

**DESENVOLUPAMENT I APLICACIÓ DE
BIOASSAIGS PER A LA DETECCIÓ I
QUANTIFICACIÓ DE XENOBIÒTICS AMB
LLEVATS RECOMBINANTS**

Tania Noelia Noguerol Risco

Barcelona, 2007

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

FACULTAT DE BIOLOGIA

Programa de Doctorat de Biomedicina

Bienni 2003-2005

**DESENVOLUPAMENT I APLICACIÓ DE BIOASSAIGS PER A LA
DETECCIÓ I QUANTIFICACIÓ DE XENOBIÒTICS AMB LLEVATS
RECOMBINANTS**

Memòria presentada per Tania Noelia Noguerol Risco per a optar al títol de Doctor
per la Universitat de Barcelona

Treball realitzat sota la direcció del Dr. Benjamí Piña Capó en el Departament de
Biologia Molecular i Cel·lular de l'Institut de Biologia Molecular de Barcelona (CSIC)

Director

Tutora

Benjamí Piña Capó

Investigador del CSIC

Dpt. de Biologia Molecular i Cel·lular

Institut de Biologia Molecular de Barcelona

IBMB-CSIC

Josefa Mallol Montero

Professora titular

Dpt. de Bioquímica i Biologia Molecular

Facultat de Biologia

Universitat de Barcelona

A mis padres, Noelia y Héctor

AGRAÏMENTS

I per fi ha arribat el gran dia. No diré que ha estat fàcil perquè mentiria però totes les hores i tot l'esforç han valgut la pena.

Són molts dies els que m'he assegut davant de l'ordinador pensant: això ja s'està acabant però encara falten per escriure els agraïments. La gent té raó quan diu que és el més complicat de redactar perquè no hi ha dades, càlculs o resultats en què basar-te. Tot i així aquest és el moment idoni per a recordar a tota la gent que ha participat en aquesta etapa de la meua vida.

En primer lloc vull agrair al meu director de tesi, el Dr. Benjamí Piña, per l'oportunitat que m'ha brindat ja que només gràcies a ell ha estat possible l'elaboració d'aquest treball. Sé que m'has hagut de dedicar moltes hores i això no ho oblidaré mai. També vull agrair a la Dra. Josefa Mallol per haver acceptat ser la meua tutora.

Des d'aquestes pàgines també vull donar gràcies a totes aquelles persones que, d'una manera o altra, han contribuït a la realització d'aquesta tesi, i molt especialment:

A la Laia, hem compartit aquest camí i molts moments en ell. Ara se separa però ja saps que no és un adéu definitiu. Et trobaré a faltar.

Al Segio, per tots els moments i totes les hores de poiata que vam compartir el primer any i per ensenyar-me amb la teua forma de veure les coses que existeix una altra perspectiva de la vida molt més tranquil·la i calmada a la que he hagut de recórrer sobretot en aquests últims dies. A tu també et trobaré a faltar.

A la Marta Casado, encara recordo el primer dia que ens van presentar i la veritat he de reconèixer que sense tu aquesta tesi, i en general el meu pas pel laboratori, no hagués estat igual. T'he d'agrair moltes coses però em consta que ja les saps perquè no m'he cansat de dir't-ho i perquè ens assemblem tant en la forma de pensar que no em calen les paraules.

A la Sue, per ajudar-me en tot el que t'he demanat, que no ha estat poc, i sempre que ho he necessitat.

A la Marta Rojas, per compartir amb mi les pors, les penes i les alegries que acompanyen a molts experiments.

Al Sergi i l'Anna, no hem coincidit gaire perquè quan vau arribar jo ja estava amb un peu fora però tot i així vull que sabeu que també formeu part d'aquest treball i part del mèrit que tingui és vostre.

A la Montse Serra, per tots els teus consells i perquè sempre has solucionat totes les preguntes amb les que no he deixat d'atabalar-te fins l'últim moment.

A David Carro, aunque ya hace tiempo que no nos vemos no me he olvidado de que tú también estuviste allí para aclararme un millón de dudas.

A tota la gent de la cinquena planta, especialment a la Maria, a Rosa (tú sí que has sido clave en esta tesis porque ¿qué habría hecho yo sin ti cada vez que el fluorímetro se estropeaba? Porque siempre venías corriendo en cuanto te necesitaba y por compartir conmigo los ataques de histeria delante del "Victor3") y a Mayte (una de las pocas almas que hay en el CSIC a las 7 de la mañana y que, a esas horas intempestivas, me hacía sentirme acompañada).

Per últim i més important, vull agrair a l'Alba per totes les estones que hem compartit i perquè sempre has estat allà per a donar-me el cop de mà que necessitava.

Perquè ja sabeu que cada moment conta...

Finalmente, deseo agradecer a mi familia, especialmente a mis padres, a Noelia (por su santa paciencia con mis nulos conocimientos en informática) y a Héctor por el apoyo que me habéis dado en todo momento para que esta tesis haya llegado a su fin.

Y ya para terminar, simplemente mencionar a todas las personas que se han cruzado en mi camino y que, aunque quizás no han contribuido directamente a la elaboración de esta tesis, sí que lo han hecho en mi vida personal. Porque *"mi mayor alegría es la certeza de que cuando necesite a un amigo jamás estaré sola"*.

A tots vosaltres: "GRÀCIES"

ÍNDIX	I
ABREVIATURES	1
I. INTRODUCCIÓ	7
I.1. RECEPTORS NUCLEARS	10
I.1.1. Especificitat de la interacció receptor-ligand	11
I.1.2. El receptor d'estrògens	12
I.1.3. El receptor de progesterona	15
I.1.4. El receptor d'hidrocarburs d'aril	16
I.2. XENOBIÒTICS	20
I.2.1. Biotransformació i bioactivació	21
I.2.2. Toxicologia i contaminació mediambiental	22
I.2.3. Disrupció endocrina	24
I.2.3.1. Les hormones com a contaminants ambientals	26
I.2.3.1.1. Estrògens sintètics	26
I.2.3.2. Fitoestrògens	27
I.2.3.2.1. Genisteïna	28
I.2.3.3. Bisfenol A	29
I.2.3.4. Alquilfenols	30
I.2.3.5. Ftalats	32
I.2.3.6. Desincrustants heterocíclics	33
I.2.3.7. Fenilurees	34
I.2.3.8. Benzotiazoles	34
I.2.3.9. Contaminants orgànics persistents	35
I.2.3.9.1. Compostos organoclorats	35
▪ Clorobenzens	38
▪ Policlorobifenils	39
▪ 4,4'-DDT i 4,4'-DDE	41
▪ Hexaclorociclohexans	42
I.3. BIOASSAIGS BASATS EN LA UTILITZACIÓ DE LLEVATS RECOMBINANTS	43
I.3.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> com a model genòmic	45
I.3.2. Gens Reporter	47
I.3.2.1. Gen reporter <i>gfp</i>	48
I.3.2.2. Gen reporter <i>lacZ</i>	49
I.3.2.3. Gen reporter <i>gus</i>	50
I.3.3. Receptors nuclears quimèrics	50
I.3.3.1. Proteïna LexA	50
I.3.3.2. Sistema L40-LexA-gen reporter	51
II. OBJECTIUS	53
III. MATERIALS I MÈTODES	57
III.1. CULTIUS CEL·LULARS	59
III.1.1. Medis de cultiu	59
III.1.1.1. Medis de cultiu bacterians	59
III.1.1.2. Medis de cultiu de llevats	60
III.1.2. Soques utilitzades	61
III.1.2.1. Soques bacterianes (<i>Escherichia coli</i>)	61
III.1.2.2. Soques de llevat (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	61
III.1.3. Manipulació i procediments generals de treball amb <i>S. cerevisiae</i>	63
III.1.3.1. Procediments d'esterilització	63
III.1.3.2. Creixement i manteniment de soques de <i>S. cerevisiae</i>	63
III.2. MÈTODES DE BIOLOGIA MOLECULAR	64

III.2.1.	Plasmidis	64
III.2.2.	Obtenció i amplificació de DNA	67
III.2.2.1.	Aïllament i purificació de bandes de DNA inferiors a 50 kb de llargada d'un gel d'agarosa	67
III.2.2.2.	Lligació	68
III.2.2.3.	Transformació bacteriana	69
III.2.2.4.	Preparació de DNA a petita escala (Miniprep)	71
III.2.2.5.	Preparació de DNA a gran escala (Maxiprep)	72
III.2.3.	Transformació de soques de llevat amb DNA plasmídic	74
III.3.	EXTRACCIÓ DE COMPOSTOS HIDROFÒBICS I HIDROFÍLICS PRESENTS EN MOSTRES REALS	75
III.3.1.	Obtenció d'extractes orgànics	76
III.3.2.	Obtenció de lixiviats (lixiviació)	77
III.4.	DESENVOLUPAMENT DEL RYA	77
III.4.1.	Sistemes de llevats utilitzats	77
III.4.1.1.	Sistema basat en el gen reporter <i>gfp</i>	78
III.4.1.2.	Sistema basat en el gen reporter <i>lacZ</i>	79
III.4.1.2.1.	Sistema basat en el receptor de progesterona més el gen reporter <i>lacZ</i> (PR-RYA)	80
III.4.1.2.2.	Sistema basat en el receptor d'hidrocarburs d'aril més el gen reporter <i>lacZ</i> (AhR-RYA i YCM-RYA)	80
III.4.1.2.3.	Sistema basat en el receptor d'estrògens més el gen reporter <i>lacZ</i> (ER-RYA)	80
III.4.1.3.	Sistema basat en el gen reporter <i>gus</i>	81
III.4.1.3.1.	Sistema GAL1-GUS	81
III.4.2.	Assaigs RYA	81
III.4.2.1.	Assaig basat en el gen reporter <i>gfp</i>	83
III.4.2.2.	Assaig basat en el gen reporter <i>lacZ</i>	83
III.4.2.2.1.	Determinació de l'activitat constitutiva del gen reporter <i>lacZ</i>	83
III.4.2.2.2.	Assaig colorimètric (ONPG) basat en el gen reporter <i>lacZ</i>	84
III.4.2.2.3.	Assaig fluoromètric (MUGal) basat en el gen reporter <i>lacZ</i>	86
III.4.2.3.	Assaig basat en el gen reporter <i>gus</i> (MUG)	87
III.4.2.4.	Assaig per a discernir entre els efectes tòxics i els efectes inhibitoris (Soca GAL1-GUS)	88
III.5.	MÈTODE DE CàLCUL	89
III.5.1.	Model matemàtic	90
III.5.2.	Anàlisi de les dades	91
III.5.3.	Càlcul dels equivalents de 17 β -estradiol	92
IV.	RESULTATS I DISCUSSIÓ	93
IV.1.	DESENVOLUPAMENT I ANÀLISI FUNCIONAL DE DIFERENTS SISTEMES DE BIOASSAIG PER A LA DETECCIÓ DE XENOBIÒTICS EN <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	95
IV.1.1.	Sistema basat en el gen reporter <i>gfp</i>	95
IV.1.2.	Sistema basat en el gen reporter <i>lacZ</i>	97
IV.1.3.	Sistema basat en el gen reporter <i>gus</i>	98
IV.1.3.1.	Cinètica del gen reporter <i>gus</i> a diferents pHs	99
IV.1.3.2.	Estudi de la presència d'un permeabilitzador	100
IV.1.4.	Comparació dels gens reporter <i>lacZ</i> i <i>gus</i>	102
IV.1.4.1.	Cinètica de substrats creuats (MUG i MUGal)	102
IV.1.4.2.	Comparació de la sensibilitat dels sistemes basats en els gens reporter <i>lacZ</i> i <i>gus</i>	103
IV.1.5.	Sistemes RYA	104

IV.1.5.1.	Sistema basat en el receptor de progesterona més el gen reporter <i>lacZ</i> (PR-RYA)	104
IV.1.5.2.	Sistema basat en el receptor d'hidrocarburs d'aril més el gen reporter <i>lacZ</i> (AhR-RYA i YCM-RYA)	107
IV.1.5.3.	Sistema basat en el receptor d'estrògens més el gen reporter <i>lacZ</i> (ER-RYA)	108
IV.1.6.	Anàlisi estadística dels límits de detecció per als sistemes ER-RYA i YCM-RYA	110
IV.1.7.	Estudi de la dualitat d'un fitoestrogen natural: la Genisteïna. Anàlisi de la seva activitat inhibidora	112
IV.1.7.1.	Discerniment entre els efectes tòxics i els efectes inhibitoris	113
IV.1.8.	Discussió general	114
IV.2.	AVALUACIÓ PER RYA DE LES INTERACCIONS DE DOS RECEPTORS DE VERTEBRATS (ER I AHR) AMB DIFERENTS CONTAMINANTS PERSISTENTS I PESTICIDES	119
IV.2.1.	Anàlisi de la capacitat d'interacció amb l'ER i l'AhR	119
IV.2.2.	Requeriments estructurals per a la interacció dels PCBs amb l'ER i l'AhR. Establiment de relacions entre la seva estructura química i l'afinitat pels receptors	125
IV.2.3.	Discussió general: estudi de l'aparent promiscuïtat de l'ER i l'AhR, <i>cross-talk</i> entre les seves vies de senyalització i disseny de nous compostos per a substituir aquells que tenen un risc demostrat	130
IV.3.	INTERCALIBRAT EUROPEU PER A LA DETECCIÓ D'ESTROGENICITAT EN MOSTRES D'AIGUA MITJANÇANT RYA	133
IV.3.1.	Intercalibrat 1	133
IV.3.1.1.	Descripció dels resultats	133
IV.3.1.2.	Límit de detecció i anàlisi de falsos positius i negatius	135
IV.3.1.3.	Anàlisi de l'exactitud i precisió	136
IV.3.1.4.	Potencial estrogènic relatiu i comparació dels EEQ mesurats vers els valors dels EEQ teòrics	137
IV.3.1.5.	Efectes de la matriu	141
IV.3.1.6.	Recomanacions per a incrementar la reproductibilitat i la robustesa de l'anàlisi	142
IV.3.2.	Intercalibrat 2	142
IV.3.2.1.	Introducció de millores per a incrementar la reproductibilitat i la robustesa de l'anàlisi	142
IV.3.2.2.	Descripció dels resultats	143
IV.3.2.3.	Anàlisi de falsos positius i negatius	145
IV.3.2.4.	Variació intra i inter-laboratoris	146
IV.3.2.5.	Potencial estrogènic relatiu	147
IV.3.2.6.	Discussió general	148
IV.4.	MONITORITZACIÓ DE L'ACTIVITAT ESTROGÈNICA EN AIGÜES RESIDUALS I DELS PRODUCTES DE LA SEVA DESACTIVACIÓ ENZIMÀTICA	150
IV.4.1.	Valoració per RYA de l'eliminació de l'activitat estrogènica després del tractament de mostres d'aigua residual per depuradores	150
IV.4.1.1.	Estudi de l'Estació Depuradora d'Aigües Residuals de Terrassa	150
IV.4.1.2.	Estudi de dues depuradores de Brasil	154
IV.4.1.3.	Discussió general	155
IV.4.2.	Valoració per RYA de l'eliminació de l'activitat estrogènica d'hormones naturals i sintètiques d'aigües residuals per diferents tractaments enzimàtics	157
IV.4.2.1.	Discussió general	159

IV.5. DETERMINACIÓ PER RYA DE L'ESTROGENICITAT EN SEDIMENTS DE L'EMBASSAMENT DE FLIX, VALORACIÓ I ANÀLISI ESTADÍSTICA DELS RESULTATS OBTINGUTS	161
IV.5.1. Determinació per RYA de l'activitat estrogènica present en els sediments	162
IV.5.2. Anàlisi de contaminants presents en les mostres de sediments	164
IV.5.3. Valoració i anàlisi estadística dels resultats obtinguts	166
IV.5.3.1. Prova de Kolmogorov-Smirnov	166
IV.5.3.2. Anàlisi factorial	169
IV.5.3.3. Comparació de la composició química de les mostres estrogèniques i no estrogèniques	171
IV.5.3.4. Correlació entre la composició química i l'estrogenicitat dels extractes orgànics i dels lixiviats	172
IV.5.4. Anàlisi de falsos positius i negatius	174
IV.5.5. Comparació dels EEQ mesurats vers els valors dels EEQ teòrics	176
IV.5.6. Discussió general	177
V. CONCLUSIONS	179
VI. BIBLIOGRAFIA	183
VII. ANNEXOS	215
ANNEX I	217
ANNEX II	218
ANNEX III	219

ABREVIATURES

- 4,4'-DDD:** 1,1-dicloro-2,2-bis(4-clorofenil)età
- 4,4'-DDE:** 1,1-dicloro-2,2-bis(4-clorofenil)etilè
- 4,4'-DDT:** 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)età
- σ :** variància
- AF (AF-1 i AF-2):** dominis amb funció d'activació transcripcional
- AhR:** receptor d'hidrocarburs d'aril
- AhR-gfp:** sistema basat en l'AhR de ratolí més el gen reporter *gfp*
- AhR-lacZ:** sistema basat en l'AhR de ratolí més el gen reporter *lacZ*
- AP:** alquilfenol
- APE:** alquilfenol polietoxilat
- ARNT:** proteïna nuclear translocadora de l'AhR
- ASE:** extracció accelerada amb solvent (*Accelerated Solvent Extractor*)
- BBP:** butil benzil ftalat
- b.d.l.:** per sota del límit de detecció (*below detection limit*)
- BPA:** bisfenol A
- BZT:** benzotiazole
- BZT-OH:** 3'-hidroxi benzotiazole
- CBs:** clorobenzens
- DBD:** domini d'unió al DNA (*DNA Binding Domain*)
- DBP:** dibutil ftalat
- DEHP:** bis(2-etilhexil) ftalat
- DEP:** dietil ftalat
- DES:** dietilestilbestrol
- DMP:** dimetil ftalat
- DO:** densitat òptica
- E1:** estrona
- E2:** 17 β -estradiol
- E3:** estriol
- EE2:** 17 α -etinilestradiol
- EC₁₀:** concentració de lligand que representa el 10% de la resposta màxima (*Effective Concentration*)
- EC₅₀:** valor que representa la concentració del compost testat que correspon a la meitat de l'activitat màxima (*Effective Concentration*)
- EDCs:** disruptors endocrins (*Endocrine Disruptor Compounds*)
- EEF:** factor d'equivalència a l'estradiol (*Estradiol Equivalency Factor*)
- EEQ:** equivalents de 17 β -estradiol (*Estradiol Equivalent*s)
- EPA:** Agència de Protecció Mediambiental dels EEUU (*Environmental Protection Agency*)

- ER:** receptor d'estrògens
- ER-RYA:** sistema basat en l'ER més el gen reporter *lacZ*
- ERE:** element de resposta a estrògens (*Estrogen Response Element*)
- GC-MS:** cromatografia de gasos i espectrometria de masses
- GEB:** tampó d'extracció del *gus* (*Gus Extraction Buffer*)
- GFP:** proteïna verda fluorescent (*Green Fluorescent Protein*)
- HCB:** hexaclorobenzè
- HCH:** hexaclorociclohexans (α -HCH, β -HCH, γ -HCH)
- HRP:** peroxidasa del rave picant (*horseradish peroxidase*)
- IC₅₀:** valor que representa la concentració d'inhibidor que redueix la resposta de l'efector fins el 50% (*Inhibition Concentration*)
- LBD:** domini d'unió al lligand (*Ligand Binding Domain*)
- LC-MS:** cromatografia líquida i espectrometria de masses
- LC-MS/MS:** cromatografia líquida i espectrometria de masses/masses
- LOD:** límit de detecció (*Limit Of Detection*)
- MetBZT:** 2-metil benzotiazole
- MUG:** 4-metilumbeliferil β -D-glucurònid
- MUGal:** 4-metilumbeliferil β -D-galactopirànòsid
- n.a:** no aplicable
- n.d:** no determinat
- NP:** nonilfenol
- NP₁EO:** nonilfenol monoetoxilat
- NP₂EO:** nonilfenol dietoxilat
- OCs:** compostos organoclorats (*Organochlorine Compounds*)
- OP:** octilfenol
- ORF:** pauta oberta de lectura (*Open Reading Frame*)
- PCBs:** policlorobifenils
- PeCB:** pentaclorobenzè
- POPs :** contaminants orgànics persistents (*Persistent Organic Pollutants*)
- PR:** receptor de progesterona
- PR-gfp:** sistema basat en el PR humà més el gen reporter *gfp*
- PR-lacZ:** sistema basat en el PR humà més el gen reporter *lacZ*
- PVC:** clorur de polivinil (*PolyVinyl Chloride*)
- RYA:** assaig basat en llevats recombinants (*Recombinant Yeast Assays*)
- SD:** desviació estàndard
- SDS:** dodecil sulfat sòdic (*Sodium Dodecyl Sulfate*)
- Sig. (bilateral):** significació bilateral
- STP:** planta de tractament d'aigües residuals (*Sewage Treatment Plant*)

TBT: tributil estany

TCDD: 2,3,7,8 tetraclorodibenzo-p-dioxina

TOC: quantitat total de matèria orgànica (*Total Organic Content*)

TR: receptor d'hormona tiroïdal

U.F.: unitats de fluorescència

WFD: *Water Framework Directive*

X: mitjana

XRE: element de resposta a xenobiòtics (*Xenobiotic Response Element*)

YCM-RYA: sistema basat en l'AhR humà més el gen reporter *lacZ*

Y-PER: *Yeast Protein Extraction Reagent*

I. INTRODUCCIÓ

El desenvolupament tecnològic i industrial ha significat prosperitat i benestar per a la humanitat, però també ha implicat un alarmant deteriorament del medi ambient. Durant dècades, tones de substàncies biològicament actives, sintetitzades per a la seva utilització en agricultura, indústria, medicina, etc., han estat abocades en el medi ambient sense tenir en compte les possibles conseqüències. La manca de mètodes analítics i toxicològics apropiats, tant per a identificar aquestes substàncies i els seus subproductes com per a determinar la seva activitat biològica i el seu potencial efecte sobre els éssers vius, ha fet que l'impacte sobre el medi ambient d'aquests productes hagi passat, i en gran mesura encara ho fa, inadvertit.

El despertar de la consciència científica i social sobre les possibles implicacions de la presència de contaminants d'origen antropogènic en el medi ambient va tenir lloc a nivell mundial l'any 1962 amb la publicació del llibre *Silent Spring* o Primavera Silenciosa (Carson, 1962). En aquest llibre la seva autora, Rachel Carson, va ser la primera en proclamar els efectes dels disruptors endocrins sobre la fauna i la salut humana i alertava de l'aparició de certes alteracions en espècies animals, com l'aprimament de la closca dels ous de les aus i el seu conseqüent trencament i pèrdua d'eficiència, que atribuïa a l'exposició a compostos químics sintètics com el DDT i els seus derivats. Des d'aleshores, un gran nombre de substàncies han estat identificades com a perilloses per a la salut humana i/o mediambiental, i la seva utilització ha estat o bé prohibida o bé regulada a través de diferents legislacions amb la finalitat de reduir en la mesura possible la seva exposició.

Per tant, la contaminació química planteja un gran perill per als ecosistemes naturals i té un gran impacte en la disponibilitat dels recursos d'aigua. Entre els diferents tipus de contaminants, aquells que interaccionen amb el metabolisme dels sistemes reguladors i/o hormonals dels éssers vius són probablement els més perillosos ja que poden ser tòxics a concentracions molt baixes, a vegades en el límit de detecció dels procediments analítics convencionals o fins i tot per sota (Colborn, 1995). Aquests compostos amb activitat biològica específica reben el nom general de xenobiòtics. Els xenobiòtics poden actuar conjuntament de manera que quantitats petites, aparentment insignificants, de xenobiòtics individuals poden tenir un important efecte acumulatiu. Donada la seva toxicitat potencial a baixes concentracions, és fonamental desenvolupar les eines capaces de detectar les interaccions entre els compostos químics i els receptors cel·lulars *in vitro*.

Els bioassaigs basats en la utilització de llevats s'estan convertint en eines generals per a la detecció i quantificació de lligands de receptors nuclears en diferents tipus de mostres (Coldham *et al.*, 1997; Garcia-Reyero *et al.*, 2001; Andersen *et al.*,

1999; Bovee *et al.*, 2005). En els últims anys, aquests bioassaigs, també coneguts com a *Recombinant Yeast Assays* (RYA), han tingut múltiples aplicacions entre les quals es pot destacar la correlació de la presència d'una gran diversitat de xenobiòtics amb activitat hormonal en mostres ambientals (Feldman and Krishnan, 1995; Thomas *et al.*, 2001; Quirós *et al.*, 2005). En aquest treball s'han desenvolupat diferents estratègies basades en l'expressió de receptors nuclears en llevats per tal de detectar i quantificar compostos xenobiòtics.

I.1. RECEPTORS NUCLEARS

Un receptor cel·lular és una proteïna capaç de desencadenar respostes cel·lulars específiques després d'unir-se a una molècula senyalitzadora, el lligand. Els lligands poden variar en la seva natura, des de proteïnes a ions químics, però són específics per a cada receptor. Una de les diferents maneres de classificar els receptors cel·lulars és en receptors nuclears i receptors de membrana. Els receptors nuclears es troben tant en el nucli com en el citoplasma cel·lular, contràriament als receptors de membrana, que es troben en la membrana cel·lular i necessiten la presència d'un segon missatger per a produir una resposta.

Els receptors nuclears de vertebrats són dianes conegudes per a diferents productes químics que se sap que són perillosos per al medi ambient. Tots els seus lligands són compostos lipofílics que travessen la membrana plasmàtica, passen al citoplasma i posteriorment al nucli. Aquests receptors inclouen els receptors hormonals, que uneixen específicament diversos tipus d'hormones tant esteroidees (andrògens, estrògens, progestàgens, mineralcorticoides i glucocorticoides) com no esteroidees (tiroïdals i retinol), i l'AhR, entre d'altres. Un cop associats amb els seus respectius lligands, els receptors nuclears actuen com a factors transcripcionals en el nucli cel·lular activant o reprimint l'expressió dels gens als quals regulen (Parker, 1991). Les constants de la unió receptor-ligand estan típicament per sota del nivell nM, la qual cosa fa que sigui el sistema regulador més sensible en els éssers vius. Tant és així que les alteracions del balanç hormonal per substàncies exògenes poden tenir efectes fisiològics profunds, des de disfuncions sexuals i de desenvolupament a càncer.

Aquest treball s'ha centrat en l'estudi d'aquells xenobiòtics capaços d'interaccionar amb tres d'aquests receptors nuclears presents en tots els vertebrats: el receptor d'estrògens (ER), el receptor d'hidrocarburs d'aril (AhR) i el receptor de progesterona (PR).

I.1.1. Especificitat de la interacció receptor-ligand

L'acció dels lligands hormonals en les cèl·lules diana ve determinada per una unió específica i de molt elevada afinitat amb els receptors. L'especificitat dels receptors cel·lulars pels seus lligands és variable. La interacció receptor-ligand pot ser massa específica per a permetre la unió de substàncies exògenes a menys que mimetitzin perfectament el seu lligand natural o molt poc específica, cas dels anomenats receptors "promiscus", que constitueixen una diana important per a molts contaminants químics. El mimetisme de substàncies té grans conseqüències fisiològiques, per exemple, els opioïdes a l'interaccionar amb els receptors del cervell provoquen resultats dramàtics. No obstant això, aquestes interaccions altament específiques rarament presenten una preocupació ambiental important ja que els requeriments estructurals tan sols són assolits per un nombre limitat d'estructures químiques. Per això en aquest treball s'han estudiat dos receptors de baixa especificitat: el receptor d'estrògens (ER) i el receptor d'hidrocarburs d'aril (AhR), dels que és conegut que s'uneixen a una gran varietat de substàncies químiques. L'interès en el seu estudi radica en què la seva activació ectòpica per contaminants comuns pot conduir a una gran varietat de desordres reproductius i de la salut.

Tot i que evolutivament l'ER i l'AhR no estan relacionats, comparteixen la característica de ser capaços d'unir-se a lligands aromàtics. El descobriment de què alguns compostos són capaços d'interaccionar amb els dos receptors amb una afinitat significativa és rellevant. L'origen molecular de la promiscuitat de lligand de l'ER i l'AhR probablement resideix en les estructures dels seus respectius dominis d'unió al lligand (veure més endavant) donat que comparteixen algunes característiques, com una contribució important de les interaccions π - π *stacking* en el reconeixement del lligand (Jacobs *et al.*, 2003). Aquestes interaccions són menys específiques que les que estan basades en ponts d'hidrogen i que confereixen l'especificitat de lligand en la majoria dels receptors nuclears (Jacobs *et al.*, 2003). A més, el domini d'unió al lligand de l'ER presenta una cavitat hidrofòbica d'unió quasi dues vegades el volum de l'estradiol, el seu lligand natural, una característica no compartida per altres receptors hormonals amb alta especificitat de lligand (Pike *et al.*, 2000). Això fa que moltes molècules puguin teòricament encaixar en aquesta cavitat i, per tant, reproduir com a mínim algunes de les reorganitzacions estructurals, conduint a l'activació dels gens diana.

L'ER constitueix un potent activador transcripcional en molts sistemes, incloent el llevat, probablement degut a la seva forta interacció amb una gran varietat de proteïnes, algunes de les quals tenen les característiques dels coactivadors transcripcionals (Shibata *et al.*, 1997; Mak *et al.*, 1999; Edwards, 2000). L'AhR és un activador molt més dèbil per ell mateix. No obstant això, la seva via de senyalització implica la unió a un fort coactivador, l'ARNT, el que augmenta el seu potencial d'activació transcripcional (Denison and Nagy, 2003). Aquesta capacitat d'ambdós receptors d'interaccionar amb diferents coactivadors també pot contribuir a la seva susceptibilitat per a ser activats per substàncies exògenes.

I.1.2. El receptor d'estrògens

El receptor d'estrògens (ER) pertany a la família dels receptors d'esteroides que inclou molts activadors transcripcionals condicionals capaços de promoure, o en alguns casos inhibir, l'expressió de gens diana després de la unió dels seus lligands i que té representants en tot el regne animal, però no en fongs ni plantes. Tots aquests receptors comparteixen una estructura similar formada per una sèrie de regions o dominis comuns en tots ells, encara que la llargada total pot variar entre els 427 aminoàcids del receptor de la vitamina D i els 984 del receptor dels mineralcorticoides.

Un receptor nuclear típic conté les següents regions (Ruff *et al.*, 2000) (Figura I.1):

- A/B: és el domini N-terminal del receptor. És força variable i conté un dels dos dominis amb funció d'activació transcripcional (AF) que presenten els receptors nuclears, l'AF-1.
- C: és el domini d'unió al DNA (DBD, *DNA Binding Domain*). Es troba molt conservat. Té com a diana seqüències específiques de DNA conegudes com a elements de resposta a hormones. Conté dos dits de zinc, estructures en forma de llaç que presenten un anell d'aquest metall format per un àtom de zinc i quatre residus de cisteïna. Els dos dits són necessaris per a unir-se al DNA; mentre que el dit N-terminal determina l'especificitat de la unió al DNA (Green *et al.*, 1988), el dit C-terminal sembla implicat en l'estabilitat de la unió al DNA així com en la dimerització dels receptors (Parker, 1991).
- D o *hinge*: és la regió central i també és força variable. Conté la senyal de localització nuclear que determina si un receptor lliure és citoplasmàtic o nuclear (Ikeda *et al.*, 2001).

- E: és una regió hidrofòbica i modular. Conté el domini d'unió al lligand (LBD, *Ligand Binding Domain*) i el lloc d'unió d'una proteïna de xoc tèrmic, l'Hsp90. També conté el segon AF implicat en la transactivació, l'AF-2.
- F: és el domini C-terminal.

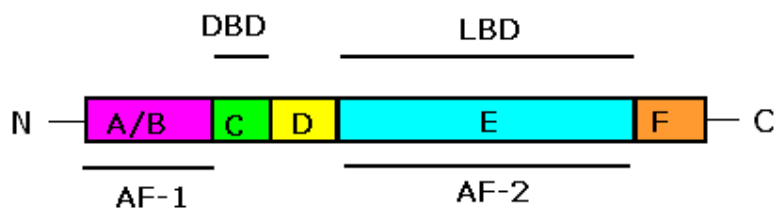


Figura I.1. Regions d'un receptor hormonal nuclear.

Els dominis d'activació AF-1 i AF-2 són regulats de manera diferent, com s'ha demostrat per anàlisis mutacionals en receptors d'esteroides (Mangelsdorf *et al.*, 1995). L'AF-2 és estrictament dependent d'hormona, ja que la unió del lligand és necessària per a provocar el canvi conformacional que el deixarà exposat a la maquinària transcripcional (Johnson and Craig, 2000). En absència de lligand, el domini E reprimeix l'AF-1 per mecanismes que encara no són ben coneguts, tot i que sembla probable que sigui com a conseqüència de la unió de l'Hsp90 al domini E.

L'LBD té una estructura terciària relativament similar en tots els receptors nuclears. Aquesta estructura està formada per onze o tretze hèlixs α i vàries làmines β que formen una cavitat d'unió lipofílica (Williams and Sigler, 1998). Dins l'LBD es poden distingir tres subregions: AF-2 (ja comentada anteriorment), que a més d'activar la transcripció conté un o dos aminoàcids de contacte amb el lligand; H9, que participa sobretot en el procés de dimerització del receptor (Bourguet *et al.*, 1995; Whitfield *et al.*, 1999); i E1, que resulta crucial per a aquest procés, segurament formant part de l'estructura adequada per a la formació de dímers (Bourguet *et al.*, 1995). A més, a prop del domini N-terminal de la regió E1 es troba un residu de lisina molt conservat que és essencial per a l'activació transcripcional (Whitfield *et al.*, 1995; Nolte *et al.*, 1998).

