



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA CELULAR Y BIOCATÁLISIS

**TRANSFORMACIÓN ENZIMÁTICA DE
DISRUPTORES ENDÓCRINOS: APLICACIÓN A SISTEMAS
DE ACUICULTURA**

T E S I S

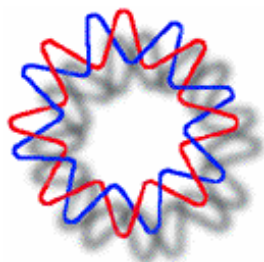
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

D O C T O R E N C I E N C I A S

P R E S E N T A

M. C. Cristina del Carmen Torres Duarte

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Rafael Vázquez Duhalt



CUERNAVACA, MORELOS.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Buscar nuestro bienestar sin pensar en las consecuencias es irresponsable. Buscar soluciones sin analizar los efectos a largo plazo, es una tontería. Quedarse impávido, es mucho peor. Nuestro trabajo es ser racionales e integrales en la búsqueda de la recuperación de nuestro mundo.

Agradecimientos

Al Dr. Rafael Vázquez Duhalt, por su valioso apoyo e invaluable orientación durante la realización de este proyecto. Gracias por darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación.

A los miembros del comité tutorial, Dra. María Teresa Viana Castrillón, Dr. Gerardo Corzo Burguete y Dr. Rafael Vázquez Duhalt, por contribuir a mi formación con sus aportaciones durante la realización de este proyecto.

A los miembros del jurado, Dra. Refugio Rodríguez Vázquez, Dra. Denhi Schnabel Peraza, Dr. Carlos Felipe Peña Malacara, Dr. Enrique Rudiño Piñera, y Dr. Eduardo Torres Ramírez, por ayudarme a enriquecer este trabajo.

A la Biol. Rosa Román Miranda y Dra. Lucía Perezgazga Ciscomani, por su valioso apoyo técnico, paciencia y amistad durante la estancia en el laboratorio.

Al PAPIIT por el apoyo económico otorgado para la realización de este proyecto (DGAPA-UNAM IN-201611).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (170935) por la beca otorgada para la realización de los estudios de Doctorado en Ciencias Bioquímicas.

A mi familia, por ayudarme a mantener siempre lleno el saco de las fortalezas para sobrellevar los momentos difíciles y también saber disfrutar los buenos momentos.

A Oscar, por ser el mejor compañero, amigo y terapeuta. Gracias por tu paciencia y apoyo.

A mis amigos que en realidad fueron mi familia en esta etapa, Lorena, Daniela, Anilú, Edna Lore, Martha, Pancho, Raunel, Sergio, Abraham. Son personas únicas y muy especiales.

A Magda, Monse, Pol, Chío, por ser los mejores amigos que siempre han estado a mi lado y que sé que permanecerán a pesar del paso de los años.

A mis amigos y compañeros de laboratorio Marcela, Rosa, Lucía, Bere, Julio, Cris, Javier, Kary, Estefa, Yusimi, Andrés, Liliana, Jesús, Martín, Joaquín, por ser tan buena compañía y hacer tan agradables los días largos de trabajo. Definitivamente el mejor laboratorio que existe.

A las innumerables personas del IBt con las que tuve la fortuna de compartir muchos momentos agradables e inolvidables como los encuentros deportivos contra los López (gracias a todos los cachirules), los partidos de los Fullerenos, los torneos de voly y las fiestas con muchos colados.

Gracias a todos ustedes por hacer de esta, una de las mejores etapas de mi vida.

Índice general

Índice general	I
Índice de figuras	III
Índice de tablas	IV
Abreviaturas	V
Resumen	VII
Abstract	VIII
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1. Disruptores endócrinos (DE)	3
2.1.1. 17 β -estradiol (E2).....	6
2.1.2. Nonilfenol (NP)	7
2.1.3. Bisfenol-A (BPA).....	8
2.1.4. Triclosán (TCS).....	10
2.2. Modos de acción de los disruptores endócrinos.....	11
2.2.1. Receptores hormonales.....	11
2.2.1.1.Receptor de andrógenos (AR)	11
2.2.1.2.Receptor de estrógenos (ER)	12
2.2.2. Disrupción endócrina en peces	17
2.3. Identificación y determinación de afinidad de DE.....	20
2.4. Eliminación de DE	21
2.4.1. Métodos abióticos.....	21
2.4.2. Métodos biológicos	23
2.4.2.1. Lacasa.....	24
2.4.2.2. Lacasa de <i>Corioloipsis gallica</i>	26
3. Hipótesis y objetivos	29
3.1. Hipótesis.....	29
3.2. Objetivo general	29
3.3. Objetivos particulares	29
4. Protocolo experimental	30
4.1. Materiales.....	30
4.1.1. Enzima	30
4.1.2. Reactivos	30
4.1.3. Oligonucleótidos.....	31
4.1.4. Vectores	32
4.1.5. Cepas	32
4.1.6. Equipos.....	33

4.2. Métodos.....	34
4.2.1. Caracterización de la lacasa.....	34
4.2.2. Transformación enzimática de los DE.....	34
4.2.3. Identificación de los productos de transformación.....	35
4.2.4. Clonación de zfER α LBD.....	36
4.2.4.1. Síntesis de cDNA	36
4.2.4.2. Amplificación del gen zfER α	36
4.2.4.3. Amplificación del dominio zfER α LBD	37
4.2.4.4. Digestión enzimática	38
4.2.4.5. Ligación.....	39
4.2.5. Expresión de zfER α LBD.....	39
4.2.6. Purificación de zfER α LBD.....	40
4.2.7. Interacción de los DE y sus productos de transformación con el ER α de pez cebra.....	41
4.2.8. Inmovilización de la lacasa.....	42
4.2.9. Tratamiento <i>in vivo</i> de pez cebra con DE.....	43
4.2.10. Cuantificación de expresión génica por PCR en tiempo real	44
4.2.10.1. Aislamiento de RNA y retrotranscripción	44
4.2.10.2. PCR cuantitativo	44
5. Resultados y discusión.....	46
5.1. Caracterización de la lacasa de <i>Coriopsis gallica</i>	46
5.2. Transformación de DE por la lacasa de <i>C. gallica</i>	47
5.3. Identificación de productos de transformación.....	49
5.4. Clonación y expresión de zfER α LBD.....	55
5.5. Interacción in-vitro de zfER α LBD con DE	60
5.6. Inmovilización de la lacasa de <i>C. gallica</i>	64
5.7. Experimentos in-vivo.....	66
6. Conclusiones.....	71
7. Perspectivas.....	73
8. Bibliografía.....	74
9. Artículos	84

Índice de figuras

Figura 1. Estructura química del 17 β -estradiol	5
Figura 2. Estructura del hER α LBD cristalizada con el ligando E2.....	14
Figura 3. Alineamiento de aminoácidos de zfER α , zfER β 1, zfER β 2, hER α y hER β	15
Figura 4. Ciclo catalítico de la lacasa.	26
Figura 5. Estructura del sitio catalítico de la lacasa de <i>Corioliopsis gallica</i> UAMH 8260.	27
Figura 6. Estructura química de los DE analizados.....	31
Figura 7. Análisis por SDS-PAGE de la lacasa de <i>C. gallica</i> UAMH 8260	46
Figura 8. Actividad de transformación de los DE E2, BPA, NP, y TCS por acción de la lacasa de <i>C. gallica</i>	47
Figura 9. Precipitado de la reacción de transformación de NP analizado por GC	50
Figura 10. Patrón de fraccionamiento obtenido por espectrometría de masas del producto de transformación del NP.	50
Figura 11. Mecanismo propuesto para la dimerización del NP por acción de la lacasa de <i>C. gallica</i>	51
Figura 12. Extracto de la reacción de transformación de BPA analizado por GC.	51
Figura 13. Estructura propuesta y patrón de fragmentación obtenido por espectrometría de masas del producto de transformación del BPA con tiempo de retención de 12.2 min.....	52
Figura 14. Estructura propuesta y patrón de fragmentación obtenido por espectrometría de masas del producto de transformación del BPA con tiempo de retención de 21.3 min	53
Figura 15. Mecanismo propuesto para la oxidación del BPA por acción de la lacasa de <i>C. gallica</i>	54
Figura 16. Cromatogramas obtenidos por GPC para la determinación de los pesos moleculares promedio de los productos del E2, BPA, NP y TCS por acción de la lacasa.....	54
Figura 17. Diferentes pasos para la clonación de zfER α LBD en pET-28b.....	56

Figura 18. Expresión de zfER α LBD en <i>E. coli</i> C41 a diferentes concentraciones de IPTG.....	57
Figura 19. Expresión de zfER α LBD en diferentes cepas de <i>E. coli</i>	58
Figura 20. Western blot de la expresión de zfER α LBD en diferentes cepas de <i>E. coli</i>	58
Figura 21. Análisis de diferentes pasos de purificación de zfER α LBD por cromatografía de afinidad.....	59
Figura 22. Curvas de unión competitiva obtenidas para el hER α , y el zfER α LBD con los DE E2, BPA, NP, y TCS.....	60
Figura 23. Niveles de mRNA de vitelogenina1 en peces cebra expuestos durante 7 días al DE sin transformar, productos de transformación por acción de la lacasa, y agua tratada con lacasa inmovilizada de los DE E2, BPA, TCS, NP.....	67

Índice de tablas

Tabla 1. Descripción de oligonucleótidos utilizados.....	31
Tabla 2. Genotipo de cepas de <i>E. coli</i> utilizadas.....	33
Tabla 3. Longitudes de onda utilizadas para el monitoreo de las reacciones de transformación.....	35
Tabla 4. Parámetros cinéticos de la transformación de distintos DE por acción de la lacasa de <i>C. gallica</i>	48
Tabla 5. Pesos moleculares promedio de los productos de transformación de los diferentes DE.....	54
Tabla 6. IC50 relativa de los diferentes DE con hER α y zfER α LBD.....	61
Tabla 7. Afinidad de diferentes DE por el hER α	62
Tabla 8. Valores de afinidad de diferentes DE en peces.....	63
Tabla 9. Afinidad por el hER α y zfER α LBD de los productos de transformación de los diferentes DE.....	64
Tabla 10. Eficiencia de inmovilización de la lacasa en diferentes soportes.....	65

Abreviaturas

ACN	Acetonitrilo
AF	Función de activación
AhR	Receptor arilhidrocarbonado
amp	Ampicilina
AR	Receptor de andrógenos
BPA	Bisfenol-A
BSA	Albúmina de suero bovino
CHO	Ovario de hámster chino
Da	Daltons
DE	Disruptor endócrino
DES	Dietilestibesterol
DL50	Dosis letal media
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dpf	Días post-fertilización
E2	17 β -estradiol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EE2	17 α -etinilestradiol
ER	Receptor de estrógenos
ERE	Elemento de respuesta a estrógenos
g	Gramos
GC	Cromatografía de gases
GPER	Proteínas G acopladas al receptor de estrógenos
h	Horas
hERα	Receptor de estrógenos α de humano
HPG	Eje hipotalámico-pituitario-gonadal
HPLC	Cromatografía líquida de alta precisión
IC₅₀	Concentración inhibitoria media
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
kan	Kanamicina
k_{cat}	Número de recambio
K_M	Constante de Michaelis-Menten

K_{ow}	Coefficiente de partición octanol/agua
L	Litros
LBD	Sitio de unión a ligando
M	Molar
m	Metro
MALDI	Desorción/ionización láser asistida por matriz
min	Minutos
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MS	Espectrometría de masas
NP	Nonilfenol
OP	Octilfenol
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PVC	Policloruro de vinilo
r	Anisotropía
RBA	Afinidad de unión relativa
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TCS	Triclosán
THF	Tetrahidrofurano
TOF	Tiempo de vuelo
TR	Tiempo de retención
U	Unidades de enzima
V	Volts
Vtg	Vitelogenina
zf	Pez cebra

Resumen

Los disruptores endócrinos (DE) son compuestos que afectan principalmente a organismos acuáticos, produciendo efectos negativos en la acuicultura. En este trabajo se estudió la transformación enzimática por la lacasa de *Coriolopsis gallica* de los compuestos estrogénicos 17 β -estradiol (E2), bisfenol-A (BPA), nonilfenol (NP) y triclosán (TCS). Durante este proceso de transformación, se obtuvieron polímeros de más de 1 kDa como principales productos de transformación. La actividad estrogénica de los DE y sus productos de transformación se evaluó *in vitro*, como la afinidad por el receptor de estrógenos α de humano (hER α) y por el sitio de unión a ligando del receptor de estrógenos α de pez cebra (*Danio rerio*) (zfER α LBD). E2, BPA, NP y TCS mostraron una mayor afinidad relativa por el zfER α LBD que por el hER α . Los productos de transformación por acción de la lacasa no mostraron afinidad por los receptores, excepto por una afinidad marginal de los productos del E2 por el zfER α LBD. Para complementar estas observaciones, se llevaron a cabo estudios *in vivo* de disrupción endócrina en pez cebra utilizando la inducción de la vitelogenina 1 (niveles de mRNA de Vtg1) como biomarcador. El uso de biorreactores enzimáticos, conteniendo lacasa copolimerizada en espuma de poliuretano, elimina eficientemente la actividad estrogénica de BPA y TCS, y reduce significativamente los efectos del E2. Estos reactores enzimáticos tienen la capacidad de eliminar los DE del agua utilizada en sistemas de acuicultura.

Abstract

Endocrine disrupting chemicals (EDCs) are known to mainly affect aquatic organisms, producing negative effects in aquaculture. Transformation of the estrogenic compounds 17 β -estradiol (E2), bisphenol-A (BPA), nonylphenol (NP) and triclosan (TCS) by laccase of *Corioloropsis gallica* was studied. Laccase is able to efficiently transform them producing mainly polymers of more than 1 kDa. The estrogenic activity of the EDCs and their products was evaluated *in vitro* as their affinity for the human estrogen receptor alpha (hER α) and for the ligand binding domain of zebrafish (*Danio rerio*) estrogen receptor alpha (zfER α LBD). E2, BPA, NP and TCS showed higher affinity for the zfER α LBD than for hER α . After laccase treatment, no affinity was found, except a marginal affinity of E2 products for the zfER α LBD. Endocrine disruption studies *in vivo* on zebrafish were performed using the induction of vitellogenin 1 as a biomarker (Vtg1 mRNA levels). The use of enzymatic bioreactors, containing copolymerized laccase on polyurethane foam, efficiently eliminates the estrogenic activity of BPA and TCS, and significantly reduces the effects of E2. These enzymatic reactors have the capacity to eliminate the EDCs in water used in aquaculture systems.

1. Introducción

El crecimiento de la población mundial hace que el abastecimiento de alimentos sea un tema crítico para la humanidad. El deterioro de las tierras aptas para el cultivo por factores ambientales y antropogénicos ha provocado que otras fuentes de alimento cobren especial importancia. Dado que la mayor parte de la superficie terrestre está cubierta por agua, se vislumbra a los productos acuícolas como la fuente de alimentos para el futuro. Sin embargo, la captura de productos pesqueros llegó a un estancamiento desde hace aproximadamente 15 años por lo que la acuicultura se ha presentado como la solución a este problema y actualmente es la actividad agropecuaria de mayor crecimiento.

La mayor parte de la acuicultura se lleva a cabo en zonas costeras, y en ocasiones, a orillas de ríos. Estas zonas son especialmente susceptibles a la contaminación, ya que gran parte de las aguas residuales municipales y de la industria son descargadas a los cauces de ríos o directamente al mar. Aún cuando se ha hecho un esfuerzo por disminuir el impacto ambiental por medio del tratamiento de aguas residuales, hay muchos compuestos que no pueden ser eliminados con facilidad como los plaguicidas, hidrocarburos poliaromáticos, compuestos organoclorados, y fármacos, todos ellos potencialmente dañinos para las poblaciones, por su capacidad de inducir cambios en el metabolismo. Hay cierto tipo de contaminantes que han sido clasificados como disruptores endócrinos (DE) capaces de actuar como agonistas o antagonistas de hormonas perturbando la síntesis, secreción, transporte, unión, acción y eliminación de hormonas endógenas o sus receptores, responsables de mantener la homeostasis, reproducción, desarrollo e integridad de los organismos vivos y su progenie. Entre los efectos negativos que ejercen en los organismos sobresalen el desarrollo anormal, la disfunción reproductiva, intersexo en las especies, feminización o masculinización, y algunos tipos de cáncer.

Las zonas urbanas de alta industrialización son las más afectadas por este tipo de compuestos. Muchos estudios demuestran que los efluentes de plantas de tratamiento de aguas son estrogénicos para los peces. Varios reportes realizados en algunos países de Europa como Finlandia, Suecia, Dinamarca, y el Reino Unido, han reportado la

intersexualidad en distintas especies de peces, lo que afecta su capacidad reproductiva y que puede llevar a una disminución de las poblaciones.

Por los riesgos que representan estos compuestos para el equilibrio ecológico, se ha puesto especial atención en su eliminación. Entre las estrategias estudiadas se encuentran la fitorremediación, biorremediación con hongos y el uso de enzimas purificadas. Hasta ahora, las enzimas más eficientes para su degradación provienen de los hongos ligninolíticos, particularmente la manganeso peroxidasa y la lacasa. La lacasa presenta la ventaja de requerir sólo de oxígeno para llevar a cabo la catálisis y es más estable operacionalmente que las peroxidases, lo que facilita su uso a escala industrial. Los estudios con la lacasa en estado libre demuestran que es eficiente en la transformación de DE. Sin embargo, se han realizado pocos estudios con respecto a la actividad estrogénica de los productos de transformación, y aún menos atención se ha puesto en sus efectos sobre los peces. En este trabajo exploramos los efectos *in vivo* e *in vitro* de diferentes compuestos con actividad estrogénica en pez cebra antes y después de ser transformados por la lacasa de *Coriolopsis gallica*. Además, se propone el uso de la lacasa inmovilizada para su aplicación en sistemas de acuicultura, una de las actividades agropecuarias más afectadas por los DE.

2. Antecedentes

2.1. Disruptores endócrinos (DE)

La historia formal de los disruptores endócrinos podría decirse que comenzó en 1962, cuando Rachel Carson publicó su libro Primavera Silenciosa (Silent Spring), donde puso en evidencia el efecto que la contaminación está teniendo en el medio ambiente, en particular cómo los plaguicidas están íntimamente relacionados con efectos negativos en la reproducción de los animales. Sin embargo, la noción de que existen compuestos naturales o sintéticos que modifican el funcionamiento del sistema endócrino es muy antigua. Por ejemplo, los granjeros observaban efectos negativos en la reproducción del ganado que pastaba en zonas donde abundaban cierto tipo de tréboles ricos en sustancias estrogénicas como cumestrol (1). Por otro lado, con el tiempo se ha observado que el uso de sustancias con actividad endócrina puede resultar perjudicial y que dichos efectos en ocasiones tardan años en ser detectados. A inicios de 1940 se comenzó a recetar el dietilestilbestrol (DES) como fármaco para evitar abortos espontáneos y nacimientos prematuros. Ahora sabemos que el DES está relacionado con cáncer y malformaciones de los hijos cuyas madres consumieron el fármaco durante el embarazo (1).

En el 2002 la Organización Mundial de la Salud definió a los DE como sustancias exógenas o una mezcla de ellas que alteran las funciones del sistema endócrino y consecuentemente causan efectos adversos en la salud de un organismo intacto, su progenie o poblaciones (2). La concentración en el ambiente de estos compuestos es variable, pero en su mayoría, se encuentran por debajo de la DL_{50} por lo que no presentan una toxicidad aguda; esto ha causado que no se haya puesto atención con anterioridad a estos compuestos porque su efecto no es apreciable a simple vista. La actividad endócrina, como los efectos en hormonas o receptores hormonales, no es tóxica en sí, pero es un mecanismo potencial de toxicidad. Entre los riesgos potenciales que presentan están alteraciones en el desarrollo y diferenciación sexual de los animales, así como desbalance en la proporción sexual dando como consecuencia una disminución de las poblaciones (3).

La lista de DE es muy larga y diversa; en el 2001, la Unión Europea publicó una lista que incluye 553 sustancias sintéticas y 9 naturales (4), y cada año se añaden nuevos compuestos. Los DE se pueden clasificar en diferentes grupos (5):

1. Hormonas naturales y sus metabolitos (17β -estradiol, estriol y estrona).
2. Hormonas artificiales (DES y esteroides sexuales en medicamentos anticonceptivos).
3. Fito y micoestrógenos (isoflavonas, lignanos, cumestanos, estilbenos, zearalonona).
4. Medicamentos con efectos secundarios hormonales (clofibrato).
5. Químicos industriales y domésticos (retardantes de flama, pinturas, plastificantes, detergentes, protectores solares).
6. Plaguicidas y sus metabolitos (DDT, lindano, endosulfán).
7. Productos secundarios de procesos industriales y domésticos (hidrocarburos aromáticos policíclicos, dioxinas).
8. Metales (cadmio, plomo).

En general, los DE más comunes en el ambiente tienen actividad estrogénica por su afinidad por los receptores de estrógenos, aunque con afinidades varios órdenes de magnitud menores que el 17β -estradiol (E2), el estrógeno natural más importante en vertebrados (6-8). Sin embargo, la exposición constante a estos compuestos es lo que provoca diferentes grados de afectación.

Se han hecho varios intentos para relacionar la estructura química con la potencial actividad estrogénica de los DE. Como primera aproximación, se propusieron tres criterios basados en la estructura del E2 (Figura 1) (9): (i) un anillo fenólico capaz de formar enlaces de hidrógeno, de manera similar al anillo A, (ii) un centro hidrofóbico similar en tamaño y forma a los anillos B y C, y (iii) un enlace de hidrógeno donador similar a la sección 17β -hidroxil del anillo D, especialmente con una distancia oxígeno-oxígeno similar a la existente entre los grupos 3- y el 17β -hidroxil del E2. Sin embargo, estos criterios no son determinantes, y para establecer cuáles compuestos pueden actuar como DE, es necesario llevar a cabo determinaciones experimentales.

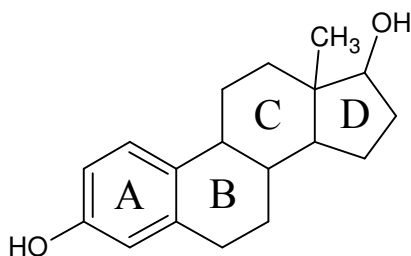


Figura 1. Estructura química del 17β-estradiol.

Entre las principales fuentes de los compuestos con actividad estrogénica están (5):

- Efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales.
- Arrastre de aguas superficiales de zonas rurales y urbanas.
- Descargas directas de desechos a los reservorios de agua.
- Filtraciones de fosas sépticas y lagunas de oxidación que llegan a mantos acuíferos.

Las aguas residuales municipales son estrogénicas debido a los diversos estrógenos contenidos en los desechos humanos, tanto naturales como los fármacos utilizados como anticonceptivos y con otros fines. Entre los DE industriales más importantes, se encuentran los ftalatos que son ampliamente usados en la manufactura de diversos productos con la finalidad de dar flexibilidad y suavidad a los plásticos. Están presentes en adhesivos, cosméticos, surfactantes no iónicos, plaguicidas, materiales de construcción, pulpa y papel, y plásticos como PVC y estireno (10). El butil bencil ftalato, dibutil ftalato y di(2-etil-hexil)ftalato son los que presentan mayor actividad estrogénica, que es entre 5 y 8 órdenes de magnitud por debajo de la potencia del E2. También son tóxicos para microorganismos, la vida acuática y el humano; sus metabolitos pueden inducir daños al DNA del esperma humano provocando mutaciones en la progenie (10). Las concentraciones medidas no alcanzan el orden de mg, que es el necesario para ver un efecto en peces. Sin embargo, tienden a acumularse en los sedimentos marinos donde pueden permanecer por más tiempo y liberarse lentamente (11).

Los bifenilos polibromados se utilizan como retardantes de flama y también presentan una importante actividad estrogénica. Son compuestos de alta hidrofobicidad que afectan la

función de la tiroides. Su potencia y concentraciones en el ambiente no son muy conocidas aún, pero su carácter hidrofóbico hace que persistan en los sedimentos (11).

Los fitoesteroles son compuestos provenientes de plantas productoras de pulpa de papel y se liberan durante los procesos de blanqueo. El principal compuesto presente en las aguas residuales de los extractos de la pulpa es el β -sitoesterol, un esteroil lipofílico. Se ha visto que en peces, el β -sitoesterol incrementa la concentración de vitelogenina (Vtg) en plasma, reduce los niveles de esteroides sexuales y colesterol, e interfiere con la capacidad biosintética de esteroides en las gónadas (12).

Hay hormonas de uso farmacéutico que se encuentran en aguas residuales en bajas concentraciones, pero que tienen una gran afinidad por los receptores de estrógenos. El DES se usa como anticonceptivo y se ha relacionado con malformaciones en los tractos genitales de los bebés debido a la exposición en el útero (13). El clenbuterol es un agonista- β_2 utilizado para mejorar la calidad de la carne en animales de consumo como reses, puercos y pollos. Su administración aumenta el contenido de proteína y disminuye la acumulación de grasa. Dado que el compuesto es administrado en altas concentraciones, los animales excretan gran parte en orina y heces que finalmente son desechadas como parte de las aguas residuales de granjas (14). Estos desechos finalmente van a dar a ecosistemas acuáticos donde ingresan a la cadena alimenticia y provocan alteraciones hormonales.

En los siguientes apartados se describe con más detalle a los cuatro disruptores endócrinos que fueron objeto de estudio en este trabajo.

2.1.1. 17β -estradiol (E2)

Hasta ahora la estrona, E2 y estriol son considerados los tres estrógenos naturales más abundantes (15). En la ganadería son usados principalmente como promotores de crecimiento. Se calcula que en Estados Unidos el 63% del ganado bovino es tratado con preparaciones hormonales que contienen hasta 20 mg de estrógenos y 200 mg de andrógenos o progesterona, del cual, alrededor del 8% es excretado (16). Los desechos sólidos del ganado son utilizados como fertilizantes en la agricultura, de donde pueden ser desorbidos durante el riego y llegar a mantos acuíferos (17).

La forma en que el E2 es liberado al ambiente puede ser libre o conjugado con grupos glucurónido o sulfato (18). El E2 en su forma conjugada también es excretado por mujeres en cantidades tan altas como de 2.4 μg por día, los cuales son convertidos a E2 libre por acción de bacterias como *E. coli* presentes en las plantas de tratamiento de aguas residuales (17). El E2 libre es más hidrofóbico que sus formas conjugadas y por lo tanto puede disminuir la velocidad de biodegradación por los organismos presentes en el medio ambiente (16).

En el ganado bovino el 58% del E2 es excretado en las heces, mientras que en los cerdos y aves de corral el 96% y 69%, respectivamente, aunque estas proporciones cambian durante el embarazo (18). Los desechos de orina y heces del ganado son la principal fuente de estrógenos en el ambiente representando el 99%, mientras que los desechos municipales contribuyen con el resto (17). La información que se tiene hasta ahora no es suficiente para calcular el flujo total de estrógenos en el ambiente, aunque una aproximación hecha en Estados Unidos en el año 2002 determinó que el ganado, cerdos y pollos contribuyen con 45, 0.8 y 2.7 toneladas de estrógenos por año, respectivamente (16). En el año 2012 se estimó una generación de 76 toneladas de estrógenos en desechos sólidos al año, de las cuales 3 toneladas son las que realmente llegarán a ambientes acuáticos (17).

Las concentraciones que se han medido en los efluentes de aguas residuales varían mucho, desde no detectables hasta 48 ng L^{-1} , aunque en general se encuentran en el rango de 1-10 ng L^{-1} (5). En vertebrados, se ha observado que la exposición a concentraciones tan bajas como 1 ng L^{-1} de estrógenos tiene efectos en las gónadas como feminización, demasculinización, reducción de tamaño y problemas reproductivos. Los invertebrados son menos sensibles a estrógenos, ya que para observar efectos negativos, se requieren concentraciones del orden de $\mu\text{g L}^{-1}$ las cuales hasta el momento no son ambientalmente relevantes (16).

2.1.2. Nonilfenol (NP)

El NP es un xenobiótico que en condiciones ambientales, es un líquido viscoso de color claro pálido, inmiscible en agua con una K_{ow} de 4.48. Es producido industrialmente

por la alquilación de fenol con nonano bajo condiciones de catálisis ácida. Entre el año 2001 y 2004, la producción anual de NP en Estados Unidos, Europa, Japón y China sumó alrededor de 260 mil toneladas (19). La mayor parte del NP liberado al ambiente es de grado técnico, que es una mezcla compleja de más de 100 isómeros que difieren en la estructura y posición de la porción alquil con respecto al anillo fenólico (20). Su principal fuente de liberación es por la degradación de nonilfenol etoxilatos, compuestos utilizados en la manufactura de antioxidantes, aditivos de aceites lubricantes. También es liberado por la degradación de surfactantes industriales, comerciales y domésticos como detergentes, emulsificantes, agentes antiestática, y solubilizantes (19, 21).

El NP también se encuentra en alimentos. En Alemania se analizaron diferentes muestras de comida observando concentraciones de NP entre 0.1 y 19.4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de peso fresco. Los alimentos con mayor contenido de NP fueron salchichas, manzanas, tomates y agua embotellada en contenedores de polietileno de alta densidad y PVC (22). Estudios posteriores confirmaron la presencia de NP en agua embotellada y leche, en ambos casos resultado de la migración de este compuesto del envase hacia el líquido (23). Esta es la forma más directa en la que los humanos estamos expuestos al NP.

En general, la concentración de NP en los medios acuáticos es baja porque tiende a asociarse a los sedimentos por su naturaleza hidrofóbica (24). La concentración de NP reportada en diferentes ríos alrededor del mundo es muy variable, pero suele estar en el orden de $\mu\text{g L}^{-1}$ (24), como en algunos ríos de Cataluña, España. En sedimentos marinos en Italia se han medido concentraciones hasta de 6.7 mg kg^{-1} . Por su potencia, concentraciones de 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ presentan un peligro significativo para las especies (11). Hasta ahora, el valor más alto reportado en solución es de 32.8 $\mu\text{g L}^{-1}$ en un lago de Wuhan, China (25).

2.1.3. Bisfenol-A (BPA)

El BPA fue sintetizado por primera vez por P. Dianin en 1891. En los años 30's fue investigado como un producto de posible uso farmacéutico por su capacidad estrogénica; sin embargo, fue sustituido por el DES que es mucho más potente (26). Ahora es usado como intermediario en la producción de resinas policarbonadas y epóxicas. El BPA se

libera de desperdicios plásticos, como productos de PVC que utilizan el BPA como estabilizante durante el proceso de fabricación (27). También es liberado durante el uso de biberones, botellas de agua reutilizables, contenedores de comida y latas de comida metálicas con recubrimientos plásticos (26). Se calcula que la producción anual mundial asciende a más de 500,000 toneladas (28).

Hasta hace poco, el BPA era considerado como un estrógeno ambiental débil por su baja afinidad relativa al receptor de estrógenos (seis órdenes de magnitud por abajo del E2). Sin embargo, resultados recientes indican que existen varias vías a través de las cuales el BPA puede estimular respuestas celulares a concentraciones por debajo de las que se espera se unan a los receptores nucleares clásicos. Estos receptores incluyen al receptor de estrógenos unido a membrana, y el receptor unido a la proteína G (GPER), cuya interacción es capaz de activar respuestas no genómicas. También es capaz de unirse al receptor aril hidrocarburo, aunque sus efectos aún permanecen inciertos (26).

Entre los efectos observados en el medio ambiente están la alteración de la determinación sexual debido a exposición durante la organogénesis de las gónadas, alteración de la función de las gónadas, e inducción de la producción de Vtg hepática en organismos adultos. En reptiles y aves se ha encontrado que puede alterar las vías de determinación sexual. Por otro lado, en peces se ha visto que puede alterar la estructura y función de los testículos, disminuyendo la cuenta de espermatozoides y por ende, el éxito de la fertilización. Así mismo, altera el ciclo reproductivo en hembras, retrasando el tiempo de ovulación (29).

Se ha demostrado que en el agua potable o embotellada usada para el consumo humano el BPA se encuentra en cantidades significativas (30). La exposición al BPA en humanos es principalmente a través de los alimentos y las bebidas consumidos. Al medio ambiente llega a través de las aguas residuales, hidrólisis o degradación natural de plásticos siendo los ríos, lagos y estuarios los principales receptores de BPA (26).

La concentración media de BPA está típicamente por debajo de $1.5 \mu\text{g L}^{-1}$ aunque se han llegado a medir concentraciones locales de $25\text{-}146 \mu\text{g L}^{-1}$ en aguas residuales (11). En 2001, Yamamoto reportó una concentración promedio de BPA de $269 \mu\text{g L}^{-1}$ en lixiviados de vertederos de residuos en Japón, donde se encontraron valores de hasta $17,200 \mu\text{g L}^{-1}$

(31). El BPA no suele ser tan recalcitrante como otros contaminantes, debido a que se degrada por vía microbiana y por fotodegradación, y tiene un bajo potencial para acumularse en animales (36). En ambientes aerobios como la mayoría de los ríos, el BPA tiene una vida media entre 4.5 y 4.7 días, siendo las bacterias los degradadores primarios (24,25). Sin embargo, bajo condiciones anaerobias, el BPA es más difícil de transformar y por lo tanto se acumula en los sedimentos. En agua salada, la degradación es más lenta (cerca de 30 días), y es más atribuible a degradación química (32). Los hongos también son capaces de degradar al BPA, aunque principalmente son los hongos ligninolíticos a través de las enzimas que secretan como la manganeso peroxidasa y la lacasa (33). Las plantas son capaces de absorber rápidamente el BPA del agua a través de la raíz y metabolizarlo a compuestos glicosilados, y su posterior biodegradación depende del pH y la temperatura. En peces se ha reportado el metabolismo de BPA a BPA sulfato, principalmente en el hígado. En mamíferos, el citocromo P450 es capaz de oxidar el BPA, aunque la capacidad de transformación depende del organismo; se ha visto que los microsomas de hígado de humano son más lentos en la glucoronidación del BPA que los microsomas de ratas (32).

2.1.4. Triclosán (TCS)

El triclocarbán y el triclosán (también llamado irgasán) están entre los 10 compuestos orgánicos más comúnmente detectados en las aguas residuales en frecuencia y concentración (34). El TCS es un agente antimicrobiano de amplio espectro utilizado en desinfectantes, detergentes, jabones, desodorantes, enjuagues bucales, shampoos, dentríficos y aditivos plásticos (35, 36).

La toxicidad aguda del TCS depende del organismo sobre el que actúe. En algas y bacterias es capaz de interrumpir las vías de síntesis de lípidos, desestabilizar membranas, y desacoplar la fosforilación oxidativa. En animales es posible que provoque narcosis no específica (37). Las plantas acuáticas, invertebrados y peces son grupos menos sensibles a la exposición crónica a TCS (34). Más allá de su toxicidad aguda, el TCS ejerce su efecto negativo en animales por actuar como disruptor endócrino. Es capaz de ejercer efectos tanto estrogénicos como androgénicos en peces; en medaka (*Oryzias latipes*) es capaz de inducir la expresión de Vtg en machos adultos a concentraciones desde 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (38).

A pesar de que en las plantas de tratamiento de aguas residuales entre el 70% y 98% es removido a través de la degradación y sorción en sólidos (37), se ha detectado en los efluentes en concentraciones superiores a $10 \mu\text{g L}^{-1}$, y en aguas superficiales en concentraciones de $2.3 \mu\text{g L}^{-1}$. De acuerdo con los estudios realizados a la fecha, la concentración media en aguas superficiales es de 50 ng L^{-1} (34); sin embargo, por su naturaleza hidrofóbica tiende a acumularse en los sedimentos (39). La bioacumulación de TCS y su derivado metil triclosán se ha reportado en plantas acuáticas. En otros organismos se ha visto que estos compuestos se acumulan de manera diferencial, y es posible que esto se deba sus potenciales de ionización (34). El TCS puede ser biodegradado, particularmente en condiciones anaeróbicas, dando como productos el 2,4-diclorofenol y el 2,8-diclorobenzo-*p*-dioxina, los cuales también se ha observado que tienen actividad estrogénica (37).

2.2.Modos de acción de los disruptores endócrinos

Los DE actúan a través de dos vías principales: 1) a través de receptores hormonales (como los androgénicos y estrogénicos), activando o inhibiendo la expresión génica (40); 2) alterando la síntesis o degradación de hormonas y receptores presentes de manera natural en los organismos (como el receptor aril hidrocarburo, AhR) (41, 42).

