



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TESINA

HALOGENACIÓN ENZIMÁTICA DE ESTRÓGENOS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERA QUÍMICA

PRESENTA

ELIZABETH UNDIANO CICERO



Ciudad Universitaria, CD.MX.

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** **Jesús Fernando Montiel Aguirre**

VOCAL: **Profesor:** **Reina García Sánchez**

SECRETARIO: **Profesor:** **Marcela Ayala Aceves**

1er. SUPLENTE: **Profesor:** **Oscar Hernández Meléndez**

2º SUPLENTE: **Profesor:** **Carmina Montiel Pacheco**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

ASESOR DEL TEMA:

MARCELA AYALA ACEVES

SUSTENTANTE:

ELIZABETH UNDIANO CICERO

ÍNDICE GENERAL:

1.	INTRODUCCIÓN.....	3
2.	JUSTIFICACIÓN	4
3.	ESTRÓGENOS: CLASIFICACIÓN Y FUNCIÓN	4
4.	LOS ESTRÓGENOS COMO CONTAMINANTES EMERGENTES	10
5.	ESTROGENOS COMO INTERRUPTORES ENDOCRINOS	12
6.	MECANISMO DE CARCINOGENESIS POR ESTROGENOS	14
7.	SITIOS REACTIVOS PARA LA HALOGENACIÓN ELECTROFÍLICA DE ESTRÓGENOS.....	18
8.	HALOGENACIÓN ENZIMÁTICA	22
9.	CONCLUSIONES.....	28
10.	PERSPECTIVAS.....	29
11.	REFERENCIAS.....	29

1. INTRODUCCIÓN

Los estrógenos son compuestos presentes en el ciclo reproductivo de humanos y otras especies animales; tanto los naturales como los sintéticos se utilizan en medicamentos de reemplazo hormonal, anticonceptivos, y en tratamientos para la infertilidad.

La cantidad de estrógenos en el ambiente ha incrementado en las últimas dos décadas por el uso que tienen en la actualidad los productos que los contienen y a que se degradan lentamente, lo que provoca que se acumulen (Combalbert 2003); sin embargo, la cantidad retenida es menor que la de otros contaminantes, por ello se denominaron *contaminantes emergentes*. Dentro de esta clasificación se encuentran medicamentos, productos de higiene personal, agentes de diagnóstico utilizados en hospitales, entre otros, por ejemplo los tratamientos para la menopausia, los antisépticos, antiinflamatorios, diuréticos, algunas fragancias y el medio para contrastar rayos X.

La exposición prolongada a estrógenos como lo son el estradiol, la equilina y el etinilestradiol puede incrementar el riesgo de desarrollar cáncer de diversos tipos en modelos animales; también son interruptores endócrinos para organismos acuáticos a muy bajas concentraciones.

Liehr y Cavalieri propusieron un mecanismo de carcinogénesis de los estrógenos que involucra dos enzimas, una oxidasa y una oxigenasa que convierte a los estrógenos en catecoles y posteriormente a quinonas, compuestos químicos muy reactivos que suelen formar aductos u oxidar las bases del ADN, lo que genera mutaciones que en ocasiones pueden conducir al desarrollo de cáncer. Una manera de evitar la formación de quinonas es bloqueando las posiciones activas del estradiol con un halógeno como cloro o bromo, y de esa forma impedir que sean sustrato de las oxigenasas y oxidasas (Liu 2003). La halogenación química no es tan amigable con el medio ambiente debido a la alta temperatura en la que se lleva a cabo la reacción y a que utiliza catalizadores tóxicos (Herrera-Rodríguez

2011). Este trabajo propone una alternativa biotecnológica para halogenar los estrógenos con enzimas haloperoxidasas.

2. JUSTIFICACIÓN

Por ser compuestos naturales, no se consideraba a los estrógenos como contaminantes y se pensaba que no causaban ningún daño al medio ambiente, sin embargo, son moléculas potencialmente dañinas, tanto para especies acuáticas como para humanos, a las concentraciones a las que se encuentran en cuerpos de agua y suelos; se han convertido en un problema ambiental gracias a la estabilidad de la molécula y a que las plantas de tratamiento de aguas no están diseñadas para eliminarlos.

Se ha propuesto solucionar este problema modificando la molécula con un átomo de halógeno, pero la forma de realizar la reacción puede no ser la mejor opción, dado que se deben utilizar altas temperaturas y catalizadores tóxicos que pueden ocasionar otros problemas ambientales.

La biotecnología nos da otra opción. Con el uso de enzimas, las reacciones pueden realizarse en condiciones ambientales y estas proteínas no causan otros daños al ambiente por que reaccionan sólo con sustratos específicos. Este trabajo propone la halogenación con el uso de haloperoxidasas, que podría utilizarse en algún proceso de biorremediación, lo que abre nuevas perspectivas en el campo del tratamiento de aguas.

3. ESTRÓGENOS: CLASIFICACIÓN Y FUNCIÓN

Los estrógenos se clasifican según su origen en naturales, semisintéticos, sintéticos, fitoestrógenos o micoestrógenos; en cuanto a su estructura, en esteroideos o no esteroideos y por sus propiedades pueden ser agonistas o antiestrógenos (Malgoza 2013, Serrano 2001).

En cuanto a su estructura, los estrógenos esteroideos son compuestos integrados por una serie de cuatro anillos de carbono unidos entre sí para formar una unidad estructural llamada ciclopentanoperhidrofenantreno (Serrano 2001). Su principal característica es el anillo fenólico A ya que determina la potencia estrogénica junto con el grupo hidroxilo ligado al carbono de la posición 3; de ellos depende la unión selectiva y la alta afinidad de la molécula a receptores de estrógeno. Otra característica es un grupo metilo (R_1) en posición angular, unido al carbono 13 entre los anillos C y D y un grupo cetónico o hidroxilo (R_2 y R_3) en el carbono 16 y 17 del anillo D. El sustituyente de estos últimos determinan que estrógeno es. La estructura del ciclopentanoperhidrofenantreno se muestra en la figura 1.

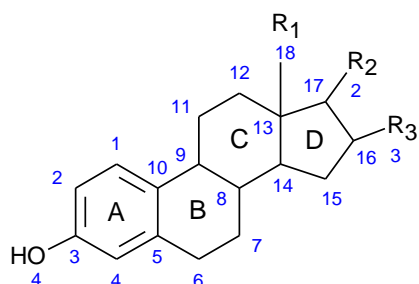


Figura 1. Estructura y numeración general de los estrógenos esteroideos

Existen sustancias que no poseen estructura esteroidea y presentan actividad estrogénica, es decir, son capaces de modificar los caracteres y órganos sexuales secundarios de las hembras. Los xenoestrógenos pertenecen a este grupo por ser sustancias desarrolladas por el humano que, aunque no se diseñan con ese fin, imitan la función de los estrógenos. Ejemplo de ellos son el bisfenol A, un precursor de los plásticos y resinas epóxicas, el nonilfenol, un surfactante industrial, y los ftalatos, usados como plastificantes.

Existen estrógenos de origen distinto al animal, como lo son los de plantas y hongos, que tienen estructura no esteroidea y demuestran su actividad hormonal cuando se administran a los animales. A los primeros se les conoce con el nombre de fitoestrógenos y a los segundos como micoestrógenos. La función de estos compuestos en las propias plantas no es bien conocida y se especula que actúan como mecanismo de defensa frente a herbívoros y agentes patógenos (Serrano 2001).

Los estrógenos naturales de procedencia animal son moléculas relativamente rígidas, lipofílicas, con pesos moleculares de alrededor de 300 Da que pertenecen a la familia de hormonas esteroides, las cuales ejercen una acción reguladora primaria restringida principalmente a los órganos reproductivos; sin embargo, pueden regular otros procesos en tejidos como hueso, hígado, sistema cardiovascular y cerebro (Katzenellenbogen B. *et al.* 2000). Dentro de este grupo hay tres hormonas en el cuerpo humano que se encuentran en mayor medida, cuya cantidad en el cuerpo varía según la edad y el género (Cui 2013):

- 17 β -estradiol (E2): presente durante el ciclo reproductivo de las mujeres
- Estriol (E3): es más abundante durante el embarazo y el producto de la oxidación de estradiol.
- Estrona (E1): se encuentra en mujeres posmenopáusicas y en hombres.

La hormona natural mayoritaria es el estradiol, por el tiempo en el que está presente en la vida de las mujeres. Es un componente importante en los medicamentos utilizados en terapias de reemplazo hormonal y para tratar la infertilidad. Otros compuestos relacionados, tales como el estrógeno sintético etinilestradiol y los estrógenos de origen equino, equilina y equilenina, se utilizan también en la formulación de estos medicamentos (Folmar 2002, Tyler C. 2008). Todos ellos poseen estructuras similares.

