



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

HALOGENACIÓN DE ESTRADIOL Y OTROS ESTRÓGENOS CON EL USO
DE CLOROPEROXIDASA DE *LEPTOXIPHIMUM FUMAGO*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
ELIZABETH UNDIANO CICERO

TUTOR PRINCIPAL
MARCELA AYALA ACEVES
Entidad de adscripción
Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Enrique Salas Vidal
Entidad de adscripción
Instituto de Biotecnología, UNAM

Eduardo Torres Ramírez
Entidad de adscripción
Centro de Química, BUAP

Cuernavaca, Morelos. Junio, 2017



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.

Agradecimientos

A la Dra. Marcela Ayala por su tiempo, esfuerzo, paciencia y apoyo en estos dos años de camino, pero sobre todo por su compromiso con la ciencia y con la formación de investigadores de calidad.

A mi comité tutorial formado por el Dr. Enrique Salas Vidal y Eduardo Torres Ramírez, que cada semestre estuvieron aportando además de su tiempo, conocimientos para encaminar en buena dirección este proyecto de investigación.

A los técnicos académicos Biól. Rosa Román Miranda y Fernando Gómez por su apoyo técnico durante la realización de esta tesis.

Al Dr. Alfonso Miranda por su ayuda en la interpretación en los espectros de resonancia magnética.

A los grupos de los Dres. Lorenzo Segovia, Agustín López y Marcela Ayala cuya disposición y compañerismo hicieron amena esta la estancia en el IBt y que además estaban presentes semana a semana en seminarios que ayudan a la formación de los alumnos del posgrado.

Al grupo de la Dra. Hilda Lomelí y a Denhi Shnabel, que muy amables ayudaron con las pruebas preliminares de pez cebra que al final no se mostrarán en este trabajo.

Al Dr. Agustín López Munguía por el préstamo de los equipos de fluorescencia y HPLC y al Dr. Leobardo Serrano y Dra. Celia Flores por el acceso al espectrómetro de masas.

Al financiamiento de CONACYT, por la beca de maestría con No. de apoyo 405160, del Instituto de Biotecnología por la beca de alimentación y hospedaje otorgada de Septiembre-Diciembre de 2015.

Esta investigación fue realizada gracias al Programa UNAM-DGAPA-PAPIIT IN209116

Y finalmente a mis compañeros de la generación 2016-1 de la maestría en ciencias bioquímicas; a los del grupo de laboratorio de biocatálisis redox y a los de cristalografía de proteínas, con los que compartí el laboratorio 8 del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Índice

INTRODUCCIÓN.....	4
ANTECEDENTES.....	5
Los compuestos halogenados en la naturaleza	5
Enzimas halogenantes.....	6
Cloroperoxidasa (CPO) de <i>Leptoxiphium fumago</i> un caso particular.	9
Características estructurales y función de los estrógenos.....	13
Sitios reactivos para la halogenación electrofílica de estrógenos	17
Estrógenos halogenados	18
HIPÓTESIS.....	20
OBJETIVOS.....	20
MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
RESULTADOS	26
Estrógenos como sustratos de la cloroperoxidasa	26
Identificación de productos clorados de estradiol.	30
Separación de los productos de la reacción	35
Identificación de la posición de halogenación de los compuestos purificados	36
Cinética de formación de productos	40
Potencial carcinogénico de los productos clorados de estradiol: reactividad en presencia de tirosinasa.....	44
Identificación de productos de la reacción de bromación de estradiol.....	45
Grado de bromación del estradiol en las reacciones enzimáticas	47
¿Se pueden halogenar otros estrógenos utilizando la cloroperoxidasa?	50
CONCLUSIONES	54
PERSPECTIVAS	55
REFERENCIAS.....	56
ANEXOS.....	61
ANEXO I. Identificación de compuestos por espectrometría de masas (GC-MS).....	61
Anexo II. : Este proyecto se aceptó para presentar en el XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.....	65

RESUMEN

La cloroperoxidasa del hongo *Leptoxiphium fumago* es una hemoperoxidasa muy versátil, que posee actividad de catalasa, peroxidasa, peroxigenasa y halogenasa según el pH en el que se encuentre¹¹. Esta enzima cataliza la halogenación de sustratos aromáticos³, por ejemplo terpenos, flavonoides y estrógenos. La enzima interactúa indirectamente con el sustrato orgánico, ya que forma un hipohaluro, intermediario oxidante que realiza la reacción de halogenación. Debido a la susceptibilidad al ataque electrofílico del anillo aromático que le otorga el grupo OH al estradiol y a compuestos relacionados, los productos halogenados de la reacción enzimática podrían estar sustituidos en las posiciones 2 y 4. El objetivo de este trabajo es encontrar la posición de halogenación de los compuestos, establecer las condiciones de reacción en la que se lleva a cabo la reacción enzimática de los estrógenos estradiol, estrona y equilina con cloroperoxidasa de *L. fumago* e identificar los productos de reacción.

INTRODUCCIÓN

Los estrógenos son hormonas femeninas que alteran los ciclos reproductivos de mamíferos. Pueden tener diversas estructuras y provenir de distintas fuentes. En la actualidad se usan en medicamentos de reemplazo hormonal, tratamientos para la infertilidad y como alimento para ganado, entre otros usos, de tal manera que la cantidad de estrógenos en el medio ambiente incrementó en las últimas décadas¹². Llegan a cuerpos de agua por medio de la orina y la disposición inadecuada de medicamentos caducos y aunque se desconoce los efectos a largo plazo que pueden tener por su presencia en el ambiente, se sabe que contribuyen a desarrollar cáncer de diversos tipos, como lo son el de mama, endometrio y pituitaria, a pesar de ser hormonas naturales. Cuando los niveles normales de estrógenos en el cuerpo incrementan, enzimas como la tirosinasa o citocromo P450, presentes en el cuerpo de mamíferos, convierte estos compuestos en quinonas, especies reactivas de oxígeno que dañan al ADN,

ocasionan mutaciones y promueven el crecimiento de tejido que forma tumores malignos^{37, 59, 70}.

Desde el 2003 existen estudios que prueban que los estrógenos halogenados en las posiciones 2, 4 o ambas tiene un menor potencial carcinogénico y estrogénico ya que no se forman quinonas y se unen en menor medida al receptor de estrógenos, dos pasos clave en la perturbación endócrina y el desarrollo de cáncer^{17, 37, 41, 50}. Hasta la fecha no hay datos sobre el uso de enzimas para halogenación de estrógenos, pero existen en la naturaleza algunas halogenasas y haloperoxidasas capaces de catalizar la reacción de una amplia variedad de compuestos como alternativa biotecnológica⁴⁹.

ANTECEDENTES

Los compuestos halogenados en la naturaleza

A partir de 1940 se empezaron a utilizar los compuestos halogenados en productos fabricados por el hombre, por ejemplo en extintores, debido a sus propiedades de resistencia a altas temperaturas y a su estabilidad química. Estos productos se empezaron a considerar tóxicos debido a los daños a la salud que ocasionaron los vapores de halones, las bombas de gas lacrimógeno que se utilizaron en la segunda guerra mundial y, más recientemente los insecticidas y compuestos organoclorados. Estos efectos tóxicos e indeseables llevaron a la generalización de que los compuestos halogenados son nocivos para el humano, aunque no se dejaron de usar por las propiedades tan particulares que le otorga a la molécula los átomos de halógeno que son difíciles de reemplazar con otra clase de compuestos.

Con el paso de los años se ha descubierto que los compuestos halogenados son muy comunes en la naturaleza; el flúor y el cloro están dentro de los 20 elementos más abundantes del planeta, por lo que podemos encontrarlos formando parte de compuestos naturales, por ejemplo el NaCl del agua de mar y

los halometabolitos de algas marinas. Hasta el 2014, existían más de 5000 compuestos halogenados provenientes de animales, plantas, hongos y bacterias y día con día se siguen encontrando más compuestos halogenados²⁴.

Los compuestos halogenados son ampliamente utilizados en la industria farmacéutica de tal manera que actualmente 1 de cada 3 fármacos tiene como principio activo un compuesto halogenado. Las propiedades fisicoquímicas que proporciona el átomo de halógeno en la molécula mejoran su acción en el cuerpo humano. Por ejemplo, gracias a su carácter hidrófobo, los fármacos halogenados pueden atravesar eficientemente las membranas plasmáticas⁴⁸; además, son más estables a la temperatura y a agentes oxidantes²⁹. Sin embargo, estas propiedades también los hacen ser más recalcitrantes y persistentes en el ambiente²⁸.

Por ello, aunque existen compuestos halogenados tóxicos y recalcitrantes que se dispersan en grandes cantidades en el ambiente, también existen algunos compuestos halogenados que tienen propiedades útiles y benéficas para la salud humana, sobre todo en pequeñas dosis, por lo que el estudio de este tipo de moléculas, sus blancos biológicos y su obtención por vías químicas y/o biotecnológicas es un campo activo de investigación científica²⁸.

Enzimas halogenantes

Existen diferentes tipos de enzimas capaces de catalizar reacciones de halogenación de sustratos orgánicos, las cuales se clasifican de acuerdo a la información mostrada en la Tabla 1.

Tabla 1. Enzimas halogenantes conocidas ⁴⁹

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 fueron las primeras enzimas descritas capaces de catalizar reacciones de halogenación, mientras que las halogenasas, fluorinasas y clorinasas se han descrito recientemente. Por estos motivos, en la literatura es posible encontrar mayor información sobre las reacciones que catalizan las haloperoxidasas, sus mecanismos de reacción y de catálisis, su estructura tridimensional, etc. La especificidad hacia el sustrato de las haloperoxidasas es baja en comparación con las halogenasas o las clorinasas. Una limitante de las haloperoxidasas, dentro del campo de la síntesis de fármacos, es que son incapaces de catalizar reacciones de fluoración, debido a que no tienen el potencial redox necesario para oxidar iones fluoruro. Por otro lado, las fluorinasas son capaces de catalizar la reacción mediante un mecanismo diferente, no oxidativo, y que se ha propuesto es de sustitución nucleofílica tipo SN₂ ⁵⁴.

Las haloperoxidasas llevan a cabo reacciones redox tomando como sustrato peróxido de hidrógeno y un ion haluro (cloruro, bromuro y/o yoduro) para formar hipohaluros; estos hipohaluros siguen un mecanismo de halogenación electrofílica sobre los sustratos aromáticos. Cabe mencionar que son las únicas peroxidases que catalizan la oxidación de dos electrones de iones haluro a iones hipohaluro ⁵⁸. En este grupo se encuentran las hemoperoxidasas, llamadas así porque contienen un grupo prostético hemo en su sitio activo, un heterociclo de porfirina con un ión de Fe²⁺ en su centro. En la Figura 1 se muestran algunas características importantes del sitio activo de estas enzimas.

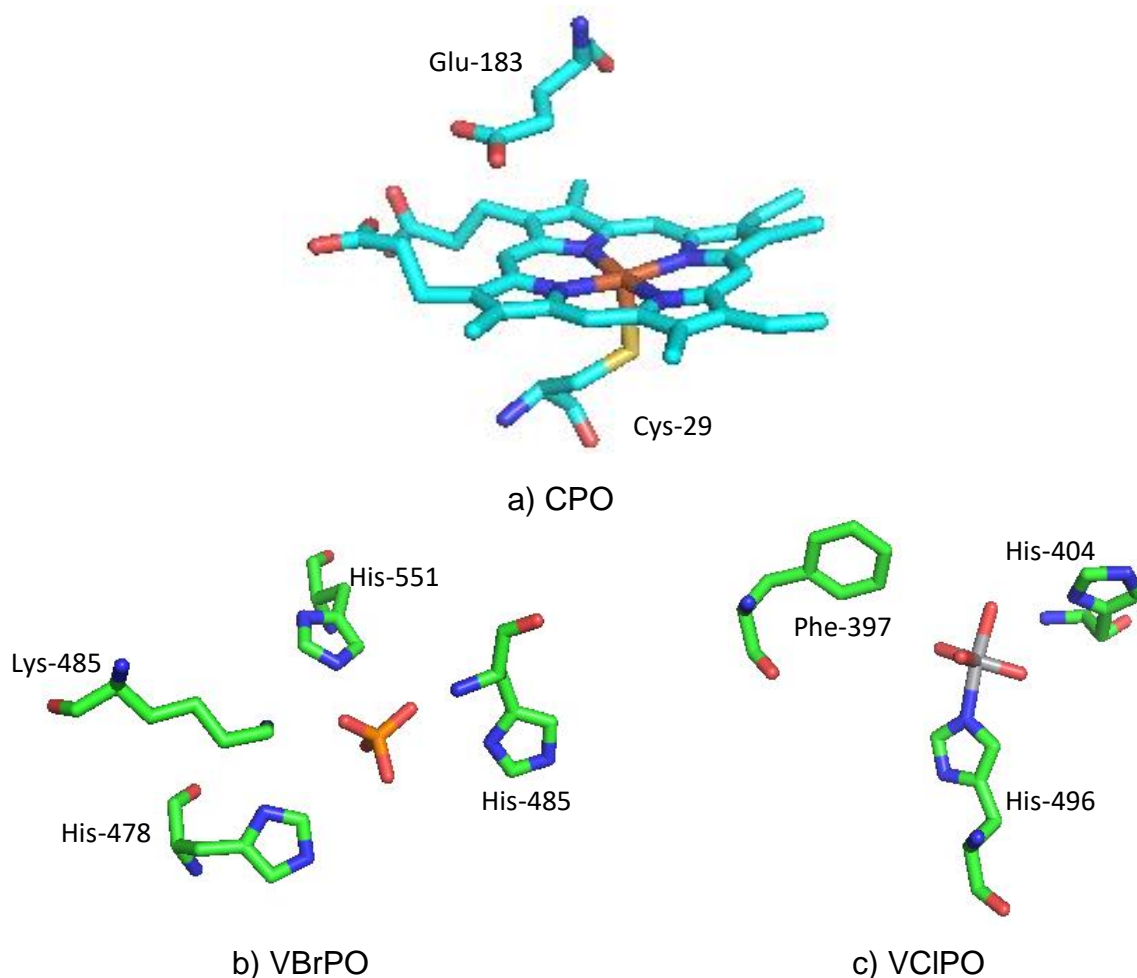


Figura 1. Sitio activo de diferentes haloperoxidasas a) Cloroperoxidasa de *Leptoxiphium. fumago* (PDB: 1CPO)⁵⁸; b) Vanadio bromoperoxidasa de *Corallina officinalis* (PDB: 1QHB)⁶⁴; c) Vanadio cloroperoxidasa de *Curvularia inaequalis* (PDB: 1IDQ)¹³

Cloroperoxidasa (CPO) de *Leptoxiphium fumago* un caso particular.

La cloroperoxidasa es una glicoproteína con un peso molecular de 42000 Da conformada en su mayoría por α -hélices, como vemos en la figura 2. Se descubrió mientras se estudiaba la vía de síntesis de la caldariomycina, un metabolito del hongo *Leptoxiphium fumago* (antes *Caldariomyces fumago*) que tiene propiedades antimicrobianas³⁰. Es una enzima muy versátil y forma parte de una familia de hemoproteínas, que a diferencia de las peroxidadas de plantas, tienen un tiolato proveniente de un residuo de cisteína como ligando axial del hemo. Se ha propuesto que entre otros factores, este ligando axial favorece que la enzima sea capaz de catalizar reacciones de halogenación⁵⁸.

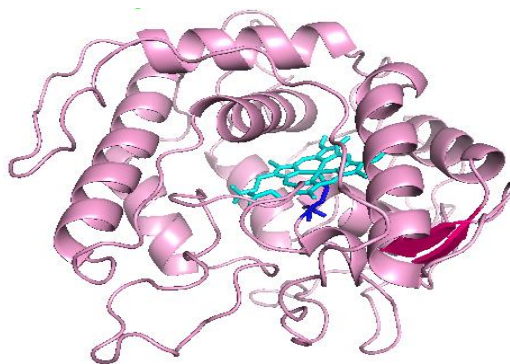


Figura 2. Estructura secundaria de la cloroperoxidasa de *L. fumago*. En rosa se muestran las hélices alfa, en cian el grupo hemo, en azul el residuo de cisteína, y en magenta las hojas β .

La CPO también tiene actividad de oxigenasa, catalasa y peroxidasa. Comparte propiedades similares con las hemo peroxidadas clásicas que catalizan la oxidación de un electrón dependiente de H_2O_2 y con las monooxigenasas P450, las cuales transfieren un átomo de oxígeno al carbono con el que reaccionan¹¹. Dentro de los compuestos que puede halogenar se encuentran las cetonas cíclicas, como la monoclorodimedona (el sustrato para el ensayo estándar), y varios compuestos con enlaces π , tales como hidrocarburos poliaromáticos, terpenos, flavonoides, etc.^{1, 3, 23, 71} como se mencionará más adelante. La reacción de halogenación tiene un pH óptimo de 3 y requiere la presencia de iones cloruro, bromuro o yoduro²⁶.

El mecanismo de catálisis de esta enzima está esquematizado en la figura 3. Comienza cuando el grupo hemo reacciona con una molécula de peróxido de hidrógeno formando una especie 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. Posteriormente un ion haluro presente en el medio reacciona con el compuesto I para producir un intermediario de hipohaluro férrico, $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{OCl})$, llamado compuesto X; se cree que es un compuesto clave para la halogenación de sustratos orgánicos por la CPO, debido a que es muy oxidante. Existe evidencia espectroscópica del compuesto X⁶⁸ y aunque durante muchos años hubo controversia sobre el papel del compuesto X en la reacción de halogenación, actualmente la mayor parte de la evidencia sugiere que el compuesto X libera un hipohaluro regresando al estado basal. El hipohaluro podría difundir al medio y ser el responsable de la halogenación del sustrato orgánico^{11, 58}.

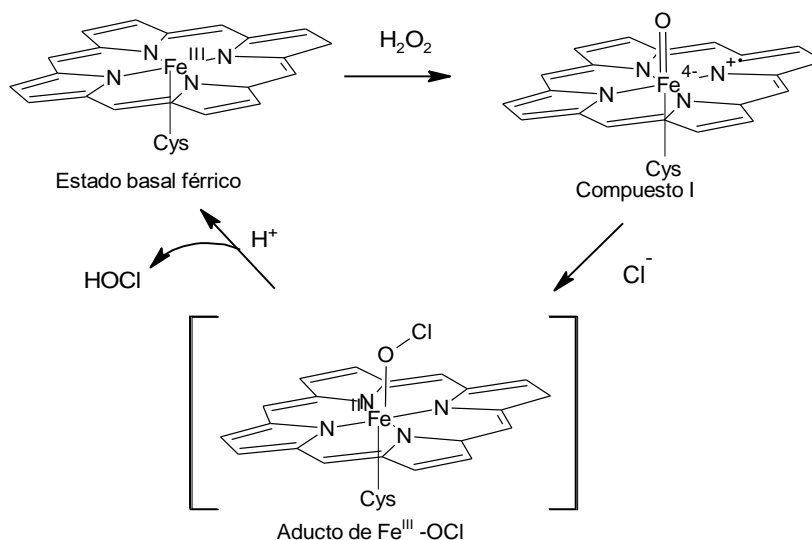


Figura 3. Mecanismo para la reacción de cloración catalizada por la CPO de *L. fumago*⁵⁸.

De acuerdo con los reportes en la literatura, la cloroperoxidasa es capaz de catalizar la halogenación de varias moléculas aromáticas como hidrocarburos policíclicos aromáticos, lignina, flavonoides y terpenos³. Para los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) se observó que la velocidad de reacción de

halogenación es dependiente del potencial de ionización del sustrato; en general la enzima cataliza la halogenación de HAPs con un potencial de ionización menor a 8.52 eV, por ejemplo, el antraceno, fenantreno y pireno ². Los productos son exclusivamente halogenados, es decir, no se detectaron compuestos oxidados tipo quinonas, como se ha observado para otras hemoperoxidasas⁵⁸. Los HAPs pueden ser halogenados en diferentes posiciones, como se muestra en la figura 4.