2.2.1. Receptores hormonales

2.2.1.1. Receptor de andrógenos (AR)

La diferenciación sexual en machos está mediada por los andrógenos producidos por los testículos fetales. Los andrógenos también son responsables de gran variedad de respuestas fisiológicas y del desarrollo en machos. Son cruciales para el desarrollo y función testicular y de glándulas sexuales accesorias, la maduración sexual de múltiples órganos durante la pubertad, mantenimiento de la espermatogénesis y maduración del esperma, regulación de la gonadotropina masculina, y varias características masculinas secundarias como masa ósea, musculatura, distribución de grasa y capilar (43).

Las principales hormonas androgénicas son la testosterona y su metabolito 5 α -dihidrotestosterona (DHT). Su actividad biológica está mediada predominantemente por el AR, que se expresa en el hipotálamo, pituitaria, hígado, próstata y testículos. El AR es un receptor nuclear de 115-120 kDa dividido en los dominios A/B que contiene la función de transactivación, el dominio C de unión a DNA que consiste de dos dedos de zinc, la región D “bisagra”, y el dominio E que es el sitio de unión a ligando, lugar donde se unen las hormonas (43).

De acuerdo con el modelo clásico, en ausencia de hormonas, el AR se encuentra en el núcleo o citoplasma secuestrado por un complejo inhibitorio multiprotéico. Una vez que se une la hormona, el receptor sufre un cambio conformacional hacia un estado activado que es capaz de homodimerizarse, aumenta su fosforilación y se une a secciones de DNA de regiones promotoras de genes específicos conocidos como elementos de respuesta a hormonas. Este complejo interactúa con el aparato de transcripción ya sea directa o indirectamente a través de proteínas co-regulatorias para promover la transcripción del gen blanco (43).

En los últimos años se han observado cambios importantes en la salud reproductiva de machos de diversas especies que se ha relacionado con la interacción de diversos contaminantes con el AR. Por ejemplo, en humanos la cuenta de espermatozoides era de 113 millones por mL en 1940 y bajó a 66 millones por mL en 1990, además de encontrarse alteraciones en la morfología y motilidad del espermatozoides. Otras acciones mediadas por DE incluyen retraso en la pubertad, distancia anogenital reducida, incremento en la incidencia de criptorquidia, hipospadias, oligozoospermia, cáncer de células germinales testiculares, de testículos y próstata (43).

2.2.1.2. Receptor de estrógenos (ER)

Los estrógenos juegan un papel crucial en el desarrollo y mantenimiento de las funciones sexuales y reproductivas normales. Tanto en machos como en hembras ejercen gran variedad de efectos en los sistemas cardiovascular, musculosquelético, inmune y nervioso central (44). La acción biológica de los estrógenos está mediada principalmente

por los ERs que son proteínas solubles que se encuentran en el citosol. Una vez que los estrógenos se unen a los ERs nucleares, el receptor activado se transloca al núcleo donde se une a segmentos regulatorios en el DNA conocidos como elementos de respuesta a estrógenos (ERE) y activan la transcripción de genes específicos (45).

Los ERs pertenecen a la familia de receptores nucleares cuyos dominios funcionales y estructurales se encuentran altamente conservados. El dominio amino terminal es el más variable tanto en secuencia como en tamaño, y en él se codifica la función de activación 1 (AF-1) que está constitutivamente activa (44). El dominio central de unión a DNA está altamente conservado y contiene dos dedos de zinc que permiten al receptor unirse al ADN en secuencias palindrómicas específicas (EREs) (44). Existe un dominio intermediario que está pobremente conservado en los ER, pero que parece ser necesario para mantener la estructura tridimensional del ER (46). En el dominio C-terminal de unión a ligando (LBD) se encuentra la función de activación 2 (AF-2). Cuando este dominio interactúa con un ligando activador, ocurre un cambio conformacional que permite la unión de una proteína co-activadora que facilita la homodimerización del ER y con ello el inicio de la transcripción; cuando un antagonista interactúa con en el LBD, la proteína co-activadora no se puede unir al ER quedando en una conformación inactiva. Al ser el dominio encargado de la interacción con el estrógeno, el LBD se ha utilizado para hacer los estudios de activación del ER y con ello la identificación de los compuestos que actúen como DE. Existen varias estructuras cristalográficas para el LBD de humano donde se observa que este dominio consiste principalmente de α -hélices. El hER α LBD fue cristalizado con su ligando natural, el E2 (PDB 1G50). Se observó que la unión del E2 se lleva a cabo por puentes de hidrógeno con los residuos Glu353, Arg394, e His524 por ser los únicos aminoácidos con cadenas laterales capaces de formar puentes de hidrógeno con el ligando; el resto del dominio consta de cadenas laterales hidrofóbicas (Figura 2) (7).

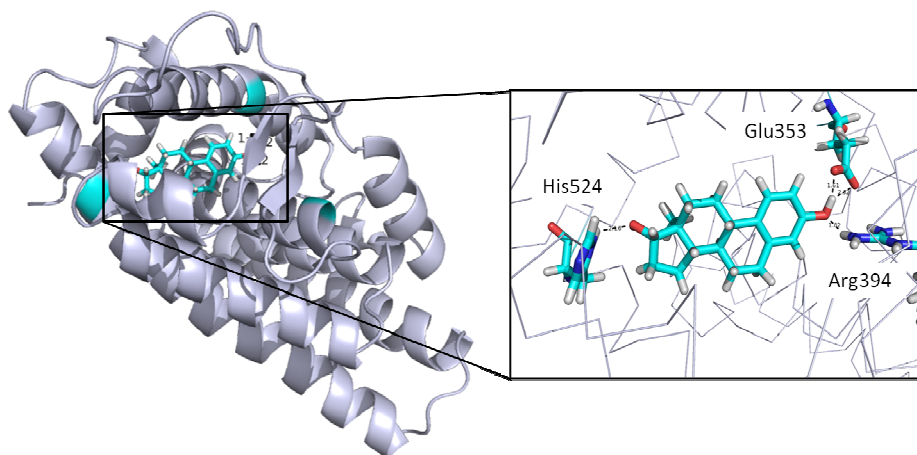


Figura 2. Estructura del hER α LBD cristalizada con el ligando E2.

En animales se han encontrado dos subtipos de receptores de estrógenos, ER α y ER β , con estructuras muy similares, pero que difieren en sus características funcionales, especialmente en sus afinidades a ligando y capacidades de transactivación (47). Ambos receptores muestran patrones de expresión particulares en el tracto gonadal, senos, testículos, hueso, sistema nervioso central, músculo esquelético, hígado, tejido adiposo, endotelio vascular y médula ósea (44). Estudios recientes en ratones indican que hay una clara predominancia del ER β en algunas áreas de la próstata y el sistema nervioso central, mientras que el ER α se expresa principalmente en útero, glándulas mamarias, hígado y músculo esquelético (48). Ambas isoformas exhiben patrones de expresión dependientes de la especie y del género, y en el caso de las hembras, la expresión varía entre la pre y postmenopausia (48).

En pez cebra se ha identificado la presencia de los receptores de estrógenos ER α , ER β 1 y ER β 2 (47). El mRNA de estos tres receptores se ha detectado en cerebro, pituitaria, hígado, gónadas, intestinos y ojos. En particular, en el cerebro, estos tres receptores se expresan de manera diferencial, aunque en algunas zonas se expresan a los mismos niveles. A nivel de secuencia, estos receptores presentan una importante similitud con el ER α y ER β de humano en el dominio C de unión a DNA (Figura 3). En el dominio E/F (sitio de unión a ligando), las zonas más conservadas corresponden a las hélices que rodean a la cavidad de unión del ligando (47). Es por ello que las funciones de transactivación son similares en los diferentes receptores, aunque las afinidades específicas por los distintos ligandos varían. El

Existen procesos mediados por otro receptor llamado GPER, antes conocido como GPR30, que inicia procesos en pocos minutos en respuesta al E2, como flujos de calcio y la producción de óxido nítrico (49). Este receptor pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G anclados en la membrana. Dentro de la familia, pertenece a la clase A que tienen similitud a rodopsina (50). El GPER de humano es de 41 kDa. Se piensa que el segmento N-terminal está localizado fuera de la célula y que los residuos de ácido aspártico en la región terminal pueden estar modificados por glicosilaciones si se encuentra en la membrana plasmática. Dentro de la célula también se encuentra en el aparato de Golgi y principalmente en el retículo endoplásmico (49).

Este receptor está ampliamente distribuido en tejidos reproductivos y no reproductivos. Además de los efectos antes mencionados, se ha visto que cuando los estrógenos interactúan con este receptor estimulan la actividad de la adenilil ciclasa e incrementan la producción de cAMP (40). El GPER se ha relacionado con el desarrollo de cáncer de seno, endometrio y ovarios en humanos. En los animales se ha visto que está implicado en la regulación neuroendócrina y de neurotransmisores, protección contra autoinmunidad y hemorragias por trauma del hígado, metabolismo de lípidos y tono cardiovascular, secreción de insulina, formación de folículos primordiales, y regulación de arresto meiótico de oocitos en peces teleostos (40, 51). La actividad de este receptor es independiente de la actividad de los receptores nucleares ER α y ER β (40).

Aunque por lo general los DE tienen una menor afinidad que el E2 por los diferentes receptores, son peligrosos para los organismos porque pueden permanecer más tiempo en el cuerpo almacenándose en el tejido adiposo por su carácter predominantemente hidrofóbico, además de que no pueden ser secretados con tanta facilidad por el hígado, como sucede con los estrógenos naturales (11). Esto, aunado a la gran variedad de efectos negativos que ejercen en los organismos, ha generado un creciente interés por la eliminación de estos compuestos del ambiente, particularmente de medios acuáticos.

2.2.2. Disrupción endócrina en peces

De la gran variedad de contaminantes que pueden afectar el sistema endócrino de los animales, muchos de ellos llegan a los ríos y el mar a través de las descargas de aguas residuales industriales y municipales, por lo que los ejemplos más documentados de los efectos adversos de los DE en el ambiente son en animales acuáticos, particularmente en peces (52). Entre los efectos que se han encontrado en peces como resultado de la disrupción endócrina están el agrandamiento de la tiroides, disminución en el contenido hormonal de la tiroides, frecuente maduración sexual prematura en machos, pérdida de características sexuales secundarias, disminución en el contenido de hormonas gonadales, reducción en la fertilidad de los huevos, feminización de machos, defeminización de hembras, intersexo, cambios en hormonas sexuales esteroideas, y mortalidad de embriones y deformidades a tasas mayores de las esperadas (45).

En la fauna silvestre hay evidencias claras de que la presencia de DE da lugar a diversos eventos que afectan la reproducción como la maduración precoz de hembras, la inhibición en el desarrollo de ovarios, reducción en el peso de los huevos, reducción en el éxito de la eclosión, y reducción en la supervivencia de larvas (2). En Suecia, peces expuestos a efluentes de plantas productoras de pulpa de papel mostraron una reducción en el tamaño de las gónadas, madurez sexual retardada, incremento en la mortalidad de larvas y una abundancia reducida; todos estos efectos tendieron a desaparecer al incrementar la distancia de la fuente de contaminación (53).

Al menos en peces, la principal forma de disrupción endócrina observada ha sido estrogénica dado que un gran número de xenobióticos tienen la capacidad de mimetizar a los estrógenos e interactuar con sus receptores, activando la transcripción de genes, particularmente ciertos genes que se consideran específicos de hembras como la Vtg, por lo cual se ha utilizado como biomarcador (11, 54). De forma natural, en peces la producción de Vtg inicia cuando la hormona estimulante del folículo estimula la producción de estrógeno. Después de que el E2 es sintetizado, viaja por el torrente sanguíneo hasta el hígado donde se difunde en los hepatocitos y se une al ER α el cual forma el complejo con las regiones promotoras de los genes de la Vtg. Una vez sintetizada la proteína, llega al oocito por endocitosis mediada por receptores, lo que provoca un aumento en el tamaño de

los folículos. Posteriormente, durante la maduración del oocito, la vitelogenina se rompe en lipovitelinas y fosvitina. Una vez maduros, los huevos son ovulados (55). En pez cebra se han identificado 7 genes que codifican para diferentes Vtg's (56). Los 7 vtgs están localizados en dos diferentes cromosomas; están predominantemente expresados en el hígado de las hembras y pueden ser inducidos en el hígado, intestino y testículos de los machos por exposición al E2. También se encuentra en otros tejidos, aunque el nivel de expresión es menos del 10% del encontrado en hígado. De los diferentes Vtgs, el Vtg1 es el más abundante encontrándose en 2 órdenes de magnitud por arriba del Vtg2 y 3 órdenes de magnitud por arriba del Vtg3 (57).

En el Reino Unido, truchas arcoiris macho expuestas a descargas de plantas de tratamiento de aguas residuales mostraron incrementos dramáticos en Vtg, llegando a niveles iguales o más altos que los que se suelen encontrar en hembras maduras, lo que va de la mano con una menor fertilidad peces y por lo tanto, llevar a la disminución de la población (2).

El interés por estudiar la disrupción endócrina en peces también reside en que son animales que pueden servir como modelo en la investigación biomédica. En particular, pueden ayudar en el estudio de los efectos sobre el eje hipotalámico-pituitario-gonadal (HPG) ya que está significativamente conservado en vertebrados; además, los peces ofrecen una ventaja clara sobre los mamíferos en términos del costo, facilidad y duración de los estudios (52). De las diferentes especies de peces modelo sobresale el pez cebra (*Danio rerio*) por su facilidad de manejo en el laboratorio. Los adultos alcanzan un tamaño de 50 mm de longitud y pueden mantenerse a densidades relativamente altas. Tienen tiempo de generación corto (3 meses) y cada hembra puede depositar entre 100 y 200 huevos semanalmente (58). Además, su genoma se encuentra completamente secuenciado lo que provee las bases para identificar nuevos diagnósticos de expresión génica en estudios relacionados con los DE (52). Una particularidad del pez cebra que le confiere ventaja sobre otros peces, es que pasa por diferentes etapas de diferenciación sexual comenzando por una etapa de hermafroditismo en la etapa juvenil, una transición de las gónadas hasta la completa diferenciación (59). De esta manera, la exposición temprana a DE puede modificar las características sexuales y la proporción sexual esperada para esta especie (60:40) (52).

En pez cebra se han hecho estudios de la respuesta génica por exposición a DE. Kausch y colaboradores (60) analizaron el perfil de expresión utilizando microarreglos de 14k por el tratamiento durante 11 días con E2, BPA y genisteína. Los patrones de expresión son distintos para los tres compuestos analizados. El E2 reprimió la expresión de genes involucrados en la proteólisis, actividades de transporte de iones y proteínas, metabolismo de alcohol, y formación del tubo neural. El BPA principalmente reguló secuencias que codifican para proteínas involucradas en el metabolismo. La genisteína reguló genes involucrados en la regulación del ciclo celular. Los patrones de expresión de genes de proteínas homeobox fueron modificados con los tres compuestos, aunque en cada caso se trató de genes específicos distintos. Los únicos genes que fueron modificados del mismo modo por los tres tratamientos fueron cinco genes que codifican para las diferentes vitelogeninas presentes en el pez. En otro estudio (61) también con pez cebra utilizando microarreglos se estudió el efecto de la exposición a E2 y NP. En ambos tratamientos se modificó la expresión de genes involucrados en el mecanismo de defensa ante estrés oxidativo y metabolismo de xenobióticos. Entre los genes inducidos, después del tratamiento con NP se encontró al citocromo P450 3A para NP (aunque no entre los 30 genes más importantes) y al citocromo P450 CYP19a1a para E2. De nuevo, en ambos casos la Vtg fue inducida del mismo modo.

Para identificar la etapa de desarrollo en que este organismo es más sensible a la exposición a DE, se estudiaron los efectos fisiológicos por exposición a etinilestradiol (59). El estudio incluyó peces de 3 etapas distintas: (a) 15 a 42 días postfertilización (dpf), etapa juvenil hermafrodítica; (b) 43 a 71 dpf, etapa de transición; (c) 72 a 99 dpf, etapa de premaduración de gónadas. La exposición durante la etapa de transición fue la que produjo los efectos más notables en cuanto a la fecundidad y capacidad de fertilización de los peces. También en esta etapa es cuando mayor cantidad de peces presentaron un fenotipo de feminización, efecto que resultó ser reversible una vez que dejaron de estar expuestos al etinilestradiol. Por lo tanto, la etapa de transición es donde mejor se observan los efectos a exposiciones a corto plazo a DE. Esto es coincidente con otro estudio donde se analizó la expresión de la Vtg1 y Vtg2 durante la etapa embrionaria, larval, juvenil y adulta, por exposición a E2 o NP por una semana (62). En la etapa embrionaria y larval se observaron los valores más bajos de ambas Vtg's. En organismos juveniles (17-24 dpf) y adultos (más

de 5 meses) se observó que los niveles de las Vtg's fueron muy similares alcanzando entre 4 y 5 órdenes de magnitud mayores a los observados en el control al ser expuestos a concentraciones de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de E2. Por lo tanto, el pez cebra en una etapa de desarrollo juvenil es un buen modelo para medir la actividad estrogénica de un compuesto tomando como biomarcador a la Vtg1.

2.3. Identificación y determinación de afinidad de DE

Los ensayos *in vitro* para la detección de DE incluyen unión al receptor, proliferación celular, expresión génica dependiente del receptor, y ensayos de genes recombinantes de receptor-receptor (63). Estos métodos se han aplicado tanto para identificar compuestos con actividad estrogénica como andrógena.

Entre los más reportados para la identificación de compuestos con actividad estrogénica se encuentran el método de levadura doble híbrido (64) y el método de bioluminiscencia en células de cáncer de mama (65). Ambos métodos se basan en medir la capacidad del receptor de estrógenos para ejercer su función de activación de la transcripción. En este caso, se requiere que las células contengan dos plásmidos, uno con el ER α y otro con un gen reportero cuya transcripción está bajo el promotor de los EREs. El inconveniente de estos ensayos es que se ha visto una gran variación entre los valores reportados (66). Por otro lado, muchos compuestos son de naturaleza hidrofóbica y es necesario el uso de disolventes que pueden resultar tóxicos para las células. Además, existen dudas acerca de si algunos de los compuestos son capaces de ser transportados al interior de las células y llegar a interactuar con el ER α , por lo que es posible que se obtengan falsos negativos.

Por otro lado, están los métodos directos que utilizan el ER α LBD aislado y que miden la afinidad de los DE en ensayos de competencia. El más común utiliza E2 marcado radioactivamente que es incubado con el LBD y diluciones del compuesto al cual se quiere determinar la afinidad. El E2 unido se separa del que no se une a la proteína utilizando carbón activado, y se cuantifica la cantidad de E2 marcado libre (67). El mayor inconveniente de este método es que se requiere de instalaciones especiales para el manejo de radioactividad y que el manejo para la eliminación del compuesto no unido puede

perturbar el complejo ER α LBD-E2. Gurer-Orhan y colaboradores (68) proponen el uso del cumestrol como ligando, ya que al unirse al ER α LBD de humano, aumenta su fluorescencia. Si en el medio se encuentra presente un ligando más fuerte como el E2, éste se unirá al ER α LBD y no permitirá que el cumestrol se una disminuyendo así la fluorescencia hasta el valor cuando no hay proteína presente. Por otro lado, Parker y colaboradores (69) reportaron un método similar midiendo la anisotropía de un fluoróforo llamado E2S. Cuando el E2S se encuentra unido al receptor, se detiene su rotación. Al hacer incidir un haz de luz fluorescente polarizado sobre este complejo, la luz es emitida en el mismo plano en el que fue excitado. Cuando el E2S está libre, la fluorescencia es emitida en diferentes planos y es detectada con menor intensidad. La ventaja que estos dos métodos presentan es que no es necesario purificar el complejo receptor-fluoróforo, y que el equipo necesario es un fluorímetro. La desventaja es que la medición de afinidad no es del todo absoluta, ya que depende de la afinidad que el fluoróforo reportero presenta por el receptor, dando una medición de afinidad relativa.

2.4. Eliminación de DE

Dependiendo del tipo de DE que se quiera eliminar, se pueden aplicar diferentes métodos destructivos como oxidación química, incineración o degradación. Por otro lado, existen también métodos no destructivos que permiten la recuperación del contaminante como extracción líquida, absorción y procesos de membrana. La aplicación de cualquiera de ellos dependerá de la concentración y las propiedades de los contaminantes presentes en el efluente (70).

2.4.1. Métodos abióticos

El carbón activado es capaz de adsorber gran cantidad de compuestos. La eficiencia de remoción es dependiente del grado de activación, volumen del poro y de la naturaleza química del DE, siendo más eficiente para los compuestos con un alto valor de K_{ow} . Desafortunadamente, el grado de adsorción del DE utilizando efluentes reales es una centésima parte de lo observado cuando el DE está solubilizado en agua pura (71).

El uso de membranas también ha sido estudiado como método de remoción de DE. La eficiencia de este método depende de las propiedades fisicoquímicas del DE como peso molecular, K_{ow} , solubilidad en agua, propiedades electrostáticas, entre otras. La eficiencia varía entre un 10% y un 99.9%, dependiendo del tipo de membrana utilizada. El DE puede ser retenido debido a su tamaño, adsorbido en la membrana o que exista una repulsión de carga. La principal desventaja es que se ha visto que en algunos casos, la remoción del DE es reversible (71).

El cloro es utilizado como método de desinfección de agua, y también ha mostrado ser eficiente en la eliminación de la actividad estrogénica de algunos DE, aunque a largos tiempos de tratamiento. Alum y colaboradores (63) observaron que para BPA, E2 y 17 α -etinilestradiol (EE2), después de una hora de tratamiento con cloro, la actividad estrogénica aumentó para los tres DE, pero disminuyó en las siguientes 24 h. Este efecto lo atribuyen a que los subproductos generados al inicio del tratamiento tienen actividad estrogénica y que al ser posteriormente oxidados, pierden su efecto negativo. La desventaja de este método es que aunque los productos de reacción obtenidos para los diferentes DE perdieron su actividad estrogénica, también se generan otros compuestos clorados que son potencialmente riesgosos para la salud, como trihalometanos y otros compuestos potencialmente carcinógenos (72).

Existe un grupo de procesos químicos oxidativos llamados procesos avanzados de oxidación, basados en la generación *in situ* de especies altamente reactivas y no selectivas como radicales hidroxilo, superóxido e hidropéroxido como iniciadores de la degradación oxidativa (10). Estos radicales son capaces de oxidar y mineralizar casi cualquier molécula orgánica a iones inorgánicos y CO₂. La generación de estos radicales puede ser a través de radiación UV u ozonización. La ozonización es el proceso más utilizado en la oxidación de DE en ausencia de luz con eficiencias alrededor del 90% (70). En el estudio de Alum y colaboradores (63) se obtuvo una mayor eliminación de la actividad estrogénica y en menor tiempo utilizando ozono que cloro. El proceso de oxidación más utilizado a nivel industrial es el proceso de Fenton que utiliza una sal de hierro (II) y peróxido de hidrógeno en condiciones ácidas (70). Una mayor eficiencia se ha obtenido con procesos de fotocátalisis utilizando UV/H₂O₂ u óxido de titanio. Comparado con los tratamientos con ozono, éstos requieren un mayor tiempo de reacción para obtener mejores resultados con respecto a

otros métodos. Utilizando catalizadores mesoporosos de Ti-MCM-41 se logró la mineralización de BPA después de 60 min de tratamiento bajo condiciones ideales. La eficiencia de estos procesos depende fuertemente de la cantidad de catalizador utilizado, tiempo de radiación y pH (73).

2.4.2. Métodos biológicos

Aunque existen procesos abióticos que son eficientes en la eliminación de DE, hay una gran variedad de factores que se deben de considerar y que afectan la eficiencia de la eliminación de los DE como la intensidad de la luz y longitud de onda, concentración inicial de sustrato, carga del catalizador, pH de la solución, temperatura de reacción y presencia de oxígeno (10). Los métodos biológicos pueden ser más atractivos en este sentido, debido a que los organismos son capaces de adaptarse a las condiciones ambientales preponderantes en el sitio y cumplir con la función deseada.

La fitorremediación es una estrategia que ha sido estudiada, en particular Imai y colaboradores (28) probaron cerca de 100 variedades de plantas de jardín para la eliminación de BPA en solución; los mejores resultados obtenidos fueron con *Portulaca oleracea* al eliminar el 95% de BPA en 24 horas de una solución con una concentración inicial de 50 μM . No se observó acumulación de BPA en los tejidos de la planta, lo que sugiere que es capaz de metabolizar el compuesto. También se hicieron análisis con NP y octilfenol (OP) los cuales fueron eliminados del agua en 24 h. Aún cuando en este estudio se obtuvieron resultados muy favorables en poco tiempo, la fitorremediación es un proceso que suele tomar años (74).

Por otro lado, los hongos ligninolíticos han demostrado ser capaces de degradar una gran variedad de xenobióticos como hidrocarburos aromáticos policíclicos, plaguicidas, compuestos organoclorados y colorantes, entre otros, a través de las enzimas extracelulares que incluyen la lignino peroxidasa, manganeso peroxidasa, la peroxidasa versátil y la lacasa (75). Dado que la estructura química de la gran mayoría de los DE contiene un anillo fenólico, estos compuestos son susceptibles a la transformación por éstas enzimas. Existen varios reportes del uso de diferentes especies de hongos para la transformación de DE.

Cabana y colaboradores (33) publicaron en el 2007 una revisión acerca de estos trabajos. La mayoría de los estudios se han realizado con BPA y el NP en solución acuosa. La eficiencia en la eliminación de los DE depende del tipo de cepa utilizada, y en el caso del NP, de los isómeros presentes. Soares y colaboradores (76) reportaron que *Bjerkandera sp.* logró la remoción del 95% de NP de una solución con 45 mg L⁻¹ después de 5 días de incubación, mientras que *Trametes versicolor* eliminó el 90% en 15 días. Los periodos de remoción en solución acuosa varían desde 4 días hasta semanas como fue el caso de *T. versicolor* que tardó 4 semanas en eliminar el 90% de una solución 0.25 mM de TCS (35). Así mismo se han efectuado estudios de la eliminación de DE en suelo logrando niveles de remoción entre el 60% y el 95% en tiempos de al menos 2 semanas.

En otros estudios se ha explorado el uso de las enzimas purificadas de los hongos ligninolíticos, logrando reducir los tiempos de reacción a horas, como ha sido el caso de Hirano y colaboradores (77), quienes reportaron en el 2000 el uso de la manganeso peroxidasa de *P. ostreatus*. En este trabajo se logró eliminar por completo el BPA de una solución 0.4 mM en 1 h de reacción. La manganeso peroxidasa de *Phanerochaete chrysosporium* eliminó el 95% de una solución 0.25 mM de NP en 1 h (78). Se ha demostrado que la manganeso peroxidasa se ve más afectada por los compuestos que están presentes en aguas residuales, es decir, pierde eficiencia cuando se comparan los resultados obtenidos en laboratorio en condiciones ideales con los obtenidos con desechos reales (79). Además, también la manganeso peroxidasa sufre de la inactivación por su co-sustrato el peróxido, fenómeno que caracteriza a las peroxidases (80). Es por ello que se han buscado otras enzimas que sean más estables, siendo la lacasa una de las opciones más interesantes. Las eficiencias de eliminación varían entre el 60% y el 100% en periodos no mayores a 1 día. Los mejores resultados se han obtenido con la lacasa de *Coriolopsis polyzona* que eliminó 5 mg L⁻¹ de BPA después de 4 h de contacto (81), y con *Trametes versicolor* que eliminó 5 mg L⁻¹ de NP después de 1.5 h (39).

2.4.2.1. Lacasa

Las lacasas (*p*-difenol:dioxígeno oxidorreductasa, EC 1.10.3.2) pertenecen a la familia de oxidases cobre-azul que catalizan procesos de polimerización o depolimerización. En

plantas, están involucradas en la formación de la pared celular, y junto con las peroxidasas, en la lignificación (82). Las lacasas fúngicas son secretadas por los micelios de basidiomicetos, ascomicetos y deuteromicetos (83). La lacasa fúngica típica es una proteína de aproximadamente 60-70 kDa con un punto isoeléctrico ácido de alrededor de pH 4.0. Las diferencias en las propiedades reportadas para lacasas purificadas de las mismas especies se pueden deber a la presencia de diferentes isoenzimas y las diferentes propiedades de distintas cepas del mismo hongo (84).

La lacasa es una glicoproteína usualmente con 4 átomos de cobre por monómero unidos a 3 sitios redox (85):

1. Sitio tipo 1 (T1) mononuclear cuyas características espectroscópicas y electrónicas son similares a la de los centros cobre azules que se encuentran en las proteínas de transferencia de electrones. Su presencia le confiere el color azul a la enzima en solución y se caracteriza por una banda de absorción a 600 nm ($\epsilon \sim 5000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, (86)).
2. Sitio tipo 2 (T2) mononuclear que presenta una geometría metálica trigonal y propiedades de resonancia paramagnética nuclear comparable con los complejos tetragonales de Cu(II).
3. Sitio tipo 3 (T3) dinuclear con un estado basal diamagnético que se origina del acoplamiento antiferromagnético fuerte entre los dos iones Cu(II), debido a la presencia de un ión hidroxilo que puentea.

La lacasa actúa por un mecanismo enzimático tipo Theorell-Chance bi-bi que inicia cuando el cobre del sitio T1 oxida al sustrato, preferencialmente fenoles y anilinas, generando un radical libre (87). El electrón extraído es transferido a través de un motivo tripéptido His-Cys-His conservado en las lacasas. El electrón llega al sitio T2/T3 donde el oxígeno molecular es reducido a agua (84). El resultado general de este proceso es la reducción de una molécula de oxígeno a 2 moléculas de agua y la oxidación de 4 moléculas de sustrato para producir 4 radicales (Figura 4).

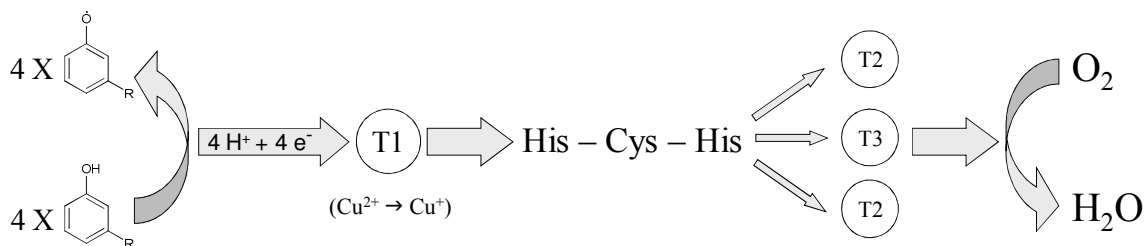


Figura 4. Ciclo catalítico de la lacasa (75).

El potencial redox de la lacasa depende del organismo de origen, variando entre 0.5 y 0.8 V (82). Se ha propuesto que el ligando axial que coordina al cobre T1 es el responsable del potencial redox. Cuando la fenilalanina es el residuo axial, la enzima es de alto potencial redox, mientras que las de medio y bajo potencial tienen una leucina y una metionina, respectivamente. Sin embargo, al hacer mutaciones en estos residuos, no hay cambios significativos en los potenciales (86). Piontek (88) propuso otra teoría en la que sugiere que la distancia del enlace entre una de las histidinas que coordinan al cobre T1 es responsable del potencial redox. Al aumentar la distancia del enlace, la contribución del par de electrones libres del nitrógeno disminuye dejando al cobre deficiente de electrones dando lugar a una desestabilización de los estados de oxidación más altos aumentando el potencial redox.

Las propiedades catalíticas y electrocatalíticas de la lacasa hacen posible que esta enzima sea utilizada en una gran diversidad de procesos biotecnológicos como el blanqueo de pulpa de papel, la síntesis orgánica, en la elaboración de biosensores, celdas de combustible enzimáticas, y en la degradación de xenobióticos (86).

2.4.2.2. Lacasa de *Coriopsis gallica*

Calvo y colaboradores (89) reportaron la producción de lacasa por el basidiomiceto *Coriopsis gallica* que resultó interesante por su capacidad de transformar diferentes colorantes industriales. La proteína se caracterizó bajo condiciones desnaturalizantes y se determinó un peso de 84.1 kDa. Se identificaron 4 isoenzimas con puntos isoeléctricos de 4.15, 4.20 y 4.27 (dos de ellas tienen el mismo *pI*). Su actividad máxima se obtuvo a pH 3,

y a una temperatura de 70°C, con actividad estable a 28°C. Su vida media de actividad fue de 32 días a 37°C y 8 días a 60°C, lo que demuestra que esta enzima es muy robusta operacionalmente.

En una variedad de lacasa de *Coriopsis gallica* llamada UAMH 8260 (University of Alberta Microfungus Collection and Herbarium) se determinó una sola isoenzima con un pI de 3.4, un peso molecular de 66 kDa determinado por SDS-PAGE, y de 56.6 kDa determinado por MALDI-TOF, un contenido de carbohidratos de 21% (w/w, equivalentes de glucosa), y 3.3 átomos de cobre por molécula de lacasa (90). De acuerdo a su secuencia de aminoácidos reportada (PDB 2vds) (91), esta lacasa comparte los motivos conservados de las secuencias de las lacasas de alto potencial redox, y se ha determinado que es de 0.74 V a pH 4.5 (86). En la Figura 5 se muestra un diagrama del sitio catalítico de esta lacasa.

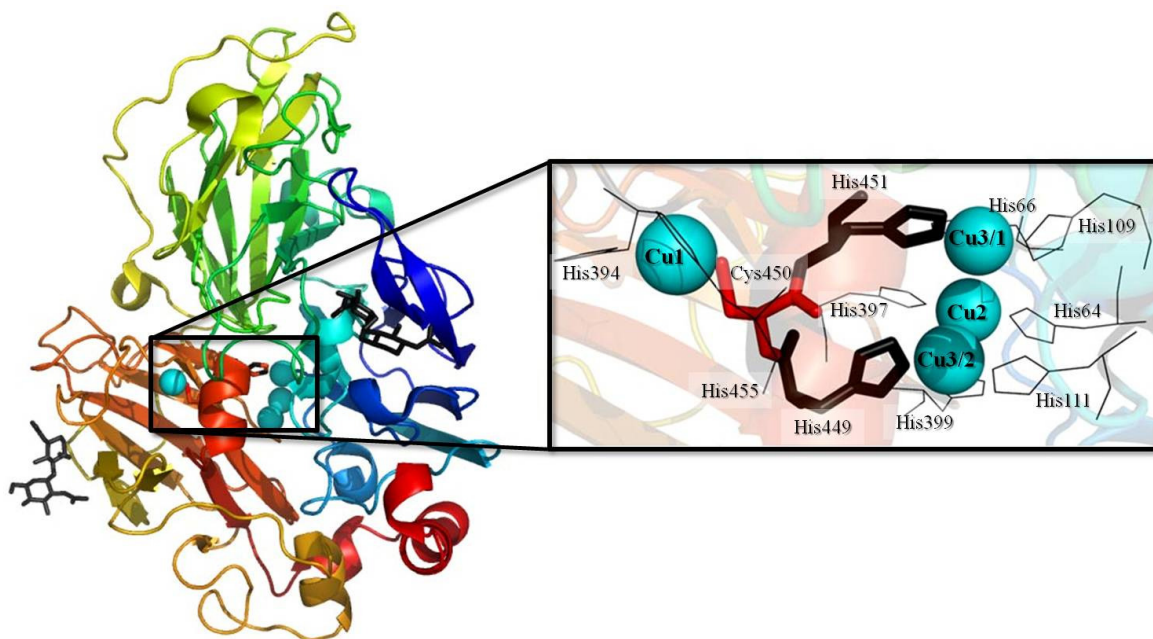


Figura 5. Estructura del sitio catalítico de la lacasa de *Coriopsis gallica* UAMH 8260 (91).

Trabajos realizados previamente por el grupo de trabajo han demostrado que esta lacasa es eficiente en la transformación de una gran variedad de colorantes industriales (92), por lo que resultó interesante explorar su aplicación en la transformación de otros xenobióticos. Estudios posteriores mostraron que esta lacasa es eficiente en la decoloración de efluentes textiles (89) y en la transformación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) (90, 93), aunque en ambos casos su actividad mejoró significativamente en

presencia de mediadores. Los mediadores son compuestos que son sustrato para la lacasa que una vez que son oxidados, se alejan del sitio activo de la enzima y son capaces de oxidar a otros compuestos que no son sustrato para enzima y transformarlos por mecanismos distintos a los que están disponibles para la lacasa. Al aplicar este sistema lacasa-mediador, se logró una eficiente transformación de plaguicidas organohalogenados, dando como principales productos aductos mediador-plaguicida (94).