Des del 1996 se sap que en la majoria, sinó en tots els vertebrats, es troben dues formes de l'ER, α i β , amb diferències significatives en quant a la seva expressió en els diferents teixits i a la seva especificitat per alguns lligands (Kuiper *et al.*, 1996). L'expressió de l'ER és responsable de regular molts processos importants com el

creixement, la diferenciació i el funcionament de diversos teixits diana. La Figura I.2 mostra els diferents teixits a on hi té lloc.

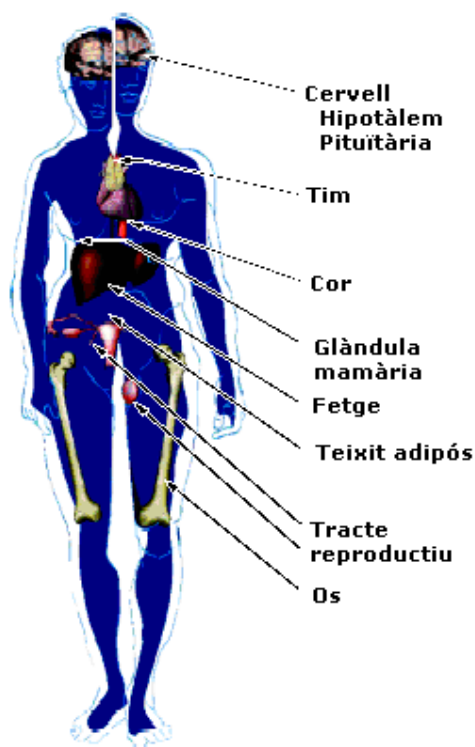


Figura I.2. Teixits i òrgans a on s'expressa el receptor d'estrògens.

La localització subcel·lular de l'ER en absència de lligand ha estat objecte de controvèrsia, havent-se descrit tant en el nucli com en el citoplasma (Welshons *et al.*, 1984; Zhang *et al.*, 2004; Cammarata *et al.*, 2004). En qualsevol cas, se sap que està unit a un complex multiproteic de xaperones, proteïnes encarregades d'afavorir el plegament proteic en general, que impedeixen que el receptor es pugui unir al DNA. Aquest complex inclou un dímer de la proteïna Hsp90 (Catelli *et al.*, 1985). Un cop s'uneix el lligand al receptor es produeix un canvi de conformació que provoca l'alliberament del complex multiproteic. Això possibilita que el complex receptor-ligand dimeritzi i s'uneixi a seqüències de DNA específiques. Aquestes seqüències s'anomenen Elements de Resposta a Estrògens (ERE, *Estrogen Response Elements*) i són seqüències palindròmiques situades en els promotors dels gens, a prop de llocs d'unió per a altres factors de transcripció (Mueller, 2004; Scrimshaw and Lester, 2004). Quan el complex receptor-ligand s'uneix a l'ERE, la resta de factors també s'uneixen al promotor i s'activa la transcripció del gen (Parker, 1991) (Figura I.3).

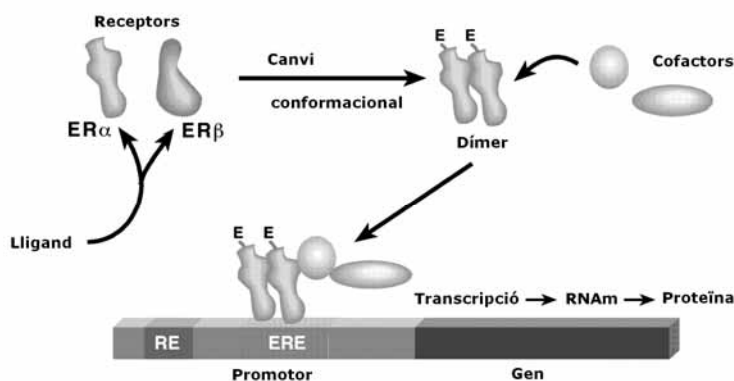


Figura I.3. Mecanisme d'acció dels lligands que interaccionen amb el receptor d'estrògens. Els disruptors endocrins afecten principalment aquest mecanisme imitant o bloquejant l'acció dels lligands naturals.

L'ER mitjança la resposta estrogènica dels esteroides femenins, el 17 β -estradiol i els seus derivats. Constitueix la diana per als disruptors endocrins amb efectes feminitzants (Colborn, 1995; Colborn *et al.*, 1993), degut a la seva promiscuïtat que li confereix una gran capacitat d'unió a molts compostos químics. Gran quantitat de compostos naturals, farmacèutics o industrials com pesticides, presenten activitat estrogènica, és a dir, actuen com a lligands de l'ER unint-se i activant aquest receptor (Colborn, 1995; Mangelsdorf *et al.*, 1995; Colborn *et al.*, 1993; Coldham *et al.*, 1997; Elsby *et al.*, 2000; Scippo *et al.*, 2004; Céspedes *et al.*, 2004). Per altra banda, els antiestrògens són compostos que antagonitzen l'acció dels estrògens competint pel seu receptor de manera que s'hi uneixen bloquejant els efectes dels lligands naturals (Barrón-González *et al.*, 2001).

La presència de lligands de l'ER en l'aigua s'ha convertit en un important indicador de la contaminació humana i industrial. Hi ha múltiples informes dels seus efectes sobre la fauna exposada (Solé *et al.*, 2003a; Solé *et al.*, 2003b; Wester *et al.*, 2004; Mills and Chichester, 2005), tot i que les evidències del seu risc per a la salut humana segueixen essent poc concloents (Safe, 2005).

I.1.3. El receptor de progesterona

El receptor de progesterona (PR) és un receptor nuclear hormonal que, a l'igual que l'ER, pertany a la família dels receptors d'esteroides. El PR en general presenta una distribució més limitada en els teixits que altres receptors d'esteroides i només s'expressa en vies reproductores femenines, glàndula mamària, sistema nerviós central i hipòfisi. Presenta dues isoformes moleculars, la isoforma A i la isoforma B, que presenta 164 aminoàcids més a l'extrem N-terminal. Les dues isoformes

provenen d'un sol gen sota control de dos promotors diferents, tenen afinitats similars vers els llocs d'unió al DNA i poden homodimeritzar o heterodimeritzar entre elles (Shao *et al.*, 2003).

Els efectes d'activació dels progestàgens, nom genèric dels agents que tenen capacitat de produir efectes similars als de la progesterona, depenen de l'activació d'ambdues isoformes. El procés (Figura I.4) és essencialment el mateix que es dona en el receptor d'estrògens, trobant-se implicada també l'Hsp90, entre d'altres (Cox and Miller, 2002).

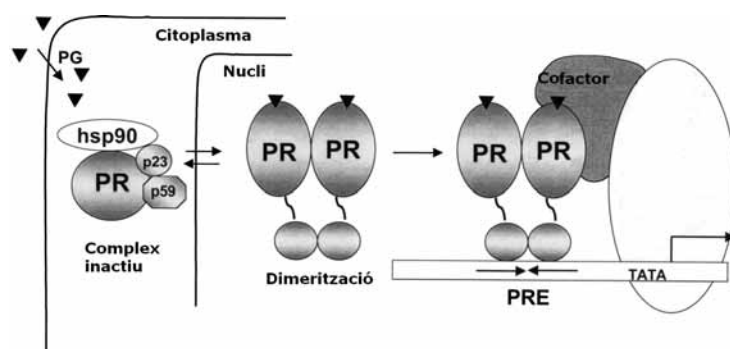


Figura I.4. Mecanisme d'acció dels disruptors endocrins que afecten el receptor de progesterona (Leonhardt and Edwards, 2002).

Dels tres receptors hormonals estudiats, les substàncies menys conegudes són les que interaccionen amb el receptor de progesterona. S'han fet pocs estudis per a valorar la presència i els efectes d'aquests compostos. Tot i així, no és ni molt menys descartable la presència de progestàgens en diferents ecosistemes i, tot just ara, està augmentant l'interès per tal de localitzar, classificar i conèixer les conseqüències d'una exposició continuada. També s'ha de tenir en compte que molts compostos amb activitat estrogènica (com els compostos organoclorats, alquilfenols, bisfenol A, etc.) poden unir-se igualment al receptor de progesterona (Kuyl *et al.*, 1998; Scippo *et al.*, 2004).

I.1.4. El receptor d'hidrocarburs d'aril

El receptor d'hidrocarburs d'aril (AhR), també conegut com a receptor de dioxines, és un factor de transcripció activat per lligand que pertany a la família de proteïnes d'unió al DNA *helix-loop-helix* (Hahn *et al.*, 1997) i que, per tant, no està emparentat ni evolutivament ni estructuralment (Figura I.5) amb l'ER o el PR. No obstant això, tant pel seu mecanisme de funcionament a nivell molecular com per les respostes fisiològiques el·licitades per la seva activació es pot considerar part de la resposta endocrina en sentit ampli.



Figura I.5. Regions del receptor d'hidrocarburs d'aril.

S'ha vist que les cèl·lules no activades per lligand presenten en el citoplasma un complex multiproteic de proteïnes tipus xaperones entre les quals predomina l'Hsp90 (Carver *et al.*, 1994). Un cop s'uneix el lligand, l'Ahr interacciona amb una proteïna nuclear translocadora, l'ARNT, i entra al nucli cel·lular (Figura I.6). En aquest procés es dona un canvi conformacional que implica la dissociació de l'Hsp90 del complex receptor-ligand facilitant-se la formació de l'heterodímer de l'Ahr amb l'ARNT. Un cop en el nucli aquest heterodímer és capaç d'unir-se a seqüències específiques del DNA anomenades Elements de Resposta a Xenobiòtics (XRE, *Xenobiotic Response Elements*). En aquest procés participen altres cofactors i diversos coactivadors. Aquesta interacció activa la transcripció d'enzims específics implicats en el metabolisme de xenobiòtics com ara els citocroms P-4501A1 (CYP1A1) i P-4501B1 (CYP1B1), entre d'altres (Jones *et al.*, 1985; Schaldach *et al.*, 1999; Nebert *et al.*, 1993; Sutter *et al.*, 1994; Safe, 1995a). L'Ahr també regula altres gens implicats en la proliferació cel·lular, regulació del cycle cel·lular i apoptosi (Hankinson, 1995; Sogawa and Fujii-Kuriyama, 1997; Hahn, 1998; Kolluri *et al.*, 1999; Matikainen *et al.*, 2001).

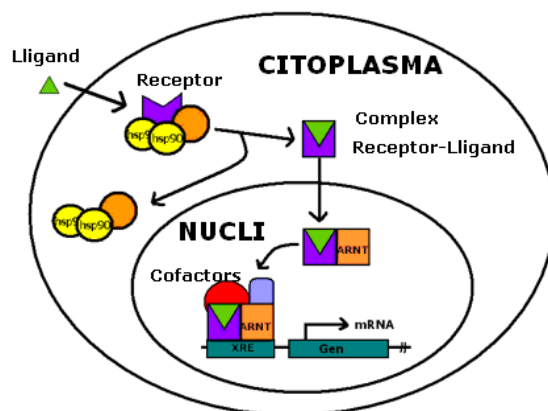


Figura I.6. Esquema simplificat del mecanisme d'acció dels lligands que interaccionen amb el receptor d'hidrocarburs d'aril. Els disruptors endocrins afecten principalment aquest mecanisme imitant o bloquejant l'acció dels lligands naturals.

El fet de què l'AhR activi gens que participen en la degradació de xenobiòtics permet que es consideri com un mecanisme de destoxicació de contaminants ambientals. A vegades, però, alguns d'aquests processos de degradació donen lloc a l'activació metabòlica dels xenobiòtics convertint-los en compostos més nocius i més difícils d'eliminar, de manera que els seus efectes poden veure's agreujats (Santiago-Josefat, 2002). Entre els compostos perillosos que es poden trobar en el medi ambient, els lligands de l'AhR constitueixen un factor de risc important degut al paper central de l'AhR en el control del metabolisme secundari, en la resposta immunològica i en els seus efectes genotòxics. De fet, l'activació ectòpica de l'AhR constitueix un pas inicial que condueix als efectes tòxics d'una gran varietat de contaminants perjudicials (Ahlborg *et al.*, 1992; Peterson *et al.*, 1993; Giesy *et al.*, 2002).

Tot i que no es coneix el lligand fisiològic natural de l'AhR, es creu que podria ser un derivat de l'indole (Denison and Nagy, 2003). Els seus lligands coneguts són compostos aromàtics hidrofòbics amb estructura coplanària com els flavonoides, l'índigo i la indirubina (Adachi *et al.*, 2001), a més de diferents contaminants ambientals com són compostos aromàtics halogenats com la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD, Figura I.7) considerat el compost més tòxic que existeix (Gray and Ostby, 1995; Gray *et al.*, 1995; Mably *et al.*, 1992), congèneres planars de les dibenzodioxines i dibenzofurans policlorats, PCBs i molts hidrocarburs aromàtics policíclics com el benzo[*a*]pirè (Gonzalez and Fernandez-Salguero, 1998; Shimizu *et al.*, 2000; Fent, 2001) (Figura I.8). Els flavonoides són compostos amb un esquelet característic constituït per dos anells de benzè units per una cadena de tres carbonis produïts normalment per les plantes. Dins d'aquest grup es troba com a lligand més important el que s'ha utilitzat en aquest treball, la β -naftoflavona. S'ha de tenir en compte que molts dels lligands que poden interaccionar amb l'ER també ho poden fer amb l'AhR, amb possibles efectes tòxics additius en la cèl·lula (Scippo *et al.*, 2004).



Figura I.7. Estructura de la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina, coneguda generalment com a dioxina (TCDD). En verd estan representats els dos anells aromàtics units per dos àtoms d'oxigen (en vermell). Cada anell presenta dos àtoms de clor (en groc).

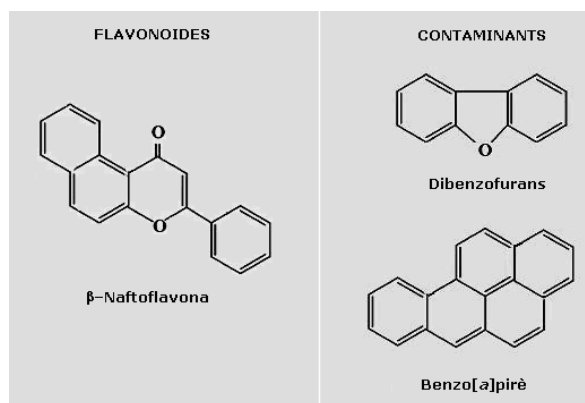


Figura I.8. Estructures d'alguns lligands de l'AhR. Es tracta de compostos aromàtics hidrofòbics amb estructura coplanària.

Amb el nom de "dioxines" es coneix una família de productes químics que inclou algunes de les substàncies més tòxiques conegudes. Com a substàncies organoclorades, la seva perillositat prové no tan sols de la seva toxicitat sinó també de la seva persistència en el medi ambient, ja que poden romandre desenes d'anys abans de ser degradades, i de la tendència a acumular-se dins dels organismes vius. Els seus efectes inclouen disfunció immune, disrupció endocrina, toxicitat reproductiva, defectes de desenvolupament, embriotoxicitat, teratogenicitat, hepatotoxicitat, toxicitat dèrmica, letalitat i càncer en vertebrats, fins i tot a concentracions molt baixes (Abbott *et al.*, 1994; Poland and Knutson, 1982; Connor *et al.*, 1997; Ahlborg *et al.*, 1992; Peterson *et al.*, 1993; Giesy *et al.*, 2002).

Diferents estudis mostren que el TCDD afecta els nivells de les hormones sexuals en els animals. Així, s'han pogut observar danys permanents en animals amb nivells d'exposició extremadament petits durant determinades fases de desenvolupament, com ara la de fetus. En mascles s'ha observat reducció dels nivells de testosterona i del nombre d'espermatozoides, desmasculinització i feminització en el comportament sexual. També s'han observat disminucions dels nivells de testosterona en homes adults exposats a dioxines durant la seva feina. Les dioxines també modifiquen les concentracions de les hormones tiroïdals en animals i nadons. Alguns dels possibles efectes de l'alteració d'aquestes hormones inclouen baix pes en el naixement, hiperactivitat i problemes d'aprenentatge i de memòria. Els danys abans del naixement poden provocar canvis permanents.

Els compostos químics que provoquen efectes similars als produïts pel TCDD es coneixen com a compostos *dioxin-like*. S'ha demostrat que molts dels efectes tòxics d'aquests compostos *dioxin-like* es produeixen mitjançant l'AhR (Nebert *et al.*, 1993; Lucier *et al.*, 1993). Molts dels estudis que aporten evidències d'aquesta

relació s'han fet amb ratolins amb el gen de l'AhR disromput (*knockouts*). Aquests ratolins són viables tot i que desenvolupen alteracions en diferents òrgans relacionades amb l'envelliment indicant que l'AhR també juga un paper important en la fisiologia i l'homeòstasi de la majoria dels òrgans (Fernandez-Salguero *et al.*, 1997). Durant l'exposició d'aquests ratolins a dioxines, s'observa que no desenvolupen símptomes d'intoxicació, és a dir, no hi ha inducció dels diferents enzims implicats en el metabolisme de xenobiòtics, com el CYP1A1. Això demostra que l'expressió d'aquests enzims i la toxicitat d'aquests compostos està mitjançada per l'AhR (Gonzalez and Fernandez-Salguero, 1998; Fernandez-Salguero *et al.*, 1996). A més, aquests ratolins *knockouts* no desenvolupen lesions significatives en fetge, tim, cor, ronyó, pàncrees, melsa, ganglis limfàtics i úter quan són exposats al TCDD (Fernandez-Salguero *et al.*, 1996). De la mateixa manera, aquests ratolins tampoc desenvolupen tumors en presència de benzo[*a*]pirè, un cancerigen ambiental que indueix l'expressió del CYP1A1 (Shimizu *et al.*, 2000). Totes aquestes dades aporten una evidència directa de què l'AhR està implicat en els processos de toxicitat i carcinogènesi relacionats amb els compostos *dioxin-like*.

La presència d'aquests compostos està controlada en els llocs de producció com els incineradors. No obstant això, es poden trobar en molts ambients diferents, incloent-hi llocs allunyats, degut a la seva capacitat per a viatjar aerotransportats llargues distàncies a llocs remots allunyats de la influència humana (Simonich and Hites, 1995; Grimalt *et al.*, 2001). Per tant, els assaigs per a detectar l'activació de l'AhR i la subsegüent transducció del senyal s'estan convertint en eines interessants per a supervisar la contaminació en mostres ambientals.

I.2. XENOBIÒTICS

La paraula "xenobiòtic" deriva del grec "*xeno*" ("estrany") i "*bio*" ("vida") i s'aplica a aquells compostos amb activitat biològica externs als organismes vius però que tenen la capacitat d'interaccionar amb ells. "Xenobiòtic" és un terme genèric que s'assigna a tota substància que ingressa o entra en contacte amb un organisme sense ser un dels seus components naturals i que és capaç de produir alteracions en diferents vies metabòliques, sigui de manera immediata o a mitjà o llarg termini. Davant d'aquesta agressió, l'organisme recorre a un complex sistema per a tractar de neutralitzar químicament l'efecte d'aquestes substàncies i finalment eliminar-les de la manera més ràpida i eficient possible.

Els xenobiòtics poden ingressar en l'organisme per diferents vies: oral, respiratòria, a través de la pell, etc., essent les més comunes les dues primeres. Sigui quina

sigui la via d'ingrés, els xenobiòtics sempre arribaran a la sang i, per consegüent, podran afectar a totes les cèl·lules de l'organisme. D'aquesta manera, el seu efecte, beneficiós o tòxic segons el cas, dependrà de la via d'ingrés, de les característiques químiques, de la concentració efectiva en sang i, d'una manera molt important, del poder de destoxicació que pugui oposar l'organisme al xenobiòtic en qüestió. En el cas de l'home, aquests compostos estranys són subseqüentment eliminats, sigui de manera intacta o metabolitzats per enzims destoxicants que realitzen una biotransformació del xenobiòtic a través de reaccions d'oxidació, reducció, hidròlisi, conjugacions amb metabòlits cel·lulars, etc. El resultat d'aquesta biotransformació és la formació de productes no tòxics o de baixa toxicitat cel·lular i que a més siguin de fàcil excreció (Guengerich and Uebler, 1986; Falkay *et al.*, 1987).

I.2.1. Biotransformació i bioactivació

La biotransformació és el procés a través del qual els xenobiòtics són modificats químicament pel metabolisme dels éssers vius. En ell participa un complex grup de proteïnes amb propietats enzimàtiques, com el citocrom P-450, que són capaces de transformar químicament els xenobiòtics. Totes les cèl·lules del nostre organisme han desenvolupat, en major o menor grau, la capacitat de destoxicació dels xenobiòtics, tot i que hi ha algunes que realitzen aquesta funció de forma més eficient i específica. En concret, alguns teixits com el fetge, el pulmó o l'intestí posseeixen la maquinària metabòlica necessària per a fer front a aquests compostos estranys. El fetge és el que té una major importància destoxicant, concretament són els hepatòcits els encarregats del procés de transformació química dels xenobiòtics previ a la seva eliminació de l'organisme.

El procés de biotransformació d'una molècula estranya en l'organisme a una espècie excretable es realitza per etapes. En una primera etapa, coneguda com a Fase I, els xenobiòtics no hidrosolubles generalment es converteixen en molècules carregades elèctricament a l'incorporar grups químics que aporten més polaritat a l'estructura. Alguns xenobiòtics poden ser eliminats una vegada que han patit aquesta biotransformació degut a què el producte resultant és suficientment hidrosoluble com per a ser excretat. No obstant això, la majoria de les substàncies necessiten d'una segona etapa, anomenada Fase II o de conjugació, per a la seva biotransformació total. Aquest procés consisteix en la unió del xenobiòtic a algunes molècules d'origen cel·lular formant-se un compost estable, molt poc reactiu i de gran solubilitat en l'aigua de manera que la seva excreció, principalment per via urinària, és ràpida i total.

A través d'aquest procés global, una molècula d'escassa solubilitat, que hauria de ser eliminada de l'organisme molt lentament, podrà ser fàcilment excretada a través de la seva biotransformació en les etapes I i II. No obstant això, a vegades els metabòlits resultants de la biotransformació d'un xenobiòtic són més tòxics que el propi xenobiòtic original. Aquesta conseqüència indesitjable de la biotransformació té lloc quan es produeixen espècies químiques molt reactives. El conjunt de reaccions metabòliques que incrementen la toxicitat dels xenobiòtics es coneixen amb el nom de bioactivació.

I.2.2. Toxicologia i contaminació mediambiental

La toxicologia mediambiental o ecotoxicologia és la divisió de la toxicologia que s'encarrega de la detecció i valoració de l'impacte dels agents tòxics sobre la biosfera i/o els ecosistemes. Tracta de les interaccions entre les substàncies químiques presents en el medi ambient i la biota, i estudia els seus efectes adversos a diferents nivells, des del nivell de molècula, cèl·lula, teixit, òrgan i organisme fins a poblacions i ecosistemes.

L'estudi ecotoxicològic dels contaminants requereix una feina multidisciplinària que inclogui els processos tant fisicoquímics com moleculars, toxicològics, fisiològics i ecològics. Una relació causa-efecte entre els efectes trobats i els compostos químics analitzats en mostres ambientals és, sovint, molt difícil d'establir i tan sols una aproximació que inclogui conceptes ecològics, químics i toxicològics permetrà entendre els efectes ecotoxicològics en els ecosistemes contaminats (Kent, 2001).

La Unió Europea ha establert una estratègia legislativa per a fer front als xenobiòtics degut a l'impacte que tenen en la salut dels éssers vius i als problemes que s'han trobat associats a ells. L'objectiu de la nova llei europea sobre els productes químics, REACH (*Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*), és millorar la protecció de la salut humana i l'ambient a través d'una millor i més ràpida identificació de les característiques dels diferents xenobiòtics. La regulació del REACH dóna una gran responsabilitat a la indústria que ha de compilar dades sobre les característiques de les substàncies químiques i proporcionar informació sobre la seva perillositat i dels protocols adients per a una manipulació segura en una base de dades a on els professionals i els consumidors puguin consultar-la. Tot això queda reflectit en una sèrie d'accions a curt, mitjà i llarg termini.

A curt termini s'ha establert una llista de contaminants prioritaris, entre els quals es troben compostos com els hidrocarburs aromàtics policíclics, PCBs, pesticides, dioxines, etc. Aquestes accions inclouen la supervisió dels seus nivells en els aliments i en l'ambient, així com la identificació dels grups de persones vulnerables, com els nens, que necessiten consideracions especials. Les accions a mitjà termini es centren en el desenvolupament i validació dels mètodes acordats internacionalment per a garantir que els productes químics sospitosos siguin analitzats d'una manera ràpida i així treure conclusions de com poden afectar a la salut dels éssers vius. També s'encarrega de la substitució progressiva dels productes químics perillosos quan s'identifiquen alternatives més convenients. Finalment, les accions a llarg termini estan relacionades amb l'actualització i l'adaptació de la legislació a través d'una avaluació de riscos. Això inclou la incorporació de nous tests de toxicitat o l'adaptació dels que ja existeixen.

A part dels contaminants prioritaris, existeix un nombre difícil d'estimar de contaminants ambientals dels que se sap molt poc o res. Aquests contaminants, denominats globalment contaminants orgànics emergents, es defineixen com a contaminants prèviament desconeguts o no reconeguts com a tals la presència dels quals en el medi ambient no és necessàriament nova però sí la preocupació per les seves possibles conseqüències. Constitueixen una línia prioritària d'investigació de l'Organització Mundial de la Salut, de l'Agència de Protecció Mediambiental dels Estats Units (EPA, *Environmental Protection Agency*) i de la Unió Europea. Aquests contaminants no necessiten ser persistents per a ocasionar efectes negatius degut a la seva elevada producció i consum que implica una contínua introducció en el medi ambient. Entre els contaminants orgànics emergents es poden trobar retardants de flama (difeníl èters polibromats), detergents de tipus alquilfenol etoxilat i els seus derivats, parafines clorades, ftalats, subproductes de desinfecció de l'aigua potable, productes de transformació de pesticides, metil tert-butil èter i altres additius de la benzina, surfactants perfluorats, fàrmacs, productes per a la higiene personal, bisfenol A, etc. A mesura que les tècniques d'anàlisi avancen i la seva sensibilitat i sofisticació milloren, augmenta el nombre de compostos que per la seva ubiqüitat, persistència i toxicologia es consideren nocius i perillosos per a l'home i el medi ambient. Els descoberts fins ara representen una part molt petita dels que segurament existeixen. De tots els contaminants orgànics emergents, els que probablement susciten més preocupació en l'actualitat són els disruptors endocrins.

I.2.3. Disrupció endocrina

En els últims anys ha augmentat la preocupació a nivell mundial pel possible efecte nociu resultant de l'exposició a diferents productes químics que tenen el potencial d'interferir amb el sistema endocrí d'homes i animals alterant el seu desenvolupament, creixement, reproducció i comportament. Els compostos que alteren el correcte funcionament del sistema endocrí dels éssers vius que viuen sota exposició continuada es coneixen amb el nom de disruptors endocrins (EDCs, *Endocrine Disruptor Compounds*). S'entén per disruptor endocrí aquell compost, natural o sintètic, capaç d'interaccionar amb els diferents receptors hormonals bé suplantant les hormones naturals, bloquejant la seva acció o bé augmentant o disminuint els seus efectes i alterant el correcte funcionament de la via. Aquests compostos es caracteritzen per actuar a baixes concentracions, ser persistents i presentar una gran capacitat de bioacumulació, fet que incrementa enormement la seva perillositat. Tot això ha fet augmentar l'interès de la comunitat científica vers la identificació de noves substàncies amb capacitat disruptora i el desenvolupament de nous protocols que permetin la seva detecció.

Els efectes dels EDCs es coneixen fa més de 30 anys i han estat descrits en moltes espècies animals. Els més destacables són:

- Funcionament tiroïdal anormal en aus i peixos
- Alteracions del sistema immunològic d'aus i mamífers
- Alteracions sexuals
- Desmasculinització i feminització de peixos i aus
- Disminució de la fertilitat i creixement en aus, peixos, mol·luscs i mamífers
- Disminució de l'eficàcia en el procés d'incubació en peixos, aus i tortugues
- Problemes en les closques dels ous

Entre els efectes més destacats en humans associats a l'exposició a aquests compostos estan:

- Malformacions en nounats
- Problemes en els testicles
- Esperma anormal i pobre
- Augment en la incidència d'infertilitat, deguda a una caiguda en el nombre d'espermatozoides en l'home i a endometriosis en dones
- Funcionament tiroïdal anormal

- Desenvolupament de càncers de dependència hormonal (pròstata, ovaris, mama, etc.)

Els compostos sospitosos d'interferir amb el receptor d'estrògens (xenoestrògens) són els més coneguts i estudiats. S'entén per xenoestrogen qualsevol substància química, sigui o no esteroide, externa als organismes vius capaç d'unir-se al receptor d'estrògens i activar la resposta hormonal. Uns són d'origen natural (fitoestrògens) i es degraden ràpidament, mentre que els d'origen sintètic o industrial, com ara els estrògens sintètics, pesticides, ftalats, dioxines, PCBs, DDT i bisfenols, són molt resistents al pas del temps i, degut a què es troben amb freqüència en el medi ambient i a què es comporten com a estrògens de gran potència, es consideren responsables de greus alteracions tant a nivell individual com ecològic. Exemples d'aquests efectes són greus malformacions en embrions i fetus de diferents espècies i, dins de l'espècie humana, s'han trobat evidències de què l'exposició a EDCs durant la gestació pot alterar permanentment tant el desenvolupament del tracte reproductiu com la seva fisiologia (Gill *et al.*, 1979). En concret, els xenoestrògens semblen ser responsables de molts casos d'esterilitat masculina i aparició de càncer de mama. S'ha vist, per exemple, que compostos amb activitat estrogènica, ja sigui compostos ambientals com el metoxiclor (Gray *et al.*, 1985) o bé compostos farmacèutics com el dietilestilbestrol (DES) (McLachlan and Dixon, 1997), indueixen pubertat precoç i produeixen disruptors en el cicle de ratolins adults. És ben conegut el fet que els estrògens tenen un paper crucial tant en el desenvolupament del tracte reproductiu com en la diferenciació sexual del cervell (Cooper and Kavlock, 1997). La disruptió del desenvolupament sexual també ha estat descrita en altres espècies com en tortugues (Crews *et al.*, 1995) o aus (Fry and Toone, 1981).

De tots els xenoestrògens, els més potents són els estrògens sintètics. No obstant això, hi ha altres famílies de substàncies que, tot i presentar una menor activitat estrogènica, aquesta es veu compensada amb uns nivells ambientals més alts degut a què es produeixen i utilitzen en grans quantitats. Aquest és el cas, per exemple, dels detergents de tipus alquilfenol etoxilat que, juntament amb els estrògens, van ser identificats en un estudi recent com els responsables de l'aparició simultània d'òrgans reproductors masculins i femenins en peixos en les rodalies de plantes de tractament d'aigües residuals (Petrovic *et al.*, 2002a).

Els disruptors endocrins també poden actuar per mitjà d'altres receptors, com és el cas del receptor d'hidrocarburs d'aril. S'ha vist que l'exposició al TCDD durant la gestació pot provocar malformacions del tracte reproductiu femení (Gray and

Ostby, 1995), reduir el nombre d'espermatozoides (Gray *et al.*, 1995) i feminitzar el cervell masculí (Mably *et al.*, 1992). El TCDD també pot produir càncer, cloracné (malaltia de la pell que provoca la seva despigmentació), anormalitats en el sistema immunològic i disfuncions del cervell (Colborn *et al.*, 1997).

Els EDCs poden, doncs, actuar en múltiples vies per múltiples mecanismes d'acció i afectar diferents fases, tant durant el desenvolupament com un cop assolit l'estat adult, fent extremadament complex l'estudi dels seus mecanismes i dels seus efectes.

I.2.3.1. Les hormones com a contaminants ambientals

Ja fa molts anys que es coneix que l'administració d'hormones pot tenir efectes molt importants en l'organisme, fins i tot a concentracions molt baixes. Tot i que sovint es fan servir les seves propietats amb finalitats terapèutiques, una contaminació amb hormones pot tenir resultats molt greus, degut justament a la seva elevadíssima eficiència. Un clar exemple es troba a principis dels anys trenta quan es van tractar rates prenyades amb una petita dosi extra d'estrògens. El resultat van ser múltiples deformacions en les cries: mal desenvolupament sexual, defectes estructurals en úter, vagina i ovaris en femelles i deformitats genitals en mascles (Colborn *et al.*, 1997).

Les hormones naturals, com el 17β -estradiol (E2), o sintètiques, com el 17α -etinilestradiol (EE2) o el dietilestilbestrol (DES), són presents sobretot en aigües residuals i són abocades als rius a on actuen com a compostos contaminants (Garcia-Reyero *et al.*, 2001). Malgrat que les seves concentracions no acostumen a ser molt elevades, els seus efectes poden ser perillosos ja que actuen a concentracions extremadament baixes.

