



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA



## Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño

**Clonación, expresión y purificación de la mutante Y537S de LBD - ER $\alpha$**

Trabajo terminal para obtener el grado de

**Licenciado en Ingeniería en Nanotecnología**

**Presenta**

**Karen Paulina Méndez González Lamb**

**Directores**

**Dr. Andrés Zarate Romero**

Departamento de bionanotecnología  
Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNyN)  
de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

**Dr. Franklin David Muñoz Muñoz**

Programa de ingeniería en nanotecnología  
Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño (FIAD)  
de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC)

**Ensenada, Baja California, México**

**Noviembre, 2024**



**"Clonación, expresión y purificación de la mutante Y537S de LBD - ER $\alpha$ "**

TESIS

PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**Licenciado en Ingeniería en Nanotecnología**

PRESENTA

**Karen Paulina Méndez González Lamb**  
**1155198**

A quien el Comité de Tesis autoriza el trabajo terminal, después de haber efectuado una revisión minuciosa del mismo y de acuerdo con el Art. 19 del R.G.E.P.E.P, las y los señores profesores emiten los siguientes votos aprobatorios mediante rubrica:

Dr. Andrés Zarate Romero

**DIRECTOR**

Dr. Franklin David Muñoz  
Muñoz

**CODIRECTOR**

Dr. Haydee López  
Rodríguez  
SINODAL

Dr. Oscar González Davis  
SINODAL

Dr. Hugo Alejandro Borbón  
Nuñez  
SINODAL

**"Por la Realización Plena del Ser"**

## 1. RESUMEN

Existen compuestos químicos que afectan el sistema endocrino de los animales y la calidad de vida de los organismos que conforman el ambiente en el que nos desenvolvemos, estos se denominan disruptores endocrinos (DEs). El desarrollo de biosensores capaces de acoplarse a estos complejos representa un campo de estudio con mucho potencial en el área científica. Uno de los candidatos para la creación de estos complejos es el receptor de estrógenos ER $\alpha$ , el cual destaca como uno de los receptores nucleares más importantes para el sistema endocrino. En el presente trabajo se realizó la clonación de la mutante Y537S del dominio de unión al ligando del receptor de humano (LBD-ER $\alpha$ ) en el vector de expresión pET28a (+). Dicha mutante contiene la etiqueta avi-Tag en el extremo N-terminal para su funcionalización con biotina. El receptor fue expresado en la cepa de *Escherichia coli* BL21(DE3) para su posterior extracción por medio de lisis celular. Su purificación se realizó a través de cromatografía de afinidad a níquel y del método de precipitación de sales con sulfato de amonio. Una vez comprobada la pureza de la muestra por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (*SDS-PAGE*); se llevaron a cabo ensayos de afinidad utilizando un equipo de espectroscopía fluorescente (EF), para la evaluación de señales ópticas producto de la unión a cumestrol. Consiguiente a esto, se elaboraron ensayos de competencia utilizando otros DEs que compiten con el cumestrol por el sitio de unión al ligando para comprobar que la unión del sistema sea dependiente del grado de afinidad al ligando de actividad estrogénica. Se utilizó el software Origin para el análisis de los datos estadísticos que resultaron de dichos ensayos. Finalmente, la proteína fue funcionalizada con biotina por medio del kit comercial BirA500 de la marca Avidity y se cuantificó el complejo Y537S ER $\alpha$ -biotina utilizando el kit comercial para la cuantificación de biotina de la marca Pierce. Se compararon los resultados recabados con los obtenidos de la literatura y se complementó el presente trabajo experimental con una investigación bibliográfica para determinar las posibles aplicaciones del complejo Y537S ER $\alpha$ -biotina en la lucha contra los disruptores del sistema endocrino.

**Palabras Clave:** Receptor de estrógenos, ER $\alpha$ , Disruptor endocrino, Proteína.

## 2. DEDICATORIA

**“Acuérdate en adelante, cada vez que algo te contriste, de recurrir a esta máxima:  
que la adversidad no es una desgracia, antes bien, el sufrirla con grandeza de ánimo  
es una dicha.”**

**-Marco Aurelio**

A mis padres, a mis abuelas y a mi tía Rosa Elena, quienes nunca han dudado de mi capacidad, ni siquiera cuando yo lo he hecho. Gracias por haberme apoyado económicamente durante la carrera y por siempre llevarme de la mano para lograr mis proyectos.

A mis hermanos, por ser una de mis mayores motivaciones en la vida para seguir acumulando logros.

A mi grupo de amigos del laboratorio, quienes me apoyaron y compartieron sus conocimientos de manera desinteresada en numerosas ocasiones, gracias por enseñarme a equivocarme con la frente en alto.

A la M.C. en Nanociencias Elizabeth Loredó García, quien fue el soporte y la compañía que tanto necesité durante mis últimos años en Ensenada.

A mi amiga, la L.I. en Nanotecnología Paola Ramos Gastelum, por estar siempre presente, por escucharme y por nunca soltarme de la mano durante mi tiempo en la universidad hasta el día de hoy.

A todos los que estuvieron conmigo durante este proceso, amigos, familiares y maestros. No hay suficientes palabras para expresar lo valioso que es para mí concluir este proyecto y mi licenciatura después de tantas adversidades en el camino.

### 3. AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNYN-UNAM) por abrirme sus puertas, por el uso de instalaciones y recursos para la realización de este trabajo de investigación, y por permitirme realizar el presente trabajo bajo la tutela de tan reconocidos y respetables investigadores.

Gracias al equipo del Laboratorio de Bionanotecnología del CNYN, a la M.A. Itandehui Betanzo Gutiérrez y al Dr. Oscar González Davis por su apoyo y gestión para conseguir el material necesario para llevar a cabo el presente trabajo de investigación.

Con profunda estima y reconocimiento, agradezco a mis directores de tesis: al Dr. Franklin David Muñoz Muñoz, por su apoyo incondicional en las múltiples ocasiones en que solicité su ayuda, y a mi codirector, el Dr. Andrés Zárate Romero, la persona más paciente y comprensiva que he tenido el placer de conocer y de ser guiada por. A pesar de mis obstáculos personales, siempre me animó a finalizar este proyecto y me apoyó con gran paciencia en cada etapa, incluso cuando tuvimos que cambiar de proyecto, cuando los experimentos no resultaban como esperábamos o cuando le preguntaba lo mismo por quinta vez.

A mi comité de tesis, el Dr. Oscar González Davis, la Dra. Haydee López Rodríguez y el Dr. Hugo Alejandro Borbón Núñez, por su retroalimentación y apoyo en la revisión de esta investigación, permitiéndome presentar este proyecto para obtener el grado de licenciatura.

A mis profesores de la Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño (FIAD-UABC), deseo expresar mi agradecimiento y reconocimiento. Desde mi primer semestre en la facultad, pude apreciar la alta calidad de investigadores que eran mis maestros. Me voy plenamente satisfecha con mi educación y con la valiosa contribución de cada uno de ustedes en mi formación académica.

## CONTENIDO

|  |    |
|--|----|
| 1. RESUMEN                                       | 2  |
| 2. DEDICATORIA                                   | 3  |
| 3. AGRADECIMIENTOS                               | 4  |
| 4. INTRODUCCIÓN                                  | 8  |
| 5. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES                  | 10 |
| 5.1 Sistema Endocrino                            | 10 |
| 5.1.1 Hormonas                                   | 10 |
| 5.1.1.1 Clasificación                            | 11 |
| 5.1.1.2 Hormonas esteroideas                     | 12 |
| 5.1.1.2.1 Estrógeno                              | 12 |
| 5.1.2 Receptores hormonales                      | 13 |
| 5.1.2.1 Receptor de estrógenos (ER)              | 13 |
| 5.1.2.1.1 Mecanismos de acción                   | 14 |
| 5.1.2.1.2 Ligandos endógenos y exógenos          | 16 |
| 5.1.2.1.3 Ambionoma                              | 17 |
| 5.2 Disruptores endocrinos                       | 17 |
| 5.2.1 Historia de los Disruptores Endocrinos     | 18 |
| 5.2.2 Tipos de DEs                               | 19 |
| 5.2.3 REACH                                      | 19 |
| 5.2.4 Comparación hormonas vs DEs                | 20 |
| 5.2.5 Mecanismos de disrupción                   | 21 |
| 5.2.6 17 $\beta$ -Estradiol                      | 21 |
| 5.2.7 Bisfenol A (BPA)                           | 22 |
| 5.2.8 Triclosán                                  | 23 |
| 5.2.9 Exposición humana a DEs                    | 24 |
| 5.2.9.1 Fuentes de exposición                    | 24 |
| 5.2.9.2 Efectos                                  | 25 |
| 5.2.9.3 Medidas de prevención                    | 26 |
| 5.2.9.3.1 Sensibilización pública                | 26 |
| 5.2.9.3.2 Recomendaciones                        | 27 |
| 5.3 Principios de técnicas experimentales        | 28 |
| 5.3.1 Clonación de ADN                           | 28 |
| 5.3.2 Expresión ADN                              | 29 |
| 5.3.2.1 Sistema de expresión de proteínas        | 30 |
| 5.3.3 Clonación y expresión de ADN en vector pET | 31 |

|          |  |    |
|----------|--|----|
| 5.3.3.1  | Vector de expresión pET 28a (+)  | 31 |
| 5.3.4    | Sistema de expresión de <i>Escherichia coli</i>  | 32 |
| 5.3.5    | Sistema promotor T7  | 33 |
| 5.3.6    | BL21 (DE3)   | 33 |
| 5.3.7    | Cromatografía de afinidad a níquel   | 33 |
| 5.3.8    | Precipitación con sulfato de amonio  | 34 |
| 5.3.9    | Ultrafiltración  | 34 |
| 5.3.9.1  | Membrana de celulosa regenerada  | 35 |
| 5.3.10   | Espectroscopia Uv-Vis – Proteínas  | 35 |
| 5.3.11   | Fluorimetría   | 36 |
| 5.3.11.1 | Ensayo de afinidad   | 37 |
| 5.3.11.2 | Ensayo de competitividad   | 38 |
| 5.4      | Antecedentes   | 38 |
| 6        | JUSTIFICACIÓN  | 41 |
| 7        | HIPÓTESIS  | 41 |
| 8        | OBJETIVOS  | 42 |
| 8.1      | Objetivo General.  | 42 |
| 8.2      | Objetivos específicos.   | 42 |
| 9        | EXPERIMENTACIÓN  | 43 |
| 9.1      | Materiales y equipo  | 43 |
| 9.2      | Metodología  | 43 |
| 9.2.1    | Clonación ADN  | 43 |
| 9.2.2    | Expresión ADN  | 44 |
| 9.2.3    | Extracción de contenido celular  | 44 |
| 9.2.4    | Purificación   | 45 |
| 9.2.5    | Ensayos de afinidad  | 46 |
| 9.2.6    | Ensayos de competencia   | 47 |
| 9.2.7    | Funcionalización y cuantificación de biotina   | 47 |
| 10       | RESULTADOS Y DISCUSIÓN   | 48 |
| 10.1     | Diseño de la secuencia y clonación de la mutante Y537S LBD-ER $\alpha$                       | 48 |
| 10.2     | Expresión de LBD-ER $\alpha$ Y537S en BL21(DE3) y purificación.                              | 50 |
| 10.3     | Determinación de afinidad del receptor de estrógenos.  | 53 |
| 10.4     | Capacidad del ER $\alpha$ de reconocer 17 $\beta$ -Estradiol y otros disruptores endocrinos. | 55 |
| 10.5     | Funcionalización de la proteína y cuantificación de biotina.                                 | 57 |
| 11       | CONCLUSIÓN   | 58 |
| 12       | BIBLIOGRAFÍA   | 59 |

|                                     |    |
|-------------------------------------|----|
| 13 ANEXO A                          | 64 |
| 13.1 Análisis de proteína Protparam | 64 |
| 13.2 Cromatograma de elución        | 65 |

#### Lista de Figuras

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Organización estructural del receptor de estrógeno $\alpha$ (ER $\alpha$ ).  | 14 |
| Figura 2. Vías de señalización de estrógenos genómicas y no genómicas. Imagen adaptada al español desde Silveyra 2019.   | 16 |
| Figura 3. Estructura química del 17 $\beta$ - Estradiol (Fuentes & Silveyra, 2019).  | 22 |
| Figura 4. Estructura química del Bisfenol A (BPA) (Andrés Sarria-Villa et al., 2019).  | 23 |
| Figura 5. Estructura química del triclosán (TCS) (Benítez-Villalba et al., 2019).  | 24 |
| Figura 6. Mapa circular del vector de expresión pET 28(+) con etiquetas de sus componentes. (Addgene - Analyze Sequence).  | 32 |
| Figura 7. Componentes esenciales de un espectrómetro de fluorescencia (An Introduction to Fluorescence Spectroscopy, 2000).  | 37 |
| Figura 8. Curva típica de saturación de un ligando con Kd de 10 nM para un receptor. Imagen adaptada al español (Stoddart et al., 2016).                               | 38 |
| Figura 9. Ilustración representativa de la proteína diseñada de la mutante Y537S LBD-ER $\alpha$ clonado e incorporado a las etiquetas para su posterior purificación. | 48 |
| Figura 10. Fragmento y plásmido digeridos y purificados.   | 49 |
| Figura 11. Análisis de PCR de colonias de la ligación ER $\alpha$ -pET28a (+).   | 49 |
| Figura 12. Digestión de plásmidos para comprobar la presencia de insertos.   | 50 |
| Figura 13. Gel de acrilamida de purificación por afinidad a níquel.  | 50 |
| Figura 14. Purificación mediante cromatografía de intercambio iónico.  | 51 |
| Figura 15. Determinación de porcentaje de saturación óptimo para purificación por sulfato de amonio.   | 52 |
| Figura 16. Precipitación y solubilización de la proteína al 40%.   | 52 |
| Figura 17. Espectroscopía de fluorescencia del complejo ER $\alpha$ -cumestrol.  | 53 |
| Figura 18. Análisis de competencia entre disruptores endocrinos.   | 55 |
| Figura 19. Funcionalización del receptor de estrógenos.  | 57 |

#### Lista de Tablas

|  |    |
|--|----|
| Tabla 1. Comparación de las hormonas y los disruptores hormonales (Arias et al., 2020).  | 20 |
| Tabla 2. Algunos efectos reconocidos o sospechados de potenciales DEs (Arias et al., 2020).  | 26 |
| Tabla 3. Cantidades de sulfato de amonio necesarias para alcanzar determinados grados de saturación a 20°C (Handbook & Surface, 2000). | 46 |

#### 4. INTRODUCCIÓN

Las hormonas esteroideas sexuales son las principales reguladoras del crecimiento y el desarrollo sexual dentro del sistema endocrino (Kleine & Rossmannith, 2016). Dentro de esta categoría podemos encontrar a los estrógenos, los cuales tienen participación en varios procesos del organismo tales como: eventos cardiovasculares, mantenimiento de la densidad del sistema óseo, desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso, entre muchas otras (Márquez, 2002). Las células objetivo que responden a los diversos tipos de hormonas se caracterizan por poseer receptores hormonales; la interacción entre una hormona y su receptor provoca una serie de reacciones bioquímicas en la célula objetivo que pueden llegar a modificar tanto la función, como la actividad de dicha célula (Hiller-Sturmhöfel & Bartke, 1998).

En 1962, Jensen y su equipo realizaron una investigación en la cual diversos tejidos de ratas fueron analizados, de esta manera, revelaron la presencia de sitios de unión de estrógeno; el primer receptor de estrógenos (ER $\alpha$ ) fue clonado más de veinte años después. Dicho receptor presenta un tamaño de 595 aminoácidos (67 kDa) y está compuesto por seis regiones nombradas de la letra “A” a la “F”. En el dominio amino terminal de la proteína podemos encontrar la región A/B; la región C representa el sitio de unión al ADN; la región de bisagra se distingue con la letra D; y por último tenemos la E/F donde se encuentra el dominio de unión al ligando (LBD) en el dominio carboxilo-terminal. Los dominios de unión de los receptores de estrógenos son capaces de reconocer una diversidad muy amplia de moléculas orgánicas e inorgánicas. Entre ellas tenemos: endoestrógenos, xenoestrógenos, fitoestrógenos, metaloestrógenos y los moduladores selectivos del receptor de estrógeno (SERM) (Fuentes & Silveyra, 2019; Márquez, 2002).

Los disruptores endocrinos (DEs) son una de las principales amenazas para la regulación hormonal. De acuerdo con la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, un disruptor endocrino se describe como “un agente que interfiere con la síntesis, secreción, transporte, unión o eliminación de hormonas naturales presentes en el organismo que son responsables del mantenimiento de la homeostasis, la reproducción, el desarrollo y/o el comportamiento” (Kabir et al., 2015). La existencia de dichos agentes es conocida desde hace alrededor de 60 años y es posible categorizarlos en ocho tipos diferentes: compuestos industriales, pesticidas organoclorados, fungicidas, plásticos y plastificantes, productos farmacéuticos, metales, fitoestrógenos e hidrocarburos aromáticos (Arias et al., 2020; Scaglia, 2009).

Los seres vivos nos encontramos en exposición universal a los DEs gracias a un empleo generalizado de manera global. Los DEs no persistentes desaparecen fácilmente después de actuar durante plazos cortos, en momentos críticos del desarrollo; mientras que los persistentes se acumulan dentro del organismo y pueden provocar efectos disruptores aunque su exposición no haya sido reciente. De acuerdo con Arias et al. (2020), entre los efectos que se puede tener debido a la exposición a DEs que se han estudiado a través de los años tenemos los siguientes:

- a) Deterioro de la salud reproductiva humana.
- b) Incremento en frecuencia de abortos, bajo peso en bebés y malformaciones congénitas.
- c) Afectaciones en el desarrollo del sistema nervioso central.
- d) Alteración en niveles de hormonas tiroideas.
- e) Incremento de trastornos inmunitarios.
- f) Efecto sobre la relación de sexos con respecto a la natalidad.
- g) Aumento en prevalencia de obesidad y de diabetes tipo 2.

A través de los años se han logrado crear sistemas de unión a disruptores endocrinos para el estudio de su prevalencia y el tratamiento de enfermedades relacionadas con su actividad. Principalmente se ha utilizado el ER $\alpha$  con el fin de aprovechar sus propiedades y su fácil expresión en sistemas de expresión bacteriana para la detección y acoplamiento de diversos ligandos de actividad estrogénica. La mutación Y537S (sustitución de Tyr por Ser) en el sitio de unión al ligando (LBD, por sus siglas en inglés) del receptor de estrógenos ER $\alpha$  se ha mostrado como una opción viable para el desarrollo de biosensores, gracias a que estabiliza la hélice 12 en la conformación agonista de la proteína añadiendo un enlace de hidrógeno adicional entre las hélices 3 y 12, lo que le proporciona mayor estabilidad en solución. De igual manera, se ha descubierto que la mutación ocurre en la superficie y que no tiene impacto en la interacción del ligando con el receptor (Nettles et al., 2008). Específicamente, el modelo de la mutante Y537S exhibe cadenas laterales sustituidas de menor tamaño y mayor polaridad. Esta combinación, junto con la presencia de un enlace de hidrógeno, contribuye a una mayor estabilidad y una disminución en la propensión a la agregación de dicha mutante (Zhong & Skafar, 2002).

Por otro lado, una de las desventajas a la hora de trabajar con sistemas ER $\alpha$ -DEs es la falta de opciones rápidas y eficaces para comprobar su acoplamiento y las características de este. Para solucionar este problema se propone el uso de nanocristales semiconductores fluorescentes denominados “*quantum dots*” (QDs). Estos nanocristales han pasado a ser componentes

importantes dentro del campo bio-nanotecnológico; entre las aplicaciones más destacadas en dicho sector tenemos el uso de los QDs como componentes integrados a través de la bio-conjugación (Algar et al., 2010).

La unión del complejo Y537S LBD-ER $\alpha$ /QD a través del acoplamiento por medio de la interacción estreptavidina:biotina proporciona un sistema muy estable para la unión al ligando de actividad estrogénica. Al estudiar las ventajas que representa el uso del sistema propuesto como biosensor fluorescente es posible considerar sus múltiples aplicaciones en la detección específica de estos ligandos tanto en medios acuosos, como en muestras de pesticidas, alimentos, productos de cuidado personal, etc. Ampliando de esta manera el conocimiento que existe sobre la prevalencia de DEs tanto en el organismo, como en el ambiente.

