

OPTIMIZACIÓN DE ENSAYOS PARA LA DETECCIÓN DE ACTIVIDAD ESTROGÉNICA Y ANDROGÉNICA EN MUESTRAS DE AGUA

Mora, Sofía C.^{1,2}

¹ Cátedra de Patología Humana, Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas.

² Instituto de Salud y Ambiente (ISAL, UNL-CONICET), Santa Fe.

Directora: Muñoz de Toro, Mónica

Área: Ciencias Biológicas

INTRODUCCIÓN

El aumento sostenido en el uso de agroquímicos sumados a la falta de control en el tratamiento de efluentes urbanos e industriales, aumenta la posibilidad de exposición a contaminantes hormonalmente activos (HA), que se comportan como perturbadores endocrinos (PE). Los perturbadores endocrinos son sustancias que imitan o antagonizan la actividad estrogénica y/o androgénica de las hormonas endógenas (Bergman y col., 2012) y, por lo tanto, tienen la capacidad de alterar el metabolismo, la homeostasis endocrina e interferir en la señalización hormonal en seres humanos, animales domésticos y en la fauna silvestre (Bergman y col., 2012; Rivera y col., 2015; Altamirano y col., 2017; Galoppo y col., 2017). Los PE pueden estar presentes en gran variedad de productos de uso cotidiano, no sólo sintéticos sino naturales, tales como agroquímicos (pesticidas, herbicidas), conservantes, envases de alimentos, plásticos, fármacos de uso humano y veterinario, fitoestrógenos, micotoxinas, entre otros (Luque y col., 2018). Una fuente de exposición a PE es el agua. Los PE pueden encontrarse en aguas superficiales, aguas residuales, aguas subterráneas y en agua de consumo (Bistan y col., 2012). Los PE actúan en dosis muy bajas, ambientalmente relevantes. Debido a los efectos adversos que producen es importante contar con técnicas muy sensibles que permitan su detección. Para detectar la presencia de PE en un ambiente determinado se puede evaluar la actividad hormonal de mezclas de compuestos independientemente de la identidad de los compuestos presentes. Los PE mejor caracterizados son aquellos que actúan como estrógenos (Luque y col., 2018), anti-estrógenos, andrógenos o anti-andrógenos. El “*Yeast Androgen Screen Assay (YAS)*” y el “*Yeast Estrogen Screen Assay (YES)*” son bioensayos *in vitro* utilizados para evaluar la actividad hormonal en muestras de agua empleando levaduras de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* transformadas con el receptor de andrógenos humano (AR) y con el receptor de estrógenos alfa (ER α), respectivamente, por la incorporación de la secuencia de ADN codificante a su genoma (Balsiger y col., 2010). Estas levaduras contienen además plásmidos de expresión que contienen un elemento de respuesta a andrógenos (*Hormone Receptor Element, HRE*) que regula la expresión del gen reportero *lacZ*. Como consecuencia de la activación del gen *lacZ* por la exposición a compuestos con actividad androgénica, la β -galactosidasa degrada al sustrato cromógeno CPRG (Sohoni y Sumpter, 1998). La absorbancia del producto final se usa como medida de actividad hormonal.

Título del proyecto: Biotecnologías Aplicadas al Estudio de la Asociación entre Contaminación y Alteraciones Reproductivas en la Fauna y Animales de Interés Zootécnico.

Instrumento: CAI+D Orientado

Año de convocatoria: 2016

Organismo financiador: Universidad Nacional del Litoral

Director/a: Mónica Muñoz-de-Toro

OBJETIVOS

Optimizar el cultivo de levaduras y el acondicionamiento de las muestras de agua a ser utilizados en ensayos de detección de actividad estrogénica/anti-estrogénica y androgénica/anti-androgénica en muestras de agua.

METODOLOGÍA, RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Limpieza de material

Todo el material utilizado en el acondicionamiento de las muestras y los cultivos microbiológicos fue de vidrio, teflón o acetato para evitar interferencias y medidas erróneas debidas al desprendimiento de sustancia con actividad hormonal que puede ocurrir en los materiales plásticos (ej. Bisfenol A, ftalatos, etc). Los materiales, además, fueron lavados con agua calidad Milli-Q y con etanol al 100% para asegurar la remoción todos los contaminantes.

Preparación de las muestras de agua

Las hormonas sexuales endógenas y sus metabolitos son eliminadas por orina y heces contaminando el hábitat de especies con hábitos acuáticos. Para optimizar la preparación de muestras incógnitas utilizamos muestras de agua de los piletones de cría del bioterio de reptiles del ISAL. Se filtró el agua utilizando un equipo de filtrado por vacío (Lobov Científica, BsAs, Argentina), para remover el material sólido. Cambiando el filtro GF/C™ cada 200 ml. Los componentes hormonalmente activos fueron aislados por cromatografía de extracción en fase sólida empleando columnas de silica-gel Discovery® DSC-18 (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Previo a la siembra de agua se acondicionó la columna con metanol y agua de calidad Milli-Q. Se sembró una única muestra mediante vacío. La presión de vacío debió ser ajustada de manera tal de obtener una velocidad de pasaje de 1,5 gotas/segundo. Terminada la siembra, se dejaron secar las columnas por 18hs bajo campana de extracción. Las muestras fueron eluidas en frascos de vidrio color caramelo empleando acetona. Las muestras se dejaron secar bajo campana, se re-suspendieron en etanol 100% y se almacenaron a -20°C hasta su utilización en los ensayos YAS/YES.