Tabla 1. Propiedades de algunos estrógenos (Silva C. 2012)

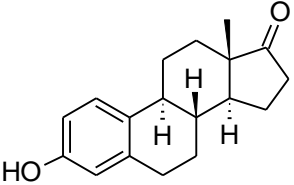
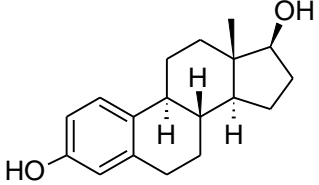
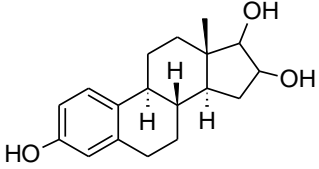
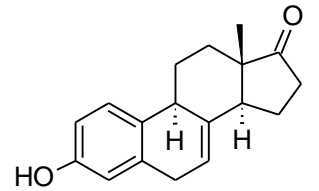
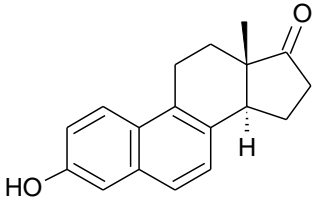
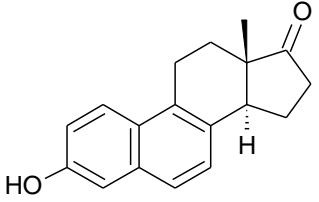
Compuesto	P.M. (g mol^{-1})	Solubilidad en agua (mg L^{-1} 20°C)	Presión de vapor (mmHg)	EC_{50} ^(*) (M)	Actividad estrogénica relativa ^(**)
Estrona (E1) 	270.4	13	2.3×10^{-10}	7.02×10^{-10} (a)	2.54 (a)

Tabla 1 (continuación). Propiedades de algunos estrógenos (Silva C. 2012)

Compuesto	P.M. (g mol ⁻¹)	Solubilidad en agua (mg L ⁻¹ 20°C)	Presión de vapor (mmHg)	EC ₅₀ ^(*) (M)	Actividad estrogénica relativa ^(**)
17β-Estradiol (E2) 	272.4	13	2.3x10 ⁻¹⁰	1.84x10 ^{-11(a)}	100 ^(a)
Estriol (E3) 	288.4	13	6.7x10 ⁻¹⁵	---	17.6 ^(a)
Equilina (EQ) 	268.4	1.4 ^(b)	---	5.5x10 ^{-10(c)}	15 ^(c)
Equilenina (EN) 	266.4	1.52 ^(b)	1.5x10 ⁻⁰⁹	1.2x10 ^{-9(c)}	7 ^(c)
17α-Etinilestradiol (EE2) 	296.4	4.8	4.5x10 ⁻¹¹	6.74x10 ^{-12(a)}	246 ^(a)

(*) EC₅₀: dosis efectiva para producir la mortalidad del 50% de la población de estudio.

(**) La actividad estrogénica relativa es con respecto al 17β-estradiol.

(a) Pillon A. 2005. In vitro, células MELN

(b) Hurwitz A. R.

(c) Tyler 2009. REα humano

Como vemos en la tabla 1, la estructura de algunos estrógenos esteroideos les otorga propiedades fisicoquímicas y bioquímicas en común, por ejemplo, son muy poco solubles en agua y tienen una presión de vapor muy baja, así que son poco volátiles. El estradiol es la hormona natural con mayor efecto estrogénico, pero el etinilestradiol, que es sintético, tiene una actividad más de dos veces mayor.

Las hormonas esteroideas pueden sintetizarse a partir del colesterol dentro del cuerpo humano mediante la formación de progesterona, testosterona y androstenediona (Figura 2).

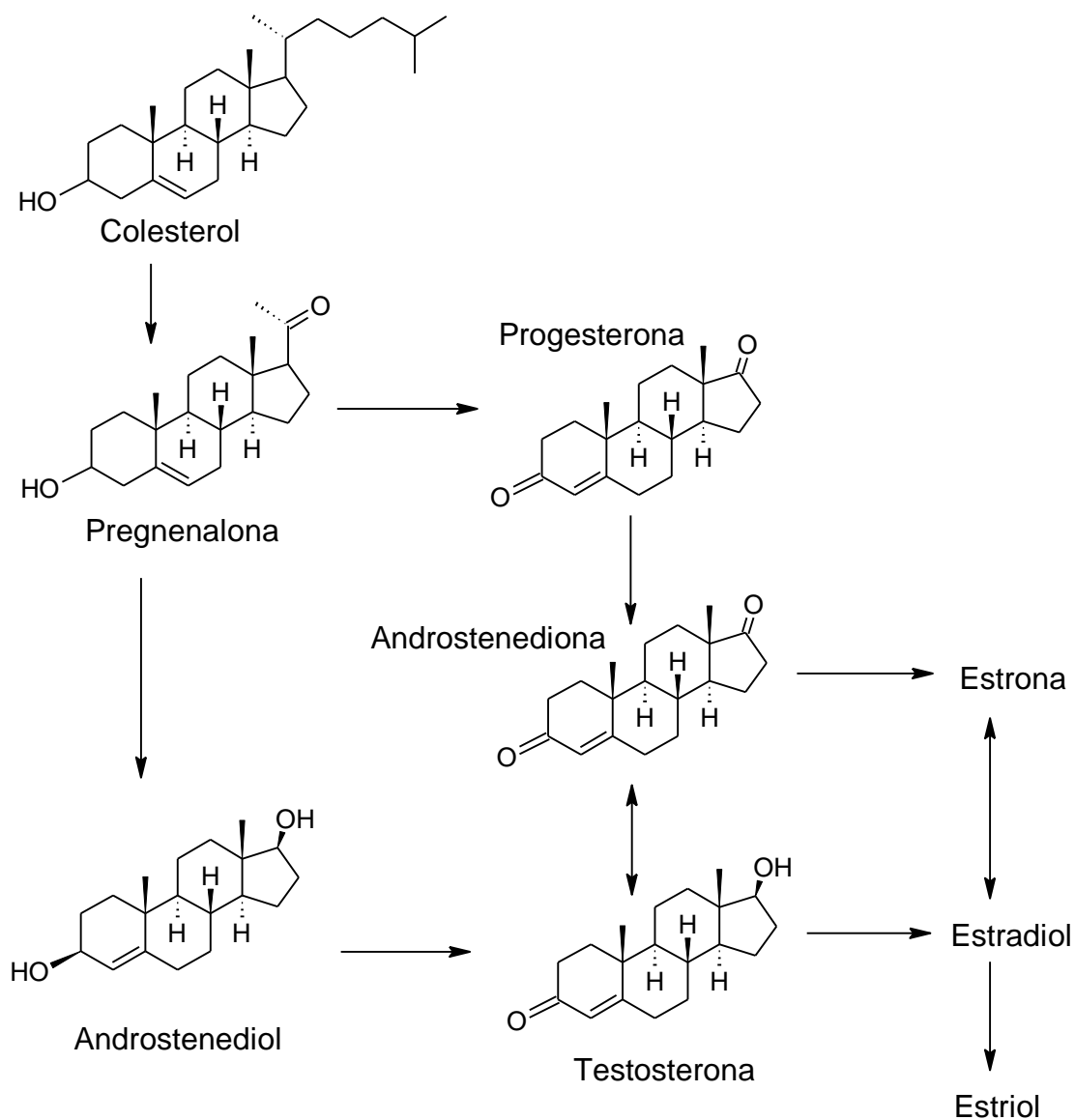


Figura 2. Síntesis de estrógenos a partir de colesterol

El catabolismo de estrógenos en el organismo ocurre en el hígado donde se hidroxilan en las posiciones 3 y/o 17 para incrementar su solubilidad y facilitar su eliminación del cuerpo a través de heces y orina. Además se incorporan otras moléculas como glucosa o algún compuesto azufrado, para formar estrógenos conjugados, los cuales tienen una actividad estrogénica baja comparada con la de los estrógenos originales. Una vez que son excretados del cuerpo, se produce de nuevo la forma activa no conjugada (Combalbert 2010).

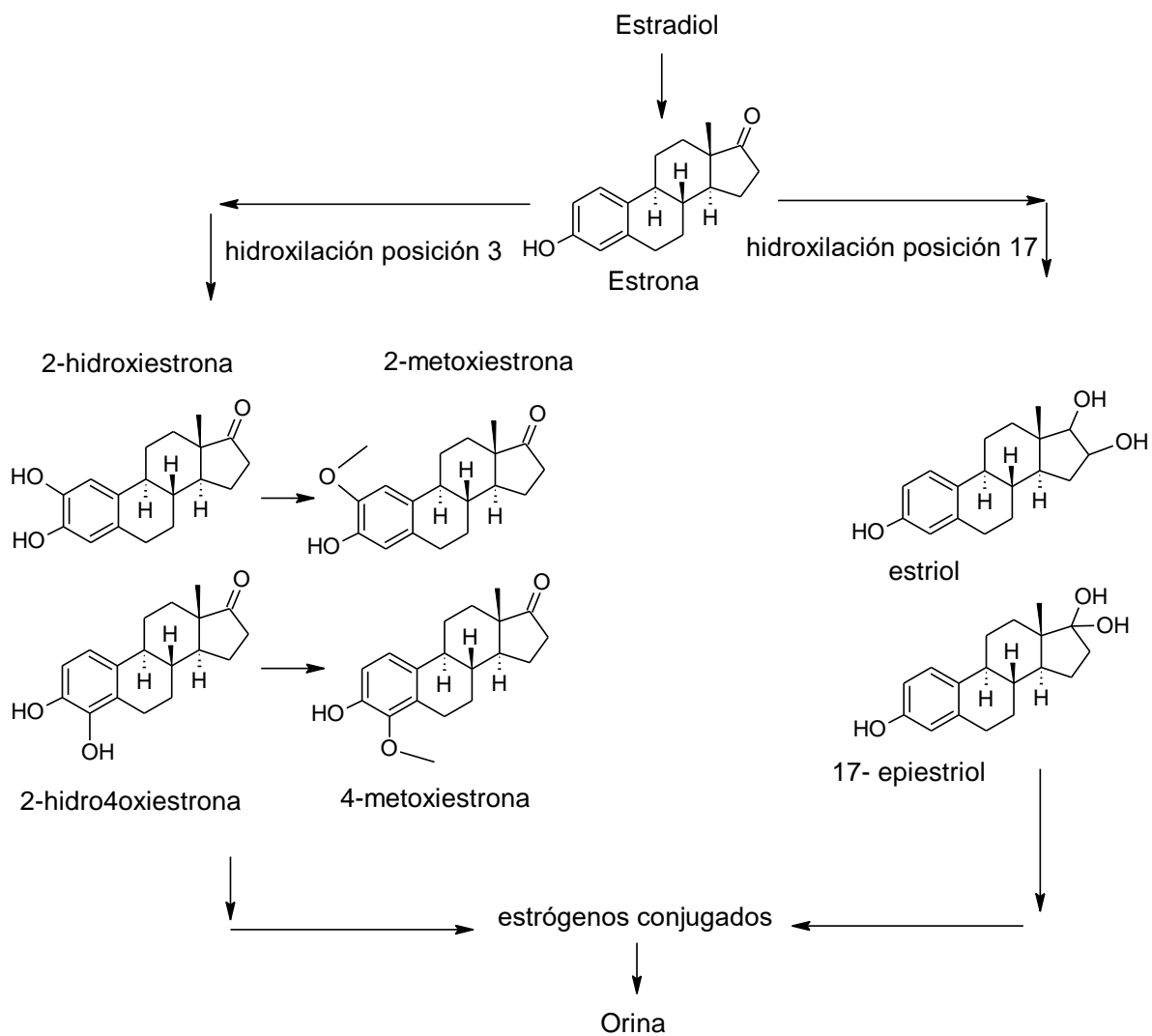


Figura 3. Metabolismo del estradiol

4. LOS ESTRÓGENOS COMO CONTAMINANTES EMERGENTES

En las últimas dos décadas se ha detectado la acumulación de diversos fármacos, productos de higiene personal y algunas sustancias usadas para diagnósticos médicos en los efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales (Combalbert 2010, Deblonde 2011, Fent 2006) . La remoción de estos compuestos es baja ya que las plantas de tratamiento de aguas no están diseñadas para eliminarlos. Por ejemplo, en la Tabla 2 se muestran algunos compuestos utilizados en hospitales que son difícilmente degradados por métodos convencionales.