I.2.3.1.1. Estrògens sintètics

Els estrògens sintètics són compostos químics amb activitat estrogènica desenvolupats industrialment com a productes farmacèutics. S'utilitzen, per exemple, en píndoles anticonceptives i per al tractament de desordres hormonals tan freqüents com la menopausa. Es comporten de la mateixa manera que les hormones naturals i provoquen trastorns en la salut humana (Degen and Bolt, 2000). En homes són els responsables d'una baixa qualitat d'esperma, càncer de testicle i òrgans sexuals deformes. En dones provoquen càncer de mama i dels òrgans reproductors, malaltia fibroquística de la mama, síndrome de l'ovari poliquístic, endometriosis, miomes uterins i malaltia inflammatòria de la pelvis. Els

fetus i embrions, el desenvolupament dels quals està controlat en gran mesura pel sistema endocrí, semblen ser particularment sensibles a la seva exposició (Iguchi *et al.*, 2002). Les femelles transmeten aquestes substàncies químiques a la seva descendència abans del part i després durant l'alletament i, com a conseqüència a la seva exposició, els individus pateixen durant la resta de la seva vida trastorns de la salut i canvis en la seva capacitat reproductiva. Se sap que l'efecte disruptor dels EDCs es pot presentar anys després de la seva exposició, podent ser molt més evident en la descendència de la població contaminada (Colborn *et al.*, 1997).

Un exemple d'estrògen sintètic amb alta afinitat pel receptor d'estrògens és el DES. El DES va ser sintetitzat per primera vegada l'any 1938 i immediatament es va començar a administrar a dones embarassades amb risc d'avortament. Finalment, el DES es va acabar administrant per moltes més coses, com la menopausa o el tractament de l'acne o càncer de pròstata, entre d'altres. Uns anys després van començar a aparèixer els problemes. Es va veure que el DES provocava malformacions genitals greus com la criptorquídia (falta de migració testicular) o la hipospàdia (obertura anormal congènita de l'úretra dins de la vagina o en la cara inferior del penis) en els fills de les dones que havien estat en tractament amb DES (Gill *et al.*, 1979; Colborn *et al.*, 1997) i càncer de matriu precoç en les filles.

Hi ha una línia de pensament que apunta que donat que ja existeixen en la natura tants estrògens naturals, no hi ha perquè preocupar-se pels sintètics. No obstant això, és important tenir en compte les diferències que existeixen entre els impostors hormonals naturals i els sintètics. Aquests últims impliquen un perill més gran que els compostos naturals ja que en el cas dels estrògens sintètics més hidrofòbics poden persistir en el cos durant anys mentre que els estrògens vegetals (o fitoestrògens) poden ser eliminats en un dia.

I.2.3.2. Fitoestrògens

Són productes naturals presents en les plantes amb estructura no esteroïdal i activitat estrogènica. Els fitoestrògens ajuden a regular el creixement de les plantes i a protegir-les de l'estrès i dels efectes nocius de la radiació ultraviolada. També es creu que són part del mecanisme de defensa contra herbívors i patògens. Aquest tipus de compostos químics són força abundants en molts tipus d'aliments. Les dues classes principals de fitoestrògens, més actives i rellevants per al consum humà, són les isoflavones i els lignans que es caracteritzen per presentar activitat estrogènica dèbil en l'organisme.

Les isoflavones pertanyen a una classe de compostos coneguts com flavonoides, nom genèric dels compostos fenòlics produïts normalment per les plantes. Es troben en una gran varietat de plantes i vegetals, en especial en les lleguminoses i les gramínies, i són estructuralment similars als estrògens, de fet actuen d'una manera semblant, tot i que la seva acció és molt més dèbil. Les isoflavones més estudiades són la Genisteïna i la Dadzeïna. Totes dues són compostos derivats de la soia, única font natural d'isoflavones amb quantitats nutricionalment significatives.

I.2.3.2.1. Genisteïna

La Genisteïna, un fitoestrogen produït de forma natural present en la soia i en el trèvol vermell, ha atret l'interès científic pels seus possibles beneficis en la prevenció del càncer i de les malalties cardíaques. De la mateixa manera que altres fitoestrògens, la Genisteïna pot funcionar de dues formes: incrementant o disminuint els efectes dels estrògens. Això és així perquè la Genisteïna és capaç d'unir-se als receptors cel·lulars activant-los però no tan intensament com l'estradiol i, al mateix temps, evita que el propi estradiol s'hi uneixi. El resultat és que quan hi ha nivells alts d'estrògens en el cos, com per exemple passa abans de la menopausa, la Genisteïna podria bloquejar parcialment els seus efectes competint per la unió als receptors i, al comportar-se comparativament com un estrogen dèbil, minimitzaria l'efecte estrogènic. Degut a què els estrògens semblen incrementar el risc de diferents tipus de càncer, el consum regular de Genisteïna podria ajudar a reduir aquest risc. *In vitro* s'ha trobat que la Genisteïna suprimeix el creixement d'un gran nombre de cèl·lules canceroses, fins i tot en tipus de càncers que no són afectats pels estrògens (Messina *et al.*, 1994; Alhasan *et al.*, 2000). En concret, el principal efecte protector s'obté en tumors de mama, colon i pròstata. Les isoflavones, a més, ajuden a prevenir l'angiogènesi, és a dir, el procés de formació de nous vasos sanguinis propis de la formació d'un tumor (Fotsis, 1995; Fotsis *et al.*, 1997). D'aquesta forma es deixa al tumor sense font d'alimentació i oxigen impedit el seu creixement i es facilita que l'organisme el pugui eliminar.

Per altra banda, si hi ha pocs estrògens presents en el cos, com passa després de la menopausa, la Genisteïna pot compensar-ho parcialment unint-se als receptors de manera que alleuja els símptomes propis de la menopausa com són les sufocacions, fatiga, suor nocturna, canvis en l'estat d'ànim, etc. Aquesta és una raó per a utilitzar la Genisteïna per a prevenir l'osteoporosi. En les dones, l'osteoporosi té lloc més freqüentment després de la menopausa quan els ovaris deixen de produir estrògens, els quals tenen un gran efecte protector en els ossos. Estudis en

animals, així com una prova doble cec controlada per placebo en humans, suggereixen que la Genisteïna pot ajudar a restaurar la protecció òssia (Fanti *et al.*, 1998; Morabito *et al.*, 2002). Les evidències indiquen que, a diferència dels estrògens que primordialment ajuden a prevenir la destrucció dels ossos, la Genisteïna també podria ajudar a promoure la seva formació (Fanti *et al.*, 1998; Morabito *et al.*, 2002).

Nombrosos estudis han demostrat també que el consum d'aliments rics en fitoestrògens modifica alguns dels factors de risc de les malalties cardiovasculars. La Genisteïna és la responsable d'un efecte antitrombogènic a l'inhibir l'agregació plaquetària i el creixement de les cèl·lules que formen la placa d'ateroma que obstrueix les artèries, principal causa dels atacs cardíacs (Tham *et al.*, 1998). A més, alguns estudis *in vitro* han demostrat que la Genisteïna podria reduir l'oxidació de les LDL (lipoproteïna de baixa densitat) disminuint la seva capacitat aterogènica, augmentar els nivells de les HDL (lipoproteïnes d'alta densitat) i ajudar a evitar que el colesterol es diposités en les parets dels vasos sanguinis (Tham *et al.*, 1998). Un estudi doble cec va trobar que el consum de Genisteïna també ajuda a relaxar la paret arterial, efecte que ajudaria a prevenir la malaltia cardíaca (Squadrito *et al.*, 2003). Les isoflavones també són antioxidants naturals amb propietats comparables a les de la vitamina E. Aquesta acció antioxidant de les isoflavones pot reduir el risc a llarg termini de càncer, prevenint el dany dels radicals lliures en el DNA.

I.2.3.3. Bisfenol A

El bisfenol A (BPA) és un xenoestrogen molt present en la vida quotidiana. Es tracta d'un químic industrial sintetitzat en la dècada dels anys trenta i utilitzat principalment en la fabricació de plàstics, reïnes epòxid, alquilfenols, poliestirens i algunes reïnes de polièster. Aquest disruptor endocrí actua com estabilitzant en l'elaboració de policarbonats plàstics utilitzats en envasos i contenidors d'ús comú en la indústria alimentària i en la llar, com envasos per a guardar aliments i begudes, productes electrònics i productes de seguretat. També es pot trobar en detergents (Choi and Jeung, 2003). Estudis posteriors van revelar la seva utilitat com a ingredient en pesticides, en especial fungicides, així com en productes antioxidants, retardants de flama (com els utilitzats en equips informàtics) i estabilitzants de PVC (clorur de polivinil o *PolyVinyl Chloride*). La seva àmplia utilització, per tant, assegura una extraordinària difusió en el medi ambient.

Diferents estudis en ratolins han suggerit que el BPA té una acció indirecta sobre el programa de divisió cel·lular que es tradueix en alteracions cromosòmiques associades a l'aparició d'anormalitats en el fetus o a malalties de base genètica com la Síndrome de Down (Hunt *et al.* 2003; Can *et al.* 2005). No hi ha evidències de què els mateixos efectes es puguin donar en humans, tot i que hi ha grans similituds en el desenvolupament embrionari d'ambdues espècies. Per altra banda, diferents estudis publicats en els últims anys han evidenciat la relació d'aquest compost amb alteracions del cicle hormonal. S'ha correlacionat la presència d'elevades dosis de BPA en sang i cordó umbilical de dones embarassades amb l'aparició d'anormalitats en fetus i nounats. També s'ha correlacionat amb un increment de càncer de pròstata, de mama i malformacions reproductives en diferents espècies animals i en humans (Maffini *et al.*, 2006).

I.2.3.4. Alquilfenols

El 1987 A.M. Soto i C. Sonnenschein treballaven amb cultius de cèl·lules cancerígenes sensibles als estrògens quan van veure que els cultius es contaminaven amb algun tipus d'estrogen. Finalment, van descobrir que la substància contaminant era quelcom que provenia del plàstic a on es realitzaven els cultius. La contaminació estrogènica va resultar ser produïda per nonilfenol, substància que pertany a una família de compostos químics sintètics anomenats alquilfenols, que són estructures químiques senzilles amb un anell fenòlic i una cadena alquílica, ramificada o no (Figura I.9). Els alquilfenols i els seus productes de degradació no es produeixen naturalment sinó que tots ells són conseqüència de l'activitat antropogènica. Per exemple, el nonilfenol s'afegeix als plàstics com a antioxidant per tal de fer-los més estables i resistent.

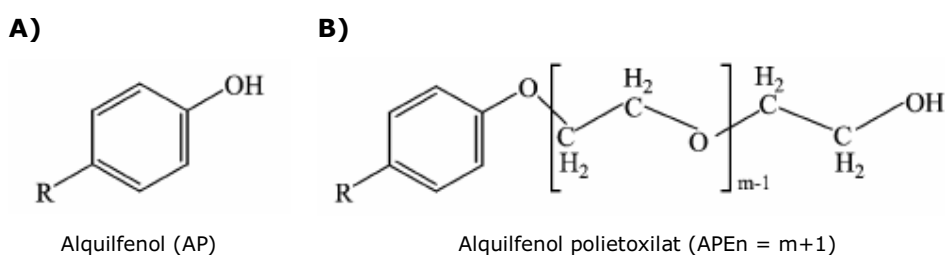


Figura I.9. Fórmula general dels alquilfenols (A) i dels alquilfenols polietoxilats (B) (Ying *et al.*, 2002).

La degradació de detergents industrials, pesticides i altres productes de neteja personal fets amb alquilfenols polietoxilats (APEs) (Soto *et al.*, 1991) és una altra font important de nonilfenol en el medi ambient. Els APEs són una de les classes de surfactants més utilitzades per la indústria. Es fan servir en detergents, pesticides i

altres productes industrials que acaben abocant-se en les aigües residuals que alimenten depuradores o bé directament en el medi ambient. Durant la seva degradació es produeixen APEs de cadena més curta com els compostos mono, bi o trietoxilats, i alquilfenols (APs) molt més actius com el nonilfenol (NP) o l'octilfenol (OP).

Les aigües residuals són la principal font de contaminació per APEs dels rius. Malgrat que aquestes aigües pateixen un procés de depuració, aquest no sol ser suficient per tal d'eliminar-los completament i, per tant, aquests compostos són contaminants habituals dels rius europeus a on són persistents i es troben en concentracions elevades. Per exemple, s'ha determinat la presència de compostos alquilfenòlics i activitat estrogènica i antiestrogènica en diferents punts de la conca del Llobregat (Garcia-Reyero *et al.*, 2001; Castillo *et al.*, 2000; Solé *et al.*, 2000; Petrovic *et al.*, 2000a; Petrovic *et al.*, 2000b). També es poden trobar en sediments (Dayue *et al.*, 1999; Céspedes *et al.*, 2004) i, fins i tot, en l'atmosfera (Dachs *et al.*, 1999; Van Ry *et al.*, 2000). Durant els processos de desinfecció i tractament de les aigües de consum, es generen derivats halogenats del NP i dels seus derivats alquilats (Garcia-Reyero *et al.*, 2004). De fet, s'han trobat quantitats en el rang des dels ppb als ppm de derivats del NP halogenats, clorats i bromats, en aigües preclorades i en fangs d'una planta de tractament d'aigües per al consum de Barcelona, tot i que semblen estar absents (o per sota del límit de detecció) en l'aigua de l'aixeta (Petrovic *et al.*, 2001a).

L'OP també prové de la degradació de detergents i està considerat, de la mateixa manera que el NP, un compost estrogènic. De fet, els efectes estrogènics del NP i de l'OP han estat àmpliament demostrats. Experiments fets per J. Sumpter van demostrar que l'OP produïa en les cries de rates tractades amb ell els mateixos efectes que el DES (Colborn *et al.*, 1997). Estudis previs en el nostre laboratori (Garcia-Reyero *et al.*, 2004) han demostrat que, a diferència del NP que *in vitro* presenta una afinitat important per l'ER, molts dels seus derivats actuen com a estrògens molt dèbils. En concret, experiments *in vivo* i *in vitro* han demostrat que l'efecte estrogènic dels alquilfenols és de 3 a 5 ordres de magnitud menor que el del 17 β -estradiol endogen (Ahel *et al.*, 1994; Céspedes *et al.*, 2004; Van den Belt *et al.*, 2004). Tot i això, donada la gran quantitat de fonts de les que poden provenir, la seva ubiqüitat, la seva natura persistent i el seu caràcter lipofílic, tot i la seva baixa estrogenicitat intrínseca, es consideren els principals disruptors endocrins en el medi aquàtic i constitueixen un greu problema tant en el tractament de residus com en el tema de la toxicologia mediambiental i, per tant, mereixen una monitorització contínua (Ahel *et al.*, 1994; Céspedes *et al.*, 2005).

I.2.3.5. Ftalats

Els ftalats són un grup de substàncies químiques sintètiques relacionades estructuralment amb un àcid orgànic, l'àcid ftàlic. Els ftalats s'utilitzen principalment com a additius que s'empren àmpliament en plàstics, sobretot en PVC, i altres materials en els que actuen com a plastificants per a fer-los més suaus i flexibles. Estan presents en una àmplia sèrie de productes industrials, en productes de medicina, per a la llar i de consum, fins i tot en productes d'higiene personal. Diferents estudis han demostrat que aquestes substàncies tenen capacitat estrogènica dèbil. Aquests contaminants no necessiten ser persistents per a ocasionar efectes negatius degut a la seva elevada producció i consum que implica una contínua introducció en el medi ambient. Això és important des del punt de vista toxicològic ja que actualment es poden trobar com a contaminants en qualsevol ecosistema a on les persones es troben exposades a dosis elevades. De fet, els ftalats es consideren els contaminants mediambientals més abundants. En aquest treball s'han analitzat els següents ftalats: DEHP (bis(2-etilhexil) ftalat), DEP (dietil ftalat), DMP (dimetil ftalat), DBP (dibutil ftalat) i BBP (butil benzil ftalat).

Els ftalats entren en el cos a través dels aliments, l'aire que es respira, el contacte amb la pell i les transfusions sanguínies. Segons l'EPA la principal font de contaminació amb DEHP, l'agent plastificant més utilitzat, és a través dels aliments. El DEHP contamina els aliments durant l'emmagatzematge a través dels envasos. També s'utilitza com a additiu en molts materials de construcció fets de PVC, per exemple, en revestiments de pisos, canonades, paviments i paper pintat. El DEHP també s'utilitza en perfums i en productes fets de PVC flexible com són les cortines de bany, mànegues de jardí, bolquers, pel·lícules plàstiques per a embolicar aliments, guants, catèters i altres instruments mèdics com tubs per a fluids. Els nens poden absorbir quantitats més elevades de ftalats degut a què moltes de les joguines per a la dentició es fan amb vinil altament flexible que conté ftalats. Les transfusions sanguínies representen una altra font de ftalats en les persones a través de les bosses que contenen la sang. Els ftalats es dispersen des del vinil o els aparells mèdics de PVC a les solucions que després s'introdueixen en els pacients. Els malalts, especialment els nens degut a què els seus sistemes encara estan en desenvolupament, poden ser especialment sensibles a aquesta classe d'exposició. La quantitat de ftalats en el cos augmenta també al respirar aire o pols contaminats amb aquestes substàncies provinents dels sòls de vinil. El contacte amb la pell pot ser una important via d'absorció dels ftalats, per exemple, a través dels productes higiènics com el sabó. En concret, el DEP s'utilitza en diferents productes amb aromes com sabons, cremes hidratants, locions, xampús i perfums.

El DEP també està present en productes de plàstic com els raspalls dentals, joguines i embolcalls d'aliments. Més del 75% del DBP s'utilitza com a plastificant en polímers com el PVC, el 14% en adhesius, el 7% en tints i el 3% en altres aplicacions diverses, entre les que s'inclouen pintures, segelladors, lubricants i agents cimentants emprats en construcció, així com productes de consum, per exemple, en cosmètics com esmalts d'ungles, perfums, etc. El BBP també s'utilitza principalment com additiu per a plastificar el PVC o altres polímers. Entre d'altres, el BBP també s'utilitza en perfums, laques i espuma per al cabell, adhesius i coles, productes per a l'automoció i revestiments de sòls de vinil.

Els ftalats ocasionen una àmplia gamma de riscos per a la salut com són danys en el fetge, ronyons i pulmons, així com anormalitats en el sistema reproductor i en el desenvolupament sexual (Duty *et al.*, 2003; Foster, 2005). En animals de laboratori s'han observat efectes de disminució de pes, funció testicular i nombre d'espermatòzoides en la descendència d'animals exposats (Sharpe *et al.*, 1995; Gangolli, 1982). Els ftalats també són tòxics per als embrions en desenvolupament, provocant malformacions i mort. A més, els ftalats es classifiquen com a 'probables cancerígens en humans' (Kleinsasser *et al.*, 2000 ; Sonne *et al.*, 2004 ; Foster, 2005).

I.2.3.6. Desincrustants heterocíclics

Des de fa anys, s'afegeixen alguns biocides a les pintures utilitzades en embarcacions per a evitar el creixement d'algues i altres organismes vius en les superfícies que estan en contacte amb l'aigua. Els productes químics utilitzats en l'actualitat substitueixen als compostos organometàl·lics d'estany, com el tributil estany (TBT), que s'han utilitzat des de fa anys i que actualment estan prohibits degut als problemes de toxicitat que presenten (López de Alda *et al.*, 2001; Castillo *et al.*, 1997). Entre ells es troben dos compostos heterocíclics analitzats en aquest treball: el Sea-Nine i l'Irgarol (Petrovic *et al.*, 2001b).

El Sea-Nine® és un netejador molt actiu contra les algues i diatomees. El seu ingredient actiu és el DCOI (4,5-dicloro-2-*n*-octil-4-isotiazolina-3-ona), que resulta extremadament tòxic per a una àmplia varietat d'organismes marins que estan en contacte directe amb les embarcacions (Arrhenius *et al.*, 2006). Tot i que el DCOI que forma part de la pintura de l'embarcació és estable, quan s'allibera per lixiviació i es posa en contacte amb l'aigua del mar, es degrada ràpidament per diferents microorganismes a compostos que són bàsicament no tòxics. L'Irgarol és

un altre agent biocida antialgues que recentment s'ha utilitzat en pintures antiincrustants per a embarcacions.

Altres biocides que substitueixen com a antiincrustants als TBTs són el Diclofluànid (fenilsulfamida amb propietats com a acaricida i fungicida afegida a les pintures i a la fusta per a donar protecció) i el Diuron (veure més endavant) (Petrovic *et al.*, 2001b).

I.2.3.7. Fenilurees

Els derivats de la fenilurea són herbicides utilitzats en agricultura per a controlar les males herbes en plantacions de diferents conreus i en zones no conreades com carreteres, vies i parcs. Entren en les plantes a través de les arrels i actuen inhibint la fotosíntesi. En aquest treball s'han analitzat tres derivats: el Diuron, el N-Demetil diuron i la 1-(3,5-Diclorofenil)urea.

De tots ells, el més utilitzat és el Diuron. El Diuron es considera tòxic per a l'ésser humà en el que provoca irritació en pell i mucoses per contacte. Conté quantitats significatives de dues impureses del seu procés de fabricació, el 3,3',4,4'-tetracloroazobenzè i el 3,3',4,4'-tetracloroazoxibenzè, que presenten activitat *dioxin-like* i que causen cloracné i importants afeccions en la pell. Els efectes sistèmics només són probables en cas d'una ingesta considerable i inclouen taquicàrdia i reducció de la capacitat pulmonar, nàusea, vòmits, emfisema moderat i pèrdua crònica de pes per exposició perllongada. El 1997 l'EPA el va classificar com a un conegut/probable cancerigen (US EPA, 1999). És persistent i es pot trobar en aigua, sediments i sòls marins. També s'utilitza com a biocida accelerador en pintures antiincrustants a on la seva activitat incrementa l'eficàcia del core de d'aquests productes. La legislació de la Unió Europea estableix límits molt rigorosos per a la presència d'aquests compostos en aigües i aliments.

I.2.3.8. Benzotiazoles

El benzotiazole (BZT) és un compost aromàtic heterocíclic emprat en síntesi orgànica la molècula del qual està constituïda per dos anells condensats, un de benzè i un de tiazole. Es troba amb freqüència en diferents compartiments ambientals com sediments i aigües residuals, a més de residus hospitalaris, a on presenta un important impacte en el medi ambient degut a què és un compost molt poc biodegradable i a la seva potencial toxicitat.

Els benzotiazoles tenen un ampli espectre d'activitat biològica. Segons les substitucions en l'anell de tiazole s'utilitzen com a fungicides, agents antialgues, vulcanitzadors relacionats amb la fabricació de cautxú, asfalt, rodes, plàstics, etc., i en medicina. En concret, alguns presenten una potent activitat antitumoral inhibint el creixement de tumors de manera selectiva en una sèrie de línies cel·lulars (Shi *et al.*, 1996; Kashiyama *et al.*, 1999; Yoshida *et al.*, 2005). També són efectius en el tractament de desordres degeneratius com l'esclerosi lateral amiotròfica (Jimonet *et al.*, 1999; Bensimon *et al.*, 1994; Lacomblez *et al.*, 1996) i en pacients amb Huntington (Heiser *et al.*, 2002). En aquest treball s'ha analitzat el BZT junt amb dos derivats seus: el 3'-hidroxi benzotiazole (BZT-OH) i el 2-metil benzotiazole (MetBZT).

I.2.3.9. Contaminants orgànics persistents

Els contaminants orgànics persistents (POPs, *Persistent Organic Pollutants*) han anat guanyant importància a mesura que s'han anat coneixent més profundament. Es pot dir que els POPs són contaminants amb un efecte global, independentment del seu origen. El fet de què els POPs siguin compostos orgànics persistents, volàtils o semivolàtils i bioacumulables (De Voogt and Brinkman, 1989) i de què presentin una elevada estabilitat química i hidrofobicitat fa que resultin altament perillosos degut a la incapacitat del medi per a eliminar-los a curt termini fent que romanguin molt de temps en el medi, fins i tot aquells que ja han estat prohibits i han deixat de produir-se. De tots els POPs, els compostos organoclorats són els més ben coneguts.

I.2.3.9.1. Compostos organoclorats

Els hidrocarburs aromàtics es poden estabilitzar químicament substituint els àtoms d'hidrogen per diversos halògens com el fluor, el clor, el brom i el iode. De tots aquests, el clor ha estat el més utilitzat, donant lloc als compostos organoclorats (OCs, *Organochlorine Compounds*). Tècnicament l'estabilitat que s'aconsegueix mitjançant la cloració, o altres formes d'halogenació, és una característica molt desitjable ja que permet una major resistència i durabilitat, característiques importants per exemple en el cas dels pesticides.

Des del punt de vista ambiental, els compostos organoclorats tenen tres propietats molt importants que fan que siguin especialment perillosos (Newton, 1979). La primera és una enorme estabilitat química en el medi que els fa resistents a la degradació fotolítica, química i biològica i fa que romanguin pràcticament inalterats

durant períodes de temps molt llargs (Tanabe and Tatsukawa, 1986; De Voogt and Brinkman, 1989). Es considera que com més residus de clor presentin més recalcitrants són, o sigui, més persistents degut a què presenten una major hidrofobicitat i, per tant, estan menys biodisponibles. La segona propietat és la seva elevada tendència a bioacumular-se a través de la cadena tròfica (Looser and Ballschmitter, 1998; D'Adamo *et al.*, 1997). Tot i que es tracta de lligands dèbils, la seva elevada liposolubilitat implica la seva persistència en el teixit adipós dels éssers vius, provocant efectes tòxics crònics fins i tot a nivells ambientals relativament baixos (Bernes, 1998).

La bioacumulació defineix la capacitat dels éssers vius d'acumular contaminants químics en el seu organisme, ja sigui directament a partir del medi on viuen (bioconcentració) o bé mitjançant la seva alimentació (biomagnificació) (Hellou *et al.*, 1998). La bioacumulació dels compostos contaminants està regulada per diversos factors com poden ser les propietats fisicoquímiques i la biodisponibilitat del compost, les condicions ambientals, el contingut lipídic dels teixits i la susceptibilitat de l'espècie i/o de l'individu (Barron, 1990). No obstant això, la seva disponibilitat dependrà sobretot de la seva solubilitat en aigua (Baumard *et al.*, 1998).

La tercera propietat és el fet de ser compostos semivolàtils, la qual cosa deriva en una gran capacitat de distribució arreu del planeta ja que són transportats per l'atmosfera fins a llocs molt llunyans dels seus punts d'emissió (Muir *et al.*, 1990; Wania and Mackay, 1996), dispersant-se àmpliament per tots els compartiments mediambientals (aire, aigua, sòl, sediments i éssers vius) i arribant a ser detectats fins i tot en zones remotes suposadament netes on no s'havien produït ni aplicat mai (Atlas and Giam, 1981; Wania and Mackay, 1996). Per exemple, s'ha trobat una important acumulació de PCBs en el Cercle Polar Àrtic (Muir *et al.*, 1988) afectant a les poblacions indígenes i a la fauna local (Norstrom *et al.*, 1988) degut a què les baixes temperatures afavoreixen la precipitació d'aquestes substàncies (efecte de destil·lació global o *grasshopper effect*) (Wania and Mackay, 1996; Grimalt *et al.*, 2001; Simonich and Hites, 1995).

L'intercanvi gasós aire-sòl i aire-aigua i la deposició són els principals processos d'arribada dels POPs des de l'atmosfera al sòl, aigua i sediments. La importància relativa d'aquests processos depèn molt de les condicions meteorològiques i de la climatologia pròpia de la zona (McVeety and Hites, 1988; Hoff *et al.*, 1996; Muir *et al.* 1996). El sòl té una gran importància en l'acumulació, transformació i reciclatge dels POPs. Els sòls han actuat com a llocs d'emmagatzematge dels POPs durant els

períodes de major concentració en l'aire. En períodes de restricció com l'actual, sobretot a nivell de compostos organoclorats, els sòls poden revertir el seu paper acumulador i assolir una major importància com a alliberadors dels POPs acumulats (Harner *et al.*, 1995; Ribes, 2003). De fet, alguns autors consideren que el sòl és actualment la principal font de reincorporació de POPs a l'atmosfera (Harrad *et al.*, 1994; Harner *et al.*, 1995; Alcock *et al.*, 1999).

Els POPs arriben a l'aigua bé per processos de deposició o bé per intercanvi gasós amb l'atmosfera. Un cop en l'aigua, els POPs poden patir diferents efectes: poden entrar a formar part de la cadena tròfica o bé sedimentar. Quan els POPs són ingerits o absorbits per la fauna, es van bioacumulant i entren a formar part de la cadena tròfica; mentre que quan arriben als sediments, es poden acumular, poden ser degradats o poden resuspendre's i tornar a incorporar-se a l'aigua. Un cop els POPs es troben en el sòl, vegetació i aigua, poden ser reincorporats a l'atmosfera mitjançant intercanvi gasós (font d'emissió secundària).

Els sediments es consideren com a destí final dels POPs. Aquests s'hi van acumulant i, degut a la seva elevada hidrofobicitat, la redissolució esdevé molt lenta. Això fa que els sediments puguin actuar com a una font contínua de contaminants (Bernes, 1998). Els POPs que arriben als sediments, així com la seva distribució, poden diferir en gran manera dels POPs que es troben en el sòl, degut bàsicament als processos interns del llac, com la recirculació de l'aigua o la resuspensió. Estudis previs en el nostre laboratori han mostrat quantitats significatives de compostos amb activitat estrogènica i *dioxin-like* en llacs europeus remots d'alta muntanya que s'han relacionat amb activitat humana (Garcia-Reyero *et al.*, 2005; Boronat *et al.*, 2007b). Aquests contaminants van trobar-se en concentracions massa elevades per a les suposades condicions prístines d'aquests llacs (Wathne *et al.*, 1997; Fernández *et al.*, 1999; Fernández *et al.*, 2000; Grimalt *et al.*, 2001). Aquests llacs d'alta muntanya poden ser utilitzats com a punts de referència per a observar i avaluar la contaminació per transport atmosfèric a gran distància, ja que estan situats lluny de les zones que tenen un impacte humà directe i el seu proveïment d'aigua ve de la pluja i la neu, de manera que actuen com a col·lectors passius de substàncies químiques antropogèniques aerotransportades. Les masses d'aire que arriben a les zones d'alta muntanya ja han recorregut grans distàncies i, per tant, els contaminants que s'hi troben són molt variables i és gairebé impossible determinar la seva procedència ja que poden haver passat per moltes fonts d'emissió diferents i poden haver patit molts processos de degradació.

Aquestes característiques fan que la majoria dels OCs formin part de les llistes de contaminants orgànics persistents prioritari publicades pel Programa del Medi Ambient de les Nacions Unides, la Unió Europea i l'EPA. A continuació es presenta una breu descripció dels principals grups d'OCs.

- **Clorobenzens**

Els clorobenzens o benzens clorats (CBs) són anells aromàtics amb un o més àtoms de clor substituïnt hidrògens que s'utilitzen com a intermediaris en les tintures i com a dissolvents. Entren en l'organisme a través de la seva inhalació o, quan estan en forma líquida, per absorció cutània. Els efectes nocius que produeixen es classifiquen com a locals i sistèmics. El efectes locals són irritació de la pell, conjuntiva i membranes de les mucoses de les vies respiratòries superiors; a més, el contacte perllongat o repetit amb els clorobenzens líquids pot provocar cremades en la pell. En quant als efectes sistèmics, cal tenir en compte que la seva toxicitat, en general, disminueix a mesura que augmenta el nombre d'àtoms de clor substituents. Bàsicament, l'exposició aguda a aquests compostos pot causar somnolència, falta de coordinació i pèrdua de coneixement, mentre que l'exposició crònica pot produir lesions hepàtiques, renals i pulmonars, segons s'ha demostrat experimentalment.

El pentaclorobenzè (PeCB) s'ha utilitzat en el passat com a plaguicida, agent pirorretardant i, en combinació amb els PCBs, en fluids dielèctrics (olis aïllants). Arriba al medi ambient a través d'emissions indirectes de la incineració de residus i de diferents produccions industrials com la refinaria del petroli. També es pot trobar en els fangs activats de les instal·lacions de tractament d'aigües de rebuig. Tot i que la majoria dels països industrialitzats van posar fi a la seva producció fa més d'una dècada, les concentracions de PeCB en teixits humans han romàs constants en els últims anys ja que dues tercers parts dels pentaclorobenzens produïts en totes les èpoques continuen utilitzant-se en transformadors o altres equips elèctrics i, per tant, poden ser objecte d'alliberament accidental.

L'hexaclorobenzè (HCB) és un subproducte industrial de la fabricació de compostos organoclorats, generant-se també en els incineradors de residus com a subproducte de combustió. S'utilitza com a fungicida en el tractament de llavors i com a conservant de la fusta. La producció d'HCB va començar en els Estats Units el 1915 i va patir un enorme increment com a subproducte industrial a partir dels anys seixanta. La seva baixa solubilitat fa que es trobi associat sobretot en sòls i sediments (Grimalt *et al.*, 1988). En quant a la seva toxicitat, l'HCB inhibeix la

fotosíntesi en algues, afecta la fertilitat en rates, provoca efectes teratogènics en ratolins i causa porfíria en éssers humans (Rapaport and Eisenreich, 1988). També s'ha trobat una relació entre el càncer de tiroide i l'exposició crònica a HCB (Grimalt *et al.*, 1994).

- **Policlorobifenils**

Els policlorobifenils o bifenils policlorats (PCBs) són compostos aromàtics clorats derivats del bifenil per substitució dels àtoms d'hidrogen per àtoms de clor. Dins del grup dels PCBs es troben 209 congèneres diferents amb la següent fórmula general $C_{12}H_{10-n}Cl_n$, a on n varia entre 1 i 10, de manera que els diferents congèneres es diferencien en el seu grau de cloració i en la posició d'aquests clors, criteri en el que es basa el sistema de nomenclatura de la IUPAC per a numerar els PCBs.

