

## DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS PERSISTENTES Y SUS METABOLITOS MAYORITARIOS EN LÍNEAS CELULARES Y LARVAS DE PEZ CEBRA PARA ESTUDIOS DE METABOLIZACIÓN

**Paloma de Oro-Carretero, Jon Sanz-Landaluze**

Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Av. Complutense s/n, 28040, Madrid, España  
pdeoro@ucm.es

### Introducción

La metabolización juega un papel crucial en la regulación de la toxicidad de los compuestos químicos, no solo por los procesos endógenos de detoxificación, sino también porque se ha encontrado que algunos metabolitos presentan toxicidades y factores de acumulación superiores a los compuestos parentales [1]. Por ello, el estudio de la metabolización puede ayudar a comprender mejor el modo de acción (MOA) de los compuestos químicos y evaluar cómo los organismos interactúan con su entorno. Sin embargo, el conocimiento en este campo aún es bastante limitado, añadido a que, actualmente, no existe ninguna regulación ni guía oficial para evaluar la biotransformación. En los últimos años, diversas agencias y organismos nacionales e internacionales vienen requiriendo una transformación en los ensayos de toxicidad, buscando una mayor eficiencia y una disminución del uso de animales, mediante la transición de las actuales y largas pruebas *in vivo*, a los ensayos *in vitro* en líneas celulares [2].

En este sentido, tanto en nuestro grupo de investigación como en el resto del mundo, se ha utilizado el pez cebra (*Danio rerio*), especialmente en sus primeras etapas de vida, para estudios de ecotoxicidad [3]. Tal es así, que actualmente se ha desarrollado un ensayo de toxicidad con embriones de pez cebra (OCDE 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test). Sin embargo, los estudios de metabolización en peces y líneas celulares han recibido menos atención y, mucho menos para determinar metabolitos de Contaminantes Orgánicos Persistentes (POPs, sus siglas en inglés).

La dificultad de estas determinaciones radica en las diferentes características físico-químicas de los analitos, ya que presentan diferentes grupos funcionales, en la baja concentración en que se encuentran y el pequeño tamaño de las muestras. Además, hay que tener en cuenta que, debido a las características hidrofóbicas y semivolátiles de la mayoría de los POPs, la concentración nominal en los ensayos *in vitro* puede conducir a estimaciones inexactas de la dosis tóxica que realmente llega a las células [4]. Esto es debido a que parte de esta concentración puede quedarse retenida en el plástico

de la placa de cultivo, en el suero bobino fetal (FBS) con el que se complementa el medio de exposición y el espacio de cabeza si son sustancias volátiles.

El objetivo de este estudio es desarrollar un método analítico que permita determinar y evaluar la biotransformación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, PAHs (Fenantreno, PHE) y Polibromodifenil éteres, PBDEs, (BDE-47), conocidos contaminantes orgánicos persistentes con poder cancerígeno y disrupción endocrina, respectivamente, así como, sus metabolitos mayoritarios (OH-PAHs, OH-BDEs y MeO-BDEs) en larvas de pez cebra y células HepG2 (línea celular de cáncer de hígado humano).

### Estudios de metabolización *in vivo*

#### **Exposición de las larvas de pez cebra**

Las larvas de pez cebra de 72 hpf (horas post-fecundación) fueron expuestas según las condiciones optimizadas en el método alternativo desarrollado en nuestro grupo de investigación [5], basado en la guía técnica OECD 305 [6]. Las concentraciones nominales para el BDE-47, disueltas con 0.5% dimetilsulfóxido (DMSO), fueron 100 y 250  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , menores al  $\text{LC}_{50}$  (4,2  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) según establece la OECD 305.

Las larvas fueron expuestas durante 48 h y se muestrearon 15 larvas y 1,5 mL de medio por réplica (3 réplicas por muestra y control). El medio se refrescó a las 24h.

#### **Determinación del BDE-47 y sus metabolitos**

Se realiza una determinación simultánea del BDE-47 y sus metabolitos BDE-28, 6-MeO-BDE-47, 5-MeO-BDE-47, 3-MeO-BDE-47, 5-OH-BDE-47, 3-OH-BDE-47 y 2'-OH-BDE-28 consensuando la diferencia de polaridad.

La preparación de la muestra (larvas) consiste en una extracción sólido-líquido con 500  $\mu\text{L}$  n-hexano:metil-tert-butiléter (MTBE) (1:1) asistida con sonda de ultrasonidos y una etapa de limpieza mediante extracción en fase sólida dispersiva (d-SPE) con florisil. En el caso de la extracción de los medios de exposición, únicamente es necesaria una extracción líquido-

líquido con la misma mezcla de disolventes. Los OH-BDEs se derivatizan con N-terc-butildimetilsilil-N-metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA).

Se utiliza un sistema cromatográfico de gases (GC) Agilent 7890A con detección de captura electrónica ( $\mu$ ECD) y espectrometría de masas (MS) para cuantificar e identificar, respectivamente, de forma simultánea, gracias a un divisor de flujo instalado al final de la columna cromatográfica.

