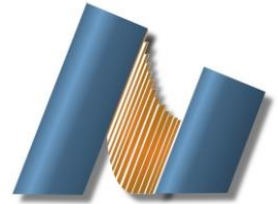




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
CENTRO DE NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA



LICENCIATURA EN NANOTECNOLOGÍA
BIONANOTECNOLOGÍA

TRANSFORMACIÓN DE DISRUPTORES ENDÓCRINOS POR CITOCROMO P450

TESIS
PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN NANOTECNOLOGÍA

PRESENTA:
SANTINO JESULÍN ZAPIAIN MERINO

DIRECTOR DE TESIS
DR. RAFAEL VÁZQUEZ DUHALT

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA ENERO 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hago constar que el trabajo que presento es de mi autoría y que todas las ideas, citas textuales, datos, ilustraciones, gráficas, etc. sacados de cualquier obra o debidas al trabajo de terceros, han sido debidamente identificados y citados en el cuerpo del texto y en la bibliografía y acepto que en caso de no respetar lo anterior puedo ser sujeto de sanciones universitarias.

Afirmo que el material presentado no se encuentra protegido por derechos de autor y me hago responsable de cualquier reclamo relacionado con la violación de derechos de autor.

*Nombre y firma del
estudiante*

Resumen

La contaminación ambiental es uno de los grandes desafíos de la sociedad. Las actividades humanas producen y dispersan en el ambiente una gran diversidad de sustancias tóxicas conocidas como xenobióticos. Estos contaminantes no solo producen daños al ambiente sino que también representan un peligro a la salud pública. Entre los contaminantes existe una serie de sustancias que interactúan directamente con el sistema endócrino alterando las respuestas hormonales de los organismos. Estas sustancias son conocidas como disruptores endócrinos (DE) [1]. La exposición a bajas concentraciones de estos disruptores endócrinos puede causar los siguientes efectos: problemas reproductivos masculinos, pubertad femenina temprana, leucemia, cáncer cerebral, desórdenes neuroconductuales, feminización de poblaciones, esterilidad e intersexo, entre otros. Hay que tener en cuenta que, aunque la asociación del aumento a la exposición química y el aumento en la tasa de enfermedades sugiere una relación entre las mismas, esto no prueba que haya una conexión entre ambas. Sin embargo, datos de estudios celulares, estudios animales y otros sistemas experimentales han generado evidencia que propone un enlace directo [2].

Citocromo P450 (CYP) es un término genérico utilizado para definir a una superfamilia de enzimas. Las CYP se encuentran principalmente en el hígado; aunque también son expresadas en casi todos los órganos. Esta familia de enzimas interviene tanto en procesos endógenos como para la transformación de sustancias exógenas (xenobióticos). Estas enzimas están involucradas en las funciones de desintoxicación en una variedad de organismos a través del metabolismo oxidativo.

En el presente trabajo, se comprobó la capacidad de la CYP_{BM3} variante "F87A" de transformar algunos de los disruptores endócrinos de mayor interés ambiental: 17 β -estradiol, resorcinol y bisfenol-A. Este proceso se evaluó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) obteniendo las actividades catalíticas de 0.118

(± 0.07) , 0.117 (± 0.03) y 165 (± 19) min^{-1} para el BPA, 17 β -estradiol y resorcinol, respectivamente. Finalmente, se identificó un producto de reacción relacionado con la transformación del 17 β -estradiol a [(16 β , 17 β)-16,17 epoxoestra-1,3,5 (10)-trien-3-yl]oxitrimetilo. La habilidad de la CYP_{BM3}F87A de transformar diversos contaminantes con actividad endócrina mediante el solo uso de peróxido de hidrógeno como cosustrato, al igual que su fácil producción y purificación la señala como una potencial herramienta en el campo de la biorremediación.

Palabras clave: Citocromo P450; CYP; Disruptores endócrinos; Transformación enzimática.

Agradecimientos

A mi familia por todo el apoyo y cariño que me han brindado a lo largo de este camino.

Al CNyN/UNAM por la formación académica, el espacio de estudio y por enseñarme un camino brillante en la investigación.

Al apoyo de ayudante de Investigador Nacional nivel 3, al proyecto “Papiit-UNAM IG200818” y al programa de Becas de Titulación por el soporte económico brindado.

Al Dr. Rafael Vázquez Duhalt, que además de apoyarme a lo largo de mi trabajo se ha convertido en uno de mis ejemplos a seguir tanto por su dedicación como por su conocimiento.

A la Dra. Katrin Quester, por su apoyo como técnico académico que, a pesar de la dificultad de mis preguntas, nunca dejó de apoyarme.

A la Dra. Ana Rodríguez y al Dr. Andrés Zárate que son las personas que más me han apoyado de principio a fin a lo largo de este proceso tanto en el ámbito profesional como personal.

Al Dr. Javier Pérez, por apoyarme en el uso de diversos equipos, técnicas y por ser un gran amigo en el laboratorio.

A la Ing. Itandehui Betanzo y al pronto Dr. Óscar González Davis por amenizar mi estadía en el laboratorio con su amistad y apoyo.

Finalmente, a todas las personas que conocí a lo largo de estos años en Ensenada. Aunque no me es posible mencionar a todos, aquí van algunos nombres: Sebastián, Cristóbal, David, César, Julián, Emmanuel, Óscar, Efraín, Pedro, Jaime, Huerta, Kanchan. Esto es gracias a ustedes.

Tabla de contenido

Resumen	I
Agradecimientos	III
Tabla de contenido	IV
Índice de figuras	V
Índice de tablas	VI
Introducción	- 1 -
Antecedentes	- 5 -
Hipótesis	- 9 -
Objetivos	- 9 -
Objetivo general	- 9 -
Objetivos particulares.....	- 9 -
Metodología	- 10 -
Expresión de CYP _{BM3} F87A.....	- 10 -
Purificación de CYP _{BM3} F87A.....	- 10 -
Pureza y cuantificación de la CYP _{BM3} F87A.....	- 11 -
Transformación enzimática de disruptores endócrinos mediante CYP _{BM3} F87A..	- 13 -
Identificación de los productos de reacción de los disruptores endócrinos con la CYP _{BM3} F87A	- 14 -
Resultados	- 15 -
Caracterización de la enzima CYP _{BM3} F87A	- 15 -
Disruptores endócrinos como sustrato de la CYP _{BM3} F87A	- 17 -
Identificación de los productos de reacción de los disruptores endócrinos con la CYP _{BM3} F87A	- 20 -
Conclusiones	- 23 -
Referencias	- 24 -