Degut a les seves propietats, entre les quals es troba una elevada estabilitat química i tèrmica, inflamabilitat baixa o nul·la, constants dielèctriques baixes i pressió de vapor baixa a temperatura ambient, els PCBs han tingut aplicacions molt diverses en els sectors comercial i industrial. Per una banda, en sistemes oberts s'utilitzen com a plastificants en segelladors, paper de transferència, agents impregnants, pintures, adhesius, ceres, lubricants, additius per a ciment i guix, agents de fundició, retardants de flama, olis d'immersió i plaguicides. Per altra banda, en sistemes tancats s'utilitzen com a fluids dielèctrics en transformadors i condensadors, fluids refrigerants en intercanviadors de calor i fluids hidràulics anticorrosius i resistents a la calor en equips de mineria i bombes de buit. Els PCBs també es formen com a subproductes en molts processos químics, com en la producció de dissolvents clorats, pigments i adhesius, així com en processos d'incineració i en emissions de vehicles (Tolosa, 1993).

La seva producció comercial va començar l'any 1929 en els Estats Units, augmentant-ne considerablement el consum durant la dècada dels seixanta. Un cop demostrats els seus efectes negatius sobre el medi ambient, la fauna i, fins i tot, l'ésser humà, la seva producció va disminuir en gran mesura fins arribar a aturar-se. A finals dels setanta la seva producció, manipulació, distribució i comercialització va ser prohibida en els Estats Units, Japó i Gran Bretanya, però va continuar en altres països europeus fins a mitjans dels anys 80. La utilització dels PCBs en sistemes oberts actualment està prohibida en molts països, però encara no han estat substituïts en tots els equipaments elèctrics que constitueixen una font d'emissió difusa, important i perenne.

Entre els antecedents sobre danys a la salut provocats pels PCBs està la intoxicació de més de mil persones per la ingestió d'oli de segó d'arròs contaminat amb PCBs el 1968 a Yusho, Japó (Rogan *et al.*, 1995; Jacobson *et al.*, 1996; Aoki, 2001). Això va ser degut a una fuita en un intercanviador de calor d'una fàbrica d'aliments. Entre els símptomes més notoris van destacar cloracné, marejos, debilitat en les extremitats, malestar gastrointestinal i trastorns en l'aparell respiratori i reproductor. Els nens nascuts de mares amb símptomes de Yusho van ser de mida inferior a la normal i, inicialment, van presentar pigmentació cutània. El 1979 va tenir lloc un altre episodi d'intoxicació similar, denominat Yu-Cheng (Taiwan), en el que la població va consumir arròs contaminat amb PCBs i altres compostos. Entre les víctimes van observar-se efectes similars als de Yusho i també es van donar alteracions en la funció hepàtica. Els nounats de mares Yu-Cheng van presentar símptomes de toxicitat aguda (Rogan, 1989, Rogan *et al.*, 1988).

Els PCBs són absorbits pels pulmons, per la pell i pel sistema gastrointestinal i es bioacumulen principalment en el teixit adipós, tot i que també s'ha trobat alguna transferència placentària. Malgrat que els PCBs són uns compostos extraordinàriament persistents, molts congèneres són metabolitzats *in vivo* a derivats més polars (Sundstrom *et al.*, 1976 ; Sipes and Schnellmann, 1987). El metabolisme d'aquestes substàncies s'ha estudiat en animals de laboratori però no en éssers humans i, en la majoria dels animals estudiats, s'ha vist que la biotransformació metabòlica dels PCBs disminueix a mesura que augmenta la cloració. Estudis en mamífers i aus de PCBs amb 1, 2, 3, 4 o 5 àtoms de clor han demostrat que aquests PCBs romanen menys temps en el teixit adipós i s'excreten més fàcilment en femtes que la majoria dels PCBs amb 6 o més àtoms de clor.

Estudis de toxicitat dels PCBs indiquen toxicitat aguda per exposició a dosis molt elevades (lesions dèrmiques i oculars, desordres respiratoris, etc.) i efectes crònics que indueixen hepatotoxicitat i desordres immunològics i reproductius, entre d'altres (Lang, 1992; Erickson, 1997). Els metabòlits hidroxilats dels PCBs presenten activitat estrogènica (Safe, 1995b; Layton *et al.*, 2002) i, a més, alguns PCBs són capaços d'alterar l'activitat de les hormones tiroïdals (Goldey *et al.*, 1995). Aquests compostos afecten els processos regulats per les hormones tiroïdals durant el desenvolupament i poden provocar alteracions permanents en les funcions del cervell adult. Aquestes observacions no tan sols s'han realitzat en animals de laboratori, sinó que també s'han trobat dificultats d'aprenentatge en nens exposats a elevats nivells de PCBs, ja sigui a través de la placenta durant la gestació o bé a través de la llet materna durant l'alimentació. L'exposició a alguns congèneres de PCBs també s'ha relacionat amb mutacions d'algun oncogen en

càncer de pàncrees (Porta *et al.*, 1999). De fet, estudis realitzats en animals indiquen que els PCBs són cancerígens i s'ha determinat la probabilitat de què barreges de PCBs siguin cancerígenes en persones.

Els PCBs planars, aquells que tenen com a màxim una substitució en posició orto, són els més tòxics, segurament degut a què són capaços d'adoptar una conformació coplanària i actuar com a contaminants *dioxin-like* a través de la seva interacció amb l'Ahr. Els PCBs planars analitzats en aquest treball són el PCB9, el PCB29, el PCB58, el PCB77 i el PCB126.

▪ **4,4'-DDT i 4,4'-DDE**

El 4,4'-DDT (1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)età) va ser sintetitzat l'any 1874 i el 1939 es va començar a utilitzar com a plaguicida. Gràcies a la seva enorme eficàcia ha permès la desaparició de la malària en moltes zones del planeta i el control de més de 20 malalties humanes greus incloent-hi la pesta bubònica, la febre groga, la tripanosomiasi, l'elefantiasi i l'encefalitis, així com un augment enorme en la producció de collites d'aliments al matar les plagues d'insectes. Aquesta gran eficàcia unida a la seva baixa toxicitat en humans va ser la responsable de què el DDT s'utilitzés de forma indiscriminada, assolint uns nivells de producció molt superiors als de qualsevol altre OC. Degut a això, tot i que es va prohibir la seva producció i utilització en la majoria dels països fa més de tres dècades, el DDT és un contaminant que sovint continua detectant-se en els diferents compartiments ambientals.

Tot i que el 4,4'-DDT és un compost molt persistent en el medi ambient, va degradant-se molt lentament, degut a la radiació solar o bé a l'acció microbiana o metabòlica, transformant-se en 4,4'-DDE (1,1-dicloro-2,2-bis(4-clorofenil)etilè) i d'aquí a 4,4'-DDD (1,1-dicloro-2,2-bis(4-clorofenil)età), ambdós també molt resistents i amb propietats químiques, físiques i toxicològiques similars a les del producte original. Tots ells presenten una elevada tendència a bioacumular-se en els éssers vius emmagatzemant-se en el teixit adipós a on el 4,4'-DDE és el metabòlit més persistent degut a què és relativament inert (Lund, 1998). El 4,4'-DDE també és el metabòlit majoritari en l'atmosfera (Wittlinger and Ballschmiter, 1987) i, com a conseqüència, és el metabòlit principal en sòls i sediments de zones d'alta muntanya a on l'aportació és principalment atmosfèrica.

L'exposició a aquests compostos s'ha associat a efectes teratogènics, disrupció endocrina, efectes cancerígens i disminució de l'eficàcia del sistema immunològic

(Colborn *et al.*, 1997). S'han vist exemples d'aquests efectes en belugues, gavines, óssos polars i foques (Colborn *et al.*, 1997). Els efectes tòxics del DDT i dels seus derivats en els éssers vius no van ser del domini públic fins a finals dels anys seixanta amb la publicació del *best-seller* Primavera Silenciosa (Carson, 1962) a on Rachel Carson va exposar tots els perills ecològics derivats de la seva utilització, fins i tot arribant a dir que acabarien desapareixent tots els ocells del món si es continuava utilitzant aquest insecticida. Com a conseqüència d'això, el 1972 l'EPA va prohibir la utilització del DDT argumentant la seva gran persistència, la seva capacitat de bioacumulació i la seva elevada toxicitat, la qual cosa va desencadenar un desproveïment en el Tercer Món que va propiciar un increment en el nombre de casos de malària. És per això que moltes nacions van decidir tornar a la seva utilització. El 15 de setembre del 2006 l'Organització Mundial de la Salut va anunciar que aquest insecticida tornaria a formar part del seu programa per a eradicar la malària. Estudis científics (Breman *et al.*, 2007) mostren que la utilització de DDT com a fumigant d'interiors associat a la utilització de mosquiteres sí és efectiu en la prevenció de la malària i no presenta perill per a la vida salvatge ni la ineficàcia a mitjà termini que la seva utilització indiscriminada com a biocida presenta en els cultius (Begon *et al.*, 1996). La comunitat ecologista i part de la comunitat científica dubta d'aquesta benignitat i existeix consens per a atribuir potencial nociu, i en molts casos cancerigen, al DDT. Tractant-se d'una qüestió en la que intervenen interessos econòmics i grups de pressió, els estudis d'ambdues parts no han estat acceptats de manera concloent i definitiva, tot i que de forma generalitzada s'accepta que el DDT no és un compost innocu per a la cadena tròfica. Actualment, s'ha restringit el seu ús per a la prevenció de malalties com la malària i com a coproducte de la síntesi del dicofol, un acaricida, sempre que el contingut total de DDT sigui inferior al 0.1%. No obstant això, la utilització del DDT es va començar a abandonar una dècada abans de la seva prohibició degut a les soques d'insectes resistent, segons algunes fonts, i, segons altres, degut a l'aparició de nous plaguicides menys tòxics que les alternatives actuals.

- **Hexaclorociclohexans**

Els hexaclorociclohexans (HCHs) es van utilitzar com a bomba de fum durant la Segona Guerra Mundial i, posteriorment, com a insecticides. A finals de la dècada dels setanta la utilització dels HCHs va augmentar desafortadament com a conseqüència de fortes restriccions en l'ús del 4,4'-DDT (Walker *et al.*, 1999).

Els HCHs es presenten en dues fórmules comercials: la tècnica, una barreja de diferents isòmers (α -HCH: 55-80%; β -HCH: 5-14%; γ -HCH: 8-15%; δ -HCH: 2-

16%; i ϵ -HCH: 3-5%); i el lindà, nom comercial de l'isòmer γ (>90%), que és l'únic amb activitat insecticida. El lindà és el més utilitzat en l'Europa Occidental, en els Estats Units i en països de l'hemisferi sud, mentre que en països en vies de desenvolupament com Polònia, Romania, Índia, Xina, Mèxic i Brasil es fa servir sobretot la fórmula tècnica degut al seu baix cost.

Els HCHs són els POPs més solubles en aigua de manera que en sistemes lacustres es troben sobretot dissolts més que no pas associats a partícules o sediments. Els isòmers α -HCH i γ -HCH es troben majoritàriament en mostres ambientals d'aire, aigua, sediments i sòls, mentre que l'isòmer β -HCH es troba principalment en teixit adipós i fluids biològics com la llet materna i la sang (Willet *et al.*, 1998). En quant a la seva toxicitat, els HCHs presenten toxicitat aguda en mamífers i la seva exposició crònica s'ha relacionat amb problemes immunològics i neurològics en humans i amb càncer de fetge en rates i ratolins. El γ -HCH es considera el més tòxic de tots els HCHs (Willet *et al.*, 1998; Walker *et al.*, 1999).

I.3. BIOASSAIGS BASATS EN LA UTILITZACIÓ DE LLEVATS RECOMBINANTS

La presència de xenobiòtics es pot detectar mitjançant mètodes directes, com l'anàlisi química, o indirectes, com els bioassaigs. Un bioassaig és un experiment *in vitro* dissenyat per a mesurar els efectes de diferents substàncies en un organisme viu. Un dels bioassaigs més emprats és l'assaig amb llevats recombinants (RYA, *Recombinant Yeast Assay*) que es basa en llevats modificats genèticament per tal de determinar la presència de xenobiòtics en el medi. Són anàlisis dirigides a supervisar les afinitats d'unió de diferents lligands als seus receptors i no a predir els efectes biològics, que per a molts sistemes hormonals requeririen l'animal sencer o fins i tot poblacions. La disponibilitat de soques de llevat manipulades genèticament per a expressar i seguir l'activitat dels receptors hormonals ha estat un avenç important en la detecció de la possible activitat disruptora endocrina en el medi ambient així com en l'*screening* del cada cop més gran nombre de compostos químics que apareixen cada any en el mercat (Coldham *et al.*, 1997; Garcia-Reyero *et al.*, 2001; Andersen *et al.*, 1999; Bovee *et al.*, 2005). Aquests bioassaigs han de donar una resposta qualitativa a la presència o no presència de contaminants de manera que poden ser una eina molt fiable en un primer *screening*. El propòsit d'aquest tipus de *screening* és realitzar una eliminació ràpida i barata de les mostres que no presentin activitat biològica i permetre una anàlisi més exhaustiva per tècniques cromatogràfiques per a identificar i quantificar els compostos presents en aquelles mostres que donen una clara resposta positiva (Pawlowski *et*

al., 2004; Schmitt *et al.*, 2005; Pinto *et al.*, 2005). Es tracta, doncs, d'una eina molt útil per a la detecció de xenobiòtics en els screenings *in vitro* inicials de substàncies químiques o mostres ambientals (Leskinen *et al.*, 2005) degut als següents avantatges:

- Els llevats són organismes fàcils de manipular
- El RYA permet veure els efectes "*in vivo*"
- Té una elevada capacitat de processament de les mostres
- La interpretació dels resultats és simple
- Els costos són baixos

En aquest treball el RYA s'ha utilitzat per a correlacionar la presència de xenobiòtics amb activitats biològiques potencialment nocives en mostres ambientals (Feldman and Krishnan, 1995; Thomas *et al.*, 2001; Quirós *et al.*, 2005) i per a establir relacions entre l'estructura química i l'afinitat de diferents compostos químics i dels seus derivats per diferents receptors nuclears de vertebrats (Gaido *et al.*, 1997; Nishihara *et al.*, 2000; Garcia-Reyero *et al.*, 2004; Arulmozhiraja *et al.*, 2005).

Els receptors nuclears són factors de transcripció que activen gens diana després de l'addició al medi d'un lligand apropiat (Mangelsdorf *et al.*, 1995). Aquesta funció pot ser reproduïda en llevats, que contenen la major part de la maquinària transcripcional requerida pels receptors per a unir-se al lligand i activar la transcripció (Pham *et al.*, 1992). No obstant això, els llevats no presenten els receptors nuclears descrits. És per això que aquests bioassaigs es basen en soques de llevat modificades genèticament de manera que contenen dos elements genètics: un que expressa un receptor nuclear d'un vertebrat i un segon en el qual un gen, l'expressió del qual és fàcil de seguir (un gen reporter), està sota el control transcripcional del receptor nuclear expressat. El gen reporter es construeix de tal forma que el seu enzim només s'expressarà en presència del complex receptor-lligand. Aquesta disposició imita el mecanisme pel qual es regulen molts gens que responen a hormones en vertebrats (Green and Chambon, 1991; Nagy and Schwabe, 2004). La similitud fonamental de tots els eucariotes assegura que el mateix mecanisme també funciona en llevats. L'expressió del gen reporter se segueix a través de la seva activitat enzimàtica utilitzant substrats els productes dels quals són fàcils de detectar i quantificar. La cinètica d'aparició d'aquests productes està directament relacionada amb la quantitat d'enzim produït, la qual es relaciona a través d'una típica corba dosi-resposta sigmoïdal amb la concentració efectiva de xenobiòtic present en el medi.

Dues característiques de la cèl·lula de llevat contribueixen a l'èxit del RYA. Primer, el llevat no té cap sistema endogen homòleg als receptors nuclears de vertebrats que pugui interferir amb l'anàlisi i, en segon lloc, el plegament i el processament post-traduccionals de les proteïnes de vertebrats en els llevats és molt similar al de les cèl·lules de mamífers. Això és de gran interès per als propòsits d'aquest treball ja que l'estructura correcta del LBD del receptor és la que determina l'especificitat del sistema, és a dir, la seva capacitat per a distingir entre els lligands i els no-lligands (Green and Chambon, 1991). Aquest últim punt s'ha provat en nombrosos treballs que comparen l'activitat de diferents compostos com a lligands en llevat i en sistemes de mamífers i s'ha trobat que, tot i que existeixen algunes diferències, el RYA és un mètode de confiança per a detectar i per a caracteritzar lligands de receptors de vertebrats (Coldham *et al.*, 1997; Andersen *et al.*, 1999; Gaido *et al.*, 1997; Odum *et al.*, 1997; Fang *et al.*, 2000; Garcia-Reyero *et al.*, 2004).

Tot i que els bioassaigs basats en llevats no proporcionen una caracterització química precisa dels lligands dels receptors ni una mesura directa de la seva concentració (Coldham *et al.*, 1997; Andersen *et al.*, 1999; Gaido *et al.*, 1997; Green and Chambon, 1991; Odum *et al.*, 1997; Fang *et al.*, 2000; Garcia-Reyero *et al.*, 2004), sí proporcionen una mesura de l'activitat hormonal i el seu baix cost i la seva fàcil manipulació fan d'ells la primera opció quan s'ha d'analitzar un gran nombre de mostres o compostos poc caracteritzats.

I.3.1. *Saccharomyces cerevisiae* com a model genòmic

Saccharomyces cerevisiae és un organisme eucariota unicel·lular que ha estat utilitzat per l'home en diferents processos de fermentació des de l'antiguitat. "*Saccharomyces*" deriva del grec i significa "fong del sucre" i "*cerevisiae*" ve del llatí i significa "de la cervesa". També és conegut pel nom de "llevat de gemmació" pel fet de presentar una divisió asimètrica en què la cèl·lula filla és menor i ben diferenciable de la cèl·lula mare, procés anomenat justament gemmació (Figura I.10).

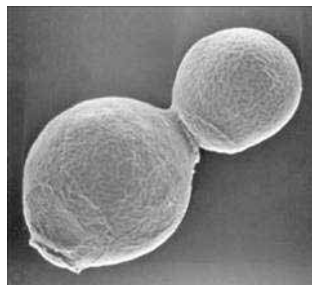


Figura I.10. Fotografia del procés de gemmació de *Saccharomyces cerevisiae*.

La seva utilització en investigació es remunta a mitjans de la dècada dels 30 i, actualment, és un dels principals organismes models utilitzats en biologia molecular. És un organisme molt adient per a la recerca donat que la seva manipulació genètica és fàcil i econòmica i pot ser crescut en un medi definit permetent un control acurat dels paràmetres experimentals. A més, és un organisme fàcilment tractable per tècniques de genètica clàssica i permet l'estudi de la funció de moltes proteïnes mitjançant tècniques bioquímiques. És un bon model per a l'anàlisi d'organismes eucariotes més complexes donat que existeix una identitat relativament elevada entre els gens de llevat i els de mamífer. Al ser un organisme unicel·lular, l'estudi de la cèl·lula representa l'estudi de tot l'organisme i, al presentar un creixement ràpid, permet realitzar estudis que en organismes pluricel·lulars serien molt més difícils i costosos. Totes aquestes avantatges de *S. cerevisiae* respecte a altres eucariotes superiors han fet que la genètica, la bioquímica i la biologia molecular d'aquest llevat hagin arribat a uns nivells de coneixement molt elevats, difícils d'aconseguir en un altre organisme. De fet, existeixen una gran quantitat de soques de llevat, de vectors d'expressió i de tècniques genètiques que permeten que l'experimentació amb aquest organisme sigui extraordinàriament ràpida.

Saccharomyces cerevisiae és el primer organisme eucariota del que es va aconseguir seqüenciar el genoma complet. La longitud del genoma del llevat és relativament petita, de 14 Mb, i només codifica per a aproximadament 6200 gens. S'estima que comparteix un 23% del seu genoma amb el dels humans però a diferència dels gens d'eucariotes superiors que solen contenir introns, només uns pocs gens de llevat en presenten, la qual cosa simplifica el procés d'identificació dels gens per anàlisi computacional. El genoma de *Saccharomyces cerevisiae* està dividit en 16 cromosomes amb mides compreses entre les 250 Kb i les 2 Mb. A part de les seqüències genòmiques hi ha els gens codificats en el genoma mitocondrial d'unes 75-80 Kb i elements no cromosomals presents en la majoria de les soques com ara el plasmidi 2 μ .

Tot i la popularitat del llevat com un sistema model, només es coneixia la funció d'un terç dels gens quan es va seqüenciar la totalitat del genoma. Actualment, 3780 gens de llevat han estat caracteritzats funcionalment i altres 560 presenten similitud amb gens de funció coneguda d'altres organismes. La seva fàcil manipulació ha suposat que *S. cerevisiae* també hagi estat escollit com a sistema model en la implantació de noves tecnologies a gran escala, les quals permeten un millor estudi funcional. Una de les característiques més interessants de la biologia del llevat és la capacitat d'integrar fragments de DNA exògens en el seu genoma

per recombinació homòloga, facilitant així la clonació i la generació de mutants. Aquest mecanisme permet que els fragments de DNA introduïts en la cèl·lula puguin ser dirigits a localitzacions específiques del genoma, de forma que la còpia *wild type* d'un gen és reemplaçada per una forma alterada d'aquest. El fet que *S. cerevisiae* creixi com a cèl·lula haploide facilita la creació de soques mutants d'un gen determinat modificant l'única còpia que presenten aquests microorganismes. Les aplicacions concretes d'aquestes tècniques inclouen, entre d'altres, la generació d'al·lels nuls en què l'ORF (pauta oberta de lectura, *Open Reading Frame*) ha estat substituïda per un gen marcador, la generació de proteïnes de fusió amb diferents epítops que substitueixen la còpia *wild type* pròpia del genoma, o la substitució del promotor endogen d'un gen per un promotor regulable. Aquestes aplicacions han permès un gran avenç en l'estudi de les funcions *in vivo* de les proteïnes.

Els mecanismes de regulació de la transcripció en eucariotes estan molt conservats des dels llevats fins als mamífers. Aquesta conservació inclou els components de la maquinària transcripcional, les proteïnes activadores i els mecanismes generals d'activació de la transcripció. Els llevats presenten un sistema de regulació transcripcional simplificat que els hi proporciona els elements suficients per a adaptar-se a canvis mediambientals i per a obtenir un màxim aprofitament dels nutrients presents en cada moment amb una mínima despesa d'energia metabòlica. L'elevat grau de conservació en les vies de senyalització d'estrès entre els llevats i eucariotes superiors fa del llevat un bon model per a la caracterització de la resposta de les cèl·lules eucariotes d'organismes més complexes enfront de situacions d'estrès com és la presència de xenobiòtics en el medi.

I.3.2. Gens Reporter

Els gens reporter són utilitzats com a marcadors per a visualitzar l'expressió de gens i la localització de proteïnes *in vivo* en gran varietat d'espècies tant pel que fa a procariotes com a eucariotes. Entre els més utilitzats, estan gens que codifiquen per a la proteïna verda fluorescent (gen reporter *gfp*), per a la β -galactosidasa (gen reporter *lacZ*) i per a la β -glucuronidasa (gen reporter *gus*).

L'eficiència d'aquests sistemes depèn del manteniment d'aquests gens marcadors dins de l'hoste i de què els nivells d'expressió siguin suficientment alts per a ser detectats. Tot i que molts plasmidis que existeixen de forma natural són estables sense exercir cap tipus de pressió selectiva, els gens marcadors introduïts són generalment més estables quan estan integrats en el genoma que quan són codificats per plasmidis. Això és particularment important per a estudis en

determinats ambients a on el manteniment del plasmidi mitjançant la utilització de condicions selectives és sovint inapropiat o impossible.

I.3.2.1. Gen reporter *gfp*

La proteïna que s'obté a partir de la transcripció del gen reporter *gfp*, proteïna verda fluorescent (GFP, *Green Fluorescent Protein*), va ser aïllada de la medusa *Aequorea victoria* i es caracteritza per presentar bioluminescència, propietat que li confereix la capacitat d'emetre llum verda a 509 nm quan és exposada a llum ultraviolada o blava, amb dos màxims d'absorció a 395 i 475 nm. És una de les proteïnes de fusió més utilitzades actualment ja que la seva detecció és no invasiva i no destructiva. No només pot ser utilitzada per a marcar proteïnes en cèl·lules vives, sinó que també pot ser utilitzada com a gen reporter per a mesurar l'activitat d'un determinat promotor o per a visualitzar la seva expressió en determinats teixits. La seva utilització com a proteïna de fusió o proteïna marcador estan patentades i comercialitzades per l'empresa *Clontech*.

La zona codificant del *gfp* correspon a una proteïna de 238 aminoàcids i 26.9 kDa de pes molecular. L'estructura tridimensional d'aquesta proteïna és en barril (β -barrel) i està constituïda per onze làmines β antiparal·leles i petits segments d'hèlix α en els extrems que envolten una hèlix α coaxial (Örmo *et al.*, 1996) (Figura I.11). Aquesta estructura cíclica protegeix tres aminoàcids consecutius (els residus Ser65, Tyr66 i Gly67), anomenats en conjunt cromòfor, que són essencials per a la fluorescència, i evita que perdin la seva capacitat lumínica davant canvis de pH, temperatura i concentració en el medi. Aquesta estructura dona gran estabilitat a la proteïna i la fa resistent als químics desnaturalitzants (Prasher, 1995).

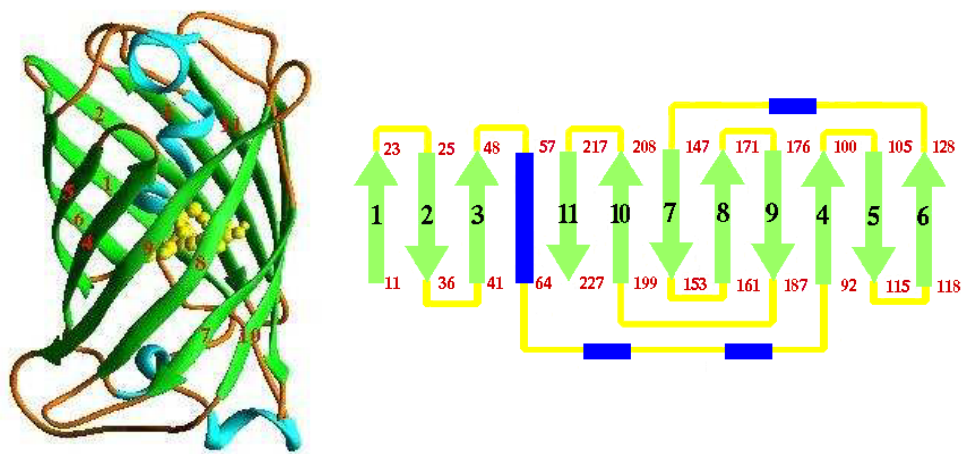


Figura I.11. Estructura de la proteïna GFP. Les onze làmines β antiparal·leles que formen la paret del cilindre estan representades en color verd i les diferents hèlixs α en blau.

I.3.2.2. Gen reporter *lacZ*

El gen *lacZ* d'*E. coli* codifica per a l'enzim β -galactosidasa. És un dels gens més utilitzats com a gen reporter tant en organismes procariotes com en eucariotes. En particular, és una eina molt utilitzada per a l'estudi d'expressió de gens en *S. cerevisiae* i també pot ser utilitzat per a identificar interaccions proteïna-proteïna en els sistemes de dos híbrids.

LacZ és un gen reporter molt utilitzat en experiments de transfecció ja que el seu producte, la β -galactosidasa, és molt estable i resistent a la degradació proteolítica, i el seu assaig és simple. De la mateixa manera que en el cas del *gfp*, *lacZ* està construït de manera que el seu enzim només s'expressarà en presència del complex receptor-ligand (Green and Chambon, 1991; Nagy and Schwabe, 2004). En aquest cas, però, l'expressió del gen reporter se seguirà a través de la seva activitat enzimàtica utilitzant dos grups principals de substrats: els cromogènics i els fluorogènics. En aquest treball com a substrat cromogènic s'ha estudiat l'o-nitrofenil- β -D-galactopiranosid (ONPG) que és hidrolitzat per la β -galactosidasa als productes o-nitrofenol, de color groc, i galactosa. L'o-nitrofenol es mesura espectrofotomètricament a 420 nm i aquesta mesura està relacionada directament amb l'activitat específica (Routledge and Sumpter, 1995). Entre els diferents mètodes per a la quantificació de la transcripció de gens reporter, aquells basats en la detecció per fluorescència són ràpids, molt sensibles i reproduïbles. En aquest treball es presenta un protocol integrat per a optimitzar aquest procés en termes de reproductibilitat i reduint al màxim el temps de l'assaig. Aquest protocol es basa en la utilització del substrat fluorogènic 4-metilumbeliferil-galactopiranosid (MUGal) (Figura I.12)

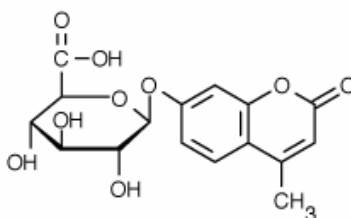


Figura I.12. Estructura del 4-metilumbeliferil-galactopiranosid (MUGal).

La β -galactosidasa metabolitza el MUGal donant com a producte fluorescent la 4-metilumbeliferona (4-MU). La fluorescència d'aquesta es mesura en un espectrofluorímetre amb una longitud d'ona d'excitació de 355 nm i una longitud d'ona d'emissió de 460 nm. La cinètica d'aparició de la fluorescència és linealment proporcional a la quantitat d'enzim produït, la qual està relacionada a través d'una corba dosi-resposta amb la concentració efectiva de compost present en el medi.

I.3.2.3. Gen reporter *gus*

El gen reporter *gus* d'*E. coli* és un altre gen marcador molt utilitzat degut a la seva gran estabilitat d'expressió i a què no interfereix amb el metabolisme de la cèl·lula hoste. Hi ha diferents substrats disponibles per a la detecció de l'expressió de l'enzim que s'obté a partir de la seva transcripció, la β -glucuronidasa. Tots ells contenen l'àcid D-glucopiranosidurònic unit per un enllaç glucosídic a un grup hidroxil d'un element cromogènic, fluorogènic o un altre tipus de molècula detectable. El substrat més utilitzat *in vitro* és el 4-metilumbeliferil β -D-glucuronid (MUG, Figura I.13 A) que és hidrolitzat per la β -glucuronidasa obtenint-se el fluorocrom 7-hidroxi-4-metil coumarin (Figura I.13 B).

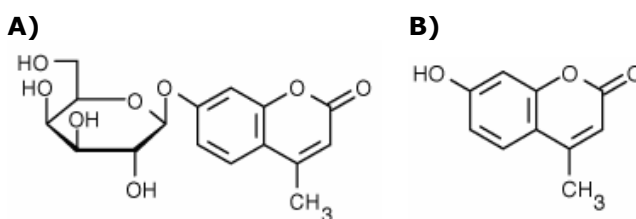


Figura I.13. A) Estructura del 4-metilumbeliferil β -D-glucuronid. B) 7-hidroxi-4-metil coumarin.

De la mateixa manera que abans, la longitud d'ona d'excitació del fluorocrom és de 355 nm, mentre que la d'emissió és 460 nm.

I.3.3. Receptors nuclears quimèrics

En aquest treball s'han utilitzat receptors nuclears quimèrics constituïts fusionant el LDB del receptor i el DBD del repressor bacterià LexA sota un promotor que s'expressa constitutivament. Aquest sistema permet, en principi, assajar diversos tipus de lligands en una mateixa soca de llevat simplement canviant el constructe d'expressió de la proteïna quimèrica.

I.3.3.1. Proteïna LexA

LexA és un gen d'*E. coli* que codifica per a una proteïna de 202 aminoàcids i 22.7 kDa de pes molecular àmpliament descrita i caracteritzada (Horii *et al.*, 1981).

Aquesta proteïna està constituïda per dos dominis units per una regió connectora:

- Domini N-terminal: del residu 1 al residu 72. Presenta una estructura en hèlix-gir-hèlix que forma el DBD (Pabo and Sauer, 1984).
- Regió connectora: de l'aminoàcid 73 al 94. En aquesta zona es produeix el trencament de la proteïna LexA.

- Domini C-terminal: del residu 95 al 202. Està implicat en els processos d'autohidròlisi (McDonald *et al.*, 1998).

Aquesta proteïna és un repressor transcripcional (Little *et al.*, 1981) amb capacitat per a formar dímers que actua unint-se a una regió específica localitzada en la regió promotora dels gens que reprimeix, el que suggereix que actua inhibint l'inici de la transcripció impedit que l'RNA polimerasa s'hi uneixi (Brent and Ptashne, 1981). La fusió del DBD de LexA amb un domini activador converteix aquest repressor bacterià en un activador eucariota (Brent and Ptashne, 1985).

I.3.3.2. Sistema L40-LexA-gen reporter

En el cas de les cèl·lules de llevat no és suficient incorporar els receptors nuclears en un plasmidi i fer una posterior transformació ja que aquests no podrien unir-se al DNA ni activar la transcripció. Es necessita, doncs, introduir seqüències de DNA a on es pugui unir el receptor activat. Una manera de fer-ho és incorporar una fusió de la seqüència operadora *lexA* davant del gen reporter l'activitat del qual interessa mesurar. Per altra banda, es fusiona en un plasmidi el DBD de LexA sota un promotor que s'expressa constitutivament amb el LBD del receptor. Un cop el lligand entra en la cèl·lula i s'uneix al receptor, tindrà lloc un canvi conformacional alliberant el complex receptor-ligand del complex multiproteic de xaperones. Aquest complex migrarà al nucli a on s'unirà a la seqüència d'unió de LexA situada davant del gen reporter activant-se la transcripció del gen (Figura I.14 A). Aquesta estratègia hauria de permetre analitzar una gran varietat de receptors en la mateixa soca (de fet, qualsevol activador transcripcional) només fusionant el LBD del receptor corresponent amb el DBD de LexA.