## **5. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES**

### **5.1 Sistema Endocrino**

Se define al sistema endocrino como un conjunto de órganos que intervienen en la coordinación de actividades metabólicas, desde el crecimiento, el desarrollo, y diversos procesos de reproducción, entre otros. Los órganos y tejidos involucrados en este sistema tienen funciones especializadas y se encargan de procesar y verter en el flujo sanguíneo, un grupo de hormonas que alcanzan cada rincón del cuerpo humano. Entre las estructuras que lo conforman tenemos: el hipotálamo, la tiroides, el timo, la glándula pineal, los ovarios y, los testículos, entre otros (Guzmán Y Valle et al., 2019). Se considera que el sistema endocrino es muy adecuado para transmitir información en eventos donde se requiere una mayor expansión y acciones reguladoras de mayor duración (Hiller-Sturmhöfel & Bartke, 1998).

#### **5.1.1 Hormonas**

Las hormonas pueden definirse como moléculas producidas por glándulas endocrinas, las cuales son distribuidas a través del torrente sanguíneo hacia las células objetivo. Mientras algunas hormonas son muy específicas, existen otras que afectan a una cantidad numerosa de diferentes tipos de células alrededor del organismo. Las hormonas ayudan a controlar el crecimiento, desarrollo y metabolismo del cuerpo, así como la composición electrolítica de los fluidos corporales y la reproducción (Hiller-Sturmhöfel & Bartke, 1998).

### 5.1.1.1 Clasificación

De acuerdo con Kline & Rossmanith, 2016, las hormonas se clasifican en tres clases diferentes:

#### a) Hormonas proteicas/peptídicas

En la primera categoría se presentan las hormonas reguladoras de la reproducción, como las gonadotropinas; del balance de energía, como lo es la insulina; y de la presión arterial, como las angiotensinas. La mayoría de los organismos vertebrados poseen hormonas de estructura similar, sin embargo, existen hormonas como la insulina las cuales también pueden encontrarse en invertebrados. Este tipo de hormonas son producidas como cualquier otra proteína y sufren modificaciones postraduccionales dentro del retículo endoplásmico y de otros compartimentos intracelulares.

#### b) Terpenos: hormonas juveniles y esteroideas

En esta categoría, formada por dos clases de hormonas, se encuentran las hormonas sexuales del hombre y la mujer (estradiol y testosterona), corticosteroides y mineralocorticosteroides tales como el cortisol, aldosterona y gestágenos (como la progesterona). Estos esteroides son derivados del colesterol. De forma general el proceso se puede describir de la siguiente manera: el precursor escualeno es convertido en colesterol a través de una serie de reacciones bioquímicas complejas. Este colesterol se presenta en la membrana plasmática la cual posteriormente es transferida a la mitocondria por medio de proteínas de regulación esteroideogénica aguda expresadas dentro de la célula. Aquí es donde ocurre la conversión del colesterol en pregnenolona. A partir de este punto se logran sintetizar los diferentes tipos de esteroides en un conjunto de conversiones donde se requieren diversos tipos de enzimas. La presencia o ausencia de dichas enzimas es lo que determinará si en dicha célula será producido cortisol o estradiol.

Generalmente los esteroides producidos son liberados de forma inmediata al ambiente celular por medio de difusión, sin embargo, existen casos en los que el producto permanece almacenado. La liberación de estas hormonas se encuentra regulada por la activación de la enzima limitante de la velocidad o bien por la enzima final en la serie de reacciones para la síntesis.

### c) Derivadas de aminoácidos

En esta categoría se encuentran las hormonas derivadas de aminoácidos. La triyodotironina y tiroxina son derivadas de la tirosina, así como la catecolamina, dopamina, noradrenalina y adrenalina. Las indolaminas como la melatonina y las moléculas relacionadas como la serotonina son creadas a partir del triptófano.

### **5.1.1.2 Hormonas esteroideas**

De acuerdo con Kleine & Rossmann (2016), las hormonas esteroideas de los vertebrados se dividen en cinco clases:

- a) Gestágenos, como la progesterona con 21 átomos de carbono.
- b) Glucocorticoides, como el cortisol.
- c) Mineralocorticoides, como la aldosterona con 21 átomos de carbono.
- d) Andrógenos, como la testosterona con 19 átomos de carbono.
- e) Estrógenos, tales como el estradiol con 18 átomos de carbono.

Todas estas tienen precursores en común como la pregnenolona y progesterona.

#### **5.1.1.2.1 Estrógeno**

Los estrógenos fueron descubiertos a principios del siglo XX. Al inyectar extractos ováricos de ganado vacuno y porcino en roedores se comprobó que inducían la actividad sexual. Posteriormente, se determinó que la hormona era producida por los folículos ováricos maduros y que posiblemente esta era característica de todas las hembras (Allen & Doisy, 1983).

Los esteroides sexuales como son el estrógeno y andrógenos son determinantes mayores en el proceso de reproducción. De estos dependen el desarrollo sexual, la maduración de las gónadas y su adecuado funcionamiento. Son los principales reguladores del crecimiento e inducen una preparación conductual específica del sexo en el cerebro. Su síntesis se produce principalmente en las gónadas, en las glándulas suprarrenales y el tejido adiposo. La producción de estrógeno se encuentra bajo el control de la hormona foliculoestimulante (FSH, por sus siglas en inglés) secretada por la glándula pituitaria al ser estimulada por la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH, por sus siglas en inglés). Mientras tanto, la secreción de estas dos

últimas hormonas se encuentra bajo el control inhibitorio de la testosterona, estradiol e inhibina (Kleine & Rossmanith, 2016).

De igual manera, los estrógenos son importantes en la fisiología cardiovascular. Gracias a esto, se conoce que el riesgo de padecimientos cardiovasculares es menor en mujeres a edades previas a la menopausia, que en hombres. También se reconoce la participación del estrógeno en el desarrollo y el mantenimiento de la densidad del sistema óseo, así como en el desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso. Su equilibrio es necesario para regular ciertas funciones cognitivas y afecta el estado de ánimo. También se ha demostrado que asisten en la prevención o retardo del desarrollo de enfermedades degenerativas del sistema nervioso (Márquez, 2002).

### **5.1.2 Receptores hormonales**

Las células objetivo de los diversos tipos de hormonas se caracterizan por poseer receptores hormonales los cuales se encuentran en la superficie de la célula, o bien en su interior. La interacción entre la hormona y su receptor provoca una serie de reacciones bioquímicas en la célula objetivo las cuales eventualmente producen modificaciones en las funciones y/o actividades de la célula (Hiller-Sturmhöfel & Bartke, 1998).

#### **5.1.2.1 Receptor de estrógenos (ER)**

El receptor de estrógenos (ER) es una proteína correspondiente a la “superfamilia de receptores nucleares”. Este fue identificado por Jensen et al. en el año 1962 al analizar diversos tejidos de ratas en los que revelaron la presencia de sitios de unión de estrógeno. Posteriormente se aisló por primera vez del útero de ratas por Toft y Gorski, en 1966. Ambas agrupaciones desarrollaron modelos para intentar interpretar cómo funciona el estradiol a nivel nuclear al unirse a un receptor determinado, el receptor de estrógenos (Márquez, 2002). Mas de veinte años después, se utilizó el RNA de la línea celular de cáncer de mama humano MCF-7 para clonar el primer receptor de estrógenos. En 1996 el equipo liderado por el Dr. Jan-Ake Gustafsson descubrió un nuevo receptor muy parecido al que se pensaba era el único ER. A este nuevo receptor se le denominó ER $\beta$ , mientras que se nombró ER $\alpha$  al previamente conocido. Cada receptor tiene diversas funciones acordes al tejido en el cual se desempeña (Kuiper et al., 1996).

El tamaño completo de ER $\alpha$  es de 595 aminoácidos y tiene una masa de 67 kDa. Este se compone por seis regiones (nombradas de la letra “A” a la “F”). El dominio A/B se encuentra

en la región amino terminal de la proteína e incluye la función de activación de la transcripción genética AF-1 (Activation Función 1), así como varios sitios de fosforilación. Contiguo se encuentra el dominio C, que representa el sitio de unión al ADN. Este está compuesto por nueve residuos de cisteínas, ocho de ellos coordinados alrededor de dos iones de  $Zn^{2+}$ . Esta característica permite que el receptor se una a una secuencia específica del ADN definida por la caja P (P-box), descrita como la combinación de aminoácidos localizada entre los dos dedos de zinc. De forma adyacente se encuentra la región de bisagra (región D). Esta región no ha sido caracterizada en su totalidad, aunque se conoce que ayuda en la unión a la proteína HSP90 (*heat shock protein 90*) que, mientras el receptor se encuentre inactivo, permanece unida a este. Por último, tenemos el LBD en el extremo carboxilo-terminal (también llamada región E/F), sitio en el cual se une la hormona. Este dominio destaca por su gran especificidad hacia su hormona y por lo tanto su gran afinidad al estrógeno correspondiente, pero no a otras hormonas esteroideas. Otras funciones de dicho dominio incluyen la función de activación de la transcripción AF-2 (Activation Function 2), dimerización, interacción con otras proteínas co-activadoras o co-represoras de la transcripción, fosforilación y localización nuclear (Fuentes & Silveyra, 2019; Márquez, 2002). En la Figura 1 se observa una imagen estructural representativa de los diversos dominios que conforman al receptor de estrógenos  $ER\alpha$ , así como una distribución cuantitativa de sus 595 aminoácidos.



**Figura 1. Organización estructural del receptor de estrógeno  $\alpha$  ( $ER\alpha$ ).**

Dominios: N-terminal (NTD, dominios A/B, AF-1), dominio de unión al ADN (DBD, dominio C), la bisagra (dominio D), la región C-terminal que contiene el dominio de unión al ligando (LBD, dominio E/F, AF-2) (Fuentes & Silveyra, 2019).

#### 5.1.2.1.1 Mecanismos de acción

Existe una posible interacción directa e indirecta entre el ADN y los complejos estrógeno-receptor gracias a la diversidad de eventos celulares y moleculares que provocan la regulación de la expresión génica. Debido a esto, los eventos de señalización mediados por estrógenos se dividen en genómicos y no genómicos (Márquez, 2002).

### **a) Señalización genómica directa de ER nuclear**

Los efectos genómicos involucran la migración de los estrógenos al citoplasma, estos se unen a sus respectivos receptores y logran modificar su conformación, liberando las *heat shock proteins* (HSPs) por pérdida de afinidad. El receptor es activado con la unión al esteroide, se dimeriza con otro receptor a través de uno de los dedos de zinc y se incorpora al núcleo de la célula. Por el otro dedo de zinc se une el ADN en el dominio correspondiente, así obtiene su actividad como factor de transcripción. Posteriormente el dímero se incrusta en el ADN para crear un compuesto de iniciación el cual modera la transcripción de genes específicos. El elemento de respuesta a los estrógenos (ERE, por sus siglas en inglés) es una secuencia palindrómica ubicada en espacios regulatorios de los genes dependientes de estrógenos; es la zona del ADN que es reconocida por el ER. Al unir el ERE con el ER se activa la caja TATA y se reclutan factores de transcripción generales (FGTs, por sus siglas en inglés) y específicos de estrógenos (FETs, por sus siglas en inglés). Consiguiente a esto se activa la RNA polimerasa II en el dominio de unión al promotor, induciendo la expresión genética. Cualquier sustancia que logre liberar a las HSPs provocará un efecto estrogénico (Scaglia, 2009).

### **b) Señalización genómica indirecta (Interacción transcripcional) de ER nuclear**

La necesidad de unir al receptor con el ADN del ligando proviene de la presencia de ciertos genes que no poseen EREs en sus regiones promotoras, su transcripción puede ser regulada por el estradiol. Se estima que el 35% de los genes a los que se dirige el estrógeno carecen de secuencias tipo ERE. En este tipo de señalización, los complejos de ER operan por medio de interacciones proteínicas con otros factores de transcripción y elementos de respuesta. Esto logra repercutir en la activación o supresión de la expresión de los genes diana (Fuentes & Silveyra, 2019; Márquez, 2002; Scaglia, 2009).

### **c) Señalización indirecta no genómica de receptor de membrana**

Se han observado respuestas biológicas de gran rapidez inducidas por estrógenos, conduciendo así a considerar la posibilidad de que estos no necesiten pasar por procesos que impliquen la transcripción directa del genoma diana, ni la síntesis de proteínas. Gracias a esta hipótesis se descubrió una vinculación directa del  $17\beta$ -estradiol al receptor acoplado a la proteína G (GPR30) en células transfectadas con GPR30 y en líneas celulares de cáncer de mama. (Revankar et al., 2005). Este receptor fue entonces renombrado a “receptor de estrógeno 1 acoplado a la proteína G” (GPER1) en 2007 (Guzmán Y Valle et al., 2019).

Entre las acciones no genómicas de los estrógenos se encuentra la activación de mecanismos de transducción de señales, con esto se producen segundos mensajeros intracelulares, la regulación del Adenosín Monofosfato Cíclico (AMPC) y la activación de cascadas de señalización de proteínas quinasas que dan lugar a cambios indirectos en la expresión génica. Dichas proteínas quinasas logran afectar la función y la capacidad de vincularse a secuencias genómicas de los factores de transcripción a través de la fosforilación, esto logra alterar la expresión de los genes. De igual manera, tanto el ER $\alpha$  como el ER $\beta$  son objetivos de fosforilación, lo cual indica que las acciones no genómicas de los estrógenos también pueden implicar la autorregulación de la expresión del receptor (Fuentes & Silveyra, 2019; Márquez, 2002; Scaglia, 2009). En la Figura 2 se muestra un esquema completo de las diferentes vías de señalización de estrógenos, incluyendo los elementos influyentes en el proceso.

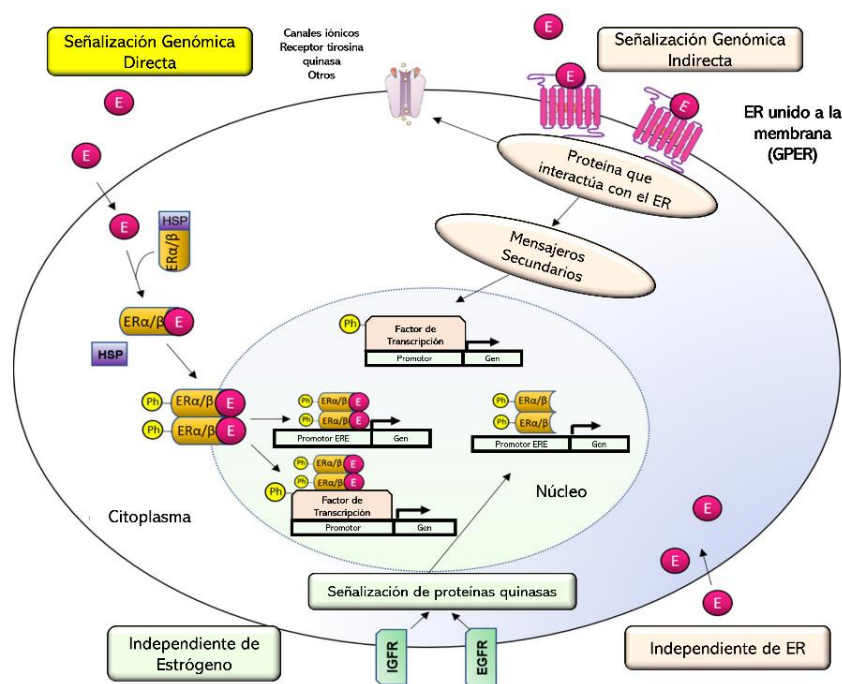


Figura 2. Vías de señalización de estrógenos genómicas y no genómicas. Imagen adaptada al español desde Silveyra 2019.

### 5.1.2.1.2 Ligandos endógenos y exógenos

Además de los estrógenos que son producidos por el organismo, existe una diversidad muy amplia de moléculas orgánicas e inorgánicas que reconocen los dominios de unión de los receptores de estrógenos. Se consideran cinco clases principales de ligandos del ER: endoestrógenos (producidos a partir del colesterol en las gónadas y otros órganos),

fitoestrógenos (compuestos no esteroideos producidos por plantas), xenoestrógenos (medicamentos, aditivos alimentarios, cosméticos corporales, plaguicidas ambientales y productos químicos para ensayos industriales), moduladores selectivos del receptor de estrógeno (SERM, por sus siglas en inglés) (compuestos sintéticos que presentan dualidad funcional, pueden actuar tanto como agonistas, como antagonistas de los ERs) y metaloestrógenos (compuestos inorgánicos en forma de iones de metales pesados que presentan actividad estrogénica) (Fuentes & Silveyra, 2019).

#### **5.1.2.1.3 Ambioima**

Se considera que el hombre está condenado a diversos padecimientos acorde a la predisposición genética. Aunque en realidad las enfermedades se presentan como una consecuencia de una relación correlativa entre la dotación genética específica y la serie de experiencias percibidas por el individuo. Incluso naciendo con genes mutados o alelos que predisponen a enfermedades, puede que no sea suficiente para que se expresen a menos que esos genes interactúen entre ellos y otros genes en repetidas ocasiones y a su vez sean afectados por el medio ambiente. El conjunto de elementos no genéticos, el genoma y el proteoma conforman el concepto de ambioima. Entre los elementos no genéticos, cambiantes, podemos encontrar a los disruptores endocrinos (Arias et al., 2020).

### **5.2 Disruptores endocrinos**

Los disruptores endocrinos son parte de la cotidianidad en la que nos desenvolvemos. Varios de estos químicos suelen afectar al sistema endocrino y entorpecen en gran medida los procesos de desarrollo del ser humano y la calidad de vida de organismos a nuestro alrededor.

El término disruptor endocrino se define como un conjunto variado y heterogéneo de complejos químicos los cuales tienen la capacidad de desequilibrar el sistema hormonal y afectar de manera negativa la salud de un espécimen o de su progenie (Pombo M, 2014). De acuerdo con la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, un disruptor endocrino se describe como “un agente que interfiere con la síntesis, secreción, transporte, unión o eliminación de hormonas naturales presentes en el organismo que son responsables del mantenimiento de la homeostasis, la reproducción, el desarrollo y/o el comportamiento” (Kabir et al., 2015).

### 5.2.1 Historia de los Disruptores Endocrinos

En 1962 se publicó el libro “Primavera Silenciosa”, en el cual se mencionó por primera vez que existe una gran diversidad de productos químicos artificiales los cuales han sido esparcidos globalmente y el cómo esta situación había logrado afectar a la fauna silvestre. Posteriormente, en 1996, Theo Colborn et al. publicaron “Nuestro futuro robado” en el que recopilaron evidencia sobre estudios de campo, experimentos y estadísticas humanas para lograr introducir formalmente el tema en la ciencia y considerarlo un nuevo peligro (Rachel Carson, 1962; Theo Colborn, 1996).

En 1938, la síntesis de un compuesto con función similar a la del estrógeno en el organismo, el dietilestilbestrol (DES) fue anunciada por Eduard Charles Dodds, un médico y científico británico. Esto desencadenó una serie de acciones por parte de la población las cuales resultaron contradictorias. Por ejemplo, se empezó a utilizar en las mujeres embarazadas para obtener bebés más grandes y fuertes, en mujeres para aliviar síntomas menopáusicos, en tratamientos para el acné, la gonorrea infantil, para el cáncer de próstata, e incluso en el ganado como aditivo, entre muchas otras aplicaciones (Arias et al., 2020).

El problema surgió hasta 1962, cuando se fabricó la talidomida. Este compuesto farmacéutico provocó nacimientos con deformaciones en cerca de 8,000 niños de 46 países. Con este problema se estudiaron casos en mujeres embarazadas en los cuales se consumía talidomida, llegando a la conclusión de que una pequeña dosis de un medicamento u hormona puede ser inofensivo en el desarrollo de un embrión, así como muy nocivo para este mismo al ser consumido unas semanas antes. Ciertas mujeres que habían consumido talidomida entre la quinta y la octava semana de embarazo, en la presentación de píldoras para dormir, tuvieron bebés con malformaciones en brazos y piernas. Debido a que estas semanas son críticas para el desarrollo del feto, las extremidades se ven afectadas al ingerir productos que funcionen como hormonas (Swan SH, 2000).