La cloroperoxidasa también puede halogenar otro tipo de sustratos como los flavonoides, metabolitos secundarios de las plantas que se utilizan como principio activo en medicamentos, por sus propiedades antioxidantes, bactericidas, etc.; ejemplo de ellos son la naringenina y la hesperetina, que contienen en su estructura un anillo aromático unido a ciclos alifáticos con diferentes sustituciones. En el caso de la naringenina, la CPO es capaz de catalizar la halogenación de dos posiciones del anillo aromático y esto ocurre tanto con bromuro, como con cloruro pero con diferentes rendimientos de reacción y en una posición distinta del compuesto monohalogenado. En la figura 4 vemos los compuestos resultantes de cada reacción con los rendimientos respectivos de la reacción⁷¹.

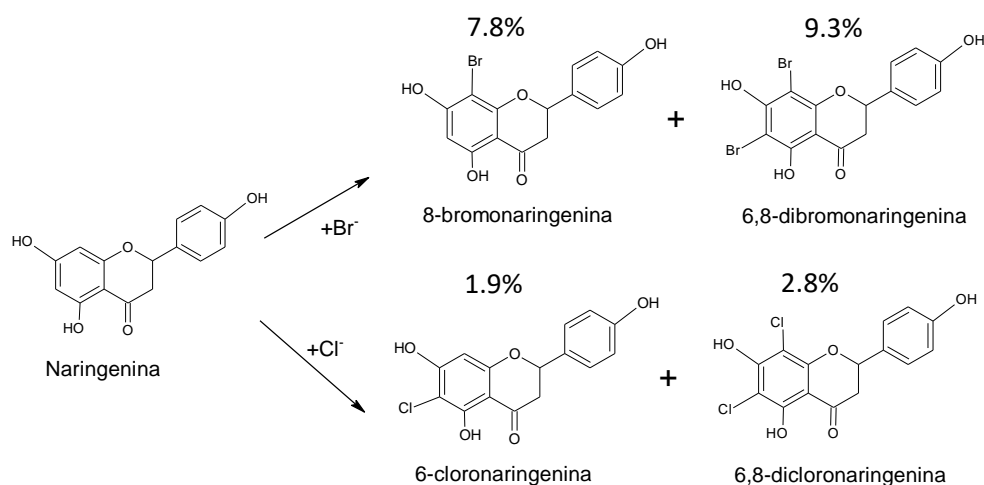
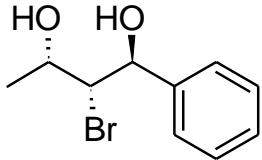
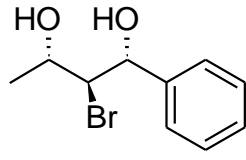


Figura 4. Halogenación de un flavonoide con cloroperoxidasa de *L. fumago*.

En resumen, las haloperoxidasas no reaccionan directamente con el compuesto orgánico que halogenan, sino que catalizan la reacción produciendo especies altamente reactivas y utilizan tres sustratos: el peróxido de hidrógeno, el

haluro y un sustrato orgánico, generalmente con enlaces π . Sin embargo, y de forma muy interesante, las enzimas catalizan algunas reacciones con una mayor regioselectividad y diaestereoespecificidad que las reacciones químicas con agentes halogenantes como la N-bromoacetamida. Un ejemplo de ello es la formación de halohidrinas a partir de alquenos, reacciones de interés industrial por ser los intermediarios en la síntesis de epóxidos y glicoles⁷². La bromohidrinación de (E)-4-fenil-3-buten-2-ol catalizada por haloperoxidasas, es diaestereoespecífica y muy similar entre la cloroperoxidasa de *L. fumago* y la vanadio-bromoperoxidasa de *C. officinalis*, pero es diferente a la de la reacción química análoga con N-bromoacetamida¹³. En la tabla 2 vemos el rendimiento de cada producto.

Tabla 2. Diaestereoespecificidad de la bromohidrinación de (E)-4-fenil-3-buten-2-ol¹³

Catalizador	 S, R,S	 R,S,S
N-bromoacetamida (NBA)	75%	25%
Cloroperoxidasa (<i>L. fumago</i>)	61%	39%
Vanadio bromoperoxidasa (<i>C. officinalis</i>)	66%	34%

La regioselectividad de estas reacciones también es mayor con enzimas que con catalizadores químicos usando como sustrato el alcohol α -metil cinamílico, como vemos en la tabla 3.

Tabla 3. Regioespecificidad de la bromohidrinación de alcohol α -metil cinamílico¹³

Catalizador	Productos	Rendimientos (%)
Cloroperoxidasa (CPO)	2-bromo-2-metil-3-fenilpropano-1,3-diol	100
N-bromoacetamida (NBA)	2-bromo-2-metil-3-fenilpropano-1,3-diol	85
	3-bromo-2-metil-3-fenilpropano-1,2-diol	15

Por este motivo, resulta interesante ampliar el conocimiento disponible sobre este tipo de reacciones enzimáticas, pues estos casos sugieren que la enzima, después de todo, podría jugar un papel importante en el reconocimiento del sustrato orgánico.

Los estrógenos: características estructurales y funciones

Los estrógenos son hormonas sexuales, principalmente femeninas, provenientes tanto de fuentes naturales como sintéticas. Se clasifican según su estructura en esteroides o no esteroides; los esteroides provienen del colesterol y tienen como base una estructura de 18 carbonos llamada esterano o *ciclopentanoperhidrofenantreno*, que consta de cuatro anillos unidos entre sí: tres ciclohexanos y un ciclopentano. En la figura 5 se muestra el esterano con los sustituyentes típicos de los estrógenos esteroides.

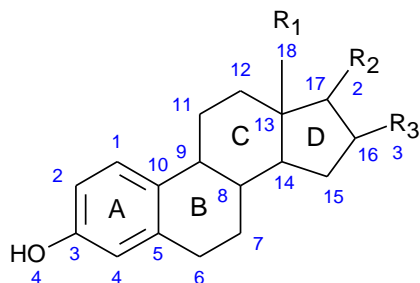


Figura 5. Estructura y numeración general de los estrógenos esteroides

El sustituyente R1 unido al carbono 13 es un grupo metilo para todos los estrógenos esteroides. Los sustituyentes R2 y R3 son diferentes en cada estrógeno, pudiendo ser un grupo cetónico o un hidroxilo.

La estructura de los estrógenos esteroides les otorga propiedades fisicoquímicas y bioquímicas en común, por ejemplo, son muy poco solubles en agua. La característica que tienen en común todos los estrógenos, ya sean de naturales o sintéticos, esteroides o no esteroides es un anillo fenólico que determina la potencia estrogénica, la unión selectiva y la alta afinidad de la molécula a receptores de estrógeno ⁵⁵.

Su acción involucra un factor de transcripción que regula la actividad de ciertos genes llamado receptor de estrógenos. La afinidad que tenga una molécula por este factor determina su potencia estrogénica, por lo general va referenciada a la afinidad que tiene por el estradiol^{32, 57, 15, 51}. De esta manera, cada estrógeno tiene un potencial estrogénico distinto. El estradiol es la hormona natural con mayor efecto estrogénico, y el etinilestradiol, que es sintético, se diseñó para tener una mayor actividad, que es más de dos veces mayor.

Los estrógenos tienen varias funciones: regulan el sistema reproductivo, y participan en el crecimiento, desarrollo y diferenciación de tejidos de hueso, hígado e incluso cerebro^{53, 32, 73}.

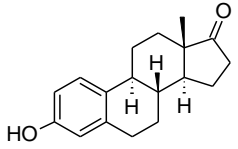
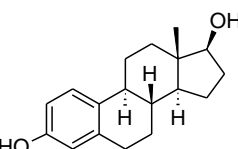
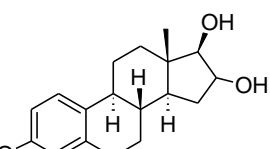
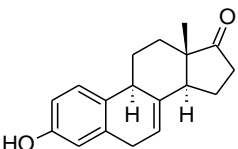
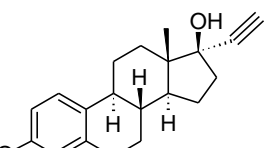
Existen estrógenos que provienen de animales, plantas y algunos hongos que tienen diferente estructura y función. En plantas y hongos la función es aún desconocida, aunque se cree que en hongos tienen un papel en la defensa contra herbívoros y agentes patógenos⁵⁵. Por su importancia y uso, también se producen estrógenos sintéticos los cuales tienen sutiles pero importantes diferencias a nivel estructural, ya que con pequeños cambios en su estructura se puede incrementar la potencia estrogénica. Tal es el caso del etinilestradiol, que con un sustituyente etinil en el carbono 17 se vuelve más potente que la molécula natural estradiol⁵⁷.

En el cuerpo humano hay tres estrógenos que se encuentran en mayor medida. La cantidad varía según la edad y el género¹⁴. El 17 β -estradiol (E2) es la hormona estrogénica mayoritaria, que está presente durante todo el ciclo reproductivo de las mujeres; la estrona (E1) se encuentra en mujeres posmenopáusicas y en hombres; y el estriol (E3), que es producto del metabolismo de estrona y estradiol, es más abundante durante el embarazo.

Los medicamentos que se usan en los tratamientos de reemplazo hormonal, píldoras anticonceptivas y tratamientos para la infertilidad se formulan con estrógenos como el estradiol y el etinilestradiol, pero también con otros

compuestos relacionados, tales como los de origen equino, equilina y equilenina,^{29, 54}. Todos ellos poseen estructuras similares, como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Propiedades de algunos estrógenos^{57, 64}

Compuesto	P.M. (g mol ⁻¹)	Solubilidad en agua (mg L ⁻¹ 20°C)	EC ₅₀ ^(*) (M)	Actividad estrogénica relativa (%)**
Estrona (E1) 	270.4	13	7.02x10 ⁻¹⁰	2.54
17β-Estradiol (E2) 	272.4	13	1.84x10 ⁻¹¹	100
Estriol (E3) 	288.4	13	--	17.6
Equilina (EQ) 	268.4	1.4 ⁽²⁹⁾	5.5x10 ⁻¹⁰ ⁽⁶⁷⁾	15 ⁽⁶⁷⁾
Etinilestradiol 	296.4	4.8	6.75x10 ⁻¹²	246

(*) Ensayo *in vitro* para células MELN. EC₅₀: dosis efectiva para producir la mortalidad del 50% de la población de estudio.

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

Existen otro tipo de compuestos llamados xenoestrógenos que son desarrollados por el ser humano y, aunque no estén diseñados con ese fin, pueden mimetizar la acción de los estrógenos. Como ejemplos de ellos encontramos al nonilfenol, un tensoactivo usado en la formulación de detergentes, los ftalatos, usados como plastificantes, y al bisfenol A, el monómero de plásticos de policarbonato³⁴. Son capaces de perturbar el funcionamiento del sistema endócrino de organismos acuáticos modificando los caracteres y órganos sexuales.

En organismos acuáticos puede ser determinante la actividad estrogénica para alterar su ciclo reproductivo ya sea por la unión a estrógenos o a xenoestrógenos. El etinilestradiol induce efectos estrogénicos en varios tipos de peces desde muy bajas concentraciones²¹.

Además, se ha visto que los estrógenos participan en un metabolismo oxidativo que contribuye al desarrollo de cáncer de mama, pituitaria, próstata entre otros cuyo producto son quinonas, metabolitos muy reactivos considerados moléculas carcinogénicas⁸. Estas moléculas oxidan lípidos y ADN mediante la liberación de especies reactivas de oxígeno y forman aductos inestables con las adeninas y guaninas^{70, 59, 56}. Algunas enzimas presentes naturalmente en el cuerpo humano, como lo son los citocromos P450 (1A1, 1A2 y 3A), o las tirosinasas pueden oxidar al estradiol formando catecoles⁹, que se transforman posteriormente en quinonas. Estos procesos se esquematizan en la figura 6.

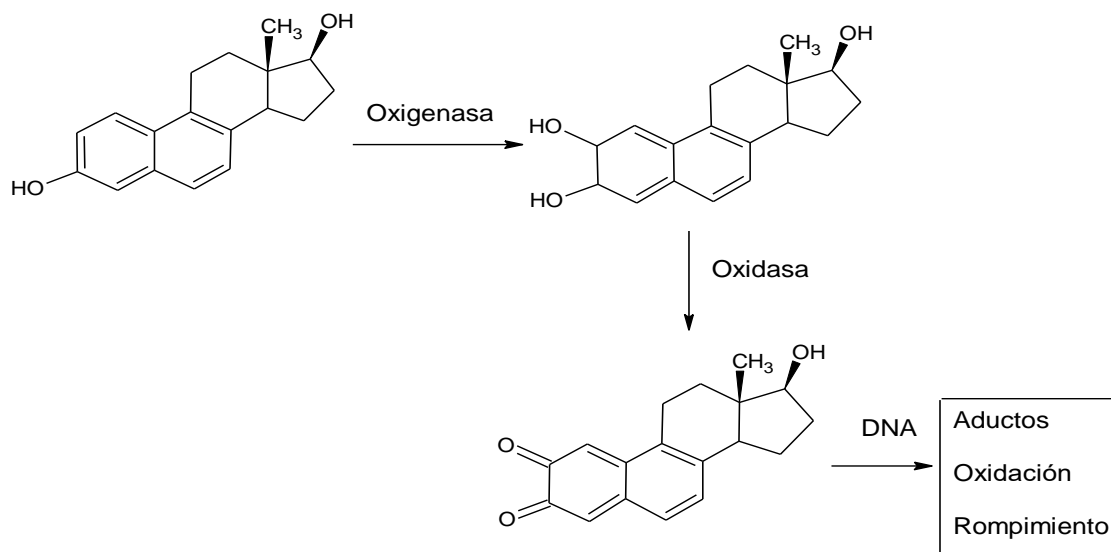


Figura 6. Mecanismo de toxicidad propuesto para compuestos estrogénicos⁹.

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 electroatractor (desactivadores) hacia el anillo aromático⁶⁴:

- Activadores débiles (dirigentes *orto* y *para*): grupos alquilo y fenilo $-\text{CH}_3$, $-\text{Ph}$. 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 $-\text{OH}$, $-\text{OCH}_3$, $-\text{NH}_2$. Activan el anillo por efecto resonante.
- Desactivadores débiles (dirigentes *orto* y *para*): desactivan por efecto inductivo. En este grupo están los halógenos $-\text{F}$, $-\text{Cl}$, $-\text{Br}$, e $-\text{I}$.
- Desactivadores fuertes (dirigentes *meta*): Son grupos $-\text{CHO}$, $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{NO}_2$ 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 un par de electrones, debido a la resonancia con el anillo aromático, 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 en principio es posible realizar la halogenación de estrógenos para formar compuestos halogenados como los que se muestran en la Figura 7.

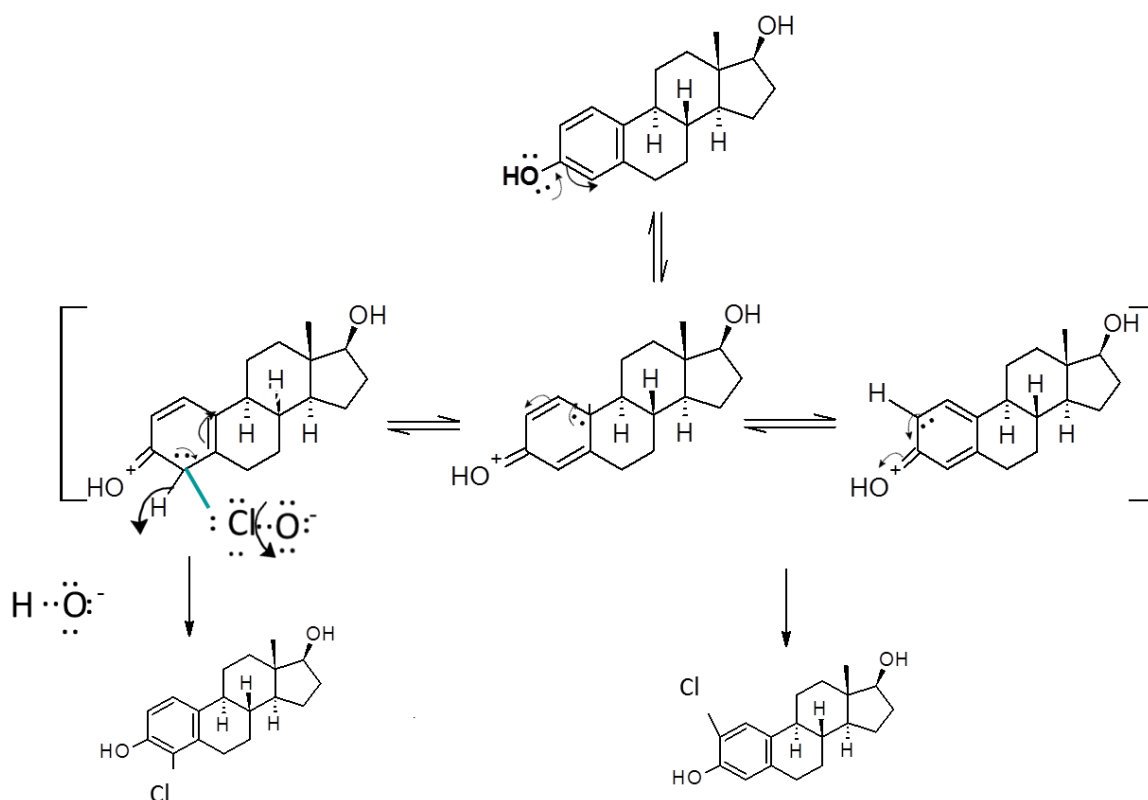


Figura 7. Sustitución electrofílica de estradiol que da como resultado halogenaciones en las posiciones *orto*: 2-cloroestradiol y 4-cloroestradiol

Estrógenos halogenados

En las plantas de tratamiento de agua se llevan a cabo reacciones de halogenación de estrógenos con el hipoclorito de sodio utilizado para el saneamiento de aguas; en este tipo de sistemas se han detectado estrógenos mono- y dihalogenados con átomos de cloro y bromo. *In vitro* se ha visto que los

productos dependen de la naturaleza química del estrógeno y el tipo de haluros que se encuentren en el agua ^{50, 25}. Los productos que se han observado varían según el estrógeno, pero en su mayoría son compuestos halogenados en la posición 2 y 4 del anillo aromático monohalogenados y dihalogenados²⁵, tal como el que se muestra en la figura 8.

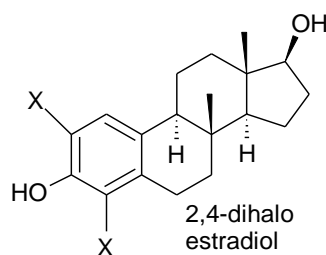


Figura 8. Estradiol halogenado en el anillo A

Algunas de las propiedades de los estrógenos halogenados ya han sido documentadas. Por ejemplo, algunos derivados halogenados del estradiol, como el 2-fluoroestradiol, son menos tóxicos que su compuesto parental, ya que se reduce dramáticamente la inducción de tumores renales *in vivo*, tomando como modelo a roedores³⁶. Otro estrógeno que halogenado en la posición 4 es menos tóxico, es la equilenina. El halógeno -ya sea flúor, cloro o bromo- que sustituye esa posición evita la formación de quinonas por la vía mencionada en la figura 6; además la afinidad que tiene el receptor de estrógenos por estos compuestos es menor que la de la molécula sin halogenar⁴¹. 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 ^{41, 37}.

La halogenación en la industria química tiene tecnologías bien establecidas, sin embargo, 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 procesos²⁰.