Índice de figuras

Figura 1. Estructura del 17 β - estradiol	- 3 -
Figura 2. Ciclo catalítico del CYP incluyendo la vía de reacción mediante peróxido de hidrógeno	- 7 -
Figura 3. Comparación de la estructura de la CYP _{BM3} nativa y mutante	- 8 -
Figura 4. Arreglo experimental utilizado para la evaluación de la CYP _{BM3} F87A catalíticamente activa	- 12 -
Figura 5. (a) Fracciones obtenidas en la purificación por cromatografía líquida rápida de proteínas (b) Análisis por SDS-PAGE de la CYP _{BM3} F87A	- 15 -
Figura 6. Estructuras químicas de los DE analizados	- 19 -
Figura 7. Estructura del [[16 β ,17 β -Epoxiestra-1,3,5(10)-trien-3-yl]oxi]trimetilsilano	- 20 -

Índice de tablas

Tabla 1. Condiciones para los programas utilizados en la cromatografía líquida de alto rendimiento para la detección de los disruptores endócrinos transformados por la CYP _{BM3} F87A.	14
Tabla 2. Constantes catalíticas de la CYP _{BM3} F87A	17
Tabla 3. Porcentaje de transformación y actividad específica de la CYP _{BM3} F87A en la transformación de diversos disruptores endócrinos.	18
Tabla 4. Datos de masa espectral del producto obtenidos en la transformación de 17 β -estradiol mediante CYP _{BM3} F87A.....	21

Introducción

El crecimiento acelerado de la industrialización ha sido un factor clave para el desarrollo de un sinnúmero de tecnologías que nos han permitido mejorar nuestra calidad de vida. Sin embargo, este proceso también ha involucrado cambios ecológicos importantes. En los últimos 60 años, se desarrollaron alrededor de 140,000 compuestos sintéticos y aproximadamente 1,000-2,000 nuevos químicos se desarrollan anualmente [3]. Ocasionalmente, ellos mismos o los procesos utilizados en la síntesis de estos compuestos llevan a la producción de sustancias secundarias que, al ser desechadas, afectan diferentes sistemas de los organismos. El efecto en el sistema endócrino ha despertado gran interés en las últimas dos décadas [4].

El sistema endócrino es aquel encargado de controlar las funciones corporales mediante la liberación de mediadores llamados hormonas [5]. Éstas interactúan con receptores específicos de la célula, ocasionando una respuesta que permite la regulación de diversas vías, el metabolismo, el crecimiento y desarrollo, entre otros. Los compuestos que perturban el equilibrio de éste sistema se conocen como disruptores endócrinos (DE) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) los define como cualquier sustancia o mezcla exógena que altera las funciones del sistema endócrino, ocasionando efectos adversos en la salud de un organismo, su prole o sus poblaciones [1]. Los efectos derivados de la interacción con éstas sustancias incluyen malformaciones en el desarrollo, interferencia en la reproducción, aumento en el riesgo de padecer cáncer, alteraciones en el sistema inmune y nervioso, por nombrar algunos. La potencial amenaza toxicológica de estos compuestos ha llevado a la identificación de 553 sustancias sintéticas y 9 naturales, que fueron presentadas por la Unión Europea en 2001 [6]. A partir de su identificación, los DE pueden ser clasificados en 8 categorías [7]:

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

Los DE actúan de diferentes maneras según su estructura. La mayor parte de estos químicos presentan una actividad estrogénica (relacionada con los receptores de estrógenos), sólo unos pocos poseen potencial androgénico y una menor cantidad presentan actividad en otras vías endócrinas tales como tiroidea, de crecimiento y estrés, por nombrar algunas [7]. A partir de ello se ha tratado de dilucidar una relación entre la estructura química y la actividad estrogénica de los DE. Al ser el 17β -estradiol (E2) el estrógeno natural más importante en vertebrados, se han propuesto tres criterios para analizar la potencial actividad estrogénica de nuevos compuestos basados en la estructura del E2 (figura 1) [8]: (i) anillo fenólico con la grupos funcionales capaces de formar enlaces de hidrógeno de manera similar al anillo A, (ii) centro hidrofóbico similar en tamaño y forma de los anillos B y C, y (iii) un enlace de hidrógeno donador similar a la sección 17β -hidroxil del anillo D , especialmente con una distancia oxígeno-oxígeno similar a la existente entre los grupos 3- y el 17β -hidroxil del E2. Independientemente de presentar una o más de

éstas características, es necesario el análisis experimental para confirmar su acción como DE.

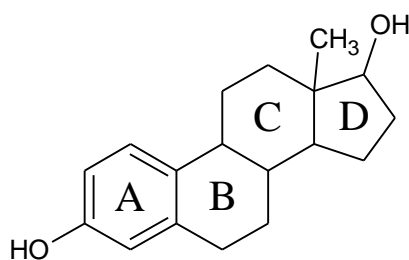


Figura 1. Estructura del 17β- estradiol

A pesar de la cantidad de DE identificados, las metodologías para su degradación son escasas. La necesidad de la eliminación de compuestos dañinos en el medio ambiente ha ido en incremento en los últimos años y el uso de maquinarias biológicas ha sido de principal interés. El uso de enzimas en la transformación de contaminantes tales como pesticidas ha tenido gran aceptación debido a su especificidad y al carácter biológico de las mismas. Entre las enzimas usadas en estos procesos se encuentran enzimas de origen fúngico como la lignina peroxidasa, lacasa, citocromo P450 (CYP), entre otros.

Los CYPs son una superfamilia de enzimas oxidasas que poseen un centro catalítico relativamente no selectivo. Debido a su baja selectividad y a la monooxigenación que catalizan, estas proteínas se encuentran involucradas en el metabolismo de drogas y compuestos ajenos al organismo (xenobióticos); por lo que resultan viables para su uso en la biorremediación. Este potencial uso como agentes degradadores de diversos contaminantes se ha observado en otros tipos de enzimas como lacasa, lignina peroxidasa, peroxidasa versátil y manganeso peroxidasa [9]. Entre estas enzimas cabe destacar aquellas que han sido utilizadas para la degradación de compuestos con actividad endócrina como lo son las lacasas provenientes de organismos como *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes*

versicolor y *Corioloopsis gallica*; y la peroxidasa versátil proveniente de *Bjerkandera adusta* [10–12].

En este trabajo analizamos la transformación de diversos DE por medio de una mutante de CYP proveniente de *Bacillus megaterium*. De igual manera, se determinaron los productos de la reacción y se discutió su posible uso en la degradación de contaminantes con actividad endócrina.