Además de los casos de talidomida, también se descubrió que el DES puede provocar otros tipos de problemas, reafirmando que el momento de exposición es más importante que la dosis. Las mujeres cuyas madres fueron expuestas al DES semanas previas a la décima de su embarazo, resultaron más propensas a desarrollar cánceres cervicales o vaginales. Además de actuar sobre el tracto reproductor, se ha reportado que el DES también afecta al cerebro, las glándulas mamarias, la glándula pituitaria y al sistema inmunitario (Arias et al., 2020).

### 5.2.2 Tipos de DEs

Los disruptores endocrinos se pueden clasificar de la siguiente manera (Arias et al., 2020; Scaglia, 2009):

- a) Compuestos industriales: Bifenilos policlorinados (PCBs), dioxinas.
- b) Pesticidas organoclorados: Clorpiritos, metoxicloro, 2,2-bis-(p-clorofenil)-1,1,1-tricloroetano (DDT) y sus metabolitos.
- c) Fungicidas: Vinclozolina.
- d) Plásticos y plastificantes: Bisfenol-A (BPA) y ftalatos.
- e) Productos farmacéuticos: Dietilestilbestrol (DES) y paracetamol.
- f) Metales: Cadmio, plomo, mercurio, uranio y un metaloide, el arsénico.
- g) Fitoestrógenos (Compuestos naturales que se pueden comportar como DEs): Soja, alfalfa y trébol.
- h) Hidrocarburos aromáticos: Relacionados con el fenantreno.

### 5.2.3 REACH

*Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals* (REACH) es una de las pocas normativas relacionadas a los DEs conocidas a escala global. Esta fue generada por la Unión Europea (UE) con el fin de regularizar el mercado de productos químicos en relación con la salud.

Esta regularización se aplica a diversos químicos, desde los utilizados en los procesos industriales, hasta los que se presentan en la vida cotidiana como en los productos de higiene, pinturas, artículos para vestir, muebles, entre otros. Por ende, se infiere que este reglamento afecta a la mayoría de las empresas en la UE. Para su correcto cumplimiento, las empresas se ven obligadas a identificar y gestionar los posibles riesgos que provocan las sustancias que fabrican y comercializan dentro de la Unión Europea. Es necesario probar a la Agencia Europea de productos químicos (ECHA, por sus siglas en inglés) la manera en la que la sustancia se puede utilizar de forma segura y comunicar las formas de gestionar los riesgos a los consumidores. De no poder gestionarse, las autoridades están autorizadas para restringir el uso de dichas sustancias de diferentes formas (Williams et al., 2009).

## 5.2.4 Comparación hormonas vs DEs

Tabla 1. Comparación de las hormonas y los disruptores hormonales (Arias et al., 2020).

| Hormonas   | Disruptores endocrinos  |
|--|---|
| Actúan a través de los receptores hormonales.  | Actúan a través de los receptores hormonales y de múltiples receptores.   |
| Algunas tienen múltiples receptores.<br>Clases y subtipos de receptores específicos de tejidos.<br>Las hormonas normalmente se unen de forma similar a todos los subtipos de receptores. | Causarán una función anormal de los receptores.<br>Probables interacciones isoforma-específicas.  |
| Activas a dosis bajas.   | Algunos actúan a dosis bajas, otros variables.  |
| Los niveles en sangre no siempre reflejan la actividad.<br>Pueden unirse a las proteínas séricas con un pequeño porcentaje libre.<br>No hay bioacumulación.                              | Los niveles en sangre no siempre reflejan la actividad.<br>Pueden unirse a las proteínas séricas.<br>Los efectos en los niveles de sangre humana pueden no reflejarse en la acción hormonal.<br>Posible bioacumulación. |
| Relaciones no lineales de dosis-respuesta.   | Relaciones no lineales de dosis-respuesta.  |
| Siempre saturable con un rango dinámico variable.<br>Pueden mostrar relaciones dosis-respuesta no monótonas.<br>Los efectos de dosis altas no son iguales a los de dosis bajas.          | Siempre saturable con un rango dinámico variable.<br>Pueden mostrar relaciones dosis-respuesta no monótonas.<br>Los efectos de dosis altas no son iguales a los de dosis bajas.   |
| Efectos específicos de los tejidos y de la etapa de la vida.   | Efectos específicos de los tejidos y de la etapa de la vida.  |
| Efectos de desarrollo permanentes.<br>Programas cerebro y sistema endocrino para la función adulta.  | Efectos de desarrollo permanentes.<br>Interfiere con los procesos de programación.  |
| Diferentes objetivos finales varían en sensibilidad.   | Diferentes objetivos finales varían en sensibilidad.  |

### **5.2.5 Mecanismos de disrupción**

Las hormonas que son sintetizadas dentro de un organismo (estrógenos, progesterona, testosterona y tiroxina), conllevan acciones biológicas, las cuales se encuentran reguladas por proteínas receptoras de alta afinidad ubicadas en el interior de las células diana. La interacción entre cada hormona y su receptor desencadena una cascada de procesos que producen diversos efectos asociados a cada hormona exclusivamente.

El desequilibrio hormonal provocado por los DEs se puede clasificar por su capacidad de actuar a diferentes niveles. Entre sus mecanismos tenemos:

- a) La mimetización o antagonización de las acciones hormonales para confundir a los receptores celulares a distintos niveles: a nivel periférico modificando la biosíntesis, el transporte o el metabolismo de los esteroides induciendo enzimas de la familia CYP2B y CYP3A; y a nivel de los órganos blanco activando o inhibiendo los receptores, afectando la actividad transcripcional de los mismos, inhibiendo la actividad histona de acetilasa, estimulando la quinasa mitogénica o afectando a lo ancho del genoma el estado de metilación del ADN.
- b) Alteración del patrón de síntesis, transporte y metabolismo hormonal.
- c) Modulación de los niveles de los receptores hormonales correspondientes.

Existen impostores químicos tales como el DDT y el DES, los cuales logran unirse al receptor de estrógenos, ya que imitan los efectos biológicos del estrógeno. Actualmente se conocen alrededor de 20 sustancias presentes en vegetales con esta misma capacidad de imitación.

Aunque se conocen los mecanismos de funcionamiento de los DEs en los sistemas biológicos, no es posible asegurar cuál de ellos está relacionado con una determinada enfermedad (Rivas A et al., 2004; Scaglia, 2009).

### **5.2.6 17 $\beta$ -Estradiol**

Entre los disruptores endocrinos naturales el 17 $\beta$ -Estradiol (E2) es el más potente y tóxico. Se ha determinado que este químico presenta su mayor actividad de alteración endocrina a niveles de ng/L (Gao et al., 2013).

Una de las características de este DE es que el E2 secretado por los animales puede permanecer en sus cuerpos y acumularse en la cadena alimentaria, esto implica que probablemente el

humano se encuentra expuesto a niveles altos de este disruptor. Cuando la concentración del E2 sobrepasa un determinado umbral acaba rompiendo el equilibrio del organismo. Se ha informado que esto aumenta el riesgo de desarrollar cáncer de próstata en hombres y cáncer de mama en las mujeres, lo que provoca la proliferación de células tumorales tras unirse a células receptoras. Además, el E2 es transportado a través de la circulación del agua y contamina el medio acuático, lo cual afecta directamente en el crecimiento regular de organismos acuáticos. La existencia en el medio ambiente del E2 deriva principalmente de las excretas de los humanos y los animales, además de las emisiones del sector ganadero, residuos industriales y los residuos hospitalarios. Se conoce que el E2 tiene potencial de persistir en el medio ambiente debido a su descubrimiento en muestras de lodos y sedimentos (Pu et al., 2019).

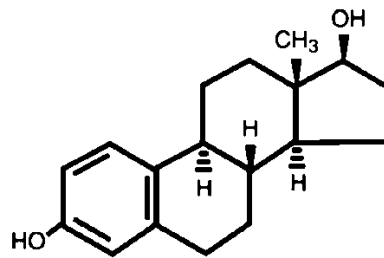


Figura 3. Estructura química del 17β- Estradiol (Fuentes & Silveyra, 2019).

### 5.2.7 Bisfenol A (BPA)

El BPA se caracteriza por ser un agente químico de gran prevalencia entre los artículos de comercialización actuales. Lo podemos encontrar desde en artículos de cuidado personal como pasta dental, cremas; en productos industriales como tuberías, biberones y recipientes plásticos. Al ser expuesto a altas temperaturas, el BPA es capaz de emigrar del policarbonato y gracias a esto se sabe que los alimentos almacenados en recipientes de plástico son propensos a contaminarse (Cao & Corriveau, 2008).

Se estima que los bebés podrían ser los más afectados, ya que la madre traspasa, a través del cordón umbilical y de la leche, el BPA que ha sido acumulado en su cuerpo. Se considera que, aunque los niveles de BPA se encuentren bajos son capaces de afectar al sistema endocrino. Las funciones disruptoras de este químico son más que solo la capacidad de mimetizar, amplificar o inhibir la actividad de los estrógenos endógenos. Diversos estudios han probado que se encuentra una relación entre los niveles de BPA y la prevalencia de ciertos padecimientos en el desarrollo del cerebro, los sistemas reproductivos, procesos metabólicos, la línea germinal masculina y la fertilidad femenina. También se ha asociado con la obesidad,

la permeabilidad intestinal y el rendimiento de la memoria y el aprendizaje (Arias et al., 2020; Mhaouty-Kodja et al., 2018; Wetherill et al., 2007).

Los mecanismos de acción del BPA son los siguientes (Polyzos et al., 2012):

- a) Incremento de la insulina y la leptina.
- b) Incremento de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ .
- c) Disminución de la adiponectina.
- d) Interfiere la inducción de tolerancia a la glucosa.
- e) Aumento de la adipogénesis.
- f) Acumulación de lípidos en adipocitos y hepatocitos.
- g) Aumento del estrés oxidativo.
- h) Disminución de la capacidad antioxidante.

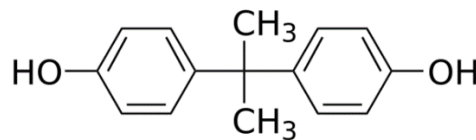


Figura 4. Estructura química del Bisfenol A (BPA) (Andrés Sarria-Villa et al., 2019).

### 5.2.8 Triclosán

El triclosán (5-cloro-[2,4-diclorofenoxi] fenol, TCS) es un agente antibacteriano sintético, soluble en lípidos y de amplio espectro que se añade comúnmente a una variedad de productos industriales y de cuidado personal, como jabón de manos, champú, pasta de dientes y productos textiles. Gracias al uso variado que se le ha dado durante los últimos 40 años, el TCS se cataloga como una nueva fuente de contaminantes antropogénicos prevalentes en el medio acuático en todo el mundo.

El TCS es catalogado como hidrofóbico, se ha demostrado que su potencial de acumulación es muy bajo. Se excreta rápidamente como metabolitos conjugados en la orina. Este compuesto se ha detectado en diversas muestras humanas, sobre todo en la orina, sangre y leche materna, de todos los grupos de edad y raza.

La estructura del triclosán es muy similar a la de los estrógenos antropogénicos, así como a la de los disruptores estrogénicos y androgénicos como los bifenilos policlorados (PCB), el bisfenol A (BPA) y las dioxinas, esto gracias a sus dos grupos funcionales fenólicos que le

proporcionan la capacidad de actuar como agente de alteración endocrina. En especial en el sistema endocrino reproductivo, tanto de humanos como en seres acuáticos y mamíferos. Aunque aún no se conoce con certeza el mecanismo de disrupción de este agente, se han propuesto diferentes modos de acción, como la alteración de las hormonas, el desplazamiento de las hormonas de los receptores hormonales y la alteración de la actividad de las enzimas esteroidogénicas (Wang & Tian, 2015).

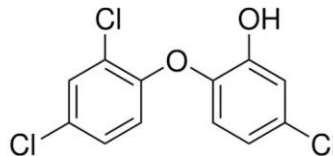


Figura 5. Estructura química del triclosán (TCS) (Benítez-Villalba et al., 2019).

### 5.2.9 Exposición humana a DEs

Los seres vivos nos encontramos en exposición universal a los DEs gracias a un empleo generalizado de manera global. Los DEs no persistentes desaparecen fácilmente después de actuar durante plazos cortos, en momentos críticos del desarrollo. También tenemos los DEs persistentes, los cuales van acumulándose en el organismo y llegan a hacer efecto aun cuando la exposición no haya ocurrido en un momento crítico. Estos se caracterizan por su baja biodegradabilidad, la facilidad de transporte por medio del aire y agua, y la bioacumulación en la cadena trófica. Existe también la transmisión de compuestos acumulados en la grasa de la madre hacia el hijo durante la gestación y posteriormente por la lactancia (Arias et al., 2020).

#### 5.2.9.1 Fuentes de exposición

La principal ruta de exposición es a través del consumo de alimentos y agua potable. Algunos ejemplos de productos que contienen DEs son carne, productos lácteos grasos, frutas y verduras (Arias et al., 2020). Es posible encontrar DEs en todos los componentes del medio ambiente, en el agua, el suelo, el aire y los sedimentos. Los productos químicos poseen una alta vida media, gracias a esto logran persistir en el medio ambiente durante varios años (Genco M et al., 2020). De manera similar, la exposición también puede ocurrir por el uso de productos industrializados como artículos de cuidado personal y doméstico. Los DEs también se encuentran en el revestimiento de las latas de conserva; en el plástico con el que están fabricados los biberones; en el espermicida que llevan incorporados los preservativos; en el

producto que se usa como sellador blanco de los dientes; en algunos materiales de uso sanitario; detergentes industriales; filtros solares; cosméticos y pesticidas (Polyzos et al., 2012).

### **5.2.9.2 Efectos**

Existen muchas revisiones donde se pone en evidencia la vinculación entre muchos diversos tipos de patologías ocasionadas por la acción de los disruptores endocrinos, así como de los efectos que estos han provocado en la salud de la fauna en animales de laboratorio. Hace falta establecer un mecanismo concreto para analizar los cambios correspondientes tanto en el organismo como en dichas patologías, conforme el paso del tiempo. En la Tabla 2 podemos observar diversos disruptores y sus efectos asociados acorde al sistema en el que influyen.

Dentro de los padecimientos posibles que se han estudiado, se encuentran los siguientes(Arias et al., 2020):

- a) Deterioro de la salud reproductiva humana:
  - Alteraciones en el desarrollo del aparato genitourinario.
  - Alteraciones de fertilidad femenina y masculina.
  - Alteraciones del desarrollo sexual y enfermedades hormono-dependientes como la endometriosis y ovario poliquístico.
  - Aumento de incidencia de tumores en órganos sexuales.
- b) Incremento en frecuencia de abortos, bajo peso en bebés y malformaciones congénitas.
- c) Afectaciones en el desarrollo del sistema nervioso central.
- d) Alteración en niveles de hormonas tiroideas.
- e) Incremento de trastornos inmunitarios.
- f) Efecto sobre la relación de sexos con respecto a la natalidad.
- g) Aumento en prevalencia de obesidad y de diabetes tipo 2.

Tabla 2. Algunos efectos reconocidos o sospechados de potenciales DEs (Arias et al., 2020).

| Efectos Adversos              |  |   |  |                                   |   |
|-------------------------------|--|---|--|-----------------------------------|---|
| Compuestos                    | Trastornos metabólicos                         | Neurodesarrollo, función tiroidea   | Reproducción                                       | Efectos Cardiovasculares          | Cáncer y otros                              |
| <b>Pesticidas</b>             |  |   |  |                                   |   |
| DDT*                          |  | Homeostasis de la tiroides  | Función menstrual<br>Pérdida fetal temprana        |                                   | Cáncer de mama,<br>impactos ambientales     |
| Organofosforados y pesticidas |  | Cambios en el desarrollo neurológico, en el espesor de la corteza, disminución del CI |  |                                   |   |
| Triclosán                     | Aumento del IMC y de la circunferencia craneal | Cambio del comportamiento neurológico   |  |                                   | (impactos ambientales)                      |
| <b>Medicamentos</b>           |  |   |  |                                   |   |
| Paracetamol                   |  |   | Criptorquidia, alteración de la función testicular |                                   |   |
| DES* (embarazo)               |  |   | Malformación uterina<br>Hispopadías                |                                   | Cáncer vaginal,<br>Cáncer de mama           |
| <b>Otros químicos</b>         |  |   |  |                                   |   |
| Bisfenol A                    | Crecimiento y sobrepeso                        | Trastornos de ansiedad e hiperactividad<br>Rendimiento de la memoria                  | Proceso reproductivo                               | Efectos sobre la función cardíaca | Suceptibilidad al cáncer de mama y próstata |

### 5.2.9.3 Medidas de prevención

#### 5.2.9.3.1 Sensibilización pública

La cantidad de problemas de salud ocasionados por los disruptores endocrinos es inmensa, ya que estos pueden llegar a afectar a la mayoría de los órganos del cuerpo humano. De acuerdo con Kabir, et al. (2015), se debería de centrar la atención en algunas áreas específicas provocadas por estos químicos, por ejemplo, en:

- a) El incremento en los padecimientos relacionados al sistema endocrino.
- b) El aumento de los cánceres relacionados con el sistema endocrino a escala global.
- c) Aumento en la tasa de obesidad y diabetes tipo 2.
- d) El riesgo que se ve aumentado en trabajadores ocupacionales gracias al uso de pesticidas como el PCB y arsénico.
- e) El tratamiento de aguas residuales ya que los disruptores endocrinos son compuestos estables de bajo grado de biodegradabilidad.
- f) El registro de datos epidemiológicos para analizar el efecto de los disruptores en la salud y en la prevalencia de padecimientos.
- g) La toxicidad provocada por disruptores con alto grado de lipofilia, las cuales ingresan con facilidad en el torrente sanguíneo.

- h) La vinculación competitiva de la medicación con el receptor responsable de su actuación para el tratamiento de la toxicidad.
- i) Abordar aspectos relacionados con las causas ambientales que se vinculan con las tendencias de las enfermedades endocrinas.
- j) La concienciación de la población correspondiente a los efectos nocivos de los DEs por medio de estrategias donde se incluyan diversos tipos de medios de comunicación.
- k) Establecer reglamentaciones que permitan minimizar la existencia de DEs en bienes de consumo y que se indique la presencia de estos en las etiquetas.

### **5.2.9.3.2 Recomendaciones**

Se puede considerar tomar acción para reducir el ingreso de disruptores endocrinos a nuestro organismo, si bien probablemente es imposible evitarlo en su totalidad, aun así, es posible restringir el nivel por medio de la toma de conciencia y siguiendo las siguientes recomendaciones:

- a) Priorizar los productos ecológicos cuando hablamos de frutas y verduras, ya que estas son las más contaminadas. Consumirlas frescas en lugar de congeladas y anterior a esto lavarlas de manera exhaustiva y pelarlas.
- b) Preferir materiales inertes como el vidrio.
- c) Utilizar fibras naturales.
- d) No consumir alimentos enlatados, ni precocinados.
- e) Leer con atención las etiquetas en los cosméticos y productos de limpieza.
- f) Evitar calentar alimentos en recipientes fabricados con BPA.
- g) Restringir el consumo de pescado azul de gran tamaño.
- h) Preferir las carnes sin hormonas, pesticidas y fertilizantes.
- i) Lavar nuestras manos con frecuencia.
- j) Evitar adherentes en utensilios de cocina.
- k) Evitar usar insecticida en casa y alrededores.
- l) Asegurar que nuestros productos de higiene no contengan parabenos y restringir el uso de toallas higiénicas.

## 5.3 Principios de técnicas experimentales

### 5.3.1 Clonación de ADN

La clonación de ADN es un método en el que las moléculas individuales de ADN se logran copiar de manera exacta para producir numerosas moléculas idénticas o clones. Es posible aislar de una mezcla a la molécula de ADN que contiene la secuencia de interés para propagarla en una célula huésped adecuada (Miles & Wolf, 1989). Actualmente la clonación de ADN es una de las metodologías básicas más empleadas en las diversas disciplinas relacionadas con las ciencias de la vida. Desde hace décadas se conocen diversos enfoques para la manipulación del ADN como la clonación y la mutagénesis, por ejemplo.