La información sobre halogenación enzimática de estrógenos es muy limitada hasta la fecha, pero existen varias enzimas capaces de realizar las reacciones, como mencionamos anteriormente. En un estudio realizado en nuestro grupo de investigación en 2015, se hizo la observación de que biocatalizadores basados en la cloroperoxidasa de *L. fumago* catalizaban la cloración de estradiol. Se formaron productos monohalogenados y dihalogenados⁶⁰. Sin embargo, en este estudio faltó un análisis completo de la reacción enzimática y comprobar 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* al grupo OH, que corresponde a las posiciones 2 y 4 del estradiol.

HIPÓTESIS

Los productos de la halogenación de estradiol con la cloroperoxidasa de *L. fumago* serán compuestos monohalogenados y dihalogenados en las posiciones 2 y 4 del anillo aromático

OBJETIVOS

General

Estudiar la síntesis de derivados halogenados de compuestos de la familia del estradiol, catalizada por la cloroperoxidasa de *L. fumago*

Particulares

- Describir las cinéticas de las reacciones de halogenación de los estradiol, estrona y equilina con dos iones (Cl⁻ y Br⁻) y obtener los parámetros cinéticos (k_{cat}, K_m).
- Caracterizar los productos de la reacción: estructura, grado de halogenación (mono, di, tri, etc).
- Determinar la reactividad de los compuestos halogenados con tirosinasa

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos:

Los estrógenos elegidos fueron estrona, equilina y estradiol, los cuales se adquirieron en Sigma, al igual que el peróxido de hidrógeno y el sulfato de sodio anhidro. Las sales (cloruro y bromuro de potasio) y solventes (acetonitrilo, diclorometano, etanol, acetato de etilo, ácido acético e isopropanol) provienen de JT Baker. Las placas de TLC y PLC se adquirieron en Merck. La cloroperoxidasa utilizada fue donada por el profesor M. Pickard de la Universidad de Alberta en Canadá. Fue producida por la cepa CMI 89362 del hongo *L. fumago* y purificada de acuerdo a lo reportado⁷⁵. Su pureza electroforética fue mayor al 90%.

Equipos

- Espectrómetro de fluorescencia de luz UV Perkin Elmer LS 55
- Rotavapor Buchi RII
- Cromatógrafo de Líquidos de alta eficiencia (HPLC)
 - Columna analítica C18 Agilent Zorbax Eclipse Plus 4.6 x 150 mm, 5 µm. Carga de carbono 10%.
 - Columna semipreparativa C18 Waters Spherisorb 20 x 250 mm, 5 µm. Carga de carbono 11.5%
- Espectrómetro de gas-masas (GC-MS):
 - Sistema GC hp Hewlett packard serie HP 6890
 - Detector selectivo de masas Agilent Technologies 5973 inert

Medio para la reacción de halogenación catalizada por CPO

Los estrógenos tienen una baja solubilidad en agua, por lo que se tiene que utilizar una pequeña porción de solvente para hacer posible la reacción. Sin embargo, el solvente tiene un efecto desactivante en la enzima, por lo que se debe añadir en baja proporción. Para determinar cuantitativamente el efecto que tiene la presencia del solvente en la actividad de la enzima, se midió la velocidad inicial de halogenación de un sustrato modelo (monoclorodimedona) en presencia de 10 y

20% de solvente (Isopropanol). Como se muestra en la figura M.1, se observó que la actividad baja casi 3 veces con 10% de IPA y más de 4 veces con el 20% de alcohol.

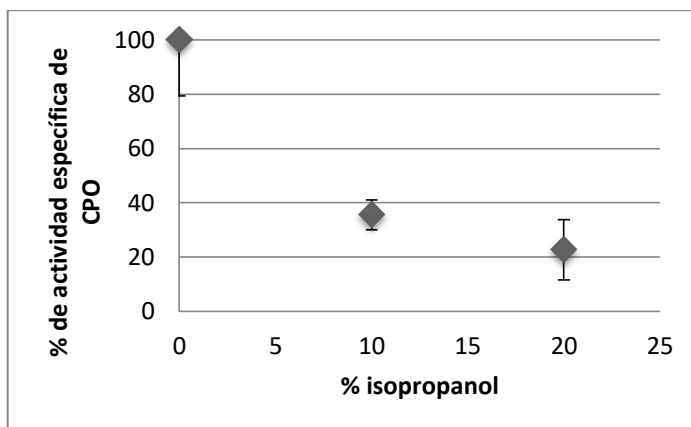


Figura M.1. Efecto del isopropanol en la velocidad inicial de la enzima (triplicado).

Por otro lado y para comprobar si el alcohol desactiva a la enzima se realizó un ensayo para medir la actividad residual a diferentes tiempos de incubación de la enzima con 20% de solvente. Como se muestra en la figura M.2, se observó que la actividad de la enzima se reduce lentamente con el tiempo, sin embargo conserva el 70% de actividad a los 10 minutos y como el tiempo que dura la reacción de halogenación de los estrógenos está alrededor de 3 minutos, se pueden usar estas condiciones para llevar a cabo la reacción. Se decidió usar el 10% de isopropanol para realizar las cinéticas de halogenación de los estrógenos, para retener mayor actividad de la enzima y poder solubilizar del orden de centenas de μM de los estrógenos.

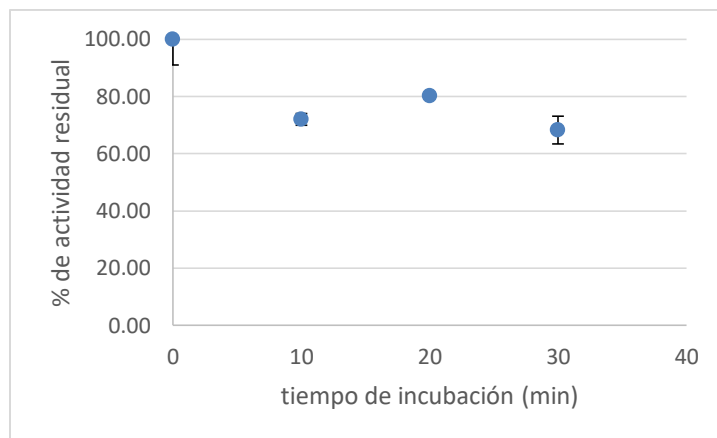


Figura M.2 Efecto del isopropanol en la actividad residual de la enzima (triplicado).

Cinéticas de halogenación enzimática de estrógenos

Se realizó en un espectrómetro de fluorescencia Perkin Elmer LS 55. Ya que los productos halogenados de la reacción fluorescen tanto o más que los reactivos, se eligió una longitud de onda tal que se leyera la emisión de los sustratos sin interferencia de productos. Para determinarla hay una función en el espectrómetro llamada "Scan" que hace un barrido de longitudes de onda de excitación y de emisión (entre 200 y 310 nm) del que resulta un diagrama de superficies en 3D en el que se ve el máximo de fluorescencia de la especie fluorescente. Se hizo primero el scan de una mezcla de reacción de 3 mL a 28°C llevando a una concentración final las siguientes especies: Buffer de acetatos pH=3 48 mM, KCl 2 mM, 10% v/v isopropanol (IPA) y estradiol, estrona o equilina 100 uM. Después se añadió a esa mezcla peróxido de hidrógeno a una concentración final de 0.5 mM y 1.23×10^{-3} U/mL de enzima y se realizó un scan. Se eligió la longitud de excitación y de emisión dónde los máximos de los productos y los reactivos no se interfirieran entre sí.

Para determinar la abertura de slit adecuada se hicieron de nuevo las mezclas de reacción y de productos, se fijaron las longitudes de onda y se leyó la fluorescencia en otro método del espectrómetro (“single read”). Se eligió una abertura tal que la fluorescencia no pasara de 800 F, y que la lectura no tuviera ruido (que la lectura no estuviera muy intermitente).

Tabla 5 Valores seleccionados de excitación y emisión en que se puede medir la desaparición de sustrato sin interferencia de los productos.

	Emisión		Excitación	
	λ (nm)	Slit	λ (nm)	Slit
17 β -Estradiol (E2)	307	5	225	2.5
Estrona (E1)	310	4	230	5
Equilina (EQ)	310	4	235	6

Usando esos valores se determinó la velocidad inicial de la reacción siguiendo la disminución de fluorescencia con el tiempo a 28°C, variando las concentraciones de estradiol, estrona y equilina en una mezcla de reacción de 3 mL conteniendo amortiguador de acetatos 60 mM pH 3, 2 mM KCl o KBr, 0.5 mM H₂O₂ y 10% de isopropanol. La reacción se inició al agregar la enzima, para la cloración se añadieron 1.23x10⁻³ U/mL y para la bromación 2.5x10⁻⁴ U/mL. Las reacciones tardaron aproximadamente 3 min en llegar a un 100% de conversión.

Separación de productos con cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) fase reversa. Columna analítica C18.

Todas las muestras secas se re-suspendieron en 200 μ L de acetonitrilo y se inyectaron 20 μ L al HPLC. El gradiente de agua-acetonitrilo fue:

Tabla 6. Gradiente utilizado en la columna analítica

Tiempo (min)	% Agua	% Acetonitrilo
0	40	60
3	40	60

10	20	80
15	20	80
16	40	60
20	60	60

Separación de productos con cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) columna semipreparativa.

Se separó una muestra de 700 µL de productos de estradiol clorado disueltos en acetonitrilo a una concentración desconocida. Se hicieron 12 inyecciones de 50 µL de muestra colectando un total de 9 picos con el siguiente gradiente.

Tabla 7. Gradiente utilizado en la columna semipreparativa

Tiempo (min)	% Agua	% Acetonitrilo
0	30	70
3	30	70
15	0	100
20	0	100
21	30	70
30	30	70

Análisis de los productos por espectrometría de masas GC-MS

Se usó un detector selectivo de masas de Agilent Technologies 5973 inert acoplado a un sistema de cromatografía de gases HP Hewlett packard serie HP 6890 con una columna HP-5MS para analizar todos los productos de halogenación. Los compuestos con grupos polares -como -OH- en su estructura se tienen que derivatizar antes de analizarse por GC-MS. Existen varios agentes derivatizantes, se usó N,O-bis (trimetil-silil) acetamida para silanizar, se colocaron las muestras en un baño a 60°C durante 20 min y después se inyectó al GC-MS. La máxima temperatura que puede soportar la columna es 350 °C, por lo que se hizo un perfil de temperaturas como sigue: 5 min a 100 °C, una rampa de calentamiento de 20 °C/min hasta llegar a 300 °C, 5 min a 300 °C. La corrida duró 20 minutos, después de los cuáles se obtiene el cromatograma y el perfil de

ionización de la muestra inyectada.

Reacciones de oxidación de estrógenos.

Se utilizó una mezcla de reacción 50 uM de estradiol y un aproximado igual de los productos clorados -pudieron haber pérdidas en el proceso de obtención-. Las reacciones con peroxidasa duraron 30 minutos; después de ese tiempo se realizó una extracción orgánica con diclorometano (3 lavados de 1 mL de solvente por cada 10 mL de reacción) y se secó la fase orgánica.

Las reacciones de tirosinasa se detuvieron después de 3 hrs. Se mantuvieron todo el tiempo en agitación. Después se detuvieron realizando una extracción orgánica con diclorometano (3 lavados de 0.4mL de solvente por cada 2 mL) y se secó la fase orgánica.

Para analizarlos se inyectaron en HPLC y en GC-MS siguiendo el método descrito anteriormente.

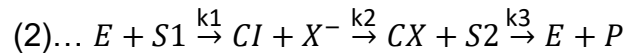
RESULTADOS

Estrógenos como sustratos de la cloroperoxidasa

Contando con el antecedente publicado por nuestro grupo de investigación⁶⁰ se ensayaron estradiol y otros dos estrógenos relacionados (equilina y estrona) como sustratos de halogenación de la CPO. Uno de los primeros retos a resolver fue establecer un método para determinar la velocidad inicial de reacción. El estradiol y sus productos de reacción tienen máximos de absorbancia en longitudes de onda UV cercanas, así que los productos interfieren con la lectura al medir la desaparición de estradiol por métodos espectrofotométricos. En espectroscopía de fluorescencia los máximos de emisión de los productos no interfieren con los del sustrato, así que pudimos establecer un método sencillo, sensible y rápido para determinar la desaparición de estradiol, equilina y estrona por medio de la disminución de fluorescencia del sustrato. Las condiciones en las que se

realizaron las reacciones así como los factores de conversión entre fluorescencia y concentración se describen en la sección de materiales y métodos.

El modelo cinético que proponemos describe a nuestra enzima involucra cuatro especies que reaccionan para formar un producto y se representa a continuación:



Dónde:

E=Cloroperoxidasa

S1=H₂O₂

X⁻= Haluro

CI=Compuesto I

CX=Compuesto X (Intermediario

halogenante)

S2= sustrato orgánico (Estrógeno)

P= Producto halogenado

El Compuesto X (CX) es un aducto haluro-profirina que en este modelo es la especie que halogena al sustrato orgánico. Durante muchos años hubo controversia sobre si CX era el responsable directo de la halogenación del sustrato orgánico o si CX libera un hipohaluro que reacciona con el sustrato orgánico fuera del sitio catalítico. La teoría más aceptada es la formación del hipohaluro, por lo que tomamos al compuesto CX como el intermediario halogenante. La velocidad de reacción depende de la concentración de los tres sustratos y de la enzima, y la ecuación que describe esta cinética es muy compleja, ya que involucra muchas variables. Para simplificarlo trabajamos en exceso de peróxido y haluro de modo que la única variable sea la concentración de estradiol.

Una vez que obtuvimos las velocidades iniciales ajustamos los datos al modelo de una hipérbola, debido a que describe su tendencia con un coeficiente de correlación cercano a 1. El modelo de Michaelis-Menten es similar, sin embargo, los parámetros obtenidos de k_{cat} y K_m se definen de distinta manera son aparentes, pero no están (ver ecuación 1). Realizamos el ajuste no lineal con el complemento de Excel "Solver" para obtener los parámetros cinéticos y la correlación que obtuvimos fue cercana a 1, lo cual indica que ese modelo describe bien nuestra reacción enzimática.

$$\text{Ecuación (1)... } v = \frac{k_{cat_{app}} * E * S}{K_{m_{app}} + S}$$

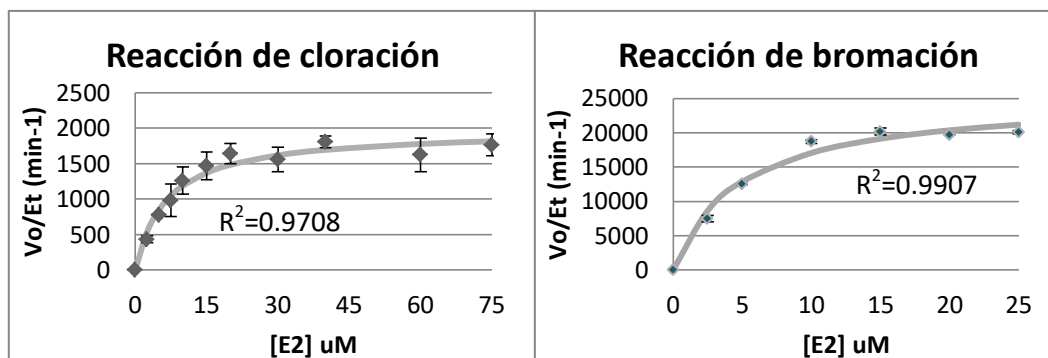


Figura 9. Cinéticas de halogenación de estradiol medidas como la velocidad inicial específica de desaparición de sustrato a diferentes concentraciones.

Todas las reacciones se hicieron por triplicado, obteniendo una desviación estándar baja para todos los puntos de las gráficas mostradas en la Figura 9. Como control negativo realizamos una cinética en un medio con todos los reactivos excepto enzima y la velocidad inicial fue cero, por lo que no hubo reacción. Los parámetros cinéticos obtenidos de las reacciones de halogenación con cloruro y bromuro están resumidos en la Tabla 8.

Tabla 8. Parámetros cinéticos de halogenación de estradiol.

Parámetros	Cl ⁻	Br ⁻
Km (μM)	6.6	4.8
k _{cat} (min ⁻¹)	1.97x10 ³	25.2x10 ³
k _{cat} /Km(M ⁻¹ s ⁻¹)	0.5x10 ⁷	8.7x10 ⁷

La constante cinética Km es la concentración de sustrato a la cual la enzima alcanza la mitad de la velocidad máxima; se espera que este valor sea bajo para que una enzima sea eficiente catalizando la conversión de un sustrato. También nos da indicios acerca de la concentración que debe tener el sustrato para alcanzar la zona de saturación de la enzima. Tanto para la reacción de cloración como la de bromación este valor está en el orden de μM, lo cual nos dice que la enzima cataliza eficientemente la halogenación de estradiol, más la de bromación, por que el valor es más bajo que el de cloración.

Para cualquier reacción que siga el modelo de Michaelis-Menten una concentración de sustrato con un valor de $10 K_m$ indica que la velocidad inicial es 90% de V_{max} . Para estradiol, esa concentración es $6.6 \mu M$ con KCl y $4.8 \mu M$ con KBr, o sea que alcanzaríamos la zona de saturación en 66 y $48 \mu M$, respectivamente. Como vemos en la figura 9, los datos experimentales tanto para la reacción de cloración como la de bromación se aproximaron a la zona de saturación y obtuvimos una buena correlación, aunque en la de bromación, no alcanzaran la concentración de saturación.

Analizando el valor de $k_{cat,app}$ que nos da el modelo vemos que la reacción de bromación de estradiol es más rápida que el de cloración en más de un orden de magnitud. Esta diferencia es debida a que para que se forme el intermediario CX se deben oxidar los iones haluro y es más fácil oxidar bromuro que cloruro por la baja electronegatividad y alta polarizabilidad del ion bromuro. Un átomo más grande tiene más alejado del núcleo a los electrones de la capa de valencia, por lo que la fuerza con la que son atraídos hacia él es menor que en un átomo pequeño, por tanto, es más fácil que pierda electrones. También vemos que la k_{cat} de cloración de los tres sustratos comparados es diferente. El intermediario CX, es el mismo para los tres, por lo tanto k_{cat} también depende de la naturaleza y estructura del sustrato 2.

La eficiencia de una enzima se puede medir de varias maneras, una de ellas es con la constante de especificidad k_{cat}/K_m . El de la monoclorodimedona, que es el sustrato usado en el ensayo estándar por ser un compuesto similar al natural, está en el orden de 10^7 . La k_{cat}/K_m del estradiol es menos de un orden de magnitud menor, así que la enzima fue eficiente para halogenar estradiol.

Por otro lado, encontramos en la literatura²⁵ que los estrógenos se halogenan en las plantas de tratamiento con el hipoclorito utilizado para sanear el agua por lo que decidimos comparar la cinética de reacción enzimática con la de una reacción química. Sin embargo, la cinética de halogenación con hipoclorito de sodio es tan rápida que no pudimos medirla. En menos de tres segundos, tiempo de la primera lectura con el espectrómetro de fluorescencia, ya se había convertido el 100% del sustrato.

La velocidad de la reacción enzimática, por otro lado, se puede modular cambiando la concentración de la enzima. Con la cantidad de enzima utilizada (1.23×10^{-3} U/ml para las reacciones de cloración y 2.5×10^{-4} U/mL para las de bromación) pudimos medirla y toma aproximadamente 3 minutos en alcanzar un 100% de conversión.

Identificación de productos clorados de estradiol.

Con el fin de comprobar que las posiciones 2 y 4 del anillo aromático A son las posiciones más susceptibles para la halogenación catalizada por CPO, separamos y purificamos los productos de estradiol. Para identificarlos recurrimos a varias técnicas:

Técnica	Especificaciones	Información proporcionada
HPLC	Columna analítica	Perfil de productos
	Columna semi-preparativa	Separación de compuestos
GC-MS		Identificación y grado de halogenación
RMN	500MHz	Estructura de los compuestos puros

La técnica que nos permitió visualizar el mayor número de productos de la reacción fue la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) con una columna analítica C18, debido a su sensibilidad y a las características hidrofóbicas de nuestros compuestos. Una extracción con solvente orgánico y posterior

concentración permitió analizar los productos de reacción al final de la misma (determinado por fluorescencia). Como se observa en la Figura 10, fue posible identificar 4 productos de la reacción de cloración de estradiol 50 μM , en presencia de 0.5 mM de H_2O_2 y 2 mM de KCl, de los cuales hay 3 en mayor proporción (picos 1, 2 y 3).