Antecedentes

Al ser los DE contaminantes emergentes y representar un riesgo a la salud pública y al ambiente, la búsqueda de procesos que permitan la remoción de los mismos ha generado gran interés ambiental.

En 2012, Torres-Duarte y colaboradores analizaron la capacidad de la enzima Lacasa de *C. gallica* para su uso en la remediación de aguas con presencia de DE. Para ello, se hizo uso de un modelo de pez cebrá para el análisis del efecto antes y después de la transformación enzimática de los diferentes DE. Se observó que la transformación de los DE mediante Lacasa de *C. gallica* daba como producto una serie de polímeros. La transformación resultó en una disminución en la inducción de vitelogenina, proteína producida durante los periodos reproductivos de diferentes especies de peces. En ese mismo estudio, se demostró la capacidad de biotransformación de los disruptores endócrinos bisfenol A, nonilfenol, triclosán y 17 β -estradiol.

Al observar los resultados positivos con el uso de lacasa de *C. gallica*, se planteó la posibilidad de utilizar otras enzimas para el mismo fin. La enzima utilizada por Torres-Duarte resultó una opción atractiva debido a su gran estabilidad, la necesidad de sólo oxígeno como co-sustrato y a la capacidad de su sitio activo de reconocer una gran variedad de sustratos [11]. Debido a ello, las enzimas a utilizar para ensayos posteriores deberían poseer dichas características o proveer alguna que incremente su actividad ante dichos contaminantes.

Los seres vivos se encuentran día a día expuestos a una alta cantidad de contaminantes y toxinas; por lo cual, los organismos han generado maquinarias capaces de contrarrestar los efectos de las mismas. Una de las estrategias de desintoxicación es la expresión de enzimas especializadas para la transformación de sustancias exógenas al organismo en benéficas o inocuas al mismo. El sistema multienzimático citocromos P450 (CYP) está involucrados en el proceso de desintoxicación de una gran diversidad de organismos. Estas enzimas transforman los agentes tóxicos en la fase I a través de la monooxigenación de los mismos.

Posteriormente, estos productos son empaquetados en un proceso llamado conjugación en la fase II y eventualmente son eliminados del sistema. Estas hemo-proteínas han sido observadas en todos los dominios mayores de los organismos y se cree que el origen los CYP modernos data de un gen ancestral de aproximadamente tres y medio billones de años [13]. Debido a las características antes mencionadas, los CYP resultan enzimas de interés para su uso en la biorremediación. Además, los citocromos P450 (CYP) son enzimas importantes en la catálisis de reacciones relacionadas con la biorremediación de hidrocarburos [14].

Sin embargo, los CYP provenientes de mamíferos comúnmente se encuentran ligados a la membrana plasmática de organelos tales como retículo endoplásmico y mitocondria; por lo que resulta complicada su purificación y su utilización en medios acuosos. Dado esto, se buscó hacer uso de un CYP de origen bacteriano que presentara una fuerte relación con aquellos de organismos superiores. El citocromo P450 BM-3 (CYP_{BM3}) de *Bacillus megaterium* resulta una opción de interés debido a su similitud con la CYP2C9 proveniente de humano, a la capacidad de ser producida en altas cantidades y a su alto número de recambio [15].

La CYP_{BM3}, es una hidrolasa de ácidos grasos que presenta un enlace covalente entre su dominio hidrolasa y un dominio diflavina reductasa. Esta hemo-proteína ha sido blanco de diversa alteraciones genéticas las cuales permitieron el anclaje y transformación de una gran variedad de sustratos. A pesar de ello, la CYP_{BM3} necesita de NAD(P)H como co-sustrato para su llevar a cabo la reacción lo cual involucra una desventaja económica en su utilización.

En 1989, Cirilo y colaboradores propusieron una vía de reacción alternativa mediante el uso de peróxido de hidrógeno para sobrellevar el problema de regeneración del cofactor [16]. (Figura 2) Sin embargo, la reacción con la enzima nativa resulta muy ineficiente y la desactivación de la enzima se ve incrementada debido a la presencia del peróxido.

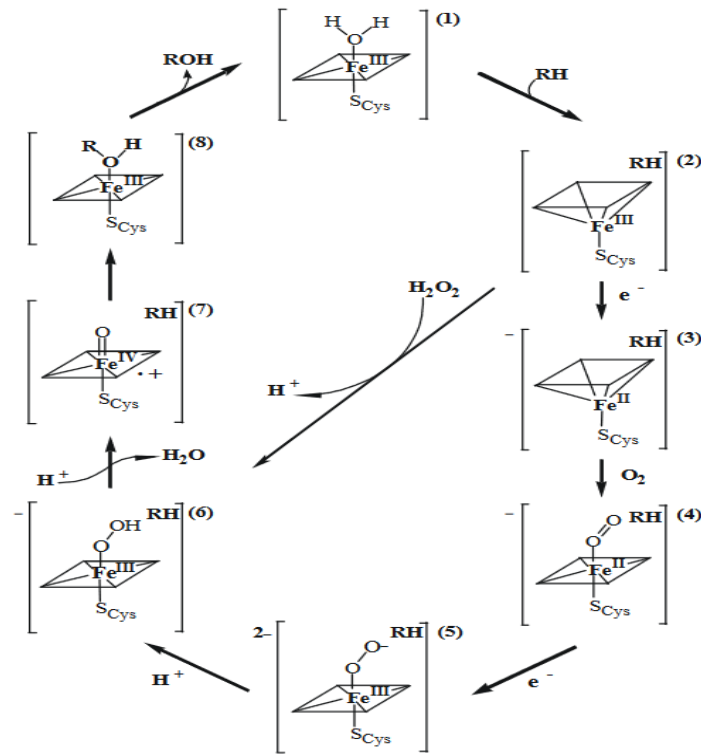


Figura 2. Ciclo catalítico del CYP incluyendo la vía de reacción mediante peróxido de hidrógeno. Siendo RH el sustrato y ROH el producto correspondiente. La molécula de porfirina es representada por un paralelogramo. La carga total de la estructura se muestra a la izquierda de cada corchete. Los intermediarios (1), (2), (7) y (8) son neutros [17].