El sistema básico de la clonación es conformado por cuatro pasos (Foundations of Molecular Cloning - Past, Present and Future | NEB, 2013):

#### a) Aislamiento de insertos

El aislamiento de insertos se produce a través de la digestión de un fragmento de ADN, donde enzimas de restricción cortan selectivamente el ADN en el centro de un tramo específico de cuatro, seis u ocho pares de bases; estas enzimas son propensas a cortar el sustrato de ADN cerca de secuencias de “reconocimiento”, a menudo palindrómicas. Los tamaños y la cantidad de fragmentos de ADN dependen de la frecuencia en la que se presentan los sitios de restricción específicos, así como de las enzimas de restricción utilizadas y del tiempo de tratamiento enzimático (Schamhart & Westerhof, 1998).

#### b) Ligación de los insertos en el vector de clonación, creando moléculas recombinantes.

Después de haber aislado con éxito el fragmento de ADN, este se liga a un plásmido vectorial. El gen amplificado a clonar se incuba con el vector. Los ácidos nucleicos de las secciones sobresalientes, producto de los cortes con enzimas de restricción, se emparejan entre sí y cierran los espacios entre ácidos nucleicos utilizando una enzima ligasa (Lessard, 2013).

#### c) Transformación de los plásmidos en bacterias u otro huésped para su propagación.

Posterior a la preparación del vector de ADN, este se propaga en bacterias a partir de la transformación. Las bacterias para la inducción del vector se preparan previamente por medio de un tratamiento con cloruro de calcio, se cultivan, y se seleccionan (Lessard, 2013). En este

proceso las bacterias, denominadas células competentes, toman material genético extraño del entorno. Si el material genético exógeno es similar al ADN bacteriano este se logra integrar en el cromosoma, en ocasiones dicho material genético logra coexistir como un plásmido con el ADN cromosómico (Bacterial Transformation, 2022).

d) Selección de huéspedes que contengan el plásmido deseado.

Para realizar la selección de células huésped se utiliza la resistencia a antibiótico del vector de ADN, esta propiedad sirve para ubicar las células que han sido transfectadas con éxito; si las bacterias se cultivan en presencia de antibiótico, solo lograrán sobrevivir las que contengan plásmidos. El inserto a clonar se hereda por todas las células progenitoras de la bacteria durante el cultivo y finalmente se forma una pequeña colonia en una placa de cultivo (Alberts et al., 2002).

El enfoque tradicional para la clonación es denominado “clonación dependiente de la ligación” (LDC, por sus siglas en inglés); incluye una digestión del vector y del inserto de ADN por enzimas de restricción y su posterior ligación. Recientemente se han desarrollado nuevas metodologías para la clonación de ADN basadas en los principios de la clonación independiente de la ligadura (LIC, por sus siglas en inglés). Este tipo de clonación se basa en la recombinación entre el inserto y el vector de destino (Erijman et al., 2011); incluye el sistema *Gateway* (Invitrogen, Carlsbad, CA), el cual es un método universal para la clonación de ADN que permite la transferencia de fragmentos de ADN entre diferentes vectores de clonación manteniendo el marco de lectura (Gateway® Cloning, 1994).

### **5.3.2 Expresión ADN**

La expresión de proteínas consiste en varias etapas: la transcripción, el empalme del ARNm, la traducción y modificación postraducciona de las proteínas; este proceso puede ser regulado en cualquiera de sus etapas. Este mecanismo es la base de diversos procesos fisiológicos y patológicos, como las adaptaciones celulares, la homeostasis y la recuperación de daños dentro de la célula (Volgin, 2014).

La transcripción es un proceso en el cual el ADN es utilizado como molde para ser transformado en una molécula de ARN. Primeramente, la enzima ARN polimerasa lee la cadena molde del ADN y sintetiza una molécula de ARN con bases complementarias a esta.

Las ARN polimerasas dependen de los factores de transcripción del ADN, los cuales se unen a promotores (secuencias específicas del ADN) para reconocer donde comienzan los genes.

Posteriormente viene la traducción, en este paso se utiliza el ARN formado para fabricar la proteína. Este proceso requiere de tres componentes principales: ARN mensajero (ARNm), el cual es transcrito a partir de genes codificadores de proteínas; los ribosomas, definido como grandes conjuntos de moléculas de ARN ribosómico (ARNr) y proteínas; y moléculas de ARN de transferencia (ARNt) el cual se encuentra unido a su aminoácido correspondiente.

El ribosoma comienza la traducción en el codón AUG (metionina), después se desplaza a lo largo del ARNm de tres en tres bases, en dirección 5' a 3'; llegan nuevos ARNt con anticodones complementarios a los codones del ARNm con sus aminoácidos correspondientes. De esta manera se fabrica un enlace peptídico para unir el aminoácido al extremo carboxilo de la cadena polipeptídica en desarrollo. Los extremos de la cadena mencionada se denominan N-terminal (grupo amino libre) y C-terminal (grupo carboxilo libre); únicamente se agregan aminoácidos al extremo del carboxilo libre (Gene expression: DNA to protein | Biological Principles, 2018).

Las modificaciones postraduccionales (MPT, por sus siglas en inglés) de las proteínas consisten en modificaciones químicas que regulan la actividad, la localización y la interacción del proteoma con otras moléculas celulares; tales como las proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y cofactores. Las MPT pueden producirse en cualquier etapa del ciclo vital de una proteína; también pueden ser reversibles. Existe gran variedad de modificaciones postraduccionales de proteínas, entre las más comunes tenemos: fosforilación, glicosilación, ubiquitinación, S-nitrosilación, metilación, N-acetilación, lipidación y proteólisis (Translational Modification, 2006).

### **5.3.2.1 Sistema de expresión de proteínas**

El sistema de expresión bacteriana consiste en un vector de expresión, el gen de interés y las células *Escherichia coli*. Además de este sistema existen otras opciones como el sistema de expresión de la levadura; el sistema de expresión de insectos; el sistema de expresión sin células; y los sistemas de expresión de los mamíferos (Rosano & Ceccarelli, 2014).

### 5.3.3 Clonación y expresión de ADN en vector pET

Entre los sistemas para clonación y expresión de proteínas recombinantes el sistema pET es uno de los más populares hasta el momento. Los genes objetivo se clonan en plásmidos pET bajo fuertes señales de transcripción y traducción del bacteriófago T7. La expresión se induce al proporcionar una fuente de ARN polimerasa T7 en la célula huésped, esta es tan selectiva y activa que, al inducirse en su totalidad, la mayoría de los recursos de la célula se convierten en expresión del gen objetivo; después de unas horas de la inducción el producto deseado puede conformar más del 50% de la proteína total.

El sistema pET presenta como ventaja la función de mantener los genes objetivo en transcripción silenciosa al estar en un estado no inducido. Estos genes son clonados utilizando células huésped que no contienen el gen de la ARN polimerasa T7, de esta manera se elimina la inestabilidad provocada por la producción de proteínas potencialmente tóxicas para la célula huésped. Posterior al establecimiento del gen objetivo en la célula huésped con una copia cromosómica del gen de la ARN polimerasa T7 bajo el control de lacUV5, la expresión de este operón se induce mediante la adición de isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) al cultivo bacteriano (pET System Manual, 2003).

#### 5.3.3.1 Vector de expresión pET 28a (+)

Entre las características del vector de expresión bacteriana pET28a (+) se incluyen: la presencia del promotor T7, el operador lac y la adición de una etiqueta 6xHis en el extremo N-terminal; cuenta con sitio de corte de trombina, etiqueta epitópica T7 interna y etiqueta His C-terminal; es resistente a la kanamicina; y presenta un sitio de clonación múltiple con sitios de reconocimiento para diversas enzimas de restricción. Además de ser fácilmente inducible por medio de la adición de IPTG. Su tamaño es de 5369 pares de bases, posee nivel alto de expresión bacteriana, transcripción *in vitro*, sitio de clonación múltiple y etiqueta para marcadores de proteínas de fusión (DNASU Plasmid | Detailed Vector Information: pET28a, 1999).

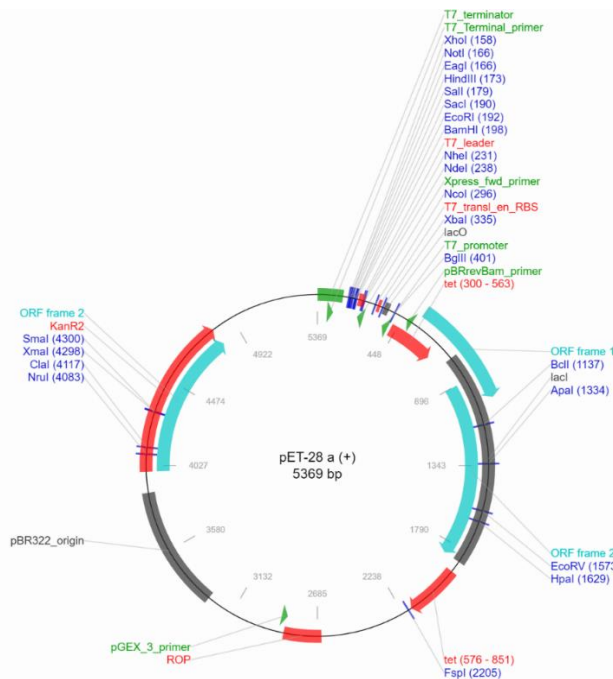


Figura 6. Mapa circular del vector de expresión pET 28(+) con etiquetas de sus componentes. (Addgene - Analyze Sequence).

### 5.3.4 Sistema de expresión de *Escherichia coli*

Uno de los huéspedes más populares para la producción de proteínas recombinantes es sin duda *Escherichia coli* (*E. coli*). Sus vectores son capaces de contener grandes inserciones de ADN, suficientes para abarcar la mayoría de los genes eucariotas (Muyers et al., 2001). Su popularidad se debe a que ofrece un alto nivel de expresión, además de ser rápido, barato y los métodos para su bioproducción son bastante sencillos. Las proteínas expresadas con frecuencia son purificadas de *E. coli* incluyendo múltiples pasos de cromatografía para lograr una pureza apropiada (Kathleen M, 2022).

La expresión en este huésped implica los siguientes pasos: el uso de células *E. coli* competentes que logren captar la secuencia de ADN de interés; la integración de dicha secuencia en el genoma bacteriano o bien la circularización de la secuencia de ADN para desarrollar el plásmido; elección de la *E. coli* transformada mediante el uso de antibiótico; su reproducción en escala en medios de cultivo; su aislamiento y la purificación de las proteínas intercelulares y secretadas.

Entre las desventajas que podría presentar el uso de *E. coli* como sistema huésped tenemos que: algunas proteínas pueden no estar correctamente plegadas, que no son posibles las

modificaciones postraduccionales eucariotas y que las proteínas rara vez son secretadas (Protein Expression Systems, 2022).

### **5.3.5 Sistema promotor T7**

Al elegir el vector de expresión adecuado, es posible considerar el sistema promotor T7 para la producción de proteínas en *E. coli*; caracterizado por ser el más común para la expresión de proteínas recombinantes. En este sistema el gen de interés es clonado detrás de un promotor el cual es reconocido por el fago T7 RNA polimerasa (T7 RNAP). Dicha polimerasa generalmente es colocada en el genoma bacteriano en un profago ( $\lambda$ DE3), el cual codifica para la T7 RNAP bajo el control transcripcional de un promotor lacUV5; de esta manera es posible inducir el sistema por IPTG. Una ventaja de este sistema es su capacidad para evitar la expresión basal, gracias a que presenta tres mecanismos para ello: la represión del gen T7 RNAP inducible por lacIQ, la inhibición del T7 RNAP por la lisozima T7 y la presencia de un operón lacO después del promotor (Rosano & Ceccarelli, 2014).

### **5.3.6 BL21 (DE3)**

La cepa BL21(DE3) y sus derivadas son las más utilizadas para la expresión de proteínas. Las células BL21(DE3) son específicas para la expresión de T7; el promotor lacUV5 impulsa la expresión de la ARN polimerasa T7, por lo que se utiliza para expresar proteínas recombinantes tras la inducción de IPTG (Rosano & Ceccarelli, 2014). Además, presenta la ventaja de carecer de proteasas, lo que evita la degradación de la proteína objetivo. Normalmente se utiliza en combinación con el sistema T7-pET (Hausjell et al., 2018).

### **5.3.7 Cromatografía de afinidad a níquel**

La cromatografía de afinidad a níquel separa las proteínas en función de una interacción específica entre las proteínas recombinantes etiquetadas con poli histidina (en cualquiera de sus extremos) y los iones de níquel inmovilizados en una matriz de cromatografía. Las proteínas recombinantes con etiqueta 6xHis se caracterizan por tener una alta afinidad por el níquel, mientras que la mayoría de las demás proteínas presentan poca o nula afinidad. En este tipo de cromatografía la reacción níquel-histidina no depende de la estructura secundaria, lo cual permite purificar proteínas desnaturalizadas (Kathleen M, 2022; Nickel Columns and Nickel Resin | Bio-Rad, 1999).

A través de este método, dichas proteínas marcadas con 6xHis consiguen ser purificadas hasta una homogeneidad superior al 95%. Es posible eluir la proteína por desplazamiento competitivo con imidazol; la manera más efectiva es utilizando un gradiente de imidazol para la elución en lugar de una única concentración (Ford et al., 1991).

### **5.3.8 Precipitación con sulfato de amonio**

El sulfato de amonio es utilizado en el proceso de purificación de proteínas debido a su alto índice de solubilidad, el cual permite soluciones salinas de alta fuerza iónica. De esta manera, por medio de una fuerza iónica adecuada, la proteína será capaz de precipitarse casi en su totalidad. Utilizando este método es posible esperar una recuperación cercana al 100% si se utilizan soluciones de sulfato de amonio en el amortiguador adecuado (Wingfield, 2001). El principio de esta purificación se basa en que, al centrifugar la solución, los precipitados del sulfato a menudo flotan en la parte superior en lugar de granularse. Esto gracias a que dichos precipitados tienen una densidad más baja que los de proteínas. (Large Volume Precipitation of Proteins with Ammonium Sulfate Using Thermo Scientific Fiberlite Carbon Fiber Rotors, 2012).

### **5.3.9 Ultrafiltración**

Entre los procesos de separación de macromoléculas destaca la ultrafiltración por ser la más eficaz y flexible. Esta se caracteriza por ser un método suave y no desnaturizante; es un proceso convectivo en el cual se separan especies macromoleculares y disolventes en función del tamaño y forma molecular utilizando membranas semipermeables anisotrópicas. Se puede utilizar tanto para concentración macromolecular, como para la purificación o el intercambio de solventes (Lee et al., 2003).

Se consideran tres principales funciones del sistema de ultrafiltración (Lab Ultrafiltration and Purification Products, 2022):

- a) Concentración de solutos; donde las macromoléculas son retenidas por la membrana al ser más grandes que el tamaño nominal de los poros, al mismo tiempo las sales y los microsolutos se filtran junto con el disolvente.
- b) Fraccionamiento de solutos por tamaño; el soluto permeable conserva su concentración al ser filtrado mientras las macromoléculas retenidas la aumentan.

c) Desalinización o purificación de solutos; por medio de diafiltración, la cual purifica la solución de sales, solventes y especies de bajo peso molecular.

Entre sus aplicaciones más comunes tenemos la desalación de proteínas, enzimas, ADN, inmunoglobulinas, entre otros; preparación de muestras para HPLC; eliminación de aminoácidos y nucleótidos etiquetados, etc.

### **5.3.9.1 Membrana de celulosa regenerada**

Los tubos utilizados para ultrafiltración necesitan de membranas para la separación de los componentes, estas pueden ser de diversos materiales. En este trabajo se utilizan las membranas de celulosa regenerada.

En la mayoría de los casos, la regeneración de la celulosa es un proceso físico el cual no implica reacciones químicas. Sus propiedades dependen de los coagulantes, la temperatura, el tiempo y la vía. Una de las características de la membrana de celulosa regenerada es su hidrofilia, esta propiedad la hace adecuada para muestras en general. Se caracteriza por una adsorción de proteínas muy baja y una alta compatibilidad química; es adecuada para oligonucleótidos y péptidos (Fink et al., 2001; Laboratory Filtration Products, 2022).

### **5.3.10 Espectroscopia Uv-Vis – Proteínas**

El espectrofotómetro es un equipo de laboratorio muy utilizado. Contiene dos fuentes de luz: una lámpara de deuterio que emite luz en la región ultravioleta y una lámpara halógena de tungsteno para la región visible. También lo componen un fotomultiplicador o un fotodiodo cuya función es detectar la luz que pasa por filtros ópticos y posteriormente atraviesa la celda con la muestra. Es posible obtener espectros al cambiar la longitud de onda de la luz incidente de manera continua (Schmid, 2001).

Entre sus múltiples funciones, este equipo permite averiguar la concentración de proteínas o ácidos nucleicos en una solución mediante mediciones de absorción, utilizando la ley de Lambert-Beer. Dicha ley relaciona a la absorbancia ( $A$ ) con la intensidad de la luz antes ( $I_0$ ) y después ( $I$ ) de atravesar la solución.

$$A = \log_{10} \frac{I}{I_0} = \epsilon lc \quad (1)$$

(A) es la absorbancia obtenida a través del espectrofotómetro, épsilon ( $\epsilon$ ) representa el coeficiente de extinción, (l) equivale a la longitud de la trayectoria que recorre la luz en cm, y (c) es la concentración molar de la proteína (The Beer-Lambert Law, 2022).

Las cadenas aromáticas laterales de Tyr, Trp y Phe absorben la luz en la región 240 – 300 nm, la cual se denomina “UV cercano” o la región aromática. De la misma manera, el dinucleótido de nicotinamida-adenina reducido (NADH) y el dinucleótido de flavina-adenina reducido (FADH<sub>2</sub>) muestran espectros en el UV cercano (Schmid, 2001).

La ventaja de utilizar este método para cuantificar la concentración de una proteína en la solución es la rapidez con la que se puede llegar a un resultado. Simplemente se inserta la muestra en el espectrofotómetro y los resultados se obtienen en cuestión de segundos; también es posible deducir cierta información acerca de la calidad de la muestra a partir de la forma del espectro que se obtiene. En cuanto a las desventajas, son necesarias concentraciones de proteína relativamente altas para la cuantificación; así como que la proteína se encuentre en el estado más puro posible para evitar que algunos contaminantes que absorben en la región UV-cercano interfieran con la medición (Photometric Quantification of Proteins in Aqueous Solutions via UV-Vis Spectroscopy, 2019).

### 5.3.11 Fluorimetría

El proceso radiativo de fluorescencia se produce cuando un electrón pasa de un estado excitado, provocado por la absorción de un *quantum* de luz por parte de la molécula, a su estado básico S<sub>0</sub>; esta relajación tiene un tiempo de vida del orden 10<sup>-9</sup> s. El fenómeno es resultado de la pérdida de energía ocasionada durante los procesos de conversión interna donde se emiten fotones de menor energía que los absorbidos (Senesi & D’Orazio, 2005).

Los componentes básicos de un espectrofotómetro de fluorescencia son: una fuente de luz continua, comúnmente se utiliza una lámpara de descarga de xenón. La radiación atraviesa un monocromador previo a incidir en la muestra (preferentemente colocada en celda de cuarzo) para lograr una onda de excitación específica. La radiación emitida se monitorea a través de un detector que se encuentra en un ángulo de 90° con respecto a la emisión de luz para minimizar la distorsión de la señal provocada por la dispersión de luz. Generalmente es un tubo fotomultiplicador el que mide la luz emitida; y finalmente se analizan los datos en un

dispositivo de lectura como un microprocesador. Se suele examinar un pequeño intervalo de longitudes de onda emitidas y se controla la intensidad de la luz incidente para evitar la fotodescomposición de la muestra (An Introduction to Fluorescence Spectroscopy, 2000; Senesi & D’Orazio, 2005).

