology: computational methods for the prediction of chemical toxicity. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 6(2), 147-172. https://doi.org/10.1002/wcms.1240

Reyes-Chaparro, A., Verdín-Betancourt, F. A., & Sierra-Santoyo, A. (2020). Human biotransformation pathway of temephos using an *in silico* approach. *Chemical Research in Toxicology*, 33(11), 2765-2774. https://dx.doi.org/10.1021/acs.chemrestox.0c00105

Rhodes, C., Jones, B. K., Croucher, A., Hutson, D. H., Logan, C. J., Hopkins, R., Hall, B. E., & Vickers, J. A. (1984). The bioaccumulation and biotransformation of cis, trans-cypermethrin in the rat. *Pesticide Science*, 15(5), 471-480. https://doi.org/10.1002/ps.2780150508

Seal, S., Mahale, M., García-Ortegón, M., Joshi, C. K., Hosseini-Gerami, L., Beatson, A., Greenig, M., Shekhar, M., Patra, A., Weis, C., Mehrjou, A., Badré, A., Paisley, B., Lowe, R., Singh, S., Shah, F., Johannesson, B., Williams, D., Rouquie, D., Clevert, D. A., Schwab, P., Richmond, N., Nicolaou, C. A., Gonzalez, R. J., Naven, R., Schramm, C., Vidler, L. R., Mansouri, K., Walters, W. P., Dalmas Wilk, D., Spjuth, O., Carpenter, A. E., & Bender, A. (2025). Machine learning for toxicity prediction using chemical structures: Pillars for success in the real world. *Chemical Research In Toxicology*, 38(5), 759-807. https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5c00033

Shaikh, N. I., & Sethi, R. S. (2023). Impairment of apoptosis pathway via Apaf1 downregulation during chlorpyrifos and/or cypermethrin induced lung damage. *Animal Biotechnology*, 34(3), 738-745. https://doi.org/10.1080/10495398.2021.1981918

Sharma, A., Yadav, B., Rohatgi, S., & Yadav, B. (2018). Cypermethrin toxicity: a review. *Journal of Forensic Sciences & Criminal Investigation*, 9(4), 1-3. https://doi.org/10.19080/JFSCI.2018.09.555767

Sharma, P., Firdous, S., & Singh, R. (2014). Neurotoxic effect of cypermethrin and protective role of resveratrol in Wistar rats. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*, 4(2), 104. https://doi.org/10.4103/2231-0738.129598

Shepelska, N. R., Prodanchuk, M. G., & Kolianchuk, Y. V. (2021). Comparative analysis of two methodological approaches to the study of endocrine disruptor alpha-cypermethrin reproductive toxicity. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 12(4), 724-732. https://doi.org/10.15421/0221100

Shukla, Y., Yadav, A., & Arora, A. (2002). Carcinogenic and cocarcinogenic potential of cypermethrin on mouse skin. *Cancer Letters*, 182(1), 33-41. https://doi.org/10.1016/S0304-3835(02)00077-0

Shuklan, P., Raj, A., Chauhan, K., Madan, P., & Rani, S. (2023). Systematic toxicity of cypermethrin and alterations in behavior of albino rats. *ACS Omega*, 8(16), 14766-14773. https://doi.org/10.1021/acsomega.3c00817

Stierand, K., & Rarey, M. (2010). Drawing the PDB: Protein−Ligand Complexes in Two Dimensions. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 1(9), 540-545. https://doi.org/10.1021/ml100164p

Sun, H., Xu, X. L., Xu, L. C., Song, L., Hong, X., Chen, J. F., Cui, L. B., & Wang, X. R. (2007). Antiandrogenic activity of pyrethroid pesticides and their metabolite in reporter gene assay. *Chemosphere*, 66(3), 474-479. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.05.059

Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), 455-461. https://doi.org/10.1002/jcc.21334