En este trabajo se estudió la transformación enzimática de diferentes DE utilizando la lacasa de *Corioloopsis gallica* UAMH 8260 y se propone su inmovilización como un método para facilitar la aplicación de este proceso enzimático para la transformación de los DE presentes en las aguas de uso acuícola y así eliminar los efectos negativos que ejercen estos compuestos sobre los peces.

3. Hipótesis y objetivos

3.1.Hipótesis

El tratamiento del agua a través de un sistema con lacasa inmovilizada transformará a los compuestos con capacidad de disrupción endócrina disminuyendo o eliminando su afinidad por los receptores endócrinos reduciendo sus efectos estrogénicos sobre los peces.

3.2.Objetivo general

Estudiar la transformación de diferentes disruptores endócrinos por la lacasa y evaluar los efectos estrogénicos de los productos de transformación en sistemas de acuicultura modelo.

3.3.Objetivos particulares

1. Determinar los parámetros cinéticos de la transformación de diferentes disruptores endócrinos por la acción de la lacasa de *Corioloipsis gallica* UAMH 8260.
2. Analizar la naturaleza química de los productos de la transformación de los diferentes disruptores endócrinos.
3. Estudiar la interacción *in vitro* de diferentes disruptores endócrinos con el receptor de estrógenos ER α de pez cebra y de humano con y sin tratamiento con lacasa.
4. Estudiar el efecto en pez cebra de diferentes disruptores endócrinos con y sin tratamiento con lacasa libre o con un sistema de lacasa inmovilizada.

4. Protocolo experimental

4.1. Materiales

4.1.1. Enzima

La lacasa de *Coriolopsis gallica* UAMH 8260 fue producida en el laboratorio según el protocolo reportado por Pickard y colaboradores (93) y purificada de acuerdo a Rodríguez y colaboradores (92). Brevemente, el hongo fue crecido en medio Bran Flakes (3% de Bran Flakes en amortiguador de fosfatos de sodio 60 mM, pH 6.0 enriquecido con 0.8 mM de CuSO₄) en matraces Fernbach de 3 L conteniendo 1 L de medio. Al alcanzar el máximo de actividad, alrededor del día séptimo día, el medio se centrifugó y concentró por ultrafiltración. La solución enzimática concentrada se sometió a un fraccionamiento por precipitación con sulfato de amonio. La primera precipitación se llevó a cabo con 50% de saturación a 4°C. El precipitado se desechó y el sobrenadante se llevó al 100% de saturación de sulfato de amonio. El precipitado de esta segunda fracción se disolvió en amortiguador 60 mM de fosfato de sodio, pH 6.0. La solución enzimática dializó en una membrana de 12 kDa contra amortiguador 10 mM de fosfatos, pH 6.0, a 4°C. El solvente de diálisis se cambió dos veces.

La solución se sometió a una cromatografía de intercambio aniónico débil sobre DEAE-celulosa (dietilaminoetilcelulosa) de Sigma-Aldrich Co, eluyendo con un gradiente de NaCl de 0 a 1 M en un amortiguador 10 mM de fosfatos pH 6.0. Las fracciones que presentaron actividad fueron colectadas y concentradas en una celda de ultrafiltración con una membrana de 10 kDa de corte. Finalmente, la solución se sometió a una cromatografía de intercambio aniónico fuerte utilizando resina High Q (Bio-Rad laboratorios) y eluyendo con un gradiente de NaCl de 0 a 1 M en un amortiguador 10 mM de fosfatos pH 6.0

4.1.2. Reactivos

Los compuestos BPA, E2, NP, TCS, β -sitoesterol y cumestrol, fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Los disolventes acetonitrilo (ACN), tetrahidrofurano (THF), dimetilsulfóxido (DMSO), hexano y acetato de etilo fueron adquiridos de Fisher

Scientific (Springfield, NJ) grado cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El prepolímero HYPOL 2002 fue donado por DOW Chemical México (Puebla, México). Los demás reactivos se obtuvieron de J. T. Baker (Phillipsburg, NJ) como grado reactivo.

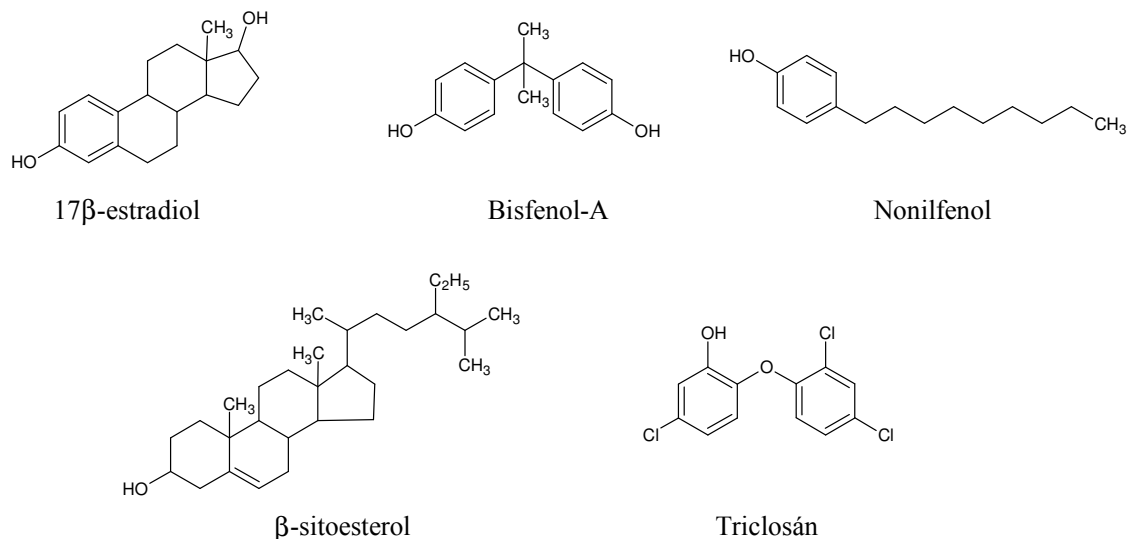


Figura 6. Estructura química de los DE analizados.

4.1.3. Oligonucleótidos

En la Tabla 1 se describen los oligonucleótidos utilizados para la clonación de zfER α y el zfER α LBD, y para la secuenciación de los diferentes fragmentos. Además se describen los oligonucleótidos utilizados en el PCR tiempo real para los análisis de la expresión de los genes de Vtg1 y el factor de elongación α 1.

Tabla 1. Descripción de oligonucleótidos utilizados^(a).

Clave	Secuencia 5' \rightarrow 3'	Descripción
Drcds5F	ATGTACCCTAAGGAGGAGCACAG CGCGGGG	Corresponde a las primeras 30 pares de bases de la secuencia reportada para el gen zfER α (Genebank AB037185.1)
Drcds3R	TCAGGGGTCAGGGCTATGGCTGTG ACAGGC	Corresponde a las últimas 30 pares de bases hasta el codón de término del gen zfER α .
DrNheI5F	CATAGGG <u>GCTAGC</u> CCTGACCAGGT GCTGCTGCTG	Introduce el sitio de restricción NheI en el extremo 5' del zfER α LBD.
DrBamHI3R	GAATTC <u>GGGATCCT</u> CAGGGGTCA GGGCTATGGC	Introduce el sitio de restricción BamHI después del codón de paro del zfER α LBD.
M13F	GTTTTCCAGTCACGTTGTA	Específico para el vector TOPO-TA® en la región río arriba del sitio de clonación.

M13R	TTGTGAGCGGATAACAATTC	Específico para el vector TOPO-TA® en la región río abajo del sitio de clonación.
T7F	TAATACGACTCACTATAGGG	Específico para el promotor T7 del vector pET-28b en la región río arriba del sitio de clonación.
T7Terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGGTGGC	Específico para el terminador T7 del vector pET-28b en la región río abajo del sitio de clonación.
Vtg1F	AACGAACAGCGAGAAAGAGATTG	Inicia en el nucleótido 3895 de la secuencia reportada para el gen Vtg1 de pez cebra (Genebank NM_001044897).
Vtg1R	GATGGGAACAGCGACAGGA	Termina con el nucleótido 4024 del gen Vtg1 de pez cebra.
elfaF	CTACAACCCTGCCAGTGTGTC	Inicia en el nucleótido 578 de la secuencia reportada para el gen del factor de elongación α 1 de pez cebra (Genebank AY422992).
elfaR	GTACCGCTAGCATTACCCTCC	Termina con el nucleótido 709 del gen del factor de elongación α 1 de pez cebra.

^(a) En negrita y subrayado se marca la secuencia del sitio de restricción.

4.1.4. Vectores

Para subclonar los productos de PCR purificados, se utilizó el vector TOPO-TA® (pCR®-2.1 TOPO®, Invitrogen). El vector está linearizado y en los extremos tiene una base timina desapareada. La enzima *Taq* polimerasa agrega una base adenina en el extremo 3' en los productos de PCR lo que permite la ligación del vector linearizado. Este vector contiene el cassette de resistencia a kanamicina y ampicilina, así como la secuencia que codifica para la enzima β -galactosidasa.

Para la expresión del zFER α LBD se seleccionó el vector pET-28b (Novagen®) que contiene el origen de replicación *f1* y un cassette de resistencia a kanamicina. La región codificante es transcrita por la RNA polimerasa T7 y es inducida por IPTG. En el extremo amino terminal contiene una secuencia de 6 histidinas así como un marcador trombina/T7; en el extremo carboxilo terminal tiene una secuencia opcional de 6 histidinas.

4.1.5. Cepas

Se utilizaron diferentes cepas de *E. coli* que se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Genotipo de cepas de *E. coli* utilizadas.

Cepa	Genotipo
DH5α	<i>fhuA2</i> Δ (<i>argF lacZ</i>) <i>UI69</i> <i>phoA</i> <i>glnV44</i> Φ 80 Δ (<i>lacZ</i>) <i>M15</i> <i>gyrA96</i> <i>recA1</i> <i>relA1</i> <i>endA1</i> <i>thi</i> ⁻¹ <i>hsdR17</i>
C41	Derivada de BL21(DE3) con al menos una mutación que le permite la expresión de proteínas tóxicas para <i>E. coli</i> .
Rosetta 2	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hds</i> _B (<i>r</i> _B ⁻ <i>m</i> _B ⁻) <i>gal dcm</i> pRARE2. Esta cepa contiene los tRNAs para 7 codones de uso raro en <i>E. coli</i> (AGA, AGG, AUA, CUA, GGA, CCC, y CGG).
W3110	F ⁻ λ <i>rph-1</i> INV(<i>rrnD</i> , <i>rrnE</i>)

4.1.6. Equipos

Las mediciones espectrofotométricas se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo Lambda 25. Durante los ensayos la temperatura se mantuvo constante a 25°C con un Peltier. Las mediciones de HPLC se llevaron a cabo en un equipo Perkin Elmer equipado con una bomba Serie 200 y un detector UV de arreglo de diodos 235 C. Los datos se procesaron con el software Turbochrom (Perkin Elmer). Se utilizó la columna analítica C-18 (250 mm x 4 mm, 5 μ m) Nucleosil (Macherey-Nagel), y para los análisis de permeación en gel se utilizó una columna Phenogel 10⁵Å (300 mm x 7.8 mm, 5 μ m) (Phenomenex).

Para el análisis de los productos de reacción se utilizó un cromatógrafo de gases (GC; Agilent, modelo 6890 *Network*) acoplado a un espectrómetro de masas (MS; Agilent, modelo 5973 *Network*). Se utilizó una columna capilar SPB-20 (30 m x 0.25 mm) (Supelco).

Los análisis de fluorescencia se llevaron a cabo en un espectrofluorómetro Aminco SLM 8000 actualizado con Olis.

Para las reacciones de PCR se utilizó un termociclador MyCycler™ (Biorad).

Para los análisis de PCR tiempo real se utilizó un StepOne Real Time PCR (Applied Biosystems) de 48 pozos.

4.2. Métodos

4.2.1. Caracterización de la lacasa

Las preparaciones enzimáticas fueron analizadas por electroforesis en un gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 10%. El contenido de proteína en las preparaciones de lacasa fue determinado por el método de Bio-Rad utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. La actividad de la lacasa se determinó espectrofotométricamente utilizando los sustratos siringaldazina 0.5 mM ($\epsilon_{530} = 64,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (95) en amortiguador de acetatos 100 mM (pH 4.5). Para determinar la actividad de lacasa durante la inmovilización se midió como la desaparición de sustrato utilizando siringaldehído 0.1 mM ($\epsilon_{320} = 8,500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (96) en amortiguador de acetatos 100 mM (pH 4.5). Una unidad de enzima fue definida como la cantidad de enzima que oxida 1 μmol de sustrato por minuto.

4.2.2. Transformación enzimática de los DE

La transformación enzimática de los DE se llevó a cabo en tubos de ensaye de 13 x 100 mm en amortiguador de acetatos 100 mM pH 4.5. Para mejorar la solubilidad de los sustratos en el medio de reacción a las concentraciones que fue necesario utilizar (50-1000 μM), se agregó 25% de ACN para el NP, TCS y el E2, y 5% para el BPA. Las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente (20-25°C), y se agitaron al inicio de la reacción para asegurar una buena oxigenación del medio de reacción.

La transformación de los DE fue analizada por HPLC después de 5 min de reacción, tiempo en el cual las reacciones se mantienen en velocidad inicial. Para el NP la elución se realizó con un gradiente lineal de agua:ACN iniciando con 65% de ACN y se aumentó a 100% de ACN en 8 min; en 1 min se regresó a 65% de ACN y se mantuvo por 6 min. Para el BPA la elución se realizó con un gradiente lineal agua:ACN iniciando con 30% ACN por 2 min y se aumentó a 60% en 10 min; se mantuvo por 1 min y en 1 min se regresó a 30% ACN y se mantuvo por 7 min. Para el E2, la elución se realizó con un gradiente lineal agua:ACN iniciando con 35% ACN por 2 min y se aumentó a 70% en 10 min; se mantuvo por 1 min y en 1 min se regresó a 30% ACN y se mantuvo por 7 min. Para el TCS, la elución se realizó con un gradiente lineal agua:ACN iniciando con 50% ACN por 2 min y se aumentó a 100% en 8 min; se mantuvo por 1 min y en 1 min se regresó a 50% ACN y se

mantuvo por 7 min. La transformación de los DE se calculó como el decremento en el área del pico observado tomando como 100% el área observada antes de la transformación. Las longitudes de onda de absorbancia utilizadas se enlistan en la Tabla 3.

Tabla 3. Longitudes de onda utilizadas para el monitoreo de las reacciones de transformación.

Compuesto	Longitud de onda (nm)
E2	220
BPA	225
NP	230
TCS	230

Para analizar la transformación del β -sitoesterol, las reacciones se llevaron a cabo en amortiguador de acetatos 100 mM pH 4.5 con 40% de THF. Los productos de las reacciones se extrajeron con hexano y se analizaron por GC utilizando n-docosano como estándar interno.

Los valores de actividad fueron reportados como micromoles de sustrato transformados por minuto por miligramo de proteína ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$) y se reporta el promedio de al menos 3 réplicas independientes. Los parámetros cinéticos k_{cat} y K_M se determinaron utilizando el programa computacional EnzFitter (Biosoft, Cambridge, UK).

4.2.3. Identificación de los productos de transformación

Para determinar la naturaleza química de los productos de transformación de E2, BPA, NP, y TCS, el sistema de reacción se escaló a un volumen de 100 mL y la desaparición del sustrato fue monitoreada por HPLC. Las concentraciones iniciales de sustrato fueron de 0.5 mM para TCS y NP y de 1 mM de BPA y E2. Como control, se pusieron las mismas condiciones de reacción sin agregar enzima, en los cuales no se observaron cambios en la concentración ni formación de precipitados. Se procedió separar los productos cuando la totalidad del NP y TCS fueron transformados, y en el caso del E2 y BPA, cuando se alcanzó el equilibrio. El medio de reacción se centrifugó para recuperar el precipitado formado, el cual fue disuelto en THF. El sobrenadante se colocó en un embudo de

separación, se acidificó con 100 μL de ácido sulfúrico concentrado y se agregó acetato de etilo para hacer la extracción. El acetato de etilo se hizo pasar por una cama de sulfato de sodio anhidro para eliminar el agua. La mayor parte del disolvente se eliminó por evaporación con vacío y se terminó de concentrar bajo flujo de nitrógeno. Una vez secas, las muestras se disolvieron en acetato de etilo y fueron analizadas por GC. Se utilizó un gradiente lineal iniciando a 80°C por 6 min; se aumentó a 280°C a razón de 15°C min^{-1} y se mantuvo por 5 min. Los compuestos fueron identificados por espectrometría de masas (MS).

Para caracterizar el peso molecular de los productos recuperados por centrifugación, se hizo un análisis por cromatografía de permeación en gel. La muestra fue eluída con 100% THF a 1 mL min^{-1} . Los compuestos fueron monitoreados a 250 nm. Para la calibración se utilizaron estándares de polivinilo de 2.5, 9, 17.5 y 50 kDa.

4.2.4. Clonación de zfER α LBD

Dado que se trata de un sistema eucarionte superior, el receptor de estrógenos de pez cebra contiene varios intrones, por lo que es más fácil obtener la región codificante a partir del mRNA. El RNA total de pez cebra adulto fue donado por la Dra. Denhi Schnabel Peraza.

4.2.4.1. Síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA se incubaron 6.6 μg de RNA total con 10 nmoles de dNTPs y 40 nmoles de oligo dT en 12 μL de reacción. Después la reacción se llevó a 20 μL en 1X de solución amortiguadora de la primera cadena (Buffer First Strand, Invitrogen), 10 mM DTT, 200 U de transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen) y 40 U de inhibidor de RNAsa (Invitrogen). La reacción se incubó a 37°C por 50 min, luego a 70°C por 15 min y por último a 4°C por 10 min.

4.2.4.2. Amplificación del gen zfER α

Para la obtención de zfER α , se llevaron a cabo reacciones de PCR en 50 μL de solución amortiguadora de alta fidelidad conteniendo 0.2 mM de dNTPs, 2 mM de MgSO_4 ,

25 pmoles de cada oligo específico (Drcds5F y Drcds3R, Tabla 1), 2 μ L de cDNA, y 2.5 U de Platinum Taq polimerasa de alta fidelidad. La reacción se llevó a cabo con un gradiente de temperatura de acuerdo al siguiente programa:

No. Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	94	2
30	94	0.5
	70	0.5
	68	2
1	68	7

El producto obtenido se purificó utilizando las soluciones y columnas de Roche[®] (High Pure PCR Product purification kit) y se subclonó en el vector TOPO-TA[®] (Invitrogen) de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Se mezclaron 2 μ L del vector TOPO-TA[®] ligado con 60 μ L de células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α y se pasaron a una celda de 0.1 cm donde se les dio un choque eléctrico de 1.8 V. Las células se recuperaron en 500 μ L de medio SOC y se incubaron a 37°C por 1 h. Se plaquearon 100 μ L de medio en cajas LB_{amp} suplementadas con X-Gal e IPTG para permitir la selección de las colonias que tuvieran el vector. Las placas se incubaron durante 16 h y se hizo la selección de las colonias de color blanco. Se verificó la presencia del inserto por una reacción de PCR de colonia. Brevemente, se tomó una colonia con un palillo y se diluyó en 10 μ L de agua destilada estéril. Se tomaron 5 μ L de esta solución como DNA templado y se hicieron reacciones de PCR en un volumen final de 25 μ L. Se crecieron 5 colonias que resultaron positivas para el inserto y se purificó el plásmido por lisis alcalina (Roche). Se mandaron a secuenciar en la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM utilizando los oligonucleótidos M13F y M13R (Tabla 1).

4.2.4.3. Amplificación del dominio zfER α LBD

El plásmido TOPO-TA[®] conteniendo el gen zfER α fue utilizado como templado para la obtención del zfER α LBD. La reacción de PCR se llevó a cabo 50 μ L de solución amortiguadora de alta fidelidad, 0.2 mM de dNTPs, 2 mM de MgSO₄, 25 pmoles de cada oligonucleótido específico (DrNheI5F, DrBamHI3R, Tabla 1), 2 μ L de plásmido

purificado, y 2.5 U de Platinum Taq polimerasa de alta fidelidad. La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando el siguiente programa:

No. Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	94	2
5	94	0.5
	55	0.5
	68	1
25	94	0.5
	70	0.5
	68	1
1	68	10

El producto de PCR fue purificado y subclonado en el vector TOPO-TA[®], y se transformó en células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α . Se plaquearon 100 μ L de medio en cajas LB_{amp} suplementadas con X-Gal e IPTG para permitir la selección de las colonias que tuvieran el vector. Las placas se incubaron durante 16 h y se hizo la selección de las colonias de color blanco. Se verificó la presencia del inserto por una reacción de PCR de colonia. Se crecieron 5 colonias que resultaron positivas para el inserto y se purificó el plásmido por lisis alcalina (Roche). Se mandaron a secuenciar en la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM utilizando los oligonucleótidos M13F y M13R (Tabla 1).

4.2.4.4. Digestión enzimática

El plásmido purificado que contenía el inserto correcto de zfER α LBD, fue primeramente digerido con 30 U de enzima NheI (Fermentas) en solución amortiguadora indicada por el proveedor (Buffer Tango). El volumen de reacción se llevó a 50 μ L y se incubó a 37°C por 16 h. El fragmento digerido fue purificado para su posterior digestión con 30 U de enzima BamHI (Fermentas) en solución amortiguadora indicada por el proveedor (Buffer BamHI). El volumen de reacción se llevó a 30 μ L y se incubó a 37°C por 5 h. La digestión se corrió en un gel de agarosa grado DNA (Bio-Rad[®]) al 1% en

solución amortiguadora TAE. Se cortó la banda correspondiente a 900 pb y se hizo la extracción de DNA del gel de agarosa utilizando soluciones y columnas de Roche (High Pure PCR Product Purification Kit). Se recuperaron 15 μL de producto con una concentración de 4.2 ng μL^{-1} .

El vector pET-28b fue digerido y purificado de la misma manera que el zfER α LBD, recuperando 15 μL de producto con una concentración de 22.5 ng μL^{-1} .

4.2.4.5. Ligación

El dominio zfER α LBD se ligó con el vector pET-28b utilizando 400 U de T4-DNA ligasa (New England Biolabs) en la solución amortiguadora indicada por el proveedor. Se utilizó una relación molar vector:inserto de 1:5. La reacción se incubó a 25°C por 30 min y se guardó a 4°C.

Se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α con el vector ligado. Se plaquearon 100 μL de medio en cajas LB_{kan}. Las placas se incubaron durante 16 h. Se verificó la presencia del inserto por una reacción de PCR de colonia. Se crecieron 5 colonias que resultaron positivas para el inserto y se purificó el plásmido por lisis alcalina (Roche). Se mandaron a secuenciar en la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM utilizando los oligonucleótidos T7F y T7Terminator (Tabla 1).

4.2.5. Expresión de zfER α LBD

El plásmido conteniendo el inserto correcto y en fase, se utilizó para transformar las cepas de *E. coli*. C41, Rosetta 2 y W3110 (Tabla 2). En cada caso, se utilizaron 60 μL de células quimiocompetentes y 3 μL de la construcción. La mezcla se mantuvo en hielo durante 30 min. Se procedió a dar un choque térmico de 42°C durante 2 min y se colocaron en hielo durante al menos 1 min. Las células fueron resuspendidas en 1 mL de medio SOC e incubadas a 37°C por 1 hora. Se plaquearon 100 μL de cultivo en medio LB_{kan} y se incubaron a 37°C por 16 h.

Para el análisis de la expresión de zfER α LBD, se seleccionó una colonia de la placa para inocular 3 mL de medio LB_{kan}. El cultivo se incubó a 37°C y 200 rpm durante 16 h. El cultivo se utilizó para inocular 50 mL de medio LB_{kan}. Se incubaron a 37°C y 200 rpm hasta alcanzar una absorbancia de 0.5. En este punto los cultivos se indujeron con diferentes concentraciones de IPTG y se dejaron crecer a diferentes temperaturas y tiempos, dependiendo del tratamiento.

Las células se recuperaron centrifugando el cultivo a 4°C y 6,000 g por 10 min. Las células se resuspendieron en 10 volúmenes de solución amortiguadora de fosfatos 20 mM pH 8 suplementada con 0.5 mM de NaCl y 5 mM de imidazol. Se agregó inhibidor de proteasas Complete (Roche) y lisozima (10 mg mL⁻¹). Las células se rompieron por sonicación en 5 ciclos alternados de 2 minutos (10 s de pulso con 10 s de descanso). Los restos celulares fueron removidos centrifugando a 4°C por 20 minutos a 20,000 g. El sobrenadante se filtró utilizando una membrana de nitrocelulosa de 0.22 μ m.

4.2.6. Purificación de zfER α LBD

La purificación se llevó a cabo en un sistema de cromatografía atmosférica EconoSystem de Bio-Rad utilizando una columna HisTrap (GE Healthcare) de 5 mL cargada con níquel. Se utilizaron dos soluciones amortiguadoras:

Solución amortiguadora de unión	20 mM fosfatos de sodio 500 mM NaCl 5 mM imidazol pH 8
Solución amortiguadora de elución	20 mM fosfatos de sodio 500 mM NaCl 500 mM imidazol pH 8

La columna se equilibró con 10 volúmenes de solución amortiguadora de unión con un flujo de 3 mL min⁻¹. El extracto proteico total se hace pasar 3 veces por la columna con un flujo de 1 mL min⁻¹. Utilizando un flujo de 2 mL min⁻¹ se lavó con 5 volúmenes de columna de solución amortiguadora de unión para eluir las proteínas de pegado

inespecífico. La elución se llevó a cabo por lotes con concentraciones conocidas de imidazol con 3 a 4 volúmenes de columna y un flujo de 2 mL min⁻¹. Las fracciones colectadas fueron analizadas por SDS-PAGE.

4.2.7. Interacción de los DE y sus productos de transformación con el ER α de pez cebra

Para estudiar la actividad estrogénica de los distintos DE antes y después de su transformación, se estudió la unión de estos compuestos al ER α . Los ensayos de unión al receptor *in vitro* se hicieron con el kit Estrogen Receptor Competitor Assay, Red de Panvera (P3029), siguiendo las instrucciones del proveedor. Posteriormente el método fue modificado utilizando al cumestrol como fluoróforo (68). La reacción de unión se llevó a cabo en solución amortiguadora de ligación que contiene 10 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 1.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 10% glicerol, y 0.4 g L⁻¹ de agente bloqueador (gelatina), pH 7.4. Para facilitar la solubilidad de los diferentes compuestos en la mezcla, se utilizó 2% de DMSO, solvente que no afecta la estabilidad de la proteína durante el ensayo.

En un volumen final de 60 μ L se colocó el ER α correspondiente en solución amortiguadora de ligación a una concentración final de 100 nM, el DE a concentraciones variables dependiendo del compuesto (entre 10 pM y 50 μ M), y finalmente el cumestrol 10 nM. Las muestras se incubaron a 25°C durante 12 h. Como controles, se incubaron en las mismas condiciones un solución conteniendo sólo cumestrol y otra conteniendo sólo el cumestrol y el ER α . Los valores de fluorescencia fueron medidos en una celda de cuarzo utilizando un espectrofluorómetro Aminco SLM 8000 actualizado con Olis (Bogart, GA, USA), a 355 nm de excitación y 405 nm de emisión (68). Cada punto de medición de anisotropía fue hecho por triplicado. Los datos obtenidos se ajustaron a la ecuación:

$$r = m_{100} + \frac{m_0 - m_{100}}{1 + 10^{(\log IC_{50} - x) \cdot HS}}$$

donde r = anisotropía, x = log [DE], m₁₀₀ = 100% unión (todo el cumestrol es desplazado), m₀ = 0% unión (todo el cumestrol está unido al ER α), HS = Hillslope. El ajuste a la curva

se llevó a cabo en el programa Origin[®] de Origin Lab Corporation. Dado que la afinidad de unión medida es dependiente de la afinidad del cumestrol al ER α , los valores de IC₅₀ se refieren como IC₅₀ relativa. La afinidad relativa (Relative binding affinity, RBA) se calculó como previamente reportado (68):

$$RBA = \frac{IC_{50}(E2)}{IC_{50}(DE)} \times 100\%$$

4.2.8. Inmovilización de la lacasa

Para facilitar la reutilización de la lacasa en sistemas de acuicultura, la enzima fue inmovilizada en un soporte inerte. Se exploró el uso de diferentes soportes para la inmovilización covalente, así como un método de copolimerización de la enzima en espuma de poliuretano.

Para la copolimerización de la lacasa en espuma de poliuretano se siguió el protocolo reportado por Bakker y colaboradores (97). Se mezclaron 900 μ L de una solución de enzima conteniendo 1 mg de lacasa en solución amortiguadora de fosfatos 60 mM, pH 6 con 100 μ L de Brij-52 (solución al 4% w/v en *tert*-butanol), y 37.5 μ L de cloruro de cobalto (1 mM en agua). Esta solución se mezcló con 1 g del prepolímero HYPOL 2002. La mezcla se mantuvo en agitación durante 1 min a temperatura ambiente y luego se mantuvo en hielo hasta que se detuvo el aumento de volumen. La espuma se almacenó a 4°C durante al menos 2 h antes de ser usada. La espuma se lavó con solución amortiguadora de fosfatos 60 mM, pH 6, hasta que no se detectó actividad lacasa en los lavados. Después, la espuma se congeló con nitrógeno líquido, se trituró y liofilizó.

También se probó al nylon como soporte siguiendo el protocolo general de inmovilización propuesto por Isgrove y colaboradores (98). El principio general consiste en la hidrólisis ácida parcial del nylon para la liberación de grupos amino a los cuales se une un compuesto con dos grupos aldehído libres, uno de los cuales se une al grupo amino del nylon y el otro queda libre para la formación de enlaces covalentes con los grupos amino de la proteína. También se probó la inmovilización en nylon previamente tratado con cloruro de calcio, siguiendo el protocolo de Vázquez-Duhalt y colaboradores (99).

Las resinas epóxicas son una opción atractiva para la inmovilización, debido a que los grupos epóxicos son capaces de reaccionar con diferentes grupos nucleofílicos presentes en la superficie de la proteína (grupos amino, hidroxilo o tiol) para formar enlaces covalentes fuertes (enlaces amino secundarios, enlaces éter y tioéter) (100). Para la inmovilización, la resina activada con grupos epóxicos se puso en contacto por 12 h con la enzima en solución amortiguadora de fosfatos 100 mM pH 8 a 4°C y con agitación constante.

También se probó la inmovilización en sefarosa (agarosa entrecruzada) activada con bromuro de cianógeno según el protocolo reportado por Kaddour y colaboradores (101).

4.2.9. Tratamiento *in vivo* de pez cebra con DE

Peces cebra (*Danio rerio*) saludables de 43 dpf se compraron en una granja de peces local (Granja Acuario Antártico, Cuernavaca, México). Los peces se aclimataron en peceras de vidrio de 18 L a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por dos días con un fotoperiodo de 12 h de luz / 12 h de oscuridad y fueron alimentados dos veces al día con alimento comercial (Tetramin para peces tropicales). Se utilizó agua potable tratada con tiosulfato de sodio para eliminar el cloro residual.

En experimentos previos, se determinó la concentración a la que el DE correspondiente indujo la expresión de la Vtg1 seleccionando las concentraciones de NP 10 nM, E2 100 nM, TCS 1 μM , y BPA 10 μM . Para facilitar la solubilidad de los compuestos, el agua contenía 1% de DMSO.

Para determinar el efecto de los productos de transformación por acción de la lacasa, se utilizaron concentraciones equivalentes del DE transformado por la lacasa. El tratamiento del agua conteniendo las concentraciones correspondientes del DE se logró haciendo pasar una corriente de agua a un flujo de 5 mL min^{-1} utilizando una bomba peristáltica a través de una columna (2.5 x 15 cm) empacada con lacasa copolimerizada en espuma de poliuretano (1.5 U). El sistema fue operado a presión ambiental. El agua no fue recirculada en este sistema. Como control se utilizaron peces expuestos a agua con 1% de DMSO.

Todos los peces fueron expuestos por 7 días a los tratamientos antes descritos bajo condiciones semi-estáticas, cambiando el 50% del agua tres veces durante el experimento manteniendo constante la concentración del contaminante. Los tratamientos se hicieron en

frascos de vidrio conteniendo 700 mL de la solución correspondiente. Para mantener la temperatura constante durante el experimento, los frascos se colocaron en un baño de agua conteniendo agua a $27 \pm 2^\circ\text{C}$. Después del tratamiento, los peces se anestesiaron en agua con hielo. Una vez inmóviles, se colocaron en hielo seco y posteriormente se almacenaron a -80°C hasta que las muestras fueron analizadas. Se hicieron tres réplicas independientes para cada tratamiento.

4.2.10. Cuantificación de expresión génica por PCR en tiempo real

Para determinar el grado de inducción del gen de la Vtg1, se analizó la expresión del gen en cada uno de los tratamientos utilizando la técnica de PCR en tiempo real cuantitativo.

4.2.10.1. Aislamiento de RNA y retrotranscripción

Los peces completos fueron triturados en nitrógeno líquido. El tejido se homogenizó en 250 μL de TRI Reagent (Sigma, Estados Unidos). El RNA total fue aislado de acuerdo a las especificaciones del proveedor. La proporción de absorbancia 260/280 nm fue medida en un Nanodrop. Los patrones de bandas en un gel de agarosa al 1% se utilizaron para verificar la integridad del RNA de cada muestra. Un μg de RNA total fue tratado con DNAsaI, libre de RNasa (Fermentas, Estados Unidos) de acuerdo a las especificaciones del proveedor. La retro transcripción se llevó a cabo con el sistema SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Estados Unidos). Finalmente, las muestras se diluyeron 1:500 y de aquí se tomó 1 μL para las reacciones de PCR tiempo real cuantitativo.

4.2.10.2. PCR cuantitativo

Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo en un volumen final de 10 μL utilizando Maxima SYBR Green /ROX qPCR Master Mix (2X) (Fermentas, USA). Se utilizaron los oligos correspondientes (Tabla 1) para amplificar la Vtg1 y el factor de elongación α 1 (elfa1) como gen de control endógeno para eliminar las variaciones en la cantidad de mRNA y cDNA utilizados, dado que se sabe que la expresión de este gen no cambia durante los tratamientos (102).

El protocolo de PCR consistió en 10 min de desnaturalización a 95°C, seguido por 40 ciclos de 15 s a 95°C y 1 min a 60°C. La cuantificación de la expresión génica relativa entre los tratamientos fue analizado por el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Los resultados fueron analizados estadísticamente por ANOVA utilizando el programa Microsoft Excel 2007 haciendo una comparación de medias con un nivel de confianza del 5%.

5. Resultados y discusión

5.1. Caracterización de la lacasa de *Coriopsis gallica*

La lacasa fue producida y purificada en el laboratorio. Como se puede observar en la Figura 7, la proteína más abundante tiene un peso molecular aproximado de 62 kDa. La diferencia con el peso reportado previamente (66 kDa) se puede deber a variaciones en la glicosilación de la proteína. También se aprecia la presencia de otra proteína de aproximadamente 48 kDa. La imagen fue analizada utilizando el programa Image J (National Institutes of Health, USA) y se determinó que la proteína contaminante representa el 8.3% por lo que la mayor parte de la proteína es lacasa.

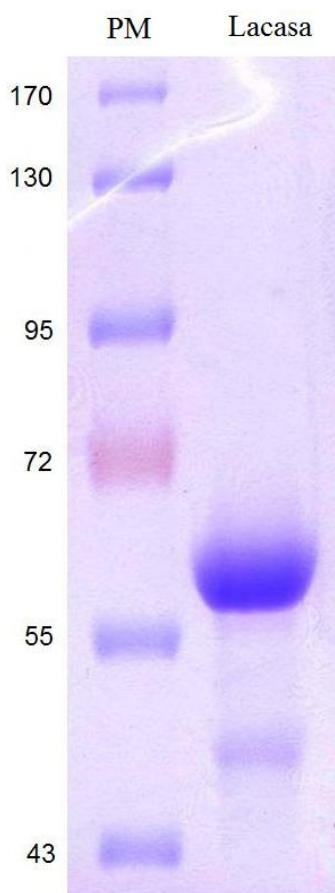


Figura 7. Análisis por SDS-PAGE de la lacasa de *C. gallica* UAMH 8260.