De tota manera, aquesta estratègia no funciona amb tots els receptors. S'ha comprovat que en el cas de l'ER el tipus de construcció proposada dóna menys resposta que utilitzant l'ER sencer. És per això que, en aquest cas, s'ha utilitzat una altra estratègia que es basa en la incorporació de dos plasmidis: un plasmidi que conté la seqüència completa del receptor i un segon plasmidi que conté la seqüència de l'ERE i el gen reporter. D'aquesta manera, quan el receptor expressat constitutivament interaccioni amb un lligand, el complex receptor-ligand es podrà unir a la seqüència específica del segon plasmidi activant la transcripció del gen reporter (Figura I.14 B).

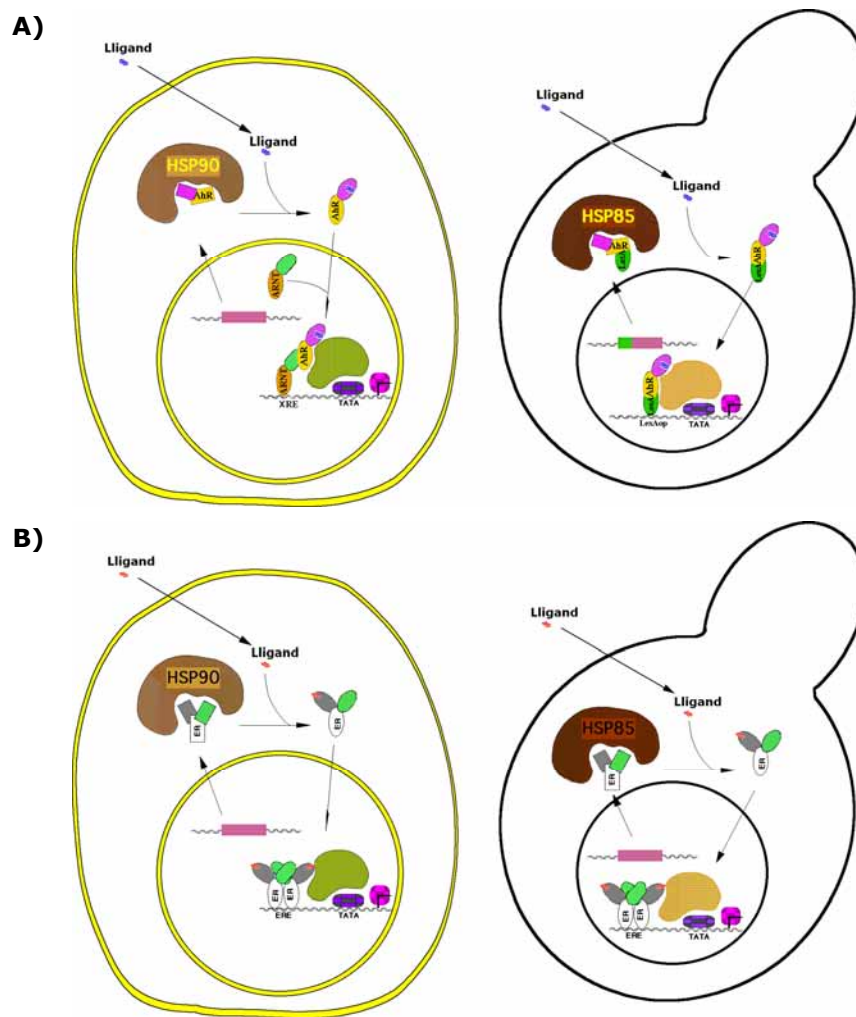


Figura I.14. Comparació entre el mecanisme d'acció dels lligands que interaccionen amb dos receptors de vertebrats en una cèl·lula de mamífer (esquerra) i una de llevat (dreta) transformada amb l'AhR (A) i amb l'ER (B).

II. OBJECTIUS

Els objectius d'aquest treball són:

Desenvolupament i anàlisi funcional de diferents sistemes de bioassaig i disseny d'un protocol automatitzable basat en soques de llevats modificades genèticament per a la detecció de xenobiòtics.

Anàlisi mitjançant RYA de les interaccions de diferents xenobiòtics amb dos receptors de vertebrats (ER i AhR), establiment de relacions entre l'estructura química dels xenobiòtics i la seva afinitat pels receptors, i estudi de les característiques estructurals requerides per a la unió als receptors.

Realització i avaluació d'un exercici d'intercalibració del sistema RYA per a la detecció d'estrogenicitat en mostres d'aigua a nivell europeu.

Aplicació del RYA per a la detecció de xenobiòtics en mostres ambientals i per a la monitorització de mètodes de tractament d'aigües residuals.

III. MATERIALS I MÈTODES

III.1. CULTIUS CEL·LULARS

III.1.1. Medis de cultiu

III.1.1.1. Medis de cultiu bacterians

- Medi LB
 - 10 g/l Triptona bacteriològica (triptona, digerit pancreàtic de caseïna (Pronadisa))
 - 5 g/l Extracte de llevat (Pronadisa)
 - 10 g/l NaCl (Merck)

Per a medi sòlid afegir 20 g/l d'agar (Bacto™ Agar (BD))

Aquest medi es prepara autoclavant els components en el recipient adequat, erlenmeyers o ampolles de vidre segons les necessitats. L'autoclau es realitza a 121°C durant 20 minuts.

Per a medi selectiu afegir 50 µg/ml d'ampicil·lina (Sigma)

- Medi SOB
 - 20 g/l Triptona bacteriològica (triptona, digerit pancreàtic de caseïna (Pronadisa))
 - 5 g/l Extracte de llevat (Pronadisa)

Un cop autoclavat s'ajusta el pH a 7.0 i s'afegeixen la resta de components estèrils:

- 2.5 mM KCl (Merck)
 - 10 mM MgCl₂ (Merck)
 - 10 mM MgSO₄ (Fluka)
 - 10 mM NaCl (Merck)
- Medi ric (SOC: SOB més glucosa 20 mM)
 - 20 g/l Triptona bacteriològica (triptona, digerit pancreàtic de caseïna (Pronadisa))
 - 5 g/l Extracte de llevat (Pronadisa)

Un cop autoclavat s'ajusta el pH a 7.0 i s'afegeixen la resta de components estèrils:

- 20 mM Glucosa (Merck)
- 2.5 mM KCl (Merck)
- 10 mM MgCl₂ (Merck)
- 10 mM MgSO₄ (Fluka)
- 10 mM NaCl (Merck)

III.1.1.2. Medis de cultiu de llevats

- Medis rics (YPD i YPR)

- 10 g/l Extracte de llevat (Pronadisa)
- 20 g/l Peptona bacteriològica (Pronadisa)

Per a medi sòlid afegir 20 g/l d'agar (Bacto™ Agar (BD))

Un cop autoclavat s'afegeix la font de carboni adient en cada cas:

- 20 g/l Glucosa (Merck) estèril: medi ric YPD
- 20 g/l Rafinosa (Fluka) estèril: medi ric YPR

- Medis sintètics: medi mínim (SD, *Synthetic Dextrose*) i medi complet (SC, *Synthetic Complete*)

- 1.7 g/l Base nitrogenada sense aminoàcids ni sulfat d'amoni (YNB-AA/AS, *Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids and Ammonium sulfate* (Difco))
- 5 g/l (NH₄)₂SO₄ (Fluka o Merck)

Per a medi sòlid afegir 20 g/l d'agar (Bacto™ Agar (BD))

Un cop autoclavat s'afegeixen la resta de components adients en cada cas:

- A. En el cas del medi mínim SD, s'afegeix una font de carboni: 20 g/l glucosa (Merck) autoclavada o 10 g/l galactosa (Fluka) esterilitzada per filtració.
- B. En el cas del medi complet SC, a part de la font de carboni corresponent, s'afegeixen diferents combinacions d'aminoàcids i/o nucleòtids necessaris per a complementar les auxotròfies. La idea és obtenir un medi selectiu

per a la presència dels gens marcadors. Les diferents combinacions d'aminoàcids i/o nucleòtids (autoclavats, si no s'indica el contrari) es preparen amb les següents concentracions finals:

- 0.01 g/l Adenina, esterilitzada per filtració (Sigma)
 - 0.04 g/l Uracil (Fluka)
 - 0.01 g/l Leucina, Histidina, Lisina, etc. (Sigma)
 - 0.01 g/l Triptòfan, esterilitzat per filtració. Guardar a 4°C embolicat amb paper d'alumini per a protegir de la llum (Sigma)
 - 1 g/l CAS aminoàcids (Difco)
- Plaques selectives (ClonNAT)
 - 10 g/l Extracte de llevat (Pronadisa)
 - 20 g/l Peptona bacteriològica (Pronadisa)
 - 20 g/l d'agar (Bacto™ Agar (BD))

Autoclavar a 121°C durant 20 minuts i afegir 20 g/l de glucosa estèril i 100 mg/l de nourseotricina (ClonNAT, Werner Bioagents (Jena, Germany))

III.1.2. Soques utilitzades

III.1.2.1. Soques bacterianes (*Escherichia coli*)

- **XL1-Blue:** *F::Tn10 proA⁺B⁺lacI^q Δ(lacZ) M15/recA1 endA1 gyrA96 (Nal^r) thi hsdR17 (r_k-m_k⁺) supE44 relA1 lac*

III.1.2.2. Soques de llevat (*Saccharomyces cerevisiae*)

- **L40:** MATa *trp1 leu2 his3 LYS2::lexA-HIS3 URA3::lexA-lacZ*

La soca L40 de *S. cerevisiae* presenta la particularitat de tenir dos gens reporter (*HIS3* i *lacZ*) precedits per la seqüència operadora *lexA*. Es tracta d'una soca ideal per a dur a terme experiments d'un o dos híbrids. Presenta auxotròfies per a triptòfan i leucina (Vojtek *et al.*, 1993).

- **BY4741 (o Y000):** MATa *his3 leu2 met15 ura3*
- **W303D (soca diploide):** MATa/MATα *leu2-3/ leu2-3 trp1-1/ trp1-1 ura3.1/ ura3.1 his3-1/his3-1 ade2-1/ade2-1 can1-100/ can1-100^R*

- YCM4:** La soca YCM4 va ser cedida per en Charles A. Miller (Miller, 1999). Aquesta soca deriva de la soca haploide W303a (*MATa ade2-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11, 15 ura3 can1-100*) i presenta dos constructes (Figura III.1). Un dels constructes és el reporter pDRE23-Z, que conté tres seqüències XRE5 i una fusió *CYC1-lacZ*. El segon constructe està integrat en el cromosoma III i co-expressa el receptor humà d'hidrocarburs d'aril i els gens de l'ARNT sota el control del promotor *GAL1,10*, promotor induïble per galactosa. Abans de realitzar l'assaig és necessari créixer les cèl·lules en galactosa tota la nit per a expressar l'AhR i l'ARNT.

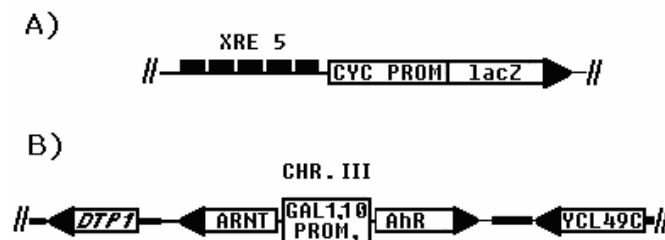


Figura III.1. Estructura dels elements sensor i reporter de la soca YCM4 (Miller, 1999). El constructe A és el reporter pDRE23-Z, que conté tres seqüències XRE5 i una fusió *CYC1-lacZ*. El constructe B co-expressa l'AhR humà i els gens de l'ARNT sota el control del promotor *GAL1,10*.

- YSB1:** La soca YSB1 (Boronat and Piña, 2006) deriva de la soca diploide W303D transformada per doble recombinació homòloga amb dos fragments de PCR (Figura III.2). El primer fragment de PCR, que presenta el gen reporter *gus*, va obtenir-se a partir del plasmidi pGUT (Jefferson *et al.*, 1987) i el segon, que codifica per al marcador de resistència nourseotricina (ClonNAT), a partir del pAG25 (Goldstein and McCusker, 1999). Aquesta soca presenta el gen *gus* sota el control del promotor *GAL1,10* que es reprimeix en presència de glucosa de manera que la soca es fa créixer utilitzant la rafinosa com a font de carboni ja que d'aquesta manera la inducció amb galactosa trigarà menys temps.

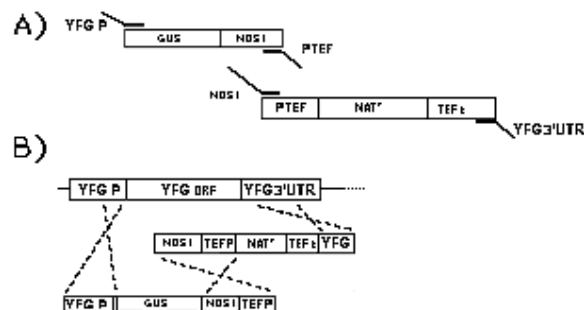


Figura III.2. Estratègia de la construcció i integració del reporter (Boronat and Piña, 2006). A) Esquema dels constructes utilitzats. B) Esquema de la doble recombinació homòloga.

III.1.3. Manipulació i procediments generals de treball amb *S. cerevisiae*

III.1.3.1. Procediments d'esterilització

Com a norma general, els medis de cultiu i les solucions van esterilitzar-se en una autoclau durant 20 minuts a 121°C. Com a procediment alternatiu per a l'esterilització d'aquelles solucions sensibles a la temperatura (galactosa, adenina, triptòfan, etc.), es va utilitzar l'esterilització per filtració a través de filtres de 0.22 µm Millex-GS (Millipore).

III.1.3.2. Creixement i manteniment de soques de *S. cerevisiae*

Les cèl·lules de *S. cerevisiae* poden ser crescudes en medi ric, YPD o YPR, o en medi mínim complementat amb els aminoàcids i nucleòtids corresponents que permetran créixer selectivament les soques auxotròfiques.

Les cèl·lules de llevat també poden ser crescudes tant en medi líquid com en medi sòlid, preparats ambdós amb els mateixos components però afegint agar al medi sòlid per a la seva solidificació.

La temperatura òptima de creixement de *S. cerevisiae* és de 30°C, creixent-se els cultius líquids amb agitació moderada per tal d'afavorir l'intercanvi gasós i els cultius sòlids en plaques de Petri amb medi solidificat per l'agar. Les plaques de medi sòlid se segellen amb parafilm per tal d'evitar que s'assequin excessivament.

- **Manteniment de les soques de *S. cerevisiae*:** Les soques de *S. cerevisiae* poden mantenir-se indefinidament en medi YPD amb glicerol estèril al 15% (v/v) a -80°C. No obstant això, si s'ha de mantenir la pressió selectiva per a alguna auxotròfia, és millor conservar-les en el medi selectiu adient amb glicerol estèril al 15% (v/v). Els estocs congelats reben el nom de glicerinats.
- **Descongelació dels estocs:** Per a recuperar cèl·lules de llevat a partir dels glicerinats s'agafa una petita porció del glicerinat rasant amb un escuradent estèril i es fa una estria en una placa de Petri amb el medi adient. Aquestes plaques s'incuben a 30°C fins a l'aparició de colònies, aproximadament uns 3 dies, i es guarden segellades amb parafilm a 4°C durant aproximadament un mes.
- **Treball rutinari amb *S. cerevisiae*:** Les cèl·lules amb que s'ha de treballar rutinàriament es mantenen en estocs crescuts en plaques de medi sòlid, descongelant-se noves cèl·lules a mesura que aquestes envelleixen, generalment es preparen noves plaques a partir dels glicerinats cada mes. Per

al creixement de cultius líquids a partir de les cèl·lules crescudes en plaques, s'agafa una colònia gran amb un escuradents estèril i es dissol en uns 2 ml de medi ric líquid (minicultiu) barrejant-se bé per a dispersar les cèl·lules. Si es requereix créixer cultius de volum més gran, primer es creixen minicultius fins que aquests arriben a la fase estacionària (aproximadament DO_{600} 1.5) i a partir d'aquests s'inoculen els cultius de major volum. Els assaigs RYA van fer-se amb cultius crescuts durant tota la nit en medi mínim complementat amb els aminoàcids i nucleòtids corresponents.

- Preparació de glicerinat a partir de nous transformants: Per a guardar una soca com un estoc congelat (glicerinat) es creixen minicultius d'aquesta en YPD, o el medi selectiu adient, fins a la fase estacionària. A continuació es barreja en un criotub (Corning) 1 ml del minicultiu amb 1 ml de glicerol al 15%. Aquests es congelen en neu carbònica i es guarden a -80°C .

III.2. MÈTODES DE BIOLOGIA MOLECULAR

En aquest apartat s'inclouen les receptes de les solucions emprades en el treball. Les cases comercials dels diferents productes i la preparació de les solucions només s'han detallat la primera vegada que apareixen en el text.

III.2.1. Plasmidis

pTZ57R/T: Vector dissenyat específicament per al clonatge de fragments de PCR (veure lligació més endavant, Figura III.9).

pRPG1.6 i pRPG3.10: Provenen del plasmidi pSLF Δ -178K (Idrissi and Piña, 1999). Presenten el gen reporter *lacZ* sota un promotor constitutiu. En el cas de pRPG1.6, *lacZ* es troba precedit per un únic lloc d'unió a Rap1p; mentre que pRPG3.10 en té tres idèntics en tàndem, de manera que assoleix nivells d'expressió unes 25 vegades superiors (cas típic de cooperativitat). Presenten el gen *URA3* com a marcador i un origen de replicació 2μ que permet tenir entre 10 i 20 còpies de plasmidi per cèl·lula (Figura III.3).

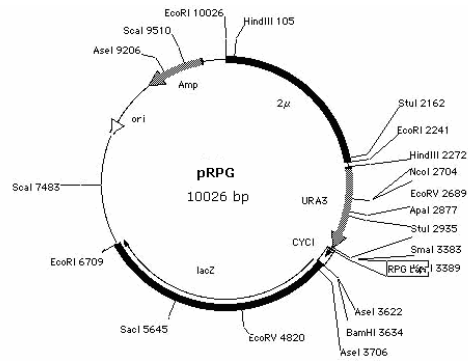


Figura III.3. Plasmidi pRPG.

pRPG-GUS1.6 i pRPG-GUS3.10: Plasmidis construïts a partir dels anteriors, pRPG1.6 i pRPG3.10 respectivament, de manera que presenten les mateixes característiques. En aquest cas, el fragment *Bam*H1-*Sac*1 del gen *lacZ* va substituir-se pel mateix fragment de pGUT, que inclou la zona codificant del gen *gus* i un terminador (Figura III.4).

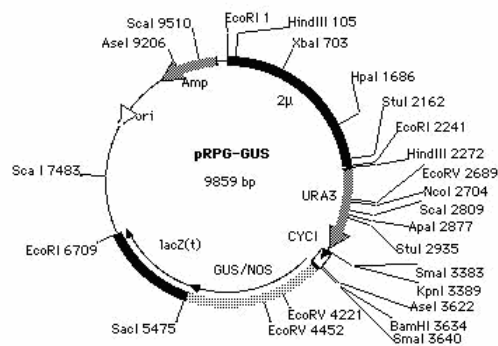


Figura III.4. Plasmidi pRPG-GUS.

pLMAX: Plasmidi que conté una fusió del DBD del repressor bacterià LexA i el LBD de l'Ahr de ratolí que prové del pLexA202 de Clontech (BD Biosciences, Palo Alto, CA, USA). Presenta el gen *HIS3* com a marcador i l'origen de replicació 2μ (Figura III.5).

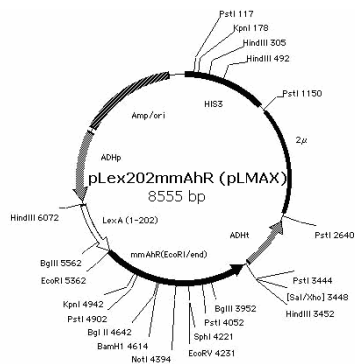


Figura III.5. Plasmidi pLMAX.

pLPR: Plasmidi que prové del pG1PRB, que expressa el PR humà. En aquest cas, el LBD del receptor també s'ha fusionat al DBD de LexA (Garcia-Reyero *et al.*, 2001). També presenta el gen *HIS3* com a marcador i un origen de replicació 2μ (Figura III.6).

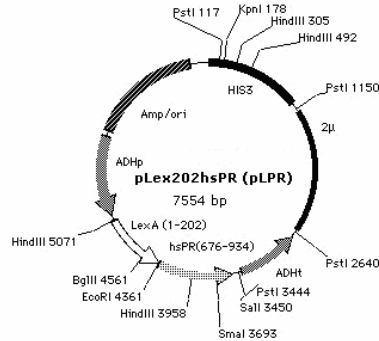


Figura III.6. Plasmidi pLPR.

pVitBx2: Plasmidi que conté dues còpies de l'ERE del gen B1 de la vitel·logenina de *Xenopus laevis* (5'-AGTCACTGTGACC-3' (Green and Chambon 1991)) i un promotor mínim (CYC1) amb el gen d'assaig *lacZ*. Presenta el gen *URA3* com a marcador i l'origen de replicació 2μ (Garcia-Reyero *et al.*, 2001) (Figura III.7).

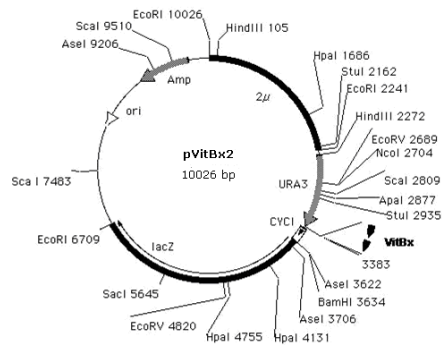


Figura III.7. Plasmidi pVitBx2.

pH5HEO: Plasmidi que prové de la inserció de l'ER humà (Green and Chambon, 1991) en la diana *BamH1* del plasmidi pAAH5 (Schneider and Guarente, 1991). Conté el gen *LEU2* com a marcador i l'origen de replicació 2μ (Garcia-Reyero *et al.*, 2001) (Figura III.8).

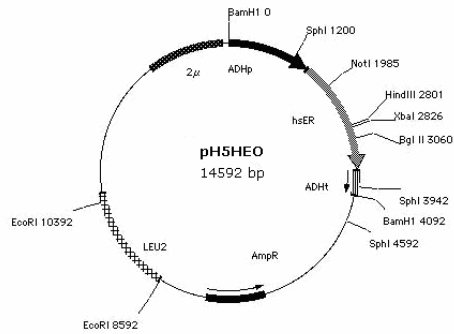


Figura III.8. Plasmidi pHSHEO.

III.2.2. Obtenció i amplificació de DNA

III.2.2.1. Aïllament i purificació de bandes de DNA inferiors a 50 kb de llargada d'un gel d'agarosa

Solucions

- Kit comercial (Schleicher & Schuell®)
 - Tampó d'unió
 - Tampó de rentat
 - Tampó de reducció de sals
 - *Glass milk* (suspensió de llet de vidre)

- TE 1x
 - 1 mM EDTA
 - 10 mM Tris-HCl pH 7.5

Procediment

- Tallar la banda d'interès de manera que contingui la mínima quantitat possible d'agarosa i pesar-la
- Per cada 100 mg de gel, afegir 280 μ l de tampó d'unió en un tub de microcentrífuga
- Escalfar a 65°C durant uns 5 minuts (fins que es fongui)
- Resuspendre la solució *glass milk* utilitzant una pipeta de plàstic i afegir 20 μ l d'aquesta a la mostra
- Deixar a temperatura ambient durant 10 minuts (barrejar per inversió en intervals d'un minut)
- Centrifugar durant 30 segons a 15000 rpm

- Descartar el màxim sobrenedant possible
- Afegir 500 µl de tampó de rentat i resuspendre el sediment
- Centrifugar 30 segons a 15000 rpm
- Descartar el sobrenedant
- (Repetir els dos passos anteriors)
- Afegir 500 µl de tampó de reducció de sals
- Centrifugar 2 minuts a 15000 rpm
- Descartar el sobrenedant
- Centrifugar el sediment durant 30 segons a 15000 rpm
- Descartar el màxim sobrenedant possible
- Assecar el sediment per evaporació durant 15-30 minuts a temperatura ambient
- Resuspendre el sediment en 50 µl de TE 1x
- Incubar 5 minuts a 50°C barrejant el tub ocasionalment
- Centrifugar 30 segons a 15000 rpm
- Recuperar el sobrenedant i guardar-lo a -20°C

III.2.2.2. Lligació

Es va utilitzar el Kit InsT/Aclone PCR clonig de Fermentas®. Aquest kit està basat en l'ús d'un vector dissenyat específicament per al clonatge de fragments de PCR, el pTZ57R/T (Figura III.9). Aquest vector permet el clonatge de productes de PCR que contenen residus addicionals d'adenina en els extrems 3'. Aquests residus extrems són introduïts per la *Taq* DNA polimerasa i altres polimerases termostables que no presenten correcció d'errors.

El vector ha estat pre-tallat amb *Eco321* i tractat amb deoxinucleotidil transferasa terminal per tal de crear fragments 3'-ddT en ambdós extrems. Quan un fragment de PCR amb extrems 3'-dA es lliga dins del vector, es produeix una molècula circular amb dos talls de cadena simple. El producte circular es pot utilitzar directament per a transformar cèl·lules d'*E. coli* (Figura III.10).

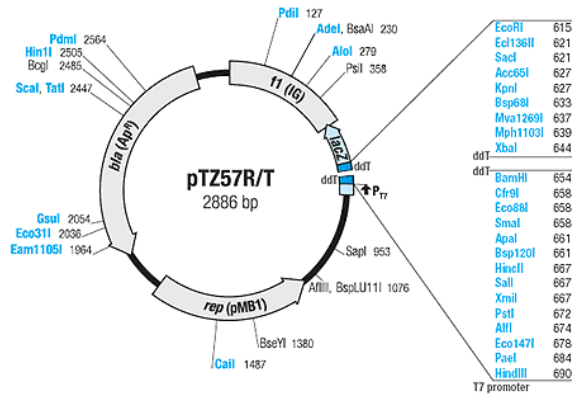


Figura III.9. Mapa de restricció del vector pTZ57R/T.

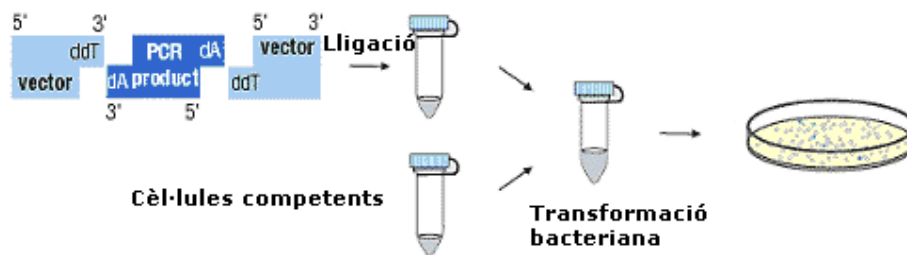


Figura III.10. Lligació d'un fragment de PCR al vector pTZ57R/T.

III.2.2.3. Transformació bacteriana

Per a transformar en bacteris es van fer servir cèl·lules competents d'*E. coli* pertanyents a la soca XL1-Blue i obtingudes mitjançant una modificació del mètode de clorur de rubidi (Hanahan, 1983).

Solucions

- TFB
 - 10 mM K-MES
 - 100 mM RbCl
 - 45 mM MnCl₂
 - 10 mM CaCl₂
 - 3 mM (NH₄)₆CoCl₃

Esterilitzar per filtració

- K-MES

- 1 M MES

Ajustar el pH a 6.2 amb KOH

Guardar a -20°C

Procediment: preparació de cèl·lules competents (mètode de clorur de rubidi)

- Inocular una colònia d'una placa de cèl·lules d'*E. coli* pertanyents a la soca XL1-Blue en 5 ml de SOB
- Incubar tota la nit a 37°C
- Inocular el cultiu en 200 ml de SOB
- Afegir 12 ml de NaCl 5 M
- Créixer a 30°C fins a assolir una DO₅₅₀ de 0.5
- Centrifugar a 5000 rpm durant 10 minuts
- Descartar el sobrenedant
- Resuspendre el sediment en 15 ml de TFB
- Incubar 15 minuts en gel
- Afegir 700 µl de DMSO i barrejar
- Incubar 10 minuts en gel
- Preparar un bany fred d'etanol (neu carbònica amb etanol)
- Afegir 1 ml a un tub Eppendorf situat en el bany fred d'etanol
- Afegir 700 µl de DMSO i barrejar
- Incubar 5 minuts en gel
- Guardar a -80°C

Procediment: transformació bacteriana

- Barrejar 100 µl de cèl·lules competents amb el DNA plasmídic
- Incubar 15 minuts en gel (30 minuts si el DNA ve d'una lligació)
- Aplicar un xoc tèrmic incubant les cèl·lules a 37°C durant 5 minuts
- Incubar en gel durant 2 minuts
- Afegir 800 µl de SOC
- Incubar 30 minuts a 37°C
- Plaquejar en medi selectiu (LB + ampil·lina)

III.2.2.4. Preparació de DNA a petita escala (Miniprep)

Es va fer servir el mètode de lisi per ebullició (Holmes and Quigley, 1981). Aquest mètode consisteix en obrir la paret bacteriana mitjançant un tractament amb liozím, un detergent no aniònic (Tritó X-100) i calor. D'aquesta manera, el plasmidi s'allibera al medi mentre que el cromosoma bacterià queda unit a la membrana. Les restes cel·lulars, juntament amb el cromosoma bacterià, es precipiten mitjançant centrifugació i el plasmidi es recupera precipitant-lo amb isopropanol. Finalment, es pot fer un tractament amb RNAsa per a eliminar l'RNA que queda a la mostra.

Solucions

- STET
 - 8% Sacarosa (Merck)
 - 5% Tritó X-100 (Sigma)
 - 40 mM EDTA pH 8.0 (Sigma)
 - 50 mM Tris pH 8.0 (Roche)

- Solució de liozím

Dissoldre el liozím (Sigma) en aigua a una concentració de 10 mg/ml. Fer alíquotes en tubs Eppendorf i guardar a -20°C.

- Solució de RNAsa

Dissoldre l'RNAsa (Ribonucleasa A de pàncrees boví, Sigma) en aigua a una concentració de 10 mg/ml. Fer alíquotes en tubs Eppendorf i guardar a -20°C.

Procediment

- Fer créixer les cèl·lules competents en 2 ml d'LB amb ampicil·lina durant una nit
- Transferir 1.5 ml de cultiu a un tub Eppendorf
- Centrifugar durant 20 segons a 15000 rpm
- Resuspendre el sediment en 700 µl de STET
- Posar-ho tot en gel
- Afegir 25 µl de liozím (10 mg/ml)
- Incubar 5 minuts en gel
- Posar a bullir durant 2 minuts

- Centrifugar 10 minuts a 15000 rpm
- Treure el sediment amb un escuradents estèril
- Afegir 700 µl d'isopropanol (Carlo Erba)
- Incubar 20 minuts a -20°C
- Centrifugar 5 minuts a 15000 rpm
- Rentar el sediment amb etanol 70%
- Deixar assecar el sediment a temperatura ambient
- Resuspendre en 100 µl de TE 1x
- Afegir 2µl d'RNAsa (10 mg/ml)
- Incubar 15 min a 37°C

III.2.2.5. Preparació de DNA a gran escala (Maxiprep)

Es va fer servir el mètode de lisi alcalina (Sambrook *et al.*, 1989). Aquest mètode consisteix en tractar la paret bacteriana amb lisozim. Després es desnaturalitzen les proteïnes de membrana i el DNA mitjançant una barreja de SDS i NaOH. El KAc neutralitza la reacció i fa precipitar el DNA cromosòmic, juntament amb les altres restes cel·lulars, ja que és massa complex per renaturalitzar-se. El DNA plasmídic és petit i circular la qual cosa fa que es pugui renaturalitzar ràpidament i quedi dissolt en el sobrenedant.

Solucions

- Tampó GTE (Glucosa, Tris, EDTA)
 - 50 mM Glucosa
 - 10 mM EDTA
 - 25 mM Tris pH 8.0
- Solució NaOH/SDS
 - 0,2 M NaOH (Carlo Erba)
 - 1% SDS (Fluka)

S'ha de preparar just abans de fer-la servir (solució extemporània)

- Solució KAc/AcOH 5M
 - 296 g/l KAc (Merck)
 - 115 ml/l àcid acètic glacial (Panreac)

Procediment

- Inocular una colònia d'*E. coli* transformada amb el plasmidi que es vulgui amplificar (resultant en la transformació bacteriana) en 250 ml d'LB amb ampil·lina
- Incubar tota la nit a 37°C
- Centrifugar 15 minuts a 5000 rpm a 4°C
- Resuspendre el sediment en 10 ml de GTE fred
- Afegir una punta d'espàtula de lizozim (Sigma)
- Barrejar bé i incubar 10 minuts en gel
- Afegir 20 ml de la solució NaOH/SDS
- Barrejar suaument i incubar 10 minuts en gel
- Afegir 15 ml de KAc/AcOH 5M
- Barrejar suaument i incubar 10 minuts en gel
- Centrifugar 15 minuts a 5000 rpm
- Filtrar el sobrenedant amb una gasa estèril
- Afegir 20 ml d'isopropanol
- Incubar 15 minuts a temperatura ambient
- Centrifugar 10 minuts a 5000 rpm
- Resuspendre el sediment en 4ml d'aigua
- Afegir 4 ml de LiCl 5 M
- Incubar 15 minuts en gel
- Centrifugar 5 minuts a 4000 rpm i guardar el sobrenedant
- Afegir 18 ml d'etanol absolut
- Incubar 1 hora a -20°C per a precipitar el DNA
- Centrifugar 15 minuts a 5000 rpm
- Descartar el sobrenedant i resuspendre el sediment en 750 µl de TE 1x
- Passar el contingut a un tub Eppendorf
- Afegir 10 µl d'RNAsa (10 mg/ml) i incubar 30 minuts a 60°C
- Afegir una punta d'espàtula de proteïnasa K (Sigma) i incubar 30 minuts a 37°C
- Fer una extracció amb fenol (Merck)
- Afegir 80 µl de NaCl 5 M i 400 µl d'isopropanol
- Barrejar i centrifugar 10 minuts a 15000 rpm
- Rentar el sediment amb etanol al 70%
- Deixar assecar a temperatura ambient
- Resuspendre en TE 1x i guardar a -20°C

III.2.3. Transformació de soques de llevat amb DNA plasmídic

Es va fer servir el mètode d'acetat de liti (Sherman, 1991). Les cèl·lules de llevat són permeabilitzades amb acetat de liti, de manera que es tornen competents. Aleshores, es barregen amb el DNA en presència de polietilenglicol, s'aplica un xoc tèrmic i, finalment, es plaquegen en medi selectiu.