Para el control positivo se preparó una muestra de Bisfenol A (BPA) de 20 mg/mL (dosis experimental inyectada a los reptiles del bioterio), la cual fue procesada siguiendo el mismo procedimiento que las muestras incógnitas.

Optimización de cultivos

La cepa de levadura recombinante *Saccharomyces cerevisiae* que se utilizó en este experimento fue gentilmente provista por el Prof. JP Sumpter (Stevenage, UK). Las condiciones del cultivo, constituidas por tiempo de incubación, presencia/ausencia de antibióticos (Ampicilina 100 mg/ml, Gentamicina 40 mg/ml) y número de repiques, se ajustaron hasta conseguir que las levaduras

	Condiciones de cultivo			Características del cultivo	
	Tiempo de incubación	Adición de antibióticos	Nº de repiques	Color	DO _{580nm}
1ra condición	12 horas	No	1	Verde	0,80
2da condición	12 horas	Si	1	Blanco	0,30
3ra condición	24 horas	Si	2	Blanco	0,98
4ta condición	12 horas	Si	1	Blanco	0,78

alcanzaran la fase de crecimiento exponencial (densidad óptica (DO) a 540 nm de 0,8).

Tabla 1: Condiciones y características del cultivo de levaduras recombinantes evaluadas para la optimización.

Por experiencias previas con el cultivo de esta cepa de levaduras se conoce que una coloración blanca es indicativa de un cultivo libre de contaminación biológica; por ello, el color de los cultivos fue considerado durante la optimización de las variables. La Tabla 1 resume los cambios realizados para obtener cultivos de levaduras en fase de crecimiento. La 4ta condición se seleccionó como óptima para realizar los cultivos.

Ensayos YAS/YES

Los ensayos YAS/YES se llevan a cabo en placas de 96 pocillos y se basan en el cambio de color del reactivo cromógeno CPRG por la exposición de las levaduras a compuestos con actividad hormonal o anti-hormonal. La placa se sembró con compuestos de referencia (Tabla 2) de concentración conocida para construir curvas de extrapolación y con las muestras de agua previamente acondicionadas. Como blanco de reactivos se usó etanol absoluto. También se sembró una dilución 1/6 del compuesto de referencia (“Spike”) para normalizar las medidas.

Sustancia	Actividad	Ensayo	Origen
Testosterona T1500 (T)	Androgénica	YAS	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Flutamida (F)	Anti-androgénica	YAS	Droguería Saporiti S.A.C.I.F.I.A., Buenos Aires, Argentina
17β-Estradiol (E ₂)	Estrogénica	YES	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
4-Dihidroxi-Tamoxifeno (T _M)	Anti-estrogénica	YES	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA

Tabla 2: Sustancias de actividad hormonal/anti-hormonal conocida empleadas como referencia de los ensayos YAS y YES.

En todos los pocillos de la placa se sembró un cultivo de levaduras en fase de crecimiento y luego de 3 días de incubación se midió la absorbancia a 570 nm y la turbidez a 620 nm. A partir de las medidas se calculó la turbidez corregida ($T_{\text{corregida}}$) mediante la ecuación (1):

$$T_{\text{corregida}} = A_{570\text{nm}} - (A_{620\text{nm}} - A_{\text{blanco } 620\text{nm}}) \quad (1)$$

Donde $A_{570\text{nm}}$ es la absorbancia de cada pocillo de la placa a 570 nm, $A_{620\text{nm}}$ es la absorbancia de cada pocillo de la placa a 620 nm y, $A_{\text{blanco } 620\text{nm}}$ es el promedio de las medidas de turbidez de la hilera de pocillos correspondientes al blanco.

Luego, se calculó la turbidez relativa porcentual ($T_{\text{relativa}\%}$), en función de la $T_{\text{corregida}}$ y la turbidez corregida máxima registrada para la sustancia de referencia o, en el caso de las medidas de actividad anti-hormonal, del normalizador (Spike), empleando la ecuación (2):

$$T_{\text{relativa}\%} = \frac{T_{\text{corregida}}}{T_{\text{corregida máx/Spike}}} \times 100\% \quad (2)$$

Finalmente, para obtener las curvas de medición de actividad hormonal se graficaron los valores medios de turbidez relativa porcentual respecto a las concentraciones de los compuestos de referencia. Las curvas de actividad hormonal obtenidas se muestran en la

Figura 1.