5.2. Transformación de DE por la lacasa de *C. gallica*

Los DE E2, BPA, NP y TCS fueron sustrato para la lacasa de *C. gallica*. El β -sitoesterol no fue sustrato para la lacasa, probablemente debido a que se trata de un hidroxicicloalcano, los cuales tienen potenciales de ionización significativamente superiores a los compuestos fenólicos (103), y por lo tanto la lacasa no es capaz de transformarlos. Además, es un compuesto lipofílico que para lograr su solubilidad en el medio de reacción, fue necesario utilizar 40% de THF. Bajo estas condiciones la lacasa retiene menos del 20% de la actividad que tiene en ausencia de disolvente (datos no mostrados), desfavoreciendo la transformación de este compuesto. Previamente se ha reportado la transformación del β -sitoesterol por la lacasa, pero se requiere del uso de mediadores redox (104).

En la Figura 8 se muestra la gráfica de la actividad de transformación para los 4 DE. Se observa que el E2 es mejor sustrato para la lacasa, seguido del NP, el BPA y por último el TCS.

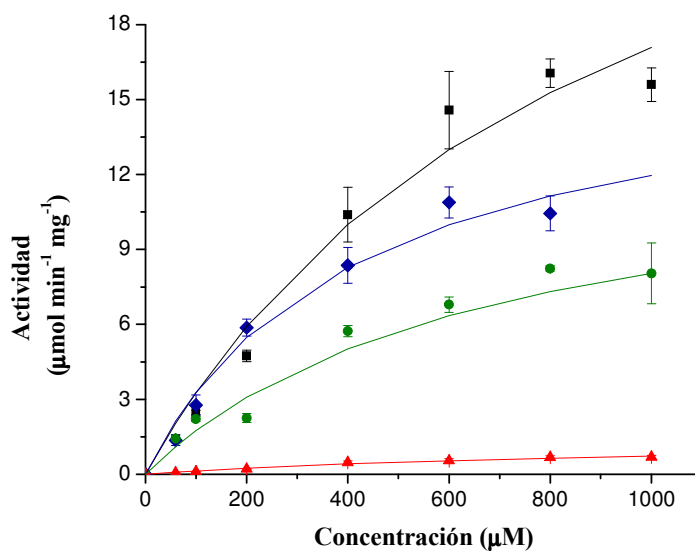


Figura 8. Actividad de transformación de los DE E2 (■), BPA (●), NP (◆), y TCS (▲) por acción de la lacasa de *C. gallica*.

Utilizando el programa Enzfitter, fue posible ajustar los datos de actividad a una cinética de Michaelis-Menten. El coeficiente de correlación del ajuste al modelo cinético y los parámetros cinéticos calculados se muestran en la Tabla 4. Para determinar el valor de la k_{cat} fue necesario considerar que la preparación enzimática utilizada contiene el 91.7% de lacasa que tiene un peso molecular reportado de 56.7 kDa determinado por MALDI-TOF.

Tabla 4. Parámetros cinéticos de la transformación de distintos DE por acción de la lacasa de *C. gallica*.

Sustrato	R²	K_M (mM)	v_{máx} ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	k_{cat} (s⁻¹)	k_{cat} / K_M (s⁻¹ mM⁻¹)
17β-estradiol	0.98	0.89	32.31	33.29	37.36
Bisfenol-A	0.97	0.67	13.45	13.86	20.68
Nonilfenol	0.98	0.42	16.98	17.49	42.16
Triclosán	0.99	0.97	1.43	1.49	1.537

Podemos observar que la lacasa de *C. gallica* es capaz de transformar a los DE E2, BPA y NP con eficiencias catalíticas similares. La k_{cat} para el E2 es 2.4 y 1.9 veces el valor de la k_{cat} para el BPA y el NP respectivamente; por estar en el mismo orden de magnitud, estas diferencias no son consideradas como significativas porque las concentraciones en las que se encuentran estos compuestos en el ambiente no alcanzan el orden de mM. Esta característica puede ser una ventaja, debido a que si en sistemas reales se encuentra una mezcla compleja de estos tres DE, la lacasa será capaz de eliminarlos con eficiencias similares. La actividad de transformación para el TCS es un orden de magnitud menor que para los otros DE. Analizando la estructura química de este compuesto (Figura 6), podemos observar que el grupo hidroxilo del anillo fenólico se encuentra en posición orto con respecto al enlace éter que une a los dos anillos. Esto puede generar un impedimento estérico provocando que la transferencia de electrones al cobre T1 de la lacasa sea más difícil que en el caso de los otros DE donde el grupo hidroxilo está más expuesto al medio.

Las lacasas de otros organismos también son capaces de transformar DE (33), pero desafortunadamente hay pocos datos cinéticos disponibles, ya que la mayoría de los trabajos reportan la transformación como porcentaje. Al comparar con algunos datos cinéticos reportados, la lacasa de *C. gallica* mostró ser cinco veces más eficiente en la transformación de E2 y BPA que la lacasa de *Trametes versicolor* y *Trametes villosa*, respectivamente, ambas lacasas de alto potencial redox que han resultado muy eficientes en la transformación de diferentes compuestos (79, 105). Cabana y colaboradores (106) reportaron la transformación de BPA y TCS por la lacasa de *Coriolopsis polyzona* con eficiencias catalíticas dos veces más altas que las obtenidas con la lacasa de *C. gallica*. Sin embargo, por estar en el mismo orden de magnitud, estas diferencias no son muy importantes. Además, la lacasa de *C. gallica* es de alto potencial redox y ha demostrado ser robusta en modelos de aplicaciones industriales como en la decoloración de efluentes textiles (107).

5.3. Identificación de productos de transformación

El sistema de reacción se escaló a 100 mL. Durante las reacciones se observó un aumento en la turbidez del medio para todos los DE. Estos compuestos insolubles se recuperaron por centrifugación, encontrando que para el E2 el precipitado representó el 86% del sustrato transformado, y para el TCS, se obtuvo el 93%. En ambos casos, la naturaleza no pudo ser determinada por espectrometría de masas.

El precipitado del NP representó el 100% del sustrato inicial. Se disolvió en ACN y fue analizado por GC (Figura 9). Entre el minuto 13.7 y 14.1 aparecen restos de NP que no fueron consumidos durante la reacción. Posteriormente se observa la presencia de varios compuestos, entre el minuto 18.2 y 20.1, y entre el minuto 23 y 27. Los espectros de masas para estos compuestos son iguales entre sí. El NP utilizado es una mezcla técnica, por lo que hay varios isómeros presentes y no se observa haya un solo pico definido aún para el sustrato. Por consiguiente, después de la reacción es posible que los diferentes picos correspondan a isómeros del mismo producto.

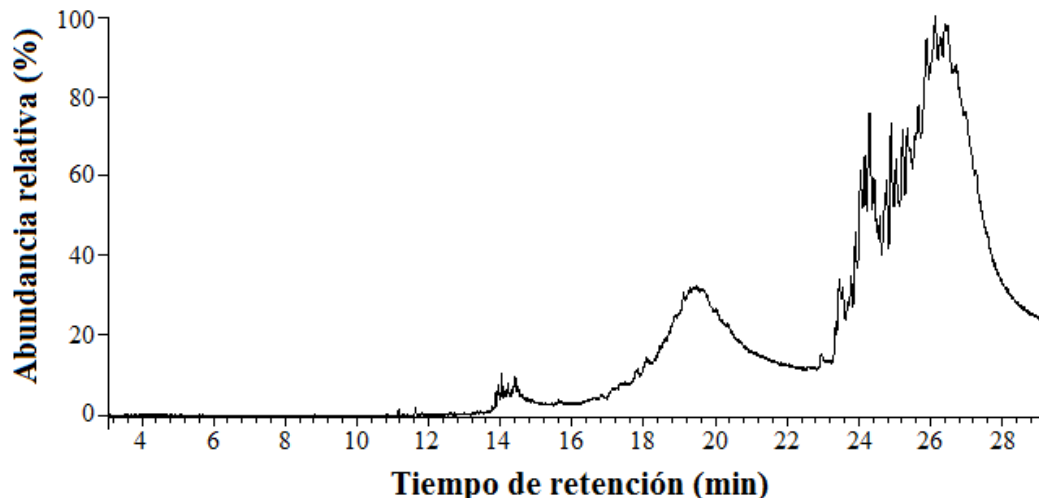


Figura 9. Precipitado de la reacción de transformación de NP analizado por GC.

En la Figura 10 se muestra el patrón de fragmentación obtenido para el producto del NP. El ión molecular es de 437 m/z , que resulta cuando el ión molecular ha perdido un protón. Los iones subsiguientes muestran la pérdida de 14 m/z que corresponden a la liberación de grupos CH_2 que se encuentran en la cola hidrofóbica del NP. También se observaron los iones de 134 m/z , 120 m/z y 107 m/z , que son característicos del NP. Este patrón indica que el producto identificado se trata de un dímero de NP que resulta de la unión de dos radicales que se forman por acción de la lacasa (Figura 11).

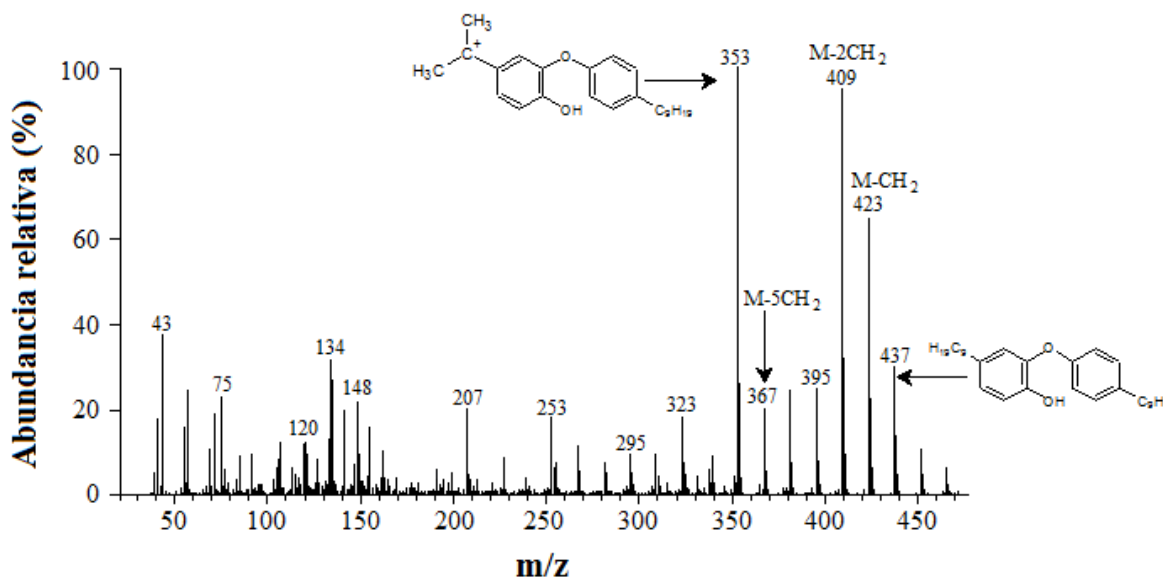


Figura 10. Patrón de fraccionamiento obtenido por espectrometría de masas del producto de transformación del NP.

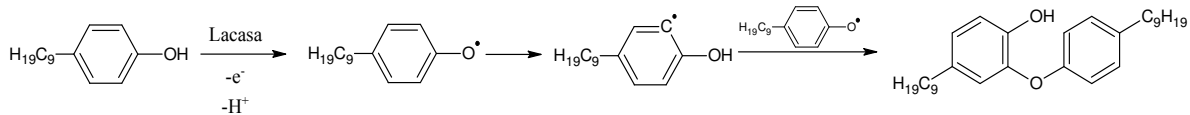


Figura 11. Mecanismo propuesto para la dimerización del NP por acción de la lacasa de *C. gallica*.

El precipitado del BPA representó el 85% en peso del BPA transformado. En el extracto del sobrenadante se lograron identificar dos productos (tiempo de retención de 12.2 min y 21.3 min), como se observa en la Figura 12.

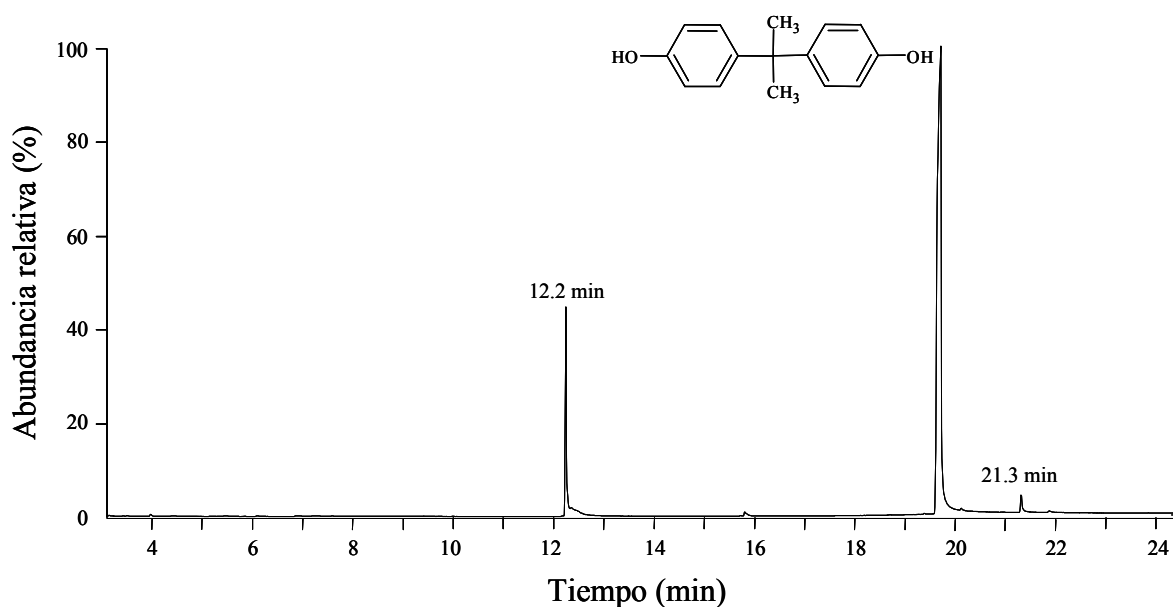


Figura 12. Extracto de la reacción de transformación de BPA analizado por GC.

En la Figura 13 se muestra el patrón de fragmentación para el producto con tiempo de retención de 12.2 min. El compuesto presentó un ión molecular de 134 m/z . La pérdida de un grupo metilo (15 m/z) da lugar a la formación de un fragmento de 119 m/z . La eliminación de un grupo hidroxilo (17 m/z) y un carbono (12 m/z) da lugar al fragmento de 105 m/z . La posterior pérdida de 14 m/z (grupo CH_2) da lugar al fragmento de 91 m/z , que

al perder un grupo metilo, se obtiene el fragmento de 77 unidades. Todas estas fragmentaciones se esquematizan sobre la estructura química de cada uno de los fragmentos formados. Este producto fue identificado como 4-isopropenilfenol.

En la Figura 14 se muestra el patrón de fragmentación para el producto con tiempo de retención de 21.3 min. El compuesto presentó un ión molecular de 268 m/z . La pérdida de un grupo metilo da lugar a la formación de un fragmento de 253 m/z . El fragmento de 135 m/z se obtiene cuando la molécula se rompe a la mitad. Aunque las dos partes de la molécula no son iguales, al darse un reacomodo electrónico, se obtienen dos fragmentos del mismo peso molecular. La eliminación de un grupo hidroxilo (17 m/z) y un carbono (12 m/z) da lugar al fragmento de 105 m/z . La posterior pérdida de 14 m/z (grupo CH_2) da lugar al fragmento de 91 m/z , que al perder un grupo metilo, se obtiene el fragmento de 77 unidades. Todas estas fragmentaciones se esquematizan sobre la estructura química de cada uno de los fragmentos formados.

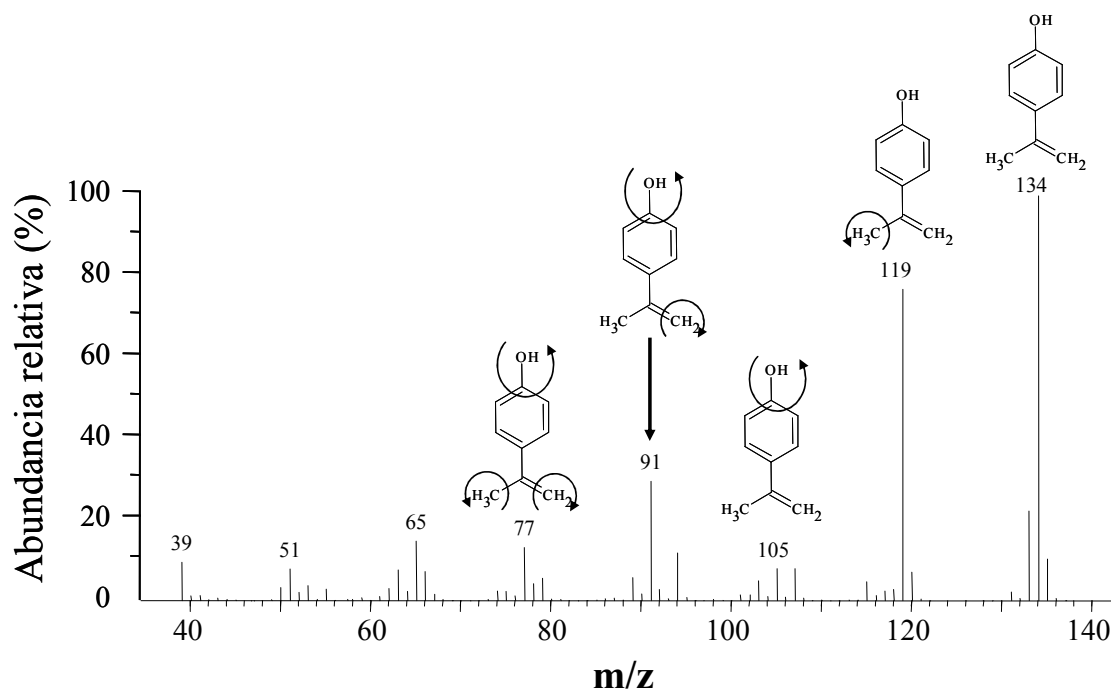


Figura 13. Estructura propuesta y patrón de fragmentación obtenido por espectrometría de masas del producto de transformación del BPA con tiempo de retención de 12.2 min.

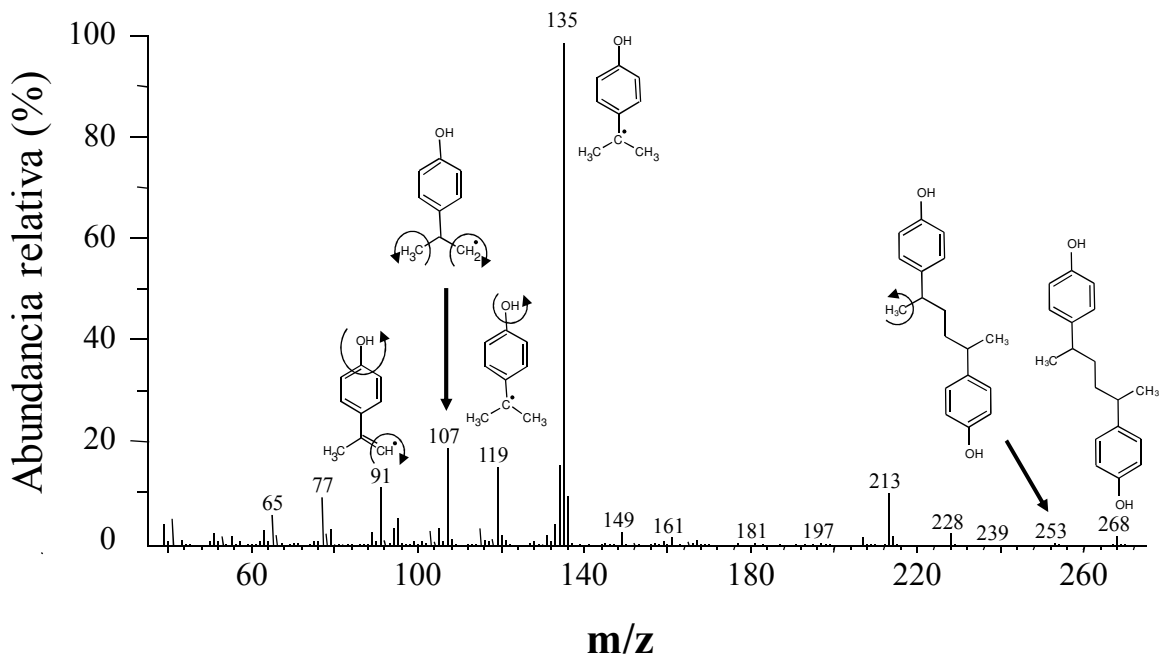


Figura 14. Estructura propuesta y patrón de fragmentación obtenido por espectrometría de masas del producto de transformación del BPA con tiempo de retención de 21.3 min.

En la Figura 15 se muestra el mecanismo propuesto para la oxidación del BPA. La lacasa sustrae un electrón del grupo fenólico del BPA y se libera un protón. Posteriormente el radical se localiza en el carbono en posición *para* donde es atacado por una molécula de agua lo que provoca el rompimiento de la molécula generando una hidroquinona y liberando un radical. Después de un reacomodo electrónico, el radical se ubica en el carbono secundario, y tras la liberación de un protón, se forma una doble ligadura dando lugar al 4-isopropenilfenol, el cual puede reaccionar con el radical generado en el paso anterior y dar lugar a un producto de 268 Da. Dai y colaboradores (108) reportaron la formación de 4-isopropenilfenol durante el proceso de elaboración de hidroquinona a partir de BPA utilizando métodos químicos. También a través del uso de una lacasa recombinante, Uchida y colaboradores (109) reportaron la formación de 4-isopropenilfenol.

El peso molecular de los precipitados obtenidos fue determinado por cromatografía de permeación en gel (Tabla 5). Tomando como 100% la suma de áreas observadas en los cromatogramas (Figura 16), se calculó la abundancia relativa para cada especie.

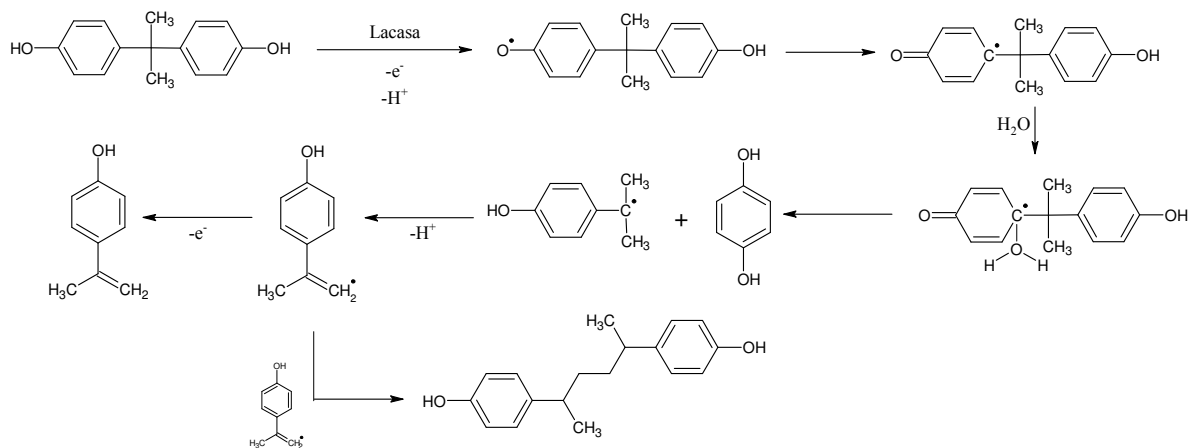


Figura 15. Mecanismo propuesto para la oxidación del BPA por acción de la lacasa de *C. gallica*.

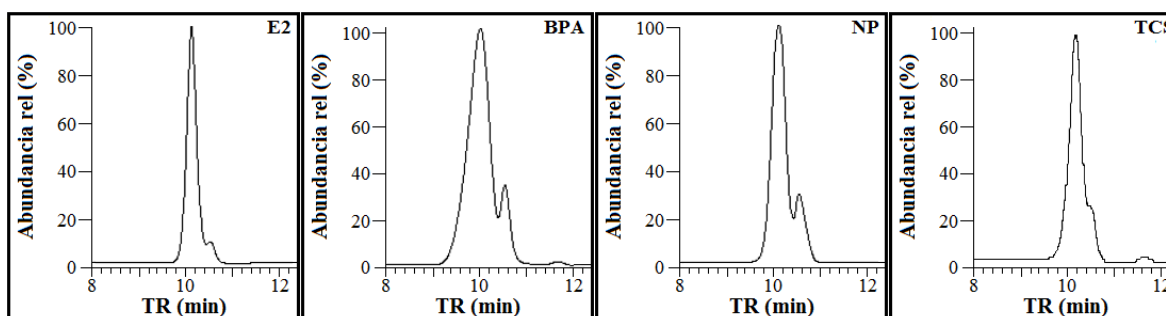


Figura 16. Cromatogramas obtenidos por GPC para la determinación de los pesos moleculares promedio de los productos del E2, BPA, NP y TCS por acción de la lacasa.

Tabla 5. Pesos moleculares promedio de los productos de transformación de los diferentes DE.

Compuesto	Peso molecular promedio del producto (kDa)	Número de monómeros	Abundancia relativa (%)
17 β -estradiol	1.6	5.9	96.3
	0.3	1.2	3.7
Bisfenol-A	2.4	10.4	87.1
	0.3	1.4	12.9
Nonilfenol	1.1	5.0	93.3
	0.3	1.5	6.7
Triclosán	1.3	4.5	88.1
	0.3	1.0	11.9

Para los diferentes DE se observó que los polímeros de más de 1 kDa representan más del 85% del producto, y que los productos que bajo peso molecular pueden corresponder al sustrato sin transformar. Para el NP el peso promedio es conformado por la presencia de un dímero y el NP sin transformar. En el caso del BPA puede tratarse de los compuestos ya identificados y un dímero con punto de ebullición superior a los 280°C. Uchida y colaboradores (109) previamente reportaron la formación de un dímero identificado como 5,5'-bis-[1-(4-hidroxifenil)-1-metil-1-etil]-bifenil-2,2'-diol; es posible que por acción de la lacasa de *C. gallica* se forme este mismo producto. Previamente se ha reportado la formación de polímeros de BPA por la lacasa recombinante de *Trametes villosa* (105). El compuesto de más alto peso molecular reportado correspondió a un hexámero, aunque el más abundante fue un tetrámero. Para estos productos se encontró una disminución en la actividad estrogénica. En nuestro caso encontramos la formación de compuestos de más alto peso molecular con una composición media equivalente a un decámero.

Después de la transformación por acción de la lacasa, se forman dímeros de BPA, E2, NP y TCS (106, 110). En este trabajo la estructura química de los polímeros no fue determinada, pero es de esperar que esté ampliamente distribuida dada la gran variedad de radicales libres que pueden ser formados durante la reacción (109). Es evidente que los productos más abundantes obtenidos son polímeros de alto peso molecular. Esto es una ventaja porque probablemente no puedan ser capaces de ingresar a los organismos, ni interactuar con el receptor de estrógenos, su principal blanco causante de la disrupción endócrina. Por otro lado, es interesante que los productos de transformación sean insolubles en el medio de reacción. Esto quiere decir que en el medio ambiente, estos productos podrían precipitar y estar menos biodisponibles. Para determinar si estos productos efectivamente han perdido la capacidad endócrina medida como su interacción con el ER α , es necesario medir la afinidad por los receptores aislados.

5.4. Clonación y expresión de zfER α LBD

La mayoría de los análisis acerca de la interacción de los DE con el ER α se han hecho con el receptor de humano, el cual se encuentra disponible comercialmente. Dado que

nuestro objetivo es eliminar la disrupción endócrina en peces, se seleccionó al pez cebra como organismo modelo. El receptor $zfER\alpha$ ha sido clonado y expresado en células CHO para estudios de la activación por esteroides (47). Sin embargo, no está disponible comercialmente.

Se clonó el gen completo de $zfER\alpha$ (1710 pb) utilizando como templado cDNA sintetizado a partir de mRNA de pez cebra macho adulto. Dado que el dominio correspondiente al sitio de unión a ligando es donde los DE se unen, fue esta sección la que se amplificó para los análisis de afinidad. El gen completo de $zfER\alpha$ se utilizó como templado para la obtención del $zfER\alpha$ LBD. En este fragmento (838 pb) se introdujeron dos sitios de restricción (NheI y BamHI) para su posterior clonación en el vector pET-28b, el cual presenta la ventaja de introducir 6 histidinas en el extremo amino terminal de la proteína (Figura 17).

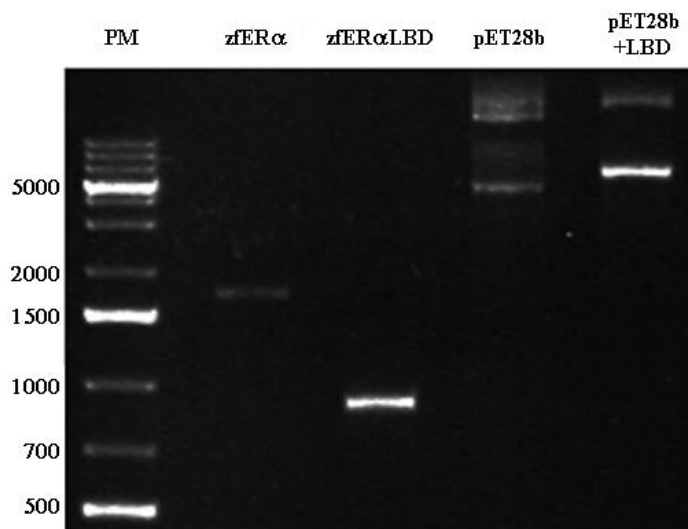


Figura 17. Diferentes pasos para la clonación de $zfER\alpha$ LBD en pET-28b.

Para la expresión de la proteína se utilizó la cepa C41, una derivada de BL21 DE3 que es capaz de expresar proteínas que resultan tóxicas para *E. coli*. La proteína se expresó a 25°C, temperatura óptima para la expresión del $ER\alpha$ LBD de humano en *E. coli* (111). En la Figura 18 se muestra el extracto total obtenido con dos concentraciones distintas de inductor a 4 h y 12 h después de la inducción; como control se utilizó el vector pET-28b vacío. El peso esperado de la proteína es de 35 kDa. Podemos observar que existe una

ligera sobreexpresión de una proteína alrededor del peso esperado al utilizar una concentración de 1 mM de IPTG.

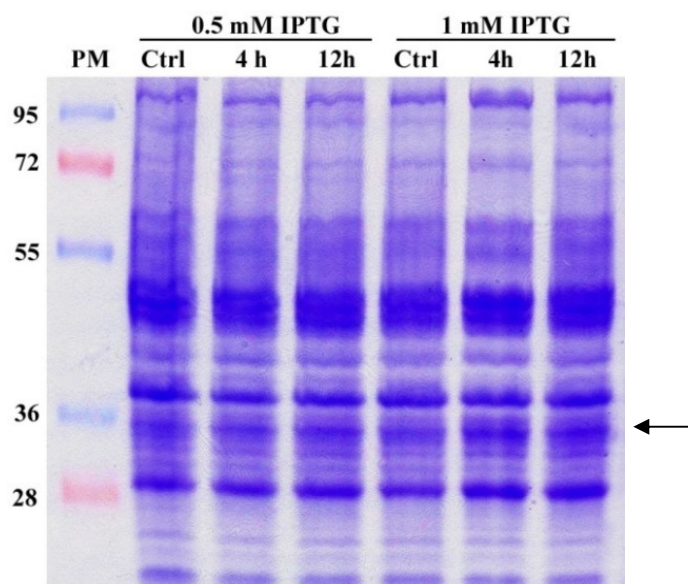


Figura 18. Expresión de zfER α LBD en *E. coli* C41 a diferentes concentraciones de IPTG.

La zfER α LBD es de un organismo eucarionte lo que puede representar varias dificultades al momento de expresarla en un organismo procarionte, como el uso de codones. De hecho, el 21% de los codones presentes en el fragmento son de baja expresión en la poza metabólica de *E. coli*. La cepa Rosetta 2 también derivada de BL21 DE3 contiene los tRNAs necesarios para transcribir siete codones de bajo uso en *E. coli* lo que puede aumentar la expresión de la proteína. Por otro lado, en la secuencia de nuestra proteína se encuentran 8 cisteínas lo que significa que es posible que para el correcto plegamiento de la proteína sea necesaria la formación de puentes disulfuro, lo cual representa una dificultad dentro del ambiente reductor de *E. coli*. La cepa W3110 es una derivada de K12, una cepa que se ha modificado para que se pueda dar la correcta formación de puentes disulfuro en *E. coli*. Por lo anterior, se probó la expresión de zfER α LBD en las cepas Rosetta 2 y W3110. En la Figura 19 se muestran tanto el extracto total como la fracción soluble para las diferentes cepas. Se observa que existen diferencias alrededor del peso esperado particularmente en el sobrenadante de Rosetta 2. Las diferentes fracciones se analizaron por Western blot (Figura 20).

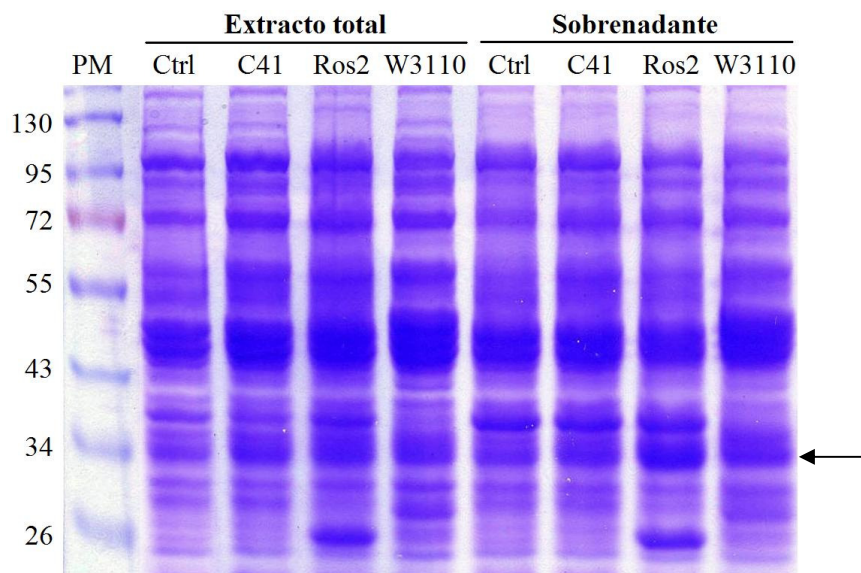


Figura 19. Expresión de zfER α LBD en diferentes cepas de *E. coli*.

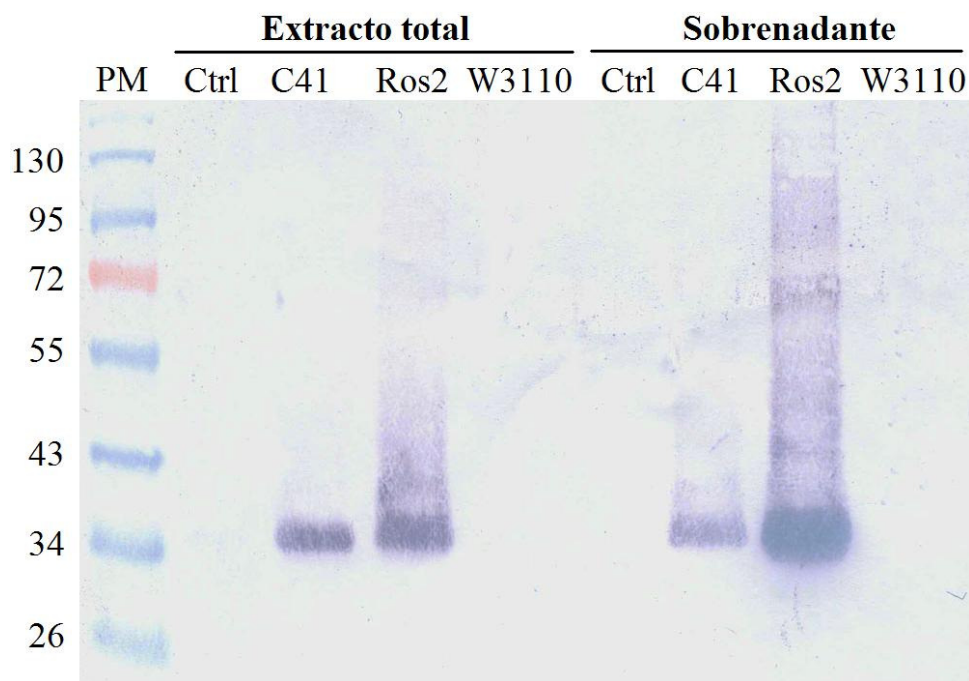


Figura 20. Western blot de la expresión de zfER α LBD en diferentes cepas de *E. coli*.