Estudios posteriores demostraron que una modificación en el residuo fenilalanina 87 por alanina resulta en un aumento en la actividad peroxigenasa al igual que elimina la necesidad del dominio reductasa [18]. El residuo F87 se encuentra cerca del grupo –hemo en el lado distal y juega un papel en el posicionamiento del sustrato

para la oxidación; por lo cual la modificación F87A permite el acceso de sustratos más robustos al incrementar el espacio en el sitio activo. (Figura 3)

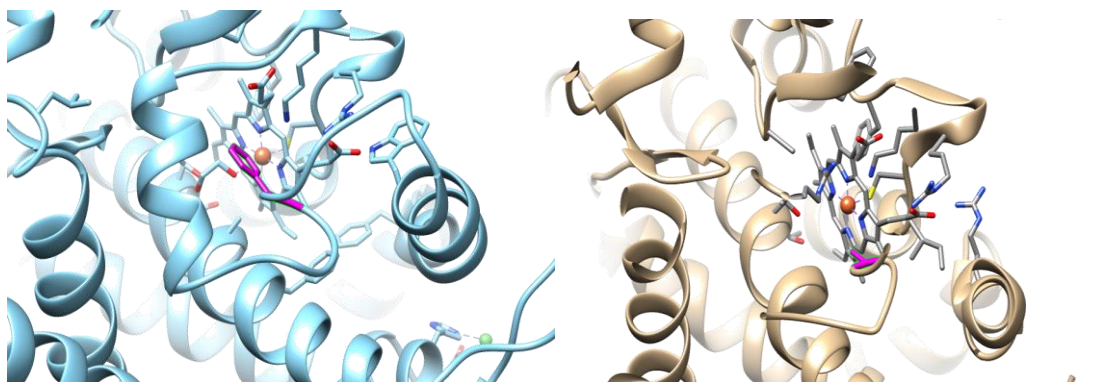


Figura 3. Comparación de la estructura de la CYP_{BM3} nativa (izquierda) y la variante CYP_{BM3}F87A. La imagen se generó por medio del software Chimera 1.13.1c.

Debido a las características derivadas de dicha mutación, se ha propuesto a la variante CYP_{BM3}F87A para su uso en la biorremediación. En 2017, Alejo y colaboradores analizaron la capacidad de la dicha enzima PEGilada como posible tratamiento para la transformación de pesticidas organofosforados obteniendo una respuesta positiva de la misma [19]. Dicha respuesta abre paso a la posibilidad del uso de esta variante de CYP_{BM3} en la transformación de otros contaminantes tales como aquellos con actividad endócrina.

Hipótesis

La variante de citocromo P450_{BM3}F87A es una enzima con la capacidad de transformar diversos disruptores endócrinos de interés ambiental.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la actividad de transformación de la enzima citocromo P450_{BM3}F87A sobre los disruptores endócrinos 17 β -estradiol, resorcinol y bisfenol A.

Objetivos particulares

- Purificar y caracterizar la proteína obtenida a partir de un vector de expresión en *E. coli* BL21.
- Evaluar la actividad de la CYP utilizando los disruptores endócrinos como sustratos.
- Identificar los productos obtenidos de la transformación enzimática de los DE por CYP_{BM3}F87A

Metodología

Expresión de CYP_{BM3}F87A

Se inoculó la cepa *Escherichia coli* DH5 α que lleva un vector de expresión pCWori CYPBM3 21B3 F87A en medio de cultivo Luria-Bertani con 200 μ g/mL de ampicilina (LB_{amp}). El precultivo se dejó en agitación constante por 18 horas a 37°C, 180-200 rpm.

En un matraz Erlenmeyer de 250 mL se inocularon 50 mL de medio TB (del inglés “*Terrific Broth*”), previamente complementado con ampicilina (200 μ g/mL), con 0.5 mL del pre inóculo antes mencionado. De igual manera, se suplementó el medio con 0.5 mM de tiamina y 100 μ L de elementos traza.

La solución de elementos traza se preparó con la siguiente proporción: 0.011 g MgCl₂•2H₂O, 0.3 g de FeCl₂•6H₂O, 0.0065 g de ZnCl₂•4H₂O, 0.002 g de CoCl₂•6H₂O, 0.01 g de Na₂MoO₄•2H₂O, 0.0038 g CaCl₂, 0.0126 g CuCl₂•2H₂O y 0.002 g H₂BO₃ disuelto en 10 mL de HCl 90% v/v [16].

El medio inoculado se colocó en agitación constante a 100 rpm a una temperatura de 25°C por 44 horas. Posterior a este tiempo, se adicionaron 0.5 mM de IPTG y se dejó en agitación por 44 horas adicionales. Se procedió a la formación de un precipitado bacteriano mediante una centrifugación a 3500 rpm durante 45 min a 4°C y la posterior eliminación del sobrenadante. Finalmente, los precipitados se almacenaron a -80°C para ser usados en procesos de purificación posteriores.

Purificación de CYP_{BM3}F87A

A cada precipitado bacteriano se le agregaron 10 mL de solución amortiguadora de lisis conteniendo 10 mM de imidazol, 50 mM de NaH₂PO₄ y 300 mM de NaCl con un pH de 8. Llevando a cabo todo el proceso en un baño de hielo, la suspensión obtenida se sometió a un lisado celular por sonicación. El ciclo de sonicado consistió en 9.9 s de pulso por cada 9.9 s de descanso durante dos minutos a una potencia

de 36%. El proceso se repitió de 7 a 8 veces dejando en reposo la suspensión por 5 minutos entre repetición. Finalizando el lisado, el producto obtenido se centrifugó durante 45 min a 8000 rpm a 4°C. El sobrenadante se recuperó y se filtró a través de una membrana de 0.22 µm y se concentró mediante ultrafiltración a través de una membrana de 10 kDa reduciendo su volumen 5 veces.

La proteína CYP_{BM3}F87A expresada contiene una etiqueta de 6 histidinas que facilita su purificación. Para ello, se empleó una cromatografía de afinidad a níquel haciendo uso de una columna HisTrapTM FF de 5 mL (GE Healthcare). La cromatografía líquida de proteínas rápida (FPLC del inglés “Fast Protein Liquid Chromatography”) se realizó en un equipo ÄKTA prime plus Protein Purification System (GE Healthcare). El programa utilizado consiste principalmente de un gradiente de concentración de imidazol de 10 a 500 mM con un flujo de 5 mL/min.

Finalmente, las fracciones con presencia de proteína fueron colectadas y dializadas en 2 L de una solución amortiguadora MES 50 mM pH 8 durante una noche. La solución obtenida se adicionó con 10% glicerol y se separó en alícuotas para su almacenaje a -20°C.