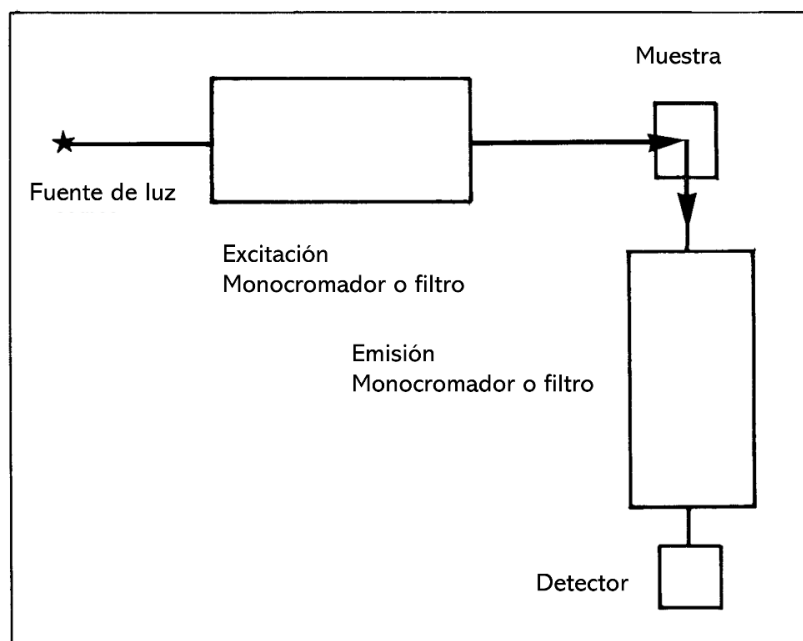
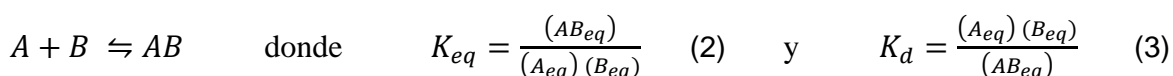


Figura 7. Componentes esenciales de un espectrómetro de fluorescencia (An Introduction to Fluorescence Spectroscopy, 2000).

### 5.3.11.1 Ensayo de afinidad

Los ensayos ópticos se caracterizan por su velocidad y simplicidad; la rapidez con la que se obtienen resultados permite realizar mediciones tanto de equilibrio como de cinética (Pollard, 2010). Uno de los métodos más utilizados para medir la afinidad de un compuesto es realizando un experimento de equilibrio, en el cual es posible determinar la magnitud de la reacción en función de la concentración de uno de los reactivos. Se traza la concentración de [AB] en función de la concentración de [B<sub>libre</sub>] en la solución, al conseguir la saturación de [A] se alcanzará una meseta en la gráfica. Con los datos producidos a través de este ensayo se logra obtener la constante de equilibrio de disociación ( $K_d$ ). Un valor más bajo de  $K_d$  indica una mayor conversión de los reactivos en el complejo receptor-ligando.



En otros términos, la  $K_d$  representa la concentración del ligando necesaria para unir el 50% del total de los sitios de unión al receptor en equilibrio (cuando [AB] es igual a [B<sub>libre</sub>]) (Stoddart et al., 2016).

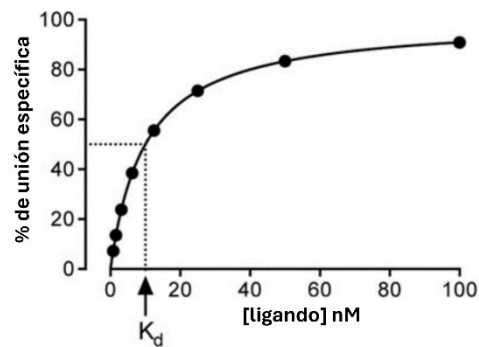


Figura 8. Curva típica de saturación de un ligando con  $K_d$  de 10 nM para un receptor. Imagen adaptada al español (Stoddart et al., 2016).

#### 4.3.11.2 Ensayo de competitividad

El ensayo de competitividad basado en fluorescencia implica la competencia de dos ligandos con la capacidad de acoplarse al sitio de unión disponible en la biomolécula objetivo. Para esto es necesario contar con una solución homogénea de la biomolécula acoplada a un ligando fluorescente con sus parámetros de unión caracterizados (Vamisetti et al., 2021). Dependiendo de la afinidad de unión, el ligando libre agregado a la solución desplazará al ligando fluorescente acoplado y dará lugar a una disminución de la señal captada por el espectrofotómetro.

La constante de disociación del ligando de interés se puede calcular a partir de su valor  $IC_{50}$  empleando la ecuación de Cheng-Prusoff:

$$K_d = \frac{IC_{50}}{[1 + (\frac{[T]}{K_{dT}})]} \quad (4)$$

Donde  $IC_{50}$  representa la cantidad de ligando no fluorescente que desplaza el 50% del reactivo acoplado a la biomolécula.  $[T]$  es la concentración del reactivo acoplado y  $K_{dT}$  simboliza la constante de disociación de equilibrio del sistema del reactivo acoplado y la biomolécula objetivo (Binding affinity with a microplate reader | BMG LABTECH, 2021).

#### 5.4 Antecedentes

En el campo de la medicina se han realizado múltiples estudios acerca de la relación entre  $ER\alpha$  y la función de sus ligandos. Como ejemplo tenemos el trabajo de Chadwick y su equipo, donde se estudian los efectos del ligando WAY-169916 en el modelo de rata transgénica HLA-B27

de enfermedad inflamatoria intestinal. En este trabajo de investigación se concluye que dicho ligando inhibe la actividad transcripcional del factor NF- $\kappa$ B (regulador de una gran diversidad de genes inflamatorios) sin promover las acciones estrogénicas convencionales, como el aumento en el riesgo del cáncer de endometrio, trombosis venosa y hemorragia uterina (Chadwick et al., 2005). Valentine y su equipo identificaron mutaciones en la hélice 12 y en la hélice 3 del receptor ER $\alpha$  que deterioran la actividad transcripcional del receptor, pero mantienen la capacidad de antagonizar la actividad transcripcional del NF- $\kappa$ B de forma dependiente del ligando (Valentine et al., 2000).

Los receptores esteroideos se caracterizan por presentar un plegamiento conflictivo para su estudio en los sitios de unión al ligando (LBD). En el año 2008, Nettles y su equipo demostraron que la mutación Y537S de Tyr en el sitio de unión al ligando del receptor de estrógenos ER $\alpha$  presenta la solución a este problema tan común, lo cual posibilita el acoplamiento del ligando en paralelo al receptor. Por medio de estudios *in silico* se determinó que la mutante posee un canal de disolvente que conecta la cavidad de unión del ligando con la superficie, dicho canal presenta un interruptor mediado por el ligando a través de His524, el cual cierra el canal tras la unión del ligando; esto estabiliza la conformación cerrada de la proteína. Los autores también mostraron que Y537S ER $\alpha$  estabiliza la hélice 12 en la conformación agonista, añadiendo un enlace de hidrógeno adicional entre las hélices 3 y 12. De igual manera, se descubrió que la mutación ocurre en la superficie y que no tiene impacto en la interacción del ligando con el receptor por medio de la comparación entre la Y537S ER $\alpha$  acoplada a raloxifeno y la estructura natural del receptor unida al mismo ligando (Nettles et al., 2008).

Para los ensayos experimentales de dicho receptor, se han ido desarrollando diversos métodos para la medición del acoplamiento a diferentes ligandos de actividad estrogénica. Entre ellos tenemos al cumestrol (CS), un fitoestrógeno fluorescente que ha representado una ventaja en este campo gracias a sus propiedades ópticas. En 1977, Lee y su equipo investigaron los efectos de la polaridad, pH y las propiedades de transferencia de energía del CS, solo y acoplado a un receptor de estrógenos ER $\alpha$  del útero de ternera. Sus resultados mostraron que el CS presenta alta fluorescencia con un coeficiente de extinción de 24,800 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> a una longitud de 345 nm en etanol, mientras que en una solución amortiguadora a pH 7.5, su máximo de emisión es a 438 nm (Lee et al., 1977). Para el año 2014, Wang y su equipo desarrollaron un ensayo de fluorescencia homogénea que permite la cuantificación del 17 $\beta$ -estradiol (E2) y otros

estrógenos de alta afinidad utilizando CS y un fragmento de ER $\alpha$  recombinante. Este trabajo demostró que es posible definir la cantidad de E2 que interacciona con el receptor por medio de la disminución de la señal fluorescente (Wang et al., 2014).

La investigación en el campo de biotinylation de proteínas aún presenta muchas áreas de oportunidad para innovar y realizar nuevos descubrimientos; por lo que se sabe, el complejo biotina- proteína presenta varias ventajas gracias al tamaño de la molécula de biotina y a su cadena lateral de ácido valeriánico (Biotinylation | Thermo Fisher Scientific - MX, 2006). En 1988, Samols y colaboradores analizaron las secuencias primarias de ciertas subunidades biotiniladas y descubrieron que, en diversos organismos, las regiones del residuo de lisina muestran homologías de secuencia (Samols et al., 1988). Basándose en estos resultados, Beckett y colaboradores, caracterizó una serie de sustratos peptídicos biotinilados por medio del sistema catalizado por BirA (una holoenzima sintetasa de la biotina en *E. coli*). Se concluyó que el péptido acoplado al sitio N-terminal fue el sustrato que presentó las propiedades más optimas; de igual forma, se determinó que BirA reconoce de manera preferente los péptidos fusionados en el N-terminal y se determinó la secuencia mínima requerida para la unión de biotina partiendo de un péptido de 14 residuos que logra imitar de forma eficaz la función de aceptación de biotina del dominio proteico (Beckett et al., 1999).

Existen diversos métodos funcionales para la etiquetación de biomoléculas, entre ellos tenemos la creación de complejos de proteínas y *quantum dots* (QDs). Estos nano-cristales semiconductores han pasado a ser de los componentes más destacados en el sector nanotecnológico; recientemente han sido incorporados al área biológica gracias a sus distinguidas características (Mattoussi et al., 2012). En el año 2010, Algar y colaboradores realizaron una revisión de diversas aplicaciones biológicas de los QDs como componentes integrados; entre ellas tenemos la bio-conjugación, la cual representa una oportunidad de dictar la orientación y movilidad de biomoléculas conjugadas (Algar et al., 2010). Más tarde, Werwie y su equipo (2014), comprobaron la unión del complejo recombinante de clorofila a/b trimérico por cada *quantum dot*; se concluyó que hay compuestos como el aminoácido tetracisteína que interactúan con las nanopartículas de manera más resistente que con una etiqueta hexahistidina (Werwie et al., 2014). Por otro lado, en 2022, Ding y su equipo fabricaron un biosensor fluorescente compuesto por estreptavidina:biotina- polilisina-QD para detectar salmonella en leche; dicho biosensor resulto ser muy específico y estable (Ding et al., 2022).

## 6 JUSTIFICACIÓN

La urgencia de desarrollar sistemas eficaces para la detección de disruptores endocrinos en el ambiente y organismos vivos se ha vuelto más apremiante ante su creciente asociación con diversas patologías que afectan la salud endocrina. La complejidad para identificar estos compuestos químicos radica en su omnipresencia y la falta de métodos precisos y accesibles para su detección. Los DEs pueden desencadenar desde neurodegeneración y osteoporosis hasta cáncer y enfermedades metabólicas, destacando la importancia de disponer de tecnologías avanzadas que permitan su monitorización eficaz y precisa.

En este escenario, emerge el desarrollo de biosensores específicamente diseñados para detectar los DEs. La utilización de la mutante Y537S del receptor de estrógenos ER $\alpha$  representa un avance significativo en este campo, ya que esta modificación mejora la estabilidad y la especificidad de su unión a los DEs gracias a un enlace de hidrógeno adicional que optimiza el plegamiento de la proteína. Además, esta mutante presenta una afinidad muy similar a la proteína silvestre, lo cual asegura su eficacia en la captura de los DEs.

La capacidad de este receptor mutante para identificar y unirse de manera fiable a los disruptores endocrinos sienta las bases para el desarrollo de biosensores altamente eficientes y precisos, facilitando la detección temprana y el estudio de la prevalencia de estos compuestos nocivos en diversos entornos. La adición de una secuencia específica de aminoácidos para la funcionalización específica por biotinylation permitirá inmovilizar la proteína de forma específica. Aunque el desarrollo del biosensor no es parte de esta investigación, la incorporación del receptor en puntos cuánticos (*quantum dots*, QDs) aprovechando sus características fluorescentes puede conducir al desarrollo de un biosensor eficiente.

## 7 HIPÓTESIS

La mutante Y537S del dominio de unión a ligando del receptor de estradiol de humano (LBD-ER $\alpha$ ), expresada de forma recombinante será capaz de enlazarse a diversos ligandos de actividad estrogénica.

## 8 OBJETIVOS

### 8.1 Objetivo General.

Clonar la mutante Y537S de LBD-ER $\alpha$ , expresarla en la cepa *Escherichia coli* y purificarla por métodos cromatográficos para evaluar su funcionamiento mediante ensayos de afinidad y competencia con diversos ligandos de actividad estrogénica.

### 8.2 Objetivos específicos.

- a) Clonar un fragmento de ADN sintético gblock de la mutante Y537S del dominio de unión a ligando del receptor de estradiol de humano (LBD-ER $\alpha$ ) en el vector de expresión pET28a (+) utilizando el kit cloneJET para su posterior expresión en células competentes.
- b) Lograr la expresión de la proteína en la cepa *Escherichia coli* BL21(DE3) empleando el protocolo específico de expresión para el crecimiento de la colonia celular, la extracción del contenido celular y la preparación de la proteína para su posterior purificación.
- c) Purificar la proteína recombinante mediante el método de cromatografía de afinidad a níquel bajo diferentes concentraciones de Imidazol y posteriormente precipitarla utilizando sulfato de amonio.
- d) Realizar pruebas de afinidad mediante espectrometría de fluorescencia para evaluar la interacción del receptor de estrógenos con cumestrol.
- e) Realizar ensayos de fluorescencia mediante la adición de concentraciones variables de estrógeno y cumestrol para evaluar la competitividad de diversos ligandos por la unión al receptor de estrógenos.
- f) Funcionalizar la proteína con biotina utilizando el kit de reacción estándar biotina-proteína ligasa BirA para su posterior unión a quantum dots que han sido previamente enlazados con streptavidina.

## 9 EXPERIMENTACIÓN

### 9.1 Materiales y equipo

El material considerado para el presente proyecto está conformado por cristalería de laboratorio y los siguientes productos químicos de grado reactivo: concentrado de medio LB, NaCl, triptófano, Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), solución amortiguadora  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , lisozima, imidazol, 2-Amino-2-(hidrozimetil)-1-3-propanediol (TRIS), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), glicerol, dodecil sulfato sódico, acrilamida, sulfato de amonio,  $\beta$ -Mercaptoetanol, persulfato de amonio (PSA). Polimerasa ADN Phusion<sup>TM</sup>, kit de clonación cloneJET, las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI* serán adquiridas de Thermo Scientific.

Entre el equipo de laboratorio utilizado tenemos: termociclador, agitador de balanceo, termostato de laboratorio, microcentrífuga, centrífuga, báscula de laboratorio, potenciómetro, ultrasonicador, ultracentrífuga, espectrofotómetro de fluorescencia- Cary Eclipse, Agilent Technologies, espectrofotómetro - NanoDrop 2000c, Thermo Scientific, espectrofotómetro multi-escáner - Multiskan Go, Thermo Scientific y sistema de documentación en gel con cámara CMOS - SmartView Pro-1100 MS.

### 9.2 Metodología

#### 9.2.1 Clonación ADN

Se clonó un fragmento de DNA sintético *gblock* de la mutante Y537S de LBD- ER $\alpha$  con la etiqueta avi-Tag en pJET 1.2, siguiendo las instrucciones determinadas por el proveedor del kit cloneJET. A partir de la construcción resultante se amplificó por PCR el fragmento de DNA correspondiente al gen de Y537S-LBD-ER $\alpha$ , utilizando los oligonucleótidos pJET:

Fw (5'-d(CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC)-3')

Rv (5'-d(AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG)-3')

A continuación, se digirió y se subclonó en los sitios *NdeI* y *XhoI* del vector de expresión pET28a (+).

Posteriormente se realizó una transformación de la ligación en células competentes. Para ello dichas células fueron preparadas el día anterior con  $\text{CaCl}_2$  acuoso. Consiguiente a esto, se

plaquearon las células en medio LB sólido adicionado con kanamicina. Las colonias positivas se analizaron mediante PCR de colonia utilizando los oligonucleótidos T7:

Fw (5'-d(TAATACGACTCACTATAGGG)-3')

Rv (5'-d(GCTAGTTATTGCTCAGCGG)-3')

Posteriormente se extrajo plásmido de las colonias seleccionadas y las construcciones fueron enviadas al servicio de secuenciación del IBT-UNAM.

### **9.2.2 Expresión ADN**

Se expresó nuestro receptor ya ligado al vector mediante el protocolo de expresión celular para la cepa *Escherichia coli* BL21(DE3). Para esto se preparó y esterilizó previamente el medio LB y el material necesario para su inoculación, incubación e inducción.

Se inoculó una colonia de células transformadas con la construcción Era-pET28a en un tubo con 50 mL de medio LB estéril adicionado con kanamicina a 35 µg/mL; dicho medio se incubó durante la noche a 37°C en agitación. Al día siguiente el pre-inóculo se adicionó a 500 mL de medio LB estéril suplementado con kanamicina y se incubó a 37°C bajo agitación constante a 200 rpm. Se monitoreó la densidad óptica a 600 nm hasta alcanzar 0.5 – 0.7 unidades de absorbancia y se indujo la expresión agregando 0.2 mM de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Se incubó el medio inducido durante un aproximado de 18 a 20 h a 20°C en agitación. Al terminar el periodo de incubación el medio fue centrifugado a una velocidad de 8,000 rpm durante 15 min a 8°C. Al final, se conservaron las células desechando el medio sobrenadante.

### **9.2.3 Extracción de contenido celular**

Se realizó la extracción del contenido celular mediante la implementación del protocolo para lisis celular. En este paso se fragmentó la membrana para liberar los componentes celulares, entre ellos la proteína de interés. Este proceso se realizó por medio de ultrasonificación de la muestra. Primeramente, se recuperaron los precipitados del paso anterior en una solución amortiguadora para lisis celular (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM pH 7.4, NaCl 100 mM, β-mercaptoetanol 2 mM, imidazol 10 mM y 10 % v/v de glicerol), se añadió fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) a 1 mM y 50 µL lisozima (30 mg/ml) a 2 mM y se incubó a 37°C

sin agitación durante 30 min. Después, se ultrasonicó la solución a una intensidad de 40 % en intervalos de 9.9 s encendido/ 5.9 s apagado durante 15 min. Finalmente, se centrifugó la solución a 13,000 rpm durante 40 min a 8°C; se conservó únicamente el sobrenadante puesto que es donde se localizó nuestra proteína de interés.

#### **9.2.4 Purificación**

La purificación se realizó por medio de cromatografía de afinidad a níquel, de acuerdo con las especificaciones del fabricante, y el método de precipitación de sales con sulfato de amonio a través del protocolo establecido en Handbook & Surface, 2000. El sobrenadante recolectado en el paso 8.2.3 fue filtrado utilizando una membrana de 0.45 µm para evitar que cualquier componente bloqueara el paso por la columna His-trap. Después de equilibrar la columna con solución amortiguadora de lisis ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM pH 7.4, NaCl 100 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 2 mM, imidazol 10 mM y 10 % v/v de glicerol), se permitió el flujo del sobrenadante filtrado para que la proteína de interés se enlazara a la columna a través de la interacción níquel-histidinas. Posteriormente se realizó un lavado con la misma solución amortiguadora para proseguir a realizar eluciones con imidazol a diferentes concentraciones (50, 200, 300 y 500 mM); de este modo se obtuvo la proteína purificada liberándola de la columna. La pureza de la muestra se evaluó a través de electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida (*SDS-PAGE*) por sus siglas en inglés, los geles obtenidos fueron teñidos con azul de Coomassie.