Tabla 2. Eficiencia de remoción promedio de algunos contaminantes emergentes (Deblonde 2011)

Farmacéutico	Molécula	Influyente	Efluente	% Remoción
		Concentración promedio (ug/L)	Concentración promedio (ug/L)	
Antibiótico	Trimetoprima	0.43	0.424	1.4
	Sulfametoxazol	0.32	0.264	17.5
Antiepiléptico	Codeína	2.8605	1.93	32.5
Analgésicos y antiinflamatorios	Diclofenaco	1.039	0.679	34.6
	Ketoprofeno	0.483	0.333	31.1
Medios de contraste	Diatrizoato	3.3	3.3	0
	Ácido Iotalámico	1.8	1.8	0
Estrógenos ^(a)	17β-Estradiol	0.03	0.03	0
	Estrona	0.078	0.075	3.8
	Estriol	0.048	0.018	62.5
	Etinilestradiol	0.020	0.018	10
	Equilenina ^(b)	0.0021	0.00043	80

^(a) Combalbert 2010

^(b) Tyler 2009

La acumulación de estrógenos en el ambiente se debe al incremento del uso de medicamentos y alimento para ganado que los contienen, a su mala disposición y a que son moléculas muy estables, lo que las vuelve difíciles de degradar (Combalbert 2010); sin embargo, la concentración detectada en plantas de tratamiento no es tan alta en comparación con otros contaminantes y como se desconocen los riesgos a la salud que puede provocar la exposición prolongada de humanos a estos compuestos, se ha clasificado al 17β-estradiol y a

compuestos relacionados como contaminantes emergentes (Deblonde *et al.* 2011, Fent *et al.* 2006). En la Tabla 3 se muestran datos de la concentración de diferentes estrógenos detectados en plantas de tratamiento de distintos países, que llegan a ellas mediante la orina de humanos y animales de granja,

Tabla 3. Concentración (ng/L) de estrógenos libres medidos en los efluentes plantas de tratamiento de aguas negras en diferentes países (Combalbert 2010).

País	E1	E2	E3	EE2	Año
Holanda	<0.4–47	<0.4–12	nm	<1.8	2000
Italia	<0.5–80	<0.5–7	<0.5–28	<0.5–2.2	2000
Alemania	<2–37	<2–49	nm	<4–17	2002
Austria	<1–72	<1–30	<1–275	<1–5	2005
Canadá	1–96	0.2–15	nm	nm	2005
Australia	<1–27	<1–5	nm	nm	2006
Japón	3–100	<1–20	nd	nm	2006
Francia	3.5–63	4.5–22.1	5.3–13.1	1–18	2010
México ^(a)	6-44	0-68	1-57	nm	2013

nm= no medido

^(a) Estrada-Arriaga 2013

Hasta la fecha, no existen muchos estudios sobre la concentración de estrógenos en los efluentes de las plantas de tratamiento en México, pero hubo uno en el que se muestreó la concentración de estrona y estradiol en diferentes puntos de Xochimilco, México, en temporada de lluvias y en temporada seca. Los datos se muestran en la figura 4. Se demostró que en temporada de lluvias la concentración de estrógenos presentes en los cuerpos de agua es mayor, hasta tres veces, que en temporada seca, excepto en dos puntos de muestreo, probablemente porque los compuestos depositados en el suelo migran por escurrimiento y arrastre del agua de lluvia (Díaz-Torres 2013).

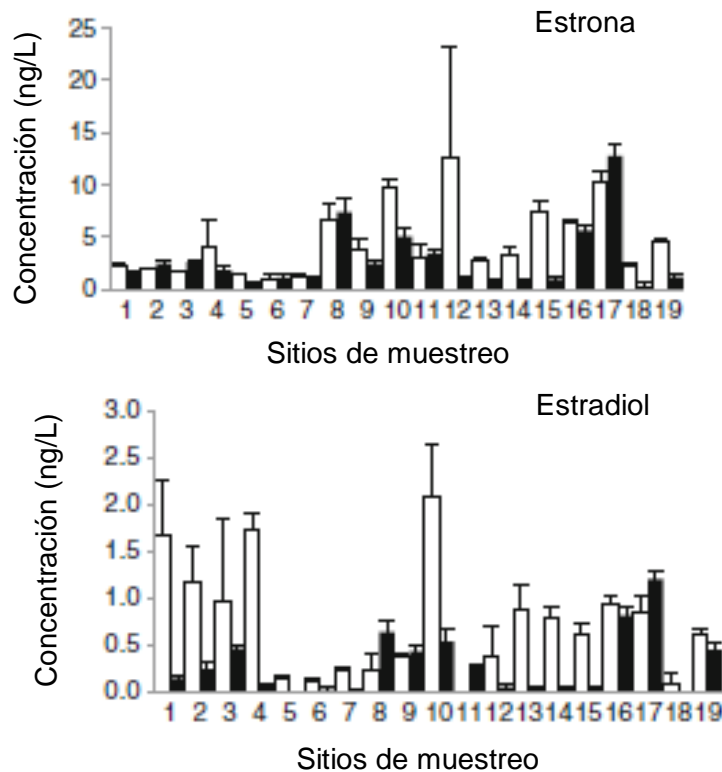


Figura 4. Concentración de estrógenos en temporada de lluvia (barras blancas) y en temporada seca (barras negras) analizada en diferentes puntos de muestreo de Xochimilco, México (Díaz-Torres 2013).

La preocupación por los estrógenos como contaminantes emergentes están enfocada en dos aspectos principalmente: a que son interruptores endócrinos a muy bajas concentraciones y a que su exposición prolongada en mamíferos, incluyendo el humano, aumenta el riesgo a desarrollar cáncer de diversos tipos.

5. ESTROGENOS COMO INTERRUPTORES ENDÓCRINOS

Tanto los estrógenos naturales como los compuestos estrogénicos de origen sintético o semisintético, tales como el diestilbestrol (DES) y el 17- α -etinil-estradiol (EE2) que se utiliza en la píldora anticonceptiva, tratamientos de reemplazo hormonal y tratamiento de cáncer, son tóxicos y se consideran interruptores endócrinos.

De acuerdo con la OMS los interruptores endócrinos se definen como “sustancias exógenas a una especie que alteran la función del sistema endocrino y causan efectos adversos sobre la salud del organismo intacto, de su progenie, o de su población” (WHO/IPCS, 2002).

El término interruptor endócrino define hoy día a un grupo de sustancias químicas de muy diferente origen, estructura y uso. Se trata de sustancias naturales o sintéticas, que interfieren con alguna de las funciones de las hormonas responsables del mantenimiento de la homeostasis y regulación del desarrollo de los organismos. En algunas ocasiones se trata de compuestos a los que las pruebas habituales de toxicidad no atribuyen efectos importantes (Serrano 2001). Los interruptores endócrinos son capaces de mimetizar o bloquear el efecto de los estrógenos, es decir, tienen la posibilidad de actuar como un estrógeno o como un antiestrógeno. El efecto negativo de los estrógenos está bien documentado para especies acuáticas, en particular peces (Nash *et al.* 2004) afectando su ecosistema mediante la alteración de su reproducción.

Cada estrógeno tiene un potencial estrogénico distinto, dependiendo de la afinidad que tenga al receptor de estrógenos. En organismos acuáticos puede ser determinante para alterar su ciclo reproductivo ya sea por la unión a estrógenos o a xenoestrógenos. El etinilestradiol induce efectos estrogénicos en varios peces desde muy bajas concentraciones (Fent 2006).

Debido a que los efectos principales de los interruptores endócrinos son sobre el sistema endócrino, el cual controla la reproducción, los cambios morfológicos van orientados hacia el desarrollo de gónadas, la reproducción y el crecimiento.

El mayor indicador que se ha utilizado es la expresión de vitelogenina, hormona femenina responsable de la producción de huevos en peces. En la Tabla 5 se resumen los efectos de la exposición a etinilestradiol de dos especies de peces.

Tabla 5. Efectos de estrógenos en peces a diferentes concentraciones.

Especie	[EE2] ng/L	Efecto
Carpa cabezona (<i>Pimephales promelas</i>) ^(a)	0.96	Feminización de machos (caracteres secundarios)
	3	Elevación de la expresión de vitelogenina Feminización de gónadas
	4	Fallas en el desarrollo normal de los caracteres sexuales secundarios Alteraciones en la proporción sexual
	5	Reducción en 56% de la fecundidad
Pez cebra (<i>Danio reio</i>) ^(b)	2	Infertilización de huevos
	20	Mortalidad del 30% de embriones
	50	Feminización de machos

(a) Fent 2006

(b) Nash *et al.* 2004

6. MECANISMO DE CARCINOGENESIS POR ESTRÓGENOS

Se ha demostrado que una exposición prolongada a estrógenos incrementa el riesgo de desarrollar cáncer de mama y de endometrio (Liehr 2000). Además, en modelos animales se ha encontrado que inducen la formación de tumores mamario, uterino, cervical y pituitario (Liehr 1986).

Aunque el mecanismo de toxicidad no se ha dilucidado completamente, se ha visto que involucra el metabolismo de estrógenos a compuestos genotóxicos o mutagénicos que pueden dañar directamente al ADN y el crecimiento de tejidos debido a la disminución de apoptosis y proliferación de células dañadas, que resulta en la formación de tumores. Ambos procesos actúan en conjunto y son los responsables de que el riesgo a desarrollar cáncer incremente (Yager 2006). Estas dos vías de carcinogénesis se muestran en la Figura 5.