Pureza y cuantificación de la CYP_{BM3}F87A

La pureza de la proteína CYP_{BM3}F87A se analizó mediante electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida. Se cuantificó la concentración de proteína midiendo la absorbancia a 420 nm, banda correspondiente al grupo hemo de la CYP, haciendo uso de la ecuación 1.

$$[CYP \mu M] = \frac{Abs_{420}}{0.091} * dilución \quad \text{Ecuación 1.}$$

Concentración de CYP

De igual manera, se cuantificó la concentración de CYP_{BM3}F87A catalíticamente activa mediante la metodología propuesta por Sato y Omura en 1964 [20]. Este método se basa en un cambio en la absorbancia a 450 nm debido a la unión de CO en el sitio activo de la CYP. Para la producción de CO se construyó un sistema como

el de la figura 4. En este el ácido sulfúrico deshidrata al ácido fórmico dando como producto CO. El CO producido es burbujeadado dentro de la muestra con CYP_{BM3}F87A con la posterior adición de hidrosulfito de sodio. El cambio de absorbancia se monitoreó con un espectrofotómetro Perkin-Elmer series 836 ET y se utilizó la ecuación 2 para determinar la concentración de enzima activa.

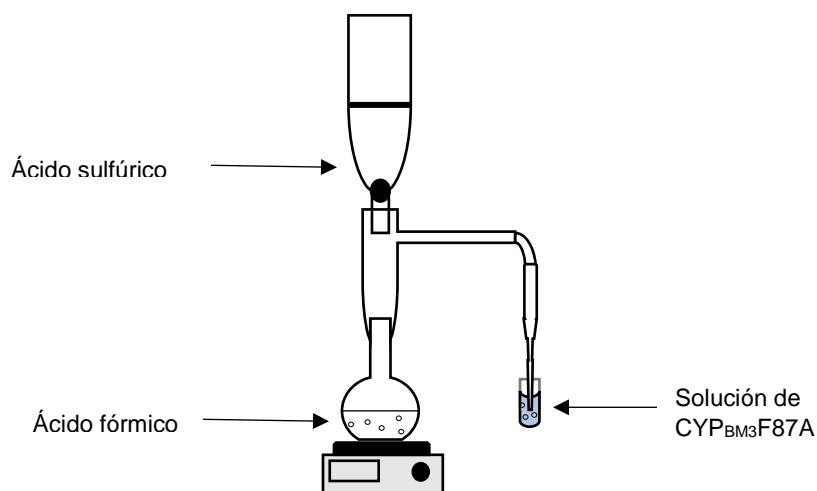


Figura 4. Arreglo experimental utilizado para la evaluación de la CYP_{BM3}F87A catalíticamente activa.

$$[CYP \mu M] = \frac{Abs_{450} - Abs_{490}}{0.091} * dilución$$

Ecuación 2.
Concentración de CYP activa.

Transformación enzimática de disruptores endócrinos mediante CYP_{BM3}F87A

La transformación de los disruptores endócrinos bisfenol A (BPA), 17 β -estradiol y resorcinol mediante la CYP_{BM3}F87A fue analizada mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC del inglés “High Performance Liquid Chromatography”). Para ello, primeramente se comprobó la capacidad de transformación de tales compuestos. Se elaboraron mezclas de reacción de 1 mL conteniendo 1.3 μ M de CYP_{BM3}F87A, 20 μ M de disruptor endócrino y 3 mM de H₂O₂ en una solución amortiguadora de MES 50 mM pH 8. Las soluciones madre de cada disruptor fueron elaboradas en acetonitrilo (ACN) a una concentración de 2 mM para BPA y resorcinol y 5 mM para el 17 β -estradiol. La reacción se incubó a temperatura ambiente no controlada por 5 minutos y se centrifugó a 6500 rpm por 1 minuto. En el caso del BPA y 17 β -estradiol, los sobrenadantes fueron analizados en un HPLC Agilent serie 1100 mediante fase inversa con columna C18, Kinetex C18, 5 μ m, 150 x 4,6 mm (Phenomenex, CA) en modo fluorescencia. Para el caso del resorcinol, se utilizó un equipo de la misma serie 1100 con la misma columna instalada en modo UV-vis.

Los valores de transformación de cada disruptor se determinaron mediante un análisis a punto final. Se cuantificó el área correspondiente a cada disruptor a una concentración fija antes y después de la reacción con la CYP_{BM3}F87A y se calculó la disminución de la misma. El programa de elución isocrático contenida como fases móviles ACN y agua con 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA) y un flujo de elución de 0.5 mL/min para el BPA y 17 β -estradiol; y un flujo de 0.2 mL/min para el resorcinol.

En la tabla 1 se pueden observar las condiciones utilizadas para cada disruptor endócrino empleado como sustrato de la CYP_{BM3}F87A.

Tabla 1. Condiciones para los programas utilizados en la cromatografía líquida de alto rendimiento para la detección de los disruptores endócrinos transformados por la CYP_{BM3}F87A.

Disruptor endócrino	Longitud de onda (nm)	Volumen de agua (mL) 0.1% TFA	Volumen de ACN (mL) 0.1% TFA
BPA	Ex. 275, Em. 313	60	40
17 β -estradiol	Ex. 280, Em. 310	45	55
Resorcinol	Abs. 273	85	15

Identificación de los productos de reacción de los disruptores endócrinos con la CYP_{BM3}F87A

Con el fin de obtener suficiente material para determinar la naturaleza química de los productos de reacción, se escalaron las reacciones del CYP_{BM3}F87A a 10 mL. Tanto la CYP_{BM3}F87A como el H₂O₂ fueron adicionados en 3 etapas sucesivas, con 30 min de incubación a temperatura ambiente no controlada posterior a la adición, hasta llegar a la concentración de escalamiento. Subsiguientemente, las reacciones fueron acidificadas, se realizó una extracción líquido-líquido con diclorometano y el extracto orgánico fue pasado a través de una columna de sulfato de sodio anhidro y secado tanto por rotaevaporación como con flujo de nitrógeno hasta eliminar el solvente. Después de esto, los polvos obtenidos fueron derivatizados haciéndolos reaccionar con bis(trimetilsilil)acetamida (BSA). La solución obtenida se colocó por 10 minutos en baño maría a 60°C para acelerar el proceso y posteriormente se procedió a la identificación. Los productos de reacción fueron identificados mediante cromatografía de gases acoplada a masas (GC/MS del inglés “Gas Chromatography / Mass Spectrometry”) con el uso de un cromatógrafo Agilent 6890N acoplado a un detector de masas Agilent 5973N.