Ullah, M. S. D. of A. R., Ahmad, M. D. of A. R., Ahmad, N. D. of A. R., Khan, M. Z. D. of V. P., & Ahmad, I. (2006). Toxic effects of cypermethrin in female rabbits. *Pakistan Veterinary Journal*, 26(4), 193-196. https://www.pvj.com.pk/archive/Volume_26_Issue_4_2006.htm

van Vugt-Lussenburg, B. M., Capinha, L., Reinen, J., Rooseboom, M., Kranendonk, M., Onderwater, R. C., & Jennings, P. (2022). "Commandeuring" xenobiotic metabolism: advances in understanding xenobiotic metabolism. *Chemical Research in Toxicology*, 35(7), 1184-1201. https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.2c00067

Wang, H. X., Zhang, R., Li, Z., Wang, L. S., Yu, Y., Wang, Q., Ding, Z., Zhang, J. P., Zhang, M. R., & Xu, L. C. (2021). Cypermethrin induces Sertoli cell apoptosis through mitochondrial pathway associated with calcium. *Toxicology Research*, 10(4), 742-750. https://doi.org/10.1093/toxres/tfab056

Wishart, D. S., Tian, S., Allen, D., Oler, E., Peters, H., Lui, V. W., Gautam, V., Djoumbou-Feunang, Y., Greiner, R., & Metz, T. O. (2022). BioTransformer 3.0—A web server for accurately predicting metabolic transformation products. *Nucleic Acids Research*, 50(W1), W115-W123. https://doi.org/10.1093/nar/gkac313

Woollen, B. H., Marsh, J. R., Laird, W. J. D., & Lesser, J. E. (1992). The metabolism of cypermethrin in man: Differences in urinary metabolite profiles following oral and dermal administration. *Xenobiotica*, 22(8), 983-991. https://doi.org/10.3109/00498259209049904

Xiong, G., Wu, Z., Yi, J., Fu, L., Yang, Z., Hsieh, C., Yin, M., Zeng, X., Wu, C., Lu, A., Chen, X., Hou, T., & Cao, D. (2021). ADMETlab 2.0: An integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W5-W14. https://doi.org/10.1093/nar/gkab255

Zaretzki, J., Matlock, M., & Swamidass, S. J. (2013). XenoSite: accurately predicting cyp-mediated sites of metabolism with neural networks. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(12), 3373-3383. https://doi.org/10.1021/ci400518g

Zhou, L., Zhou, M., Tan, H., & Xiao, M. (2020). Cypermethrin-induced cortical neurons apoptosis via the Nrf2/ARE signaling pathway. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 165, 104547. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.02.013

Zhou, S. F., Wang, B., Yang, L. P., & Liu, J. P. (2010). Structure, function, regulation and polymorphism and the clinical significance of human cytochrome P450 1A2. *Drug Metabolism Reviews*, 42(2), 268-354. https://doi.org/10.3109/03602530903286476

Zhou, S. F., Yang, L. P., Wei, M. Q., Duan, W., & Chan, E. (2009). Insights into the structure, function, and regulation of human Cytochrome P450 1A2. *Current Drug Metabolism*, 10(7), 713-729. https://doi.org/10.2174/138920009789895552

Zhou, P., Huang, J., & Tian, F. (2012). Specific noncovalent interactions at protein-ligand interface: implications for rational drug design. *Current Medicinal Chemistry*, 19(2), 226-238. https://doi.org/10.2174/092986712803414150

Zorova, L. D., Popkov, V. A., Plotnikov, E. Y., Silachev, D. N., Pevzner, I. B., Jankauskas, S. S., Babenko, V. A., Zorov, S. D., Balakireva, A. V., Juhaszova, M., Sollott, S. J., & Zorov, D. B. (2018). Mitochondrial membrane potential. *Analytical Biochemistry*, 552, 50-59. https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.07.009

BIOGRAFÍAS

Fleitas-Ibarrola, Lucas, Licenciado en Ciencias Biológicas por la Universidad Nacional de Asunción, Paraguay. Investigador en formación del Grupo de Investigación en Biología Computacional y Bioinformática Estructural y del Laboratorio de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental.