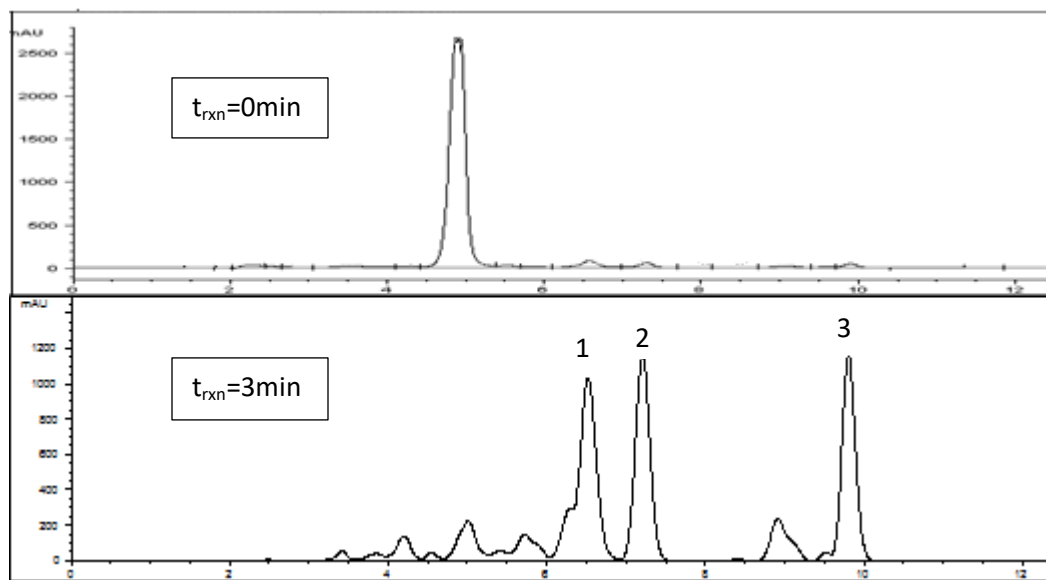


Figura 10. Perfil de productos clorados del estradiol (E2), analizados por HPLC

Hay un pico pequeño correspondiente al reactivo que aparece a un tiempo de retención de 5 minutos. Esto nos dice que aunque no se convirtió el 100 % de estradiol, la conversión fue alta. Con el fin de obtener mayor información sobre la estructura de los productos observados, analizamos la mezcla de productos extraídos de una reacción de 10 mL por GC-MS. Debido a la probable presencia de grupos polares en la muestra, derivatizamos la mezcla con un grupo sililo, que sustituye los -H de los grupos OH. Para el estradiol, hay 2 -OH que podrían ser derivatizados con un grupo sililo (que tiene un m/z de 73 cada uno), así que para analizar los valores de m/z obtenidas por GC-MS hay que agregar 146 al peso del estradiol (270) y restar 1 por cada átomo de hidrógeno sustituido. De esa manera, el peso del estradiol detectado por esta técnica es 416.

Se identificaron tres productos de la reacción de cloración de estradiol comparando las masas de los iones moleculares mayoritarios; el equipo tiene una biblioteca de datos con los patrones de fragmentación de algunos compuestos que permite identificarlos, pero sólo se pudo identificar el del estradiol. Los demás compuestos fueron identificados tras analizar las señales de m/z del ion molecular y el patrón de fragmentación. En la Figura 11A se observan los patrones de fragmentación para los compuestos clorados. El panel A pertenece al cromatograma de gases de la mezcla de compuestos inyectados. Los picos 1 (Fig. 11C) y 2 (Fig. 11D) corresponderían a compuestos monoclorados, mientras que el pico 3 (Fig. 11E) correspondería al estradiol diclorado.

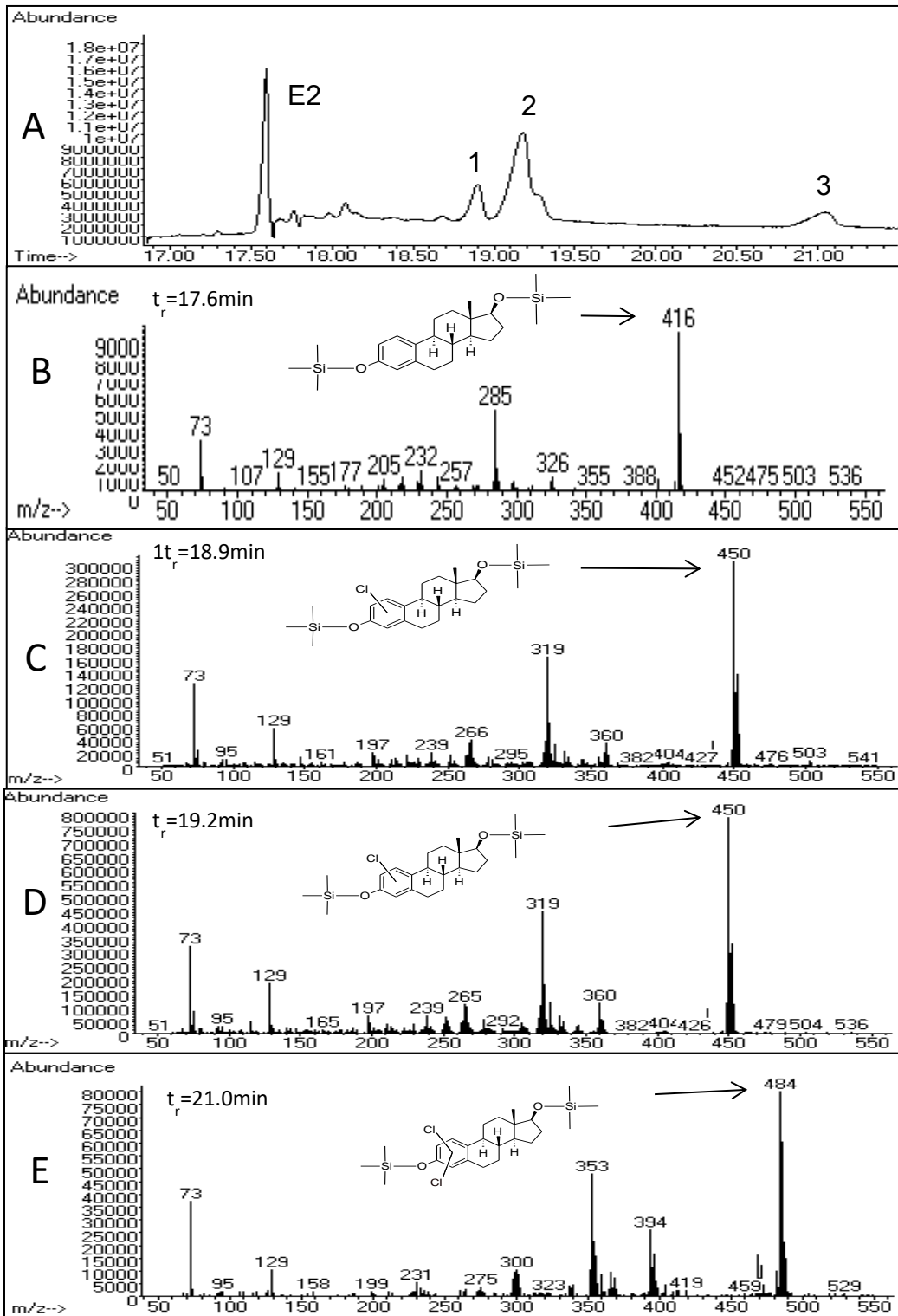


Figura 11. Identificación de productos clorados de estradiol (E2) mediante GC-MS. El panel A muestra el cromatograma de gases de la mezcla de productos. Los paneles B-E son los patrones de fragmentación pertenecientes a los compuestos respectivos a cada pico.

El perfil obtenido del cromatógrafo de gases muestra una señal abundante (en comparación con las demás) para el estradiol, a pesar de que nos habíamos asegurado que la conversión fue alta, tanto por fluorescencia como por HPLC. Lo esperado era que los productos aparecieran con una abundancia relativa mayor. Adicionalmente, sólo se detectan 3 productos y no 4, lo que se esperaba según el perfil observado por HPLC. Hay muchas razones por las que las señales de los productos de una reacción podrían no mostrarse con suficiente intensidad en GC-MS. La más probable en nuestro caso es que la reacción de derivatización de las moléculas halogenadas no fue eficiente debido al impedimento estérico que podrían imponer los átomos de halógenos durante la reacción de derivatización. Por tanto, no podrían sacarse conclusiones sobre la abundancia relativa de los productos. Sin embargo, este resultado nos permitió identificar la naturaleza de al menos 3 productos.

La masa del ion molecular del estradiol silanizado es 416. Las masas de los iones moleculares mayoritarios de los picos 2 y 3 corresponden a la masa de cloroestradiol silanizado debido a que la masa del cloro es 35 y, al sustituirse, la molécula pierde un átomo de hidrógeno con masa 1 dando como resultado un ion molecular de masa 450. Como son dos picos y tienen la misma masa, lo que debe diferir para que salgan en tiempos de retención diferente es su estructura química, (son isómeros) así que podemos suponer que la posición de halogenación es distinta. De la misma manera analizamos la masa del ion molecular mayoritario del pico 4, que es 484 correspondiente al estradiol diclorado ($416+2(35)-2=484$).

Mediante esta técnica determinamos el grado de halogenación de los productos de la reacción, que es 1 para dos productos y 2 para el tercer producto detectado. Para determinar la posición de halogenación en la estructura química de los productos se utilizó RMN. Esta técnica requiere tener el producto puro y en una cantidad mínima de 5 mg para tener una señal lo suficientemente intensa. Por ello se realizaron reacciones a mayor escala (2.5 L), a una concentración de 80

μM de estradiol, realizando varias adiciones de enzima y peróxido para asegurar una conversión alta del estradiol.

Separación de los productos de la reacción

Para separar los compuestos probamos primero con placas preparativas de sílica para cromatografía en capa fina (PLC), pero la separación de los compuestos fue mala pues no obtuvimos suficiente resolución entre las bandas. Como alternativa usamos una columna semipreparativa C18 de HPLC con una carga de carbonos similar a la analítica y funcionó bien esta técnica para obtener el grado de purificación necesario para analizar los compuestos por RMN. En la figura 12 se observan las diferentes fracciones obtenidas de la separación de productos de la cloración de estradiol.

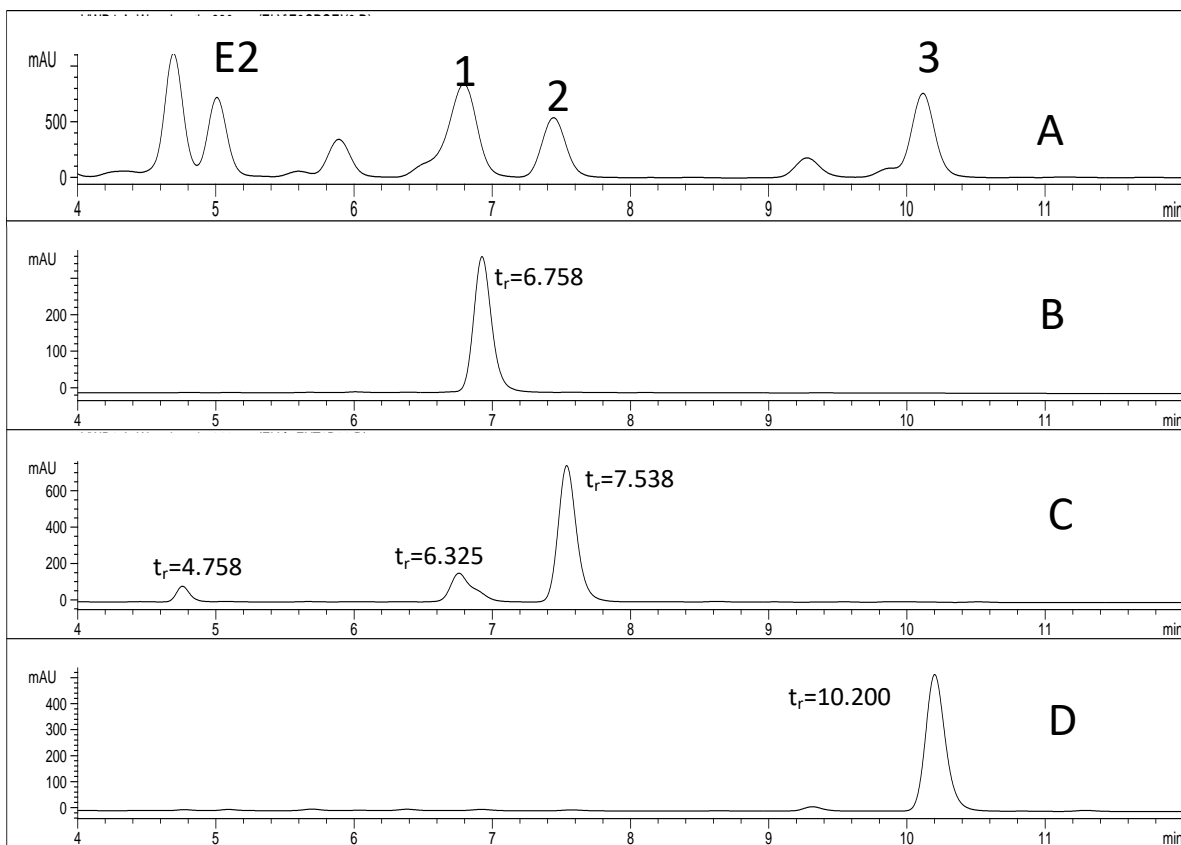


Figura 12. Separación de productos clorados mediante HPLC preparativo. A: cromatograma de la mezcla de productos visualizados a una longitud de onda de 220 nm. B-D: cromatogramas de los compuestos separados correspondientes a los picos 1-3, respectivamente.

El perfil de los productos mayoritarios de la reacción (pico 1, 2 y 3) es similar al observado en otros análisis, aunque hay algunas señales que no habíamos observado anteriormente. En particular, el tiempo de retención del pico más abundante ($t_r < 5$ min, Figura 12A) sugiere que es un compuesto más polar que el estradiol. Por otro lado, logramos purificar el pico 1 y el 3 como se puede observar en las Figura 12B-D; sin embargo el pico 2 presenta impurezas que impidieron su clara identificación por RMN.

Identificación de la posición de halogenación de los compuestos purificados

La ventana espectral obtenida con el análisis de protón en RMN de los compuestos puros se muestra en la figura 13 para el pico 1 y la figura 14 para el pico 2. El análisis de protón de RMN permite conocer la interacción entre los protones presentes en una molécula orgánica. En nuestro caso, el estradiol tiene un anillo aromático. Las señales pertenecientes a este tipo de ciclos aparecen arriba de 6 ppm. Gracias a que esta molécula sólo tiene un anillo aromático, se facilita el análisis porque las señales son únicamente del anillo más reactivo y esto facilita la asignación de las posiciones en las que podrían localizarse los átomos de cloro en las moléculas halogenadas.

El compuesto parental -el estradiol- tiene tres protones en las posiciones 1, 2 y 4 que interactúan entre sí de la siguiente manera:

- 1.-El protón 1 tiene un acoplamiento *orto* con el protón 2. Esta señal aparece como dos picos, con una constante de acoplamiento de 8.6 Hz.
- 2.-El protón 2 tiene un acoplamiento *orto* con el protón 1, y a su vez se acopla con el protón 4 en posición *meta*. Esta señal aparece como cuatro picos, llamados doble de dobles (dd) y sus constantes de acoplamiento son de 8.6 Hz y 2.9 Hz respectivamente.
- 3.-El protón 4 tiene un acoplamiento *meta* con el protón 2, con una constante de acoplamiento de 2.3 Hz y finalmente el protón 4 tiene un acoplamiento *para* con el

protón 1, pero es tan pequeña la interacción que a veces no se ve esa señal y la constante de acoplamiento es de alrededor de 0.2 Hz.

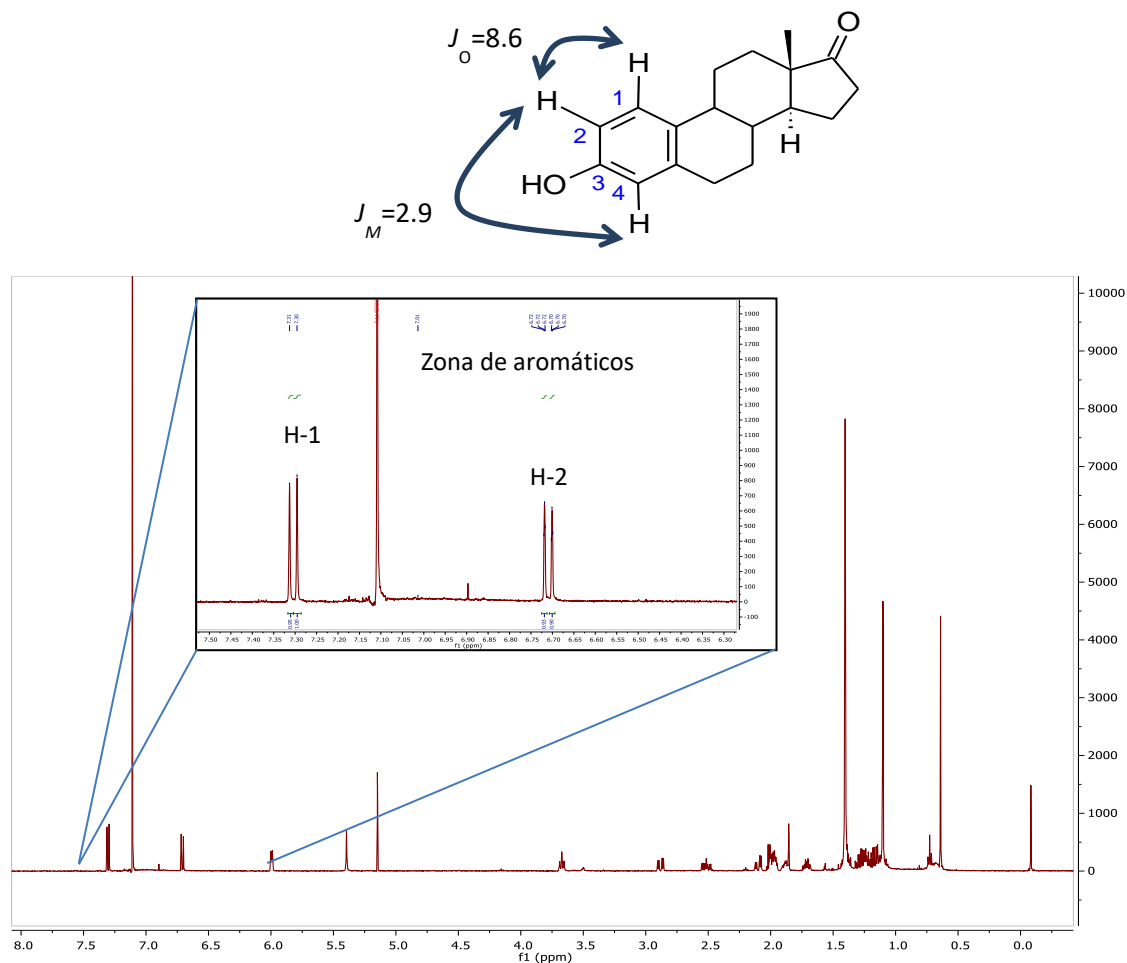


Figura 13. Espectro de protón de uno de los compuestos identificado por GC-MS como cloroestradiol (pico 1)