Resultados y discusión

Caracterización de la enzima CYP_{BM3}F87A

El vector de expresión que codifica para la CYP_{BM3}F87A en *E. coli* BL21 presenta una sección codificante a 6 histidinas que facilita su purificación. Además de ello, el grupo hemo de la proteína le proporciona una coloración rojiza bajo luz natural lo cual permite la identificación de las fracciones en las cuales la proteína se encuentra presente. Esto, combinado con una lectura a 280 nm del FPLC permite la obtención de CYP_{BM3}F87A con un alto grado de pureza. En la figura 5a se pueden observar algunas de las fracciones correspondientes a la purificación de los extractos obtenidos en el lisado bacteriano. Se puede observar que la coloración de las fracciones es de una tonalidad rojiza, por lo cual podemos asegurar que la enzima purificada presenta un compuesto capaz de reflejar tal longitud de onda y que normalmente se atribuye a la presencia de un grupo hemo. De igual manera, en la figura 5b se muestra un gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomasie que evidencia la pureza de la muestra obtenida al presentar una sola banda a los 50 kDa, lo cual corresponde a lo reportado por Alejo en 2017 para la variante de CYP_{BM3}F87A y confirma la correcta purificación de la proteína.

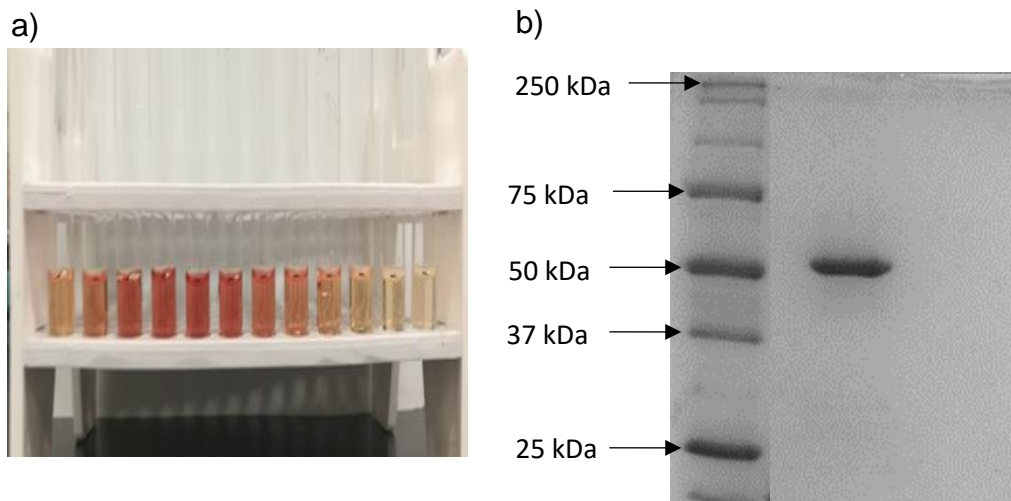


Figura 5. (a) Fracciones obtenidas en la purificación por cromatografía líquida rápida de proteínas (b) Análisis por SDS-PAGE de la CYP_{BM3}F87A

Posteriormente a la purificación, se evaluó la concentración de enzima producida y enzima activa dando como resultado 46.4 μM y 29.59 μM . De igual manera, se obtuvo un R_z igual a 1.02 para la purificación. Este consiste valor en la relación entre la absorbancia en la banda a 420 nm correspondiente al hemo del CYP_{BM3}F87A y aquella perteneciente a los residuos aromáticos de la proteína total del medio a los 280 nm. El valor de R_z es un indicador de la pureza de las hemo-proteínas y su valor, en nuestro caso, indica una alta pureza.

Las constantes catalíticas, k_{cat} y K_M de la CYP_{BM3}F87A fueron obtenidas primero para la oxidación de 2,6 dimetoxifenol (DMF) en presencia de 3 mM de H_2O_2 y, al ser una enzima de alto interés experimental, fue comparado con los valores obtenidos por Alejo en 2017. Los valores derivados de estos análisis se pueden observar en la tabla 2.

Tabla 2. Constantes catalíticas de la CYP_{BM3}F87A

Enzima	k_{cat} (min⁻¹)	K_M (μM)	k_{cat}/K_M (min⁻¹ /mM⁻¹)
CYP _{BM3} F87A	16.38	172 (±47)	95.2
CYP _{BM3} F87A [19]	11.1 (±0.7)	172 (±47)	64.5

La variación observada en ambos trabajos para las constantes catalíticas es mínima y debido a que se encuentran dentro del mismo orden no resultan significativas.

Disruptores endócrinos como sustrato de la CYP_{BM3}F87A

La capacidad de transformación de los disruptores endócrinos BPA, 17β-estradiol y resorcinol fue evaluada analizando la disminución en el área del pico correspondiente en el espectro de HPLC. En la tabla 3 se observan los valores obtenidos para el porcentaje de transformación y la velocidad de la misma para cada disruptor endócrino.

Tabla 3. Porcentaje de transformación y actividad específica de la CYP_{BM3}F87A en la transformación de diversos disruptores endócrinos

Disruptor endócrino	Área inicial (u.a.)	Área final (u.a.)	Transformación (%)	Actividad específica (s⁻¹)
BPA	781 (± 68)	528 (±43)	31.4 (±11)	0.118 (±0.07)
17β-estradiol	1049 (±101)	682 (±37)	34.7 (±4)	0.117 (±0.03)
resorcinol	258 (±4)	127 (±11)	50.7 (±5)	0.165 (±0.02)

Los valores de velocidad específica para los disruptores endócrinos analizados presentan una variación mínima; por estar en el mismo orden de magnitud, estas diferencias no son significativas ya que los compuestos se encuentran en concentraciones menores al orden de mM en el ambiente. Los compuestos con actividad endócrina normalmente presentan estructuras similares [8], por lo que la velocidad de transformación de los sustratos pueden estar relacionada con sus características estructurales.. En el caso del resorcinol, el contraste de su actividad específica con la de los otros disruptores analizados puede atribuirse igualmente a su estructura. El resorcinol es un 1,3 dihidroxybeneno que en comparación con las estructuras de los otros disruptores, figura 6, resulta muy pequeño; por lo que puede entrar al sitio activo de la proteína con mayor facilidad y por lo tanto transformado de forma más eficiente.