Gayozo, Elvio, Licenciado en Ciencias Biológicas por la Universidad Nacional de Asunción, Master en Ciencias Biotecnológicas. Líder del Grupo de Investigación en Biología Computacional y Bioinformática Estructural e Investigador del Laboratorio de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental.

Material suplementario

Aproximación Computacional de la Biotransformación y Toxicidad de la Cipermetrina y sus Metabolitos

Fleitas-Ibarrola, Lucas[1,2]; Gayozo, Elvio[1,2,*]

[1]Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biología, Laboratorio de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental, San Lorenzo, Paraguay
[2]Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biología, Grupo de Investigación en Biología Computacional y Bioinformática Estructural (GIBCBE), San Lorenzo, Paraguay

Resumen: En las últimas décadas se han llevado a cabo numerosos estudios que involucran a la Cipermetrina y al ácido 3-fenoxibenzoico (3-PBA), sin embargo, se desconoce la biotransformación de la misma en el ser humano, así como la toxicidad que presentan sus metabolitos. El objetivo de este estudio fue analizar la biotransformación de la Cipermetrina y la toxicidad de sus metabolitos en el ser humano, así como las afinidades de unión a enzimas involucradas en el metabolismo Fase I y Fase II, mediante métodos bioinformáticos. Se realizaron aproximaciones de biotransformación de la Cipermetrina en metabolismo Fase I y II, se evaluaron los sitios de metabolismo y el potencial tóxico de los metabolitos, para ello se emplearon métodos de aprendizaje de máquina y QSAR (relación cuantitativa estructura-actividad). También se realizaron simulaciones de acoplamiento molecular entre la Cipermetrina, sus metabolitos y las enzimas involucradas en la biotransformación. Las aproximaciones sugieren que la Cipermetrina podría ser metabolizada en Fase I por la CYP1A2, CYP2B6 y la UDP-glucuronosiltransferasa, mediante hidroxilaciones, oxidaciones, oxigenaciones y conjugación química. Además, las aproximaciones indican riesgo predictivo de hepatotoxicidad, toxicidad respiratoria, toxicidad ocular, inhibición de aromatasa e inducción de cambios en los potenciales de membrana mitocondrial. Las simulaciones de acoplamiento molecular sugieren afinidades de interacción con la CYP1A2, y la CYP2B6. Los hallazgos *in silico* predicen que la biotransformación de la Cipermetrina ocurre en el metabolismo de Fase I y II, mediante reacciones de oxigenación y oxidación mediadas por la CYP1A2 y la CYP2B6, sugiriendo el potencial tóxico en sus metabolitos.

Tabla de Contenido

Tabla S1. Códigos SMILES de la Cipermetrina y metabolitos generados 124

Tabla S2. Nomenclatura IUPAC de metabolitos generados en este estudio 124

Figura S1. Representación de las estructuras de ligandos co-cristalizados con (A) CYP1A2 y (B) CYP2B6 en el análisis de validación redocking del protocolo de simulación de acoplamiento molecular. A. α-naftoflavona. B. Bornano 125

Figura S2. Representaciones bidimensionales de las interacciones predichas en los complejos CYP1A2 y los compuestos evaluados. A. Metabolito 01. B. Metabolito 02. C. Metabolito 03. D. Metabolito 05. E. Metabolito 06. F. Metabolito 07. G. Metabolito 08. H. Metabolito 09. I. Metabolito 10. J. Metabolito 11. K. Metabolito 12. L. Metabolito 13. M. Metabolito 14. N. Metabolito 15. O. 3-PBA. P. Cipermetrina.. 125