Las señales provenientes de la resonancia del compuesto del pico 1 muestran dos protones en el anillo aromático con desplazamientos químicos de 6.7 y 7.3 ppm con multiplicidades de doblete (Figura 13). Los dos protones tienen constantes de acoplamiento orto ($J_0 = 8.6$ Hz), lo que indica que el átomo sustituido de cloro está en la posición 4, ya que no hay otra manera en que haya dos protones *orto* en esa molécula

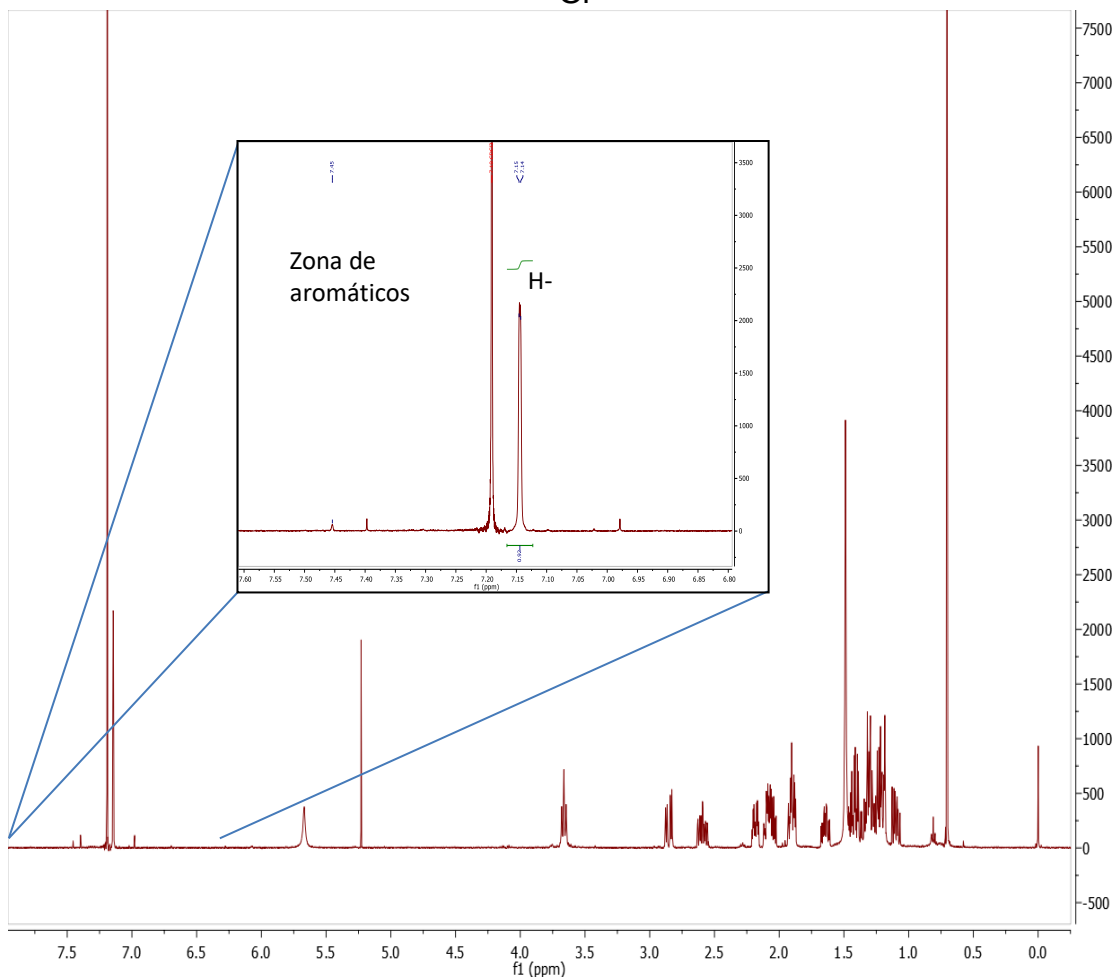
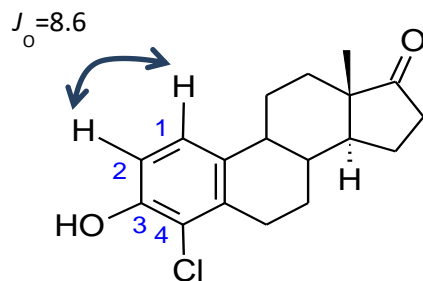
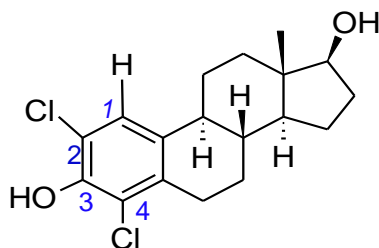


Figura 14. Espectro de protón de uno de los compuestos identificado por GC-MS como dicloroestradiol (pico 3)

El pico 3 es un compuesto dihalogenado en la posición 2 y 4, ya que encontramos solo un singulete en 7.3 ppm (Figura 14). Este no tiene constantes de acoplamiento, porque no tiene ningún otro protón con quien acoplarse.



En la Tabla 9 se muestra un resumen de las dos señales principales que nos guiaron en la determinación de la estructura de los compuestos que purificamos como productos de la reacción enzimática.

Tabla 9. Desplazamientos y constantes de acoplamiento de los compuestos identificados por RMN

Compuesto	¹ H-RMN (CDCl ₃)			
	GC-MS (m/z)	Posición		
		1	2	4
4-ClE2	450	7.3d(8.6)	6.7d(8.6)	
2,4-diClE2	484	7.14s		

De acuerdo con las propiedades electro-donadoras del grupo hidroxilo en el anillo aromático A del estradiol, las posiciones en *orto* (C2 y C4) son las más favorecidas para una sustitución electrofílica. Los cálculos teóricos de la distribución electrónica en la molécula predicen que la posición 4 es más reactiva^{34, 74}, pero nosotros observamos que los compuestos monohalogenados parecen obtenerse en la misma proporción. Así que realizamos una cinética de aparición de productos para determinar si había una posición más reactiva que otra; si la hubiera, deberíamos ver una acumulación mayor del producto halogenado correspondiente.

Se utilizó una concentración de estradiol de 50 μM y se varió la concentración de peróxido. Considerando que la estequiometría de la reacción es 1:1 (una molécula de peróxido se consume para convertir una molécula de estradiol en un producto monohalogenado), elegimos tres concentraciones de peróxido: una con el peróxido como reactivo limitante (29 μM), una ligeramente en exceso (57 μM) y otra en exceso (114 μM).

Cinética de formación de productos

Como se observa en la figura 15, cuando se utiliza una baja concentración de peróxido el estradiol no se consume por completo (Fig 15A). Se observa claramente la formación de dos productos principales, que corresponden al 4-Cl estradiol y al pico 2 (Fig. 13) que suponemos es el 2-Cl estradiol. De acuerdo con estos resultados, no parece haber un producto favorecido. Únicamente cuando hay una conversión alta de estradiol y un exceso de peróxido es posible observar la formación de un tercer producto que corresponde a 2,4-diCl estradiol (Fig. 15B y 15C).

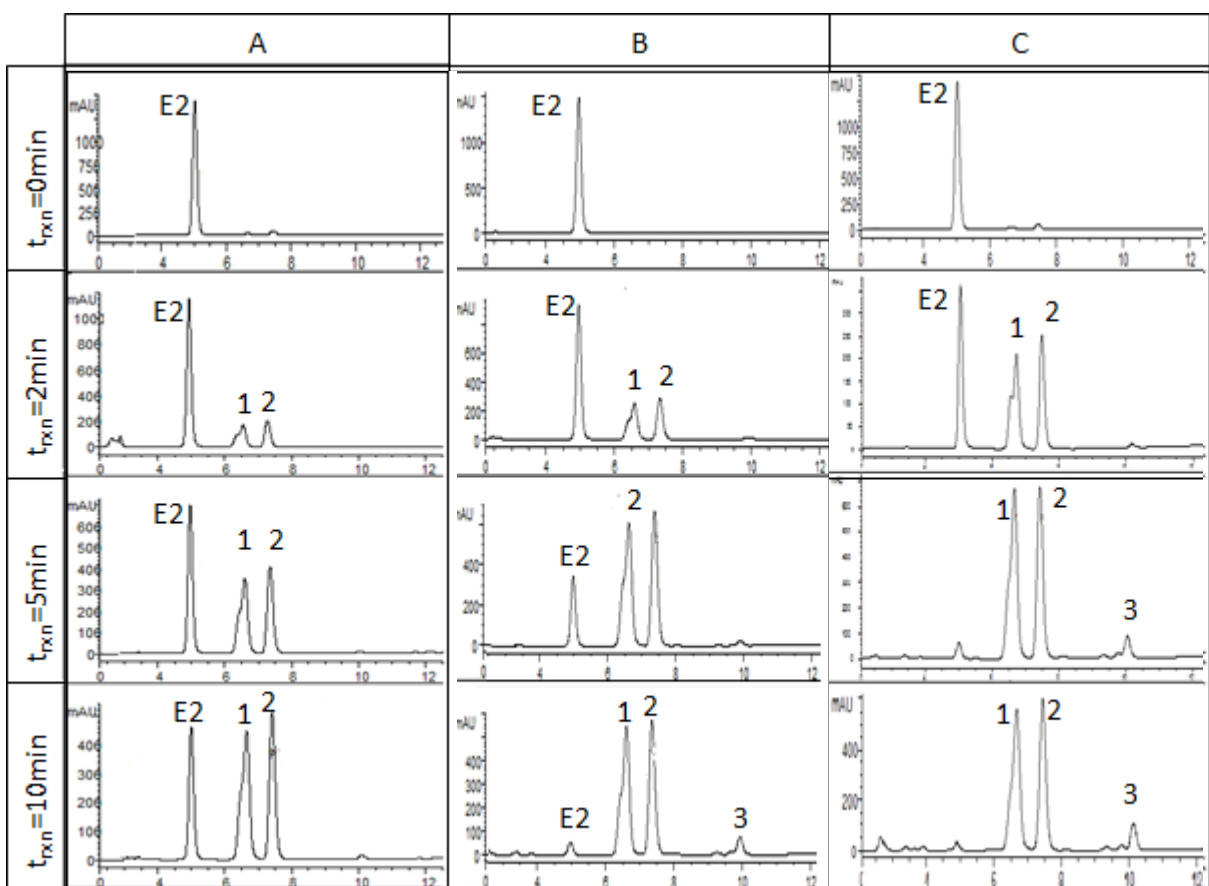


Figura 15. Perfil de productos clorados derivados de estradiol a diferentes tiempos de reacción y a tres concentraciones de peróxido de hidrógeno. A=29 μ M, B=57 μ M y C=114 μ M

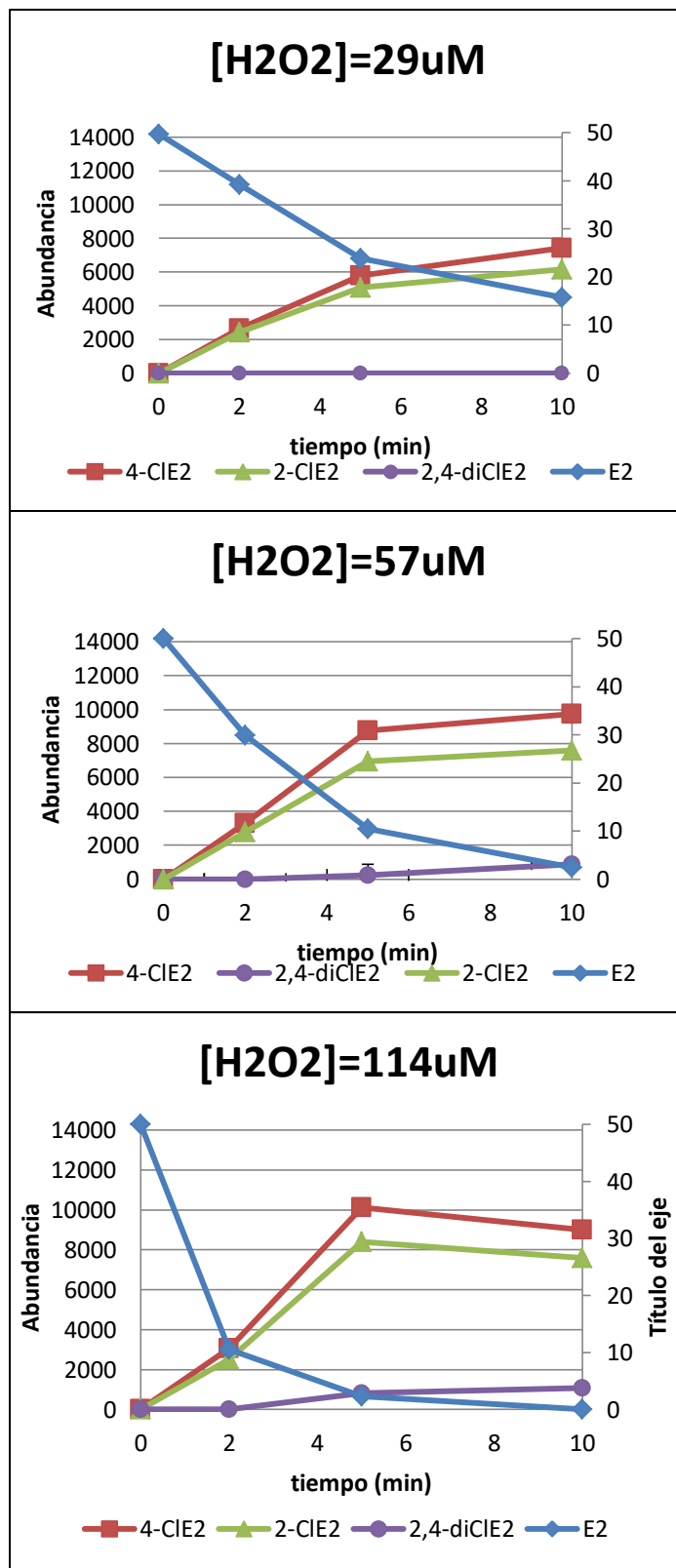


Figura 16. Cinética de formación de productos durante la reacción de cloración utilizando diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno.

Al analizar de forma cuantitativa estos resultados, se puede extraer más información. Primeramente, la velocidad de desaparición de estradiol depende de forma lineal de la concentración de peróxido, observando 5670, 2237, 1480 y $\mu\text{M}/\text{min}$ para 114, 57 y 29 μM de peróxido de hidrógeno. Esto coincide con el hecho de que la concentración de peróxido de hidrógeno se encuentra muy por debajo de las condiciones de saturación de la enzima (aprox. 1 mM)⁶⁵. A una concentración dada de peróxido, la velocidad de formación de los productos es prácticamente igual. Sin embargo, cuando hay un exceso de peróxido y una vez que se ha consumido el estradiol, se logra observar que el 2-Cl estradiol se consume en mayor proporción que el 4-Cl estradiol a medida que se genera el producto halogenado (2,4-diCl estradiol).

En conclusión, las dos posiciones (2 y 4) son igual de reactivas para la reacción de monohalogenación, por lo que no existe regioselectividad. Sin embargo, nuestros datos sugieren que el compuesto 2-Cl estradiol es más reactivo que el 4-Cl estradiol para una segunda halogenación; aunque éste también reacciona y a tiempos largos de reacción siguen estando presentes ambos compuestos monohalogenados.

Con el fin de determinar si hay una ventaja entre usar la enzima o un agente químico (hipoclorito) para halogenar estradiol, realizamos reacciones químicas usando una concentración de hipoclorito equivalente al doble de la que se obtendría en el sistema enzimático si todo el peróxido reaccionara con cloruro para formar esa especie (1 mM). Los perfiles de productos de ambas reacciones los vemos en la figura 17.

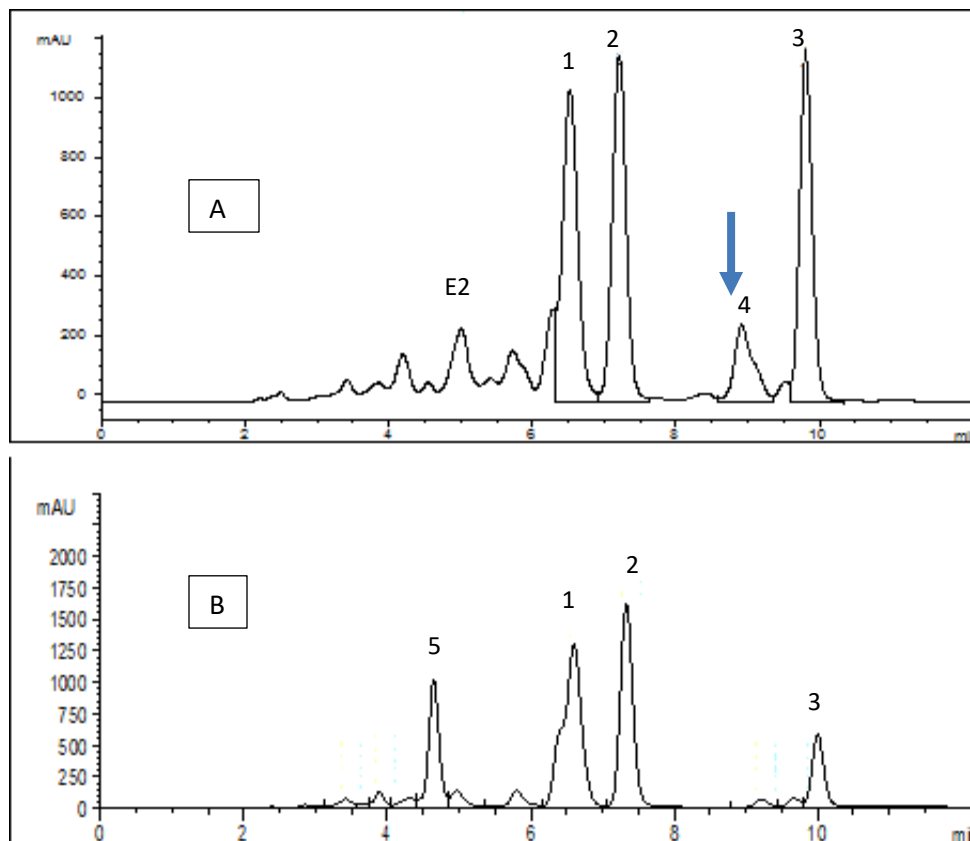


Figura 17. Comparación de los productos clorados obtenidos a partir de la reacción enzimática (A) y química (B) de estradiol

Observamos que el perfil de productos es similar entre las dos reacciones. Los productos mayoritarios son los mismos en ambas reacciones, si bien hay un producto minoritario distinto en la reacción enzimática ($t_r = 8.9$ min). Las proporciones de los productos mayoritarios, 2-Cl, 4-Cl y 2,4-diCl estradiol también son diferentes entre ambas reacciones, pues el producto dihalogenado se forma en menor proporción en la reacción química, a pesar de tener una concentración de hipoclorito mayor a la teórica equivalente de la reacción enzimática. Dicha observación no se explica con una menor conversión, puesto que en ambas reacciones la conversión fue mayor a 90%

Potencial carcinogénico de los productos clorados de estradiol: reactividad en presencia de tirosinasa

Con el fin de comprobar que los productos obtenidos en las reacciones enzimáticas no son sustratos de enzimas como la tirosinasa, a través de la cual se pueden formar quinonas en el organismo, se realizaron y analizaron reacciones utilizando una tirosinasa comercial del hongo *Agaricus bisporus* y como sustratos tanto el estradiol como la mezcla de los productos obtenidos en las reacciones enzimáticas.