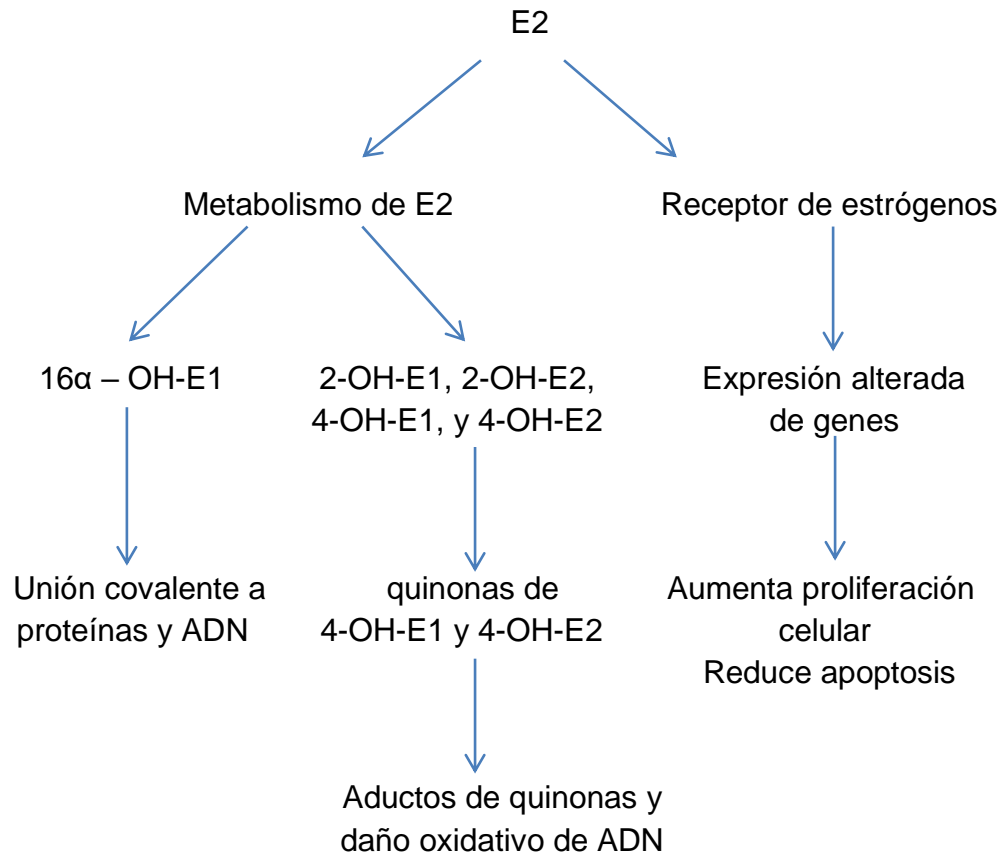


Figura 5. Vías complementarias de la carcinogénesis de estrógenos (Yager 2006)

La primera vía es el metabolismo oxidativo de los estrógenos, cuyo producto son quinonas, metabolitos muy reactivos considerados moléculas carcinogénicas (Cavalieri *et al.* 2002). Estas moléculas oxidan lípidos y ADN mediante la liberación de Especies Reactivas de Oxígeno y forman aductos inestables con las adeninas y guaninas, (Liehr 1990, Yager 2006, Zhang 2001). Algunas enzimas presentes naturalmente en el cuerpo humano, como lo son los citocromos P450 (1A1, 1A2 y 3A), prostaglandina sintasa o las tirosinasas pueden oxidar al estradiol formando catecoles (Cavalieri *et al.* 2004), que se transforman posteriormente en quinonas. Esta vía se esquematiza en la figura 6.

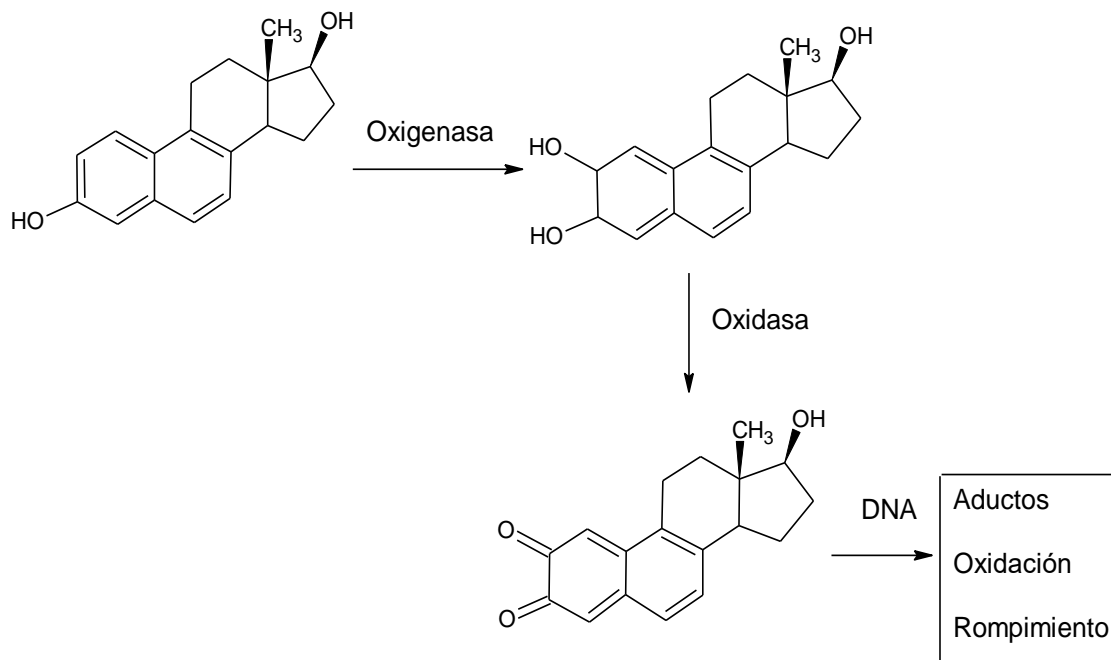


Figura 6. Mecanismo de toxicidad propuesto para compuestos estrogénicos.

La segunda vía de carcinogénesis es mediante la activación del receptor de estrógenos (ER), un factor de transcripción específico localizado en el citoplasma y núcleo celular (Barrón 1997, Noriega 2008). Se han identificado dos, conocidos como ER α y ER β (Kuiper G. 1996 *et al.*). ER α es expresado predominantemente en órganos reproductivos (útero, mama y ovario), así como en el hígado y en el sistema nervioso central, en tanto que la forma β es expresada mayoritariamente en otros tejidos como hueso, endotelio, pulmones, tracto urogenital, ovario, sistema nervioso central y próstata (Noriega 2008).

El receptor de estrógenos se une a secuencias específicas del ADN en el genoma y regula la cantidad de transcritos de ARN mensajero por diferentes vías, mostradas en la figura 7. Esta unión implica la activación del receptor y puede ocurrir con diferentes ligandos como estrógenos naturales, sintéticos o xenoestrógenos, pero también hay otros que lo inactivan, como los antiestrógenos, Estas moléculas compiten entre sí para unirse al receptor (Katzenellenbogen 1996).

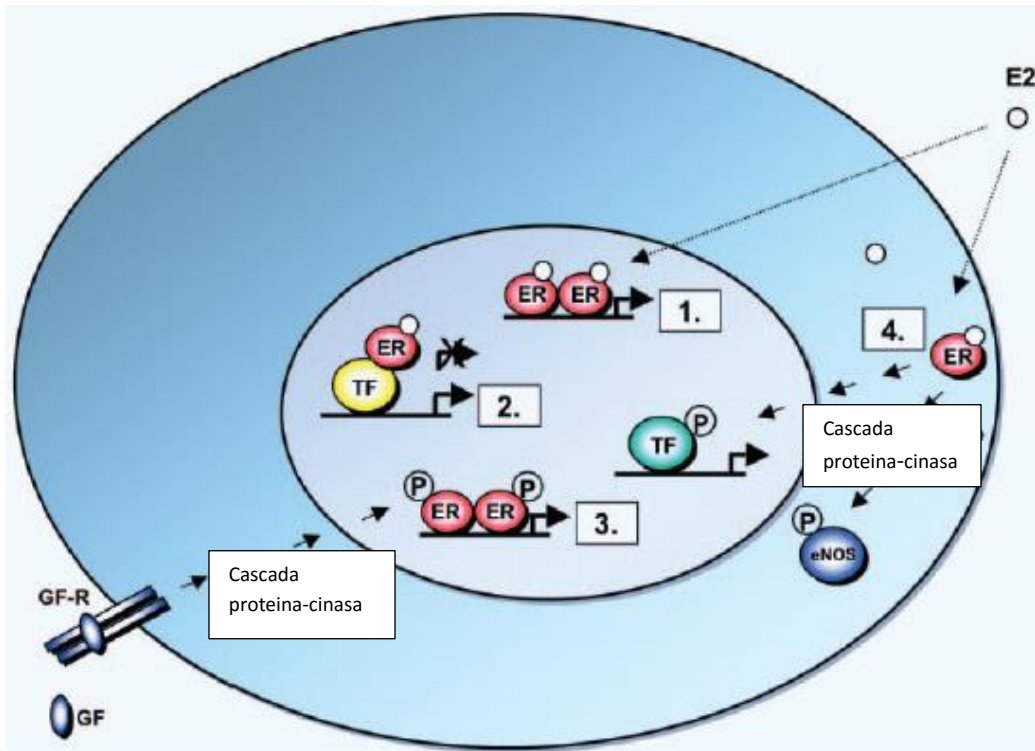


Figura 7. Ilustración esquemática de los mecanismos de señalización del receptor de estrógenos. 1. Vía clásica de acción. 2. Acciones genómicas independientes del elemento de respuesta a estrógenos (EREs). 3. Acciones genómicas independiente del ligando. 4. Acciones no genómicas. (Björnström, 2005)

En la vía clásica, los complejos nucleares E2-ER se unen directamente a los elementos de respuesta a estrógenos en los promotores de genes diana. En la segunda vía, el complejo nuclear E2-ER interacciona con un complejo del factor de transcripción (TF) que hace contacto con el promotor del gen objetivo a través de interacciones proteína-proteína. La tercera vía involucra factores de crecimiento (FC) que activan la cascada de señalización proteína-cinasa, lo que lleva a la fosforilación (P) y la activación de los receptores de estrógenos nucleares en elementos de respuesta a estrógenos. En la vía no genómica, los complejos de membrana E2-ER activan cascadas de señalización proteína-cinasa, que altera las funciones de las proteínas en el citoplasma, por ejemplo, la activación de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS), una molécula lipofílica que participa en

muchos procesos biológicos, o la regulación de la expresión génica a través de la fosforilación y la activación de un factor de transcripción.