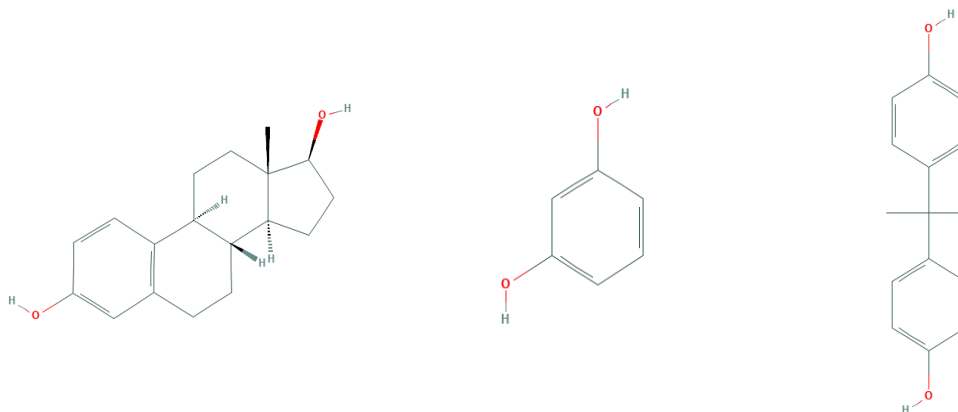


Figura 6. Estructuras químicas de los DE analizados. De izquierda a derecha, 17β-estradiol, resorcinol, bisfenol A.

De igual manera, se puede identificar a la CYP_{BM3}F87A como una enzima capaz de transformar dichos disruptores endócrinos, aunque a tasas menores a las observadas con la lacasa de *C. gallica* y con la peroxidasa versátil de *Bjerkandera adusta*. [11] [12] A pesar de ello, la CYP_{BM3}F87A muestra una actividad catalítica máxima a un pH de 9.0 [21] , a diferencia de los perfiles de pH observados para las enzimas antes mencionadas encontrándose estos en un pH entre 4 y 4.5. Esto presenta una ventaja en el uso de la CYP_{BM3}F87A para la biorremediación de zonas con pH alcalino. Igualmente, se puede hacer uso de agregados de diferentes tipos de enzimas para cubrir un mayor intervalo de pH [22]. Con respecto a la actividad, ésta puede verse optimizada si se modifica químicamente en su superficie, comportamiento demostrado por Alejo en 2017 al unir polietilenglicol a los grupos aminos presentes en la superficie de la CYP_{BM3}F87A y determinar el aumento de actividad contra la enzima sin modificar [19].

Aunque la biorremediación resulta en una herramienta con muchas ventajas en el aspecto ambiental, no hay reportes de un estudio de la transformación del resorcinol, en su papel de disruptor endócrino, por alguna otra enzima. Una de las

rutas comunes en el tratamiento de la contaminación por este compuesto reside en el uso de fotocatalisis. A pesar de ello, las tasas de transformación obtenidas por este método derivan en la remoción de un 80% del resorcinol en un tiempo de 2 horas mediante el uso de luz UV y de 100% en 7 horas con exposición a luz solar [23], [24]. Esto posiciona al uso de la CYP_{BM3}F87A como un efectivo agente en la biorremediación de dicho compuesto.

Identificación de los productos de reacción de los disruptores endócrinos con la CYP_{BM3}F87A

El análisis de cromatografía de gases acoplada a masas de los productos de la reacción entre el 17 β -estradiol y la CYP_{BM3}F87A propuso como posible producto el [(16 β , 17 β)-16,17 epoxiestra-1,3,5 (10)-trien-3-yl]oxitrimetil cuya estructura se muestra en la figura 6.

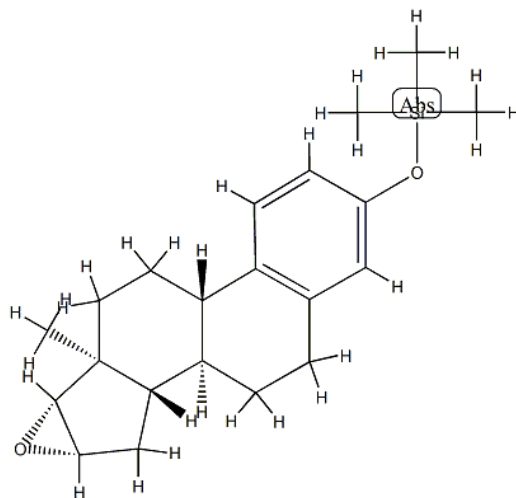


Figura 7. Estructura del [(16 β ,17 β -Epoxiestra-1,3,5(10)-trien-3-yl]oxi]trimetilsilano [25].

Este valor obtenido corresponde a una reacción de monooxigenación característica del CYP_{BM3}F87A. En la tabla 4 se pueden observar los datos de iones de masa

correspondientes al compuesto obtenido para la monooxigenación del 17 β -estradiol.

Tabla 4. Datos de masa espectral del producto obtenidos en la transformación de 17 β -estradiol mediante CYP_{BM3}F87A

Disruptor endócrino	Producto	iones de masa espectral (<i>m/z</i>)
17 β -estradiol	[(16 β , 17 β)-16,17 epoxoestra-1,3,5 (10)-trien-3-yl]oxitrimetilo	73 (22), 117 (16), 131 (21), 209 (17), 217 (18), 218 (24), 219 (17), 256 (30), 257 (30), 280 (32), 341 (88) M* , 342 (100)

^a Los valores en paréntesis corresponden a las intensidades relativas. M* = ion molecular

Aunque el producto [(16 β , 17 β)-16,17 epoxoestra-1,3,5 (10)-trien-3-yl]oxitrimetilo posee una estructura derivada de una monooxigenación, se requiere de alguna técnica complementaria como resonancia magnética nuclear para confirmar que este compuesto es el único obtenido en el proceso de transformación del 17 β -estradiol por la CYP_{BM3}F87A. Hay que tomar en cuenta que el producto se encuentra derivatizado, por ello la presencia de iones espectrales característicos del grupo silano.

Las mediciones obtenidas por espectrometría de masas para la identificación de productos de la transformación del BPA y el resorcinol resultaron no aportar información confiable. Esto debido a que los picos adquiridos no se pudieron relacionar con estructuras correspondientes a las reacciones de monooxigenación conocidas. De igual manera, se ha observado que las monooxigenaciones en compuestos fenólicos tienden a la formación de radicales libres resultando en la generación de compuestos poliméricos no identificados. A la par, los productos tanto del BPA como del resorcinol pueden tener características químicas no afines al proceso de separación líquido-líquido; por lo que una separación con solventes de

diversas propiedades puede ser útil en la purificación de los productos para proveer mayor información sobre sus características. Finalmente, es necesario realizar una caracterización completa de los parámetros cinéticos de la enzima para poder hacer una comparación eficiente con otras enzimas utilizadas en la biorremediación de compuestos con actividad endócrina.