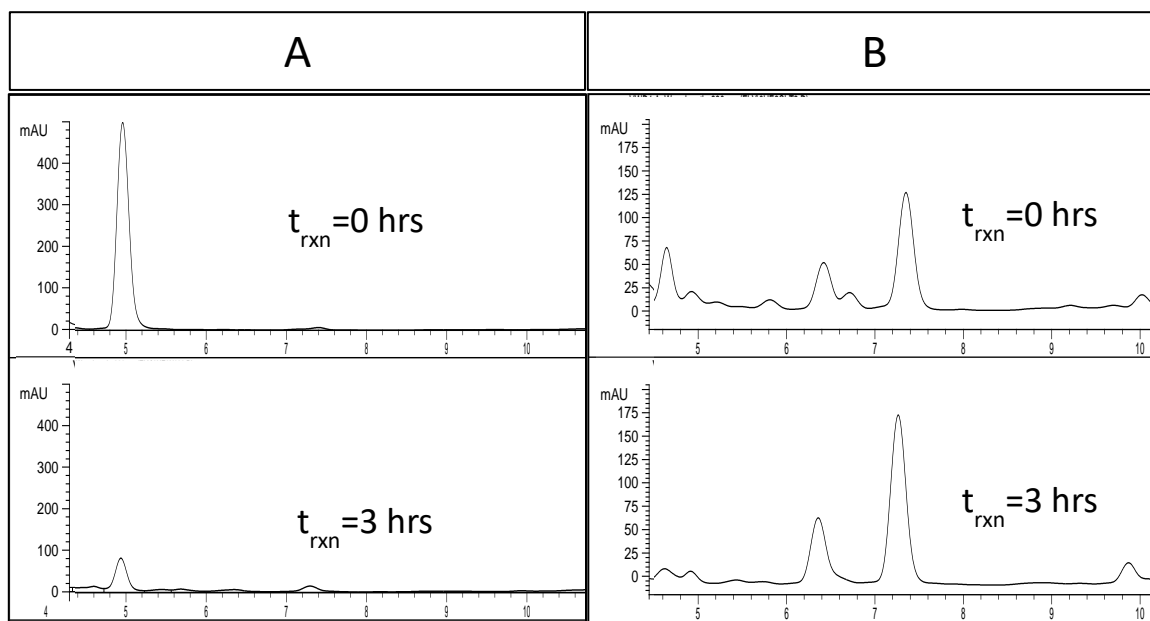


Figura 18. Reacción de estradiol (A) y de la mezcla de productos obtenidos de la reacción enzimática (B) con tirosinasa

Como vemos en la figura 18, el estradiol reaccionó en presencia de la tirosinasa hasta llegar a una conversión casi completa del sustrato. En 3 hrs reaccionó el 87% del estradiol, mientras que ninguno de los productos halogenados reaccionó. Esto confirma lo que se ha reportado en el sentido de que los estrógenos sustituidos en las posiciones 2 y/o 4 con átomos no reactivos (como el cloro) ya no son sustrato de oxidasas como la tirosinasa⁴¹, lo cual evita que el estradiol se convierta en quinona y disminuya su efecto carcinogénico mediante esta vía³⁶.

Identificación de productos de la reacción de bromación de estradiol

También analizamos los productos generados en las reacciones enzimáticas de bromación del estradiol, aunque con menor profundidad que las reacciones de cloración.

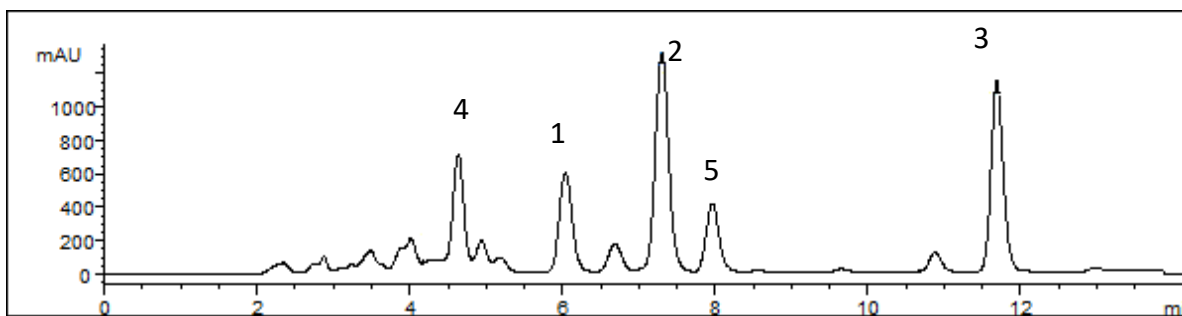


Figura 19. Perfil de productos de la reacción de bromación de estradiol, analizado por HPLC

El perfil de productos bromados de estradiol es más complejo que el de los productos clorados a una concentración de peróxido 0.5 mM y 5 minutos de reacción, ya que observamos una mayor cantidad de picos. También hay uno más polar que el estradiol que sugiere que es resultado de una oxidación.

Ya que para los productos clorados observamos diferentes perfiles según la concentración de peróxido y el tiempo de reacción, realizamos una cinética de formación de productos a 100, 50 y 25 μ M de peróxido a 2, 5 y 10 min de reacción y los cromatogramas resultantes los podemos ver en la figura 20

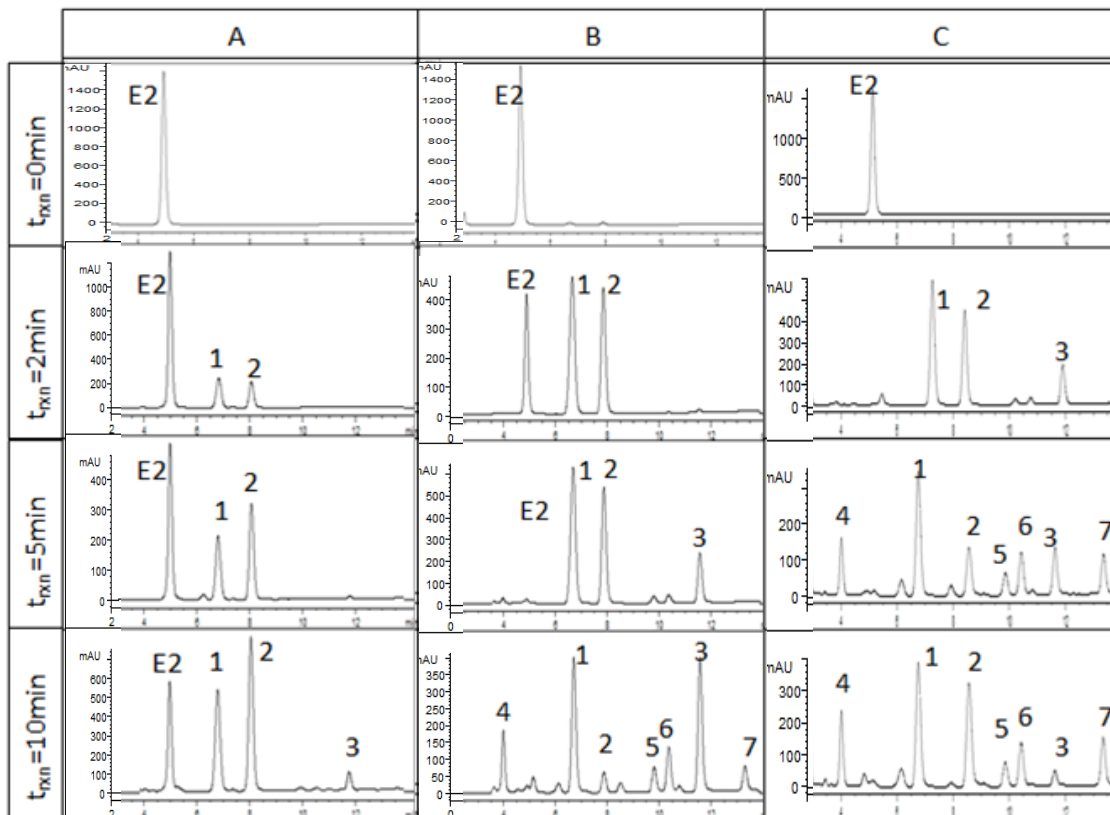


Figura 20. Perfil de productos bromados derivados de estradiol a diferentes tiempos de reacción y a tres concentraciones de peróxido de hidrógeno. A=25 μ M, B=50 μ M y C=100 μ M

El perfil de productos de la bromación de estradiol es el mismo que el de los clorados cuando la reacción está limitada por peróxido, lo que nos lleva a pensar que los picos 1 y 2 son compuestos monohalogenados y el pico 3 un compuesto dihalogenado. Al estar en una concentración equimolar, o más alta de peróxido se forman más productos a altos tiempos de reacción llegando a observar hasta 7 productos. Con esto comprobamos que el perfil depende del tiempo de reacción y la concentración de peróxido, al igual que los compuestos clorados, posiblemente debido a que los productos iniciales pueden ser transformados y forman otros productos.

Los productos que pertenecen al pico 1 y 2 son igual de favorecidos por la reacción, tal como vemos en la figura 21.

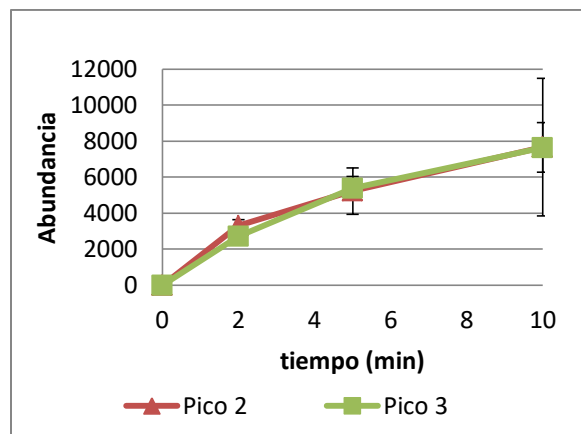


Figura 21. Cinética de formación de productos (duplicado) durante la reacción de bromación a una concentración de peróxido de hidrógeno igual a 25 μM

La velocidad inicial de formación de los productos es:

	Vo (abundancia/min)	
	Pico 2	Pico 3
Muestra 1	1777	1416
Muestra 2	1533	1305

Los picos 1 y 2 tienen una velocidad inicial de aparición muy similar, un poco mayor la del pico 2, pero con una diferencia tan pequeña que es despreciable, por lo que los compuestos se forman casi al mismo tiempo y las dos posiciones son igual de reactivas, al igual que para los compuestos clorados.

Grado de bromación del estradiol en las reacciones enzimáticas

Al igual que los compuestos clorados, identificamos los productos de la reacción de bromación de estradiol mediante el análisis de las masas de los iones moleculares del GC-MS. En la Figura 22 se muestran los diferentes compuestos en la mezcla.

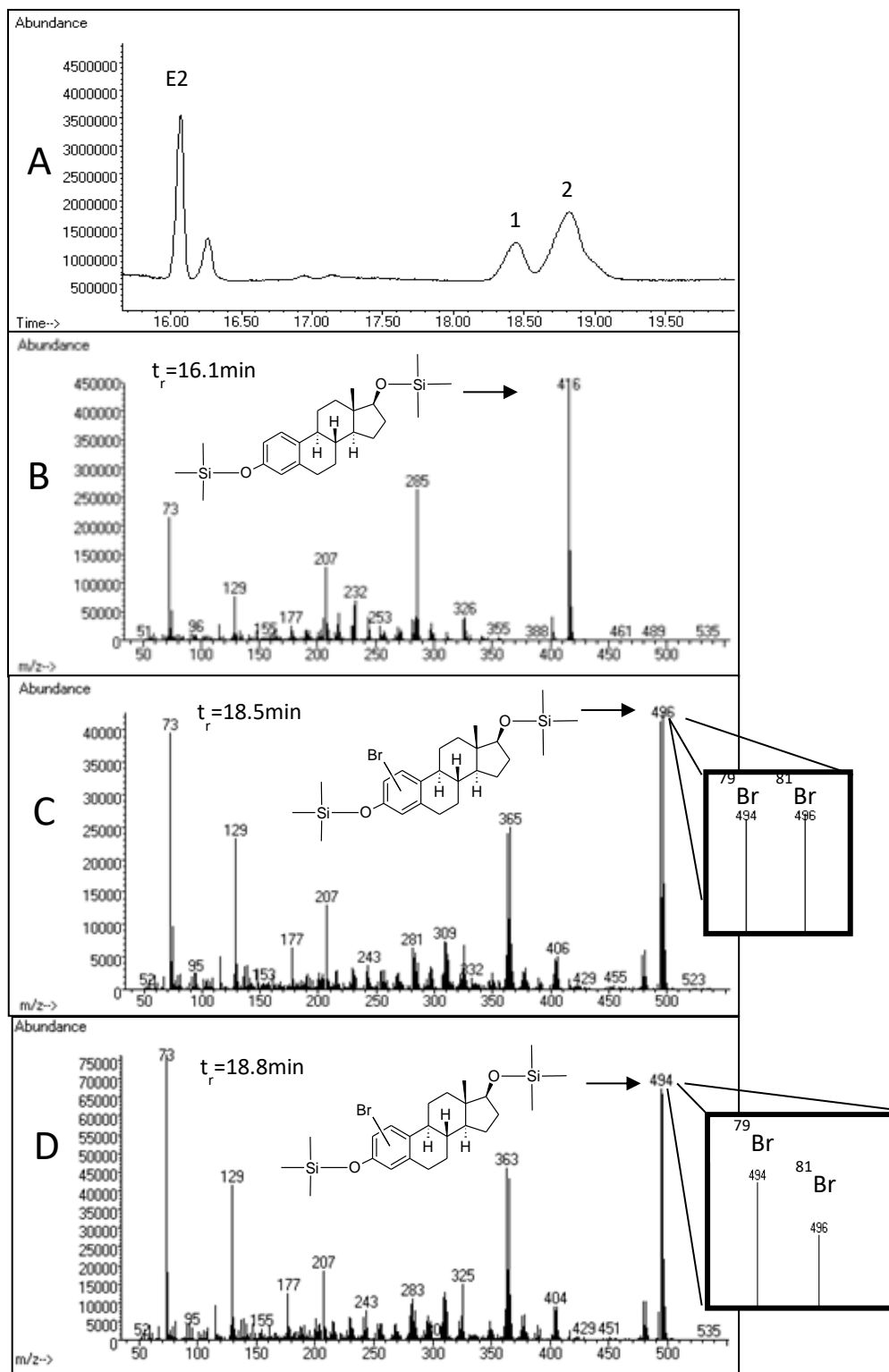


Figura 22. Identificación de productos bromados de estradiol mediante GC-MS. El panel A muestra el cromatograma de gases de la mezcla de productos. Los paneles B-D son los patrones de fragmentación pertenecientes a los picos E2, 1 y 2

El primer pico del cromatograma, con tiempo de retención de 16.2 min, es estradiol remanente en la reacción. Encontramos otro pico que no numeramos porque la masa del compuesto identificado es de 414 y no corresponde a ningún compuesto proveniente del estradiol, además, en la biblioteca no se encontró ningún patrón de fragmentación que coincidiera.

Los patrones de fragmentación de los picos 1 y 2 corresponden a compuestos derivados con el grupo sililo, debido a la presencia de $m/z=73$. Además, se observan dos iones moleculares con la misma abundancia correspondientes a m/z de 494 y 496. Estas masas corresponden a estradiol monobromado. La razón de observar dos iones moleculares se debe a que el bromo tiene 2 isótopos estables: el ^{79}Br y el ^{81}Br ; si tenemos el isótopo de ^{79}Br , la masa del ion molecular de bromoestradiol es de 494 y si tenemos el ^{81}Br la masa del ion es 496. Por las mismas razones expuestas para los compuestos clorados, el hecho de observar dos picos diferentes con el mismo ion molecular y un patrón de fragmentación prácticamente idéntico sugiere que son isómeros de bromoestradiol derivatizado y con la halogenación en posiciones distintas.

Para saber si el perfil de productos de la reacción química es similar al de la enzimática, hicimos una reacción con 100 μM de hipoclorito y lo dejamos reaccionar 5 minutos, para compararla con el perfil de productos de la reacción enzimática a las mismas condiciones y obtuvimos la figura 23.

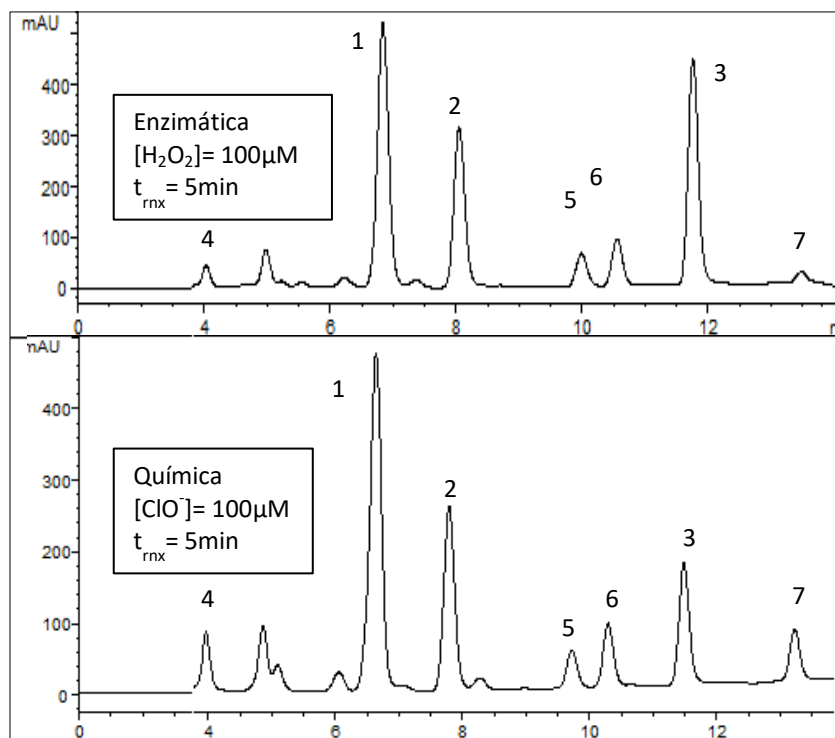


Figura 23. Comparación del perfil de los productos de la reacción enzimática contra la reacción química a las mismas condiciones de reacción

El perfil de productos de las dos reacciones es el mismo. Las abundancias difieren ligeramente. El pico 3 se forma en mayor proporción en la reacción enzimática. Cabe mencionar que el perfil de productos en la reacción química fue el mismo desde los 2 minutos de reacción, mientras que el de la reacción enzimática alcanzó este perfil hasta los 5 minutos.

¿Se pueden halogenar otros estrógenos utilizando la cloroperoxidasa?

Utilizamos otros dos sustratos estructuralmente parecidos al estradiol y que también tienen un efecto estrogénico, aunque en menor grado⁵⁷. Ambos sustratos fueron transformados en presencia de la enzima, bajo condiciones de cloración y de bromación. Los datos experimentales y las constantes cinéticas que se obtienen al ajustar al modelo de Michaelis Menten se muestran en la Figura 24 y tabla 10, respectivamente.