La unión del receptor al estrógeno estimula la proliferación de células mamarias e incrementa el número de células diana o blanco dentro del tejido. El incremento de la división celular y la síntesis de ADN elevan el riesgo de replicación de errores, lo que puede dar como resultado la adquisición de mutaciones puntuales perjudiciales que interrumpen procesos celulares normales, tales como la apoptosis, proliferación celular, o la reparación del ADN (Deroo 2006).

Los catecoles resultantes del metabolismo de estrógenos, 4-hidroxicatecol y 2-hidroxicatecol, tienen alta afinidad de unión al receptor de estrógenos humano (150 y 100%, respectivamente, comparado con estradiol) así que pueden participar también en la regulación de la expresión de genes, la señalización o ambas a través del receptor (Yager 2006).

Una manera de evitar la conversión de estrógenos a catecoles y quinonas es bloquear las posiciones que por resonancia son ricos en electrones, como la 2 y 4, introduciendo átomos de halógeno.

7. SITIOS REACTIVOS PARA LA HALOGENACIÓN ELECTROFÍLICA DE ESTRÓGENOS

Los carbonos insaturados de los compuestos bencénicos son especialmente ricos en electrones debido a la presencia de enlaces π , que permiten reacciones de sustitución electrofílica, a menos que tengan un grupo saliente que atraiga con fuerza a los electrones, haciendo que el carbono insaturado sea susceptible a un ataque nucleofílico. Los sustituyentes del anillo aromático se pueden clasificar en cuatro grupos dependiendo de su capacidad como electrodonador (activadores) o electroattractor (desactivadores) hacia el anillo aromático:

- Activadores débiles (dirigentes *orto* y *para*): grupos alquilo y fenilo -CH₃, -Ph. Activan el anillo por efecto inductivo.
- Activadores fuertes (dirigentes *orto* y *para*): grupos con pares solitarios en el átomo que se une al anillo, como -OH, -OCH₃, -NH₂. Activan el anillo por efecto resonante.
- Desactivadores débiles (dirigentes *orto* y *para*): desactivan por efecto inductivo. En este grupo están los halógenos -F, -Cl, -Br, e -I.
- Desactivadores fuertes (dirigentes *meta*): Son grupos -CHO, -CO₂H, -SO₃H, -NO₂ con enlaces múltiples sobre el átomo que se une al anillo. Desactivan por efecto resonante.

Ya que los estrógenos tienen un sustituyente -OH en el anillo aromático A, que actúa como donador de electrones debido a la resonancia las posiciones *orto* y *para*, se vuelven ricas en densidad electrónica y por tanto susceptibles a una reacción de sustitución electrofílica sobre el anillo. Las reacciones de halogenación siguen mecanismos de este tipo, por lo que es posible realizar la halogenación de estrógenos para formar compuestos halogenados como el que se muestra en la Figura 8, bloquear las posiciones reactivas de los estrógenos e impedir la formación de catecoles y quinonas por la vía mencionada anteriormente.

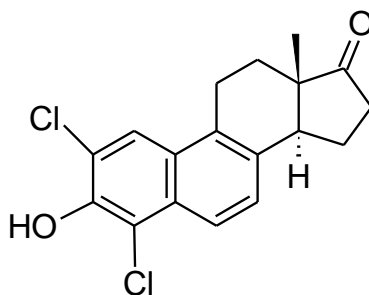


Figura 8. 2,4-cloroequilenina

La caracterización de estos estrógenos halogenados ha sido realizada por diferentes investigadores. Uno de ellos es Liehr, que comprobó en 1986 con 4-fluoroestradiol que los derivados halogenados son menos tóxicos *in vivo* utilizando roedores como modelo, ya que se reduce dramáticamente la inducción de tumores renales. Otro de los investigadores interesados en observar los efectos de derivados halogenados es Liu X, que junto con otros colaboradores, trabajó con equilenina para comprobar el efecto estrogénico y el potencial carcinogénico que tiene la molécula halogenada en la posición 4. El resultado observado fue que la halogenación evita la formación de quinonas y que el compuesto halogenado tiene afinidad por el receptor de estrógenos, aunque es menor que la afinidad por la equilenina. Se modificó la molécula con flúor, cloro y bromo y se compararon las propiedades de los tres derivados. La magnitud en el cambio de la afinidad al receptor depende del tamaño del átomo de halógeno, siendo más dramático el efecto con bromo; con flúor la molécula tiene casi el mismo efecto estrogénico que el compuesto parental (Liu X 2003, Liehr *et al.* 1986b).

El mayor uso que se le da a este tipo de compuestos es para la formulación de medicamentos que controlan hormonas relacionadas a la reproducción, por ello se buscaría reemplazar la molécula activa por un compuesto halogenado y no con algún átomo de otra naturaleza. Además, los derivados halogenados podrían tener otras propiedades interesantes, como menor volatilidad y mayor estabilidad térmica y oxidativa. En la actualidad un número importante (2 de cada 10) de compuestos halogenados son producidos por la industria farmacéutica debido principalmente a la facilidad con que permean las membranas celulares (Herrera-Rodríguez 2011). Ejemplo de ellos son el ansiolítico diazepam, o el antihistamínico loratadina (Figura 9).

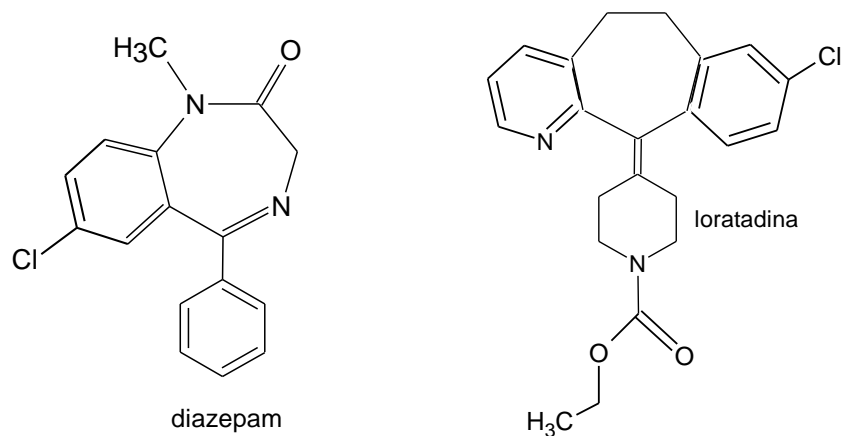


Figura 9. Estructura de fármacos halogenados.

Para que los haloestrógenos puedan ser sustitutos por los compuestos utilizados actualmente en medicamentos, además de otras cosas, deben ser afines al receptor de estrógenos para que el medicamento tenga efecto sobre el cuerpo, como lo tienen los estrógenos libres. Por lo tanto, para reducir el potencial carcinogénico de los estrógenos sólo se quiere evitar la vía formación de quinonas sin modificar significativamente la vía que involucra al receptor de estrógenos.

En los estudios antes mencionados, se hicieron las halogenaciones con reacciones químicas para probar qué efecto tenían los productos. Aunque la halogenación en la industria química tiene tecnologías bien establecidas, sus procedimientos son típicamente caracterizados por ser riesgosos y altamente tóxicos por la generación de subproductos y el uso de catalizadores dañinos para el medio ambiente. Existen alternativas biotecnológicas, como la halogenación enzimática, que pueden ser más ventajosas por las condiciones de reacción y la baja toxicidad de los procesos (Herrera-Rodríguez L. 2011).

8. HALOGENACIÓN ENZIMÁTICA

Existen diferentes tipos de enzimas capaces de halogenar sustratos orgánicos, las cuales se clasifican de acuerdo a la información mostrada en la Tabla 6.

Tabla 6. Enzimas halogenantes conocidas (Herrera-Rodriguez L. 2011)

Tipo de enzima		Características
Haloperoxidasas	Hemo haloperoxidasas	Pueden halogenar una gran cantidad de sustratos generando hipohaluros
	Vanadio haloperoxidasas	
Halogenasas	Dependientes de FADH ²⁻	Halogenación vía HOCl
	Dependientes de α-cetoglutarato y O ₂	Formación de enlaces específicos de C-X ⁻ vía radicales libres
Fluorinasas		Catalizan desplazamiento nucleofílico de metionina
Clorinasas		Reacción análoga de fluorinasas, con un ion cloruro

Las haloperoxidasas son las primeras enzimas que se descubrieron y por ello las más caracterizadas. Llevan a cabo reacciones redox tomando como sustrato peróxido de hidrógeno y siguen un mecanismo de halogenación electrofílica. Son las únicas peroxidasas que catalizan la oxidación de dos electrones de iones haluro a iones hipohaluro (Raven E. 2016). En este grupo se encuentran las hemoperoxidasas y las vanadioperoxidasas. Las primeras son llamadas así porque contienen un grupo prostético hemo en su sitio activo. Este grupo es un heterociclo de porfirina con un ión de Fe²⁺ en su centro. En las vanadioperoxidasas el ion metálico que permite el intercambio de electrones es un vanadato, localizado en el sitio activo (Butler 2004). En la Figura 10 se muestran algunas características importantes del sitio activo de estas enzimas.