Tabla S1. Códigos SMILES de la Cipermetrina y metabolitos generados

Metabolitos	Códigos
Cipermetrina	Cl/C(/Cl)=C/C1C(C(=O)OC(C#N)C2=CC=CC(OC3=CC=CC=C3)=C2)C1(C)C
Metabolito 1	Cl/C(/Cl)=C/C1C(C(=O)OC(C#N)(C2=CC=CC(OC3=CC=CC=C3)=C2)O)C1(C)C
Metabolito 2	Cl/C(/Cl)=C/C1C(C(=O)OC(C#N)C2=CC=CC(OC3=CC=CC=C3)=C2O)C1(C)C
Metabolito 3	Cl/C(/Cl)=C/C1C(C(=O)OC(C#N)C2=CC=CC(OC3=CC=CC=C3)=C2)(C1(C)C)O
Metabolito 4	Cl/C(/Cl)=C/C1C(C(=O)OC(C#N)C2=CC=CC(OC3=CC=CC=C3)=C2)C1(C)CO
Metabolito 5	Cl/C(/Cl)=C/C1C(C(=O)OC(C#N)(C2=CC=CC(OC3=CC=CC=C3)=C2O)O)C1(C)C
Metabolito 6	Cl/C(/Cl)=C/C1C(C(=O)OC(C#N)(C2=CC=CC(OC3=CC=CC=C3)=C2)O)(C1(C)C)O
Metabolito 7	Cl/C(/Cl)=C/C1C(C(=O)OC(C#N)(C2=C(C=CC(OC3=CC=CC=C3)=C2)O)O)C1(C)C
Metabolito 8	Cl/C(/Cl)=C/C1C(C(=O)OC(C#N)C2=C(C=CC(OC3=CC=CC=C3)=C2O)O)C1(C)C
Metabolito 9	Cl/C(/Cl)=C/C1C(C(=O)OC(C#N)C2=CC=CC(OC3=CC=CC=C3)=C2O)(C1(C)C)O
Metabolito 10	Cl/C(/Cl)=C/C1C(C(=O)OC(C#N)C2=CC=CC(OC3=CC=CC=C3)=C2O)C1(C)CO
Metabolito 11	Cl/C(/Cl)=C/C1C(C(=O)OC(C#N)C2=CC=CC(OC3=CC=CC=C3)=C2) (C1(C)C)OC4OC(C(O)=O)C(C(C4O)O)O
Metabolito 12	Cl/C(/Cl)=C/C1C(C(=O)OC(C#N)C2=CC=CC(OC3=CC=CC=C3)=C2)(C1(C)CO)O
Metabolito 13	Cl/C(/Cl)=C/C1C(C(=O)OC(C#N)(C2=CC=CC(OC3=CC=CC=C3)=C2)O)C1(C)CO
Metabolito 14	Cl/C(/Cl)=C/C1C(C(=O)OC(C#N)C2=CC=CC(OC3=CC=CC=C3)=C2)C1(C)C=O
Metabolito 15	O=C(OC(C#N)c1cc(ccc1)Oc1ccccc1)C1C(\C=C(/Cl)Cl)C1(CO)CO
3-PBA	O=C(O)C1=CC=CC(OC2=CC=CC=C2)=C1