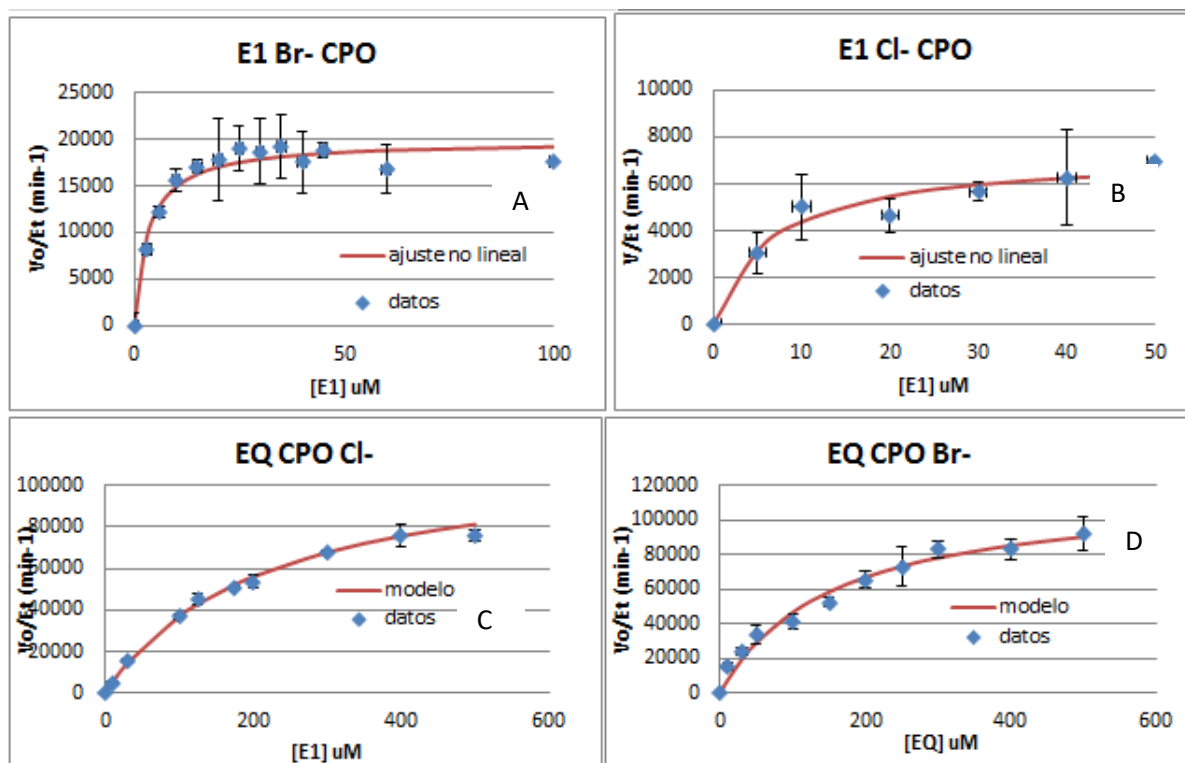


Figura 24. Cinéticas de halogenación de otros estrógenos medidas como la velocidad inicial específica de desaparición de sustrato (máximo 20% de conversión) a diferentes concentraciones. A) cloración de estrona. B) bromación de estrona C) cloración de equilina D) bromación de equilina.

Los estrógenos son hidrofóbicos y tienen baja solubilidad en agua, por lo que en las reacciones se añadió 10 % de solvente que permitió solubilizar 100 μM de estrona y 500 μM de equilina. El ajuste al modelo de Michaelis-Menten que obtuvimos para estos datos fue bueno, ya que el coeficiente de correlación entre los datos y el modelo es muy alto.

Tabla 10. Parámetros cinéticos de halogenación de estrona y equilina

	Estrona		Equilina	
	KCl	KBr	KCl	KBr
Km (μM)	6.6	3.3	216	152
kcat (min^{-1})	7.26×10^3	19.86×10^3	116×10^3	118×10^3
kcat /Km ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	1.83×10^7	10.00×10^7	0.98×10^7	1.29×10^7
R²	0.9197	0.9324	0.9971	0.9876

El valor de K_m es muy similar en las reacciones con estrona y estradiol con los dos haluros, así que se alcanza la velocidad máxima a bajas concentraciones de sustrato, pero para equilina hay una diferencia de dos órdenes de magnitud, por lo que la velocidad máxima se alcanza a concentraciones más elevadas. Para estrona y estradiol se observaron valores de k_{cat} y K_m que indican que estos sustratos son eficientemente halogenados por la enzima, con valores comparables a los reportados para el sustrato modelo (monoclorodimedona) y el pireno, otro sustrato aromático (6.7×10^7 y 0.12×10^7 respectivamente). El coeficiente k_{cat}/K_m para la bromación de los sustratos, al igual que para el estradiol, muestra que esta reacción se lleva a cabo de forma más eficiente que la cloración. Sin embargo, la diferencia en la eficiencia de cloración y bromación para equilina es mucho menor. La k_{cat} de halogenación, tanto cloración como bromación, es mucho mayor para la equilina que para los otros dos estrógenos (un orden de magnitud). La mayor diferencia entre estos tres sustratos y que pudiera influir en los resultados observados, es la doble ligadura en el anillo B de la equilina. De acuerdo con los reportes en la literatura, las halogenaciones tienden a realizarse en sitios insaturados de los compuestos orgánicos⁵⁸ por lo que es posible que la doble ligadura del anillo B de la equilina constituya otro sitio reactivo además del anillo aromático A.

Para tener una identificación preliminar de los productos seguimos el mismo procedimiento descrito antes para estradiol y se analizó la mezcla de productos, extrayéndolos de la reacción y derivatizando con grupos silano. Los patrones de fragmentación se encuentran en el anexo I y en la figura 25, el perfil de productos clorados de estrona obtenidos con el cromatógrafo de gases.

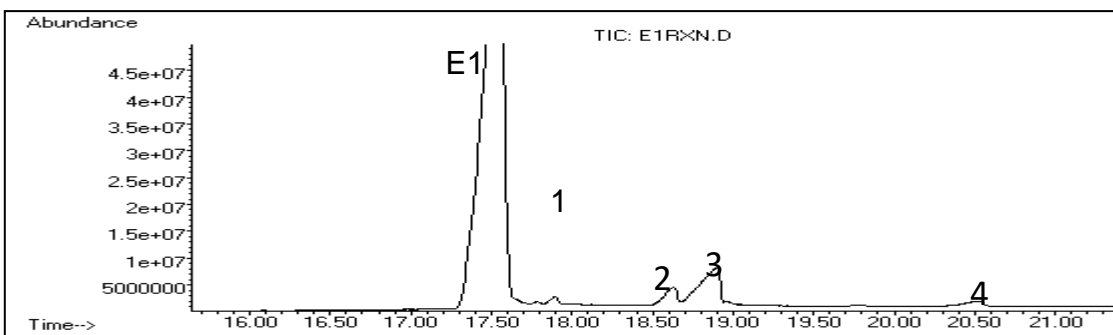


Figura 25. Perfil de productos clorados de estrona obtenido por GC.

Para la estrona observamos un perfil similar de productos a los del estradiol. En la figura 25 vemos 5 picos, 4 de ellos son productos, los cuales enumeramos del 1-4; el primero, que no tiene número es el más abundante y corresponde a estrona derivatizada, que al igual que para los productos de estradiol, no tendría que ser más abundante que los productos halogenados. Encontramos el segundo pico en la biblioteca de datos del MS como cloroestrona sin silanizar. La relación m/z de los otros dos picos corresponden a estrona monoclorada silanizada y estrona diclorada silanizada respectivamente. En las reacciones de bromación también se lograron detectar dos productos monobromados derivados de la estrona. No se detectó por GC-MS la presencia de productos dibromados.

Finalmente, no pudimos visualizar ningún producto halogenado para equilina, ni clorados ni bromados. Los compuestos que detectamos y que están en las figuras de los anexos tienen una relación m/z que corresponden a la halogenación de una impureza de la equilina con un peso de 338. Aun así, sólo detectamos un compuesto monoclorado y uno monobromado.

CONCLUSIONES

- El estradiol y los estrógenos relacionados, equilina y estrona, son sustratos de la cloroperoxidasa de *L. fumago* bajo condiciones de halogenación, en presencia de iones cloruro o bromuro. La cinética de las reacciones de halogenación se puede describir con un modelo tipo Michaelis-Menten, por su comportamiento hiperbólico. La reacción de bromación es más rápida que la de cloración, debido a que el bromuro es un ión más fácilmente oxidable que el cloruro.
- Los principales productos de la reacción de cloración de estradiol son 4-cloro estradiol y 2-cloro estradiol. De acuerdo con la cinética de reacciones limitadas por peróxido de hidrógeno, las dos posiciones tienen una reactividad similar, por lo que no hay un producto que se acumule preferentemente. Un producto secundario, el 2,4-dicloro estradiol, comienza a formarse una vez que el estradiol se ha consumido en al menos un 80%. Los datos sugieren que el 2-cloro estradiol comienza a convertirse al compuesto dihalogenado más rápido que el 4-cloro estradiol.
- El grado de halogenación de los compuestos halogenados que pudimos identificar por GC-MS es:

	Clorados			Bromados	
Estradiol (E2)	1	1	2	1	1
Estrona (E1)	1	1	2	1	1

- Las constantes cinéticas para las reacciones de cloración y bromación de equilina son muy parecidas, en contraste con lo observado para los otros dos sustratos en los que la diferencia estaba en un orden de magnitud. No fue posible identificar los productos de reacción de este estrógeno por GC-MS.
- La reacción química usando ClO^- es mucho más rápida que la enzimática (3s vs 3 min) y el perfil de productos es muy similar. Una ventaja de la reacción

enzimática es que se puede controlar cinéticamente la formación de compuestos monohalogenados.

- Los productos clorados de estradiol no son sustrato de la tirosinasa, por lo que en teoría tienen menor potencial carcinogénico por la vía de formación de quinonas.

PERSPECTIVAS

- Utilizar otras técnicas de identificación de productos para visualizar todos los productos de reacción de equilina y su posición de halogenación (Por ejemplo, LC-MS, RMN)
- Realizar pruebas de estabilidad de los productos halogenados de estrona (exposición a luz, T, etc.)
- Realizar pruebas de biodegradación de los compuestos halogenados.
- Encontrar otras halogenasas que catalicen la reacción mediante un mecanismo diferente.
- Realizar las cinéticas de desaparición de los estrógenos halogenados con cloroperoxidasa para determinar si son sustratos de la enzima e identificar los productos que forman

REFERENCIAS

1. ARIAS, G. P.; STASHENKO, E.; TORRES, R. Biotransformación de terpenos α (+)-limoneno, β -pineno y γ -terpineno por medio de cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago*. *Scientia et technica*, 2007, vol. 1, no 33.
2. 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.
3. AYALA, M.; SEGOVIA, L.; TORRES, E. Halogenases: A biotechnological alternative for the synthesis of halogenated pharmaceuticals. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 2016.
4. 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.
5. 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.
6. BRION, F., et al. Impacts of 17β -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.
7. 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.
8. 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
9. 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.
10. COLONNA, S., et al. Enantioselective oxidations of sulfides catalyzed by chloroperoxidase. *Biochemistry*, 1990, vol. 29, no 46, p. 10465-10468.
11. COLONNA, S., et al. Recent biotechnological developments in the use of peroxidases. *Trends in biotechnology*, 1999, vol. 17, no 4, p. 163-168.
12. 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.
13. 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.
14. 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.

15. DE COSTER, S.; VAN LAREBEKE, N. Endocrine-disrupting chemicals: associated disorders and mechanisms of action. *Journal of environmental and public health*, 2012, vol. 2012.
16. 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.
17. DEBORDE, M. et al. Aqueous chlorination kinetics of some endocrine disruptors. *Environmental science & technology*, 2004, vol. 38, no 21, p. 5577-5583.
18. DEROO, B.; KORACH, K. Estrogen receptors and human disease. *The Journal of clinical investigation*, 2006, vol. 116, no 3, p. 561-570.
19. 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.
20. 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.
21. FENT K et al. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*. 2006, 76, 122-159
22. 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.
23. GETREY, L. et al. Enzymatic halogenation of the phenolic monoterpenes thymol and carvacrol with chloroperoxidase. *Green Chemistry*, 2014, vol. 16, no 3, p. 1104-1108.
24. GRIBBLE, G. W. A recent survey of naturally occurring organohalogen compounds. *Environmental chemistry*, 2015, vol. 12, no 4, p. 396-405.
25. GRIFFITH, D. R., et al. Measuring free, conjugated, and halogenated estrogens in secondary treated wastewater effluent. *Environmental science & technology*, 2014, vol. 48, no 5, p. 2569-2578.
26. HAGER, L. P., et al. Chloroperoxidase II. Utilization of halogen anions. *Journal of biological chemistry*, 1966, vol. 241, no 8, p. 1769-1777.
27. HALLENBERG, P. F.; HAGER, L. P. Purification of chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*. *Methods in enzymology*, 1978, vol. 52, p. 521-529.
28. HERRERA-RODRIGUEZ, L., et al. Perspectives on biotechnological halogenation. *chimica oggi/Chemistry Today*, 2011, vol. 29, no 6.
29. 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.
30. JORDAN, V. C. et al. Structure-activity relationships of estrogens. *Environmental health perspectives*, 1985, vol. 61, p. 97.
31. KATZENELLENBOGEN, B. Estrogen receptors: bioactivities and interactions with cell signaling pathways. *Biology of reproduction*, 1996, vol. 54, no 2, p. 287-293.

32. 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.
33. KIMBLIN, C; BU, X.; BUTLER, A. Modeling the catalytic site of vanadium bromoperoxidase: Synthesis and structural characterization of intramolecularly H-bonded vanadium (V) oxoperoxo complexes, [VO (O₂)(NH₂pyg₂)] K and [VO (O₂)(BrNH₂pyg₂)] K. *Inorganic chemistry*, 2002, vol. 41, no 2, p. 161-163.
34. KUBLI-GARFIAS, C. Comparative study of the electronic structure of estradiol, epiestradiol and estrone by *ab initio* theory. *Journal of molecular structure: THEOCHEM*, 1998, vol. 452, no 1, p. 175-183.
35. KUIPER, G., et al. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the national academy of sSciences*, 1996, vol. 93, no 12, p. 5925-5930.
36. LIEHR, J. G. 2-Fluoroestradiol. Separation of estrogenicity from carcinogenicity. *Molecular pharmacology*, 1983, vol. 23, no 2, p. 278-281.
37. LIEHR, J., et al. Carcinogenicity of catechol estrogens in Syrian hamsters. *Journal of steroid biochemistry*, 1986, vol. 24, no 1, p. 353-356.
38. LIEHR, J., Is Estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? 1. *Endocrine reviews*, 2000, vol. 21, no 1, p. 40-54.
39. LIGTENBARG, A.; HAGE, R.; FERINGA, B. Catalytic oxidations by vanadium complexes. *Coordination chemistry reviews*, 2003, vol. 237, no 1, p. 89-101.
40. 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.
41. 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.
42. LU, Y., et al. Halogen bonding for rational drug design and new drug discovery. *Expert opinion on drug discovery*, 2012.
43. 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.
44. MATSUI, S., et al. Estrogen and estrogen mimics contamination in water and the role of sewage treatment. *Water science and technology*, 2000, vol. 42, no 12, p. 173-179
45. MCEWEN, B. Estrogen actions throughout the brain. *Recent progress in research*, 2002, vol. 57, p. 357-384.
46. MELGOZA, R. J. Estrógenos de uso clínico. *Mensaje bioquímico*, 2013, vol. 37, no 15, 261 - 274.
47. 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.

48. MILLER, Terry L.; GAUGHAN, Pamela L.; BUHLER, Donald R. Effects of halogenated antibacterials on the erythrocyte membrane. *Chemico-biological interactions*, 1978, vol. 22, no 2-3, p. 167-183.
49. MURPHY, C. D.; Grant, R. Chemical production-biohalogenation. *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*. Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 2903-2910.
50. NAKAMURA, H. et al. By-products produced by the reaction of estrogens with hypochlorous acid and their estrogen activities. *Journal of health science*, 2006, vol. 52, no 2, p. 124-131.
51. NAKAMURA, Hideyuki, et al. By-products produced by the reaction of estrogens with hypochlorous acid and their estrogen activities. *Journal of health science*, 2006, vol. 52, no 2, p. 124-131.
52. 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.
53. NORIEGA-REYES, Y.; MCCARRON, L. Correguladores del receptor de estrógenos y su implicación en el cáncer mamario. *Cancerología*, 2008, vol. 3, p. 29-40.
54. O'HAGAN, D., et al. Biochemistry: biosynthesis of an organofluorine molecule. *Nature*, 2002, vol. 416, no 6878, p. 279-279.
55. OLEA, N.; FERNÁNDEZ, M.; MARTÍN-OLMEDO, P. Disruptores endocrinos: el caso particular de los xenobióticos estrogénicos. I *Estrógenos naturales*. 2001.
56. 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.
57. 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.
58. RAVEN, E, and DUNFORD, B. Heme peroxidases. *Royal Society of Chemistry: metallobiology*. 2016. Cap 9, p. 183-217, Cap 13, p. 311-333.
59. ROY D., LIEHR J.; Estrogen, DNA damage and mutations. *Mutation research* 1999, vol 424, p.107-115
60. SALCEDO, K., et al. Halogenation of 17 β -estradiol by a rationally designed mesoporous biocatalyst based on chloroperoxidase. *Biocatalysis*, 2015, vol1, no 1.
61. SHEFFIELD D. et al. Bromoperoxidase of the macroalga *Corallina officinalis*. *Biochemical society transactions* 1992, vol. 20, no 3, p. 284S-284S.
62. SHEFFIELD D. et al. *Corallina officinalis* bromoperoxidase immobilized on agarose. *Phytochemistry* 1995, vol. 38, p. 1103-1107
63. 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
64. SOLOMONS T.W.G. Química orgánica. Editorial *Limusa*. Sexta reimpresión. México 1990.
 65. THOMAS, J.A.; MORRIS, D. R.; HAGER, L.I P. Chloroperoxidase VIII. Formation of peroxide and halide complexes and their relation to the mechanism of the halogenation reaction. *Journal of biological chemistry*, 1970, vol. 245, no 12, p. 3135-3142.
 66. TORRES E., AYALA M. Biocatalysis by metalloenzymes. En: KENNETH P. (eds.) *Comprehensive inorganic chemistry II* Editorial *Elsevier*. 2° ed., Capítulo: 6.24, , 2013, vol.6, p.685-735
 67. 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.
 68. WAGENKNECHT, H.A; WOGGON, W.D. Identification of intermediates in the catalytic cycle of chloroperoxidase. *Chemistry & biology*, 1997, vol. 4, no 5, p. 367-372.
 69. 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 Julio, 2016
 70. YAGER, J.; DAVIDSON, N. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *New england journal of medicine*, 2006, vol. 354, no 3, p. 270-282.
 71. YAIPAKDEE, P.; ROBERTSON, L. W. Enzymatic halogenation of flavanones and flavones. *Phytochemistry*, 2001, vol. 57, no 3, p. 341-347.
 72. YÚFERA, E. P. Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria. *Reverté*, 1995.
 73. 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.
 74. ZHUROVA, E. A., et al. Experimental and theoretical electron density study of estrone. *Journal of the american chemical society*, 2006, vol. 128, no 27, p. 8849-8861.
 75. PICKARD, M. A.; KADIMA, T. A.; CARMICHAEL, R. D. Chloroperoxidase, a peroxidase with potential. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 1991, vol. 7, no 4, p. 235-241.