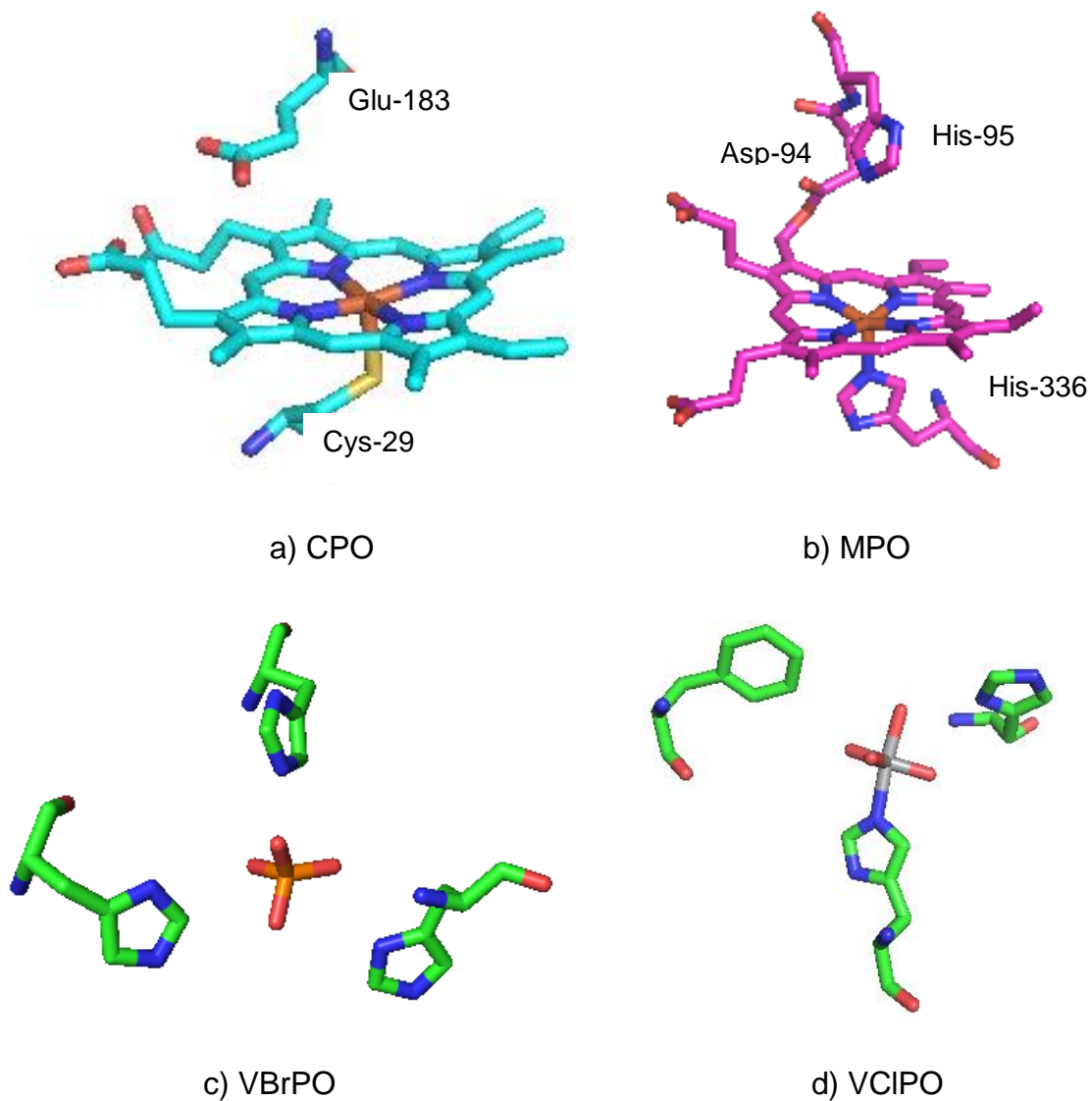


Figura 10. Aminoácidos y grupo prostético del sitio activo de algunas haloperasas, a) Cloroperoxidasa del hongo *Leptoxiphium fumago*, grupo prostético: hemo, b) Mieloperoxidasa humana Isoforma C, grupo prostético: hemo. c) Vanadio bromoperoxidasa del alga roja *Corallina officinalis*, grupo prostético: vanadato, d) Vanadio cloroperoxidasa del hongo *Curvularia inaequalis*. grupo prostético: vanadato.

Los ejemplos clásicos de hemoperoxidasas son la cloroperoxidasa (CPO) y mieloperoxidasa (MPO), que tienen un mecanismo de reacción similar, mostrado en la Figura 11. El grupo hemo reacciona con una molécula de peróxido de

hidrógeno formando una especie de radical π -catión de porfirina oxohierro (IV) conocido como compuesto I que es el responsable de la oxidación de un ion haluro. En este paso de la reacción, el peróxido se reduce a agua mientras se oxida la enzima. Luego un ion haluro presente en el medio ataca el átomo de ferril oxígeno del compuesto I para producir un intermediario de hipohaluro férrico, Fe^{III} (OCl), que se cree es un compuesto clave para la halogenación de sustratos orgánicos por la CPO y para la actividad antimicrobiana de la MPO, debido a que es muy oxidante. No se ha obtenido evidencia espectroscópica del intermediario de hipocloruro férrico y se desconoce cómo el compuesto I oxida al ion haluro (Colonna S. 1999, Raven E. 2016).

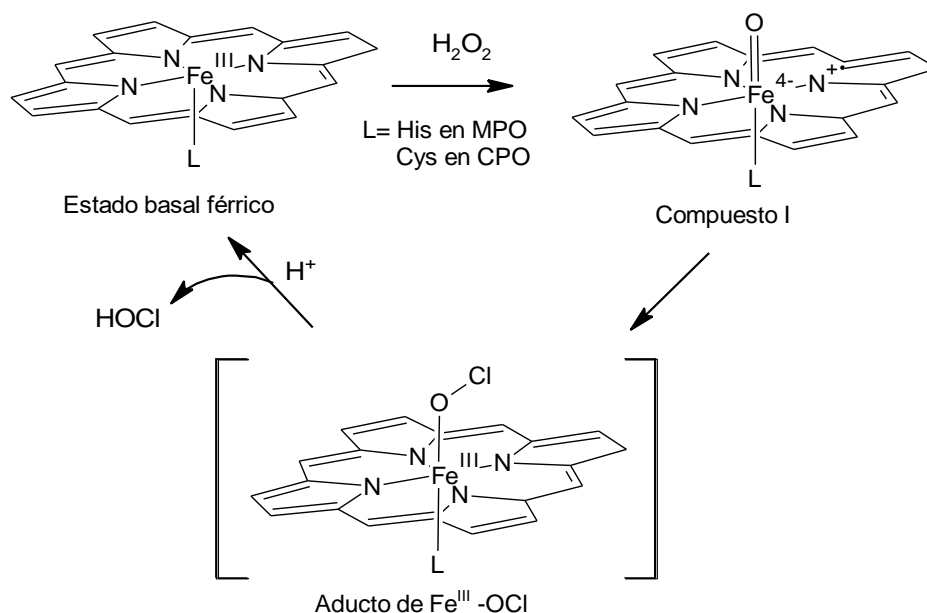
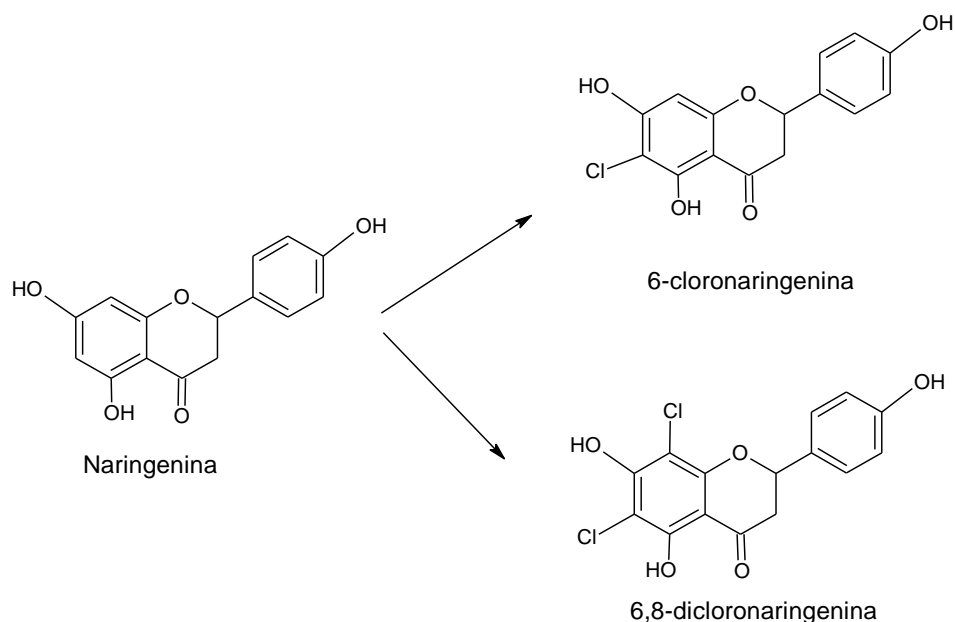


Figura 11. Mecanismo de reacción de las haloperoxidasas.

A través de este mecanismo la cloroperoxidasa es capaz de halogenar varias moléculas aromáticas como hidrocarburos policíclicos aromáticos, lignina, flavonoides y terpenos (Ayala *et al.* 2016). Los flavonoides son metabolitos secundarios de las plantas, por ejemplo la naringenina, la cual se puede halogenar en dos posiciones del anillo aromático A. Como se puede observar, esta reacción

es similar a la que buscaríamos para catalizar de forma enzimática la halogenación del estradiol.



Ejemplo 1. Halogenación de un flavonoide con cloroperoxidasa de *L. fumago*.

Las vanadio-haloperoxidasas (V-HPO) se clasifican de acuerdo al halógeno más electronegativo que puede oxidar. Las vanadio cloroperoxidasas (V-CIPOs) pueden oxidar cloruro, bromuro y yoduro, mientras que las vanadio bromoperoxidasas (V-BrPOs) sólo pueden oxidar bromuro y yoduro. Las vanadio cloroperoxidasas han sido aisladas principalmente de hongos, mientras que las vanadio bromoperoxidasas se han encontrado principalmente en algas marinas. Las enzimas más estudiadas de este tipo son la V-CIPO del hongo *Curvularia inaequalis*, la V-BrPO del alga café *Ascophyllum nodosum* y la VBrPO del alga roja *Corallina officinalis* (Butler 2004).