Las cepas C41 y Rosetta 2 fueron capaces de expresar la proteína; no se observa señal en el sobrenadante de W3110. Esto nos dice que la formación de puentes disulfuro no es el factor limitante más importante para el correcto plegamiento de la proteína, sino más bien

es el uso de codones. Además, al utilizar Rosetta 2 observamos que la proteína se encuentra en su mayoría en la fracción soluble por lo que esta cepa fue la seleccionada para los experimentos posteriores.

Se procedió a hacer la purificación utilizando una columna de afinidad. La elución de la proteína se hizo por lotes con incrementos del 20% de la solución amortiguadora de elución equivalente a 100 mM de imidazol. Las fracciones que contenían 300 mM y 400 mM tenían muy poca proteína por lo que no se muestran en la Figura 21. Podemos observar que en la fracción que no se unió a la columna (carril 2), hay un poco de proteína con el peso molecular correspondiente al zfER α LBD, pero como se vio anteriormente, *E. coli* produce una proteína del mismo peso molecular. El zfER α LBD fue eluído al utilizar 500 mM de imidazol.

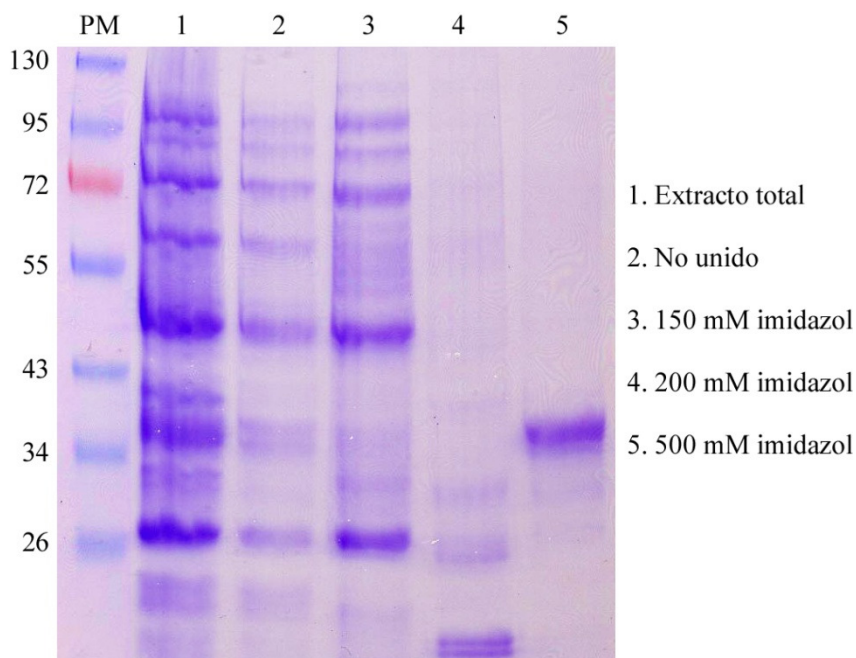


Figura 21. Análisis de diferentes pasos de purificación de zfER α LBD por cromatografía de afinidad.

Utilizando el software ImageJ fue posible determinar que la proteína tiene un 80% de pureza, porcentaje suficiente dado que Gurer-Orhan y colaboradores (68) reportan el uso de extracto parcialmente purificado en los ensayos de afinidad. La cantidad final de proteína

obtenida después de la purificación fue de 540 μg de 0.5 L de cultivo, lo cual considerando la pureza, da un rendimiento de 0.86 mg de zfER α LBD por litro de cultivo.

Al eliminar el imidazol de la muestra, la proteína se precipita por lo que se probó el almacenamiento con imidazol. Después de 3 días de almacenamiento a 4°C, de nuevo se observó un precipitado. Al agregar agentes estabilizantes, la proteína se mantuvo estable durante su almacenamiento a -80°C en una solución amortiguadora que contenía 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM KCl, 2mM DTT, 1 mM EDTA, 1mM ortovanadato de amonio, y 10% glicerol. La preparación almacenada tenía una concentración de 13.6 μM .

5.5. Interacción in-vitro de zfER α LBD con DE

Para determinar la afinidad tanto de los DE como de los productos de transformación por acción de la lacasa, se utilizó un kit comercial (Panvera). Al utilizar este método, la sensibilidad del equipo no fue suficiente y las señales obtenidas eran cercanas al ruido. Es por ello que se modificó el método cambiando al fluoróforo E2S por cumestrol. Se aumentó la concentración del fluoróforo y del ER α para poder obtener una señal más definida. Los valores obtenidos fueron graficados (Figura 22), con base en los cuales se determinó la IC₅₀ relativa de los diferentes DE (Tabla 6).

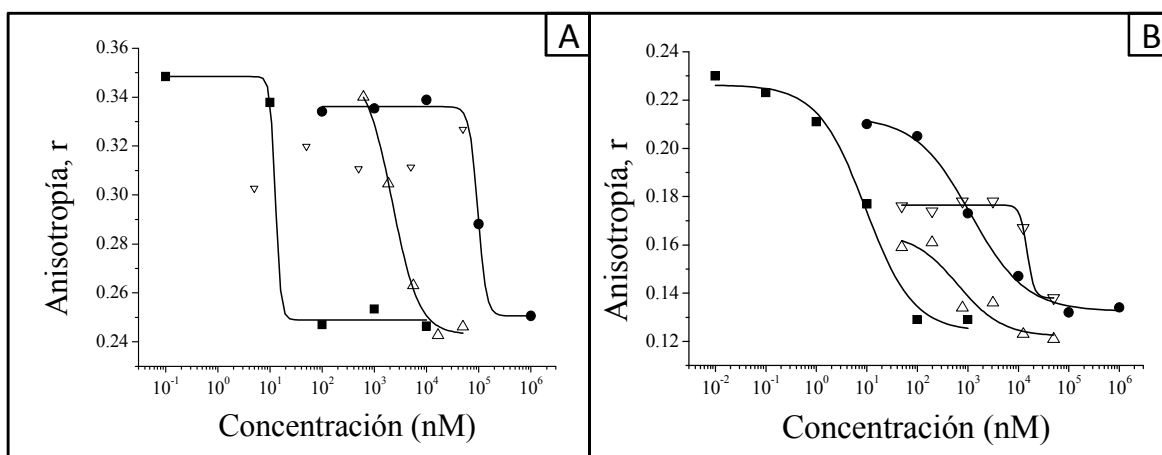


Figura 22. Curvas de unión competitiva obtenidas para el (A) hER α , y el (B) zfER α LBD con los DE (■) E2, (●) BPA, (△) NP, y (▽) TCS.

Tabla 6. IC₅₀ relativa de los diferentes DE con hER α y zfER α LBD.

Compuesto	hER α		zfER α LBD	
	IC ₅₀ relativa (μ M)	RBA ^a (%)	IC ₅₀ relativa (μ M)	RBA (%)
17B-estradiol	0.017	100	0.0094	100
Bisfenol-A	95.5	0.018	1.14	0.824
Nonilfenol	2.24	0.758	0.64	1.47
Triclosán	>50	-	19.3	0.049

^a RBA: afinidad de unión relativa.

Para el hER α , la afinidad obtenida para el BPA es un orden de magnitud menor al obtenido para el NP, siendo que previamente se ha reportado que el BPA tiene una afinidad similar o mayor que el NP (6, 11, 112). Estas diferencias se pueden deber principalmente al método que se está utilizando para determinar la afinidad (66). Es importante resaltar que la IC₅₀ relativa de los diferentes DE son mayores por el zfER α LBD que para el hER α . Esto nos podría indicar una mayor sensibilidad de los peces a los DE. Sin embargo, para poder hacer una comparación más directa, sería necesario hacer los estudios con el receptor completo de pez cebra, para descartar que estas diferencias se deban al uso de sólo un dominio de la proteína.

A las concentraciones probadas, el TCS no tuvo afinidad por el hER α . Esto se puede deber a que el grupo hidroxilo no se encuentra en posición *para* y por lo tanto está menos disponible para formar los enlaces de hidrógeno con los aminoácidos correspondientes. Para el hER α el E2 presentó una IC₅₀ relativa de 0.017 μ M. Este valor es uno y dos órdenes de magnitud por arriba de los valores reportados por Olsen y colaboradores (113) y Matthews y colaboradores(114), respectivamente (Tabla 7). De nuevo, las diferencias presentadas probablemente se deban al método de medición utilizado (66). Esto está validado por el hecho de que los valores obtenidos en este trabajo son más cercanos a los reportados por Gurer-Orhan y colaboradores (68), y por Parker y colaboradores (69), ambos utilizando el método de unión competitiva por fluorescencia.

Tabla 7. Afinidad de diferentes DE por el hER α .

Referencia	E2 IC ₅₀ (nM)	BPA RBA ^a (%)	NP RBA (%)	Método
Olsen y colaboradores (113)	1.8	0.32	0.020	Proliferación de células MCF-7
Nakai (115)	2.1		0.061	Unión competitiva por centelleo: proteína de fusión GST-ER α LBD -[³ H-E2]
Matthews y colaboradores (114)	0.2	0.008	-	Unión competitiva por centelleo: proteína de fusión GST-ER α -[³ H-E2]
Rider y colaboradores (116)	0.69	-	0.12	Unión competitiva por centelleo: lisado celular-[³ H-E2]
Parker y colaboradores (69)	5.6	-	-	Unión competitiva por fluorescencia: hER α -ES2
Gurer-Orhan y colaboradores (68)	26.4	0.13	0.62	Unión competitiva por fluorescencia: hER α LBD-cumestrol
Este trabajo	17	0.018	0.758	Unión competitiva por fluorescencia: hER α -cumestrol

^a RBA: afinidad de unión relativa.

Los valores que se han reportado de la IC₅₀ de E2 en peces son más homogéneos, siendo del mismo orden de magnitud incluso entre diferentes especies (Tabla 8). Sin embargo, los valores de afinidad para el BPA y el NP presentan diferencias de hasta tres o cuatro órdenes de magnitud, respectivamente. Es posible que los receptores presenten diferencias estructurales que causen las diferente capacidad de unión de los DE. Sin embargo, no es posible validar esto, dado que a la fecha no existen estructuras cristalográficas disponibles para ningún receptor de estrógenos de pez. Hasta ahora, lo más cercano son modelos por homología desarrollados para pez cebra (117). Los resultados muestran que la única diferencia entre el LBD de pez cebra y el de humano, es el cambio de L349M (Figura 3). Esto pudiera no parecer significativo, pero existen diferencias en las distancias calculadas entre los otros residuos clave para la unión del E2. Estas diferencias pudieran resultar más significativas cuando otro compuesto se encuentre en el sitio de unión. Otros trabajos también atribuyen a este cambio las diferencias en la sensibilidad entre peces y mamíferos (112), lo que coincide con lo encontrado en este trabajo.

Tabla 8. Valores de afinidad de diferentes DE en peces.

Referencia	Organismo	E2 IC ₅₀ (nM)	BPA RBA ^a (%)	NP RBA (%)
Kloas y colaboradores (118)	<i>Cyprinus carpio</i>	32.0	0.12	0.047
Olsen y colaboradores (113)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	6.6	5.8 x 10 ⁻³	9.4 x 10 ⁻⁴
Matthews y colaboradores (114)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	3.3	0.21	-
Passos y colaboradores (119)	<i>Sparus aurata</i>	2.3	1.3	-
Nakai (115)	<i>Oryzias latipes</i>	4.8	-	8.1
Rider y colaboradores (116)	<i>Pimephales promelas</i>	4.3	-	0.53
Gale y colaboradores (120)	<i>Ictalurus punctatus</i>	2.3	-	0.78
Este trabajo	<i>Danio rerio</i>	9.4	0.83	1.47

^a RBA: afinidad de unión relativa.

Aunque al parecer los receptores de estrógenos de humano y de pez cebra tienen afinidades similares por los DE, no son afectados de la misma manera. Los peces están expuestos constantemente a los DE y pueden entrar en el organismo a través del alimento, las agallas o el tejido epitelial (121). Además, algunas especies de peces no tienen cromosomas sexuales y el sexo es determinado por factores ambientales, como el pez cebra (122). De esta manera, cuando los peces están expuestos a compuestos estrogénicos, poblaciones enteras pueden feminizarse llevando a la extinción de la especie (3).

Para el receptor de humano, se probó la afinidad de los productos del E2 y NP a concentraciones equivalentes a 20 veces la IC₅₀ (Tabla 9). Para el BPA y el TCS se probaron las concentraciones máximas posibles dada la poca solubilidad de los productos en el sistema. Para ninguno de estos productos de reacción se detectó afinidad por el hER α . Ya se ha reportado que la lacasa es capaz de eliminar la afinidad de estrógenos naturales por el hER α (123, 124). Para el zfER α LBD no se detectó afinidad de los productos de transformación del BPA, NP ni TCS a concentraciones equivalentes a 20 veces la IC₅₀. El producto del E2 tiene una IC₅₀ de 46.7 $\mu\text{g L}^{-1}$, que equivale al 5.5% de la afinidad del E2

sin transformar. Es interesante resaltar que para este compuesto se ha reportado previamente la formación de dímeros (81, 110), los cuales todavía pudieran presentar afinidad por el receptor. En contraste, los polímeros de BPA son de mayor peso molecular (Tabla 5) y no mostraron afinidad por ninguno de los dos receptores. La naturaleza polimérica de los productos después de la transformación con la lacasa es probablemente la razón principal de la disminución de la afinidad por el receptor. El incremento en el tamaño de los DE al polimerizarse puede crear un impedimento estérico para su interacción con el sitio de unión a ligando del receptor. Es aún más importante resaltar que los polímeros son los productos mayoritarios y presentan baja solubilidad en agua indicando que en el medio ambiente precipitarían formando parte del sedimento, de donde podrían ser eliminados con mayor facilidad. Incluso, si los peces llegan a ingerir estos compuestos, su actividad estrogénica sería prácticamente nula, eliminando así el impacto negativo que ejercen en el medio ambiente.

Tabla 9. Afinidad por el hER α y zfER α LBD de los productos de transformación de los diferentes DE.

DE transformado	hER α		zfER α LBD	
	Concentración máxima probada (mg L ⁻¹)	IC ₅₀ (μ g L ⁻¹) ^(a)	Concentración máxima probada (mg L ⁻¹)	IC ₅₀ (μ g L ⁻¹)
17β-estradiol	0.093	ND	2.45	46.7
Bisfenol-A	21	ND	11.4	ND
Nonilfenol	9.9	ND	13.2	ND
Triclosán	140	ND	54.4	ND

^(a) ND: no detectable.

5.6. Inmovilización de la lacasa de *C. gallica*

Para la aplicación de la lacasa en sistemas de acuicultura, es necesario que la enzima esté inmovilizada de manera covalente para asegurar que no habrá pérdida de enzima por desorción y más aún que podrá ser reutilizada durante varios ciclos de transformación. Existen muchos métodos para lograr este objetivo, de los cuales se probaron la

copolimerización, inmovilización en nylon, en resina epóxica, y en sefarosa. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Eficiencia de inmovilización de la lacasa en diferentes soportes.

	Copolimerización	Nylon (98)	Nylon (99)	Resina epóxica	Sefarosa
Proteína inicial ($\mu\text{g g soporte}^{-1}$)	176	81	81	81	648
Carga ($\mu\text{g g soporte}^{-1}$)	105	14.6	9.7	49	440
Proteína retenida (%)	60	18	12	60	68
Actividad inicial ($\text{U mg proteína}^{-1}$)	58.7	251	251	63	251
Actividad final ($\text{U mg proteína}^{-1}$)	4.3	1.5	4.7×10^{-4}	ND ^(a)	ND
Actividad retenida (%)	7.2	0.60	1.9×10^{-4}	ND	ND
Actividad retenida (U g soporte^{-1})	0.45	0.02	4.6×10^{-6}	ND	ND

^(a) ND: no detectable.

En todos los casos hay una pérdida significativa de la actividad. La sefarosa que se utilizó se encuentra activada con grupos ciano que reaccionan con los grupos amino de la proteína. La inmovilización en el caso de la resina epóxica se realiza con los grupos epóxido disponibles que reaccionan con los grupos amino de la proteína. En estos dos casos se observó que la enzima se inactivó por completo, probablemente debido a que la enzima se unió en varios residuos quedando muy rígida, lo que le impide llevar a cabo la catálisis.

En el protocolo reportado por Vázquez y colaboradores (99), se utiliza al glutaraldehído para activar al nylon y hacer que la enzima se una por los grupos amino. En este caso, la enzima retuvo un poco de actividad, aunque es prácticamente insignificante.

Siguiendo el protocolo propuesto por Isgrove y colaboradores (98), además de activar al nylon con glutaraldehído, se agrega una molécula de polietilenimina que funciona como espaciador para favorecer una mayor movilidad de la proteína aún cuando haya unión multipunto. En este caso, se logró retener un poco más de actividad, aunque sigue siendo muy baja (0.60%).

Buscando otras alternativas además de la unión por los grupos aminos, se probó el protocolo propuesto por Bakker y colaboradores (97), en el cual, un prepolímero que contiene grupos isocianato es capaz de reaccionar con los grupos hidroxilo de las glicosilaciones de la proteína. Al utilizar este protocolo, se logró retener el 7.2% de la actividad, lo cual es bajo comparado con los valores esperados (entre 60% y 100%). Durante el proceso de copolimerización hay un aumento en la temperatura lo que podría inactivar a la enzima. Se midió la temperatura en el centro de la espuma durante los 2 min que dura el proceso de copolimerización y no se alcanzaron los 50°C, temperatura a la cual la enzima es estable por 1 h (107), por lo que se descarta que este sea el origen de la pérdida de actividad. Lo más probable es que la inactivación se deba a que el prepolímero es capaz de reaccionar también con los grupos amino de la proteína, causando, de nuevo, rigidez en la enzima.

Comparativamente hablando, la inmovilización en espuma de poliuretano fue la más eficiente por lo que se eligió este material para ser utilizado en los tratamientos del agua contaminada con los diferentes DE.

5.7. Experimentos *in-vivo*

Durante los experimentos de exposición, no se detectó mortalidad de los peces. El E2 (100 nM, Figura 23A) mostró la mayor inducción de Vtg1 con respecto al control. Los productos de transformación presentaron una capacidad de inducción de la Vtg1 significativamente menor al E2 sin transformar, reduciendo su efecto en un 77%, aunque los niveles observados son altos. Esto coincide con los resultados obtenidos para la afinidad *in vitro* donde se observó que el producto retuvo el 5.5% de afinidad por el zfER α LBD (Tabla 6); es posible que la presencia de dímeros sea la causa de esta inducción. Al utilizar el sistema de lacasa inmovilizada, la inducción de Vtg1 fue estadísticamente igual a la

obtenida para los productos de transformación, y significativamente mayor a lo obtenido para el control.

Al tratar a los peces con BPA 10 μ M, se observó también una fuerte inducción de la Vtg1 (Figura 23B). Cuando se probaron los productos de transformación, los valores obtenidos de inducción fueron el equivalente al 0.38% del BPA sin transformar, que al igual que al utilizar el sistema de lacasa inmovilizada, los valores son estadísticamente iguales a la expresión obtenida para el control.

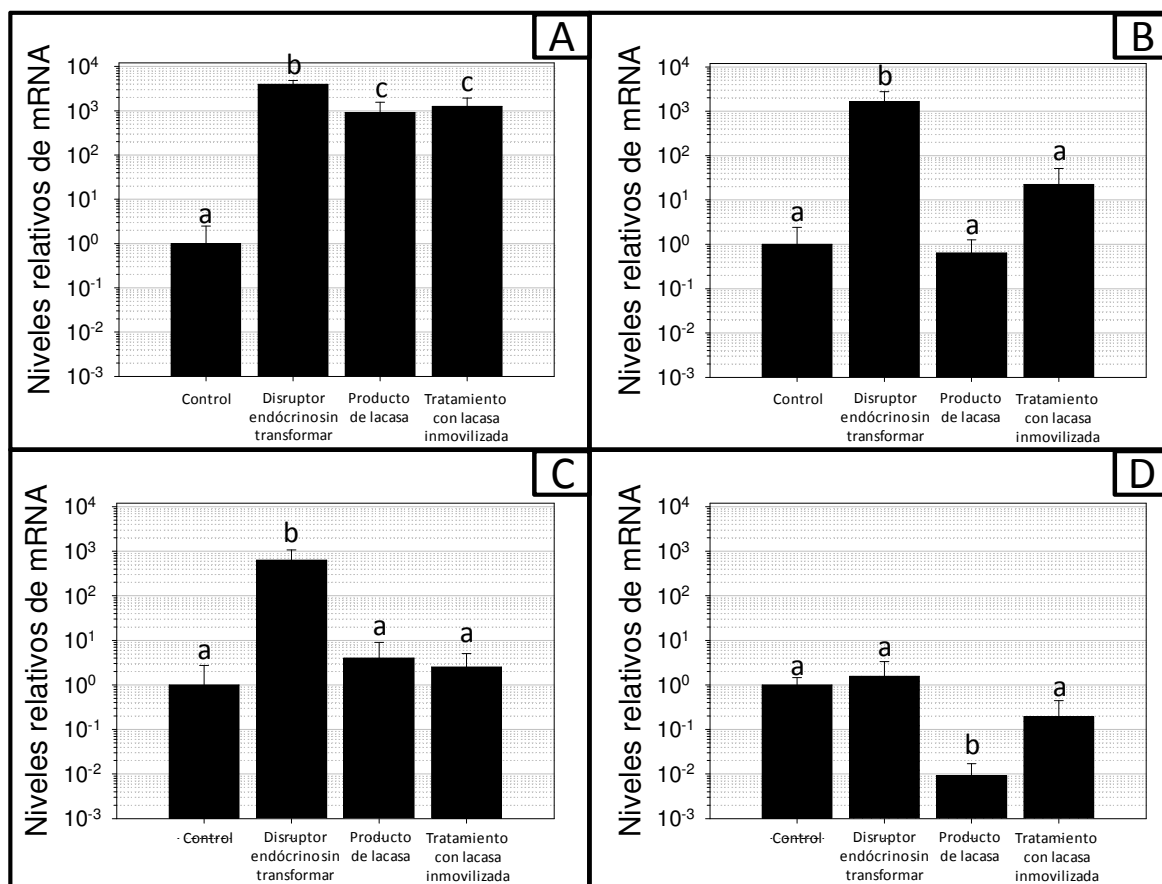


Figura 23. Niveles de mRNA de vitelogenina en peces cebra expuestos durante 7 días al DE sin transformar, productos de transformación por acción de la lacasa, y agua tratada con lacasa inmovilizada de los DE: (A) E2, (B) BPA, (C) TCS, (D) NP. Los valores fueron normalizados con respecto al gen *elfa1* y representan el valor de expresión promedio (\pm desviación estándar) comparado con los controles. Los tratamientos con letra distinta presentan diferencias significativas ($p < 0.05$). Los niveles de expresión relativa son graficados en escala logarítmica.

Para el TCS 1 μ M (Figura 23C), observamos que es capaz de inducir fuertemente a la Vtg1. Con esto se muestra que tiene una fuerte actividad estrogénica en pez cebra, aunque

previamente se ha visto al TCS como un DE débil en otros peces como *Oryza latipes* (38). Los productos de transformación utilizando lacasa libre presentaron el 0.64% de la inducción obtenida para el TCS sin transformar. Cuando se utilizó el sistema de lacasa inmovilizada, la inducción fue estadísticamente igual a lo observado para el control.

Al exponer a los peces a NP 10 nM, no hubo una inducción de la Vtg1 (Figura 23D), a pesar de que en los experimentos preliminares se había observado un efecto significativo. Esto se puede deber a diferencias en las edades fisiológicas de los peces que se utilizaron. Es interesante notar que el producto de transformación con la lacasa libre es capaz de reprimir la expresión de Vtg1, lo que puede traer como consecuencia una disminución en la fertilidad de las hembras. Compuestos como el tamoxifen también son capaces de reprimir a la Vtg1(125). Sin embargo, el mecanismo de acción del tamoxifen está mediado por el ER α , lo que probablemente no es el caso para el producto del NP ya que no se encontró afinidad en los análisis *in vitro* (Tabla 6). Es posible que el producto del NP actúe a través de vías de señalización independientes del ER α , como a través de interacciones con el receptor aril hidrocarburo, como ha sido reportado para el esturión (126, 127). Afortunadamente, cuando se utilizó el sistema de lacasa inmovilizada, no se observó este efecto de represión, siendo la expresión de la Vtg1 estadísticamente igual a la observada en el control. Es posible que esto se deba a que los productos pudieran estar quedando atrapados en el soporte y no lleguen a los peces.

La lacasa es capaz de transformar al E2, BPA y NP con eficiencias catalíticas que están en el mismo orden de magnitud, por lo que se hubiera esperado que para estos compuestos se observaran mejores resultados que para el TCS que es transformado con una eficiencia que es un orden de magnitud menor (Tabla 4). Sin embargo, hay varios factores a tomar en cuenta para poder hacer esta comparación. Por un lado, la concentración que se probó de cada DE en estos experimentos fue distinta porque su potencia estrogénica es diferente en cada caso. El BPA fue utilizado a una concentración de 10 μ M, la cual puede resultar tóxica en el caso del E2 y del NP, y si se hubiera utilizado una concentración menor de BPA, no se hubiera observado la inducción de la Vtg1. A pesar de que se utilizaron concentraciones que difieren en un orden de magnitud entre sí, el tratamiento al utilizar la lacasa inmovilizada resultó ser igual de eficiente en el caso del BPA y el TCS, aunque esto no concuerde para el E2 y el NP. Esto nos lleva a considerar la naturaleza de los productos

obtenidos. Para el BPA peso molecular promedio corresponde a un decámero, por lo que serían los polímeros con mayor impedimento estérico para interactuar con el α ER. Para el E2 son hexámeros, y para el NP y TCS, pentámeros; sin embargo, el aumento en el tamaño no es suficiente para descartar su capacidad estrogénica, como en el caso del E2 donde los productos siguen presentando actividad estrogénica importante. Para este caso, este resultado coincidió con lo obtenido para la afinidad *in vitro*, pero no fue igual para el producto del NP donde no se observó afinidad por el receptor, pero sí se vio un efecto de represión de la Vtg1 en los experimentos *in vivo*. Esto nos indica que sigue siendo difícil predecir si un compuesto tendrá actividad estrogénica basados sólo en su estructura química e incluso con los ensayos de afinidad por el receptor, por lo que es necesario hacer las mediciones *in vivo*. Esto justificado además porque los procesos en los que están involucradas las hormonas son diversos; aún cuando un compuesto puede no tener afinidad por el ER α , puede interrumpir otros procesos como la síntesis del propio receptor o impedir la degradación del E2 presente de forma natural en el organismo, generando efectos diversos.

El número de reportes que abordan la disrupción endócrina en el medio ambiente están incrementando con rapidez. Los valores que han sido reportados hasta hoy varían desde no detectables al orden de $\mu\text{g L}^{-1}$ (19, 24, 29, 36). En 2001, Yamamoto y colaboradores (31) reportaron que la concentración promedio de BPA en lixiviados de residuos industriales es de $269 \mu\text{g L}^{-1}$, pero se encontraron valores de hasta $17,200 \mu\text{g L}^{-1}$. En Estados Unidos, se han encontrado concentraciones de $16.6 \mu\text{g L}^{-1}$ de TCS en aguas residuales (128), mientras que en lagos de China, el NP ha alcanzado concentraciones de $32 \mu\text{g L}^{-1}$ (25). Las concentraciones probadas en este trabajo están uno o dos órdenes de magnitud por arriba de los valores encontrados usualmente en el medio ambiente. Sin embargo, la respuesta fue analizada en un periodo de tiempo corto (7 días), mientras que en la fauna, los peces están expuestos constantemente durante toda su vida. Además, dada la naturaleza hidrofóbica de los DE, tienden a acumularse en los fluidos y en el tejido adiposo, teniendo un efecto acumulativo en los organismos (36).

La calidad del agua que ingresa a sistemas de acuicultura es un tema primordial, dado que muchas granjas se ubican en zonas contaminadas, impactadas negativamente por la actividad humana. Las actividades industriales y la agricultura, cercanas a granjas, liberan

compuestos xenobióticos que pueden contaminar la fuente de agua para la acuicultura. Para facilitar el tratamiento enzimático para los sistemas de acuicultura, se propone el uso de lacasa inmovilizada. Otros estudios han demostrado la eficiencia del uso de lacasa inmovilizada en el tratamiento de agua contaminada con DE (106, 129, 130). Sin embargo, se ha puesto poca atención a la eficiencia en la eliminación de la actividad estrogénica del agua después de ser tratada. En este trabajo, demostramos que el uso de lacasa copolimerizada en espuma de poliuretano es tan eficiente como la lacasa libre en la eliminación de los efectos estrogénicos en pez cebra de E2, BPA y TCS. En el caso de NP, donde hay una represión de Vtg1 después del tratamiento con lacasa, el uso de la lacasa inmovilizada elimina este efecto negativo, probablemente debido a que los productos quedan atrapados en el soporte. De esta manera, el uso de lacasa inmovilizada en sistemas de acuicultura elimina los efectos estrogénicos causados por contaminantes acuáticos, al acabar con los efectos adversos como feminización e infertilidad, y mejorando la calidad del producto, además de que facilita el tratamiento enzimático haciendo que la enzima pueda ser reutilizable durante el proceso.

Además de la posible aplicación a sistemas de acuicultura, este tratamiento tiene el potencial de ser utilizado como un paso adicional en las plantas de tratamiento de aguas, o incluso para la producción de agua embotellada donde estos contaminantes también están presentes (30).

6. Conclusiones

La lacasa de *C. gallica* es capaz de transformar a los compuestos E2, BPA, y NP con eficiencias catalíticas similares (37, 21 y 42 s⁻¹ mM⁻¹), lo que indica que este sistema podría transformar eficientemente a los diferentes DE en una mezcla compleja. El TCS también es transformado por esta enzima, aunque con una eficiencia menor (1.5 s⁻¹ mM⁻¹). El β-sitosterol no es sustrato para la lacasa.

Durante la transformación del E2, BPA, NP y TCS se observó la formación de un precipitado que corresponde al producto mayoritario de la reacción. Estudios de cromatografía de permeación en gel indican que en todos los casos los compuestos de más de 1 kDa representan más del 85% del producto obtenido. Para el NP se identificó la formación de un dímero. Para el BPA se identificó la formación de 4-isopropenilfenol, un dímero del mismo, e hidroquinona en cantidades traza.

Se logró clonar el zfERαLBD en el vector pET-28b. Es posible su expresión en *E. coli* C41, pero dado el tipo de codones presentes en el fragmento, la proteína se produce en bajas cantidades. La cepa Rosetta 2 es capaz de expresar mayor cantidad de proteína en la fracción soluble dando un rendimiento de 0.86 mg de zfERαLBD por litro de cultivo con un 80% de pureza.

Los análisis de afinidad *in vitro* utilizando anisotropía muestran que E2, BPA, NP y TCS tienen una mayor afinidad por el zfERαLBD que por el hERα. Los productos de transformación de BPA, NP y TCS no mostraron afinidad por ninguno de los dos receptores a las concentraciones probadas. Para el E2, el producto retuvo el 5.5% de la afinidad del E2 sin transformar para el zfERαLBD, y no mostró afinidad por el hERα.

La lacasa de *C. gallica* inmovilizada en nylon, resina epóxica y sefarosa, con las metodologías ensayadas, pierde su actividad. Con el método de copolimerización en espuma de poliuretano se logró una carga de 0.105 mg g⁻¹ con una actividad de 0.45 U g⁻¹, reteniendo el 7.2% de la actividad.

El E2 (100 nM), BPA (10 μ M) y TCS (1 μ M) son capaces de inducir fuertemente la expresión de la Vtg1 en pez cebra después de 7 días de tratamiento. El NP (10 nM) no mostró una inducción significativa del gen durante el tratamiento. Una vez transformados por la lacasa, el BPA y TCS no mostraron efectos en la inducción de la Vtg1. Para el E2 los productos disminuyeron significativamente su efecto (23% de la inducción de E2 sin transformar). En el caso del NP, los productos reprimieron la expresión de la Vtg1; es posible que estos compuestos estén actuando por vías independientes al zfER α .

La lacasa de *C. gallica* copolimerizada en espuma de poliuretano mostró ser eficiente en la eliminación de los efectos estrogénicos en pez cebra de E2, BPA y TCS a niveles iguales que utilizando la enzima libre. Para el NP, ya no se observó represión de la Vtg1 mostrando niveles de expresión iguales al control. Este sistema tiene el potencial de ser utilizado en sistemas de acuicultura para eliminar los efectos estrogénicos de los contaminantes que pudieran estar presentes.

7. Perspectivas

Es necesario estudiar la eficiencia de la lacasa con la mezcla de varios disruptores endócrinos, y más aún, en mezclas complejas que asemejen aguas residuales, ya que sólo se evaluó con disruptores aislados.

Aunque la lacasa de *C. gallica* es eficiente en la transformación de DE en el sistema probado, se inhibe en presencia de haluros por lo que resultaría poco eficiente en sistemas de acuicultura que requieran agua salada. Para ello sería necesario la utilización de otras lacasas como la de *Marinomonas mediterranea* que retiene un porcentaje alto de su actividad en presencia de sales.

La cantidad de enzima activa que se obtuvo por el método de copolimerización de la lacasa fue suficiente para obtener una transformación apropiada de los DE. Sin embargo, durante el proceso la lacasa sufrió un proceso de inactivación haciendo que se obtuviera poca actividad por gramo de soporte. Es necesario explorar más alternativas para lograr una mayor eficiencia en la inmovilización covalente en términos de actividad retenida y carga.

En este trabajo se probó que el uso de la enzima inmovilizada redujo los efectos estrogénicos a niveles similares a los obtenidos con la lacasa libre. Es necesario aplicar principios de bioingeniería para el diseño y optimización del biorreactor.

Aunque la disrupción endócrina fue disminuida o eliminada por acción de la lacasa, también es importante medir otros efectos tóxicos que pudieran tener los productos de transformación a través de estudios histológicos y de inducción de otros genes de respuesta a toxicidad, como los de respuesta a estrés oxidativo.