Solucions

- TE 1x
 - 1mM EDTA
 - 10 mM Tris-HCl pH 7.5
- TE 10x
 - 10 mM EDTA
 - 100 mM Tris-HCl pH 7.5
- LiAc 1x
 - 0.1 M LiAc (Sigma) en TE 1x pH 7.5
- LiAc 10x
 - 1 M LiAc pH 7.5 en TE 10 x pH 7.5
- PEG (polietilenglicol) 50% p/v
- LiAc/PEG
 - 1 volum LiAc 10x
 - 9 volums PEG-3350 50%
- DNA d'esperma de salmó (10 mg/ml)

Deixar resuspendre l'esperma de salmó (spermidine (N-[3-Aminopropyl]-1,4-butanediamine)Trihydrochloride, Sigma) en TE 1x a 4°C durant tota una nit. L'endemà sonicar dues vegades durant 30 segons. Extreure una vegada amb fenol, una altra amb fenol:cloroform i novament amb cloroform. Després precipitar amb etanol absolut i rentar amb etanol al 70%. A continuació redissoldre en TE 1x, desnaturalitzar el DNA incubant a 100°C durant 20 minuts i centrifugar 5 minuts a 15000 rpm. Finalment, rentar, aliquotar i guardar a -20°C.

Procediment

- Créixer les cèl·lules de llevat en YPD fins que arribin a una DO_{600} entre 0.5 i 1
- Passar 10 ml de cultiu a un tub Falcon de 15 ml
- Centrifugar 5 minuts a 4000 rpm
- Descartar el sobrenedant i resuspendre el sediment en 2 ml de TE 1x estèril
- Centrifugar 5 minuts a 4000 rpm

- Descartar el sobrenedant i resuspendre el sediment en 2 ml de LiAc 1x estèril
- Centrifugar 5 minuts a 4000 rpm
- Descartar el sobrenedant i resuspendre en 100 µl de LiAc 1x estèril
- Passar 100 µl de la suspensió cel·lular a un tub Eppendorf estèril
- Afegir 10 µl de DNA d'esperma de salmó (10 mg/ml)
- Afegir 10 µl del DNA plasmídic corresponent (1-10 µg)
- Barrejar
- Afegir 700 µl de la solució LiAc/PEG acabada de preparar
- Incubar 30 minuts a 30°C
- Incubar durant 15 minuts a 37°C per a provocar un xoc tèrmic
- Centrifugar 1 minut a 6000 rpm
- Descartar el sobrenedant i rentar dues vegades amb TE 1x estèril
- Resuspendre en 400 µl de TE 1x estèril i plaquejar en plaques de medi selectiu adient

En cas de què la selecció sigui per resistència a nourseotricina, les cèl·lules s'han de resuspendre en YPD, incubar 4 hores a 30°C en moviment per a què expressin el gen de resistència i després plaquejar en el medi selectiu adient.

III.3. EXTRACCIÓ DE COMPOSTOS HIDROFÒBICS I HIDROFÍLICS PRESENTS EN MOSTRES REALS

Per tal de recuperar els contaminants orgànics hidrofòbics i hidrofílics que es desitja analitzar per RYA, les mostres han de ser sotmeses a un procés d'extracció. Existeixen diverses tècniques d'extracció de compostos orgànics aplicables a mostres sòlides:

- Extracció per Soxhlet
- Ultrasons
- Microones
- Extracció amb fluid supercrític
- Extracció accelerada amb dissolvents (ASE, *Accelerated Solvent Extractor*)

L'ASE està totalment automatitzada i té diversos avantatges respecte a mètodes més tradicionals ja que, al ser més eficient, permet la utilització de dissolvents menys perillosos i en menor quantitat. És per això que va ser la tècnica escollida en aquest treball per a dur a terme l'extracció dels compostos orgànics presents en les mostres de sediments. L'ASE es basa en la utilització de dissolvents comuns a elevades condicions de temperatura i pressió de manera que l'eficiència del procés

d'extracció augmenta. La pressió elevada ajuda a mantenir la temperatura del dissolvent i facilita que la cel·la d'extracció s'ompli. Les elevades temperatures baixen la viscositat del dissolvent, permeten una difusió més ràpida dins de la matriu i milloren la solubilitat de l'analit en el dissolvent utilitzat de manera que s'aconsegueixen cinètiques de desorció més ràpides. Per altra banda, les diferents mostres també van ser sotmeses a un procés de lixiviació.

La neteja del material és un pas molt important en l'anàlisi de compostos orgànics. El material s'ha de netejar perfectament. El procés de neteja consisteix en un primer rentat amb aigua i sabó i, posteriorment, una submersió durant 15 minuts en un bany d'ultrasons amb un 5-10% de detergent alcalí Extran AP 13 (Merck, Darmstadt, Germany). En treure'l del bany, s'han de fer diferents esbandits. Primer, s'esbandeix amb aigua destil·lada, després tres cops amb aigua miliQ i tres cops més amb acetona. Un cop net s'ha de tapar amb paper d'alumini i assecar al forn. A més, els vials, tubs i pipetes *pasteur* s'han de muflar durant 12 hores a 400°C per tal d'assegurar l'eliminació de qualsevol compost orgànic.

III.3.1. Obtenció d'extractes orgànics

Es va utilitzar l'ASE® 300 *Accelerated Solvent Extractor* (2000 Dionex Corporation)

- Fer una barreja 1:1 amb diclorometà (Merck) i n-hexà (Merck)
- Afegir hidromatrix (*Chem tube – Hydromatrix, Varian*) a un got de precipitats
- Cobrir totalment la hidromatrix amb la barreja de diclorometà i n-hexà
- Sonicar 10 minuts en un bany d'ultrasons
- Decantar l'excedent de solvent i tornar a repetir el rentat
- Deixar assecar la hidromatrix en la estufa a 35°C
- Prensar la hidromatrix
- Muntar els diferents components de l'ASE. Posar en un extrem de les cel·les els filtres metàl·lics i els filtres de fibra de vidre i cel·lulosa (Dionex, D28)
- Afegir hidromatrix i prensar-la
- Pesar 1 g de mostra i barrejar amb 0.5 g d'hidromatrix aproximadament
- Afegir la barreja a la cel·la i tornar a prensar
- Acabar d'afegir hidromatrix fins a emplenar la cel·la i tornar a prensar
- Tancar la cel·la amb força
- Col·locar els vials de recol·lecció i les cel·les en l'ASE (*ASE® 300 Accelerated Solvent Extractor, Dionex*)
- Col·locar el solvent per a fer l'extracció (diclorometà i n-hexà (1:1))
- Programar l'ASE amb el següent programa:

- Temperatura 100°C
- Preescalfament 6 minuts
- Escalfament 5 minuts
- Estàtic 5 minuts
- Flux recuperat 100%
- Purga 90 segons
- Pressió 1500 psi

Aquest programa es repeteix tres vegades per a cada cel·la

Una vegada finalitzat el programa:

- Evaporar amb nitrogen el contingut dels vials de recollida
- Resuspendre bé en 1 ml de metanol
- Fer tres rentats evaporant el metanol amb nitrogen i resuspendent novament en metanol
- Finalment, resuspendre les mostres en 250 µl de metanol i guardar-les a -20°C

III.3.2. Obtenció de lixiviats (lixiviació)

- Pesar 1 g de mostra
- Afegir 1 ml d'aigua miliQ
- Barrejar en un tub de vidre muflat fins que quedi totalment homogeneïtzat
- Deixar en agitació moderada a 4°C i protegit de la llum durant 2 dies
- Centrifugar i recollir el sobrenedant en un vial. Si és necessari, filtrar per a que la mostra quedi ben neta
- Guardar a -20°C

III.4. DESENVOLUPAMENT DEL RYA

III.4.1. Sistemes de llevats utilitzats

El principi és simple: consisteix en un organisme unicel·lular (llevat) modificat genèticament per a obtenir una resposta fàcil de detectar a l'addició de compostos que puguin mimetitzar els lligands naturals de determinats receptors.

En aquest cas concret, s'ha treballat amb diferents sistemes sensors:

- Sistema basat en el gen reporter *gfp*
- Sistema basat en el gen reporter *lacZ*
- Sistema basat en el gen reporter *gus*

III.4.1.1. Sistema basat en el gen reporter *gfp*

Aquest sistema està basat en una soca de llevat en la que s'introdueixen el gen reporter *gfp* i el receptor nuclear d'interès. L'estratègia que es va seguir és la següent:

Primer, un fragment (Longtine *et al.*, 1998) que conté el gen reporter *gfp* i el marcador de selecció *Kan^R* va ser amplificat per PCR amb uns oligonucleòtids mixtes en els que l'extrem 5' es corresponia a l'ORF del gen *HIS3* seguint la pauta de lectura. Les seqüències dels oligonucleòtids són les següents: 5'-GCAGAAAGCCCTAGTAAAGCGTATTCGGATCCCCGGGTTAATTAA-3' (directe) i 5'-GAACACCTTTGGTGGAGGGAACATCGAATTCGAGCTCGTTTAAAC-3' (revers). A continuació, aquest fragment va introduir-se per un procés de recombinació homòloga dins la soca de llevat L40 i van seleccionar-se les cèl·lules que l'havien incorporat (Figura III.11). En aquest procés, la soca L40 transformada amb aquest fragment que conté el gen reporter *gfp* perd el gen *HIS3* i, per tant, passa a ser *His⁻*.

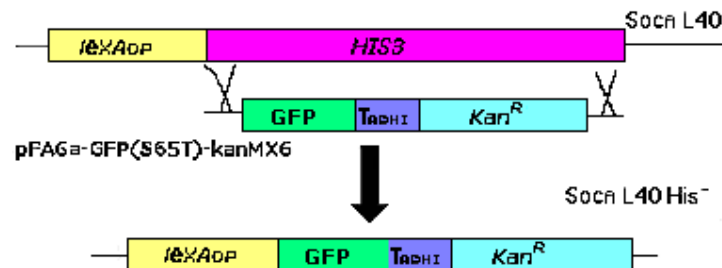


Figura III.11. Esquema de la recombinació homòloga amb la que va integrar-se el fragment pFAG α -GFP(S65T)-kanMX6 (Longtine *et al.*, 1998) en la soca L40.

La soca L40 amb el gen reporter *gfp* integrat va ser obtinguda amb èxit i, a continuació, va transformar-se amb els plasmidis que contenien els diferents receptors, pLPR (PR) o pLMAX (AhR) depenent del sistema, de manera que va obtenir-se una soca a on l'expressió del gen reporter *gfp* depenia de la presència d'un lligand capaç d'unir-se al receptor i activar-lo.

Per a simplificar d'ara endavant aquests sistemes s'han anomenat: sistema PR-*gfp*, en el cas del sistema basat en el PR més el gen reporter *gfp*, i sistema AhR-*gfp*, sistema basat en l'AhR més el gen reporter *gfp*. L'ER va ser descartat degut al tipus de construcció d'aquest sistema, no basada en el reporter *lexA*, com és el cas dels dos receptors anteriors.

III.4.1.2. Sistema basat en el gen reporter *lacZ*

En el cas del sistema basat en el gen reporter *lacZ*, en primer lloc va dissenyar-se un sistema per a comparar l'activitat constitutiva d'aquest gen reporter sota el control d'un promotor amb diferent nivell d'expressió. D'aquesta manera, va transformar-se la soca W303D amb els plasmidis pRPG1.6 i pRPG3.10.

A continuació, van dissenyar-se diferents sistemes basats en tres receptors nuclears (PR, AhR i ER) per a avaluar el potencial de disrupció endocrina causat per diferents xenobiòtics presents en diverses mostres estudiades. Per a fer això van introduir-se en el llevat dos elements genètics: el receptor i el gen reporter *lacZ*. En aquest sistema qualsevol compost present en el medi de cultiu capaç d'unir-se i activar el receptor promourà l'expressió de l'enzim β -galactosidasa que transformarà un determinat substrat en un producte fàcilment detectable. En aquest treball s'han utilitzat dos tipus de substrats per al gen reporter *lacZ*: un substrat cromogènic (ONPG) i un substrat fluorogènic (MUGal).

Per a què es pugui donar resposta transcripcional és imprescindible la unió receptor-ligand i que aquest complex interaccioni amb el DNA. Aquest fet que sembla trivial no ho és tant ja que els receptors nuclears utilitzats no tenen domini propi d'unió al DNA de llevat degut a què no es troben de manera natural en aquestes cèl·lules. Per aquesta raó són de gran importància les construccions plasmídiques mostrades anteriorment. En el cas dels sistemes PR-RYA (sistema basat en el PR més el gen reporter *lacZ*) i AhR-RYA (sistema basat en l'AhR més el gen reporter *lacZ*), la soca L40 va transformar-se amb els plasmidis pLPR i pLMAX, respectivament, que contenen el LBD del receptor fusionat al DBD del repressor bacterià LexA sota un promotor que s'expressa constitutivament. Aquesta soca es caracteritza per presentar la seqüència operadora *lexA* situada davant del gen reporter *lacZ*. En presència d'un lligand, el complex receptor-ligand migrarà al nucli on s'unirà a la seqüència operadora *lexA* activant la transcripció de *lacZ*.

En el cas del sistema ER-RYA, sistema basat en l'ER més el gen reporter *lacZ*, no hi ha cap plasmidi que incorpori la seqüència operadora *lexA* sinó que, en aquest cas, el llevat va transformar-se amb dos plasmidis, pH5HEO i pVitBx2, de manera que el receptor, present en el plasmidi pH5HEO, s'unirà a l'ERE del plasmidi pVitBx2.

III.4.1.2.1. Sistema basat en el receptor de progesterona més el gen reporter *lacZ* (PR-RYA)

En aquest cas va seguir-se l'estratègia basada en el sistema L40-LexA-gen reporter. El plasmidi pLPR conté una fusió del DBD de LexA i el LBD del PR humà expressat constitutivament en un plasmidi episomal d'elevat nombre de còpies (plasmidi d'expressió pLexA202 de Clontech (BD Biosciences, Palo Alto, CA, USA)). Aquest constructe quimèric va introduir-se en la soca L40 (Vojtek *et al.*, 1993), en la qual una fusió *lexA-lacZ* està integrada en el genoma (Wach *et al.*, 1994).

III.4.1.2.2. Sistema basat en el receptor d'hidrocarburs d'aril més el gen reporter *lacZ* (AhR-RYA i YCM-RYA)

En aquest cas van seguir-se dues estratègies diferents:

A) Sistema basat en el sistema L40-LexA-gen reporter (AhR-RYA)

És la mateixa estratègia que es va fer servir per al sistema PR-RYA però, en aquest cas, la soca L40 va ser transformada amb el plasmidi d'expressió pLMAX que conté una fusió del DBD de LexA amb el LBD de l'AhR de ratolí en el plasmidi d'expressió pLexA202 de Clontech (BD Biosciences, Palo Alto, CA, USA). Aquest constructe quimèric, de la mateixa manera que abans, va introduir-se en la soca L40 (Vojtek *et al.*, 1993), en la qual una fusió *lexA-lacZ* està integrada en el genoma (Wach *et al.*, 1994).

B) Sistema YCM-RYA

Aquest sistema està basat en la soca YCM4 cedida per en Charles A. Miller (Miller, 1999) (veure descripció en l'apartat III.1.2.2. Soques de llevat).

III.4.1.2.3. Sistema basat en el receptor d'estrògens més el gen reporter *lacZ* (ER-RYA)

En aquest cas es va utilitzar la soca BY4741 obtinguda d'EUROSCARF (EUROSCARF, Frankfurt, Germany) prèviament transformada amb els plasmidis pH5HEO i pVitBx2 (Garcia-Reyero *et al.*, 2001). El plasmidi d'expressió pH5HEO prové de la inserció de l'ER humà (Green and Chambon, 1991) en la diana *BamH1* del plasmidi pAAH5 (Schneider and Guarente, 1991). El plasmidi reporter pVitBx2 conté dues còpies de l'ERE del gen B1 de la vitel·logenina de *Xenopus laevis* (5'-AGTCACTGTGACC-3')

(Green and Chambon, 1991)) i un sistema promotor (CYC1) amb el gen d'assaig *lacZ*.

El sistema ER-RYA es basa en plasmidis episomals d'elevat nombre de còpies, els quals asseguren de 10 a 20 còpies per cèl·lula tant del plasmidi d'expressió que conté el receptor com del plasmidi reporter (Garcia-Reyero *et al.*, 2001). A més, l'expressió de l'ER està regulada pel promotor ADH1 sencer (d'1.5 kb) que és més fort que altres versions més curtes. En aquestes condicions, la resposta a agonistes d'estrògens és extremadament sensible, la qual cosa permet temps d'incubacions molt curts.

III.4.1.3. Sistema basat en el gen reporter *gus*

Experimentalment es va introduir el plasmidi que conté el gen *gus* dins la soca de llevat diploide W303D. Aquest plasmidi presenta un promotor constitutiu que fa que el gen s'expressi sense la necessitat de la presència de cap compost extern a la cèl·lula de llevat. D'aquesta manera, s'espera detectar expressió de l'enzim que s'obté a partir de la transcripció del gen reporter *gus*, la β -glucuronidasa, mitjançant la metabolització del seu substrat, MUG, a un producte fluorescent. Per a fer aquest assaig, es va contar amb dues versions del plasmidi pRPG-GUS (pRPG-GUS1.6 i pRPG-GUS3.10) que es diferencien en el nivell d'expressió del promotor, essent precedit el primer per un promotor dèbil mentre que el segon es troba sota el control d'un promotor fort.

III.4.1.3.1. Sistema GAL1-GUS

Aquest sistema està basat en la soca YSB1 que presenta el gen reporter *gus* sota el control del promotor *GAL1,10* (veure descripció en l'apartat III.1.2.2. Soques de llevat). Aquest sistema s'ha utilitzat per a discernir entre els efectes tòxics i els efectes inhibitoris dels lligands.

III.4.2. Assaigs RYA

En aquest treball s'ha fet servir una versió de RYA que evita l'adsorció dels compostos hidrofòbics a les superfícies de plàstic i la migració de les substàncies estrogèniques del material de plàstic a les solucions aquoses (Noguerol *et al.*, 2006a; Garcia-Reyero *et al.*, 2001; Garcia-Reyero *et al.*, 2005). Per a aconseguir això, s'ha utilitzat material de vidre en lloc de plàstic. La utilització exclusiva de material de vidre impedeix que els compostos hidrofòbics es fixin per adsorció en qualsevol material orgànic, ja siguin puntes de pipetes, tubs Eppendorf, plaques de

cultiu cel·lular o plaques de microtitulació. Això és especialment rellevant per als sistemes basats en l'AhR degut a la natura altament lipofílica de la majoria dels seus lligands. Un mètode alternatiu i més pràctic degut a què s'augmenta la processivitat de l'assaig fent possible l'anàlisi de més mostres a la vegada és la utilització de plaques de microtitulació sililades amb diclorodimetilsilà solució al 2% en 1,1,1-tricloroetà que impedeix la fixació dels compostos hidrofòbics. De la mateixa manera que abans, la neteja del material és un pas molt important. Tot el material de vidre (vials, tubs, campanetes de Durham, etc.) s'ha de muflar durant 12 hores a 400°C per tal d'assegurar l'eliminació de qualsevol compost orgànic.

En el cas del sistema ER-RYA, s'ha d'evitar el contacte del metanol, solvent en el que es preparen totes les mostres, amb qualsevol material de plàstic degut a la facilitat de contaminació d'aquest per estrògens provinents del plàstic. En aquest treball s'ha utilitzat material de vidre en lloc de plàstic per a emmagatzemar i manipular les mostres, i campanetes de Durham de vidre per a les incubacions. El protocol proposat també inclou la utilització de plaques de microtitulació de polipropilè, un plàstic no estrogènic (NUNC™, Roskilde, Denmark (Garcia-Reyero *et al.*, 2004)).

En cada assaig es van realitzar diferents controls, analitzats seguint la mateixa metodologia que en el cas de les mostres. En concret, es van incloure:

- control negatiu: cultiu amb metanol, que és el solvent en el que es van resuspendre totes les mostres i compostos analitzats. S'ha de tenir en compte que com a màxim es pot afegir al cultiu un 10% de metanol, concentracions més elevades resulten tòxiques per a les cèl·lules de llevat.
- control positiu: cultiu amb concentració saturant de lligand. En aquest treball s'ha fet servir la progesterona (Sigma) com a lligand del PR, la β -naftoflavona (Sigma) com a lligand de l'AhR i el 17 β -estradiol (Sigma) com a lligand de l'ER.
- control d'inhibició: cultiu amb concentració saturant de lligand (la mateixa concentració que el control positiu) més la mostra a analitzar. L'objectiu d'aquest control és demostrar, en el cas de què una mostra no doni cap resposta, si l'absència de senyal és deguda a la no presència de lligand i, per tant, d'activitat en una mostra donada.

Sempre, si no s'indica el contrari, es van realitzar triplicats de tot i els bancs de dilucions de les mostres es van establir segons les necessitats de cada experiment.

En alguns casos va interessar fer les dilucions a part en vials de vidre muflats, fent servir capil·lars de vidre (Microcapillary Pipettes, Sigma).

III.4.2.1. Assaig basat en el gen reporter *gfp*

Procediment en placa

- Créixer 2 ml de cultiu (minicultiu) en YPD tota la nit a 30°C
- Inocular uns 20 µl de minicultiu en uns 20 ml de medi mínim complementat amb els aminoàcids i nucleòtids corresponents
- Incubar tota la nit a 30°C
- Ajustar el cultiu a una DO₆₀₀ de 0.5
- Traspasar 100 µl de cultiu a cada pouet d'una placa de microtitulació
- Afegir la substància a testar i fer el banc de dilucions corresponent
- Incubar 2 hores a 30°C
- Llegir en un espectrofluorímetre (Victor3 Wallac spectrofluorometer (Perkin Elmer Inc., Wellesley, MA, USA)) a una longitud d'ona d'excitació de 485 nm i d'emissió de 535 nm

Procediment en tub

- Créixer 2 ml de cultiu (minicultiu) en YPD tota la nit a 30°C
- Inocular uns 20 µl de minicultiu en uns 20 ml de medi mínim complementat amb els aminoàcids i nucleòtids corresponents
- Incubar tota la nit a 30°C
- Ajustar el cultiu a una DO₆₀₀ de 0.5
- Traspasar 2 ml de cultiu a un tub
- Afegir la substància a testar i fer el banc de dilucions corresponent
- Incubar 2 hores a 30°C
- Traspasar 100 µl de cultiu a cada pouet d'una placa de microtitulació
- Llegir en un espectrofluorímetre (Victor3 Wallac spectrofluorometer (Perkin Elmer Inc., Wellesley, MA, USA)) a una longitud d'ona d'excitació de 485 nm i d'emissió de 535 nm

III.4.2.2. Assaig basat en el gen reporter *lacZ*

III.4.2.2.1. Determinació de l'activitat constitutiva del gen reporter *lacZ*

El protocol és el mateix que el descrit en l'assaig *lacZ* colorimètric en placa (apartat III.4.2.2.2.) i fluorimètric (apartat III.4.2.2.3.) però sense afegir cap compost a

testar. S'ha de tenir en compte que en el cas de l'assaig fluorimètric, per tal d'evitar la saturació del sistema, van utilitzar-se diferents volums de cultiu: 50 µl per al plasmidi pRPG1.6 i de 10 µl per al pRPG3.10.

III.4.2.2.2. Assaig colorimètric (ONPG) basat en el gen reporter *lacZ*

Solucions

- Tampó Z
 - 60 mM Na₂HPO₄
 - 40 mM NaH₂PO₄
 - 10 mM KCl
 - 1 mM MgSO₄

Ajustar, si cal, el pH a 7.0

- Tampó Z/β-mercaptoetanol
 - 75 µl β-mercaptoetanol (Fluka)
 - 25 ml Tampó Z
- ONPG (4 mg/ml d'ONPG (o-nitrofenil-β-D-galactopiranosid, Sigma) en aigua)

Procediment en tub

- Créixer 2 ml de cultiu en YPD (minicultiu) tota la nit a 30°C
- Inocular uns 20 µl de minicultiu en uns 20 ml de medi mínim complementat amb els aminoàcids i nucleòtids corresponents
- Incubar tota la nit a 30°C
- Ajustar el cultiu a una DO₆₀₀ de 0.5-1
- Traspasar 2 ml de cultiu a un tub
- Afegir la substància a testar i fer el banc de dilucions corresponent
- Incubar tota la nit a 30°C
- Passar els 2 ml de cultiu a un tub Eppendorf
- Centrifugar 1 minut a 15000 rpm
- Descartar sobrenedant
- Afegir 250 µl d'Y-PER™ (PIERCE™, Rockford, IL, USA) per a permeabilitzar les cèl·lules

- Incubar 30 minuts a 30°C
- Afegir 750 µl de la solució tampó Z/β-mercaptoetanol
- Deixar 5 minuts a temperatura ambient
- Afegir 200 µl d'ONPG i anotar el temps que serà el temps inicial (T_i)
- Quan la solució viri a groc, afegir 500 µl de Na₂CO₃ 1M
- Anotar el temps que serà el temps final (T_f)
- Centrifugar 5 minuts a 6000 rpm
- Llegir la DO₄₂₀ del sobrenedant

Procediment en campaneta de Durham

- Créixer 2 ml de cultiu en YPD (minicultiu) tota la nit a 30°C
- Inocular uns 20 µl de minicultiu en uns 20 ml de medi mínim complementat amb els aminoàcids i nucleòtids corresponents
- Incubar tota la nit a 30°C
- Ajustar el cultiu a una DO₆₀₀ de 0.5-1
- Afegir 100 µl de cultiu a cada campaneta de Durham
- Afegir la substància a testar i fer el banc de dilucions corresponent
- Incubar tota la nit a 30°C
- Afegir 100 µl d'Y-PER™
- Incubar 30 minuts a 30°C
- Afegir 100 µl d'una solució que conté tampó Z/β-mercaptoetanol i ONPG amb una relació 1:1
- Anotar el temps que serà el temps inicial (T_i)
- Quan la solució viri a groc, afegir 100 µl de Na₂CO₃ 1M
- Anotar el temps que serà el temps final (T_f)
- Llegir la DO₄₂₀

Procediment en placa

- Créixer 2 ml de cultiu en YPD (minicultiu) tota la nit a 30°C
- Inocular uns 20 µl de minicultiu en uns 20 ml de medi mínim complementat amb els aminoàcids i nucleòtids corresponents
- Incubar tota la nit a 30°C
- Ajustar el cultiu a una DO₆₀₀ de 0.5-1
- Afegir 100 µl de cultiu a cada pouet d'una placa de microtitulació de 96 pouets. En el cas del sistema ER-RYA, les plaques han de ser de polipropilè, un plàstic no estrogènic (NUNC™, Roskilde, Denmark (Garcia-Reyero *et al.*, 2004))

- Afegir la substància a testar i fer el banc de dilucions corresponent
- Incubar tota la nit a 30°C
- Afegir 100 µl d'Y-PER™
- Incubar 30 minuts a 30°C
- Afegir 100 µl d'una solució que conté tampó Z/β-mercaptoetanol i ONPG amb una relació 1:1
- Anotar el temps que serà el temps inicial (T_i)
- Quan la solució viri a groc, afegir 100 µl de Na₂CO₃ 1M
- Anotar el temps que serà el temps final (T_f)
- Llegir la DO₄₂₀

III.4.2.2.3. Assaig fluoromètric (MUGal) basat en el gen reporter *lacZ*

Solucions

- Tampó d'assaig MUGal
 - 100 ml Tampó Z
 - 1 ml Tritó X-100 10%
 - 1 ml SDS 10%
 - 70 µl β-mercaptoetanol
 - 21 mg MUGal (4-metilumbeliferil-galactopiranòsid, Sigma)

Aliquotar i guardar embolicat amb paper d'alumini a -20°C

- Tampó Z
 - 60 mM Na₂HPO₄
 - 40 mM NaH₂PO₄
 - 10 mM KCl
 - 1 mM MgSO₄

Ajustar, si cal, el pH a 7.0

Procediment

- Créixer 2 ml de cultiu en YPD (minicultiu) tota la nit a 30°C
- Inocular uns 20 µl de minicultiu en uns 20 ml de medi mínim complementat amb els aminoàcids i nucleòtids corresponents
- Incubar tota la nit a 30°C

- Ajustar el cultiu a una DO_{600} entre 0.1-0.2 (les cèl·lules han d'estar en creixement exponencial)
- Traspasar 50 μ l de cultiu a cada pouet d'una placa de microtitulació de 96 pouets. En el cas del sistema ER-RYA les plaques han de ser de polipropilè, un plàstic no estrogènic (NUNC™, Roskilde, Denmark (Garcia-Reyero *et al.*, 2004))
- Afegir la substància a testar i fer el banc de dilucions corresponent
- Incubar 4 hores (en el cas dels sistemes PR-RYA, AhR-RYA i YCM-RYA) o 6 hores (sistema ER-RYA) a 30°C
- Afegir 50 μ l d'Y-PER™
- Incubar 30 minuts a 30°C
- Afegir 50 μ l de tampó d'assaig MUGal a cada pouet
- Centrifugar un minut a 1000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5810)
- Llegir en un espectrofluorímetre (Victor3 Wallac spectrofluorometer (Perkin Elmer Inc., Wellesley, MA, USA)) a una longitud d'ona d'excitació de 355 nm i d'emissió de 460 nm

III.4.2.3. Assaig basat en el gen reporter *gus* (MUG)

Solucions

- GEB (tampó d'extracció del *gus*, *Gus Extraction Buffer*)
 - 50 mM $NaPO_4$ (a pH 7.0)
 - 10 mM β -mercaptoetanol
 - 10 mM Na_2EDTA (a pH 8.0)
- Tampó d'assaig MUG
 - 100 mg MUG (4-metilumbeliferil β -D-glucurònid, Sigma)
 - 100 ml GEB

Aliquotar i guardar embolicat amb paper d'alumini a -20°C

Procediment

- Créixer 2 ml de cultiu en YPD (minicultiu) tota la nit a 30°C
- Inocular uns 20 μ l de minicultiu en uns 20 ml de medi mínim complementat amb els aminoàcids i nucleòtids corresponents
- Incubar tota la nit a 30°C

- Ajustar el cultiu a una DO_{600} entre 0.1-0.2 (les cèl·lules han d'estar en creixement exponencial)
- Traspasar el volum de cultiu que interressi (normalment 50 μ l) a cada pouet d'una placa de microtitulació de 96 pouets (es recomana 50 μ l per pRPG-GUS1.6 i 10 μ l per pRPG-GUS3.10 per tal d'evitar la saturació del sistema)
- Afegir 50 μ l d'Y-PER™
- Incubar 30 minuts a 30°C
- Afegir 50 μ l de tampó d'assaig MUG a cada pouet
- Centrifugar un minut a 1000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5810)
- Llegir en un espectrofluorímetre (Victor3 Wallac spectrofluorometer (Perkin Elmer Inc., Wellesley, MA, USA)) a una longitud d'ona d'excitació de 355 nm i d'emissió de 460 nm

III.4.2.4. Assaig per a discernir entre els efectes tòxics i els efectes inhibitoris (Soca GAL1-GUS)

Procediment

- Inocular una colònia de la soca GAL1-GUS d'una placa d'YPR més nourseotricina en 2 ml d'YPR (minicultiu)
- Incubar tota la nit a 30°C
- Inocular 50 μ l de minicultiu en 10-20 ml d'YPR
- Incubar tota la nit a 30°C
- Ajustar el cultiu amb YPR a una DO_{600} entre 0.1-0.2
- Separar una part de cultiu que es farà servir de control negatiu (sense galactosa)
- Afegir un 2% de galactosa a la resta de cultiu i fer un banc de dilucions amb el compost en una placa de microtitulació de 96 pouets, tot deixant un pouet sense compost com a segon control negatiu. Deixar 50 μ l de volum final a cada pouet
- Incubar 2 hores a 30°C
- Afegir 50 μ l d'Y-PER™
- Incubar 30 minuts a 30°C
- Afegir 50 μ l de tampó d'assaig MUG a cada pouet
- Centrifugar un minut a 1000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5810)
- Llegir en un espectrofluorímetre (Victor3 Wallac spectrofluorometer (Perkin Elmer Inc., Wellesley, MA, USA)) a una longitud d'ona d'excitació de 355 nm i d'emissió de 460 nm

III.5. MÈTODE DE CÀLCUL

Aquests sistemes es basen en el seguiment de les taxes de transcripció de gens reporter, l'expressió dels quals depèn de la unió del receptor al seu lligand natural o xenobiòtic. En el cas de l'assaig colorimètric del sistema basat en el gen reporter *lacZ*, l'activitat β -galactosidasa va ser calculada en unitats de Miller a partir de la següent fórmula (Fórmula III.1):

$$\text{Unitats de Miller} = \frac{1000 \times DO_{420}}{DO_{600} \times V \times (T_f - T_i)}$$

Fórmula III.1: Fórmula que permet calcular les unitats de Miller. En aquesta fórmula "V", "DO₄₂₀" i "DO₆₀₀" representen el volum i la densitat òptica del cultiu a 420 i 600nm, respectivament.

