



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



TRANSFORMACIÓN DE ALTERADORES HORMONALES POR LA LACASA DE *Corioloopsis gallica*

Torres-Duarte Cristina y Vazquez-Duhalt Rafael. Instituto de Biotecnología-Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa. Cuernavaca, Morelos, México. CP 62210. Fax: +52 (777) 3172388. ctorresd@ibt.unam.mx

Palabras clave: disruptor endócrino, lacasa, pez cebra.

Introducción. Los disruptores endócrinos (DE) son xenobióticos que pueden funcionar como agonistas o antagonistas de hormonas causando efectos adversos en los organismos como desarrollo sexual anormal, feminización de machos, infertilidad, intersexo y algunos tipos de cáncer [1]. Los DE son contaminantes de aguas residuales domésticas e industriales, por lo que afectan principalmente a organismos acuáticos. Por los riesgos que representan para el equilibrio ecológico y la salud, se ha estudiado ampliamente su eliminación siendo el uso de enzimas de hongos ligninolíticos el método más eficiente. Las enzimas manganeso peroxidasa y lacasa han resultado eficientes en la transformación de diferentes DE [2]. En este trabajo exploramos la transformación de nonilfenol (NP), bisfenol-A (BPA), triclosán (TCS) y 17 β -estradiol (E2) por la lacasa del basidiomiceto *Corioloopsis gallica*, la caracterización de los productos obtenidos, así como su capacidad de activar al receptor de estrógenos.

Metodología. Los compuestos fueron transformados por la lacasa a temperatura ambiente en 1 ml de reacción conteniendo amortiguador de acetatos 100 mM pH 4.5 y hasta 25% de ACN, dependiendo del compuesto; las reacciones fueron monitoreadas por HPLC. Para la identificación de productos, las reacciones se escalaron a 100 mL. Se formó un precipitado que se recuperó por centrifugación y se disolvió en THF para ser analizado por GPC. Los sobrenadantes se extrajeron con acetato de etilo y los extractos se analizaron por GC-MS.

El sitio de unión a ligando del receptor de estrógenos α de pez cebra (zfER α LBD) se clonó en el vector PET28b poniendo una etiqueta de histidinas en el extremo amino terminal. La proteína se expresó en *E. coli* Rosetta2 y se purificó por afinidad en columnas de níquel. La determinación de la afinidad de los DE y sus productos por el receptor de estrógenos se determinará siguiendo el protocolo reportado por Usui y colaboradores [3].

Resultados. Los compuestos E2, BPA, NP y TCS fueron transformados con eficiencias catalíticas similares (37, 21, 42 y 1.6 s⁻¹ mM⁻¹, respectivamente), indicando que la lacasa transformará con eficiencia los diferentes DE en una mezcla compleja. Como producto del BPA se identificó un dímero y el 4-isopropenilfenol. Para el NP se identificó un dímero. En ambos casos, estos productos representaron menos del 5% del producto de transformación. Para los cuatro compuestos se

obtuvieron principalmente polímeros de peso molecular promedio de al menos 1 kDa (Tabla 1) que corresponde a tetrámeros y superiores. Es probable que la formación de polímero vaya aunada a la disminución en la actividad estrogénica ya que por ser de mayor tamaño, éste no podrá interactuar con el receptor de estrógenos.

Tabla 1. Peso molecular promedio de los productos de transformación de diferentes disruptores endócrinos por la lacasa.

Compuesto	Peso molecular promedio del producto (kDa)	Número de monómeros	Abundancia relativa (%)
E2	1.6	5.9	96.3
	0.3	1.2	3.7
BPA	2.4	10.4	87.1
	0.3	1.4	12.9
NP	1.1	5.0	93.3
	0.3	1.5	6.7
TCS	1.3	4.5	88.1
	0.3	1.0	11.9

Para determinar si el tratamiento con lacasa de los diferentes DE modifica realmente la capacidad de los mismos de actuar como alteradores hormonales, se medirá su afinidad por el receptor de estrógenos antes y después de ser transformados. Dado que los peces son los organismos que están más expuestos a estos contaminantes y por ello son los más afectados, en este trabajo, además de medir la afinidad por el receptor de estrógenos de humano, se medirá la afinidad por el receptor de estrógenos de pez cebra. Para ello se clonó y expresó heterológicamente el zfER α LBD obteniendo un rendimiento de 2 mg de proteína por litro de cultivo con un 80% de pureza. Los ensayos de afinidad se están llevando a cabo.

Conclusiones. La lacasa de *Corioloopsis gallica* es capaz de transformar eficientemente a diferentes disruptores endócrinos dando como productos polímeros de mayor peso molecular que probablemente tengan una menor actividad estrogénica.

Agradecimiento. El proyecto se realiza con financiamiento de CONACyT.

Bibliografía.

- Barton HA (2003) *Pure Appl. Chem.* 75(11): 2159-2166.
- Cabana HJJP, Agathos SN (2007) *Eng. Life Sci.* 7(5): 429-456.
- Usui T, Ikeda Y, Tagami T, Matsuda K, Moriyama K, Yamada K, Kuzuya H, Kohno S, Shimatsu A (2002) *J. Endocrinol.* 175(2): 289-296.