8. Bibliografía

1. Marty MS, Carney EW, Rowlands JC 2011 Endocrine disruption: historical perspectives and its impact on the future of toxicology testing. *Toxicological Sciences* 120:S93-S108
2. WHO [World Health Organization], 2002 Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. Geneva: International Programme on Chemical Safety
3. Kidd KA, Blanchfield PJ, Mills KH, Palace VP, Evans RE, Lazorchak JM, Flick RW 2007 Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104:8897-8901
4. Matthiessen P 2003 Historical perspective on endocrine disruption in wildlife. *Pure and Applied Chemistry* 75:2197-2206
5. Burkhardt-Holm P 2010 Endocrine disruptors and water quality: A state-of-the-art review. *International Journal of Water Resources Development* 26:477-493
6. METI. Ministry of Economy, Trade and Industry, Japan. Appendix 1. Data list of RBA values of human ER α receptor binding assay, RA and PC 50 values of human ER α reporter gene assay. 6th Meeting of the Task Force on Endocrine Disrupters, Tokio, Japan, 24 and 25 June 2002, pp 1-24
7. Celik L, Lund JDD, Schiott B 2007 Conformational dynamics of the estrogen receptor α : molecular dynamics simulations of the influence of binding site structure on protein dynamics. *Biochemistry* 46:1743-1758
8. Faulds MH, Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson J-A 2012 The diversity of sex steroid action: regulation of metabolism by estrogen signaling. *Journal of Endocrinology* 212:3-12
9. Schultz TW, Sinks GD, Cronin MTD 2002 Structure–activity relationships for gene activation oestrogenicity: Evaluation of a diverse set of aromatic chemicals. *Environmental Toxicology* 17:14-23
10. Sin J-C, Lam S-M, Mohamed AR, Lee K-T 2012 Degrading endocrine disrupting chemicals from wastewater by TiO₂ photocatalysis: A review. *International Journal of Photoenergy* 2012
11. Johnson A, Jürgens M 2003 Endocrine active industrial chemicals: release and occurrence in the environment. *Pure and Applied Chemistry* 75:1895-1904
12. Christianson-Heiska I, Smeds P, Granholm N, Bergelin E, Isomaa B 2007 Endocrine modulating actions of a phytosterol mixture and its oxidation products in zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 145:518-527

13. Degen GH, Bolt HM 2000 Endocrine disruptors: update on xenoestrogens. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 73:433-441
14. Schiavone A, Tarantola M, Perona G, Pagliasso S, Badino P, Odore R, Cuniberti B, Lussiana C 2004 Effect of dietary clenbuterol and cimaterol on muscle composition, β -adrenergic and androgen receptor concentrations in broiler chickens. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 88:94-100
15. Poutanen M 2012 Understanding the diversity of sex steroid action. *Journal of Endocrinology* 212:1-2
16. Lange IG, Daxenberger A, Schiffer B, Witters H, Ibarreta D, Meyer HHD 2002 Sex hormones originating from different livestock production systems: fate and potential disrupting activity in the environment. *Analytica Chimica Acta* 473:27-37
17. Andaluri G, Suri R, Kumar K 2012 Occurrence of estrogen hormones in biosolids, animal manure and mushroom compost. *Environmental Monitoring and Assessment* 184:1197-1205
18. Hanselman TA, Graetz DA, Wilkie AC 2003 Manure-borne estrogens as potential environmental contaminants: a review. *Environmental Science and Technology* 37:5471-5478
19. Soares A, Guieysse B, Jefferson B, Cartmell E, Lester JN 2008 Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environment International* 34:1033-1049
20. Ieda T, Horii Y, Petrick G, Yamashita N, Ochiai N, Kannan K 2005 Analysis of nonylphenol isomers in a technical mixture and in water by comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry. *Environmental Science and Technology* 39:7202-7207
21. Vazquez-Duhalt R, Marquez-Rocha F, Ponce E, Licea AF, Viana MT 2006 Nonylphenol, an integrated vision of a pollutant. *Applied Ecology and Environmental Research* 4:1-25
22. Guenther K, Heinke V, Thiele B, Kleist E, Prast H, Raecker T 2002 Endocrine disrupting nonylphenols are ubiquitous in food. *Environmental Science and Technology* 36:1676-1680
23. Loyo-Rosales JE, Rosales-Rivera GC, Lynch AM, Rice CP, Torrents A 2004 Migration of nonylphenol from plastic containers to water and a milk surrogate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:2016-2020
24. Sharma VK, Anquandah GAK, Yngard RA, Kim H, Fekete J, Bouzek K, Ray AK, Golovko D 2009 Nonylphenol, octylphenol, and bisphenol-A in the aquatic environment: A review on occurrence, fate, and treatment. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* 44:423-442
25. Wu Z, Zhang Z, Chen S, He F, Fu G, Liang W 2007 Nonylphenol and octylphenol in urban eutrophic lakes of the subtropical China. *Fresenius Environmental Bulletin* 16:227-234

26. Vandenberg LN, Maffini MV, Sonnenschein C, Rubin BS, Soto AM 2009 Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocrine Reviews* 30:75-95
27. Yamamoto T, Yasuhara A 1999 Quantities of bisphenol a leached from plastic waste samples. *Chemosphere* 38:2569-2576
28. Imai S, Shiraishi A, Gamo K, Watanabe I, Okuhata H, Miyasaka H, Ikeda K, Bamba T, Hirata K 2007 Removal of phenolic endocrine disruptors by *Portulaca oleracea*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 103:420-426
29. Crain DA, Eriksen M, Iguchi T, Jobling S, Laufer H, LeBlanc GA, Guillette Jr LJ 2007 An ecological assessment of bisphenol-A: evidence from comparative biology. *Reproductive Toxicology* 24:225-239
30. Li X, Ying G-G, Su H-C, Yang X-B, Wang L 2010 Simultaneous determination and assessment of 4-nonylphenol, bisphenol A and triclosan in tap water, bottled water and baby bottles. *Environment International* 36:557-562
31. Yamamoto T, Yasuhara A, Shiraishi H, Nakasugi O 2001 Bisphenol A in hazardous waste landfill leachates. *Chemosphere* 42:415-418
32. Kang J-H, Katayama Y, Kondo F 2006 Biodegradation or metabolism of bisphenol A: from microorganisms to mammals. *Toxicology* 217:81-90
33. Cabana H, Jones JP, Agathos SN 2007 Elimination of endocrine disrupting chemicals using white rot fungi and their lignin modifying enzymes: a review. *Engineering in Life Sciences* 7:429-456
34. Brausch JM, Rand GM 2011 A review of personal care products in the aquatic environment: Environmental concentrations and toxicity. *Chemosphere* 82:1518-1532
35. Hundt K, Martin D, Hammer E, Jonas U, Kindermann MK, Schauer F 2000 Transformation of triclosan by *Trametes versicolor* and *Pycnoporus cinnabarinus*. *Applied and Environmental Microbiology* 66:4157-4160
36. Dann AB, Hontela A 2011 Triclosan: environmental exposure, toxicity and mechanisms of action. *Journal of Applied Toxicology* 31:285-311
37. Lyndall J, Fuchsman P, Bock M, Barber T, Lauren D, Leigh K, Perruchon E, Capdevielle M 2010 Probabilistic risk evaluation for triclosan in surface water, sediments, and aquatic biota tissues. *Integrated Environmental Assessment and Management* 6:419-440
38. Ishibashi H, Matsumura N, Hirano M, Matsuoka M, Shiratsuchi H, Ishibashi Y, Takao Y, Arizono K 2004 Effects of triclosan on the early life stages and reproduction of medaka *Oryzias latipes* and induction of hepatic vitellogenin. *Aquatic Toxicology* 67:167-179
39. Cabana H. JJP, Agathos S.N. 2007 Elimination of endocrine disrupting chemicals using white rot fungi and their lignin modifying enzymes: a review. *Engineering in Life Sciences* 7:429-456

40. Thomas P, Alyea R, Pang Y, Peyton C, Dong J, Berg AH 2010 Conserved estrogen binding and signaling functions of the G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) in mammals and fish. *Steroids* 75:595-602
41. Sanderson JT 2006 The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals. *Toxicological Sciences* 94:3-21
42. Milnes MR, Bermudez DS, Bryan TA, Edwards TM, Gunderson MP, Larkin ILV, Moore BC, Guillette JLJ 2006 Contaminant-induced feminization and demasculinization of nonmammalian vertebrate males in aquatic environments. *Environmental Research* 100:3-17
43. Luccio-Camelo DC, Prins GS 2011 Disruption of androgen receptor signaling in males by environmental chemicals. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 127:74-82
44. Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Strom A, Treuter E, Warner M, Gustafsson J-A 2007 Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiology Reviews* 87:905-931
45. Giesy JP, Snyder EM 1998 Xenobiotic modulation of endocrine function in fishes. In: Kendall RJ, Dickerson RL, Giesy JP, Suk WA eds. *Principles and processes for evaluating endocrine disruption in wildlife*. Pensacola, FL: SETAC Press; 155-237
46. Menuet A, Le Page Y, Torres O, Kern L, Kah O, Pakdel F 2004 Analysis of the estrogen regulation of the zebrafish estrogen receptor (ER) reveals distinct effects of ER α , ER β_1 and ER β_2 . *Journal of Molecular Endocrinology* 32:975-986
47. Menuet A, Pellegrini E, Anglade I, Blaise O, Laudet V, Kah O, Pakdel F 2002 Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions. *Biology of Reproduction* 66:1881-1892
48. Foryst-Ludwig A, Kintscher U 2010 Metabolic impact of estrogen signalling through ER α and ER β . *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 122:74-81
49. Mizukami Y 2010 *In vivo* functions of GPR30/GPER-1, a membrane receptor for estrogen: from discovery to functions *in vivo*. *Endocrine Journal* 57:101-107
50. Maggiolini M, Picard D 2010 The unfolding stories of GPR30, a new membrane-bound estrogen receptor. *Journal of Endocrinology* 204:105-114
51. Pang Y, Thomas P 2009 Involvement of estradiol-17 β and its membrane receptor, G protein coupled receptor 30 (GPR30) in regulation of oocyte maturation in zebrafish, *Danio rerio*. *General and Comparative Endocrinology* 161:58-61
52. Ankley GT, Johnson RD 2004 Small fish models for identifying and assessing the effects of endocrine-disrupting chemicals. *ILAR Journal* 45:469-483
53. Larsson DGJ, Farlin L 2002 Male-biased sex ratios of fish embryos near a pulp mill: temporary recovery after a short-term shutdown. *Environmental Health Perspectives* 110:739

54. Örn S, Holbech H, Madsen TH, Norrgren L, Petersen GI 2003 Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone. *Aquatic Toxicology* 65:397-411
55. Clelland E, Peng C 2009 Endocrine/paracrine control of zebrafish ovarian development. *Molecular and Cellular Endocrinology* 312:42-52
56. Wang H, Yan T, Tan JTT, Gong Z 2000 A zebrafish vitellogenin gene (vg3) encodes a novel vitellogenin without a phosphotyrosine domain and may represent a primitive vertebrate vitellogenin gene. *Gene* 256:303-310
57. Wang H, Tan JTT, Emelyanov A, Korzh V, Gong Z 2005 Hepatic and extrahepatic expression of vitellogenin genes in the zebrafish, *Danio rerio*. *Gene* 356:91-100
58. McGonnell IM, Fowkes RC 2006 Fishing for gene function - endocrine modelling in the zebrafish. *Journal of Endocrinology* 189:425-439
59. Maack G, Segner H 2004 Life-stage-dependent sensitivity of zebrafish (*Danio rerio*) to estrogen exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 139:47-55
60. Kausch U, Alberti M, Haindl S, Budczies J, Hock B 2008 Biomarkers for exposure to estrogenic compounds: Gene expression analysis in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology* 23:15-24
61. Ruggeri B, Ubaldi M, Lourdasamy A, Soverchia L, Ciccocioppo R, Hardiman G, Baker ME, Palermo F, Polzonetti-Magni AM 2008 Variation of the genetic expression pattern after exposure to estradiol-17 β and 4-nonylphenol in male zebrafish (*Danio rerio*). *General and Comparative Endocrinology* 158:138-144
62. Jin Y, Chen R, Sun L, Qian H, Liu W, Fu Z 2009 Induction of estrogen-responsive gene transcription in the embryo, larval, juvenile and adult life stages of zebrafish as biomarkers of short-term exposure to endocrine disrupting chemicals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 150:414-420
63. Alum A, Yoon Y, Westerhoff P, Abbaszadegan M 2004 Oxidation of bisphenol A, 17 β -estradiol, and 17 α -ethynyl estradiol and byproduct estrogenicity. *Environmental Toxicology* 19:257-264
64. Routledge EJ, Sumpter JP 1996 Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15:241-248
65. Demirpence E, Duchesne M-J, Badia E, Gagne D, Pons M 1993 MVLN Cells: A bioluminescent MCF-7-derived cell line to study the modulation of estrogenic activity. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 46:355-364
66. Gutendorf B, Westendorf J 2001 Comparison of an array of in vitro assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens. *Toxicology* 166:79-89
67. Denny JS, Tapper MA, Schmieder PK, Hornung MW, Jensen KM, Ankley GT, Henry TR 2005 Comparison of relative binding affinities of endocrine active

- compounds to fathead minnow and rainbow trout estrogen receptors. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24:42-42
68. Gurer-Orhan H, Kool J, Vermeulen NPE, Meerman JHN 2005 A novel microplate reader-based high-throughput assay for estrogen receptor binding. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 85:149-161
 69. Parker GJ, Law TL, Lench FJ, Bolger RE 2000 Development of high throughput screening assays using fluorescence polarization: Nuclear receptor-ligand-binding and kinase/phosphatase assays. *Journal of Biomolecular Screening* 5:77-88
 70. Esplugas S, Bila DM, Krause LGT, Dezotti Mr 2007 Ozonation and advanced oxidation technologies to remove endocrine disrupting chemicals (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in water effluents. *Journal of Hazardous Materials* 149:631-642
 71. Liu Z-h, Kanjo Y, Mizutani S 2009 Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment - physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: A review. *Science of the Total Environment* 407:731-748
 72. Lee B-C, Kamata M, Akatsuka Y, Takeda M, Ohno K, Kamei T, Magara Y 2004 Effects of chlorine on the decrease of estrogenic chemicals. *Water Research* 38:733-739
 73. Tao H, Hao S, Chang F, Wang L, Zhang Y, Cai X, Zeng J-S-D 2011 Photodegradation of bisphenol A by titania nanoparticles in mesoporous MCM-41. *Water, Air and Soil Pollution* 214:491-498
 74. Chowdhury A, Pradhan S, Saha M, Sanyal N 2008 Impact of pesticides on soil microbiological parameters and possible bioremediation strategies. *Indian Journal of Microbiology* 48:114-127
 75. Pointing SB 2001 Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57:20-33
 76. Soares A, Guieysse B, Mattiasson B 2006 Influence of agitation on the removal of nonylphenol by the white-rot fungi *Trametes versicolor* and *Bjerkandera* sp. *BOL* 13. *Biotechnology Letters* 28:139-143
 77. Hirano T, Honda Y, Watanabe T, Kuwahara M 2000 Degradation of bisphenol A by the lignin-degrading enzyme, manganese peroxidase, produced by the white-rot basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 64:1958-1962
 78. Tsutsumi Y, Haneda T, Nishida T 2001 Removal of estrogenic activities of bisphenol A and nonylphenol by oxidative enzymes from lignin-degrading basidiomycetes. *Chemosphere* 42:271-276
 79. Auriol M, Filali-Meknassi Y, Adams CD, Tyagi RD, Noguerol T-N, Piña B 2008 Removal of estrogenic activity of natural and synthetic hormones from a municipal wastewater: Efficiency of horseradish peroxidase and laccase from *Trametes versicolor*. *Chemosphere* 70:445-452

80. Valderrama B, Ayala M, Vazquez-Duhalt R 2002 Suicide inactivation of peroxidases and the challenge of engineering more robust enzymes. *Chemistry and Biology* 9:555-565
81. Cabana H, Jiwan J-LH, Rozenberg R, Elisashvili V, Penninckx M, Agathos SN, Jones JP 2007 Elimination of endocrine disrupting chemicals nonylphenol and bisphenol A and personal care product ingredient triclosan using enzyme preparation from the white rot fungus *Coriolopsis polyzona*. *Chemosphere* 67:770-778
82. Riva S 2006 Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends in Biotechnology* 24:219-226
83. Valderrama B, Oliver P, Medrano-Soto A, Vazquez-Duhalt R 2003 Evolutionary and structural diversity of fungal laccases. *Antonie van Leeuwenhoek* 84:289-299
84. Baldrian P 2006 Fungal laccases: occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews* 30:215-242
85. Battistuzzi G, Bellei M, Leonardi A, Pierattelli R, De Candia A, Vila A, Sola M 2005 Reduction thermodynamics of the T1 Cu site in plant and fungal laccases. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 10:867-873
86. Morozova OV, Shumakovich GP, Gorbacheva MA, Shleev SV, Yaropolov AI 2007 "Blue" laccases. *Biochemistry* 72:1136-1150
87. Lacki K, Duvnjak Z 1996 Modeling the enzymatic transformation of 3,5-dimethoxy,4-hydroxy cinnamic acid by polyphenoloxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Biotechnology and Bioengineering* 51:249-259
88. Piontek K, Antorini M, Choinowski T 2002 Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *The Journal of Biological Chemistry* 277:37663-37669
89. Calvo AM, Copa-Patiño JL, Alonso O, González AE 1998 Studies of the production and characterization of laccase activity in the basidiomycete *Coriolopsis gallica*, an efficient decolorizer of alkaline effluents. *Archives of Microbiology* 171:31-36
90. Vandertol-Vanier HA, Vazquez-Duhalt R, Tinoco R, Pickard MA 2002 Enhanced activity by poly(ethylene glycol) modification of *Coriolopsis gallica* laccase. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 29:214-220
91. De La Mora E, Valderrama B, Horjales E, Rudino-Pinera E 2008 Crystal structure of laccase from *Coriolopsis gallica* In: Protein Data Bank
92. Rodríguez E, Pickard MA, Vazquez-Duhalt R 1999 Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. *Current Microbiology* 38:27-32
93. Pickard MA, Roman R, Tinoco R, Vazquez-Duhalt R 1999 Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by *Coriolopsis gallica* UAMH 8260 laccase. *Applied and Environmental Microbiology* 65:3805-3809
94. Torres-Duarte C, Roman R, Tinoco R, Vazquez-Duhalt R 2009 Halogenated pesticide transformation by a laccase-mediator system. *Chemosphere* 77:687-692

95. Tinoco R, Pickard MA, Vazquez-Duhalt R 2001 Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. *Letters in Applied Microbiology* 32:331-335
96. Camarero S, Ibarra D, Martinez MJ, Martinez AT 2005 Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Applied and Environmental Microbiology* 71:1775-1784
97. Bakker M, van de Velde F, van Rantwijk F, Sheldon RA 2000 Highly efficient immobilization of glycosylated enzymes into polyurethane foams. *Biotechnology and Bioengineering* 70:342-348
98. Isgrove FH, Williams RJH, Niven GW, Andrews AT 2001 Enzyme immobilization on nylon-optimization and the steps used to prevent enzyme leakage from the support. *Enzyme and Microbial Technology* 28:225-232
99. Vazquez-Duhalt R, Semple KM, Westlake DWS, Fedorak PM 1993 Effect of water-miscible organic solvents on the catalytic activity of cytochrome c. *Enzyme and Microbial Technology* 15:936-943
100. Mateo C, Torres R, Fernández-Lorente G, Ortiz C, Fuentes M, Hidalgo A, López-Gallego F, Abian O, Palomo JM, Betancor L, Pessela BCC, Guisan JM, Fernández-Lafuente R 2003 Epoxy-amino groups: A new tool for improved immobilization of proteins by the epoxy method. *Biomacromolecules* 4:772-777
101. Kaddour S, López-Gallego F, Sadoun T, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM 2008 Preparation of an immobilized-stabilized catalase derivative from *Aspergillus niger* having its multimeric structure stabilized: The effect of Zn²⁺ on enzyme stability. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 55:142-145
102. McCurley A, Callard G 2008 Characterization of housekeeping genes in zebrafish: male-female differences and effects of tissue type, developmental stage and chemical treatment. *BMC Molecular Biology* 9:102
103. Levin RD, Lias SG 1982 Ionization potential and appearance potential measurements, 1971-1981. Washington, D. C.: U.S. Dept. of Commerce, National Bureau of Standards
104. Gutierrez A, Rencoret J, Ibarra D, Molina S, Camarero S, Romero J, Del Rio JC, Martinez AT 2007 Removal of lipophilic extractives from paper pulp by laccase and lignin-derived phenols as natural mediators. *Environmental Science and Technology* 41:4124-4129
105. Fukuda T, Uchida H, Suzuki M, Miyamoto H, Morinaga H, Nawata H, Uwajima T 2004 Transformation products of bisphenol A by a recombinant *Trametes villosa* laccase and their estrogenic activity. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 79:1212-1218
106. Cabana H, Jones JP, Agathos SN 2007 Preparation and characterization of cross-linked laccase aggregates and their application to the elimination of endocrine disrupting chemicals. *Journal of Biotechnology* 132:23-31

107. Reyes P, Pickard MA, Vazquez-Duhalt R 1999 Hydroxybenzotriazole increases the range of textile dyes decolorized by immobilized laccase. *Biotechnology Letters* 21:875-880
108. Dai SH, Lin CY, Rao DV, Stuber FA, Carleton PS, Ulrich H 1985 Selective indirect oxidation of phenol to hydroquinone and catechol. *The Journal of Organic Chemistry* 50:1722-1725
109. Uchida H, Fukuda T, Miyamoto H, Kawabata T, Suzuki M, Uwajima T 2001 Polymerization of bisphenol A by purified laccase from *Trametes villosa*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 287:355-358
110. Nicotra S, Intra A, Ottolina G, Riva S, Danieli B 2004 Laccase-mediated oxidation of the steroid hormone 17 β -estradiol in organic solvents. *Tetrahedron: Asymmetry* 15:2927-2931
111. Eiler S, Gangloff M, Duclaud S, Moras D, Ruff M 2001 Overexpression, purification, and crystal structure of native ER α LBD. *Protein Expression and Purification* 22:165-173
112. Dang Z 2010 Comparison of relative binding affinities to fish and mammalian estrogen receptors: The regulatory implications. *Toxicology Letters* 192:298-315
113. Olsen CM, Meussen-Elholm ETM, Hongslo JK, Stenersen J, Tollefsen K-E 2005 Estrogenic effects of environmental chemicals: an interspecies comparison. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 141:267-274
114. Matthews J, Celius T, Halgren R, Zacharewski T 2000 Differential estrogen receptor binding of estrogenic substances: a species comparison. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 74:223-234
115. Nakai M 2003 Receptor binding assay and reporter gene assay of medaka. In: J. Ministry of the Environment, J. Chemicals Evaluation and Research Institute eds. MEDAKA Development of test methods and suitability of medaka as test organism for detection of endocrine disrupting chemicals. Tokyo; 21-26. http://www.env.go.jp/chemi/end/pdfs/emedaka_all.pdf
116. Rider CV, Hartig PC, Cardon MC, Wilson VS 2009 Comparison of chemical binding to recombinant fathead minnow and human estrogen receptors alpha in whole cell and cell-free binding assays. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28:2175-2181
117. Costache AD, Pullela PK, Kasha P, Tomasiewicz H, Sem DS 2005 Homology-modeled ligand-binding domains of zebrafish estrogen receptors α , β 1, and β 2: from *in silico* to *in vivo* studies of estrogen interactions in *Danio rerio* as a model system. *Molecular Endocrinology* 19:2979-2990
118. Kloas W, Schrag B, Ehnes C, Segner H 2000 Binding of xenobiotics to hepatic estrogen receptor and plasma sex steroid binding protein in the teleost fish, the common carp (*Cyprinus carpio*). *General and Comparative Endocrinology* 119:287-299

119. Passos ALS, Pinto PIS, Power DM, Canario AVM 2009 A yeast assay based on the gilthead sea bream (teleost fish) estrogen receptor β for monitoring estrogen mimics. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72:1529-1537
120. Gale WL, Patiño R, Maule AG 2004 Interaction of xenobiotics with estrogen receptors α and β and a putative plasma sex hormone-binding globulin from channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *General and Comparative Endocrinology* 136:338-345
121. Katagi T 2010 Bioconcentration, bioaccumulation, and metabolism of pesticides in aquatic organisms. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 204:1-132
122. von Hofsten J, Olsson P-E 2005 Zebrafish sex determination and differentiation: Involvement of FTZ-F1 genes. *Reproductive Biology and Endocrinology* 3:63-73
123. Tamagawa Y, Hirai H, Kawai S, Nishida T 2005 Removal of estrogenic activity of endocrine-disrupting genistein by ligninolytic enzymes from white rot fungi. *FEMS Microbiology Letters* 244:93-98
124. Tamagawa Y, Yamaki R, Hirai H, Kawai S, Nishida T 2006 Removal of estrogenic activity of natural steroidal hormone estrone by ligninolytic enzymes from white rot fungi. *Chemosphere* 65:97-101
125. Sun L, Wen L, Shao X, Qian H, Jin Y, Liu W, Fu Z 2010 Screening of chemicals with anti-estrogenic activity using in vitro and in vivo vitellogenin induction responses in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 78:793-799
126. Palumbo AJ, Denison MS, Doroshov SI, Tjeerdema RS 2009 Reduction of vitellogenin synthesis by an aryl hydrocarbon receptor agonist in the white sturgeon (*Acipenser Transmontanus*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 28:1749-1755
127. Shanle EK, Xu W 2011 Endocrine disrupting chemicals targeting estrogen receptor signaling: identification and mechanisms of action. *Chemical Research in Toxicology* 24:6-19
128. McAvoy DC, Schatowitz B, Jacob M, Hauk A, Eckhoff WS 2002 Measurement of triclosan in wastewater treatment systems. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21:1323-1329
129. Diano N, Grano V, Fraconte L, Caputo P, Ricupito A, Attanasio A, Bianco M, Bencivenga U, Rossi S, Manco I, Mita L, Del Pozzo G, Mita DG 2007 Non-isothermal bioreactors in enzymatic remediation of waters polluted by endocrine disruptors: BPA as a model of pollutant. *Applied Catalysis B: Environmental* 69:252-261
130. Nicolucci C, Rossi S, Menale C, Godjevargova T, Ivanov Y, Bianco M, Mita L, Bencivenga U, Mita D, Diano N 2011 Biodegradation of bisphenols with immobilized laccase or tyrosinase on polyacrylonitrile beads. *Biodegradation* 22:673-683

9. Artículos

Laccase-Mediated Transformations of Endocrine Disrupting Chemicals Abolish Binding Affinities to Estrogen Receptors and Their Estrogenic Activity in Zebrafish

Cristina Torres-Duarte · María Teresa Viana ·
Rafael Vazquez-Duhalt

Received: 16 March 2012 / Accepted: 1 August 2012
© Springer Science+Business Media, LLC 2012

Abstract Endocrine disrupting chemicals (EDCs) are known to mainly affect aquatic organisms, producing negative effects in aquaculture. Transformation of the estrogenic compounds 17 β -estradiol (E2), bisphenol-A (BPA), nonylphenol (NP), and triclosan (TCS) by laccase of *Corioloopsis gallica* was studied. Laccase is able to efficiently transform them into polymers. The estrogenic activity of the EDCs and their laccase transformation products was evaluated in vitro as their affinity for the human estrogen receptor alpha (hER α) and for the ligand binding domain of zebrafish (*Danio rerio*) estrogen receptor alpha (zfER α LBD). E2, BPA, NP, and TCS showed higher affinity for the zfER α LBD than for hER α . After laccase treatment, no affinity was found, except a marginal affinity of E2 products for the zfER α LBD. Endocrine disruption studies in vivo on zebrafish were performed using the induction of vitellogenin 1 as a biomarker (VTG1 mRNA levels). The use of enzymatic bioreactors, containing immobilized laccase, efficiently eliminates the endocrine activity of BPA and TCS, and significantly reduces the effects of E2. The potential use of enzymatic reactors to eliminate the endocrine activity of EDCs in supply water for aquaculture is discussed.

Keywords Bisphenol-A · Endocrine disruption · Estrogen receptor · Zebrafish · Laccase · Nonylphenol · Triclosan · Immobilized laccase · Vitellogenin

Introduction

Endocrine disruption in human and wildlife has been a major research topic in recent years. The chemical nature of endocrine disrupting chemicals (EDCs) is very diverse and includes pesticides, plastic additives, flame retardants, phytosterols, detergents, and pharmaceuticals

C. Torres-Duarte · R. Vazquez-Duhalt (✉)
Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Col.
Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico
e-mail: vazqduh@ibt.unam.mx

M. T. Viana
Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, Baja
California, Mexico

[1]. It has been found they may act by two main pathways: (1) through hormone receptors (estrogenic and androgenic receptors, and G-protein coupled estrogen receptor, GPER) activating or inhibiting gene expression [2] and (2) by altering the synthesis or degradation of the hormones naturally present in the organisms (i.e., aryl hydrocarbon receptor, AhR) [3, 4]. Since the majority of the EDCs have been found to be of estrogenic nature, their affinity for the estrogen receptor alpha ($ER\alpha$), specially from human, has been used as a tool to estimate the estrogenic activity of a compound [5, 6]. Also, the induction of vitellogenin (Vtg) has been reported as a reliable biomarker of endocrine disruption in fish [7].

Hundreds of compounds are classified as endocrine disruptors, being bisphenol-A (BPA), nonylphenol (NP), and triclosan (TCS) specially regarded as EDCs. BPA is used for the synthesis of different types of plastics, and it has been found BPA leaching from baby bottles, reusable water bottles, food containers, and metallic food cans with inner coatings [8]. NP is used in the manufacture of antioxidants, lubricating oil additives, and mostly in the production of nonylphenol ethoxylates surfactants. Nonylphenol ethoxylates are used widely as detergents, emulsifiers, wetting and dispersing agents, antistatic agents, demulsifiers, and solubilizers [9, 10]. TCS is a broad spectrum antimicrobial used as an ingredient in disinfectants, soap, detergent, toothpaste, mouthwash, deodorant, shampoo, and plastic additives [11]. Due to their wide use, these EDCs are commonly found in wastewaters, mainly affecting aquatic organisms [12]. Their affinity for the $ER\alpha$ is orders of magnitude lower than 17β -estradiol (E2), the most potent natural estrogen in vertebrates [13]. However, the concentrations at which they can be found in nature are in the order of micrograms per liter, several orders of magnitude higher than E2 [1].

The negative health effects reported in fish caused by EDCs include loss of secondary sexual characteristics, lessened egg fertility, feminization of males, defeminization of females, intersex, and increased embryo mortality and deformities [14]. There is the imperative need to search for an effective method to treat the water used in aquaculture in order to eliminate the negative effects of EDCs that may impact the food quality and production. Among the different methods proposed for the EDCs removal [15–18], the enzymatic transformation by oxidoreductases seems to be effective [19, 20]. Laccase (EC 1.10.3.2) is one of the most promising enzymes for the transformation of EDCs because it is a very robust enzyme, it only needs oxygen as a cosubstrate and is able to transform a wide variety of substrates producing free radicals and water [21].

In this work, the potential use of immobilized laccase for the treatment of waters polluted with endocrine disrupting chemicals, especially those used for aquaculture, is studied. The transformation kinetics of different EDCs by the laccase of *Coriolopsis gallica* was determined and the endocrine activity, before and after enzymatic transformation, on both human and zebrafish estrogen receptors was analyzed. The endocrine activities of E2, BPA, NP, and TCS in zebrafish were measured as the induction of vitellogenin 1 (Vtg1) before and after laccase treatment.

Experimental Section

Enzyme and Chemicals Laccase from *Coriolopsis gallica* UAMH 8260 was produced and purified as previously reported [22]. Purified laccase from *C. gallica* had a specific activity of 412 U per milligram of protein. This laccase has a molecular weight of 66 kDa determined by SDS-PAGE, a carbohydrate content of 21 % (w/w glucose equivalents), and 3.3 copper atoms per laccase molecule [23]. The compounds β -sitosterol (BSS), bisphenol-A (BPA), nonylphenol technical grade (NP), triclosan (TCS), and 17β -estradiol (E2) were purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). HPLC-grade organic solvents acetonitrile, ethyl acetate, tetrahydrofuran (THF), and dimethyl sulfoxide (DMSO) were obtained from Fisher Scientific (Springfield, NJ, USA). Buffer salts and other reagents were purchased from J.T.

Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Prepolymer HYPOL 2002 was kindly provided by DOW Chemical Mexico.

Laccase activity Laccase activity was estimated spectrophotometrically by the oxidation of 50 μM syringaldazine at 530 nm ($\epsilon_{530}=64,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [24] in 100 mM acetate buffer, pH 4.5. Protein content was determined with the BioRad protein reagent using bovine serum albumin as protein standard. One laccase unit is defined as the amount of protein needed for the oxidation of 1 μmol of syringaldazine per minute.

Enzymatic Transformation of EDCs Enzymatic reactions were carried out in 1 mL reaction mixture in 100 mM acetate buffer pH4.5 containing 25 % acetonitrile for E2, NP, and TCS, or 5 % for BPA. Reactions were performed at room temperature and started by adding from 0.5 to 8 U of laccase, depending on the substrate. The extent of the reaction was estimated by the decrease of the corresponding EDC peak analyzed by HPLC, and quantified using a calibration curve. Average values and standard deviations of each reaction condition were calculated from three independent replicates. The catalytic constants were determined varying the EDC concentration until catalytic saturation. The transformation rate values were fitted to the Michaelis–Menten equation using the EnzFitter software (Biosoft, Cambridge, UK).

HPLC Analysis The quantitative analysis of E2, NP, BPA, and TCS was performed on a HPLC system coupled to a photodiode array detector (Perkin Elmer, USA). A reverse phase C₁₈ column (250×4 mm, 5 μm) Nucleosil (Macherey–Nagel, Düren, Germany) was used for the chromatographic separation. The reaction samples were eluted at 1 mLmin⁻¹ with (A) Milli-Q water and (B) acetonitrile as elution solvents. The gradient program was set as follows: (a) For NP and TCS, the elution started with 50 % B and then the solvent proportion was linearly increased to 100 % B within 8 min, and it was kept constant for 1 min. (b) For BPA and E2, the gradient initiated with 30 % B, increased to 70 % B within 10 min, and kept constant for 1 min. E2 was detected at a wavelength of 220 nm, BPA at 225 nm, and NP and TCS at 230 nm.

Identification of Reaction Products For product identification, reactions were scaled up to 100 mL. The EDCs concentrations in the reaction mixtures were 1 mM BPA, 0.5 mM E2, 0.5 mM NP, or 1 mM TCS. Reactions were performed at room temperature and monitored by HPLC until no substrate was detected. For BPA, the reaction was stopped after 18 h, when equilibrium was reached and not all substrate was transformed. After enzymatic transformation, the reaction mixture was centrifuged to recuperate the precipitate that was dried at 75 °C for approximately 2 h until constant weight was obtained. The precipitate dissolved in THF was analyzed by gel permeation chromatography using a Phenogel 10⁵ Å column (300×7.8 mm, 5 μm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA). The compounds were eluted with 100 % THF at 1 mLmin⁻¹. Polyvinyl standards were used to determine the molecular weight of the polymers. The compounds were detected at 250 nm.

The supernatant was acidified with sulfuric acid and extracted with ethyl acetate. The organic phase was passed through sodium sulfate to eliminate the water, and the solvent was evaporated under vacuum. The chemical nature of products was determined by gas chromatography coupled to a mass spectrometry detector, GC–MS (Agilent 6890N Gas chromatograph with 5973 Mass selective detector).

Cloning of Zebrafish ER α LBD One microgram of total RNA from adult male zebrafish was reverse transcribed with oligodT (Invitrogen). The entire coding region of zfER α cDNA (GenBank AB037185.1) was amplified by PCR with oligonucleotides zfcds5F (5'-

ATGTACCCTAAGGAGGAGCACAGCGCGGGG-3') and zfcds3F (5'-TCAGGGGT CAGGGCTATGGCTGTGACAGGC-3'). The following PCR protocol was used: denaturation for 2 min at 94 °C, followed by 30 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 65 °C, and 2 min at 68 °C. The reaction was terminated with a final extension of 7 min at 68 °C. The coding region was used as a template to amplify the ligand binding domain, zfER α LBD, with primers zfNheI5F (5'-CATAGGGCTAGCCCTGACCAGGTGCTGCTGCTG-3') and zfBamHI3R (5'-GAATTCGGGATCCTCAGGGGTCAGGGCTATGGC-3'). The following PCR protocol was used: denaturation for 2 min at 94 °C, followed by 5 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 55 °C, and 1 min at 68 °C; then, 30 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 70 °C, and 1 min at 68 °C. The reaction was terminated with a final extension of 10 min at 68 °C. PCR products were cloned in the NheI and BamHI sites of pET28b (NovagenTM), after the amino terminal His-tag sequence. *Escherichia coli* Rosetta 2 cells were chemically transformed with the pET28b recombinant plasmid.

Protein Expression and Purification Overnight cultures of the transformed cells were used to inoculate 50 mL of LB medium supplemented with 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of kanamycin. The cells were incubated at 37 °C, up to an $\text{OD}_{600\text{nm}}=0.6$, then the expression of zfER α LBD was induced with 1 mM IPTG and the culture temperature was cooled to 29 °C. After 12 h, cells were harvested by centrifugation and resuspended in binding buffer (20 mM phosphate buffer, 0.5 M NaCl, 5 mM imidazole, pH8.0). Lysozyme (Sigma) and Complete EDTA-free (RocheTM) protease inhibitor cocktail were added. The cells were lysed by sonication. The extract was centrifuged at 20,000 $\times g$ at 4 °C for 20 min. The supernatant was filtered through of 0.2 μm cellulose nitrate membrane. The purification was performed on a Ni²⁺ affinity chromatography column (GE Healthcare) previously equilibrated with binding buffer. The His6-zfER α LBD was loaded on the column, and nonspecific binding was removed by increasing the imidazole concentration to 250 mM. Elution was performed with 500 mM imidazole. Protein concentration was determined with the BioRad protein reagent using bovine serum albumin as standard. Protein purity was evaluated by SDS-PAGE electrophoresis.