Per altra banda, en el cas de l'assaig fluorimètric, va ser calculada per mètodes de regressió lineal estàndard a partir de les corbes dosi-resposta com l'increment de les unitats arbitràries de fluorescència en el temps. En aquest cas, per a conèixer la quantitat d'expressió del gen reporter s'afegeix a les cèl·lules substrat en excés i es mesura l'aparició de fluorescència en funció del temps a diferents concentracions de lligand en un espectrofluorímetre. L'espectrofluorímetre llegeix la placa 20 vegades de manera que de cada pouet es tenen 20 lectures de fluorescència amb el temps corresponent (Figura III.12).

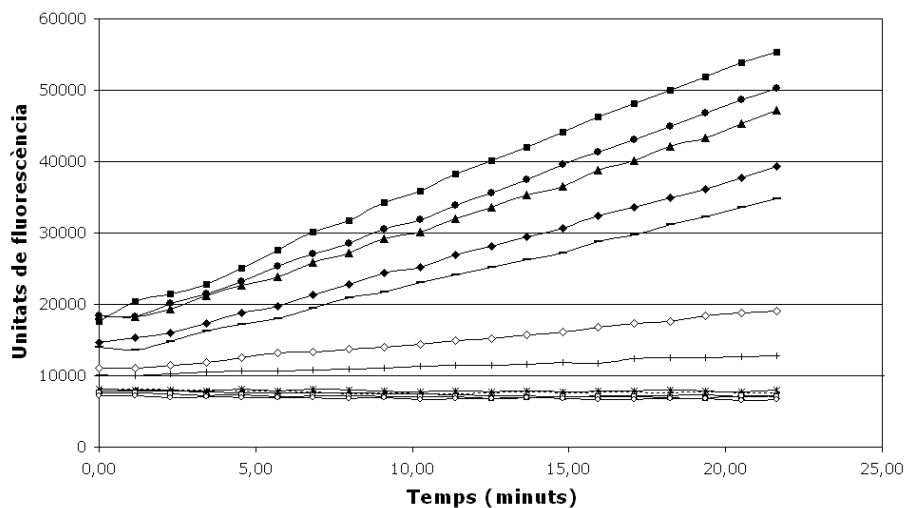


Figura III.12. Increment lineal de la fluorescència (en unitats de fluorescència) respecte el temps (en minuts) per a diferents concentracions de lligand.

A concentracions saturants de substrat l'aparició del producte fluorescent segueix una correlació lineal amb el temps amb un pendent equivalent als valors d'activitat β -galactosidasa (o β -glucuronidasa) en unitats de fluorescència per minut. El càlcul

dels pendents de les línies de la Figura III.12 es fa per mètodes de regressió lineal estàndard en unitats de fluorescència per minut (U.F./minut). A partir dels resultats obtinguts es pot traçar una corba dosi-resposta que relaciona la concentració de lligand amb l'activitat β -galactosidasa (o β -glucuronidasa) (Figura III.13).

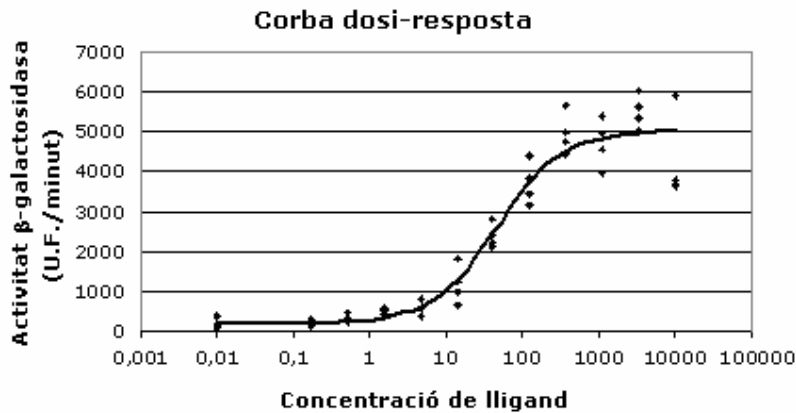
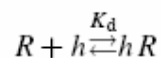


Figura III.13. Corba dosi-resposta del lligand. En aquest gràfic l'eix de les Y representa l'activitat β -galactosidasa en unitats de fluorescència per minut (U.F./minut).

Tots els càlculs estadístics es van fer amb l'SPSS v.13.0.1 package (SPSS Inc., Chicago, Ill.). Els valors de les EC_{50} , valor que representa la concentració de compost testat que correspon a la meitat de l'activitat màxima, van ser calculats a partir de l'ajust de les dades a una versió no cooperativa de l'equació de Hill utilitzant l'SPSS (Noguerol *et al.*, 2006a).

III.5.1. Model matemàtic

El model més simple per a descriure corbes dosi-resposta assumeix un equilibri entre les molècules d'hormona lliure i d'hormona unida a receptor presents en la solució



a on "R" representa la concentració de molècules de receptor lliure sense hormona, "h" la concentració de molècules d'hormona, "hR" la concentració de molècules d'hormona unides a receptor i "Kd" és la constant de dissociació. Aquest model assumeix que una única molècula de l'agonista s'unirà a una única molècula de receptor, la qual cosa ha estat demostrada per nombroses dades físiques i cristal·logràfiques (Green and Chambon, 1991; Nagy and Schwabe, 2004). Si s'assumeix que la concentració d'hormona és molt més gran que la concentració de receptor, la fracció de receptor unit a l'hormona " Φ_r " es pot descriure per l'equació de Hill

$$\Phi_R = \frac{[hR]}{R_t} = \frac{1}{1 + (K_d/[h])} \quad \text{Equació (1)}$$

a on "Rt" és la concentració total de receptor (unit i lliure) (Giraldo *et al.*, 2002). L'equació de Hill només descriu l'equilibri per a la interacció receptor-hormona. Freqüentment s'assumeix que aquest és el pas limitant en la sèrie d'esdeveniments que van des de la presència d'una concentració donada d'hormona fins a l'efecte fisiològic final, en aquest cas, l'expressió del gen reporter. No obstant això, hi ha moltes evidències en els sistemes complexos que indiquen una altra modulació de la resposta hormonal deguda als passos subseqüents de la dimerització del complex receptor-hormona, de la unió al DNA i de l'activació de la transcripció. Els mètodes matemàtics corresponents estan molt menys desenvolupats però, en la majoria dels casos, introdueixen un coeficient de cooperativitat, "p". En aquest treball (Noguerol *et al.*, 2006a), s'han provat dues d'aquestes aproximacions: una versió cooperativa de l'equació de Hill

$$\Phi_R = \frac{1}{1 + \left(\frac{K_d}{[h]}\right)^p} \quad \text{Equació (2)}$$

la qual assumeix que és necessària més d'una única molècula d'hormona per a produir una configuració activa del receptor, per exemple, considerant el receptor "actiu" una molècula dimèrica amb dos llocs d'unió per a l'hormona; i l'anomenada equació de Hill modificada

$$\Phi_R = \frac{1}{\left(1 + \frac{K_d}{[h]}\right)^p} \quad \text{Equació (3)}$$

Això ha estat demostrat empíricament per a descriure la relació entre la interacció receptor-ligand i la resposta fisiològica en sistemes complexos (Giraldo *et al.*, 2002).

III.5.2. Anàlisi de les dades

Les equacions (1), (2) i (3) poden ser reformulades per a expressar la variació de la resposta fisiològica a una concentració donada de lligand obtenint-se les equacions (1'), (2') i (3'):

$$U_L = \frac{A}{1 + \frac{K}{[L]}} + B \quad \text{Equació (1')}$$

$$U_L = \frac{A}{1 + \left(\frac{K}{[L]}\right)^p} + B \quad \text{Equació (2')}$$

$$U_L = \frac{A}{\left(1 + \frac{K}{[L]}\right)^p} + B \quad \text{Equació (3')}$$

a on "U_L" representa la magnitud de la resposta fisiològica (en aquest cas, l'activitat del gen reporter), "B" és el nivell basal (sense lligand), "A" representa l'increment de la resposta des del nivell basal fins a la concentració saturant de lligand, "p" és el factor de cooperativitat, i "K" és la K_d aparent. En l'equació (1') "K" és equivalent a l'EC₅₀. Tots aquests paràmetres van ser calculats a partir de les dades de les corbes dosi-resposta per mètodes de regressió no lineal. L'anàlisi de les dades, l'estadística i l'ajust lineal i no lineal a les equacions va fer-se amb l'SPSS v.13.0.1 package (SPSS Inc., Chicago, Ill.).

Per a calcular l'activitat anti-ligand es poden reformular les equacions (1') i (2'):

$$U_L = B - \frac{A}{1 + \frac{K}{[L]}} \quad \text{Equació (1'')}$$

$$U_L = B - \frac{A}{1 + \left(\frac{K}{[L]}\right)^p} \quad \text{Equació (2'')}$$

a on "B" és l'activitat β-galactosidasa obtinguda només amb l'efector positiu (progesterona, β-naftoflavona o 17β-estradiol, segons el sistema RYA), i "B-A" equival a l'activitat residual amb una concentració infinita de l'inhibidor. En l'equació (1''), "K" és equivalent a la IC₅₀, concentració d'inhibidor que redueix la resposta de l'efector fins el 50%.

III.5.3. Càlcul dels equivalents de 17β-estradiol

Per a poder comparar les diferents mostres analitzades els resultats s'han expressat en equivalents de 17β-estradiol (EEQ). Els equivalents representen la concentració de lligand de referència, 17β-estradiol en aquest cas, amb la que s'obtingria la mateixa resposta que la que presenta la mostra problema analitzada.

Aquests equivalents es calculen tenint en compte l'EC₅₀ del 17β-estradiol (EC₅₀ Estradiol) i la dilució en la que s'obté l'EC₅₀ de la mostra (f_{dil}) (Fórmula III.2).

$$EEQ = EC_{50 \text{ Estradiol}} \times f_{dil}$$

Fórmula III.2: Fórmula que permet calcular els EEQ.

IV. RESULTATS I DISCUSSIÓ

IV.1. DESENVOLUPAMENT I ANÀLISI FUNCIONAL DE DIFERENTS SISTEMES DE BIOASSAIG PER A LA DETECCIÓ DE XENOBIÒTICS EN *Saccharomyces cerevisiae*

Els bioassaigs basats en la utilització de llevats, també coneguts com a RYA, han demostrat ser una eina excel·lent per a avaluar el potencial de disrupció endocrina causat pels contaminants químics presents en diverses mostres estudiades (Garcia-Reyero *et al.*, 2001). No obstant això, la detecció de xenobiòtics mitjançant RYA es troba amb diferents problemes quan s'analitzen mostres no convencionals. Primer, moltes mostres només es poden obtenir en quantitats reduïdes la qual cosa limita les màximes concentracions d'assaig i els volums de cultiu. Segon, sovint la toxicitat i l'activitat dels lligands tenen lloc a concentracions molt similars. I tercer, i més important, els protocols basats en llevats han de ser adaptats a mitjana o gran escala per a cobrir el màxim nombre de mostres i compostos amb el mínim cost possible en quant a temps i diners.

En aquest treball, s'ha tractat de solucionar aquests problemes analitzant i comparant tres sistemes basats en diferents gens reporter per tal de determinar quin és el més sensible i així dissenyar un protocol basat en la utilització de llevats que sigui senzill, ràpid, reproduïble i altament sensible per a la detecció de diferents xenobiòtics. Els tres sistemes analitzats són: el sistema basat en el gen reporter *gfp*, el sistema basat en el gen reporter *lacZ* i el sistema basat en el gen reporter *gus*.

IV.1.1. Sistema basat en el gen reporter *gfp*

El primer sistema analitzat va ser el basat en el gen reporter *gfp*. En aquest cas, van fer-se una sèrie d'assaigs basats en el PR, sistema PR-*gfp*, i en l'AhR, sistema AhR-*gfp*. L'ER va ser descartat degut al tipus de construcció d'aquest sistema, no basada en el reporter *lexA*, com és el cas dels dos receptors anteriors.

Van dur-se a terme dos tipus d'assaigs, en tub i en placa, per tal de determinar si aquest factor afectava a l'hora de donar una major o menor resposta. Teòricament s'esperava una major resposta en tub ja que les condicions de creixement són menys restrictives. Per contra, l'assaig en placa ofereix una sèrie d'avantatges pràctics ja que es disminueixen considerablement els volums de cultiu i de mostra necessaris i s'augmenta la processivitat del sistema fent possible l'anàlisi de més mostres a la vegada.

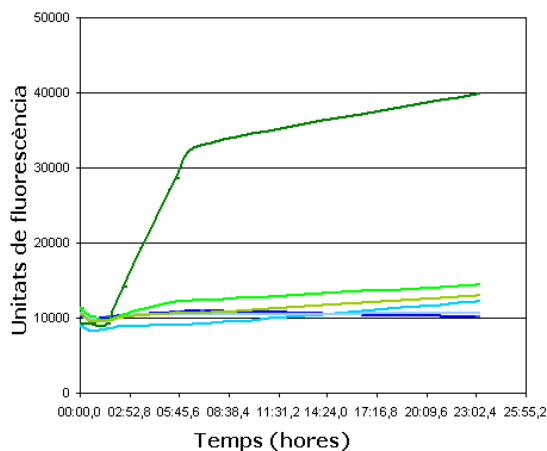
Van analitzar-se tres condicions d'assaig diferents pel que es referia a la concentració de lligand amb la que es va incubar el sistema: alta concentració de lligand, concentració intermèdia de lligand i absència de lligand. En la Taula IV.1 estan indicades les concentracions de lligand amb les que van incubar-se els sistemes: progesterona, en el cas del sistema PR-*gfp*, i β -naftoflavona, en el cas del sistema AhR-*gfp*.

Taula IV.1. Concentracions de lligand, progesterona i β -naftoflavona, utilitzades en els sistemes basats en el gen reporter *gfp* i els receptors de progesterona (PR-*gfp*) i d'hidrocarburs d'aril (AhR-*gfp*), respectivament.

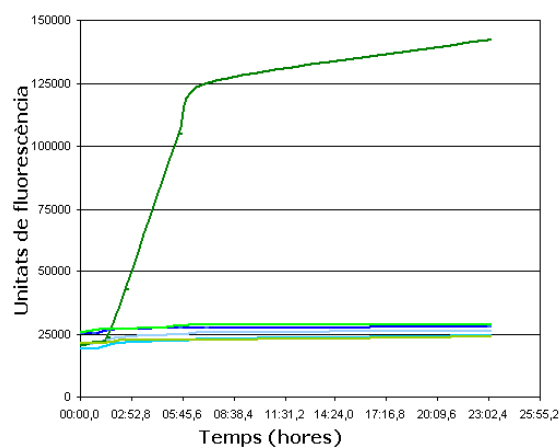
	Alta concentració de lligand	Concentració intermèdia de lligand	Absència de lligand
PR-<i>gfp</i> (progesterona)	2.5 μ M	25 nM	sense lligand
AhR-<i>gfp</i> (β-naftoflavona)	500 nM	100 nM	sense lligand

L'assaig va fer-se en forma de cinètica ja que el que interessava veure era l'aparició de fluorescència, és a dir, de proteïna GFP en funció del temps. La cinètica va seguir-se durant 23 hores en les que van fer-se set lectures puntuals que es corresponien als 30 minuts, 1, 2, 5, 7 i 23 hores. El temps 0 es va establir just després de dues hores d'incubació amb el lligand. En la Figura IV.1 es troba representada la cinètica d'aparició de fluorescència en funció del temps.

A) Assaig en placa



B) Assaig en tub



— PR-*gfp* a 2.5 μ M — PR-*gfp* a 25 nM — PR-*gfp* sense lligand
 — AhR-*gfp* a 500 nM — AhR-*gfp* a 100 nM — AhR-*gfp* sense lligand

Figura IV.1. Cinètica d'aparició de fluorescència en el sistema basat en el gen reporter *gfp* a mesura que passa el temps. A) Gràfic que representa els resultats obtinguts en l'assaig en placa. B) Gràfic que representa els resultats obtinguts en l'assaig en tub. Els valors representats són els valors mitjans de totes les determinacions.

Tot i que només es va poder apreciar un increment de la fluorescència en el sistema AhR-*gfp* a alta concentració de lligand, sí que van trobar-se diferències entre l'assaig fet en placa (Figura IV.1 A) i l'assaig dut a terme en tub (Figura IV.1 B). En el primer cas, va obtenir-se una expressió de l'ordre de 40000 unitats de fluorescència després de les 23 hores; mentre que en el segon, va ser de 140000, unes 3-4 vegades més tal i com s'esperava degut a les condicions menys restrictives de creixement en tub. Pel que fa a la resta de clons, no va detectar-se cap increment significatiu. Aquesta manca d'activitat va ser deguda a la baixa sensibilitat del gen reporter *gfp* ja que necessita nivells d'expressió elevats per a poder ser detectat per l'espectrofluorímetre. A més, va observar-se que era necessari un temps d'incubació també elevat per tal de detectar la seva expressió. Van fer-se nombrosos assaigs basats en aquest sistema però el resultat no va ser el desitjat.

S'ha de tenir en compte que el sistema dissenyat presenta un promotor induïble per lligand, és a dir, només donarà expressió en presència d'aquest. Els compostos que interessa detectar es caracteritzen per trobar-se a baixes concentracions i, per tant, es necessita un sistema amb gran sensibilitat per a poder observar els seus efectes. Tot això fa que *gfp* no sigui un bon gen reporter per a dur a terme assaigs hormonals. Altres grups de treball (Cahill *et al.*, 2004) sí que han aconseguit dissenyar aquest mateix sistema amb èxit. No obstant això, es tracta d'un procediment a on es donen llargs períodes d'incubació, fins a 24 hores, i sota l'expressió de gens estructurals i, per tant, d'elevada expressió. Així doncs, es pot concloure que el sistema dissenyat no és adequat per a la detecció de compostos que es troben a baixes concentracions, sota promotors que activen l'expressió per inducció i en els que interessa que el temps d'incubació sigui el més curt possible.

IV.1.2. Sistema basat en el gen reporter *lacZ*

Es va comparar l'activitat constitutiva d'aquest gen reporter sota el control d'un promotor amb diferent nivell d'expressió. Per a determinar això es va introduir el plasmidi que contenia el gen *lacZ* dins la soca W303D. Aquest plasmidi presenta un promotor constitutiu que fa que el gen s'expressi sense necessitar la presència de cap compost extern a la cèl·lula de llevat. Per a fer aquest assaig es va contar amb dues versions de plasmidis, pRPG1.6 i pRPG3.10, que es diferencien en el nivell d'expressió del promotor. En el cas del plasmidi pRPG1.6, *lacZ* està precedit per un promotor dèbil; mentre que en el cas del plasmidi pRPG3.10, es troba sota el control d'un promotor fort. En l'assaig fluorimètric, van utilitzar-se diferents volums

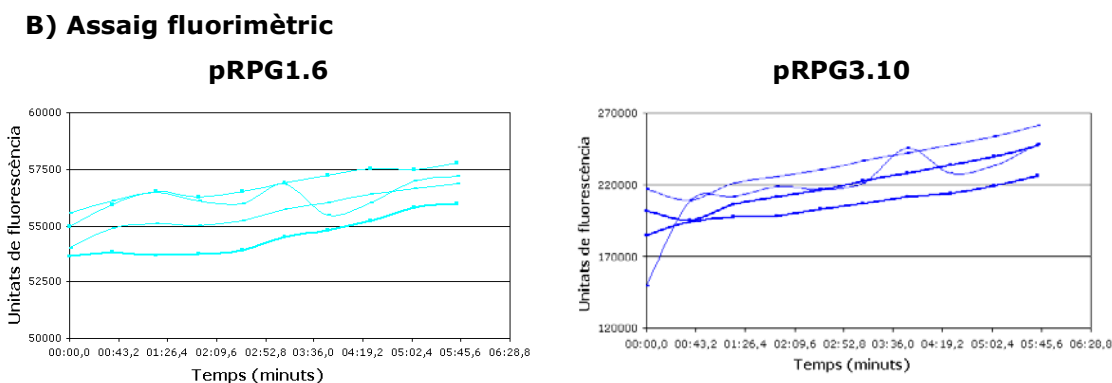
de cultiu (50 µl per al plasmidi pRPG1.6 i de 10 µl per al pRPG3.10) per tal d'evitar la saturació del sistema en aquest últim cas.

En el cas de l'assaig colorimètric basat en ONPG, va determinar-se l'activitat β-galactosidasa en unitats de Miller; mentre que en el cas de l'assaig fluorimètric, va mesurar-se la cinètica d'aparició de fluorescència al llarg del temps en 10 lectures puntuals (Figura IV.2).

A) Assaig colorimètric

	Unitats de Miller
pRPG1.6	6.57±0.95
pRPG3.10	88.71±13.06

Figura IV.2. A) Resultats de l'activitat β-galactosidasa calculada com a unitats de Miller en l'assaig colorimètric amb el sistema basat en el gen reporter *lacZ* amb dos promotors constitutius amb diferent nivell d'expressió. B) Comparació de la cinètica d'aparició de fluorescència del sistema basat en el gen reporter *lacZ* amb dos promotors constitutius amb diferent nivell d'expressió. Nota: tenir en compte el canvi d'escala.



Tal i com s'esperava, en ambdós casos van trobar-se diferències significatives en els nivells d'expressió.

IV.1.3. Sistema basat en el gen reporter *gus*

Es va dissenyar un nou sistema per a detectar xenobiòtics utilitzant una soca de llevat com a biosensor amb el gen *gus* com a gen reporter. De la mateixa manera que abans, es va dur a terme una comparació de l'activitat constitutiva d'aquest gen reporter sota el control d'un promotor amb diferent nivell d'expressió. Per a determinar això, es va transformar la soca W303D amb els plasmidis pRPG-GUS1.6, a on el gen *gus* es troba precedit per un promotor dèbil, i pRPG-GUS3.10, a on *gus* es troba sota el control d'un promotor fort.

En la Figura IV.3 es pot observar la cinètica que es va fer enregistrant la fluorescència durant 20 lectures ininterrompudes amb les mateixes condicions per a tots els clons. En aquest cas, també van fer-se quatre rèpliques per plasmidi i van utilitzar-se diferents volums de cultiu (50 µl per al plasmidi pRPG-GUS1.6 i de 10 µl

per al pRPG-GUS3.10) per tal d'evitar la saturació del sistema. Efectivament, aquí també es van trobar, tal i com s'esperava, diferències significatives en els nivells d'expressió.

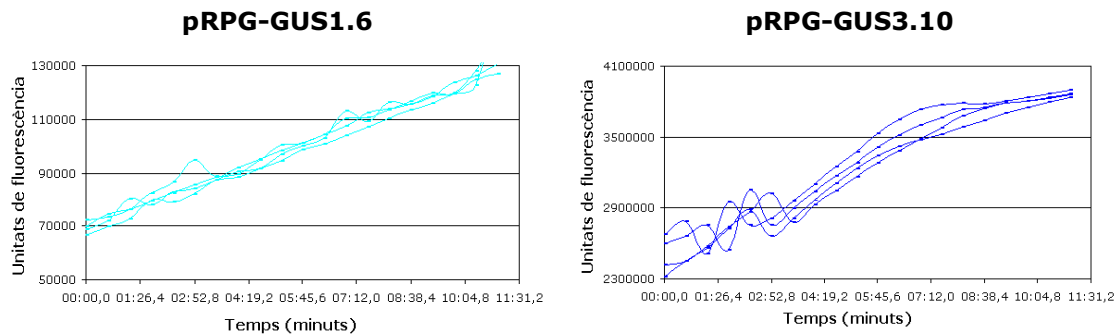


Figura IV.3. Comparació de la cinètica d'aparició de fluorescència del sistema basat en el gen reporter *gus* amb dos promotors constitutius amb diferent nivell d'expressió.

Nota: tenir en compte el canvi d'escala.

El gen reporter *gus* està poc caracteritzat, així que es va decidir optimitzar la reacció estudiant la cinètica del gen reporter *gus* a diferents pHs i explorant la necessitat de la presència d'un permeabilitzador.

IV.1.3.1. Cinètica del gen reporter *gus* a diferents pHs

El tampó d'assaig GEB presenta un pH neutre però se sap que la sensibilitat del sistema augmenta a l'augmentar el pH de la reacció. El pH és un paràmetre important en aquests tipus d'assaigs ja que un pH bàsic atura la reacció. Interessa saber, doncs, si la variació d'aquest en una unitat és suficient com per a aturar el sistema o si, al contrari, és suficient per a fer augmentar la sensibilitat en la detecció d'activitat.

Es va mesurar l'aparició de fluorescència en el temps amb diferents condicions d'assaig pel que fa al pH i al volum de cultiu. En concret, van analitzar-se dos pHs diferents (pH 7.0 com a pH neutre i pH 8.0 com a pH bàsic) i 5, 10, 20 i 50 µl de cultiu. La cinètica d'aparició de fluorescència en el temps es pot veure en la Figura IV.4.

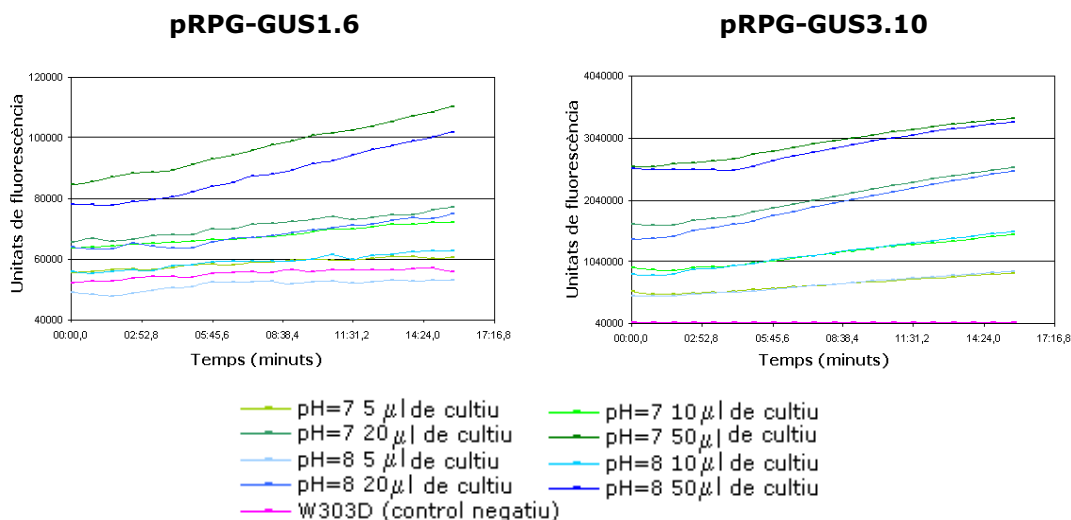


Figura IV.4. Cinètica d'aparició de fluorescència en el temps a diferents pHs d'assaig amb el sistema basat en el gen reporter *gus* amb els plasmidis pRPG-GUS1.6 i pRPG-GUS3.10. Les línies representen el valor mitjà de totes les determinacions.

En aquest cas, no van observar-se diferències entre ambdós pHs. El rang de pHs amb el que es va treballar va ser un rang estret ja que en un medi molt bàsic la reacció s'atura. És per això que només es va modificar un grau el pH i es va pujar fins a pH 8.0. En aquest pH, però, no es va apreciar cap augment significatiu de la sensibilitat del sistema, essent aquesta la mateixa que en un assaig a pH neutre. Queda clar, doncs, que tot i que el pH del tampó d'assaig és important per a què la reacció es pugui donar, poden introduir-se petites variacions sense que això afecti la sensibilitat del sistema.

IV.1.3.2. Estudi de la presència d'un permeabilitzador

Per a poder observar l'activitat del gen reporter *gus*, de la mateixa manera que en el cas del sistema basat en el gen reporter *lacZ*, és essencial que el substrat pugui travessar la paret cel·lular del llevat i així ser metabolitzat per la β -glucuronidasa, enzim que s'obté a partir de la transcripció del *gus*. El següent experiment va permetre determinar si el substrat MUG és soluble per ell mateix i, per tant, és capaç de travessar la paret sense ajuda de cap altre agent o si, al contrari, és necessària la presència d'un permeabilitzador com és el cas de l'Y-PER (Y-PER®, *Yeast Protein Extraction Reagent*). L'Y-PER és un detergent que s'utilitza per a extreure proteïnes solubles de *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Bacillus subtilis* i *Escherichia coli*, a part d'una gran varietat de bacteris gram positiu.

Es va seguir el protocol tal i com està descrit en l'apartat Materials i Mètodes, partint de 50 μ l de volum inicial de cultiu, fins el punt en què s'ha d'afegir el permeabilitzador. Aleshores, van fer-se tres condicions experimentals per a cadascun dels dos plasmidis: 50 μ l d'Y-PER, 25 μ l d'Y-PER + 25 μ l de GEB (només contenia la meitat de permeabilitzador) i 50 μ l de GEB (sense permeabilitzador).

En la Figura IV.5 es mostren els resultats obtinguts. Es pot veure que no van apreciar-se diferències significatives entre les dues primeres condicions d'assaig. En ambdós casos, va aconseguir-se una expressió al voltant de 150000 unitats de fluorescència per a pRPG-GUS1.6 i 4000000 per a pRPG-GUS3.10. Sí es veu, en canvi, una clara disminució pel que fa a les cèl·lules que no van ser tractades prèviament amb el permeabilitzador Y-PER. En el cas de pRPG-GUS1.6, l'expressió es troba al voltant de les 60000 unitats de fluorescència (menys de la meitat que en el cas de les cèl·lules que sí que havien estat tractades amb permeabilitzador); mentre que el valor per a pRPG-GUS3.10 és d'unes 2200000 unitats (la meitat del valor de referència).

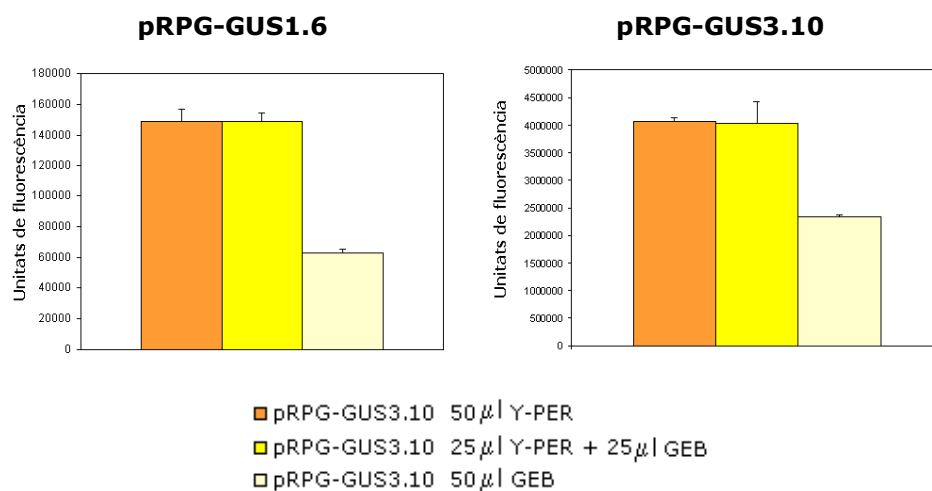


Figura IV.5. Comparació de les unitats de fluorescència obtingudes en incubar amb diferents concentracions de permeabilitzador el sistema basat en el gen reporter *gus* amb els plasmidis pRPG-GUS1.6 i pRPG-GUS3.10. Els valors representats corresponen al valor mitjà de totes les determinacions i les barres d'error representen la seva desviació estàndard.

L'Y-PER és un detergent que permeabilitza la paret cel·lular la qual cosa facilita que l'enzim entri en contacte amb el substrat que ha de metabolitzar i, d'aquesta manera, es disminueix el temps d'assaig. En el procediment descrit en l'apartat Materials i Mètodes s'indica un volum de 50 μ l d'Y-PER. Sembla que la meitat de volum ja seria suficient per a permeabilitzar 50 μ l de cultiu, encara que es recomana afegir el volum descrit en el protocol per tal d'assegurar una disgregació cel·lular total. En absència d'Y-PER l'eficiència de l'assaig disminueix notablement,

essent aquesta gairebé la meitat que en el cas d'un cultiu tractat amb el permeabilitzador. En resum, el permeabilitzador Y-PER, a diferència dels assaigs colorimètrics amb ONPG a on es presenta com un element imprescindible, no és essencial en els assaigs fluorimètrics permetent la seva realització immediata, amb la que es disminueix l'activitat però no s'anul·la.

IV.1.4. Comparació dels gens reporter *lacZ* i *gus*

Es va realitzar una cinètica de substrats creuats amb els sistemes basats en els gens reporter *lacZ* i *gus* i una comparació de la sensibilitat d'ambdós sistemes.

IV.1.4.1. Cinètica de substrats creuats (MUG i MUGal)

Com s'ha indicat abans, el MUG és el substrat de la β -glucuronidasa, enzim que s'obté a partir de la transcripció del gen reporter *gus*; mentre que el MUGal n'és el de la β -galactosidasa, enzim que s'obté a partir de la transcripció del gen reporter *lacZ*. En aquest assaig es va voler veure si aquests substrats es podien creuar entre ells, essent MUG metabolitzat per la β -galactosidasa i MUGal per la β -glucuronidasa.