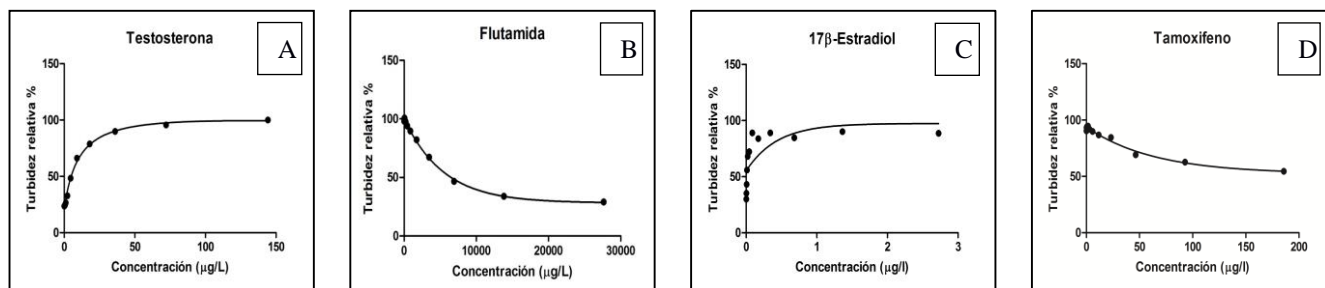


Figura 1: Yeast Androgen Screen Assay (YAS). Curvas de actividad androgénica (A), anti-androgénica (B), estrogénica (C) y anti-estrogénica (D).

A partir de las curvas se pudo determinar la actividad hormonal de las muestras por interpolación. Los resultados obtenidos indicaron para el control de BPA y para las muestras incógnitas actividad estrogénica y baja actividad anti-estrogénica. Para las pruebas de actividad androgénica y anti-androgénica, para ambas muestras, los valores dieron por debajo del límite de detección.

Actividad Hormonal	Muestra Incógnita	Control Positivo de BPA(0.02µg/ µL)
Androgénica	<LOD	<LOD
Anti-Androgénica	<LOD	<LOD
Estrogénica	0.003 µg/L	0.196 µg/L
Anti-Estrogénica	30.000 µg/L	37.700 µg/L

Como conclusión se puede decir que los ensayos YES y YAS resultan una herramienta

Tabla 3: LOD representa el Límite de Detección.

muy sensible para la detección de perturbadores endocrinos en concentraciones muy bajas. Su campo de aplicación es muy amplio según las muestras utilizadas. Por ejemplo, nos permitirá encontrar asociaciones entre la contaminación y las alteraciones reproductivas en la fauna.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Altamirano G. A., Ramos J. G., Gómez A. L., Luque E. H., Muñoz-de-Toro M., Kass L.,** 2017. Perinatal exposure to bisphenol A modifies the transcriptional regulation of the b-Casein gene during secretory activation of the rat mammary gland. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 439, 407-418.
- Balsiger H. A., De la Torre R., Lee W., Cox M. B.,** 2010. A Four-Hour Yeast Bioassay for the Direct Measure of Estrogenic Activity in Wastewater without Sample Extraction, Concentration, or Sterilization. *Science Total Environment*, 408, 1422-1429.
- Bergman A., Heindel J.J., Jobling S., Kidd K. A., Zoeller R. T.,** 2012. Interorganization Programme for the Sound Management of Chemicals.State of the Science of Endocrine Disrupting Chemical.United Nations Environment Programme and World Health Organization.
- Bistan M., Podgorelec M., Marinsek Logar R., Tisler T.,** 2012.Yeast Estrogen Screen Assay as a Tool for Detecting Estrogenic Activity in Water Bodies. *Food Technol. Biotechnol*, 50, 427-433.
- Galoppo G. H., Canesini G., Tavalieri Y.E., Stoker C., Kass L., Luque E. H., Muñoz-de-Toro M.,** 2017. Bisphenol A disrupts the temporal pattern of histofunctional changes in the female reproductive tract of Caiman latirostris. *General and Comparative Endocrinology*, 254, 75-85.
- Luque E. H., Muñoz-de-Toro M., Ramos J. G.,** 2018. Estrogenic Agonist. En: *Encyclopedia of Reproduction*, Second Edition, 2, 753-759 (Editor: Skinner M. K.).
- Rivera O. E., Varayoud J., Rodriguez H., Santaman C. G., Bosquiazzo V. L., Osti M., Belmonte N. M., Muñoz-de-Toro M., Luque E. H.,** 2015. Neonatal exposure to xenoestrogens impairs the ovarian response to gonadotropin treatment in lambs. *Reproduction*, 149, 645-655.
- Sohoni P., Sumpter J.P.,** 1998. Several environmental o estrogens are also anti-androgens. *Journal of Endocrinology*, 158, 327-339.