ER α Competitor Assay An anisotropy assay was performed to examine the in vitro binding to ER α of the different EDCs before and after the laccase treatment. The analysis method from PanVera kit supplier (PanVera, Madison, WI, USA) was modified, using coumestrol as alternative fluorophore. hER α (PanVera, Madison, WI, USA) or recombinant zfER α LBD (100 nM) was added to coumestrol (10 nM) in assay buffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 1.5 mM EDTA, 0.4 g L^{-1} blocking agent, and 10 % glycerol, pH8.0). The complex was then added to successive dilutions of either the EDC or the transformation product. To allow the proper solubility of the compounds, 2 % of DMSO was used. The preparations were incubated for 12 h at 25 °C in the dark. Fluorescence values were read using an Aminco SLM 8000 spectrofluorometer upgraded by Olis (Bogart, GA, USA), at 355 nm excitation and 405 nm emission [25]. Each data point in the anisotropy assay was run in triplicate. The data obtained was fitted to the equation:

$$r = m_{100} + \frac{m_0 - m_{100}}{1 + 10^{(\log \text{IC}_{50} - x) \cdot \text{HS}}}$$

Where r =anisotropy, x =log [EDC], m_{100} =100 % binding (all coumestrol is displaced), m_0 =0 % binding (all coumestrol is bound to the ER α), and HS=Hill slope. Curve fitting was performed using Origin[®] software from Origin Lab Corporation. Since the binding affinity measured is dependent on the affinity of coumestrol for the ER α , IC_{50} values are referred as relative IC_{50} . Relative binding affinity (RBA) was

calculated as previously reported [25]:

$$\text{RBA} = \frac{\text{IC}_{50}(\text{E2})}{\text{IC}_{50}(\text{EDC})} \times 100\%$$

Enzyme Immobilization Laccase was immobilized according to a modified method proposed by Bakker et al. [26]. Shortly, 900 μL of an enzyme solution containing 1 mg of laccase in phosphate buffer 60 mM (pH6.0) was mixed with 100 μL of Brij-52 (4 % solution w/v in *t*-butanol) and 37.5 μL of CoCl_2 (1 mM in water). This solution was added to 1 g of the prepolymer Hypol 2002. The mixture was stirred for 1 min at room temperature and then was stored in ice until the volume increase ceased. Then, foams were stored at 4 °C for at least 2 h before being washed with phosphate buffer 60 mM (pH6.0) until no laccase activity was detected in the washing buffer. The foam was then frozen in liquid nitrogen, crushed, and lyophilized. Activity of immobilized laccase was measured with 100 μM syringaldehyde ($\epsilon_{320}=8,500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [27] in acetate buffer 100 mM (pH4.5). We obtained an activity of 0.5 U of laccase per gram of foam.

Zebrafish Exposure Experiments and Sample Collection A stock solution of each EDC was prepared in DMSO (100 %). Healthy zebrafish (*Danio rerio*) of 43 dpf were obtained from a local fish farm (Granja Acuaria Antártico, Cuernavaca, Mexico). Fish were acclimatized in glass tanks at room temperature (25 ± 2 °C) for 2 days with a photoperiod of 12 h light/12 h dark and were fed twice a day with a commercial diet. In preliminary experiments, we determined the concentration at which the corresponding EDC induces Vtg1 expression. The selected concentrations were NP 10 nM, E2 100 nM, TCS 1 μM , and BPA 10 μM , in water containing 1 % DMSO. To directly assess the effect of laccase treatment, the transformation product of the corresponding EDC was tested at equivalent concentrations. Also, treated water using an enzymatic bioreactor was tested. Water containing the corresponding concentration of the EDC was passed through a column (2.5×15 cm) packed with immobilized laccase (1.5 U) at a flow rate of 5 mL min^{-1} . No water recirculation was used. Control fish were raised in rearing water with 1 % DMSO. Exposure was set under semi-static conditions, based on 50 % renewal of the water three times during the experiment, maintaining the contaminant concentration. Five fish were reared in 700 mL of each solution in glass flasks placed into larger aquaria with heated water maintaining the temperature at 27 ± 2 °C. Three independent replicates in separated glass flasks were used for each treatment. After 7 days of treatment, fish were anesthetized on ice, then kept on dry ice and stored at -80 °C until analysis.

Isolation of RNA and Reverse Transcription Whole zebrafish were crushed in liquid nitrogen. The tissue was homogenized in 250 μL TRI Reagent (Sigma, USA). Total RNA was isolated according to the manufacturer's instructions. The absorbance ratio 260/280 nm was measured in a Nanodrop. The banding patterns on a 1 % agarose gel were used to verify the quality of the RNA in each sample. One microgram of total RNA was treated with DNase I, RNase-free (Fermentas, USA) according to manufacturer's instructions. Reverse transcription of mRNA was carried out with the SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, USA). Finally, samples were diluted 500-fold and 1 μL was used for the real-time quantitative polymerase chain reaction.

Gene Expression Analysis Real-time quantitative PCR was performed using a StepOne Real Time PCR system (Applied Biosystems, USA). The qPCR reactions were carried out using Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2 \times) (Fermentas, USA). Oligonucleotide

primer pairs of vitellogenin 1 (Vtg1) and housekeeping gene (elongation factor 1-alpha, Elfa) were used as follows: Vtg1 forward 5'-AACGAACAGCGAGAAAGAGATTG-3', reverse 5'-GATGGGAACAGCGACAGGA-3' corresponding to positions 3895–4024 (NM_001044897); Elfa forward 5'-CTACAACCCTGCCAGTGTTGC-3', reverse 5'-GTACCGCTAGCATTACCCTCC-3' corresponding to positions 578–709 (AY422992). Elfa transcript was used to standardize the results by eliminating variations in mRNA and cDNA quantity since its expression did not change following any of the treatments. The following PCR protocol was used: denaturation for 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C. The correct primer amplification was confirmed on agarose gels. The relative quantification of gene expression among the treatment groups was analyzed by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. Results were analyzed by ANOVA.

Results

Of the compounds assayed for laccase transformation, only β -sitosterol was not substrate. The catalytic constants obtained for the transformation of BPA, E2, NP, and TCS was adjusted to a Michaelis–Menten kinetics (Table 1). Laccase is able to transform the EDCs with very similar catalytic efficiencies, except for TCS which shows a value one order of magnitude lower.

During the reactions, the media turned turbid and the precipitate was recovered by centrifugation. Gravimetric measurements showed that the total amount (100 %) of transformed substrate was found as a polymeric insoluble material for E2, NP, and TCS, while for BPA the precipitate accounted for the 85 % of the transformed substrate. The average molecular weight of the precipitate was determined by gel permeation chromatography, being of 1.6 kDa for E2, 2.4 kDa for BPA, 1.1 kDa for NP, and 1.3 kDa for TCS. According to the molecular weight, the produced polymers contained an average of 5 monomeric units for NP and TCS, 6 units for E2, and 10 units for BPA.

After supernatant extraction with ethyl acetate and analysis by GC–MS, soluble products were only detected for BPA and trace amounts of NP products (Table 2). For BPA, traces of hydroquinone (Fig. 1a I) and 4-isopropenylphenol, in a higher proportion (Fig. 1a II), were found. These two BPA products were identified by comparison with mass spectra of standard compounds. In addition, after spectrum interpretation, another secondary soluble product from BPA was identified (Fig. 1a III). In the case of NP, traces of a dimer (Fig. 1b) was identified as the only soluble product. The chemical nature of these compounds shows that they can be the building blocks of the obtained polymers since they could be further transformed by laccase, making the chemical structure of the polymers complex and diverse.

In order to assess if after laccase treatment the EDCs are still able to interact with the ER α , the *in vitro* affinity of the polymers for the ER α of both human and zebrafish was tested. Previous studies of the activation of the zfER α by steroids have been performed with CHO cells [28]. However, the use of the isolated receptor is here proposed since polymers will be tested and their internalization into the cell might be a limiting step. In previous studies, the ligand binding domain

Table 1 Catalytic constants of the laccase transformation of different endocrine disrupting chemicals

Compound	k_{cat} (s ⁻¹)	K_M (mM)	k_{cat}/K_M (s ⁻¹ mM ⁻¹)	R^2
17 β -Estradiol	33.3	0.89	37.4	0.98
Nonylphenol	17.5	0.42	42.2	0.98
Bisphenol-A	13.9	0.67	20.7	0.97
Triclosan	1.5	0.97	1.5	0.99

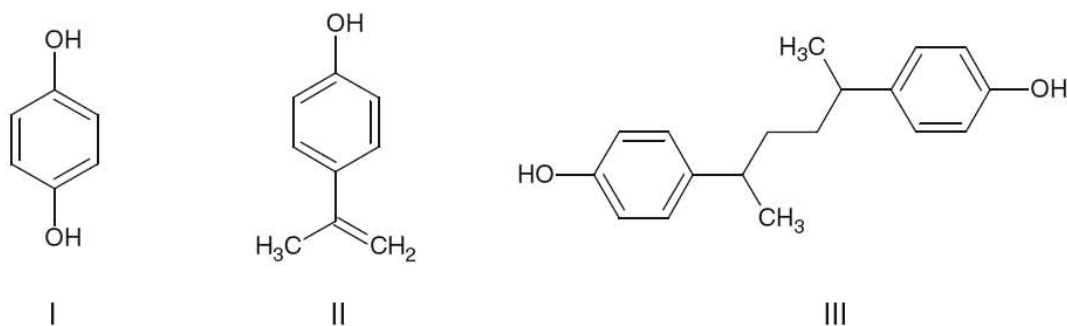
Table 2 Spectral data of transformation products of BPA and NP by laccase identified by GC–MS

Compound	<i>m/z</i> (Relative intensity)
Hydroquinone (Fig. 2a I)	39(10), 50(6), 53(24), 54(18), 55(11), 61(6), 63(7), 81(33), 82(18), 108(10), 109(6), 110 [M ⁺] (100), 111(9)
4-Isopropenylphenol (Fig. 2a II)	39(8), 51(6), 63(6), 65(12), 66(6), 77(12), 89(5), 91(27), 94(11), 105(8), 107(8), 119(76), 120(7), 133(22), 134 [M ⁺] (100)
Bisphenol-A dimer (Fig. 2a III)	39(5), 41(6), 65(8), 77(11), 91(13), 95(6), 107(21), 119(19), 134(19), 135(100), 136(10), 213(14), 270 [M ⁺] (0.1)
Nonylphenol dimer (Fig. 2b)	41 (18), 43(37), 55(16), 57(23), 71 (18), 75(22), 134(31), 135(27), 141(20), 148 (21), 155(15), 207(20), 253(18), 323(18), 353 (100), 354(26), 367(20), 381(24), 395(24), 409(93), 410(32), 423(64), 424(22), 437(29), 438 [M ⁺] (14)

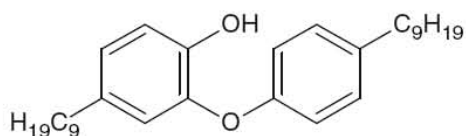
of the ER α was used for in vitro measurements because it is the portion of the protein where the EDCs bind [29]. Different *E. coli* strains were tested and the best results were obtained with Rosseta 2, but even so, most of the produced protein was found in inclusion bodies. Eiler et al. [29] reported that the addition of E2 to the culture media increased the obtained amount of soluble protein due to a more stable conformation of the LBD when it is bound to the hormone. This strategy was not used because the zfER α LBD is needed in its native conformation. Under our culture conditions, 0.86 mg of protein per liter of culture was obtained and showed to be prone to precipitation. The zfER α LBD showed good storage stability at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in a buffer containing 50 mM Tris–HCl (pH8.0), 500 mM KCl, 2 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM ammonium orthovanadate, and 10 % glycerol. The partially purified zfER α LBD (80 % purity) showed a molecular weight of 34.8 kDa.

Coumestrol is a fluorescent dye that when it binds to the ER α , its polarization increases. When another compound with affinity for the ER α is present, it displaces the coumestrol and its polarization decreases. Thus, the affinity of E2, BPA, NP, and TCS for the human ER α (hER α) and the zfER α LBD by anisotropy was measured (Table 3). The affinity of TCS for the hER α

(a) BPA products



(b) NP product

**Fig. 1** Products of the laccase-mediated enzymatic transformation of **a** BPA and **b** NP, identified by GC–MS

was not possible to determine because it reached its solubility limit at 50 μM , where it showed no affinity. The insoluble polymers, which are the main reaction products, were dissolved first in DMSO and added to the affinity assay mixture. The final DMSO concentration was 2 %. For the hER α , the reaction products from E2 and NP were assayed using 20 times the IC₅₀ of untransformed compounds (92.6 ngmL⁻¹ and 9.9 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively). BPA polymers were less soluble and the maximum concentration reached in the system was 21 $\mu\text{g mL}^{-1}$, which is equivalent to the IC₅₀ of untransformed BPA. For TCS transformation products, the concentration tested was 140 $\mu\text{g mL}^{-1}$. At the concentrations assayed, no affinity was found for any of the EDCs reaction products. For the zfER α LBD, the RBA values of untransformed EDCs were higher than those obtained from hER α , suggesting that zebrafish are more sensitive to the presence of EDCs. For the transformation products of NP, BPA, and TCS, no affinity was found either using concentrations 20 times higher than their IC₅₀ equivalent concentrations of untransformed EDCs. The transformation product of E2 showed a relative IC₅₀ of 46.7 $\mu\text{g mL}^{-1}$, which is equivalent to 5.5 % of RBA of untransformed E2.

The in vitro experiments suggest that laccase treatment products of EDCs do not show affinity for the ER α . To complement these results, in vivo experiments were performed with zebrafish, using the induction of Vtg1 as biomarker. During the exposure experiments, no fish mortality was detected. The levels of Vtg1 expression after the different treatments are shown in Fig. 2. Untransformed E2 showed the highest Vtg1 induction followed by BPA and TCS. NP showed no significant induction compared to the control. After laccase treatment, the Vtg1 induction with the E2 product was reduced to 23 %. However, it is still able to strongly induce Vtg1. The products from BPA and TCS showed very low induction of Vtg1 (0.038 % and 0.638 %, respectively) when compared with equivalent concentrations of untreated EDCs. For NP laccase product, down-regulation of Vtg1 was observed. The use of enzymatic bioreactors with immobilized laccase show Vtg1 inductions statistically equal to the values observed by laccase product of E2, BPA, and TCS. For NP, the Vtg1 down-regulation is eliminated, having expression levels equivalent to those observed in control experiments.

Discussion

Laccase of *C. gallica* is a high redox potential oxidoreductase with 0.74 V at pH4.5 [30] that has proven to be efficient in the transformation of dyes, polycyclic aromatic hydrocarbons, and pesticides [31–33]. This laccase is also very efficient in the transformation of EDCs

Table 3 Relative IC₅₀ values and relative binding affinities of different EDCs tested with the hER α and zfER α LBD

Compound	hER		zfER α LBD	
	Relative IC ₅₀ (μM)	RBA (%) ^a	Relative IC ₅₀ (μM)	RBA (%) ^a
17 β -Estradiol	0.018 (0.997) ^b	100	0.009 (0.992)	100
Bisphenol-A	95.3 (0.999)	0.02	1.14 (0.996)	0.83
Nonylphenol	2.21 (0.996)	0.80	0.64 (0.901)	1.47
Triclosan	ND ^c	–	19.3 (0.991)	0.05

^a RBA relative binding affinity.

^b In parentheses, the correlation coefficient is shown

^c ND not detected

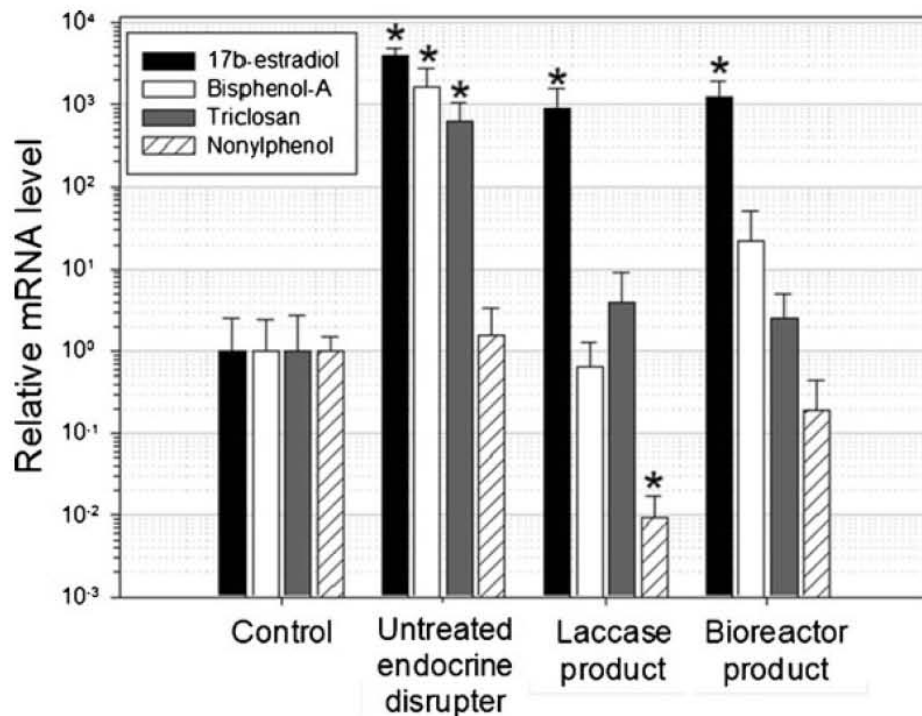


Fig. 2 Vitellogenin1 mRNA levels in zebrafish exposed to different treatments: untreated EDCs, laccase transformation product, and products from bioreactor with immobilized laccase. The concentration of the endocrine disrupting chemicals and equivalent concentration of products were 100 nM E2, 10 μ M BPA, 1 μ M TCS, or 10 nM NP. The fish treatment was performed for 7 days. Values were normalized against *Elfa* and represent the mean mRNA expression value (\pm SD) as compared to controls. The asterisks (*) indicate a significant difference ($p < 0.05$) relative to controls from three independent experiments. Relative expression levels are plotted on a log scale

(Table 1), with k_{cat} values from 1.5 to 33.3 s^{-1} and catalytic efficiencies in the order of per second per millimolar. Laccases from other organisms are also able to transform EDCs [19], but unfortunately most of the papers report transformation as transformation percentage and only a few show kinetic data. *C. gallica* laccase showed to be five times more efficient in the transformation of E2 and BPA than laccases of *Trametes versicolor* and *Trametes villosa*, respectively [34, 35]. Cabana et al. [36] reported the transformation of BPA and TCS by laccase of *Corioloropsis polyzona* with catalytic efficiencies two-fold higher than those obtained with laccase from *C. gallica*. From the EDCs tested, only β -sitosterol was not transformed, probably because it is not a phenolic compound such as the other EDCs assayed. The ionization potentials of hydroxycycloalkanes are significantly higher than those of phenols [37], and thus laccase is not able to transform them.

Laccases are known to produce free radicals that can undergo polymerization [38]. After laccase transformation of BPA, E2, NP, and TCS, dimers are formed [36, 39]. As mentioned in the “Results” section, we found that laccase from *C. gallica* mainly transformed the EDCs to polymers with an average molecular weight of more than 1 kDa. For BPA, polymers have been previously identified, and up to hexamers have been characterized [35, 40]. Here, the chemical structure of the polymers was not determined, but it is expected to be unevenly distributed since a wide variety of radicals can be produced during the reaction [40].

Structure–activity relationships for xenoestrogens have been studied for 120 aromatic chemicals [13]. Three structural criteria were found, based on E2 structure: (1) the hydrogen-bonding ability of the phenolic ring mimicking the A-ring; (2) a hydrophobic centre similar in size and shape to the B- and C-rings; and (3) a hydrogen-bond donor mimicking the 17 β -

hydroxyl moiety of the D-ring, especially with an oxygen-to-oxygen distance similar to that between the 3- and 17 β -hydroxyl groups of E2. However, a structural criterion is not enough to determine which compounds act as EDCs, and experimental measurements need to be performed. The relative IC₅₀ of the EDCs before transformation was determined for both human and zebrafish ER α (Table 3). At the concentrations tested, TCS did not show binding affinity for the hER α , probably because the hydroxyl group is not placed in *para* position.

Reported values of E2 affinity for hER α , estimated with different methods, vary from 0.2 to 26.4 nM [6, 25, 41–44]. We obtained an IC₅₀ of 18 nM, which is one and two orders of magnitude higher than the values reported by Olsen et al. [43] and Matthews et al. [41], respectively, both measured by scintillation competitive binding assay. Nevertheless, it is closer to the values reported by Gurer-Orhan et al. [25] and Parker et al. [44] which were determined by a fluorescence competitive binding assay. The differences observed are probably due to the measurement method used [12].

The IC₅₀ values of E2 reported for fish are more homogeneously distributed, being in the same order of magnitude even among different species [41–43, 45–48]. However, the affinity of BPA and NP show significant differences among the different fish species. It is possible that the receptors have structural differences that cause different affinities for the EDCs. However, it is not easy to validate this since, to date, there are no crystallographic structures available for any estrogen receptor of fish. Using homology-modeled structure of zfER α , it was found that the only difference between human and zebrafish binding site is the mutation L349M [49]. It might be not that significant, but differences in the distances calculated between the key binding site residues and E2 are also observed. These differences could be more significant when other compound is bound.

Our results show that the RBA of BPA, NP, and TCS for the zfER α LBD are higher than those obtained for the hER α meaning that zebrafish would be more affected by EDCs. Besides, fish are constantly exposed to EDCs which can enter the organism through food, gills, or epithelial tissue [50]. Also, many fish species do not have sex-specific chromosomes, and sex is determined by environmental factors [51]; thus, when fish are exposed to estrogen mimics, entire populations can be feminized leading to species extinction [52].

After laccase transformation, the affinity of the EDCs is diminished probably due to the bulkier size of the polymers that would create a steric hindrance for their interaction with the ER α LBD. Laccase has been reported to eliminate the affinity of natural estrogens for the hER α [53, 54]. For E2, we found that the affinity for hER α was abolished after laccase treatment, whereas for zfER α LBD it was diminished to 5.5 % of the untransformed E2. The remaining endocrine activity could be due to the presence of E2 dimers [36, 39], which could still have affinity for the zfER α LBD. In contrast, polymers of BPA are of higher average molecular weight (2.4 kDa) and affinity was abolished for both hER α and zfER α LBD. More importantly, the main reaction products precipitate in aqueous solutions meaning that in natural environments would precipitate, and thus be less bioavailable.

The results obtained *in vitro* were complemented by the experiments with zebrafish. After 1 week of exposure, untransformed E2, BPA, and TCS significantly increased Vtg1 expression. Although TCS has been regarded as a weak estrogen in *Oryza latipes* [55], here we demonstrated its potential as an endocrine disrupter in zebrafish. After laccase treatment, BPA and TCS products lost their capacity to induce Vtg1, while E2 product still could induce it, but at a significantly lower level than E2 before treatment. This is in accordance with the results *in vitro* where BPA and TCS products lost their affinity and E2 products still show affinity for the zfER α LBD. Again, the polymeric nature of the products could hamper either the interaction with the zfER α , or they may not even be able to enter the organism. NP

had no effect before transformation, but after laccase treatment, it down-regulated Vtg1. Some compounds have been reported to down-regulate Vtg1, like tamoxifen [56]. However, the mechanism of action of tamoxifen is mediated by the ER α , which is probably not the case for NP laccase product since results in vitro showed no affinity for the zfER α LBD. It is possible that NP products can act through a signaling pathway independent of ER α , like interactions with the aryl hydrocarbon receptor as has been reported in sturgeon [57, 58].

Water quality is a crucial matter for aquaculture since many farms are placed inland or on the seashore where urban, agricultural, and industrial activities release xenobiotic compounds that may pollute the aquaculture water source. To facilitate the enzymatic treatment of water in aquaculture systems, the use of immobilized laccase is proposed. Different systems using immobilized laccase have proven to be effective in the elimination of EDCs [59–61]. However, little attention has been paid to the efficiency in the elimination of endocrine activity. In this work, we demonstrated that the use of immobilized laccase is as effective as the use of free laccase in the elimination of estrogenic activity of E2, BPA, and TCS in zebrafish. In the case of NP, where a down-regulation of Vtg1 induction after laccase treatment is observed, the use of immobilized laccase reduces this down-regulation, probably because the products are trapped in the polyurethane matrix. Thus, the use of immobilized laccase in aquaculture systems can eliminate the estrogenic effects caused by water pollutants, such as feminization and infertility, improving the product quality.

Besides the possible application to aquaculture systems, this method has the potential to be used as an additional step in wastewater treatment plants, or even for the production of bottled water where these pollutants also have been found [62].

We can conclude, so far, that laccase of *C. gallica* is able to efficiently transform BPA, E2, NP, and TCS to polymeric material, transformation that eliminates their affinity for the ER α of both human and zebrafish. The use of immobilized laccase has the potential to be used for the elimination of the estrogenic activity of pollutants found in water used for aquaculture.

Acknowledgments We thank Dr. Takuya Nishigaki for his help in the spectrofluorometric analyses, and Dr. Armando Bravo and Dr. Omar Pantoja for their technical support with real-time PCR analysis. We also thank Jorge Hernández and Jaime García for technical support in fish culture. This work was supported by a grant from the National University of Mexico (DGAPA-UNAM IN-201611) and by scholarship from the National Council of Science and Technology (C. Torres-Duarte).

References

1. Johnson, A., & Jürgens, M. (2003). *Pure and Applied Chemistry*, 75, 1895–1904.
2. Thomas, P., Alyea, R., Pang, Y., Peyton, C., Dong, J., & Berg, A. H. (2010). *Steroids*, 75, 595–602.
3. Milnes, M. R., Bermudez, D. S., Bryan, T. A., Edwards, T. M., Gunderson, M. P., Larkin, I. L. V., Moore, B. C., & Guillette, J. L. J. (2006). *Environmental Research*, 100, 3–17.
4. Sanderson, J.T. (2006) *Toxicological Sciences*, 94, 3–21.
5. Gutendorf, B., & Westendorf, J. (2001). *Toxicology*, 166, 79–89.
6. Pillon, A., Boussioux, A.-M., Escande, A., Aït-Aïssa, S., Gomez, E., Fenet, H., Ruff, M., Moras, D., Vignon, F., Duchesne, M.-J., Casellas, C., Nicolas, J.-C., & Balaguer, P. (2005). *Environmental Health Perspectives*, 113, 278–284.
7. Kausch, U., Alberti, M., Haindl, S., Budczies, J., & Hock, B. (2008). *Environmental Toxicology*, 23, 15–24.
8. Vandenberg, L. N., Maffini, M. V., Sonnenschein, C., Rubin, B. S., & Soto, A. M. (2009). *Endocrine Reviews*, 30, 75–95.
9. Soares, A., Guieysse, B., Jefferson, B., Cartmell, E., & Lester, J. N. (2008). *Environment International*, 34, 1033–1049.
10. Vazquez-Duhalt, R., Marquez-Rocha, F., Ponce, E., Licea, A. F., & Viana, M. T. (2006). *Applied Ecology and Environmental Research*, 4, 1–25.

11. Dann, A. B., & Hontela, A. (2011). *Journal of Applied Toxicology*, *31*, 285–311.
12. Oberdörster, E., & Cheek, A. O. (2001). *Environmental Toxicology and Chemistry*, *20*, 23–36.
13. Schultz, T. W., Sinks, G. D., & Cronin, M. T. D. (2002). *Environmental Toxicology*, *17*, 14–23.
14. Giesy, J. P., & Snyder, E. M. (1998). In R. J. Kendall, R. L. Dickerson, J. P. Giesy, & W. A. Suk (Eds.), *Principles and processes for evaluating endocrine disruption in wildlife* (pp. 155–237). Pensacola: SETAC.
15. Imai, S., Shiraiishi, A., Gamo, K., Watanabe, I., Okuhata, H., Miyasaka, H., Ikeda, K., Bamba, T., & Hirata, K. (2007). *Journal of Biosciences and Bioengineering*, *103*, 420–426.
16. Lee, B.-C., Kamata, M., Akatsuka, Y., Takeda, M., Ohno, K., Kamei, T., & Magara, Y. (2004). *Water Research*, *38*, 733–739.
17. Liu, Z.-H., Kanjo, Y., & Mizutani, S. (2009). *Science of the Total Environment*, *407*, 731–748.
18. Vidal, G., Becerra, J., Hernández, V., Decap, J., & Xavier, C. R. (2007). *Journal of Biosciences and Bioengineering*, *104*, 476–480.
19. Cabana, H., Jones, J. P., & Agathos, S. N. (2007). *Engineering in Life Sciences*, *7*, 429–456.
20. Tsutsumi, Y., Haneda, T., & Nishida, T. (2001). *Chemosphere*, *42*, 271–276.
21. Pointing, S. B. (2001). *Applied Microbiology and Biotechnology*, *57*, 20–33.
22. Tinoco, R., Pickard, M. A., & Vazquez-Duhalt, R. (2001). *Letters in Applied Microbiology*, *32*, 331–335.
23. Vandertol-Vanier, H. A., Vazquez-Duhalt, R., Tinoco, R., & Pickard, M. A. (2002). *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *29*, 214–220.
24. Chefetz, B., Chen, Y., & Hadar, Y. (1998). *Applied and Environmental Microbiology*, *64*, 3175–3179.
25. Gurer-Orhan, H., Kool, J., Vermeulen, N. P. E., & Meerman, J. H. N. (2005). *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, *85*, 149–161.
26. Bakker, M., van de Velde, F., van Rantwijk, F., & Sheldon, R. A. (2000). *Biotechnology and Bioengineering*, *70*, 342–348.
27. Camarero, S., Ibarra, D., Martinez, M. J., & Martinez, A. T. (2005). *Applied and Environmental Microbiology*, *71*, 1775–1784.
28. Menuet, A., Pellegrini, E., Anglade, I., Blaise, O., Laudet, V., Kah, O., & Pakdel, F. (2002). *Biology of Reproduction*, *66*, 1881–1892.
29. Eiler, S., Gangloff, M., Duclaud, S., Moras, D., & Ruff, M. (2001). *Protein Expression and Purification*, *22*, 165–173.
30. De la Mora, E., Lovett, J. E., Blanford, C. F., Garman, E. F., Valderrama, B., & Rudino-Pinera, E. (2012). *Acta Crystallographica Section D*, *68*, 564–577.
31. Pickard, M. A., Roman, R., Tinoco, R., & Vazquez-Duhalt, R. (1999). *Applied and Environmental Microbiology*, *65*, 3805–3809.
32. Reyes, P., Pickard, M. A., & Vazquez-Duhalt, R. (1999). *Biotechnology Letters*, *21*, 875–880.
33. Torres-Duarte, C., Roman, R., Tinoco, R., & Vazquez-Duhalt, R. (2009). *Chemosphere*, *77*, 687–692.
34. Auriol, M., Filali-Meknassi, Y., Adams, C. D., Tyagi, R. D., Noguero, T.-N., & Piña, B. (2008). *Chemosphere*, *70*, 445–452.
35. Fukuda, T., Uchida, H., Suzuki, M., Miyamoto, H., Morinaga, H., Nawata, H., & Uwajima, T. (2004). *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *79*, 1212–1218.
36. Cabana, H., Jones, J. P., & Agathos, S. N. (2007). *Journal of Biotechnology*, *132*, 23–31.
37. Levin, R. D., & Lias, S. G. (1982). *Ionization potential and appearance potential measurements, 1971–1981*. Washington, D. C.: U.S. Dept. of Commerce, National Bureau of Standards.
38. Gianfreda, L., Xu, F., & Bollag, J.-M. (1999). *Bioremediation Journal*, *3*, 1–26.
39. Nicotra, S., Intra, A., Ottolina, G., Riva, S., & Danieli, B. (2004). *Tetrahedron-Asymmetry*, *15*, 2927–2931.
40. Uchida, H., Fukuda, T., Miyamoto, H., Kawabata, T., Suzuki, M., & Uwajima, T. (2001). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *287*, 355–358.
41. Matthews, J., Celius, T., Halgren, R., & Zacharewski, T. (2000). *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *74*, 223–234.
42. Nakai, M. (2003). MEDAKA: development of test methods and suitability of medaka as test organism for detection of endocrine disrupting chemicals. Ministry of the Environment, Japan and Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan, pp. 21–26.
43. Olsen, C. M., Meussen-Elholm, E. T. M., Hongslo, J. K., Stenersen, J., & Tollefsen, K.-E. (2005). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Toxicology and Pharmacology*, *141*, 267–274.
44. Parker, G. J., Law, T. L., Leno, F. J., & Bolger, R. E. (2000). *Journal of Biomolecular Screening*, *5*, 77–88.
45. Gale, W. L., Patiño, R., & Maule, A. G. (2004). *General and Comparative Endocrinology*, *136*, 338–345.
46. Kloas, W., Schrag, B., Ehnes, C., & Segner, H. (2000). *General and Comparative Endocrinology*, *119*, 287–299.
47. Passos, A. L. S., Pinto, P. I. S., Power, D. M., & Canario, A. V. M. (2009). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *72*, 1529–1537.

48. Rider, C. V., Hartig, P. C., Cardon, M. C., & Wilson, V. S. (2009). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28, 2175–2181.
49. Costache, A. D., Pullela, P. K., Kasha, P., Tomasiewicz, H., & Sem, D. S. (2005). *Molecular Endocrinology*, 19, 2979–2990.
50. Katagi, T. (2010). *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 204, 1–132.
51. von Hofsten, J., & Olsson, P.-E. (2005). *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3, 63–73.
52. Kidd, K. A., Blanchfield, P. J., Mills, K. H., Palace, V. P., Evans, R. E., Lazorchak, J. M., & Flick, R. W. (2007). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 8897–8901.
53. Tamagawa, Y., Hirai, H., Kawai, S., & Nishida, T. (2005). *FEMS Microbiology Letters*, 244, 93–98.
54. Tamagawa, Y., Yamaki, R., Hirai, H., Kawai, S., & Nishida, T. (2006). *Chemosphere*, 65, 97–101.
55. Ishibashi, H., Matsumura, N., Hirano, M., Matsuoka, M., Shiratsuchi, H., Ishibashi, Y., Takao, Y., & Arizono, K. (2004). *Aquatic Toxicology*, 67, 167–179.
56. Sun, L., Wen, L., Shao, X., Qian, H., Jin, Y., Liu, W., & Fu, Z. (2010). *Chemosphere*, 78, 793–799.
57. Palumbo, A. J., Denison, M. S., Doroshov, S. I., & Tjeerdema, R. S. (2009). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28, 1749–1755.
58. Shanle, E. K., & Xu, W. (2011). *Chemical Research in Toxicology*, 24, 6–19.
59. Diano, N., Grano, V., Fraconte, L., Caputo, P., Ricupito, A., Attanasio, A., Bianco, M., Bencivenga, U., Rossi, S., Manco, I., Mita, L., Del Pozzo, G., & Mita, D. G. (2007). *Applied Catalysis B: Environmental*, 69, 252–261.
60. Cabana, H., Alexandre, C., Agathos, S. N., & Jones, J. P. (2009). *Bioresource Technology*, 100, 3447–3458.
61. Nicolucci, C., Rossi, S., Menale, C., Godjevargova, T., Ivanov, Y., Bianco, M., Mita, L., Bencivenga, U., Mita, D., & Diano, N. (2011). *Biodegradation*, 22, 673–683.
62. Li, X., Ying, G.-G., Su, H.-C., Yang, X.-B., & Wang, L. (2010). *Environment International*, 36, 557–562.

Producción a escala piloto de lacasa de *Coriolopsis gallica*

Rosa Román, Cristina Torres-Duarte,
Marcela Ayala, Rafael Vázquez-Duhalt

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos. 62250 México

Production of laccase from *Coriolopsis gallica* at pilot plant scale

Abstract. The production of laccase from the ligninolytic fungi *Coriolopsis gallica* was carried out at pilot plant scale in a 100 L bioreactor. A cheap fermentation medium was used containing 3% Bran Flakes in 60 mM phosphate buffer, pH 6.0 containing 0.8 mM copper sulfate. A total of 630 650 laccase units were obtained in 7-days cultures. After few purification steps, including centrifugation, ultracentrifugation, ammonium sulfate precipitation, and two ionic exchange chromatographies, a partially purified preparation was obtained with 79% of laccase showing a specific activity of 313 U/mg.