De esta forma, se consigue un método rápido de bajo coste con gran selectividad y sensibilidad.

### Resultados y discusión

Transcurridas las 48h de exposición de las larvas de pez cebra al BDE-47 se encuentran sus metabolitos BDE-28, 2'-OH-BDE-28 y 5-MeO-BDE-47 con las dos concentraciones estudiadas (Fig. 1) donde el ratio de metabolización con respecto al BDE-47 no supera el 1% en ninguno de los casos, semejante a los encontrados en la literatura. No se detectaron cantidades cuantificables del resto de metabolitos.

El pez cebra tiene enzimas altamente conservadas de los mamíferos y ortólogos con los humanos, incluyendo enzimas del citocromo P450 (CYP), glucuronosiltransferasas (UGTs) y sulfotransferasas (SULTs) que permiten realizar reacciones de la fase I y fase II involucradas en el metabolismo del BDE-47. Además, se ha demostrado que las larvas a partir de 72 hpf tienen gran capacidad de biotransformación y la expresión de enzimas CYP1A aumenta drásticamente. Esto puede ser un factor importante para haber encontrado concentraciones significativas de dichos metabolitos.

Además, en nuestros estudios recientes [7] también hemos encontrado metabolitos de fármacos con este método de larvas de pez cebra por lo que se confirma la posibilidad de seguir desarrollando este método en estudios de metabolización, ya que es un método rápido, de bajo coste y de no sufrimiento animal (según la normativa, las larvas hasta 144 hpf, no se consideran animales).

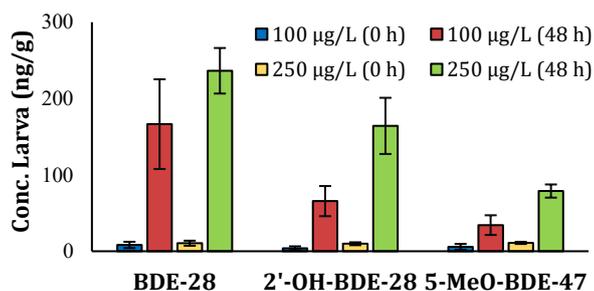


Fig. 1. Biotransformación del BDE-47 por larvas de pez cebra después de 48 h

### Estudios de metabolización *in vitro*

#### Ensayo de citotoxicidad y exposición en células HepG2

Se realiza un estudio de viabilidad celular, denominado ensayo MTT (Fig. 2), previo al estudio de metabolización *in vitro* para estimar la concentración nominal, de tal forma que al final del ensayo haya un 70% de células vivas ( $< LC_{50}$ ), como consenso a que el analito afecte y además tengan suficiente poder de metabolización.

La exposición de las células HepG2 se efectuó con cultivos celulares sembrados en placas de vidrio P100 e incubados durante 24h a 37°C (5%  $CO_2$ ) con medio DMEM suplementado con 10% de FBS. El medio de cultivo se cambió por uno contaminado (20  $mg \cdot L^{-1}$  para BDE-47 y 15  $mg \cdot L^{-1}$  para PHE) y se incubaron durante 48h en las mismas condiciones. Parte del medio contaminado se guardó para determinar la concentración real a "tiempo 0 de exposición". Además, se incluyó una placa de células control (sin medio contaminado) y una placa con medio contaminado (sin células) como control de pérdidas del analito. Finalmente, se guarda el medio de exposición a las 48h de incubación de cada muestra y se recoge y se seca el pelet celular hasta su análisis.

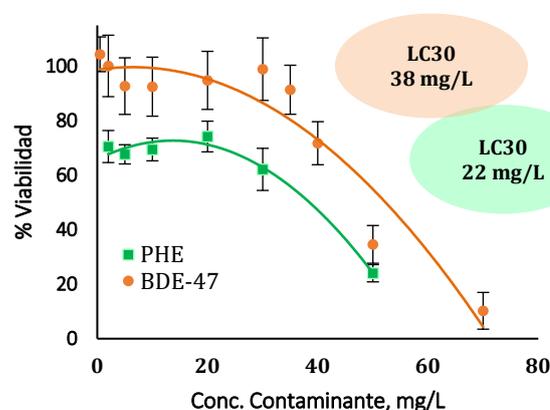


Fig. 2. Viabilidad celular HepG2 a diferentes concentraciones nominales de PHE y BDE-47

#### Determinación BDE-47, PHE y sus metabolitos

Las técnicas analíticas utilizadas fueron GC-MS- $\mu$ ECD para el BDE-47 y sus metabolitos (MeO-BDEs y OH-BDEs), cromatografía de líquidos con detección fluorescencia (HPLC-FL) para el PHE y GC-MS para sus metabolitos OH-PHE (2-OH-PHE, 3-OH-PHE).