El mecanismo propuesto por Butler y Carter-Franklin en combinación con el propuesto por Ligtenbarg se muestra en la Figura 12. Primero el enlace vanadato coordina al peróxido de hidrógeno produciendo un intermediario oxoperoxovanadio

piramidal de base cuadrada que oxida el segundo sustrato en el ciclo, el bromuro, por dos electrones para generar un intermediario tipo ion bromonio.

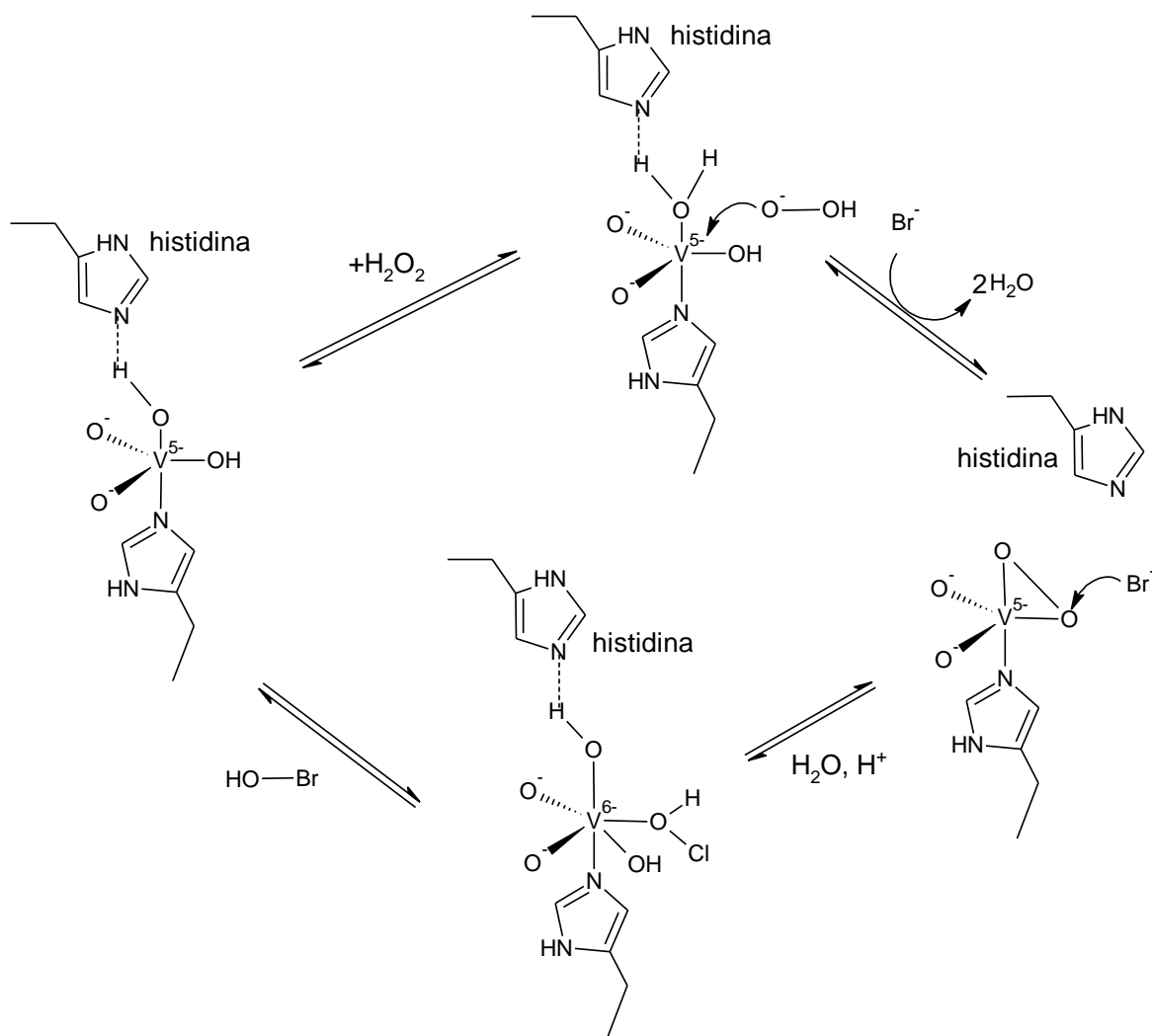
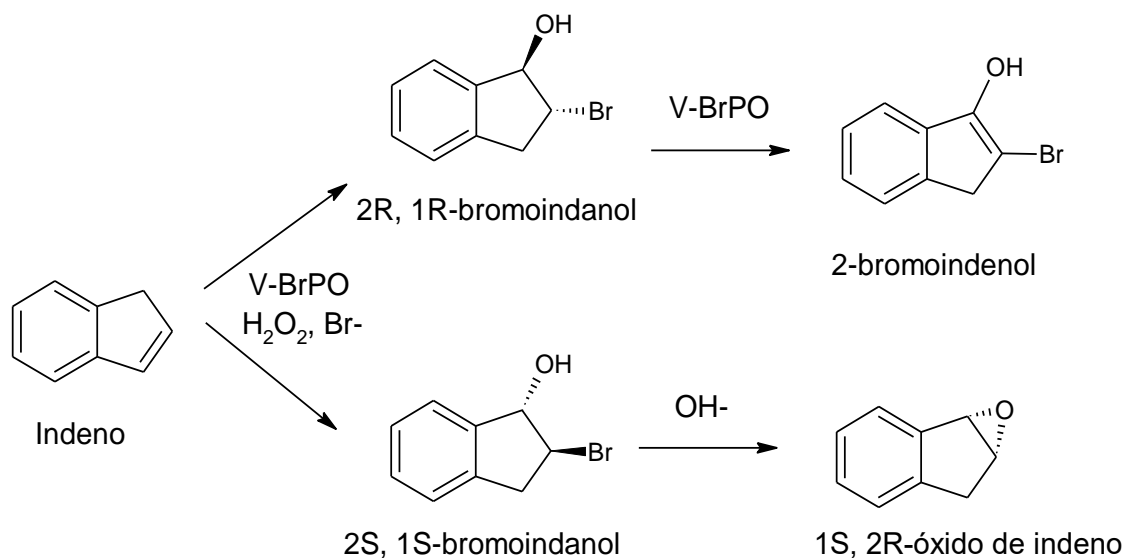


Figura 12. Mecanismo de reacción para las vanadio haloperoxidasas (Ligtenberg 2003, Butler 2004).

Las vanadio peroxidasas, al igual que las hemoperoxidasas, catalizan reacciones de halogenación con sustratos aromáticos, por ejemplo la de indeno. El producto de la reacción de este sustrato con la VHPO de *Curvularia protuberata* a un pH neutro es una mezcla racémica de epóxidos ópticamente activos (Ejemplo 2).



Ejemplo 2. Reacción de halogenación de indeno catalizada por un extracto de Vanadio Bromoperoxidasa de *Curvularia protuberata*. (Ayala 2016)

Las haloperoxidasas no reaccionan directamente con el compuesto orgánico que halogenan, sino que realizan la reacción utilizando intermediarios, por ello se considera que estas enzimas utilizan dos sustratos, el peróxido de hidrógeno y un sustrato orgánico con enlaces π , el cual se puede clorar, bromar o yodar. Sin embargo, se ha demostrado que las enzimas catalizan reacciones con una mayor regioselectividad y diaestereoespecificidad que las reacciones químicas con N-bromoacetamida. Las hemo y las vanadio peroxidasa tienen una diaestereoespecificidad similar en las reacciones que catalizan (Coughlin 1993).

El uso de estas enzimas es muy amplio debido a que además de halogenar, las V-HPO también ciclizan y oxidan compuestos orgánicos usando intermediarios bromados y las hemoperoxidasas tienen también actividad de monooxigenasa, peróxido dismutasa y oxidasa a diferente pH. Además la especificidad de sustrato de las haloperoxidasas es baja en comparación con las halogenasas o las clorinasas, cuya especificidad de sustrato es muy alta, así que la cantidad de reacciones que catalizan es muy grande. Sin embargo, no son capaces de realizar las reacciones de fluoración, debido a que el peróxido de hidrógeno no tiene el

potencial redox necesario para oxidar iones fluoruro. Para ello existen otras enzimas como las fluorinasas, que son capaces de llevar a cabo la reacción mediante un mecanismo diferente, que se ha propuesto es de sustitución nucleofílica tipo SN2. (O'Hagan 2002).

Se ha observado que la cloroperoxidasa de *L. fumago* puede halogenar estradiol y que además se forman productos monohalogenados y dihalogenados (Salcedo *et al.* 2015). No se ha comprobado en qué posición se halogena el estradiol, pero por el sustituyente -OH del anillo A, que es un electrodonador fuerte, y tomando en cuenta que los halógenos son nucleófilos, podría resultar una sustitución electrofílica orientada en *orto* y *para* al grupo OH, que corresponde con las posiciones 2 y 4 del estradiol.

9. CONCLUSIONES

Los estrógenos son contaminantes ambientales y tienen efectos tanto en animales acuáticos como en mamíferos por ser interruptores endócrinos y agentes carcinogénicos. Para evitar la vía de formación de quinonas se puede halogenar a los estrógenos en las posiciones 2 y 4 con la ayuda de enzimas. Hay una gran variedad de enzimas halogenasas, un grupo en particular podría utilizarse para estos fines. Las haloperoxidasas son las más atractivas por la baja especificidad de sustrato que tienen y por ser las más estudiadas; ejemplo de ellas son la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* y la bromoperoxidasa de *Corallina officinalis*. Estas enzimas podrían catalizar la sustitución electrofílica con átomos de cloruro o bromuro sobre el estradiol, dadas las propiedades resonantes que tiene el anillo aromático A de los estrógenos y al grupo hidroxilo del mismo anillo.

Esta podría ser una alternativa para sustituir los tratamientos de reemplazo hormonal y anticonceptivos, ya que los derivados halogenados tienen afinidad al receptor de estrógenos, pero no son sustrato de las enzimas que los oxidan.