Se utilizó sulfato de amonio para precipitar la proteína. Se realizaron diversos ensayos para evaluar el grado de precipitación previo a determinar la concentración de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  adecuada para nuestra muestra. Dicha concentración fue aplicada a la solución de proteína purificada obtenida en el paso anterior; se agitó la solución durante 25 min y se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 min a 8°C. El sobrenadante fue desechado y el precipitado resuspendido en solución amortiguadora con sumo cuidado para no dañar la proteína; se centrifugó una vez más a 13,000 rpm durante 15 min a 8°C. Se conservó el sobrenadante y se realizaron múltiples lavados con solución amortiguadora utilizando tubos de ultrafiltración para eliminar el sulfato de amonio restante en la muestra. Finalmente se evaluó la pureza de la proteína a través de *SDS-PAGE*. En la Tabla 3 se muestran las cantidades requeridas de sulfato de amonio para saturar la muestra a determinado porcentaje.

| Porcentaje inicial | Porcentaje de saturación final a obtener |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|--------------------|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
|                    | 20                                       | 25  | 30  | 35  | 40  | 45  | 50  | 55  | 60  | 65  | 70  | 75  | 80  | 85  | 90  | 95  | 100 |     |  |
| 0                  | 113                                      | 144 | 176 | 208 | 242 | 277 | 314 | 351 | 390 | 430 | 472 | 516 | 561 | 608 | 657 | 708 | 761 |     |  |
| 5                  | 85                                       | 115 | 146 | 179 | 212 | 246 | 282 | 319 | 358 | 397 | 439 | 481 | 526 | 572 | 621 | 671 | 723 |     |  |
| 10                 | 57                                       | 86  | 117 | 149 | 182 | 216 | 251 | 287 | 325 | 364 | 405 | 447 | 491 | 537 | 584 | 634 | 685 |     |  |
| 15                 | 28                                       | 58  | 88  | 119 | 151 | 185 | 219 | 255 | 293 | 331 | 371 | 413 | 456 | 501 | 548 | 596 | 647 |     |  |
| 20                 | 0  | 29  | 59  | 89  | 121 | 154 | 188 | 223 | 260 | 298 | 337 | 378 | 421 | 465 | 511 | 559 | 609 |     |  |
| 25                 |  | 0   | 29  | 60  | 91  | 123 | 157 | 191 | 228 | 265 | 304 | 344 | 386 | 429 | 475 | 522 | 571 |     |  |
| 30                 |  |     | 0   | 30  | 61  | 92  | 125 | 160 | 195 | 232 | 270 | 309 | 351 | 393 | 438 | 485 | 533 |     |  |
| 35                 |  |     |     | 0   | 30  | 62  | 94  | 128 | 163 | 199 | 236 | 275 | 316 | 358 | 402 | 447 | 495 |     |  |
| 40                 |  |     |     |     | 0   | 31  | 63  | 96  | 130 | 166 | 202 | 241 | 281 | 322 | 365 | 410 | 457 |     |  |
| 45                 |  |     |     |     |     | 0   | 31  | 64  | 98  | 132 | 169 | 206 | 245 | 286 | 329 | 373 | 419 |     |  |
| 50                 |  |     |     |     |     |     | 0   | 32  | 65  | 99  | 135 | 172 | 210 | 250 | 292 | 335 | 381 |     |  |
| 55                 |  |     |     |     |     |     |     | 0   | 33  | 66  | 101 | 138 | 175 | 215 | 256 | 298 | 343 |     |  |
| 60                 |  |     |     |     |     |     |     |     | 0   | 33  | 67  | 103 | 140 | 179 | 219 | 261 | 305 |     |  |
| 65                 |  |     |     |     |     |     |     |     |     | 0   | 34  | 69  | 105 | 143 | 183 | 224 | 267 |     |  |
| 70                 |  |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 0   | 34  | 70  | 107 | 146 | 186 | 228 |     |  |
| 75                 |  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 0   | 35  | 72  | 110 | 149 | 190 |     |  |
| 80                 |  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 0   | 36  | 73  | 112 | 152 |     |  |
| 85                 |  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 0   | 37  | 75  | 114 |  |
| 90                 |  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 0   | 37  | 76  |  |
| 95                 |  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 0   | 38  |  |

**Tabla 3. Cantidades de sulfato de amonio necesarias para alcanzar determinados grados de saturación a 20°C (Handbook & Surface, 2000).**

Después de evaluar la pureza de las fracciones por electroforesis, se realizó un paso más de purificación a través de cromatografía de intercambio aniónico, en la cual se llevó a cabo la separación de los componentes, dependiendo de la carga de la proteína, en una solución.

### 9.2.5 Ensayos de afinidad

Se utilizó la técnica de espectrometría de fluorescencia para medir la afinidad del receptor a cumestrol. Se utilizó el espectrofluorímetro Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Agilent Technologies), las mediciones se realizaron en una celda de cuarzo. Primero se realizaron diversas pruebas para elegir la solución amortiguadora (SA) que no provocara señal de fondo, la cual interfería con las mediciones; una vez elegida, se midió la señal de diferentes concentraciones de cumestrol (CS) en la solución amortiguadora. Se repitió el procedimiento con concentraciones del receptor libre. Para evaluar la afinidad, se inició el ensayo con una solución de 10 nM de cumestrol, se agregó el receptor ER $\alpha$  purificado, se incubó a temperatura ambiente sin luz incidente durante 3 min y se midió la señal producida por el acoplamiento a una longitud de onda de excitación de 340 nm y emisión desde 380 hasta 600 nm. Posteriormente se añadió proteína para aumentar la concentración de esta en el complejo y se repitió la medición de señal pasados 3 min utilizando concentraciones desde 0.2 nM hasta 20 nM. El ensayo continuó de la misma manera hasta que la concentración del receptor superó la concentración del CS. El ensayo de afinidad se realizó por triplicado y los resultados fueron analizados para determinar la  $K_d$  del complejo.

### **9.2.6 Ensayos de competencia**

Los ensayos de competencia se realizaron basándonos en el protocolo establecido por Wang et al., 2014. Se evaluaron diferentes ligandos del receptor dependiendo de la disponibilidad de los reactivos en el laboratorio. Se inició el ensayo preparando soluciones de CS y la mutante de LBD-ER $\alpha$  en una proporción de 1:20 respectivamente; se agregó a dichas soluciones el ligando a evaluar en concentraciones finales que iniciaron desde el 10% de la concentración final del CS, hasta valores de 16 veces la concentración final del receptor. Por ejemplo, si la solución principal de CS y ER $\alpha$  fue de 20 nM y 400 nM respectivamente, se realizaron mediciones agregando el ligando en concentraciones finales desde 2 nM hasta 6.4  $\mu$ M. Las muestras se incubaron durante 3 h a temperatura ambiente y se midió la señal producto de cada muestra por triplicado. Para determinar cuáles ligandos eran capaces de desplazar al cumestrol en el complejo.

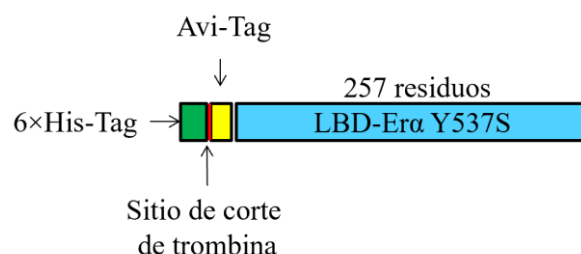
### **9.2.7 Funcionalización y cuantificación de biotina**

El receptor fue funcionalizado utilizando el kit de reacción estándar biotina-proteína ligasa BirA de la marca Avidity. Se lavó la muestra mediante ultrafiltración para sustituir la solución amortiguadora por la indicada en el manual; se realizaron los cálculos necesarios acorde a las instrucciones del proveedor para determinar la cantidad de los componentes a agregar y se incubó la muestra en las condiciones que determinó el manual acorde a las concentraciones tanto de proteína, como de biotina, ATP, entre otros elementos. Posteriormente, se realizó un nuevo lavado por el método de ultrafiltración; con el fin de concentrar el receptor en la solución amortiguadora adecuada para el uso del kit de cuantificación de biotina con fluorescencia de la marca Pierce. Se realizó el protocolo estipulado por el proveedor y los cálculos para estimar cuanta proteína en la muestra fue funcionalizada. Las muestras se dializaron para eliminar la biotina no ligada al receptor y evitar la interferencia en el análisis de la proteína.

## 10 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 10.1 Diseño de la secuencia y clonación de la mutante Y537S LBD-ER $\alpha$

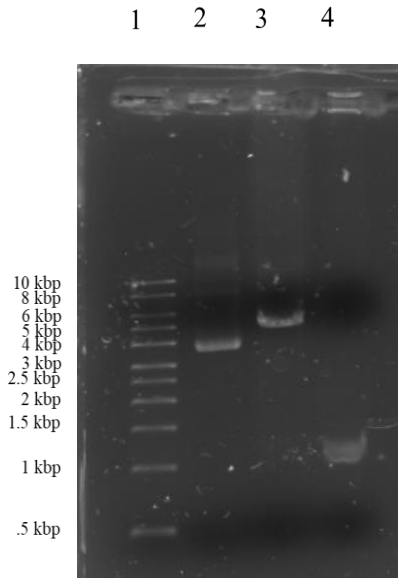
Para el diseño del *gblock* se consideró la secuencia codificante del LBD-ER $\alpha$  con la mutación Y537S y se diseñó con los sitios de corte para las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI* de manera en que al incorporarse generó una proteína con las siguientes características:



**Figura 9.** Ilustración representativa de la proteína diseñada de la mutante Y537S LBD-ER $\alpha$  clonado e incorporado a las etiquetas para su posterior purificación.

La secuencia de aminoácidos completa se introdujo en el servidor Protparam (<https://web.expasy.org/protparam/>), los resultados teóricos predijeron una proteína de 33 kDa, con un punto isoeléctrico (pI) de 6.6 y un coeficiente de extinción molar de 27,960 (Anexo A).

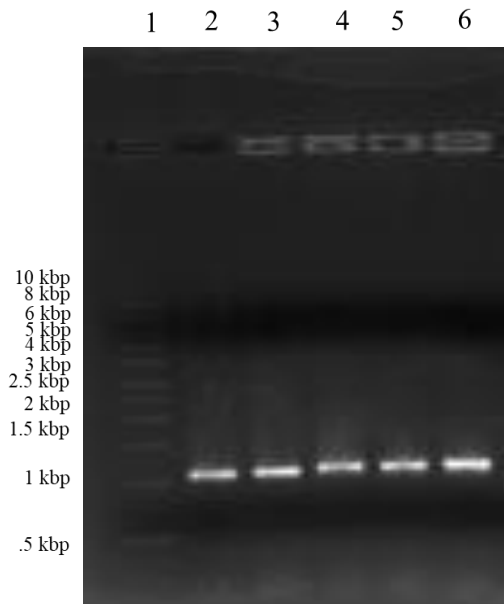
A partir del *gblock* de Y537S LBD-ER $\alpha$  se clonó en el vector pJET 1.2. Tanto el fragmento amplificado a partir de pJET-ER $\alpha$  como el plásmido pET28a(+) fueron digeridos con las enzimas *NdeI* y *XhoI* y purificados con el kit geneJET de ThermoScientific. Los productos purificados se corrieron en un gel de agarosa al 1% en TAE 1X (Figura 10).



**Figura 10. Fragmento y plásmido digeridos y purificados.**

Las muestras se encuentran ordenadas de la siguiente manera: 1. marcador de peso molecular, 2. pET28a sin digerir, 3. pET28a digerido, 4. fragmento ER $\alpha$  digerido.

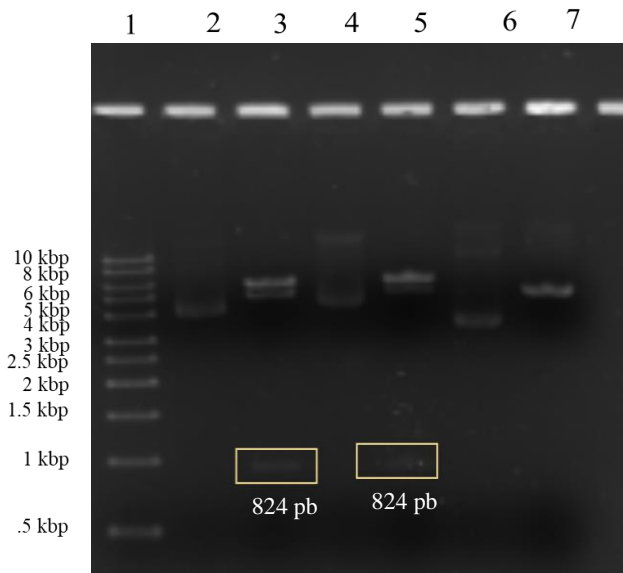
Se realizó el ligado del inserto en el vector pET28a (+), los productos de la ligación se transformaron en células quimiocompetentes XL1Blue y las colonias seleccionadas en medio LB suplementado con Kanamicina se analizaron por PCR de colonia utilizando los oligonucleótidos T7 Fw y T7 Rv. Se analizaron 5 colonias que resultaron positivas (Figura 11).



**Figura 11. Análisis de PCR de colonias de la ligación Era-pET28a (+).**

Las muestras se encuentran ordenadas de la siguiente manera: 1. marcador de peso molecular, del pocillo 2 al 6 se encuentran las colonias no. 1,2,3,4 y 5 respectivamente.

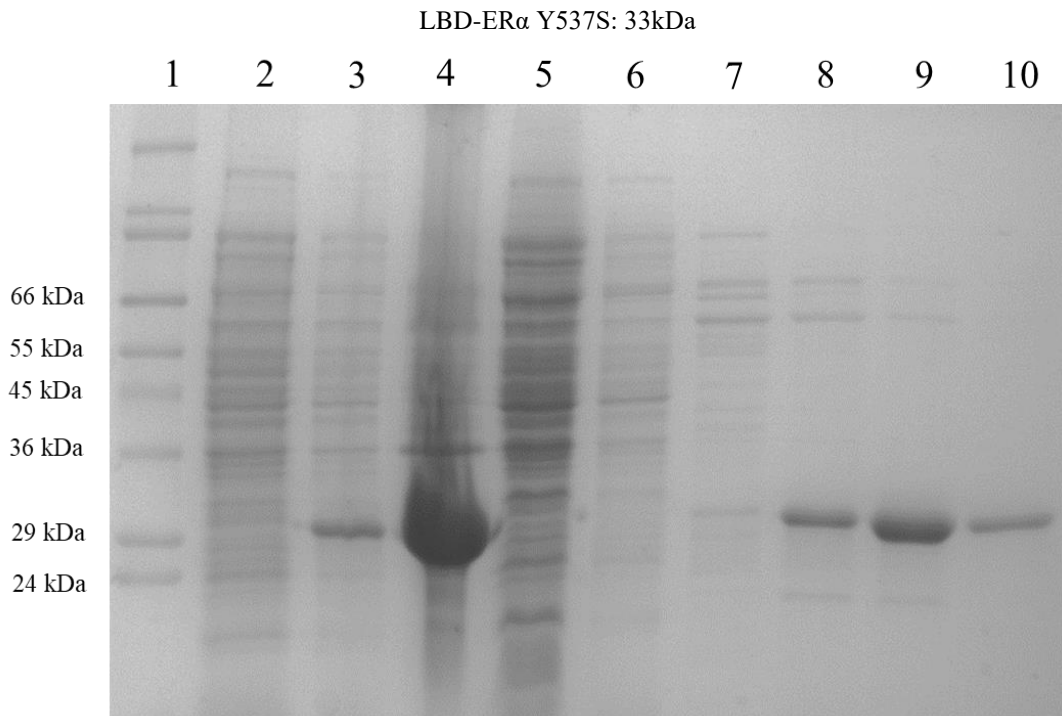
Se seleccionaron las colonias 1 y 2 para inocular cultivos de 5 mL y se crecieron por 16 h para extraer plásmido utilizando el kit geneJET de ThermoScientific de purificación de plásmido. Los plásmidos obtenidos fueron digeridos con las enzimas *NdeI* y *XhoI* para comprobar la presencia de los insertos (Figura 12) y se enviaron al servicio de secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.



**Figura 12. Digestión de plásmidos para comprobar la presencia de insertos.**

Las muestras se encuentran ordenadas de la siguiente manera: 1. marcador de peso molecular, 2. construcción 1 sin digerir, 3. construcción 1 digerida, 4. construcción 2 sin digerir, 5. construcción 2 digerida, 6. pet28a sin digerir, 7. pet28a digerido.

### 10.2 Expresión de LBD-ER $\alpha$ Y537S en BL21(DE3) y purificación.

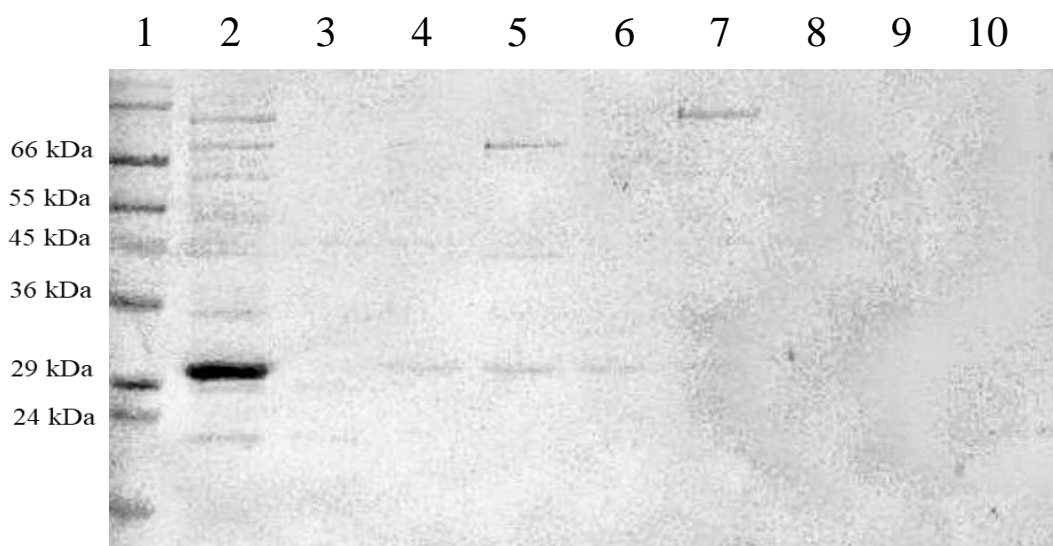


**Figura 13. Gel de acrilamida de purificación por afinidad a níquel.**

Las muestras se encuentran ordenadas de la siguiente manera: 1. marcador de peso molecular, 2. muestra no inducida, 3. muestra inducida, 4. precipitado de lisis celular, 5. sobrenadante de lisis celular filtrado por columna, 6. lavado, 7. elución Imidazol 50 mM, 8. elución Imidazol 200 mM, 9. elución Imidazol 300 mM, 10. elución Imidazol 500 mM.

La proteína se expresó de acuerdo con el protocolo descrito en la sección de metodología. Las fracciones obtenidas a partir de la purificación por afinidad a níquel muestran una banda de

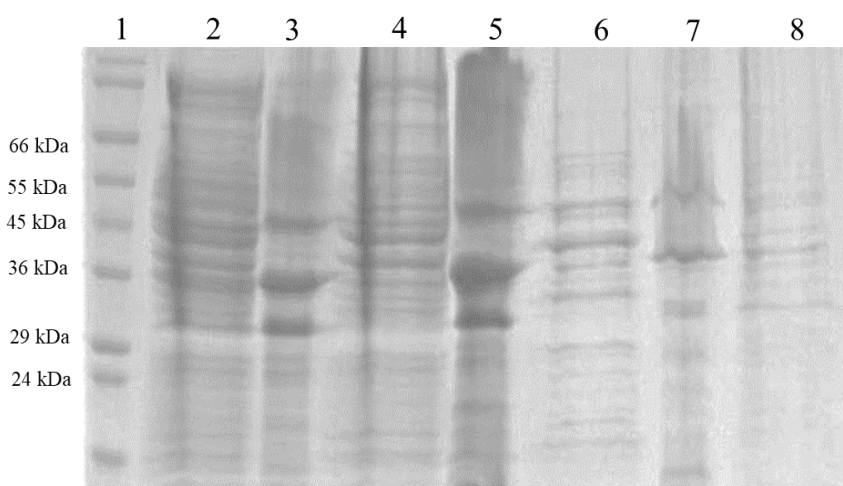
~ 33 kDa (Figura 13). El carril 9 corresponde a la fracción en la que se obtuvo la proteína más concentrada mediante la elución con imidazol a 300 mM con una pureza suficiente para su posterior uso en pruebas de unión. A pesar de que la fracción de 500 mM presenta mayor pureza, se decidió trabajar con la fracción de 300 mM y evaluar otros métodos de purificación adicionales.



**Figura 14. Purificación mediante cromatografía de intercambio iónico.**

Las muestras se encuentran ordenadas de la siguiente manera: 1. marcador de peso molecular, 2. muestra dializada, 3. muestra no adherida a la columna, 4. muestra 1 (Tubo no.24), 5. muestra 2 (Tubo no.27), 6. muestra 3 (Tubo no.31), 7. muestra 4 (Tubo no.36), 8. muestra 5 (Tubo no.50), 9. muestra 6 (Tubo no.56), 10. muestra 7 (Tubo no.60).