La extracción del pelet celular consiste en una extracción sólido-líquido asistida con sonda de ultrasonidos y extracción líquido-líquido en el caso de los medios de exposición. Los disolventes

utilizados fueron hexano:MTBE (1:1), acetonitrilo (+NaCl en el caso de los medios) y hexano:DCM (1:1) para BDE-47 y sus metabolitos de forma simultánea, PHE y OH-PHE, respectivamente. Todos los metabolitos hidroxilados se derivatizan previamente con MTBSTFA.

### Resultados y discusión

Se optimizó un protocolo de exposición en el que solo se observó una pérdida del 14%, asumible, debida a la evaporación del analito, eliminando los factores del plástico de la placa (70% pérdida) y un porcentaje de FBS adecuado, según los modelos desarrollados [8]. Transcurridas las 48h de exposición de las células HepG2 al PHE, se observaron concentraciones significativas de 3-OH-PHE, 2-OH-PHE y compuestos aún no identificados, tanto en el interior de las células como en el medio de exposición (Fig. 3A). En el caso del BDE-47, se detectaron concentraciones de 5-MeO-BDE-47 y compuestos aún no identificados en el interior de las células (Fig. 3B) y medios de exposición, además de, pequeñas cantidades de 5-OH-BDE-47 y 3-OH-BDE-47 en los medios de exposición.

En ambos casos, se obtienen ratios de metabolización mayores en el medio de exposición frente al interior celular. Esto es debido a los procesos de introducción de xenobióticos al interior celular y expulsión de estos después de su metabolización.

### Conclusiones

Se han desarrollado varias metodologías analíticas teniendo en cuenta la pequeña cantidad de muestra, las muy diferentes propiedades físico-químicas de los diferentes analitos y sus metabolitos y su baja concentración. La combinación de líneas celulares y larvas de pez cebra como modelo alternativo al sufrimiento animal es una plataforma adecuada para estudios de metabolización.

Con este estudio se pretende aportar nuevas investigaciones que ayuden a autores que trabajan realmente en la extrapolación de los datos obtenidos en modelos *in vivo* e *in vitro* [4], que determinan modelos para estimar la concentración real disponible para la célula con respecto a la nominal [8] y seguir dilucidando rutas y cinéticas metabólicas de los contaminantes orgánicos persistentes.

Y, de este modo, llegar a establecer regulaciones oficiales para el estudio de la metabolización.

En trabajos futuros se identificarán los compuestos desconocidos con técnicas avanzadas y se realizarán estudios metabólicos con líneas celulares de pez cebra (ZFL y ZF4).

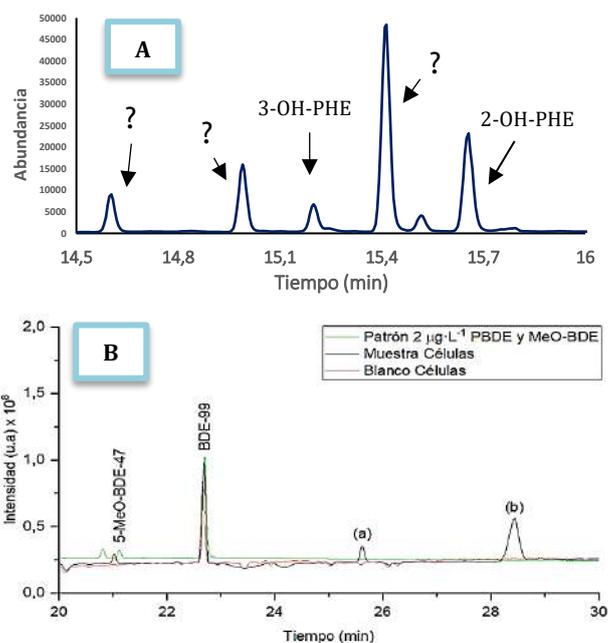


Fig. 3. Biotransformación del PHE (A) y BDE-47 (B) por células HepG2 después de 48 h

### Agradecimientos

Los autores agradecen a AZTI Tecnalia por el suministro de larvas y el apoyo financiero de [PID 2020 114714 RB I00] y [AVANSECAL II CM, 2018 /BAA 4393]. Paloma de Oro agradece al Ministerio de Ciencia e Innovación por su contrato predoctoral PRE2021/097956 y a la SEQA por la beca para asistir a la XIII Reunión.

### Referencias

- [1] Fu, Q. et al. *Environ. Sci. Technol.* 54, 4400-4408 (2020).
- [2] U.S. National Research Council. *Toxicity Testing in the 21st Century* (2007).
- [3] García-Calvo, E. et al. *Chemosphere* 263, 128170 (2021).
- [4] Proença, S. et al. *Toxicol. in Vitro* 73. 105133 (2021).
- [5] Sanz-Landaluze, J. et al. *Environ. Sci. Technol.*, 49, 1860-1869 (2015).
- [6] OECD, Test No. 305. (2012).
- [7] Molina-Fernández, N. et al., *Anal. Bioanal. Chem.* 413(20), 5169-5179 (2021).
- [8] Laue, H., et al., *Environ. Sci. Technol.* 54, 9483-9494 (2020).