Tabla S2. Nomenclatura IUPAC de metabolitos generados en este estudio

Metabolitos	Nomenclatura IUPAC
Metabolito 1	Ciano(hidroxi)(3-fenoxifenil)metil 3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropano-1-carboxilato
Metabolito 2	Ciano(2-hidroxi-3-fenoxifenil)metil 3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropano-1-carboxilato
Metabolito 3	3-(2,2-diclorovinil)-1-hidroxi-2,2-dimetilciclopropano-1-carboxilato de ciano(3-fenoxifenil)metilo
Metabolito 4	3-(2,2-diclorovinil)-2-(hidroximetil)-2-metilciclopropano-1-carboxilato de ciano(3-fenoxifenil)metilo
Metabolito 5	Ciano(hidroxi)(2-hidroxi-3-fenoxifenil)metil 3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropano-1-carboxilato
Metabolito 6	Ciano(hidroxi)(3-fenoxifenil)metil 3-(2,2-diclorovinil)-1-hidroxi-2,2-dimetilciclopropano-1-carboxilato
Metabolito 7	Ciano(hidroxi)(2-hidroxi-5-fenoxifenil)metil 3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropano-1-carboxilato
Metabolito 8	Ciano(2,6-dihidroxi-3-fenoxifenil)metil 3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropano-1-carboxilato
Metabolito 9	Ciano(2-hidroxi-3-fenoxifenil)metil 3-(2,2-diclorovinil)-1-hidroxi-2,2-dimetilciclopropano-1-carboxilato
Metabolito 10	Ciano(2-hidroxi-3-fenoxifenil)metil 3-(2,2-diclorovinil)-2-(hidroximetil)-2-metilciclopropano-1-carboxilato
Metabolito 11	Ácido 6-(1-((ciano(3-fenoxifenil)metoxi)carbonil)-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2H-pirano-2-carboxílico
Metabolito 12	Ciano(3-fenoxifenil)metil 3-(2,2-diclorovinil)-1-hidroxi-2-(hidroximetil)-2-metilciclopropano-1-carboxilato
Metabolito 13	Ciano(hidroxi)(3-fenoxifenil)metil 3-(2,2-diclorovinil)-2-(hidroximetil)-2-metilciclopropano-1-carboxilato
Metabolito 14	3-(2,2-diclorovinil)-2-formil-2-metilciclopropano-1-carboxilato de ciano(3-fenoxifenil)metilo
Metabolito 15	Ciano(3-fenoxifenil)metil 3-(2,2-diclorovinil)-2,2-bis(hidroximetil)ciclopropano-1-carboxilato

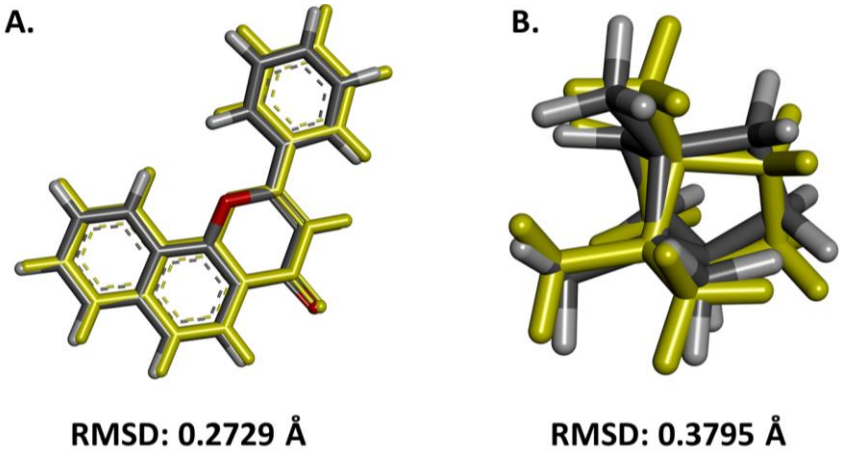

Figura S1. Representación de las estructuras de ligandos co-cristalizados con (A) CYP1A2 y (B) CYP2B6 en el análisis de validación redocking del protocolo de simulación de acoplamiento molecular. A. α-naftoflavona. B. Bornano