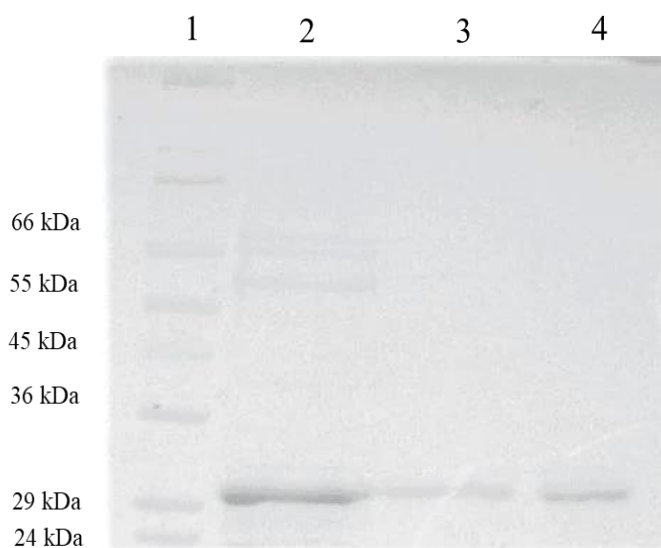
Se utilizó la resina High Q de BioRad para purificar por intercambio aniónico la fracción de 300 mM de imidazol obtenida en la cromatografía de afinidad a níquel. Se seleccionó esta resina debido a que el punto isoeléctrico de la proteína es de 6.6, por lo que al pH de 7.4 la proteína debe tener una carga negativa. De acuerdo con el gel presentado en la figura 14 la proteína fue eluida en las fracciones 24, 27, 31, 36, 50, 56 y 60; iniciando en lo que corresponde a un 29.4% de concentración del buffer de elución o 361 mM de NaCl, acorde al cromatograma de elución generado por el equipo (Anexo A). Como se puede observar hay otras proteínas de mayor y menor peso molecular que eluyen en las mismas fracciones, por lo que se descartó el uso de esta cromatografía como paso de purificación ya que no incrementó la pureza de Y537S LBD- ER $\alpha$  en las fracciones.



**Figura 15. Determinación de porcentaje de saturación óptimo para purificación por sulfato de amonio.**

Las muestras se encuentran ordenadas de la siguiente manera: 1. marcador de peso molecular, 2. 20% soluble, 3. 20% precipitado, 4. 40% soluble, 5. 40% precipitado, 6. 60% soluble, 7. 60% precipitado, 8. 80% soluble.

Debido a que la purificación mediante cromatografía de intercambio iónico no fue efectiva para incrementar la pureza de la proteína, se evaluó la solubilidad de la proteína en diferentes concentraciones de sulfato de amonio (Figura 15). Los resultados obtenidos nos permiten evaluar la saturación óptima de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  para la purificación de nuestra proteína. En este caso la mayor concentración de proteína se obtuvo utilizando una saturación al 40%.



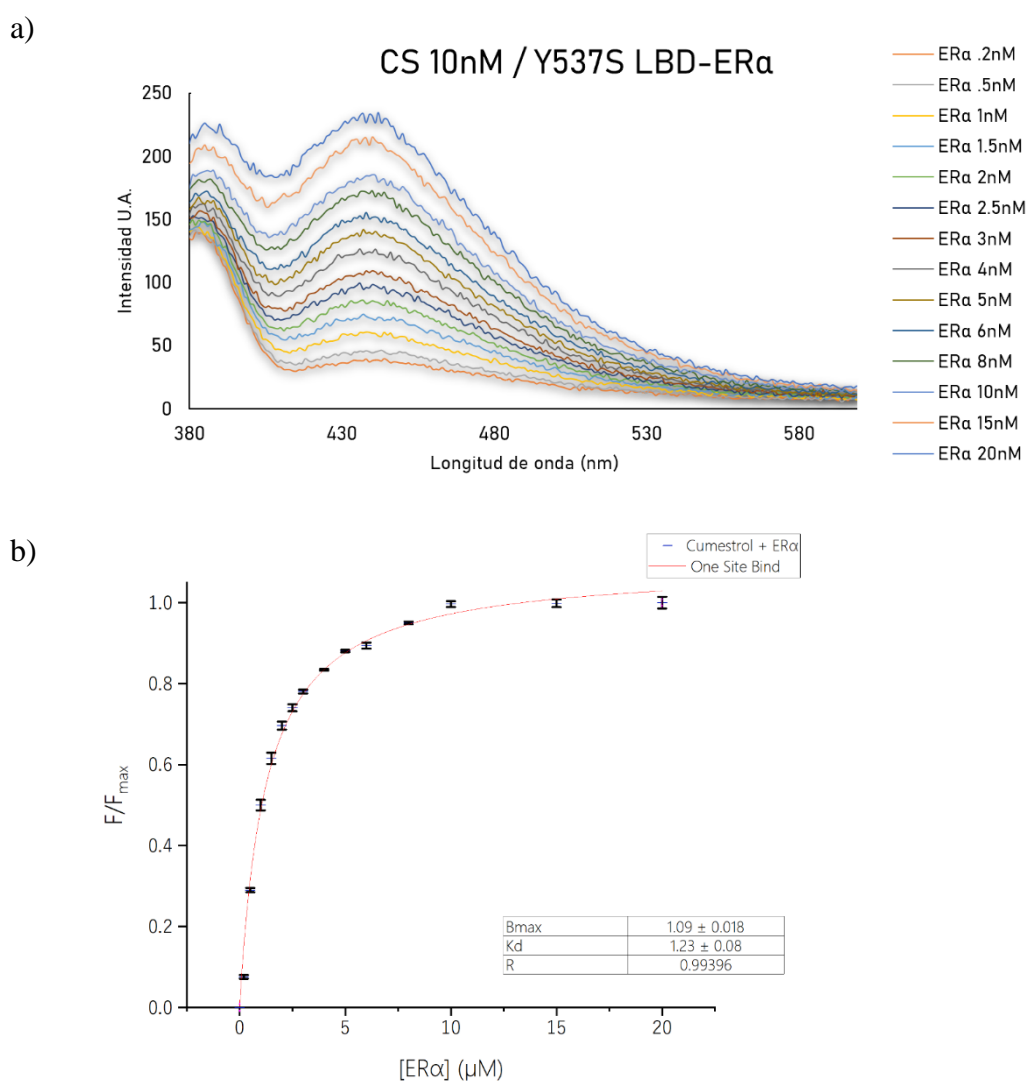
**Figura 16. Precipitación y solubilización de la proteína al 40%.**

Las muestras se encuentran ordenadas de la siguiente manera: 1. marcador de peso molecular, 2. muestra de elución Imidazol 300mM, 3. sobrenadante de muestra precipitada con SA resuspendida en buffer de unión y centrifugada, 4. precipitado de centrifugado en buffer de unión.

Al implementar el método de purificación por precipitación con sulfato de amonio se obtiene una proteína con un grado óptimo de pureza y concentración. Confirmando así, que la precipitación con sulfato de amonio utilizando una saturación al 40% adicional a la purificación por afinidad a níquel produce una muestra de Y537S LBD- ER $\alpha$  concentrada y limpia (Figura 16).

### 10.3 Determinación de afinidad del receptor de estrógenos.

Con la intención de evaluar la capacidad de la proteína para unirse al cumestrol se realizaron diversos ensayos de unión a ligando, utilizando el equipo de espectroscopía fluorescente.



**Figura 17. Espectroscopía de fluorescencia del complejo Era-cumestrol.**

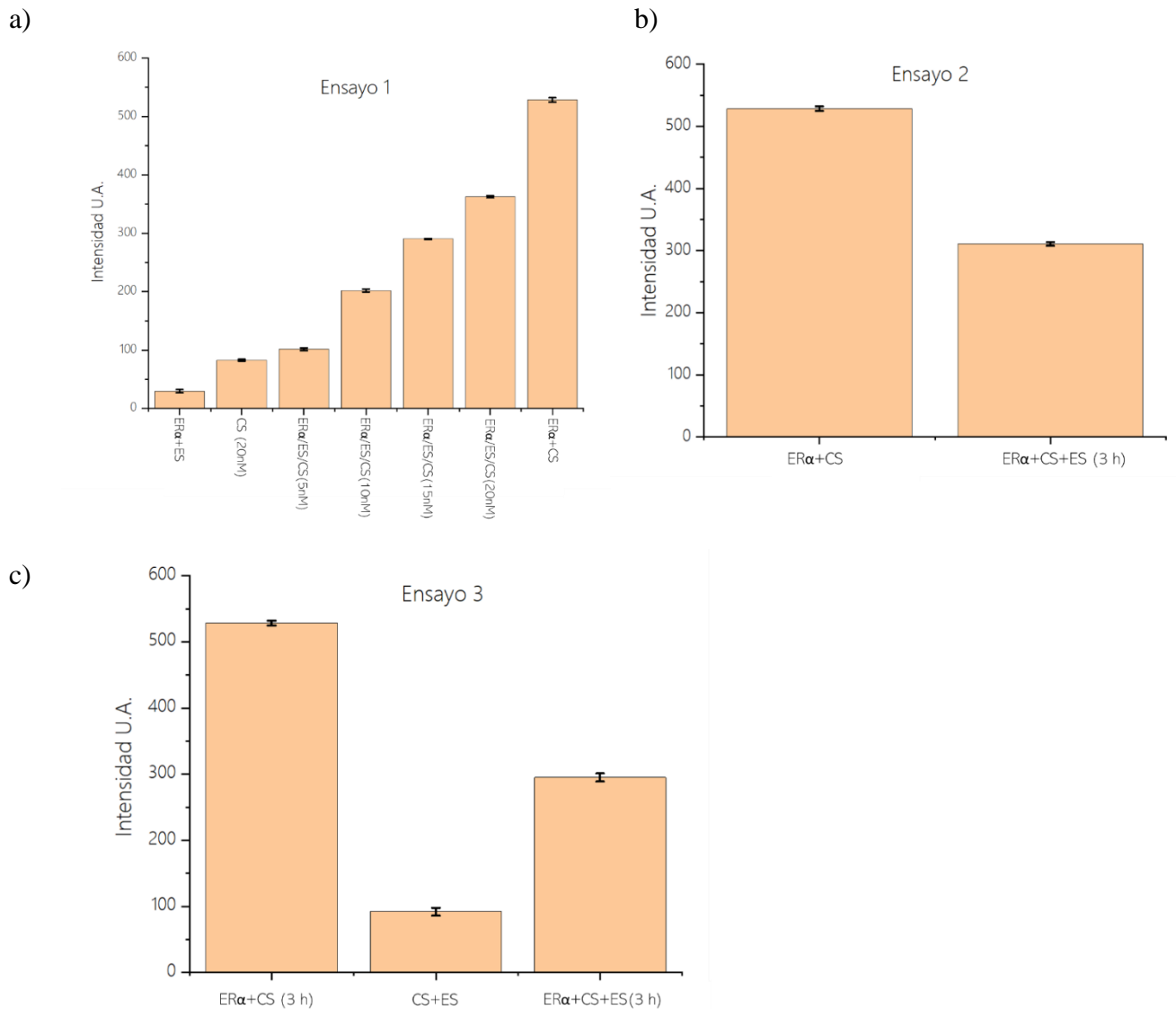
(17a) Espectros de fluorescencia de la adición de Y537S LBD-Era $\alpha$  a una solución de Cumestrol 10 nM. (17b) Ajuste de los datos al modelo de unión de un sitio en el software Origin.

Mediante ensayos de determinación de afinidad se obtuvieron los datos necesarios para realizar un análisis gráfico de la señal fluorescente emitida por el complejo CS-ER $\alpha$  (Figura 17a). Se percibe el incremento de la señal obtenida a diferentes concentraciones de Y537S LBD- ER $\alpha$ . Se muestra que la fluorescencia del complejo CS-ER $\alpha$  incrementa hasta un grado de saturación (1/1) en el cual, al superar ese punto, la señal captada por el equipo deja de ser proporcional y únicamente se percibe la fluorescencia emitida por el exceso de proteína en la muestra.

En la segunda imagen (17b) se presentan los valores de fluorescencia/fluorescencia máxima de la Figura 17a vs la concentración de Y537S LBD-ER $\alpha$ . Los datos se ajustaron al modelo de unión de un solo sitio usando el programa Origin Pro 8.6.0 (OriginLab), el ajuste permitió determinar una  $K_d$  de  $1.23 \pm .08$  nM para el cumestrol y el valor de  $X^2$  del ajuste es de  $1E-9$ . El valor de la  $K_d$  obtenida es cercano al previamente reportado de  $1.14 \pm .51$  nM para la unión del receptor de estrógenos purificado y el cumestrol (Scarlati & Miksic, 1995). La curva hiperbólica obtenida utilizando el software Origin demuestra que todo el ligando libre fue acoplado al receptor, provocando así una meseta de saturación en la gráfica.

#### 10.4 Capacidad del ER $\alpha$ de reconocer 17 $\beta$ -Estradiol y otros disruptores endocrinos.

Se realizaron diversos ensayos de competencia para evaluar la reducción de señal fluorescente al incorporar 17 $\beta$ -Estradiol (ES) al complejo CS-LBD ER $\alpha$ . La competencia entre ES y CS resulta evidente al comparar las señales emitidas por cada uno de los complejos de manera independiente.



**Figura 18. Análisis de competencia entre disruptores endocrinos.**

Gráficas obtenidas del equipo de espectroscopía de fluorescencia para analizar la reducción de señales producto de las concentraciones del ligando no fluorescente agregado al complejo CS-ER $\alpha$  para la sustitución del cumestrol en el sitio de unión.

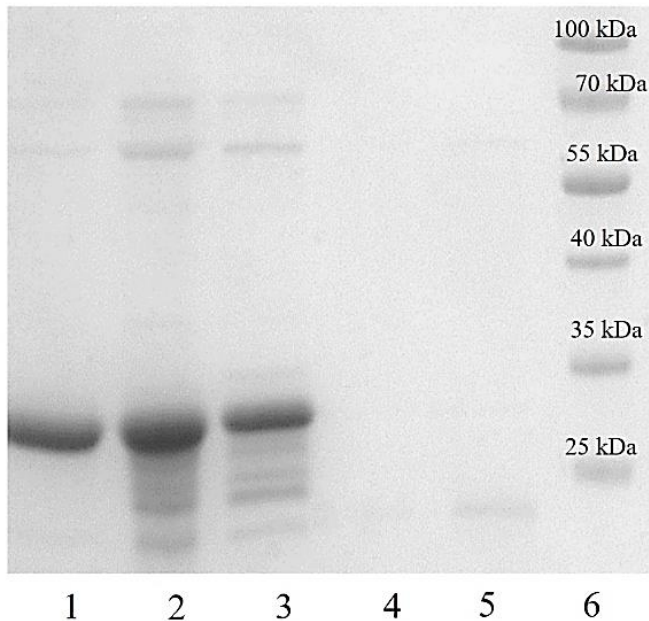
Se realizó el primer ensayo incorporando cumestrol para alcanzar diversas concentraciones (5 nM, 10 nM, 15 nM y 20 nM) a la mezcla de proteína con estradiol, ambas a una concentración inicial de 20 nM. Previamente, esta mezcla fue sometida a incubación durante una hora con el fin de asegurar su acoplamiento. Se observó un incremento en la intensidad emitida conforme se agregó el cumestrol hasta llegar a un punto máximo de 279 u.a. (Figura 18a); la unión  $17\beta$ -Estradiol/LBD-ER $\alpha$ , por sí sola no produce señal fluorescente considerable.

El incremento continuo en la señal fluorescente mientras se agrega cumestrol a la mezcla indica un acoplamiento entre la proteína libre y el cumestrol. Sin embargo, al comparar el valor de la proteína acoplada a ambos ligandos con la muestra control CS-ER $\alpha$  se observa una evidente competencia cumestrol/estradiol por la ocupación del sitio de unión a ligando. Cuando la proteína se encuentra unida al estradiol, se produce una señal equivalente al 52.9% de la señal emitida por el complejo CS-ER $\alpha$  en su medición independiente (Figura 18a).

Durante el segundo experimento se agregó ES a una muestra de proteína con CS, cada uno a una concentración final de 20 nM en la solución. Esta mezcla se incubó durante 3 horas y finalmente se midió la fluorescencia de la proteína con ambos ligandos (Figura 18b). Se observa una disminución del 59% de la señal fluorescente emitida por la mezcla de complejos CS-ER $\alpha$ /ES-ER $\alpha$  al pasar el tiempo. Esto nos permite demostrar que el ES se encuentra activamente compitiendo por el sitio de unión de nuestra proteína.

El tercer ensayo consistió en incorporar nuestra proteína a una mezcla de CS/ES. La primera medición que se muestra en la gráfica es de la muestra control CS-ER $\alpha$ , después de tres horas de incubación. La segunda medición es del complejo inicial sin el receptor, mientras en la tercera se evalúa la fluorescencia de la muestra CS-ER $\alpha$ /ER (cada uno a una concentración de 20 nM) incubada durante tres horas (Figura 18c). En este experimento se estima que la señal fluorescente del complejo CS-ER $\alpha$ /ER aumentó en un 320% en comparación a la muestra sin proteína. Sin embargo, aun aumentando de manera considerable, solo alcanza a emitir un valor del 55% de la señal producida por el complejo CS-ER $\alpha$  de manera independiente. Con esto se confirma que ambos ligandos compiten por el sitio de unión de nuestro receptor de estrógenos.

## 10.5 Funcionalización de la proteína y cuantificación de biotina.



**Figura 19. Funcionalización del receptor de estrógenos.**

Las muestras se encuentran ordenadas de la siguiente manera: 1. elución Imidazol 300 mM, 2. proteína en buffer para funcionalizar, 3. proteína funcionalizada con biotina, 4. proteína funcionalizada 10uL (cambio de buffer), 5. proteína funcionalizada 4uL (cambio de buffer), 6. marcador de peso molecular.

Para funcionalizar la proteína, el manual del kit BirA500 indica que se debe cambiar la muestra de amortiguador a uno que sea compatible con las características del set comercial. Después de varios intentos se decidió adaptar el amortiguador de biotilación debido a que la proteína se precipitaba totalmente en el amortiguador indicado por el kit. Sin embargo, a pesar de que la proteína resultó más soluble en el amortiguador modificado, al intentar cuantificar la biotina acoplada al receptor fue necesario sustituir nuevamente el amortiguador de la muestra y durante este paso en todas las pruebas se perdió la proteína por completo (Figura 19).

La proteína pierde solubilidad en el amortiguador en el que se realiza la funcionalización, así como en el que se determina la concentración de biotina. Por lo tanto, una opción a considerar sería evaluar la funcionalidad tanto del kit de biotilación como del método de cuantificación de biotina en amortiguadores que sean más compatibles con el receptor de estrógenos.

Para un análisis más específico de las propiedades de la mutante Y537S LBD-ER $\alpha$  al ser funcionalizada con biotina, inmovilizada e incorporada a una muestra con algún disruptor endócrino (preferentemente el cumestrol gracias a su gran afinidad y fluorescencia) es posible diseñar experimentos de interferometría, los cuales permitirían un estudio más específico de la interacción entre nuestro receptor y los ligandos, así como una caracterización detallada de la actividad biológica y sus propiedades superficiales.

## 11 CONCLUSIÓN

En el presente proyecto se estableció como objetivo clonar, expresar, purificar y funcionalizar la mutante Y537S LBD-ER $\alpha$ . Con base en una metodología de tipo experimental y revisión de la literatura se logró clonar de manera exitosa el fragmento de la mutante en la cepa XL1- Blue para su posterior expresión en la cepa BL21(DE3).

Se evaluaron diversas técnicas de purificación concluyendo que el método más óptimo consiste en el empleo de la técnica de cromatografía de afinidad a níquel, combinada con la técnica de precipitación de sales con una saturación del 40%. De esta manera fue posible obtener una muestra de nuestra proteína con un alto nivel de pureza. Sin embargo, cabe mencionar que la cantidad de proteína perdida resulta significativa. Por otro lado, se descarta el uso de la cromatografía de intercambio aniónico para la purificación del receptor debido a que el gradiente resulta en una serie de muestras muy diluidas y se percibe un rendimiento de purificación muy bajo.