Conclusiones

La CYP_{BM3}F87A es una enzima capaz de catalizar la transformación de los disruptores endócrinos bisfenol A, 17 β -estradiol y resorcinol. Dando como producto, en el caso del 17 β -estradiol un epóxido con la fórmula química [(16 β , 17 β)-16,17 epoxoestra-1,3,5 (10)-trien-3-yl]oxitrimetilo.

Los valores de actividad específica similares para los DE analizados indican que la proteína CYP_{BM3}F87A puede ser utilizada en la transformación de una mezcla compleja de dichos contaminantes.

A pesar de que la actividad específica de la enzima CYP_{BM3}F87A se encuentra por debajo de aquellas obtenidas para otras enzimas oxidoreductasas, esta puede ser utilizada para tratamientos de muestras alcalinas.

La optimización del proceso de purificación de productos es clave en la identificación de los mismos. Es necesario encontrar solventes afines a dichos productos para purificarlos y así determinar sus estructuras.

Referencias

- [1] T. Damstra, S. Barlow, A. Bergman, R. Kavlock, and G. Van Der Kraak, "Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors.," *WHOpublication no. WHO/PCS/EDC/02.2*, p. 180, 2002.
- [2] A. Gore, D. Crews, L. Doan, M. La Merrill, H. Patisaul, and A. Zota, "Introduction to Endocrine disrupting Chemicals (EDCs)-A Guide for Public interest Organizations and Policy-markers. Endocrine Society.," *Www.Endocrine.Org*, 2014.
- [3] U. E. P. A. States, "TRI National Analysis 2017," *January*, 2017. [Online]. Available: <https://www.epa.gov/trinationalanalysis/releases-chemicals-2016-tri-national-analysis>.
- [4] EPA, "Endocrine Disruption," 2017. [Online]. Available: <https://www.epa.gov/endocrine-disruption/what-endocrine-disruption>.
- [5] G. J. Tortora and B. Derrickson, *Principles of Anatomy & Physiology 14th Edition*. 2014.
- [6] P. Matthiessen, "Historical perspective on endocrine disruption in wildlife," *Pure Appl.Chem.*, vol. 75, no. 11–12, pp. 2197–2206, 2003.
- [7] P. Burkhardt-Holm, "Endocrine disruptors and water quality: A state-of-the-art review," *Int. J. Water Resour. Dev.*, vol. 26, no. 3, pp. 477–493, 2010.
- [8] T. W. Schultz, G. D. Sinks, and M. T. D. Cronin, "Structure-activity relationships for gene activation oestrogenicity: Evaluation of a diverse set of aromatic chemicals," *Environ. Toxicol.*, vol. 17, no. 1, pp. 14–23, 2002.
- [9] I. E. Touahar, L. Haroune, S. Ba, J. P. Bellenger, and H. Cabana, "Characterization of combined cross-linked enzyme aggregates from laccase, versatile peroxidase and glucose oxidase, and their utilization for the elimination of pharmaceuticals," *Sci. Total Environ.*, 2014.
- [10] Z. Ghobadi Nejad, S. M. Borghei, and S. Yaghmaei, "Kinetic studies of Bisphenol A in aqueous solutions by enzymatic treatment," *International Journal of Environmental Science and Technology*, 2018.
- [11] C. Torres-Duarte, M. T. Viana, and R. Vazquez-Duhalt, "Laccase-mediated transformations of endocrine disrupting chemicals abolish binding affinities to estrogen receptors and their estrogenic activity in zebrafish," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 168, no. 4, pp. 864–876, 2012.
- [12] D. A. Alarcón-Payán, R. D. Koyani, and R. Vazquez-Duhalt, "Chitosan-based biocatalytic nanoparticles for pollutant removal from wastewater," *Enzyme Microb. Technol.*, 2017.
- [13] W. F. Loomies, *Four Billion Years: An Essay on the Evolution of Genes and Organisms*. United States: Sunderland, Mass. : Sinaur Associates, Inc., 1988.
- [14] B. S. P. P.B. Danielson, "The Cytochrome P450 Superfamily: Biochemistry, Evolution and Drug Metabolism in Humans," *Curr. Drug Metab.*, 2002.

- [15] A. Rentmeister, T. R. Brown, C. D. Snow, M. N. Carbone, and F. H. Arnold, "Engineered Bacterial Mimics of Human Drug Metabolizing Enzyme CYP2C9," *ChemCatChem*, 2011.
- [16] H. Joo, Z. Lin, and F. H. Arnold, "Laboratory evolution of peroxide-mediated cytochrome P450 hydroxylation," *Nature*, 1999.
- [17] P. C. Cirino and F. H. Arnold, "A self-sufficient peroxide-driven hydroxylation biocatalyst," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2003.
- [18] P. C. Cirino and F. H. Arnold, "Regioselectivity and Activity of Cytochrome P450 BM-3 and Mutant F87A in Reactions Driven by Hydrogen Peroxide," *Adv. Synth. Catal.*, 2002.
- [19] K. Alejo-González *et al.*, "PEGylation of cytochrome P450 enhances its biocatalytic performance for pesticide transformation," *Int. J. Biol. Macromol.*, 2017.
- [20] T. OMURA and R. SATO, "THE CARBON MONOXIDE-BINDING PIGMENT OF LIVER MICROSOMES. I. EVIDENCE," *J. Biol. Chem.*, 1964.
- [21] L. Sanchez-Sanchez, R. Roman, and R. Vazquez-Duhalt, "Pesticide transformation by a variant of CYPBM3 with improved peroxxygenase activity," *Pestic. Biochem. Physiol.*, 2012.
- [22] R. Taboada-Puig *et al.*, "Combined cross-linked enzyme aggregates from versatile peroxidase and glucose oxidase: Production, partial characterization and application for the elimination of endocrine disruptors," *Bioresour. Technol.*, 2011.
- [23] S. M. Lam, J. C. Sin, A. Z. Abdullah, and A. R. Mohamed, "Photocatalytic degradation of resorcinol, an endocrine disrupter, by TiO₂ and ZnO suspensions," *Environ. Technol. (United Kingdom)*, 2013.
- [24] S. K. Pardeshi and A. B. Patil, "Solar photocatalytic degradation of resorcinol a model endocrine disrupter in water using zinc oxide," *J Hazard Mater*, 2009.
- [25] Chemical Book, "[[16β,17β-Epoxyestra-1,3,5(10)-trien-3-yl]oxy]trimethylsilan," 2017. [Online]. Available: https://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB72395851_EN.htm. [Accessed: 12-Oct-2018].