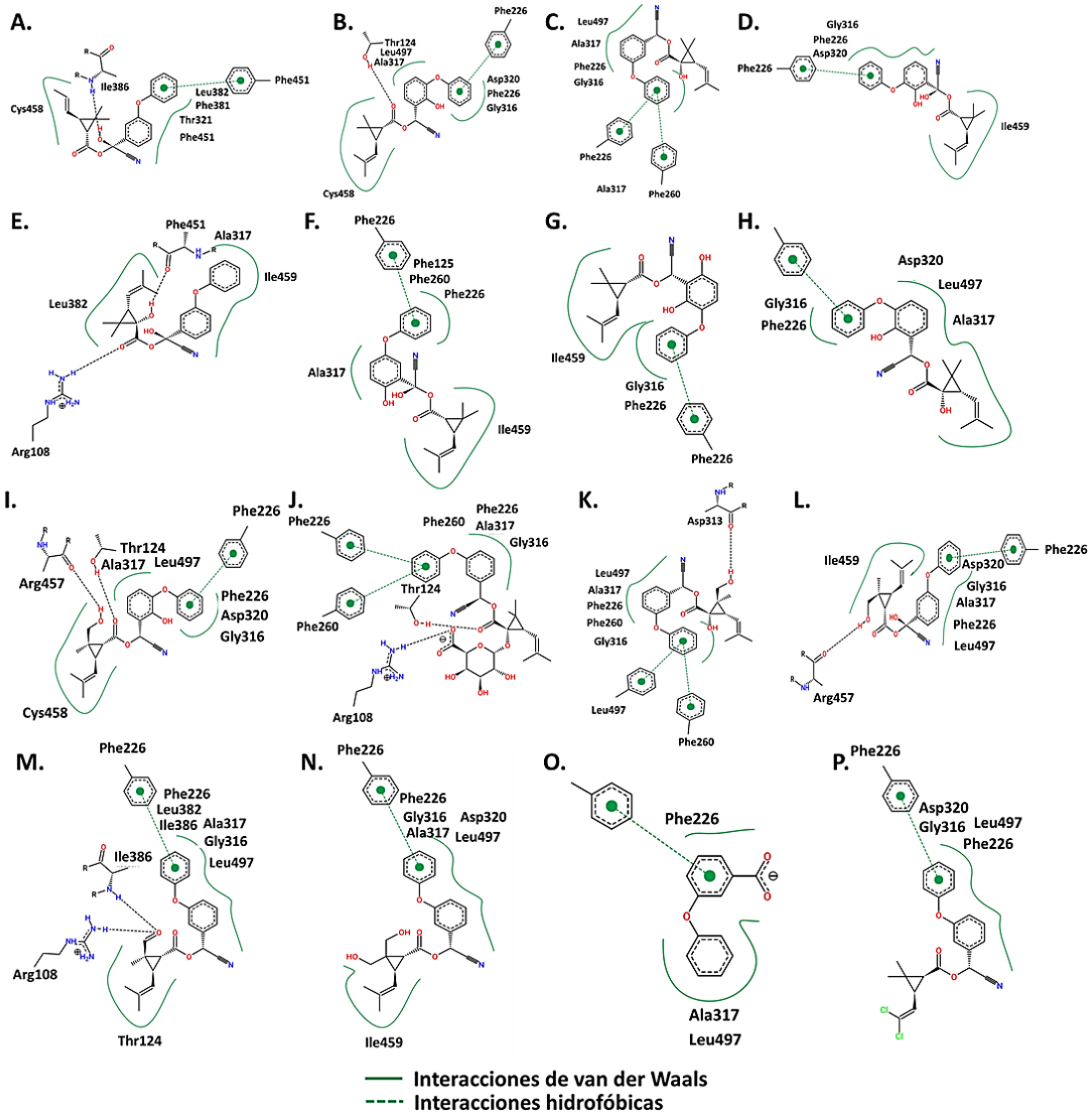

Figura S2. Representaciones bidimensionales de las interacciones predichas en los complejos CYP1A2 y los compuestos evaluados. A. Metabolito 01. B. Metabolito 02. C. Metabolito 03. D. Metabolito 05. E. Metabolito 06. F. Metabolito 07. G. Metabolito 08. H. Metabolito 09. I. Metabolito 10. J. Metabolito 11. K. Metabolito 12. L. Metabolito 13. M. Metabolito 14. N. Metabolito 15. O. 3-PBA. P. Cipermetrina