A través de ensayos de afinidad y un análisis de datos utilizando el software Origin se determinó que la proteína es capaz de unirse al cumestrol y su medición resulta exitosa al evaluarse mediante espectrometría de fluorescencia gracias a las propiedades ópticas del fitoestrógeno.

Mediante la realización de pruebas de competencia utilizando espectrometría de fluorescencia, se evidenció que el 17 $\beta$ -Estradiol compite con el cumestrol por el sitio de unión al ligando del receptor. En consecuencia, se puede concluir que nuestra variante/mutante es capaz de interactuar con distintos tipos de estrógenos. Existen otros métodos que son más precisos para la medición de las interacciones biomoleculares de nuestra proteína, como la polarización de fluorescencia. Sin embargo, en nuestro laboratorio no se cuenta con polarímetro por lo que se determinó directamente por el cambio en la intensidad de fluorescencia.

Se demostró que la proteína es considerablemente estable en el amortiguador de biotilación, sin embargo, al ser manipulada en este estado se desestabiliza y se pierde por completo. Resulta necesario evaluar otros amortiguadores que sean compatibles tanto con el receptor de estrógenos, como con el kit de cuantificación de biotina.

La perspectiva a futuro de este proyecto implica la unión de *quantum dots* previamente conjugados con streptavidina al receptor que ha sido funcionalizado con biotina. Esto habilitará

la realización de pruebas de reconocimiento y generación de señales en muestras que contengan disruptores endocrinos. Asimismo, esta unión representa una alternativa viable para cuantificar la cantidad de biotina presente en nuestra muestra, sin requerir un procedimiento que resulte en la precipitación completa del receptor.

## 12 BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Isolating, Cloning, and Sequencing DNA*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26837/>
- Algar, W. R., Tavares, A. J., & Krull, U. J. (2010). Beyond labels: A review of the application of quantum dots as integrated components of assays, bioprobes, and biosensors utilizing optical transduction. En *Analytica Chimica Acta* (Vol. 673, Número 1, pp. 1–25). <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.05.026>
- An Introduction to Fluorescence Spectroscopy*. (2000).
- Arias, M. P., Castro-Feijóo, L., Conde, J. B., & Cabanas Rodríguez, P. (2020). Una revisión sobre los disruptores endocrinos y su posible impacto sobre la salud de los humanos. *Revista Española de Endocrinología Pediátrica*, 11(2), 33–53. <https://doi.org/10.3266/RevEspEndocrinolPediatr.pre2020.Nov.619>
- Bacterial Transformation*. (2022). <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/technical-documents/technical-article/genomics/advanced-gene-editing/transformation>
- Beckett, D., Kovaleva, E., & Schatz, P. J. (1999). *A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation*.
- Binding affinity with a microplate reader | BMG LABTECH*. (2021). <https://www.bmglabtech.com/en/blog/how-to-determine-binding-affinity-with-a-microplate-reader/>
- Biotinylation | Thermo Fisher Scientific - MX*. (2006). <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/biotinylation.html>
- Bruning, J. B., Parent, A. A., Gil, G., Zhao, M., Nowak, J., Pace, M. C., Smith, C. L., Afonine, P. V., Adams, P. D., Katzenellenbogen, J. A., & Nettles, K. W. (2010). Coupling of receptor conformation and ligand orientation determine graded activity. *Nature Chemical Biology*, 6(11), 837–843. <https://doi.org/10.1038/nchembio.451>
- Chadwick, C. C., Chippari, S., Matelan, E., Borges-Marcucci, L., Eckert, A. M., Keith, J. C. ¶, Albert, L. M., Leathurby, Y., Harris, H. A., Bhat, R. A., Ashwell, M., Trybulski, E., Winneker, R. C., Adelman, S. J., Steffan, R. J., & Harnish, D. C. (2005). *Identification of pathway-selective estrogen receptor ligands that inhibit NF-B transcriptional activity*. [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0405841102](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0405841102)
- Ding, S., Hu, H., Yue, X., Feng, K., Gao, X., Dong, Q., Yang, M., Tamer, U., Huang, G., & Zhang, J. (2022). A fluorescent biosensor based on quantum dot–labeled streptavidin and poly-L-lysine for the rapid detection of Salmonella in milk. *Journal of Dairy Science*, 105(4), 2895–2907. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21229>
- DNASU Plasmid | Detailed Vector Information: pET28a*. (1999). <http://dnasu.org/DNASU/GetVectorDetail.do?vectorid=319>

- Edgar Allen, & Edward A. Doisy. (1983). Landmark article Sept 8, 1923. An ovarian hormone. Preliminary report on its localization, extraction and partial purification, and action in test animals. *JAMA*, 19(250), 2681–2683.
- Erijman, A., Dantes, A., Bernheim, R., Shifman, J. M., & Peleg, Y. (2011). Transfer-PCR (TPCR): A highway for DNA cloning and protein engineering. *Journal of Structural Biology*, 175(2), 171–177. <https://doi.org/10.1016/J.JSB.2011.04.005>
- Fink, H.-P., Weigel, P., Purz, H. J., & Ganster, J. (2001). *Structure formation of regenerated cellulose materials from NMMO-solutions*. [www.elsevier.com/locate/ppolysci](http://www.elsevier.com/locate/ppolysci)
- Ford, C. F., Suominen, I., & Glatz, C. E. (1991). Fusion Tails for the Recovery and Purification of Recombinant Proteins. En *PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION* (Vol. 2). *Foundations of Molecular Cloning - Past, Present and Future* | NEB. (2013). <https://international.neb.com/tools-and-resources/feature-articles/foundations-of-molecular-cloning-past-present-and-future>
- Fuentes, N., & Silveyra, P. (2019). *Estrogen receptor signaling mechanisms*. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.01.001>
- Gateway® Cloning. (1994). [http://www.premierbiosoft.com/tech\\_notes/Gateway\\_Cloning.html](http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/Gateway_Cloning.html)
- Genco M, Anderson-Shaw L, & Sargis RM. (2020). Unwitting accomplices: Endocrine disruptors confounding clitoral care. *J Clin Endocr Metab*.
- Gene expression: DNA to protein* | *Biological Principles*. (2018). <https://bioprinciples.biosci.gatech.edu/module-4-genes-and-genomes/06-gene-expression/>
- Guzmán Y Valle, E., Mátér, A., Nacional, D. M., Vilcabana, A., & Margot, S. (2019). *UNIVERSIDAD NACIONAL DE EDUCACIÓN*.
- Handbook, I. M., & Surface, B. S. (2000). ÄKTA™ Laboratory-scale Chromatography Systems Biacore Sensor Surface Handbook GST Gene Fusion System Handbook. *Cell Separation Media Methodology and Applications*, 18–1115. [www.gelifesciences.com/handbooks](http://www.gelifesciences.com/handbooks)
- Hausjell, J., Weissensteiner, J., Molitor, C., Halbwirth, H., & Spadiut, O. (2018). E. coli HMS174(DE3) is a sustainable alternative to BL21(DE3). *Microbial Cell Factories*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-018-1016-6>
- Hiller-Sturmhöfel, S., & Bartke, A. (1998). *The Endocrine System An Overview*.
- Kabir, E. R., Rahman, M. S., & Rahman, I. (2015). A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. En *Environmental Toxicology and Pharmacology* (Vol. 40, Número 1, pp. 241–258). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.06.009>
- Kathleen M. (2022). *Estrogen Receptors Methods and Protocols Second Edition*. <http://www.springer.com/series/7651>
- Kleine, B., & Rossmannith, W. G. (2016). *Hormones and the Endocrine System*.
- Kuiper, G. G. J. M., Enmark, E., Peltö-Huikkola, M., Nilsson, S., Jänne, J.-A. G., & Jensen, E. V. (1996). *Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary PCR-Amplification and Complementary DNA Cloning* (Vol. 93). *Lab Ultrafiltration and Purification Products*. (2022).
- Laboratory Filtration Products*. (2022).
- Large Volume Precipitation of Proteins with Ammonium Sulfate Using Thermo Scientific Fiberlite Carbon Fiber Rotors*. (2012).
- Lee, Y., Lee, S., Shamir, A., Cohen-Or, D., & Seidel, H. P. (2003). Membranes, Synthetic, Applications. *Proceedings - Pacific Conference on Computer Graphics and Applications*, 279–344. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227410-5/00419-1>
- Lessard, J. C. (2013). Molecular cloning. En *Methods in Enzymology* (Vol. 529, pp. 85–98). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00007-0>
- Márquez, D. C. (2002). *Receptor de Estrógeno: Bases Moleculares Aplicadas a Medicina*.

- Mattoussi, H., Palui, G., & Na, H. Bin. (2012). Luminescent quantum dots as platforms for probing in vitro and in vivo biological processes. En *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 64, Número 2, pp. 138–166). <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.09.011>
- Mhaouty-Kodja, S., Belzunces, L. P., Canivenc, M. C., Schroeder, H., Chevrier, C., & Pasquier, E. (2018). Impairment of learning and memory performances induced by BPA: Evidences from the literature of a MoA mediated through an ED. En *Molecular and Cellular Endocrinology* (Vol. 475, pp. 54–73). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.03.017>
- Miles, J. S., & Wolf, R. (1989). *Scientific Tools in Medicine Principles of DNA cloning*.
- Muyrers, J. P. P., Zhang, Y., & Stewart, A. F. (2001). Techniques: Recombinogenic engineering—new options for cloning and manipulating DNA. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(5), 325–331. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01757-6](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01757-6)
- Nettles, K. W., Bruning, J. B., Gil, G., Nowak, J., Sharma, S. K., Hahm, J. B., Kulp, K., Hochberg, R. B., Zhou, H., Katzenellenbogen, J. A., Katzenellenbogen, B. S., Kim, Y., Joachmiak, A., & Greene, G. L. (2008). NF $\kappa$ B selectivity of estrogen receptor ligands revealed by comparative crystallographic analyses. *Nature Chemical Biology* 2008 4:4, 4(4), 241–247. <https://doi.org/10.1038/nchembio.76>
- Nickel Columns and Nickel Resin | Bio-Rad*. (1999). <https://www.bio-rad.com/featured/en/nickel-columns-nickel-resin.html>
- Paterni, I., Granchi, C., Katzenellenbogen, J. A., & Minutolo, F. (2014). Estrogen Receptors Alpha (ER $\alpha$ ) and Beta (ER $\beta$ ): Subtype-Selective Ligands and Clinical Potential. *Steroids*, 0, 13. <https://doi.org/10.1016/J.STEROIDS.2014.06.012>
- pET System Manual*. (2003). [www.novagen.com](http://www.novagen.com)
- Photometric Quantification of Proteins in Aqueous Solutions via UV-Vis Spectroscopy*. (2019). <https://handling-solutions.eppendorf.com/sample-handling/photometry/applications/detailview-applications/news/photometric-quantification-of-proteins-in-aqueous-solutions-via-uv-vis-spectroscopy/>
- Pollard, T. D. (2010). MBOC technical perspective: A guide to simple and informative binding assays. *Molecular Biology of the Cell*, 21(23), 4061–4067. <https://doi.org/10.1091/MBC.E10-08-0683/ASSET/IMAGES/LARGE/ZMK0211096270004.JPEG>
- Polyzos, S. A., Kountouras, J., Deretzi, G., Zavos, C., & Mantzoros, C. S. (2012). The Emerging Role of Endocrine Disruptors in Pathogenesis of Insulin Resistance: A Concept Implicating Nonalcoholic Fatty Liver Disease. En *Current Molecular Medicine* (Vol. 12). <http://www.fda.gov/ScienceResearch/BioinformaticsTo>
- Pombo M. (2014). Perturbadores endocrinos. *Rev Esp Pediatr*, 70, 229–231.
- Protein Expression Systems*. (2022). <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/technical-documents/technical-article/protein-biology/protein-expression/protein-expression-systems>
- Rachel Carson. (1962). *Primavera Silenciosa*. Editorial Planeta S.A.
- Revankar, C. M., Cimino, D. F., Sklar, L. A., Arterburn, J. B., & Prossnitz, E. R. (2005). A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*, 307(5715), 1625–1630. <https://doi.org/10.1126/science.1106943>
- Rivas A, Granada A, Jiménez M, Olea F, & Olea N. (2004). Exposición humana a disruptores endocrinos. *Ecosistemas (Monográfico)*, 13.
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in Escherichia coli: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5(APR). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2014.00172>

- Samols, D., Thornton, C. G., Murtif, V. L., Kumar, G. K., Haase, F. C., & Wood, H. G. (1988). Evolutionary conservation among biotin enzymes. *The Journal of biological chemistry*, 263(14), 6461–6464. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)68661-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)68661-2)
- Scaglia, H. (2009). *Disruptores endocrinos*.
- Scarlata, S., & Miksic, R. (1995). Binding properties of coumestrol to expressed human estrogen receptor. En *Molecular and Cellular Endocrinology I* (Vol. 5).
- Schamhart, D. H. J., & Westerhof, A. C. C. (1998). *INVITED EDITORIAL Strategies for gene cloning*.
- Schmid, F.-X. (2001). *Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry*. [www.els.net](http://www.els.net)
- Senesi, N., & D'Orazio, V. (2005). FLUORESCENCE SPECTROSCOPY. *Encyclopedia of Soils in the Environment*, 4, 35–52. <https://doi.org/10.1016/B0-12-348530-4/00211-3>
- Stoddart, L. A., White, C. W., Nguyen, K., Hill, S. J., & Pflieger, K. D. G. (2016). Fluorescence- and bioluminescence-based approaches to study GPCR ligand binding. *British Journal of Pharmacology*, 173(20), 3028. <https://doi.org/10.1111/BPH.13316>
- Swan SH. (2000). Intrauterine exposure to diethylstilbestrol: long-term effects in human. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 2000, 108, 793–904.
- Tan, F., Cong, L., Li, X., Zhao, Q., Zhao, H., Quan, X., & Chen, J. (2016). An electrochemical sensor based on molecularly imprinted polypyrrole/graphene quantum dots composite for detection of bisphenol A in water samples. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 233, 599–606. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.04.146>
- The Beer-Lambert Law*. (2022). [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\\_Textbook\\_Maps/Supplemental\\_Modules\\_\(Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\)/Spectroscopy/Electronic\\_Spectroscopy/Electronic\\_Spectroscopy\\_Basics/The\\_Beer-Lambert\\_Law](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy_Basics/The_Beer-Lambert_Law)
- Theo Colborn, D. D. y P. M. (1996). *Nuestro futuro robado*. Ecoespaña Editorial.
- Translational Modification*. (2006). <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-post-translational-modification.html>
- Valentine, J. E., Kalkhoven, E., White, R., Hoare, S., & Parker, M. G. (2000). Mutations in the estrogen receptor ligand binding domain discriminate between hormone-dependent transactivation and transrepression. *Journal of Biological Chemistry*, 275(33), 25322–25329. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002497200>
- Vamisetti, G. B., Meledin, R., Nawatha, M., Suga, H., & Brik, A. (2021). The Development of a Fluorescence-Based Competitive Assay Enabled the Discovery of Dimeric Cyclic Peptide Modulators of Ubiquitin Chains. *Angewandte Chemie International Edition*, 60(13), 7018–7023. <https://doi.org/10.1002/ANIE.202013392>
- Volgin, D. V. (2014). Gene Expression: Analysis and Quantitation. *Animal Biotechnology: Models in Discovery and Translation*, 307–325. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416002-6.00017-1>
- Wang, C., Li, C., Zhou, H., & Huang, J. (2014). High-throughput screening assays for estrogen receptor by using coumestrol, a natural fluorescence compound. *Journal of Biomolecular Screening*, 19(2), 253–258. <https://doi.org/10.1177/1087057113502673>
- Werwie, M., Fehr, N., Xu, X., Basché, T., & Paulsen, H. (2014). Comparison of quantum dot-binding protein tags: Affinity determination by ultracentrifugation and FRET. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1840(6), 1651–1656. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.11.025>

- Wetherill, Y. B., Akingbemi, B. T., Kanno, J., McLachlan, J. A., Nadal, A., Sonnenschein, C., Watson, C. S., Zoeller, R. T., & Belcher, S. M. (2007). In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. En *Reproductive Toxicology* (Vol. 24, Número 2, pp. 178–198). <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.05.010>
- Williams, E. S., Panko, J., & Paustenbach, D. J. (2009). The European Union's REACH regulation: A review of its history and requirements the EU REACH regulation: A review E. S. Williams et al. En *Critical Reviews in Toxicology* (Vol. 39, Número 7, pp. 553–575). <https://doi.org/10.1080/10408440903036056>
- Wingfield, P. T. (2001). Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate. *Current protocols in protein science / editorial board, John E. Coligan ... [et al.], APPENDIX 3*, Appendix. <https://doi.org/10.1002/0471140864.PSA03FS13>
- Zhong, L., & Skafar, D. F. (2002). Mutations of tyrosine 537 in the human estrogen receptor- $\alpha$  selectively alter the receptor's affinity for estradiol and the kinetics of the interaction. *Biochemistry*, 41(13), 4209–4217. <https://doi.org/10.1021/bi0121095>

## 13 ANEXO A

### 13.1 Análisis de proteína Protparam

#### PROTEIN ANALYSIS

##### Sequence

The submitted protein sequence has 293 amino acids:

```
MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MGLNDIFEAQ KIEWHEIKRS KKNSLALS LT 50
ADQMVSALLD AEPPILYSEY DPTRPFSEAS MMGLLTNLAD RELVHMINWA 100
KRVPGFVDLT LHDQVHLLC AWLEILMIGL VWRSMHPGK LLLFAPNLLLD 150
RNQGKCVEGM VEIFDMLLAT SSRFRMMNLQ GEEFVCLKSI ILLNSGVYTF 200
LSSTLKSLEE KDHIHRVLDK ITDTLIHLMA KAGLTLQQQH QRLAQLLLIL 250
SHIRHMSNKG MEHLYSMKCK NVVPLSDLLL EMLDAHRLHA PTS 293
```

##### Molecular Weight

The average molecular weight is: 33365.9734

The monoisotopic molecular weight is: 33344.1587

The total number of atoms is: 4713

##### Amino acid composition

| Amino Acid        | Count | % Total |
|-------------------|-------|---------|
| Alanine (A)       | 16    | 5.46    |
| Arginine (R)      | 13    | 4.44    |
| Asparagine (N)    | 10    | 3.41    |
| Aspartic acid (D) | 14    | 4.78    |
| Cysteine (C)      | 4     | 1.37    |
| Glutamine (Q)     | 10    | 3.41    |
| Glutamic acid (E) | 18    | 6.14    |
| Glycine (G)       | 14    | 4.78    |
| Histidine (H)     | 21    | 7.17    |
| Isoleucine (I)    | 15    | 5.12    |
| Leucine (L)       | 50    | 17.06   |
| Lysine (K)        | 15    | 5.12    |
| Methionine (M)    | 17    | 5.80    |
| Phenylalanine (F) | 8     | 2.73    |
| Proline (P)       | 10    | 3.41    |
| Serine (S)        | 25    | 8.53    |
| Threonine (T)     | 11    | 3.75    |
| Tryptophan (W)    | 4     | 1.37    |
| Tyrosine (Y)      | 4     | 1.37    |
| Valine (V)        | 14    | 4.78    |

##### Charge and hydrophobicity

Negatively charged residues (D, E) = 32 (10.92%)

Positively charged residues (K, R, H) = 49 (16.72%)

Polar residues (C, S, Q, N, T, Y) = 64 (21.84%)

Hydrophobic residues (A, G, I, L, M, P, F, W, V) = 148 (50.51%)

The aliphatic index is: 105.84

The Grand Average of Hydropathicity (GRAVY) is: -0.049

##### Isoelectric Point

6.61 using amino acid pKa values from Bjellqvist et al

6.65 using amino acid pKa values from Wikipedia

##### Extinction Coefficient

The extinction coefficient is: 27960

A 1mg/ml (29.971  $\mu$ M) solution of your protein has an A280nm of: 0.84

If all cysteines are disulphide bonded, the extinction coefficient is: 28210

A 1mg/ml (29.971  $\mu$ M) solution of your protein has an A280nm of: 0.85

Input your A280 and click "Enter" to calculate concentration or click "New Sequence" to enter a new sequence.

## 13.2 Cromatograma de elución