Key words: fungal laccases, enzyme production, white rot fungi.

Resumen. Se realizó la producción de lacasa del hongo ligninolítico *Coriolopsis gallica* a escala piloto en un fermentador de 100 L. La fermentación se realizó en un medio muy económico consistente de 3% de bran flakes en un amortiguador de fosfatos de sodio 60 mM, pH 6.0, conteniendo 0.8 mM de sulfato de cobre. Se obtuvieron 630 650 unidades de actividad lacasa en 7 días de cultivo. Después de pocos pasos de purificación que consistieron en centrifugación, ultrafiltración, precipitación con sulfato de amonio y dos cromatografías de intercambio iónico, se obtuvo una preparación parcialmente pura con 79% de lacasa y una actividad específica de 313 U/mg.

Palabras clave: lacasas fúngicas, producción de enzima, hongos de la pudrición blanca.

Received 20 April 2010; accepted 28 September 2010.

Recibido 20 de abril 2010; aceptado 28 de septiembre 2010.

Introducción

Lacasas

La lacasa (EC 1.10.3.2, *p*-difenoil:dioxígeno oxidorreductasa) es una enzima que cataliza la oxidación de sustratos utilizando al oxígeno molecular como aceptor de electrones. Esta enzima debe su nombre a que fue primeramente aislada del árbol de laca, *Rhus verniciifera* (Yoshida, 1883). La presencia de lacasa en otras plantas superiores es escasa. También se ha aislado de algunas bacterias, pero

principalmente se encuentra en hongos (Valderrama *et al.*, 2003).

La lacasa fúngica típica es una proteína de aproximadamente 60-70 kDa con un punto isoeléctrico ácido de alrededor de pH 4.0, y con un óptimo de actividad entre 50°C y 70°C (Baldrian, 2006). Es una glicoproteína cuya glicosilación es responsable de la estabilidad estructural de la enzima (Vite-Vallejo *et al.*, 2009). También se ha encontrado que protege a la enzima de la proteólisis y la inactivación por radicales libres (Morozova *et al.*, 2007).

La lacasa es una enzima comúnmente monomérica que normalmente contiene 4 átomos de cobre unidos a 3 sitios

Autor para correspondencia: R. Vázquez-Duhalt
vazqduh@ibt.unam.mx

redox, clasificados de acuerdo a sus características espectroscópicas (Battistuzzi *et al.*, 2005): El sitio tipo 1 (T1) es mononuclear y le confiere el color azul a la enzima en solución y se caracteriza por una banda de absorción a 600 nm ($\epsilon \approx 5000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Morozova *et al.*, 2007). El sitio tipo 2 (T2) también es mononuclear y presenta una geometría metálica trigonal y propiedades de resonancia paramagnética nuclear comparables con los complejos tetragonales de Cu(II). Finalmente, el sitio tipo 3 (T3) es dinuclear y presenta un estado basal diamagnético que se origina por el acoplamiento antiferromagnético fuerte entre los dos iones Cu(II), conectados por un ión hidroxilo. En el sitio T1 el sustrato interactúa con la enzima y se lleva a cabo la sustracción de un electrón, mientras que en el sitio T2/T3 se lleva a cabo la reducción del oxígeno a agua.

El potencial redox de la lacasa depende del organismo de origen, variando entre 0.5 y 0.8 V (Riva, 2006). Se ha propuesto que la identidad del ligando axial que coordina al cobre del sitio T1 afecta el potencial redox de la enzima (Morozova *et al.*, 2007). Con base en la estructura cristalográfica de la lacasa de *Trametes versicolor*, Piontek *et al.* (2002) han sugerido que la longitud del enlace entre una de las histidinas que coordinan al cobre del sitio T1 modula el potencial redox.

En la Figura 1 se muestra un esquema del ciclo catalítico de la lacasa, la cual actúa por un mecanismo tipo ping-pong que inicia cuando el cobre del sitio T1 oxida al

sustrato, preferencialmente fenoles y anilinas, y se genera un radical libre (Petersen y Degn, 1978). El electrón extraído es transferido a través de un motivo tripéptido His-Cys-His, conservado en las lacasas. El electrón llega al sitio T2/T3 donde el oxígeno molecular es reducido a agua (Baldrian, 2006). El resultado global de este proceso es la reducción de una molécula de oxígeno a 2 moléculas de agua y la oxidación de 4 moléculas de sustrato para producir 4 radicales libres (Riva, 2006). Aunque la lacasa cataliza la oxidación de una gran variedad de compuestos, su catálisis está limitada por el bajo potencial redox de esta enzima, comparado con el de las peroxidasas (d'Acunzo *et al.*, 2002).

Usos y potencial industrial de las lacasas

La baja especificidad de la lacasa es una característica que ha sido explotada en una gran variedad de procesos industriales. La función natural de la lacasa, la degradación de lignina, ha sido utilizada principalmente por la industria de la producción de papel. En 1997 Novo Nordisk patentó el sistema Lignozym® que utiliza un sistema lacasa-mediador para disminuir el contenido de lignina y aumentar la brillantez del papel (Call y Mücke, 1997). Este mismo sistema ha sido aplicado en la industria alimentaria para la clarificación de jugos, cervezas y vinos (Rodríguez-Couto y Toca-Herrera, 2006). La lacasa tiene un potencial importante en procesos de biorremediación debido a su eficiencia en la transformación de contaminantes como hidrocarburos poliaromáticos,

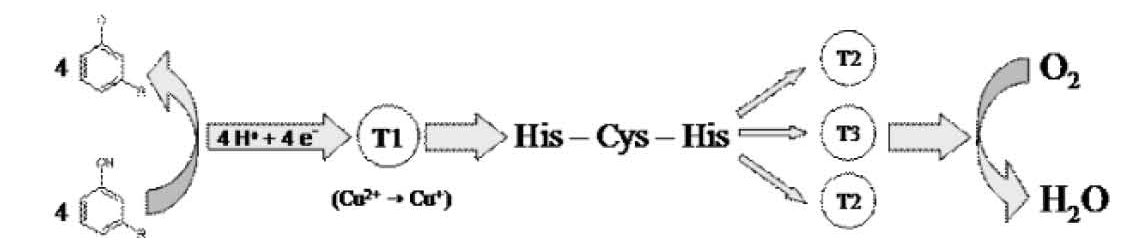


Figura 1. Ciclo catalítico de la lacasa.

plaguicidas, explosivos, disruptores endócrinos, bifenilos policlorados y colorantes sintéticos, entre otros (Pointing, 2001). Por su capacidad de transformar gran variedad de colorantes industriales, se ha sugerido su uso tanto para el saneamiento de efluentes de plantas industriales como para el tratamiento de fibras textiles (Rodríguez *et al.*, 1999; Robinson y Nigam, 2008.). En 1996 Novozyme patentó un producto basado en la lacasa llamado DeniLite® y en la actualidad es utilizado ampliamente en la producción de mezcilla (Rodríguez-Couto y Toca-Herrera, 2006). La industria cosmética también ha aprovechado la capacidad de decoloración de esta enzima para sustituir al H₂O₂ en los tintes para el cabello (Yoshino *et al.*, 2001), e incluso es utilizada en formulaciones para el aclarado de la piel (Rodríguez-Couto y Toca-Herrera, 2006). En la industria farmacéutica puede ser utilizada para la síntesis de antibióticos, como cefalosporinas, y nuevas variedades de penicilinas, así como para llevar a cabo reacciones de acoplamiento de compuestos fenólicos y para la producción de polímeros biológicamente activos (Witayakran y Ragauskas, 2009). Al generar un flujo de electrones durante la catálisis, la lacasa se ha utilizado para la fabricación de biosensores. Por ejemplo, para la detección de compuestos fenólicos en el vino (Fernandes y Rebelo, 2009), determinar la presencia de morfina y codeína, de algunos tipos de flavonoides, e incluso de algunos neurotransmisores (Rodríguez-Couto y Toca-Herrera, 2006). Esta misma característica se ha explotado para la producción de celdas de combustible como una fuente de energía limpia (Sztó *et al.*, 2009).

Una ventaja más de la lacasa es que sus aplicaciones pueden ampliarse a través del uso de mediadores, por lo que el diseño de nuevos compuestos que sean mediadores eficientes y no tóxicos es de suma importancia (Torres-Duarte *et al.*, 2009). Por ejemplo, en la transformación de hidrocarburos aromáticos policíclicos la actividad mejoró significativamente en presencia de mediadores (Vandertol-Vanier *et al.*, 2002; Pickard *et al.*, 1999a). Por otro lado, las

técnicas de inmovilización deben ser mejoradas con el fin de lograr que la enzima sea reusable y estable por largos tiempos y así facilitar su aplicación tanto en procesos a gran escala como en sistemas nanométricos.

Lacasa de *Corioloopsis gallica*

En cuanto a la producción de lacasa por el basidiomiceto *Corioloopsis gallica*, se encuentran pocas referencias en la literatura. Calvo y colaboradores (Calvo *et al.*, 1998) reportaron la producción de lacasa por *Corioloopsis gallica*; la enzima resultó interesante por su capacidad de transformar diferentes colorantes industriales. La proteína se caracterizó bajo condiciones desnaturalizantes y se determinó un peso de 84.1 kDa. Se identificaron 4 isoenzimas con puntos isoeléctricos de 4.15, 4.20 y 4.27 (dos de ellas tienen el mismo *pI*). Su actividad máxima se obtuvo a pH 3, y a una temperatura de 70°C, con actividad estable a 28°C. Su vida media fue de 32 días a 37°C y 8 días a 60°C.

Por otro lado, la lacasa proveniente de la cepa de *Corioloopsis gallica* UAMH 8260 del herbario de la Universidad de Alberta en Canadá (University of Alberta Microfungus Collection and Herbarium) presentó una sola isoenzima con un *pI* de 3.4, un peso molecular de 66 kDa determinado por SDS-PAGE, y de 56.6 kDa determinado por MALDI-TOF, un contenido de carbohidratos de 21% (w/w, equivalentes de glucosa), y 3.3 átomos de cobre por molécula de lacasa (Vandertol-Vanier *et al.*, 2002). Aunque el potencial redox de esta lacasa no se ha determinado, de acuerdo a la secuencia de aminoácidos reportada (PDB 2vds), esta lacasa comparte los motivos conservados de las secuencias de las lacasas de alto potencial redox (Morozova *et al.*, 2007). En la Figura 2 se muestra un diagrama del sitio catalítico de esta lacasa. Se puede observar que contiene el motivo His-Cys-His conservado a través del cual pasan los electrones extraídos por el cobre T1 hacia el sitio T2/T3. Además, esta lacasa contiene los 4 átomos de cobre coordinados por histidinas.

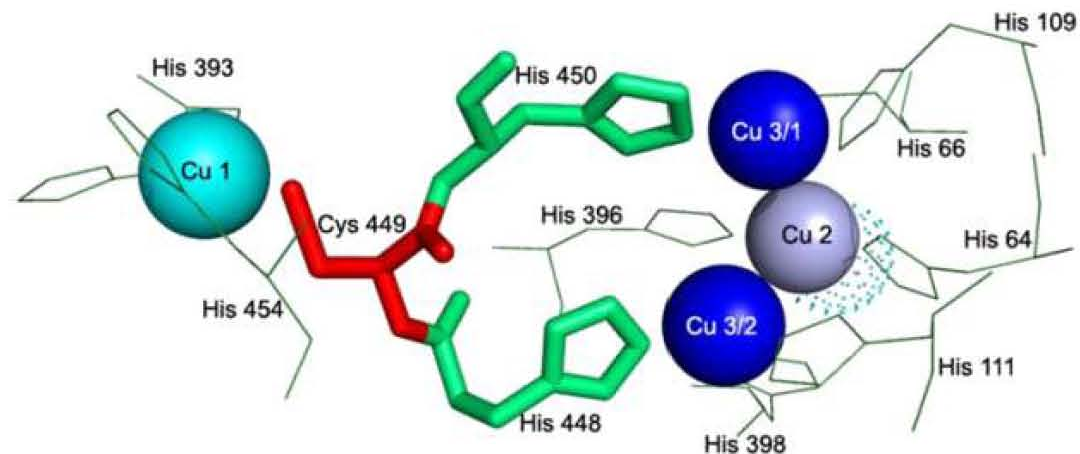


Figura 2. Estructura del sitio catalítico de la lacasa de *Corioloopsis gallica* UAMH 8260 (Protein Data Bank: <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=2VDS>).

Por lo anterior, queda de manifiesto la importancia de la lacasa en la nueva química “verde”; con el fin de desarrollar aplicaciones comerciales, su producción a gran escala es imperativa. En este trabajo presentamos la experiencia del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México en la producción a escala piloto de lacasa de *Corioloopsis gallica*.

Materiales y métodos

Cepa y reactivos

La cepa de *Corioloopsis gallica* UAMH 8260 fue obtenida de la Colección de Microhongos y herbario de la Universidad de Alberta. Para su mantenimiento, la cepa fue crecida a 28°C por 7 días en cajas Petri con medio de papa-dextrosa-agar (PDA). Posteriormente se conservó a 4°C.

La siringaldazina y la glucosa fueron obtenidas de Sigma-Aldrich. El extracto de levadura, el extracto de malta y el medio PDA fueron adquiridos de Difco. Las sales fueron compradas a J. T. Baker. Como sustrato orgánico para la fermentación piloto se usó Bran Flakes comerciales

(Kellogg's, Queretaro) triturados en mortero.

Cultivos

Los preinóculos crecieron en matraces Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 100 mL de medio GMY modificado como describe Mester *et al.* (1996). Este medio soporta excelente crecimiento pero relativamente bajos niveles de producción enzimática (Pickard *et al.* 1999b) y contiene por litro: 10 g de glucosa, 3.5 g extracto de malta, 2 g extracto de levadura, 2 g fosfato de potasio, 0.5 g sulfato de magnesio, 0.1 g bacto peptona, 1 mL de solución de minerales (0.5 mg sulfato de cobre, 0.16 mg sulfato de manganeso, 0.14 mg de sulfato de zinc, 0.29 mg de cloruro de cobalto en 1 litro). El medio se ajusta a un pH de 4.5. Los matraces fueron inoculados con 1cm² de micelio de las cajas Petri previamente homogenizados con un homogenizador (Sorvall, Norwalk, Conn) por 10 segundos. Los matraces se colocaron en agitación orbital a 150 rpm a 29°C.

Los inóculos para el fermentador se prepararon en matraces Fernbach de 3 litros conteniendo 1 litro de medio GMY. Se usaron 4 matraces para inocular el fermentador de 100 litros.

Fermentación Piloto

Se utilizó un fermentador enchaquetado de 40 cm de diámetro y 106 cm de altura. El fermentador está equipado con un motor de un caballo de fuerza, un impulsor de 19 cm de diámetro tipo Rushton y difusor de dona. El fermentador piloto, localizado en la planta piloto del Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca, fue preparado con 100 litros del medio Bran Flakes (Pickard *et al.*, 1999b) que consiste en 3% de Bran Flakes en un amortiguador de 60 mM de fosfatos de sodio, pH 6.0 enriquecido con 0.8 mM de CuSO_4 (Tinoco *et al.*, 2010). Este medio ha sido reportado como inductor de producción de altas concentraciones de lacasa (Pickard *et al.* 1999b; Tinoco *et al.*, 2001). La fermentación se detuvo al séptimo día y se recuperó el caldo de cultivo para su posterior tratamiento.

Actividad enzimática

La actividad de la lacasa se evaluó a lo largo de la fermentación y en los diferentes pasos de purificación, utilizando como sustrato 50 μM de siringalazina (4-hidroxí-3,5-dimetoxibenzaldehidazina) en un amortiguador de acetatos 100 mM, pH 4.5 (Tinoco *et al.*, 2001). La actividad fue monitoreada a una longitud de onda de 530 nm y estimada con un coeficiente de extinción de $64\,000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Una unidad de actividad (U) fue definida como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de 1 μmol de sustrato en un minuto. El contenido de proteína en las preparaciones de lacasa fue determinado con el método de Bradford (1976) usando el reactivo de Bio-Rad y la albúmina de suero bovino (BSA) como estándar.

Purificación de la enzima

El caldo de cultivo (100 litros) se centrifugó en una centrífuga tubular marca Sharples Modelo AS-16 a 15 000 RPM (13 200 g). Posteriormente, el sobrenadante se concentró por ultrafiltración en un equipo de fibra hueca de 20 litros marca Amicon Modelo DC 10 L. La primera filtración se realizó en

un cartucho de fibra hueca (H5 MP-43) con un corte de 0.1 μm . La segunda filtración y concentración se realizó con un cartucho (H10 P10-20) con un corte de 10 000 Da, obteniéndose un volumen de 3.8 litros.

La solución enzimática concentrada se sometió a un fraccionamiento por precipitación con sulfato de amonio. La primera precipitación se llevó a cabo con 50% de saturación a 4°C. El precipitado se desechó y el sobrenadante se llevó al 100% de saturación de sulfato de amonio. El precipitado de esta segunda fracción se redisolvió en 900 mL de amortiguador 60 mM de fosfato de sodio, pH 6.0. La solución enzimática se dividió en volúmenes de 100 mL y dializó en una membrana de 12 000 Da contra 4 L de un amortiguador 10 mM de fosfatos, pH 6.0, a 4°C. El solvente de diálisis se cambió dos veces.

La solución se sometió a una cromatografía de intercambio aniónico débil sobre DEAE-celulosa (dietilaminoetilcelulosa) de Sigma-Aldrich Co, eluyendo con un gradiente de NaCl de 0 a 1 M en un amortiguador 10 mM de fosfatos pH 6.0. Las fracciones que presentaron actividad fueron colectadas y concentradas en una celda de ultrafiltración con una membrana de 10 000 Da de corte. Finalmente, la solución se sometió a una cromatografía de intercambio aniónico fuerte utilizando resina High Q (Bio-Rad laboratorios) y eluyendo con un gradiente de NaCl de 0 a 1 M en un amortiguador 10 mM de fosfatos pH 6.0.

Resultados y discusión

Las lacasas fúngicas son excretadas al medio por los hongos filamentosos (Bollag y Leonowicz, 1984). Las más altas producciones de lacasa son alcanzadas por los cultivos de hongos de pudrición blanca o ligninolíticos (Leonowicz *et al.*, 1997), que son los microorganismos más eficientes para transformar la lignina en CO_2 y agua. Por su importancia y potencial industrial, la producción de lacasas a gran escala es

un desafío de actualidad. Las diferentes morfologías del crecimiento de los hongos filamentosos afectan la reología del caldo de fermentación, afectando por ende la productividad del biorreactor. Los efectos de la reología del caldo sobre la biomasa, momentum y transferencia de calor en un biorreactor han sido ampliamente estudiados (Charles, 1985; Moo-Young *et al.*, 1987). La gran mayoría de los procesos de fermentación de hongos filamentosos en la industria son cultivos sumergidos.

Los fermentadores aireados más empleados en la industria son de tipo tanque agitado, representando el 93% (en valor del producto) de toda la producción biotecnológica (Li *et al.*, 2009). En la configuración mayormente empleada en los reactores tipo tanque agitado mecánicamente la altura del líquido normalmente iguala el diámetro del tanque y la agitación se suministra por una turbina de disco de 6 hojas, tipo Rushton, con un diámetro de $1/3$ el diámetro del tanque (d_t). La distancia entre la turbina y la base del tanque por lo general es igual a un diámetro del impulsor. Estos fermentadores cuentan además con cuatro o más deflectores igualmente espaciados, con un ancho igual a $d_t/12$, para prevenir la formación de vórtices. La dispersión del gas (aire u oxígeno) se realiza a través de un distribuidor de gas (*sparger*), situado debajo del impulsor, en el eje de la vasija. Este distribuidor en ocasiones se reduce a una simple tobera, aunque en otros casos se usan dispositivos más o menos complejos. El uso de la turbina tipo disco evita que se produzca la canalización del gas por el eje del impulsor y ayuda a lograr una correcta dispersión del gas en el líquido. Finalmente, los fermentadores están equipados con sondas para medir pH, oxígeno disuelto, espuma, temperatura y potencial redox.

El medio económico y simple de 3% Bran Flakes (Pickard *et al.*, 1999b) que demostró inducir la actividad lacasa, fue enriquecido con 0.8 mM de sulfato de cobre. La presencia de sulfato de cobre en el medio de cultivo demostró inducir significativamente la producción de lacasa en

Pleurotus ostreatus (Tinoco *et al.*, 2010). En la Figura 3 se muestra la cinética de crecimiento de *Corioloopsis gallica* UAMH 8260 medida en términos de la proteína extracelular, así como la cinética de producción de la lacasa. En el medio de Bran Flakes la proteína extracelular aumentó constantemente hasta el tercer día, alcanzando un valor de 450 mg/mL. Simultáneamente, la actividad lacasa aumentó de forma asociada al crecimiento, alcanzando un valor máximo de 32 U/mL al sexto día de cultivo (Figura 3).

El proceso de purificación montado es sencillo, rápido y eficiente. En estas condiciones de cultivo la enzima se produce con buena pureza y solamente un fraccionamiento con sulfato de amonio y dos cromatografías de intercambio iónico fueron suficientes para purificar 3.23 veces a la enzima (Tabla 1). Excepto la ultrafiltración, las demás etapas de purificación tuvieron porcentajes de recuperación de al menos 70%, lo que se encuentra dentro de valores aceptables en procesos a escala comercial. En la ultrafiltración encontramos una pérdida de actividad del 55% principalmente por actividad asociada a partículas de gran tamaño ($>100\ 000$ Da). La pureza de la preparación al final del tren de purificación puede ser claramente observada por el intenso color azul de la solución debido al cobre del sitio T1 (Figura 4A) y verificada electroforéticamente (Figura 4B). Para esta preparación se determinó un grado de pureza de 79% por densitometría en un gel electroforético.

Datos sobre eficiencias en la purificación a nivel piloto en la literatura son inexistentes, sin embargo existen datos de purificaciones a nivel laboratorio que nos sirven de comparación. La purificación de la lacasa del hongo silvestre comestible *Tricholoma mongolicum* consistente en cromatografías de intercambio iónico DEAE-celulosa, CM-celulosa, Q-Sepharosa, y filtración en gel FPLC sobre Superdex 75, se obtuvieron rendimientos del 15% con actividades específicas de 1480 U/mg (Li *et al.*, 2010). Por otro lado, con el uso de filtración, ultrafiltración y precipitación con acetona, la lacasa de *Cerrena unicolor* fue

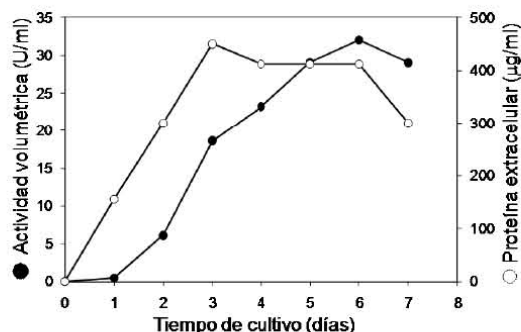


Figura 3. Cinética de crecimiento de *Corioliopsis gallica* y producción de lacasa en un fermentador de 100 L.

A



B

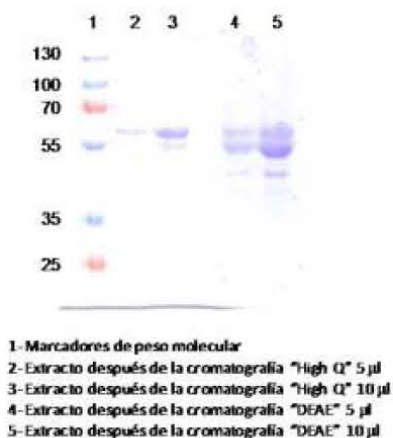


Figura 4. Lacasa purificada de un cultivo de 100 L de *Corioliopsis gallica*. A) Solución de lacasa al final del tren de purificación B) Electroforesis de las fracciones eluidas de cromatografías de intercambio iónico.

purificada con eficiencias del 73% (Bryjak y Rekuć, 2010). García y col. (2007) purificaron la lacasa de *Pycnoporus sanguineus* usando dos etapas de cromatografía de interacción hidrofóbica en fenil-Sepharose obteniendo un rendimiento de solo 8.37%. La lacasa del hongo *Pleurotus sajor-caju* se purificó 10 veces por medio de una precipitación con sulfato de amonio y cromatografías DEAE-celulosa y Sephadex G-100 obteniéndose un rendimiento global del 53% (Murugesan *et al.*, 2006). Finalmente, la lacasa extracelular de *Panus tigrinus* fue purificada por ultrafiltración, cromatografía de intercambio aniónico y filtración en gel hasta una preparación con 317 U/mg y un rendimiento del 66% (Quaratino *et al.*, 2007).

De acuerdo con los datos en la Tabla 1, se produjeron 2 610 000 unidades de lacasa en siete días de cultivo. Considerando la actividad específica de la lacasa de *C. gallica* de 313 U/mg de proteína, se puede estimar que se produjeron aproximadamente 8 339 mg de lacasa por 100 L de cultivo de *Corioliopsis gallica* en 168 horas, lo que equivale a una productividad de 11.9 mg/L/día. La eficiencia global del tren de purificación fue del 24.16%, lo cual arroja un rendimiento para la enzima pura de 28.2 mg por litro de cultivo.

De acuerdo con la literatura, no existen ejemplos sobre la producción de lacasa a la escala que presenta este trabajo. Se ha observado que la producción de lacasa en biorreactores, que van hasta solo 20 L, puede variar entre 0.004 y 740 U/ml, de acuerdo a la especie y a las condiciones de cultivo (Rodríguez-Couto y Toca-Herrera, 2006). Los niveles más altos de producción de lacasa se han alcanzado en cultivos de *Trametes pubescens*, usando sales de cobre como inductor en cultivos de 20 L (Galhaup *et al.*, 2002). Mientras que en cultivo en lote se obtuvieron 330 U/mL en 17 días de fermentación, el cultivo tipo lote alimentado con glucosa permitió incrementar la actividad de lacasa a 740 U/mL en 29 días, siempre y cuando se mantuviera un nivel bajo de glucosa para evitar la represión. Este nivel de producción equivale a una productividad de 24.13 mg/L/día.

Tabla 1. Tren de purificación para la lacasa de *Corioloopsis gallica* 8260 UAMH producida en un fermentador de 100 L

Etapas	Volumen total (mL)	U/mL	µg proteína/mL	U/mg proteína	U totales	Actividad (%)	Factor de purificación
Fermentación	90 000	29	300	97	2 610 000	100	1
Centrifugación	87 000	28	300	93	2 436 000	93.33	1.043
Ultrafiltración	3 815	290	2 302	126	1 106 350	42.39	0.770
Precipitación (NH ₄) ₂ SO ₄	900	1 161	7 348	158	1 045 070	40.04	1.63
Cromatografía DEAE	300	2 950	16 725	176	885 000	33.91	1.81
Cromatografía High Q	56	11 206	35 760	313	630 650	24.16	3.23

La fuente de carbono utilizada en este trabajo no inhibe la producción de la lacasa, sino que la estimula de forma asociada al crecimiento, como se observa en la Figura 3. Algunas estrategias para mejorar el nivel de producción y por tanto la productividad consisten en el uso de inductores, tales como compuestos aromáticos o sales de cobre (Tinoco *et al.*, 2010). Sin embargo, se ha observado que algunos de estos inductores pueden ser tóxicos y el efecto puede variar de manera importante entre especies, requiriéndose concentraciones altas en el medio de cultivo. Actualmente no existe en la literatura información sobre el efecto de inductores en la producción de lacasa de *Corioloopsis gallica*.

Una ventaja del cultivo con *Corioloopsis gallica* es que tiene un tiempo de fermentación corto, lo cual se traduce en una reducción tanto en los costos de operación como en el riesgo de contaminación. Por otro lado se ha comprobado que la lacasa de este hongo, en su forma purificada, presenta altas eficiencias catalíticas (k_{cat}/K_m) cuando se compara con lacasas de diversas cepas de *Pleurotus ostreatus* y *Trametes versicolor* (Tinoco *et al.*, 2001).

Conclusiones

Los resultados de este trabajo muestran la factibilidad de producir y purificar una lacasa de interés industrial de forma

rápida y eficiente. El medio de cultivo utilizado no contiene componentes tóxicos y la fermentación se lleva a cabo en una semana. El tren de purificación es simple y se obtiene un grado de pureza adecuado para las aplicaciones sugeridas de la enzima. Existe la posibilidad de mejorar el nivel de producción y por tanto la productividad a través de estrategias como el uso de inductores, aunque actualmente no existen investigaciones al respecto con *Corioloopsis gallica*.

Agradecimientos

Se agradece al Biól. Mario Caro de la planta piloto del IBT por su apoyo técnico.

Literatura citada

- Baldrian P., 2006. Fungal laccases: occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews* 30:215-242.
- Battistuzzi G., M. Bellei, A. Leonardi, R. Pierattelli, A. De Candia, A. Vila, M. Sola, 2005. Reduction thermodynamics of the T1 Cu site in plant and fungal laccases. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 10:867-873.
- Bollag J.M., A. Leonowicz, 1984. Comparative studies of extracellular fungal laccases. *Applied Environmental Microbiology* 48:849-54.
- Bradford M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Bryjak J., A. Rekuć, 2010. Effective purification of *Cerrena unicolor* laccase using microfiltration, ultrafiltration and acetone precipitation.

- Applied Biochemistry and Biotechnology 160:2219-2235.
- Call H.P., I. Mücke, 1997. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym®-process). *Journal of Biotechnology* 53: 163-202.
- Calvo A.M., J.L. Copa-Patiño, O. Alonso, A.E. González, 1998. Studies of the production and characterization of laccase activity in the basidiomycete *Coriolopsis gallica*, an efficient decolorizer of alkaline effluents. *Archives of Microbiology* 171:31-36.
- Charles M., 1985. Fermentation scale-up: problems and possibilities. *Trends in Biotechnology* 3:134-49.
- d'Acunzo F., C. Galli, B. Masci, 2002. Oxidation of phenols by laccase and laccase-mediator systems. *European Journal of Biochemistry* 269: 5330-5335.
- Fernandes C.I.S., M.J.F. Rebelo, 2009. Polyphenolic biosensors. Application in red wines. *Portugaliae Electrochimica Acta* 27: 457-462.
- Galhaup C., H. Wagner, B. Hinterstoisser, D. Haltrich, 2002. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme and Microbial Technology* 30: 529-536.
- García T.A., M.F. Santiago, C.J. Ulhoa, 2007. Studies on the *Pycnoporus sanguineus* CCT-4518 laccase purified by hydrophobic interaction chromatography. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75:311-318.
- Leonowicz A., L. Gianfreda, J. Rogalski, M. Jaszek, J. Luterek, M. Wojtas-Wasilewska, E. Malarezyk, A. Dawidowicz, M. Fink-Boots, G. Ginalska, N.-S. Cho, 1997. Purification of extracellular *Cerrena unicolor* laccase by means of affinity chromatography. *Journal Korea Tappi* 29:7-17.
- Li M., G. Zhang, H. Wang, T. Ng, 2010. Purification and characterization of a laccase from the edible wild mushroom *Tricholoma mongolicum*. *Journal Microbiology and Biotechnology* 20:1069-1076.
- Li Q., L.M. Harvey, B. McNeil, 2009. Oxidative stress in industrial fungi. *Critical Reviews in Biotechnology* 29:199-213.
- Mester, T., M. Pena, J.A. Field, 1996. Nutrient regulation of extracellular peroxidases in the white rot fungus *Bjerkandera* sp. Strain BOS55. *Applied Microbiology and Biotechnology* 44: 778-784.
- Morozova O.V., G.P. Shumakovich, M.A. Gorbacheva, S.V. Shleev, A.I. Yaropolov, 2007. "Blue" laccases. *Biochemistry* 72: 1136-1150.
- Moo-Young M., B. Halard, D.G. Allen, R. Burrell, Y. Kawase, 1987. Oxygen transfer to mycelial fermentation broths in an air-lift fermenter. *Biotechnology and Bioengineering* 30:746-53.
- Murugesan K., M. Arulmani, I.H. Nam, Y.M. Kim, Y.S. Chang, P.T. Kalaichelvan, 2006. Purification and characterization of laccase produced by a white rot fungus *Pleurotus sajor-caju* under submerged culture condition and its potential in decolorization of azo dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72: 939-946.
- Pickard M.A., R. Roman, R. Tinoco, R. Vazquez-Duhalt, 1999a. Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by *Coriolopsis gallica* UAMH 8260 laccase. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 3805-3809.
- Pickard, M.A., H. Vandertol, R. Roman, R. Vazquez-Duhalt, 1999b. High production of ligninolytic enzymes from white rot fungi in cereal bran liquid medium. *Canadian Journal of Microbiology* 45:627-631.
- Piontek K., M. Antorini, T. Choinowski, 2002. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *Journal of Biological Chemistry* 277: 37663-37669.
- Pointing S.B., 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57: 20-33.
- Protein Data Bank: <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=2VDS>. Última fecha de acceso: Noviembre 20, 2008.
- Quarantino D., F. Federici, M. Petruccioli, M. Fenice, A. D'Annibale, 2007. Production, purification and partial characterisation of a novel laccase from the white-rot fungus *Panus tigrinus* CBS 577.79. *Antonie Van Leeuwenhoek* 91:57-69.
- Riva S., 2006. Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends in Biotechnology* 24: 219-226.
- Robinson T., S.P. Nigam, 2008. Remediation of textile dye waste water using a white-rot fungus *Bjerkandera adusta* through solid-state fermentation (SSF). *Applied Biochemistry and Biotechnology* 151:618-628.
- Rodríguez E., M.A. Pickard, R. Vazquez-Duhalt, 1999. Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. *Current Microbiology* 38: 27-32.
- Rodríguez-Couto S., J.L. Toca-Herrera, 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnology Advances* 24: 500-513.
- Szot K., W. Nogala, J. Niedziolka-Jönsson, M. Jönsson-Niedziolka, F. Marken, J. Rogalski, C.N. Kirchner, G. Wittstock, M. Opallo, 2009. Hydrophilic carbon nanoparticle-laccase thin film electrode for mediator less dioxygen reduction: SECM activity mapping and application in zinc-dioxygen battery. *Electrochimica Acta* 54: 4620-4625.
- Tinoco R., M.A. Pickard, R. Vazquez-Duhalt, 2001. Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. *Letters of Applied Microbiology* 32:331-335.
- Tinoco R., A. Acevedo, E. Galindo, L. Serrano-Carreón, 2010. Increasing *Pleurotus ostreatus* laccase production by culture medium optimization and copper/lignin synergistic induction. *Journal of the Industrial Microbiology and Biotechnology* (en prensa) (DOI 10.1007/s10295-010-0797-3).
- Torres-Duarte C., R. Roman, R. Tinoco, R. Vazquez-Duhalt, 2009. Halogenated pesticide transformation by a laccase-mediator system. *Chemosphere* 77: 687-692.
- Valderrama B., P. Oliver, A. Medrano-Soto, R. Vazquez-Duhalt, 2003. Evolutionary and structural diversity of fungal laccases. *Antonie van Leeuwenhoek* 84: 289-299.
- Vandertol-Vanier H.A., R. Vazquez-Duhalt, R. Tinoco, M.A. Pickard, 2002. Enhanced activity by poly(ethylene glycol) modification of *Coriolopsis gallica* laccase. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 29: 214-220.
- Vite-Vallejo O., L.A. Palomares, E. Dantán-González, H.G. Ayala-Castro, C. Martínez-Anaya, B. Valderrama, J. Folch-Mallol, 2009. The role of N-glycosylation on the enzymatic activity of a *Pycnoporus sanguineus* laccase. *Enzyme and Microbial Technology* 45: 233-239.
- Witayakran S., A.J. Ragauskas, 2009. Synthetic applications of laccase in green chemistry. *Advances in Synthetic Catalysis* 351: 1187-1209.
- Yoshida H., 1883. Chemistry of lacquer (*Urushi*) part 1. *Journal of the Chemical Society* 43:472-486.
- Yoshino T., A. Kimura, Y. Asai, 2001. Hair dye compositions. *European Patent No. Ep1142563*.