10. PERSPECTIVAS

Se realizarán los experimentos para determinar:

- Si los compuestos estrogénicos como estradiol, estrona y equilina son sustratos de las haloperoxidasas, como pueden ser la CPO de *L. fumago* y la VBrPO de *C. officinalis*;
- Si las posiciones en las que las haloperoxidasas halogenan son las predichas en este tesina (la 2 y 4)
- Las propiedades de los compuestos halogenados, por ejemplo
 - afinidad por el receptor de estrógeno
 - transformación de los compuestos halogenados por tirosinasas, peroxidases y/o citocromos P450
 - efecto de los compuestos halogenados en el desarrollo de organismos acuáticos como pez cebra.

Estas perspectivas se llevarán a cabo en un proyecto de posgrado.

Adicionalmente, es interesante contemplar la opción de sintetizar enzimáticamente fármacos halogenados.

11. REFERENCIAS

AYALA, M., *et al.* Substrate specificity and ionization potential in chloroperoxidase-catalyzed oxidation of diesel fuel. *Environmental science & technology*, 2000, vol. 34, no 13, p. 2804-2809.

AYALA, M.; SEGOVIA, L.; TORRES, E. Halogenases: A Biotechnological Alternative For The Synthesis Of Halogenated Pharmaceuticals. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 2016.

BARRÓN G. A. *et al.* El receptor de estrógenos y la glándula mamaria. *Revista de investigación clínica*, 1997, vol. 49, no 6, p. 515-28.

BJORNSTROM, L; SJOBERG, M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Molecular endocrinology*, 2005, vol. 19, no 4, p. 833-842.

BRION, F., *et al.* Impacts of 17 β -estradiol, including environmentally relevant concentrations, on reproduction after exposure during embryo-larval-, juvenile-and adult-life stages in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 2004, vol. 68, no 3, p. 193-217.

BUTLER, A; CARTER-FRANKLIN, J. The role of vanadium bromoperoxidase in the biosynthesis of halogenated marine natural products. *Natural product reports*, 2004, vol. 21, no 1, p. 180-188.

CAVALIERI E, *et al.* Estrogens as endogenous genotoxic agents DNA adducts and mutations. *Journal of National Cancer Institute Monographs* 2002, vol. 27, p. 75-94

CAVALIERI, E.; ROGAN, E.; CHAKRAVARTI, D. The role of endogenous catechol quinones in the initiation of cancer and neurodegenerative diseases. *Methods in enzymology*, 2004, vol. 382, p. 293-319.

COLONNA, S., *et al.* Enantioselective oxidations of sulfides catalyzed by chloroperoxidase. *Biochemistry*, 1990, vol. 29, no 46, p. 10465-10468.

COLONNA, S., *et al.* Recent biotechnological developments in the use of peroxidases. *Trends in Biotechnology*, 1999, vol. 17, no 4, p. 163-168.

COMBALBERT, S; HERNANDEZ-RAQUET, G. Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, vol. 86, no 6, p. 1671-1692.

COUGHLIN, P, *et al.* Biotransformation of alkenes by haloperoxidases: Regiospecific bromohydrin formation from cinnamyl substrates. *Biotechnology letters*, 1993, vol. 15, no 9, p. 907-912.

CUI J; SHEN Y.; Li, R. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends in molecular medicine*, 2013, vol. 19, no 3, p. 197-209.

DEBLONDE, T.; COSSU-LEGUILLE, C.; HARTEMANN, P. Emerging pollutants in wastewater: a review of the literature. *International journal of hygiene and environmental health*, 2011, vol. 214, no 6, p. 442-448.

DEROO, B.; KORACH, K. Estrogen receptors and human disease. *The Journal of clinical investigation*, 2006, vol. 116, no 3, p. 561-570.

DÍAZ-TORRES, E., *et al.* Endocrine Disruptors in the Xochimilco Wetland, Mexico City. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2013, vol. 224, no 6, p. 1-11.

ESTRADA-ARRIAGA E., *et al.* Presencia y tratamiento de compuestos disruptores endócrinos en aguas residuales de la Ciudad de México empleando un biorreactor con membranas sumergidas. *Ingeniería, investigación y tecnología*, 2013, vol. 14, no 2, p. 275-284.

FENT, K.; WESTON, A.; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic toxicology*, 2006, vol. 76, no 2, p. 122-159.

FOLMAR, L., *et al.* A comparison of the estrogenic potencies of estradiol, ethynylestradiol, diethylstilbestrol, nonylphenol and methoxychlor in vivo and in vitro. *Aquatic Toxicology*, 2002, vol. 60, no 1, p. 101-110.

HERRERA-RODRIGUEZ, L., *et al.* Perspectives on biotechnological halogenation. *chimica oggi/Chemistry Today*, 2011, vol. 29, no 6.

HURWITZ, A. R.; LIU, S. T. Determination of aqueous solubility and pKa values of estrogens. *Journal of pharmaceutical sciences*, 1977, vol. 66, no 5, p. 624-627.

KATZENELLENBOGEN, B. Estrogen receptors: bioactivities and interactions with cell signaling pathways. *Biology of Reproduction*, 1996, vol. 54, no 2, p. 287-293.

KATZENELLENBOGEN, B., *et al.* Molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands and receptor pharmacology. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 2000, vol. 74, no 5, p. 279-285.

KUIPER, G., *et al.* Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996, vol. 93, no 12, p. 5925-5930.

LIEHR, J., *et al.* Carcinogenicity of catechol estrogens in Syrian hamsters. *Journal of steroid biochemistry*, 1986, vol. 24, no 1, p. 353-356.

LIEHR, J., Is Estradiol a Genotoxic Mutagenic Carcinogen? 1. *Endocrine reviews*, 2000, vol. 21, no 1, p. 40-54.

LIGTENBARG, A.; HAGE, R.; FERINGA, B. Catalytic oxidations by vanadium complexes. *Coordination chemistry reviews*, 2003, vol. 237, no 1, p. 89-101.

LITTLECHILD, J., *et al.* Structural and functional comparisons between vanadium haloperoxidase and acid phosphatase enzymes. *Journal of Molecular Recognition*, 2002, vol. 15, no 5, p. 291-296.

LIU, X., *et al.* Effect of halogenated substituents on the metabolism and estrogenic effects of the equine estrogen, equilenin. *Chemical research in toxicology*, 2003, vol. 16, no 6, p. 741-749.

LU, Y., *et al.* Halogen bonding for rational drug design and new drug discovery. *Expert opinion on drug discovery*, 2012.

MACHATHA, S.; YALKOWSKY, S. Comparison of the octanol/water partition coefficients calculated by ClogP®, ACDlogP and KowWin® to experimentally determined values. *International journal of pharmaceutics*, 2005, vol. 294, no 1, p. 185-192.

MELGOZA, R. J. Estrógenos de uso clínico. *Mensaje Bioquímico*, 2013, vol. 37, no 15, 261 – 274.

MESH. Estrone 2016. National Center for Biotechnology Information (NCBI) en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68004970> y Estriol consultado en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68004964>. Última fecha de consulta 28/01/2016.

NASH, J., *et al.* Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethynylestradiol causes reproductive failure in fish. *Environmental health perspectives*, 2004, p. 1725-1733.

NORIEGA-REYES, Y.; MCCARRON, L. Correguladores del Receptor de Estrógenos y su Implicación en el Cáncer Mamario. *Cancerología*, 2008, vol. 3, p. 29-40.

PEZZELLA, A, *et al.* Tyrosinase-catalyzed oxidation of 17 β -estradiol: structure elucidation of the products formed beyond catechol estrogen quinones. *Chemical research in toxicology*, 2005, vol. 18, no 9, p. 1413-1419.

PILLON, A, *et al.* In vivo bioluminescence imaging to evaluate estrogenic activities of endocrine disrupters. *Analytical biochemistry*, 2005, vol. 340, no 2, p. 295-302.

RAVEN, E, and DUNFORD, B. Heme peroxidases. *Royal Society of Chemistry: Metallobiology*. 2016. Cap 9, p. 183-217.

SALCEDO, K., *et al.* Halogenation of β -estradiol by a rationally designed mesoporous biocatalyst based on chloroperoxidase. *Biocatalysis*, 2015, vol1, no 1.

O'HAGAN, D., *et al.* Biochemistry: biosynthesis of an organofluorine molecule. *Nature*, 2002, vol. 416, no 6878, p. 279-279.

OLEA, N.; FERNÁNDEZ, M.; MARTÍN-OLMEDO, P. Disruptores endocrinos: el caso particular de los xenobióticos estrogénicos. I Estrógenos naturales. 2001.

SHEFFIELD D. *et al.* Bromoperoxidase of the macroalga *Corallina officinalis*. *Biochemical Society Transactions* 1992, vol. 20, no 3, p. 284S-284S.

SHEFFIELD D. *et al.* *Corallina officinalis* bromoperoxidase immobilized on agarose *Phytochemistry* 1995, vol. 38, p. 1103–1107

SILVA C.P *et al.* Processes for the elimination of estrogenic steroid hormones from water: A review. *Environmental Pollution* 2012, vol. 165, p. 38-58

SOLOMONS T.W.G. Química orgánica. Editorial Limusa. Sexta reimpresión. México 1990.

TYLER, C., *et al.* Environmental health impacts of equine estrogens derived from hormone replacement therapy. *Environmental science & technology*, 2009, vol. 43, no 10, p. 3897-3904.

WHO/IPCS. Global assessment of the state-of-the science of endocrine disruptors, 2002. en: World Health Organization/International Program on Chemical Safety. WHO/PCS/EDC/02.2. Disponible en: http://www.who.int/ipcs/publications/new_issues/endocrine_disruptors/en/. Última fecha de consulta: 15 de Juliol, 2016

YAGER, J.; DAVIDSON, N. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 2006, vol. 354, no 3, p. 270-282.

ZHANG, F., *et al.* Equine estrogen metabolite 4-hydroxyequilenin induces DNA damage in the rat mammary tissues: formation of single-strand breaks, apurinic sites, stable adducts, and oxidized bases. *Chemical research in toxicology*, 2001, vol. 14, no 12, p. 1654-1659.