ANEXOS

ANEXO I. Identificación de compuestos por espectrometría de masas (GC-MS)

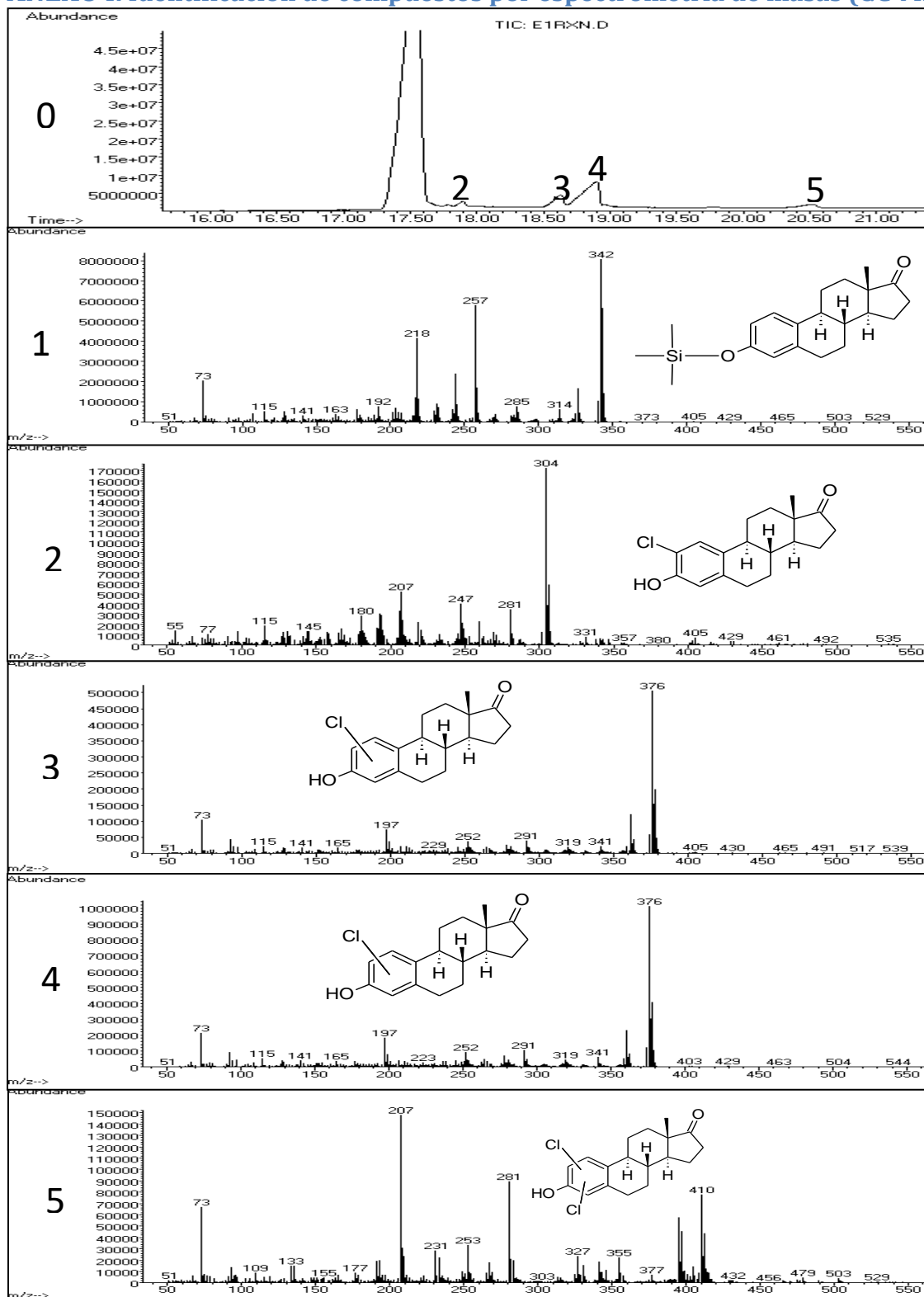


Figura A1. Identificación de productos clorados de estrona.

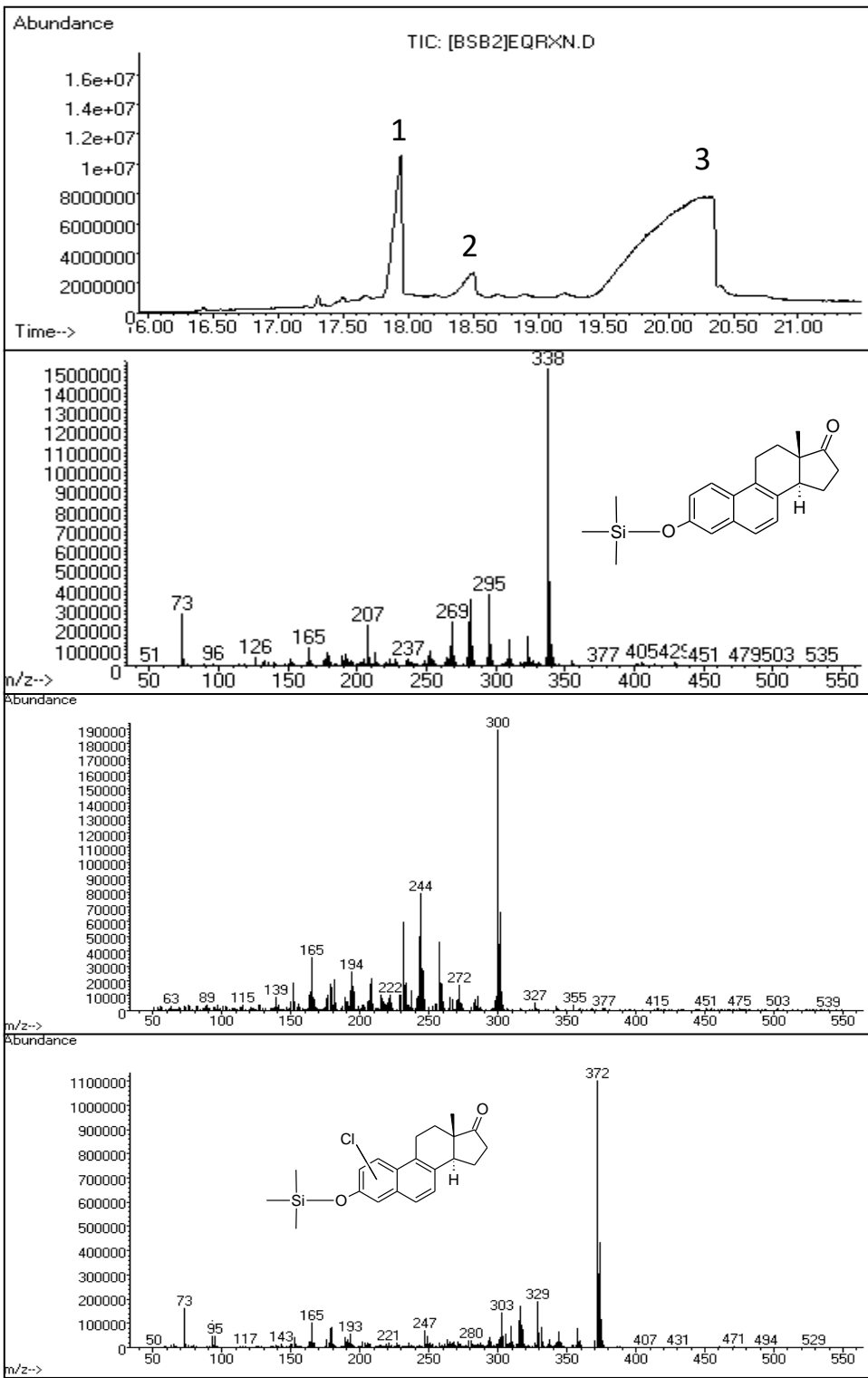


Figura A2. Identificación de productos clorados de equilina.

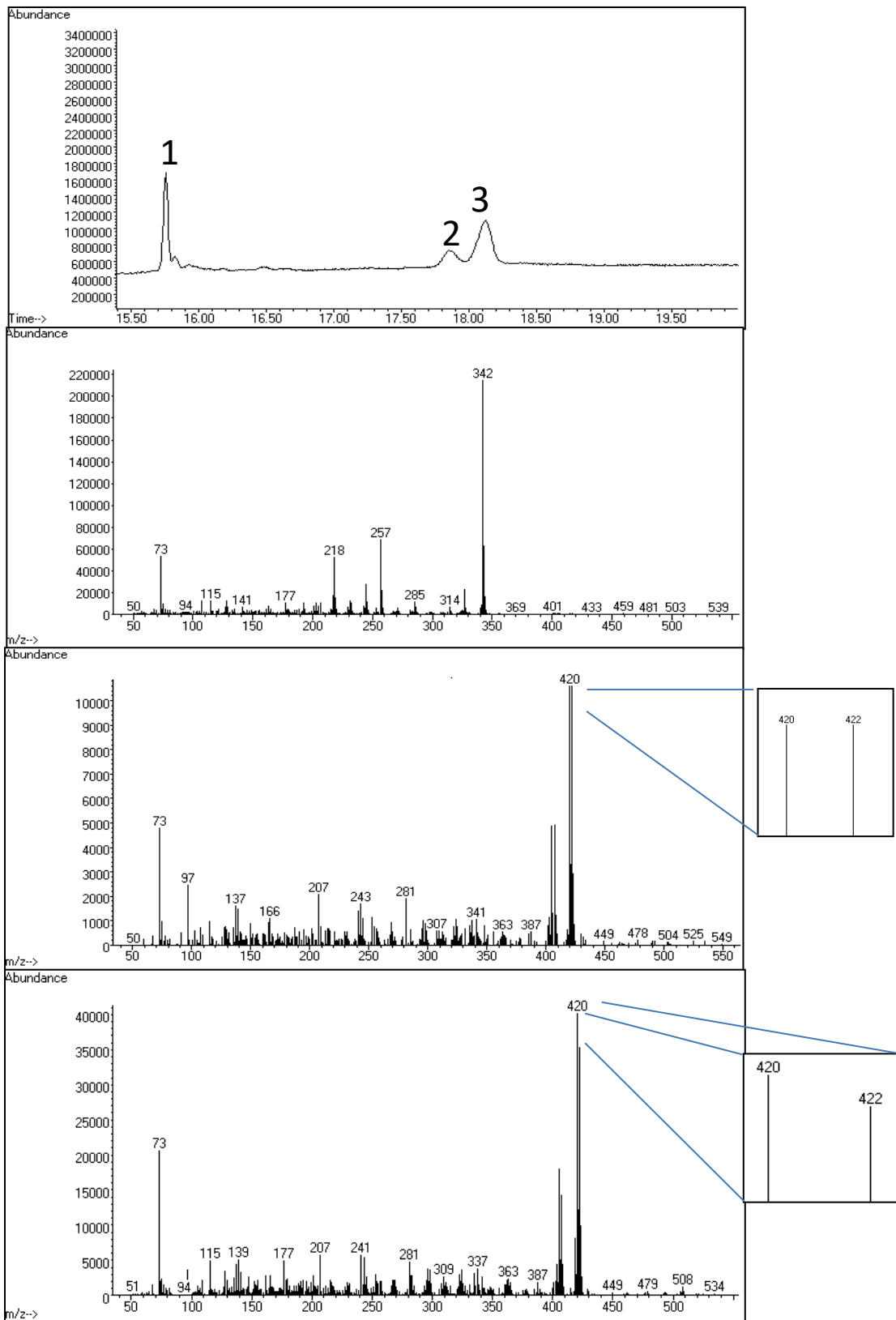


Figura A3. Identificación de productos bromado de estrona.

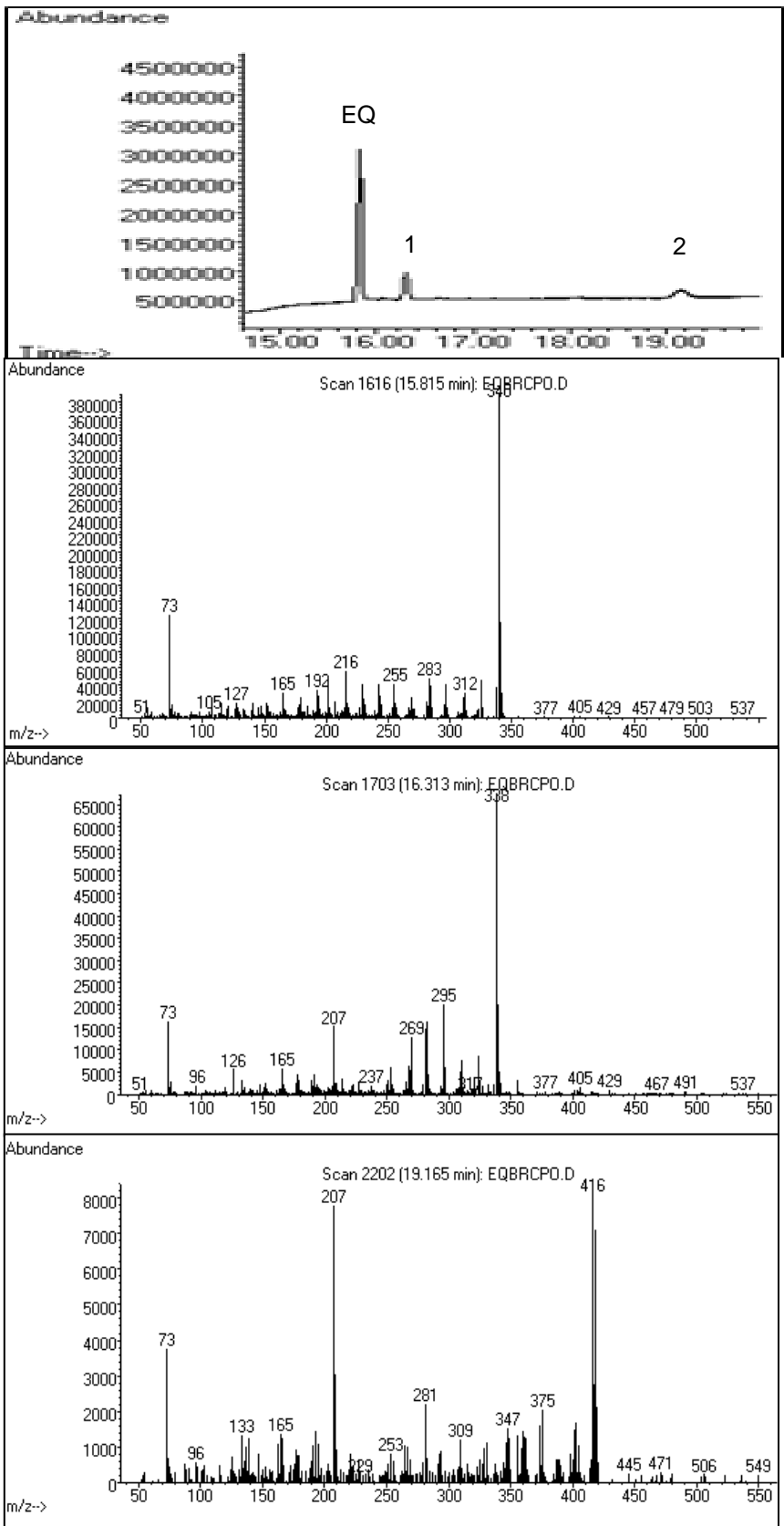


Figura A4. Identificación de productos bromado de equilina

Anexo II. : Este proyecto se aceptó para presentar en el XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



HALOGENACIÓN DE ESTRÓGENOS CATALIZADA POR UNA CLOROPEROXIDASA

Elizabeth Undiano, Alfonso Miranda, Marcela Ayala
 Instituto de Biotecnología, UNAM. Cuernavaca, Morelos CP 62210 eundiano@ibt.unam.mx

Palabras clave: cloroperoxidasa, halogenación, estrógenos

Introducción. Los compuestos halogenados son utilizados en diferentes campos, como el industrial, agrícola y farmacéutico. A la fecha, existen más de 5000 compuestos naturales halogenados y algunos han servido como base para formular o desarrollar medicamentos [1]. En el caso de los estrógenos, se ha visto que la halogenación en ciertas posiciones evita la formación de o quinonas, un compuesto muy oxidante implicado en el desarrollo de cáncer de mama, endometrio, entre otros [2]. Dentro de las alternativas biotecnológicas para catalizar halogenaciones se encuentran las halogenasas y las haloperoxidasas. La cloroperoxidasa del hongo *Leptoxiphium fumago* (CPO) es una haloperoxidasa con baja especificidad que puede catalizar la halogenación de una amplia variedad de compuestos orgánicos utilizando H_2O_2 y haluros (i.e. cloruro, bromuro) como co-sustratos. Previamente en nuestro laboratorio se descubrió que esta enzima cataliza la cloración de estradiol [3].

El objetivo de este trabajo es estudiar con detalle la reacción, utilizando estradiol (E2) y otros estrógenos como estrona (E1) y equilina (EQ), además de identificar los productos para la cloración de E2 y comprobar si son sustratos de la tirosinasa, enzima responsable de la formación de quinonas a partir de estrógenos.

Metodología. Se realizaron reacciones de halogenación en presencia de cloruro y bromuro utilizando cada uno de los tres estrógenos; el medio de reacción fue amortiguador de acetatos 50mM pH=9, 10% de isopropanol, 2 mM de KBr o KCl y 1mM de H_2O_2 . La cinética de la reacción se cuantificó siguiendo la desaparición del sustrato por fluorescencia. Se identificaron los productos de reacción combinando varias técnicas analíticas: cromatografía de líquidos (HPLC), espectrometría de masas (GC-MS) y resonancia magnética nuclear (RMN). Los productos de la reacción enzimática fueron recuperados por extracción con solvente orgánico y utilizados como sustratos de la tirosinasa de *Agaricus bisporus*.

Resultados. La CPO fue capaz de catalizar la halogenación de los tres sustratos elegidos con ambos iones haluros de forma muy eficiente, comparable a la eficiencia que muestra la enzima con su sustrato natural; los datos se ajustaron bien al modelo de Michaelis-Menten. La reacción de bromación tiene una mayor eficiencia que la de cloración. Se ha reportado en la literatura que la CPO convierte a los halogenuros en especies activadas (HOX) que reaccionan con los compuestos orgánicos; siendo el ion bromuro más oxidable que el cloruro, esperaríamos estos resultados. En el caso de EQ la eficiencia de la reacción de cloración y bromación es muy similar y kcat es mucho mayor que para E1 y E2. Esto podría deberse a que la EQ tiene un par de sitios reactivos adicionales para la halogenación, el anillo A y la insaturación en el anillo B (ver Tabla 1), mientras que E1 y E2 sólo cuentan con el anillo A.

Tabla 1. Constantes cinéticas de la reacción de halogenación de tres estrógenos catalizada por la cloroperoxidasa de *L. fumago*

	Estrona		Estradiol		Equilina	
	KCl	KBr	KCl	KBr	KCl	KBr
Km (μ M)	6.6	3.3	6.6	4.8	216	162
kcat (s^{-1})	121	330	33	420	1933	1967
kcat/Km ($\times 10^7 M^{-1}s^{-1}$)	1.83	10	0.5	0.7	0.09	1.29

El perfil de productos de cloración de E2 se observa en la Fig. 2. Se pueden observar dos productos mayoritarios. De acuerdo con los resultados de RMN, el producto más abundante ($t_r=10$ / min) es un compuesto diclorado en las posiciones 2 y 4. El segundo producto más abundante ($t_r=15.0$ min) es un compuesto monoclorado en la posición 4.

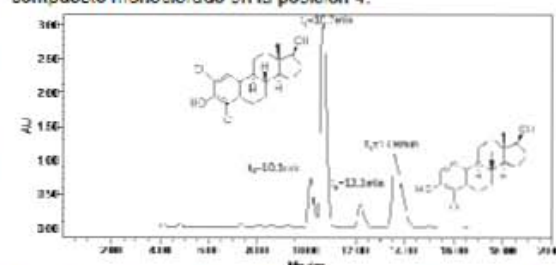


Fig. 1. Identificación de los productos de la reacción de cloración de E2.

Conclusiones. Para los tres sustratos, la CPO cataliza la bromación de manera más eficiente que la de cloración. Los productos mayoritarios de la cloración de E2 fueron 4-Cl-E2 y 2,4-diCl-E2, las cuales son las posiciones más reactivas del anillo A debido a la presencia de grupo electrodonador -OH. Los productos clorados derivados de E2 no son sustratos de la tirosinasa, lo que confirma que estos compuestos son menos propensos a formar quinonas y por tanto son menos reactivos.

Agradecimientos. Al apoyo técnico de la HnoI Rosa Román y Fernando Gómez y al financiamiento de PAPIIT 209116, CONACYT No. Apoyo 405160.

Bibliografía. (1) Herrera Rodríguez L, Khan F, Robins K, Moyer HP. (2011) *Chem Today* 29, 31-33. (2) Liu X, Zhang H, Liu H, Hurdette JH, Li Y, Overk CR, Pisha C, Yao J, van Driemen RD, Swanson SM, Dolton JL. (2003) *Chem. Res. Toxicol.* 16, 741-749. (3) Salcedo K, Torres-Ramírez E, Haces I, Ayala M. (2016). *Biocatalysis* 1: 33-43. (4) Undiano E, Miranda A, Ayala M. In preparación.