Es va partir de la soca W303D transformada amb els plasmidis pRPG-GUS1.6 i pRPG-GUS3.10. Per al pRPG-GUS1.6 van utilitzar-se 50 μ l de cultiu en cadascun dels assaigs mentre que per al pRPG-GUS3.10 van utilitzar-se'n 10 μ l per tal d'evitar la saturació del sistema. Per una altra banda, es va utilitzar el sistema ER-RYA a concentració saturant de 17β -estradiol (30 nM) incubat amb el substrat MUG. En la Figura IV.6 es representen les cinètiques obtingudes.

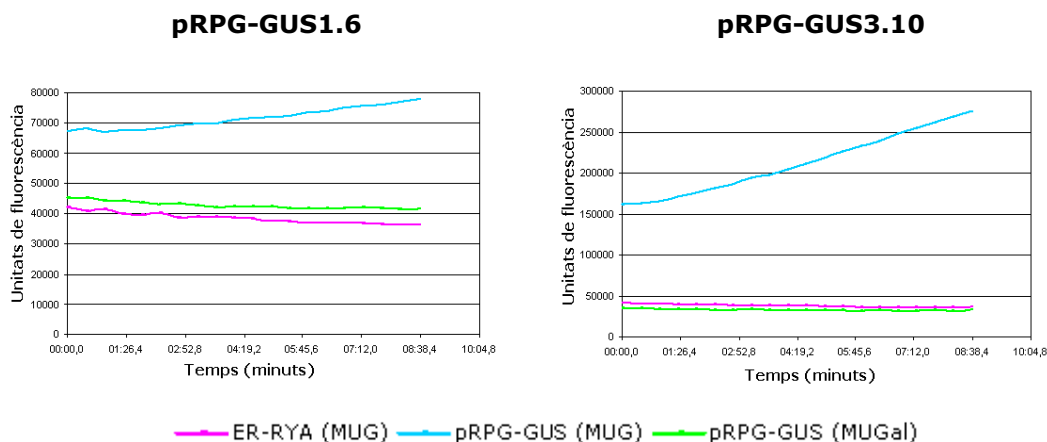


Figura IV.6. Cinètica d'aparició de fluorescència en el temps del sistema ER-RYA incubat amb el substrat MUG i del sistema basat en el gen reporter *gus* amb els plasmidis pRPG-GUS1.6 i pRPG-GUS3.10 incubat amb els substrats MUG i MUGal. Les línies representen el valor mitjà de totes les determinacions.

En la Figura IV.6 només es va apreciar activitat en aquells clons que van ser incubats amb el seu substrat teòric. Aquest experiment és de gran importància ja que podria permetre establir la possibilitat d'intercanviar substrats entre el sistema basat en el gen reporter *gus* i el sistema basat en *lacZ*, mantenint la funcionalitat d'ambdós sistemes. Els resultats, però, indiquen que els sistemes només funcionen amb els seu substrat propi, és a dir, MUGal com a substrat de la β -galactosidasa i MUG com a substrat de la β -glucuronidasa. Això, per altra banda, representa un gran avantatge per a futures innovacions a l'hora de fer soques que puguin contenir els dos gens reporter gràcies a una doble transformació amb els dos plasmidis. En la Figura IV.6 es va veure que cap dels dos substrats interfereix en l'altre sistema de manera que es podria mesurar a la vegada i en una mateixa soca de llevat l'expressió dels dos gens reporter en assaigs paral·lels i així detectar dos compostos diferents ja que en tot moment es podria diferenciar entre l'activitat d'un sistema i l'activitat de l'altre.

IV.1.4.2. Comparació de la sensibilitat dels sistemes basats en els gens reporter *lacZ* i *gus*

Aquests dos sistemes presenten certa homologia ja que els plasmidis tenen estructures molt similars i es basen en la metabolització d'un substrat i la posterior detecció del seu producte. Així doncs, resulta rellevant saber quin dels dos sistemes presenta una major sensibilitat ja que pot determinar la seva elecció en un determinat assaig. Per a fer aquesta comparació, es va mesurar l'activitat constitutiva dels dos gens reporter.

Es va partir de la soca diploide W303D transformada amb pRPG-GUS1.6 i pRPG-GUS3.10 i de la mateixa soca transformada amb pRPG1.6 i pRPG3.10. Van seguir-se els procediments tal i com estan descrits en l'apartat Materials i Mètodes utilitzant-se 10 μ l de volum de cultiu per pRPG-GUS3.10 i per pRPG3.10. D'aquesta manera, es va poder obtenir suficient activitat per a poder diferenciar els dos assaigs i es va evitar la saturació del sistema. A partir de les cinètiques d'aparició de fluorescència en el temps de les Figures IV.2 i IV.3 van calcular-se els pendents de les línies que s'han expressat en la Taula IV.2 en unitats de fluorescència per minut i per densitat òptica (U.F./minut/DO).

Taula IV.2. Comparació dels valors dels pendents amb les seves desviacions estàndards calculats a partir de les cinètiques d'aparició de fluorescència en el temps dels sistemes basats en els gens reporter *gus* i *lacZ* amb els plasmidis pRPG1.6 i pRPG-GUS1.6 i pRPG3.10 i pRPG-GUS3.10. També es mostra la seva relació.

	Unitats	1.6	3.10	3.10/1.6
<i>lacZ</i> (MUGal)	U.F./minut/DO	0.51±0.11	74.91±18.76	146.88
<i>gus</i> (MUG)	U.F./minut/DO	8.54±0.65	1054.97±32.93	123.53

A la vista dels resultats obtinguts es pot concloure que els dos sistemes són equivalents. La diferència més gran entre els dos sistemes és que el sistema basat en el gen reporter *gus* va donar més unitats de fluorescència absolutes. Això podria representar una major sensibilitat per constructes que donin baixa activitat com, per exemple, els constructes integrats. En aquest cas, interessa un sistema sensible ja que es treballa amb construccions a on els gens reporter es troben sota promotors induïbles per lligand i, per tant, nivells baixos d'expressió. És per això que el sistema basat en el gen reporter *gfp* va ser descartat. No obstant això, en el cas dels sistemes basats en els gens reporter *gus* i *lacZ* s'ha de tenir en compte que l'activitat constitutiva dels sistemes analitzats és alta de manera que la sensibilitat, entenent-se com la resposta a una activitat enzimàtica baixa, no és un factor decisiu ja que tots dos sistemes són prou sensibles. Així doncs, cap dels dos sistemes és exclouent de l'altre sinó que s'haurà d'aplicar un, un altre o ambdós a la vegada segons interressi en cada cas. No s'ha d'oblidar, però, que el sistema *lacZ* pot ser utilitzat amb dos tipus de substrats, colorimètrics i fluorimètrics, característica que pot fer que en determinats casos pugui interessar més la seva utilització. En aquest treball, es va optar pel sistema basat en el gen reporter *lacZ* ja que és més conegut, el seu substrat (MUGal) és més barat i, en aquest cas, ja es disposava dels constructes necessaris per a treballar amb ell.

IV.1.5. Sistemes RYA

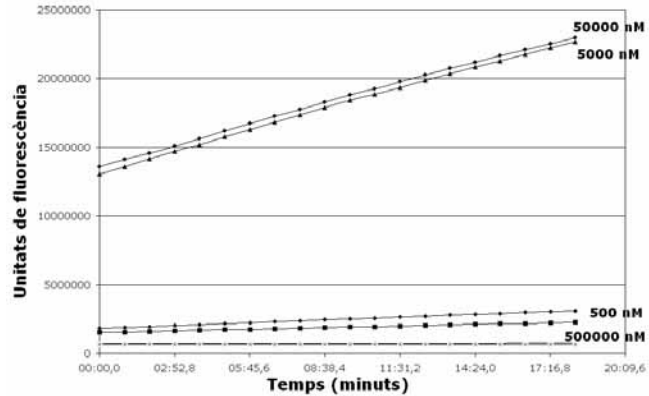
IV.1.5.1. Sistema basat en el receptor de progesterona més el gen reporter *lacZ* (PR-RYA)

Es va utilitzar la soca L40, que presenta la seqüència operadora *lexA* davant del gen reporter *lacZ*, transformada amb el plasmidi pLPR, que conté el receptor humà de progesterona.

En el cas de l'assaig colorimètric es va fer un banc de dilucions amb vuit concentracions diferents de progesterona i quatre rèpliques per a cadascuna d'aquestes, mentre que en el cas de l'assaig fluorimètric es va mesurar l'aparició de fluorescència en funció del temps a nou concentracions de progesterona (Figura

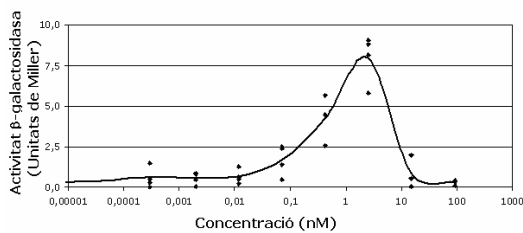
IV.7) i es va veure que, a concentracions saturants de substrat, l'aparició del producte fluorescent segueix una correlació lineal amb el temps, amb un pendent equivalent als valors d'activitat β -galactosidasa en unitats de fluorescència per minut.

Figura IV.7. Increment lineal de la fluorescència (en unitats de fluorescència) respecte el temps (en minuts) per a diferents concentracions de progesterona amb el sistema PR-RYA. Cada línia representa el valor mitjà de totes les determinacions per a cada concentració de progesterona. En el marge dret estan indicades aquelles concentracions que van presentar un increment en la fluorescència.



A partir dels resultats obtinguts es van traçar les corbes dosi-resposta de la Figura IV.8 que relacionen la concentració de lligand, progesterona en aquest cas, amb l'activitat β -galactosidasa. En el cas de l'assaig colorimètric (Figura IV.8 A), l'activitat β -galactosidasa va ser calculada en unitats de Miller; mentre que en el cas de l'assaig fluorimètric (Figura IV.8 B), es va calcular a partir del pendent de les línies de la Figura IV.7 per mètodes de regressió lineal estàndard en unitats de fluorescència per minut (U.F./minut). Es va veure que a elevades concentracions de progesterona s'arribava al màxim nivell de resposta. Això s'interpreta com a un efecte de toxicitat de manera que l'increment de resposta es dona fins que s'arriba a una concentració de progesterona tòxica per a la cèl·lula de llevat. A partir d'aquesta concentració la progesterona presenta uns nivells de toxicitat massa elevats, cosa que fa que les cèl·lules morin i, per tant, no s'observa resposta.

A) Assaig colorimètric



B) Assaig fluorimètric

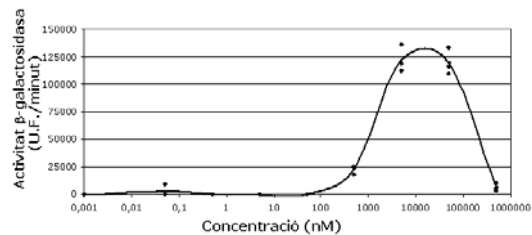


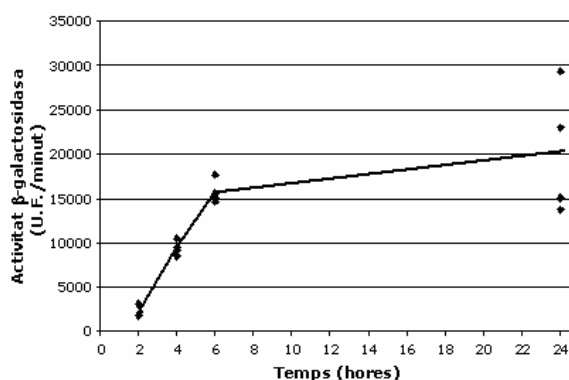
Figura IV.8. Corbes dosi-resposta de la progesterona amb el sistema PR-RYA. A) Gràfic que representa els valors obtinguts utilitzant el substrat cromogènic ONPG. B) Gràfic que mostra els resultats obtinguts amb el substrat fluorogènic MUGal. L'eix de les Y representa l'activitat β -galactosidasa en unitats de Miller (assaig colorimètric) i unitats de fluorescència per minut (U.F./minut) (assaig fluorimètric). En tots dos casos la línia contínua representa el valor mitjà per a cada concentració de progesterona (Noguerol *et al.*, 2006a).

Aquest sistema es va fer servir per a comparar el comportament entre els protocols colorimètric i fluorimètric. Els valors calculats de les EC_{50} de la progesterona en ambdós mètodes són similars ($0.54 \mu\text{M}$ en l'assaig colorimètric i $1.32 \mu\text{M}$ en l'assaig fluorimètric), tots dos notablement més alts que els valors que s'obtenen utilitzant el PR original en un sistema RYA similar (30 nM , Garcia-Reyero *et al.*, 2001). Això probablement reflecteix una interacció dèbil entre el constructe químic i la progesterona.

Tot i que les corbes dosi-resposta per als assaigs colorimètric i fluorimètric de la Figura IV.8 són similars, l'efecte tòxic observat va tenir lloc a una concentració més baixa en el sistema colorimètric. La toxicitat més elevada de la progesterona en aquest assaig es relaciona probablement amb la necessitat d'incubacions *overnight* degut a la baixa sensibilitat d'aquest sistema. En canvi, la detecció fluorogènica de l'activitat β -galactosidasa permet temps d'incubació molt més curts disminuint així els possibles efectes tòxics.

La Figura IV.9 mostra els valors de l'activitat β -galactosidasa de l'assaig fluorogènic després de 2, 4, 6 i 24 hores d'incubació amb progesterona $5 \mu\text{M}$. No es va poder traçar un gràfic similar utilitzant el substrat ONPG ja que aquest només detecta activitat β -galactosidasa després d'una incubació *overnight*. Les dades indiquen que els nivells d'activitat augmenten fins a les 6 hores a on arriben a un *plateau*, incubacions més llargues només incrementen la variabilitat entre els replicats probablement degut a diferències de creixement i/o viabilitat. La variabilitat més gran de les dades en la corba dosi-resposta amb ONPG de la Figura IV.8 A en relació amb les dades fluorogèniques de la Figura IV.8 B es podria explicar probablement per aquest requeriment d'incubacions *overnight*.

Figura IV.9. Variació de l'activitat β -galactosidasa (en U.F./minut) incubant el sistema PR-RYA amb una concentració de progesterona de $5 \mu\text{M}$ a diferents temps. La línia contínua indica el valor mitjà de quatre rèpliques independents per a cada temps (Noguerol *et al.*, 2006a).



Aquest sistema va donar resultats pobres tant en termes d'activitat transcripcional com d'afinitat per al lligand, la progesterona. Malgrat això, va ser un bon model per

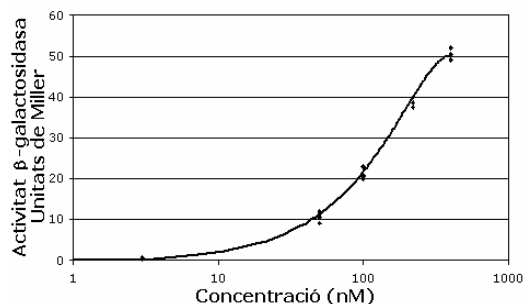
a comparar el comportament dels protocols colorimètric i fluorimètric per als sistemes de baixa expressió.

IV.1.5.2. Sistema basat en el receptor d'hidrocarburs d'aril més el gen reporter *lacZ* (AhR-RYA i YCM-RYA)

En el cas de l'assaig colorimètric, es va fer exactament el mateix experiment però va transformar-se la soca L40 amb el plasmidi pLMAX, que conté l'AhR de ratolí (sistema AhR-RYA). En aquest cas, es va fer un banc de dilucions amb sis concentracions diferents de β -naftoflavona i quatre rèpliques per a cadascuna d'aquestes i a partir dels resultats obtinguts es va traçar la corba dosi-resposta relacionant la concentració de β -naftoflavona amb l'activitat β -galactosidasa calculada en unitats de Miller (Figura IV.10 A).

En el cas de l'assaig fluorimètric, es va utilitzar la soca YCM4 cedida per en Charles A. Miller (Miller, 1999). La Figura IV.10 B mostra la corba dosi-resposta corresponent a la β -naftoflavona per a aquest assaig així com l'adequació dels valors a l'equació (1'). L' EC_{50} calculada (46.9 nM) és similar als valors que apareixen en la bibliografia per a aquest sistema (Miller, 1999; Carver *et al.*, 1994). En aquest cas, també es va observar que els sistemes RYA basats en aquest receptor mostren un nivell d'expressió basal relativament alt en absència de lligand que a la seva vegada determina un moderat augment de la transcripció després de l'addició del lligand. En concret, l'activitat β -galactosidasa en absència de lligand (nivell basal) va ser calculada en 15 U.F./minut, mentre que l'activitat màxima a concentració saturant de lligand va assolir 500 U.F./minut, el que va representar una inducció de la transcripció de 33 vegades. Aquest valor també és similar a altres valors divulgats per a diferents sistemes RYA basats en l'AhR (Miller, 1999; Carver *et al.*, 1994). La Figura IV.10 B també mostra la reproductibilitat de les dades en totes les concentracions de lligand, a excepció de la concentració més alta (10 μ M) en la qual es va veure un possible efecte tòxic en tres de les quatre rèpliques analitzades.

A) Assaig colorimètric



B) Assaig fluorimètric

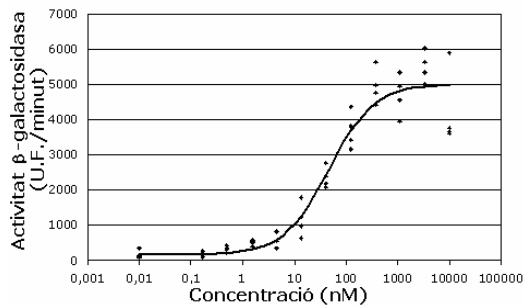
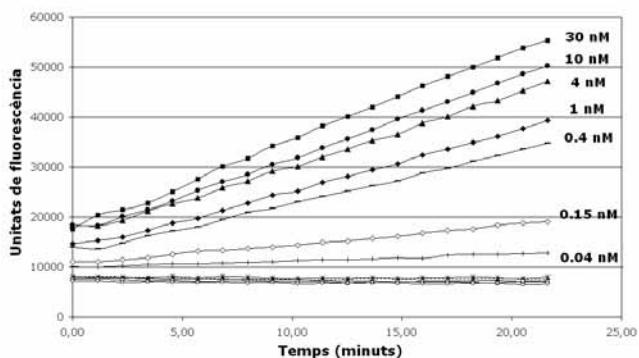


Figura IV.10. Corbes dosi-resposta de la β-naftoflavona amb els sistemes AhR-RYA i YCM-RYA. A) Gràfic que representa els valors obtinguts amb el sistema AhR-RYA utilitzant el substrat cromogènic ONPG. En aquest gràfic l'eix de les Y representa l'activitat β-galactosidasa en unitats de Miller i la línia contínua correspon al valor mitjà per a cada concentració de β-naftoflavona. B) Gràfic que mostra els resultats obtinguts amb el substrat fluorogènic MUGal. L'eix de les Y representa l'activitat β-galactosidasa en unitats de fluorescència per minut (U.F./minut). La línia contínua indica la corba predita per l'equació (1') i els rombes representen els valors individuals de l'activitat β-galactosidasa (Noguerol et al., 2006a).

IV.1.5.3. Sistema basat en el receptor d'estrògens més el gen reporter lacZ (ER-RYA)

Tal i com s'ha fet per al PR, es va mesurar l'aparició de fluorescència en funció del temps. La Figura IV.11 mostra la cinètica de formació del producte fluorogènic per a diferents concentracions de 17β-estradiol. En aquest cas, es va fer un banc de dilucions amb dotze concentracions diferents de 17β-estradiol i sis rèpliques per a cadascuna d'aquestes.

Figura IV.11. Increment lineal de la fluorescència (en unitats de fluorescència) respecte el temps (en minuts) per a diferents concentracions de 17β-estradiol amb el sistema ER-RYA. Cada línia representa el valor mitjà de totes les determinacions per a cada concentració de 17β-estradiol que apareixen indicades en el marge dret (Noguerol et al., 2006a).



De la mateixa manera que abans, els valors de l'activitat β-galactosidasa es van calcular en unitats de Miller en el cas de l'assaig colorimètric (Figura IV.12 A), i a partir del pendent de les línies de la Figura IV.11 per mètodes de regressió lineal estàndard en el cas de l'assaig fluorimètric (Figura IV.12 B). Aquesta figura també mostra un ajust no lineal de les dades a les equacions (1'), (2') i (3'). Igual que en

el cas de la progesterona, es pot apreciar que a mesura que s'incrementa la concentració de 17β -estradiol augmenta la resposta però, en aquest cas, no es va arribar al nivell de toxicitat del sistema. Això es pot veure clarament en les corbes dosi-resposta del 17β -estradiol de la Figura IV.12 en les que es representa la variació de l'activitat β -galactosidasa a diferents concentracions de 17β -estradiol.

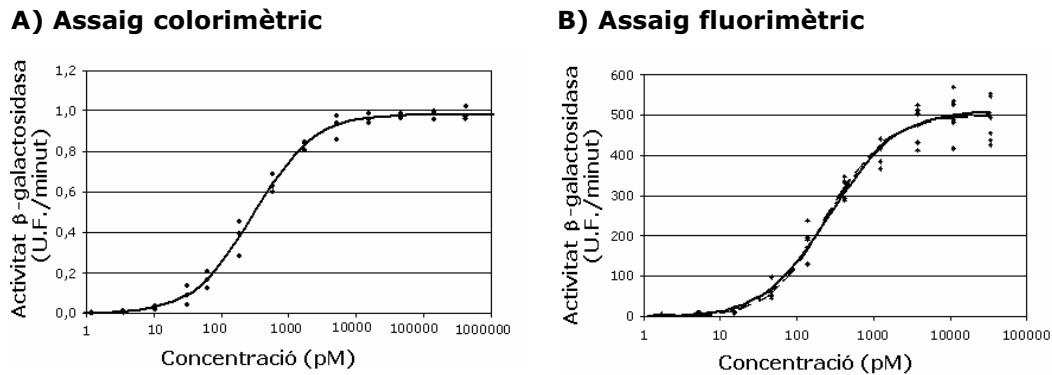


Figura IV.12. Corbes dosi-resposta del 17β -estradiol amb el sistema ER-RYA. A) Gràfic que representa els valors obtinguts utilitzant el substrat cromogènic ONPG. En aquest gràfic l'eix de les Y representa l'activitat β -galactosidasa en unitats de Miller i la línia contínua correspon al valor mitjà per a cada concentració de 17β -estradiol. B) Gràfic que mostra els resultats obtinguts amb el substrat fluorogènic MUGal. L'eix de les Y representa l'activitat β -galactosidasa en unitats de fluorescència per minut (U.F./minut). Els rombes representen els valors de sis determinacions independents per a cada concentració de 17β -estradiol. El gràfic indica les corbes teòriques com es defineixen en l'equació (1') (línia contínua), (2') (guionets llargs) i (3') (guionets curts). Els paràmetres corresponents, calculats per mètodes de regressió no lineal, es mostren en la Taula IV.3 (Noguerol *et al.*, 2006a).

En la Taula IV.3 es mostren els valors dels paràmetres calculats per a cada model a partir de l'ajust de les dades de la corba dosi-resposta de l'assaig fluorimètric del 17β -estradiol (Figura IV.12 B). Les dades van mostrar un bon ajust a les tres equacions, la predicció dels paràmetres més rellevants de les quals va coincidir. És particularment rellevant que les equacions (2') i (3') predigueren un valor proper a 1 per al paràmetre de cooperativitat p . De fet un valor per a $p=1$, que indicaria una formació no cooperativa del complex receptor-ligand, és conseqüent amb la predicció dels dos models amb una confiança del 95%. La principal conclusió és que l'equació de Hill no cooperativa encaixa adequadament amb les dades indicant que l'equilibri receptor-ligand és realment el pas limitant en aquest sistema i que la possible interacció cooperativa del complex receptor-ligand no influeix en la dinàmica de la resposta hormonal. Els valors de K obtinguts pels tres models són similars, de 175 a 267 pM en el cas de l'equació (1) que coincidiria amb la constant de dissociació del 17β -estradiol. El valor d' EC_{50} calculat (267.64 pM amb un interval de confiança del 95% de 220.18-315.11 pM) és molt similar als valors obtinguts en

sistemes basats en ONPG, com també es pot veure en altres grups (Garcia-Reyero *et al.*, 2001; Céspedes *et al.*, 2004).

Taula IV.3. Resultats de l'ajust de les dades de la corba dosi-resposta de l'assaig fluorimètric del 17 β -estradiol (Figura IV.12 B) a tres variants alternatives de l'equació de Hill (Noguerol *et al.*, 2006a).

Model	A		B		K		p	
	Valor	Interval de confiança del 95%	Valor	Interval de confiança del 95%	Valor	Interval de confiança del 95%	Valor	Interval de confiança del 95%
Equació de Hill (1')	-5.77	(-16.67- 5.52)	518.60	(448.38-538.81)	267.64	(220.18-315.11)	1.00 ^{a)}	--
Equació cooperativa de Hill (2')	-2.55	(-14.84-9.75)	505.70	(476.98-539.46)	256.55	(212.22-300.88)	1.10	(0.91-1.28)
Equació de Hill modificada (3')	0.97	(-11.3-13.23)	503.54	(479.80-527.25)	174.79	(132.50-251.08)	1.55	(0.68-2.43)

En aquesta taula "B" és el nivell basal (sense lligand), "A" representa l'increment de la resposta des del nivell basal fins a la concentració saturant de lligand, "p" és el factor de cooperativitat i "K" és la Kd aparent. En la equació (1') "K" és equivalent a l'EC₅₀. Tots aquests paràmetres van ser calculats a partir de les dades de la corba dosi-resposta del 17 β -estradiol per mètodes de regressió no lineal. L'anàlisi de les dades, l'estadística i l'ajust lineal i no lineal a les equacions va fer-se amb l'SPSS v.13.0.1 package (SPSS Inc., Chicago, Ill.).

^{a)} Valor fixat en aquest model.

El sistema basat en el gen reporter *lacZ* és el sistema més consolidat dels tres que s'han estudiat. Amb aquest sistema es va trobar activitat per a tots els receptors nuclears testats, essent l'ER el que va presentar una major expressió i el PR el de menys activitat. Presenta l'avantatge de què pot ser utilitzat tant per a assaigs colorimètrics com per a assaigs fluorimètrics i, aprofitant aquest avantatge, van comparar-se els dos tipus d'assaig per tal de definir el protocol més adequat. Es va veure que l'aspecte clau d'aquest protocol és la utilització de substrats fluorogènics, en comptes de cromogènics, amb els quals s'incrementa la sensibilitat per a la detecció de l'activitat β -galactosidasa de dos a tres ordres de magnitud.

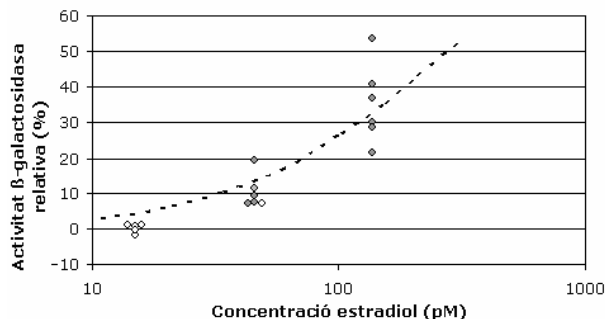
IV.1.6. Anàlisi estadística dels límits de detecció per als sistemes ER-RYA i YCM-RYA

El límit de detecció (LOD, *Limit Of Detection*) per a la determinació de l'activitat β -galactosidasa es pot calcular com la concentració de lligand que correspon al valor mínim dels pendents significativament diferents dels controls negatius. En el cas de l'ER-RYA, en el que l'activitat basal de la β -galactosidasa està per sota dels límits de detecció, aquesta probabilitat equival al paràmetre de significació " σ " que indica la probabilitat de què el pendent calculat sigui zero. La Figura IV.13 mostra una part de la corba dosi-resposta de la Figura IV.12 B recalculada per a traçar les unitats relatives de l'activitat β -galactosidasa *versus* la concentració del 17 β -estradiol. Els símbols estan codificats segons els valors de σ a partir dels càlculs de regressió lineal corresponents. Els valors significatius ($\sigma \leq 0.05$) dels pendents es van

correspondre als valors entre el 7 i el 10% de l'activitat β -galactosidasa a concentracions saturants de 17β -estradiol. Així doncs, es pot concloure que el valor del LOD calculat amb aquest mètode va coincidir aproximadament amb l' EC_{10} , concentració de lligand que representa el 10% de la resposta màxima. Per al 17β -estradiol aquest valor es va calcular a partir de l'equació (1') en 34 pM (Taula IV.3, Noguerol *et al.*, 2006a). En la Figura IV.13 es pot veure que la majoria dels valors dels pendents són $\sigma \leq 0.001$ indicant la robustesa de l'anàlisi.

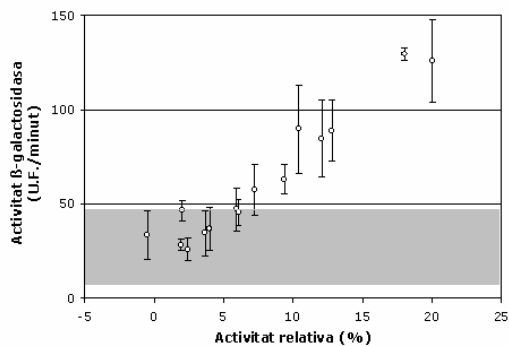
Figura IV.13. Gràfic dels valors d'activitat β -galactosidasa relativa amb el sistema ER-RYA a diferents concentracions de 17β -estradiol.

Els valors significatius s'han identificat de la següent manera: cercles negres, $\sigma < 0.01$; cercles grisos, $\sigma < 0.05$; i cercles blancs, $\sigma > 0.05$ (no significatiu) (Noguerol *et al.*, 2006a).



Les dades del sistema YCM-RYA no es poden analitzar de la mateixa manera que els valors de l'ER-RYA ja que amb aquest sistema en situació basal els nivells d'activitat β -galactosidasa són massa grans (al voltant de 15 U.F./minut) com per a ser estadísticament significatius a partir de zero. La Figura IV.14 mostra una representació dels valors relatius d'activitat β -galactosidasa *versus* els valors absoluts (part esquerra de la Figura IV.10 B). El sector gris del gràfic indica el nivell de confiança del 95% per a la transcripció basal. Van ser considerats estadísticament significatius aquells valors d'activitat β -galactosidasa en els que el límit de confiança del 95% no se superposava amb els nivells basals (Noguerol *et al.*, 2006a). En aquest cas, les diferències entre els nivells basals i els assajats van arribar a ser significatives quan els valors relatius de l'activitat β -galactosidasa estaven per sobre del 7-10% de l'activació màxima, similar al que s'observava amb l'ER-RYA. Es pot concloure, doncs, que va ser raonable fixar el valor del LOD en l' EC_{10} per a la majoria de les determinacions. En el cas de l'YCM-RYA, es va correspondre a 5 nM (Noguerol *et al.*, 2006a), valor similar al descrit per a aquest sistema (Miller, 1999).

Figura IV.14. Gràfic dels valors relatius de l'activitat β -galactosidasa (% de l'activitat màxima) *versus* els valors absoluts (U.F./minut) amb el sistema YCM-RYA a diferents concentracions de β -naftoflavona. Les barres indiquen el 95% de l'interval de confiança calculat per mètodes de regressió no lineal. El sector fosc indica el 95% de l'interval de confiança per a l'activitat basal de la β -galactosidasa.



IV.1.7. Estudi de la dualitat d'un fitoestrogen natural: la Genisteïna. Anàlisi de la seva activitat inhibidora

La combinació de diferents sistemes fluorogènics de RYA també pot ajudar a la caracterització d'antagonistes específics d'hormones, és a dir, compostos en presència dels quals s'evita l'activació d'un agonista conegut (Garcia-Reyero *et al.*, 2004; Graumann and Jungbauer, 2000). La Genisteïna és un fitoestrogen natural que actua com a agonista de l'ER amb una EC_{50} calculada amb el sistema ER-RYA de $2.9 \pm 0.7 \mu\text{M}$ (Taula IV.4). Per altra banda, quan s'analitza amb l'YCM-RYA actua com a antagonista suprimint l'activació per β -naftoflavona amb un valor calculat d' IC_{50} de $29.9 \pm 5.9 \mu\text{M}$ (Taula IV.4).

Es va realitzar una corba d'inhibició de la Genisteïna incubant els cultius de llevat amb $0.5 \mu\text{M}$ de β -naftoflavona i diferents concentracions de Genisteïna (Figura IV.15 B). S'esperava trobar un màxim de resposta en aquells cultius que van ser incubats en absència de Genisteïna i una disminució progressiva de la resposta a mesura que augmentava la concentració d'aquesta. Els paràmetres de regressió de la corba d'inhibició suggereixen que l'efecte antagònic té un fort efecte cooperatiu ($p=4.5 \pm 3.0$), en contraposició amb la resposta agonista essencialment no cooperativa obtinguda amb el sistema ER-RYA (Taula IV.4). Aquesta funció dual de moltes flavones naturals (Zhang *et al.*, 2003) pot ser central en l'estudi del seu proposat efecte beneficiós per a la salut *in vivo* (Cornwell *et al.*, 1999). En les corbes dosi-resposta mostrades en la Figura IV.15 s'observa que la màxima activació amb l'ER-RYA té lloc a concentracions de Genisteïna similars a l' IC_{50} obtinguda amb l'YCM-RYA.

A) Corba dosi-resposta de la Genisteïna B) Corba d'inhibició de la Genisteïna

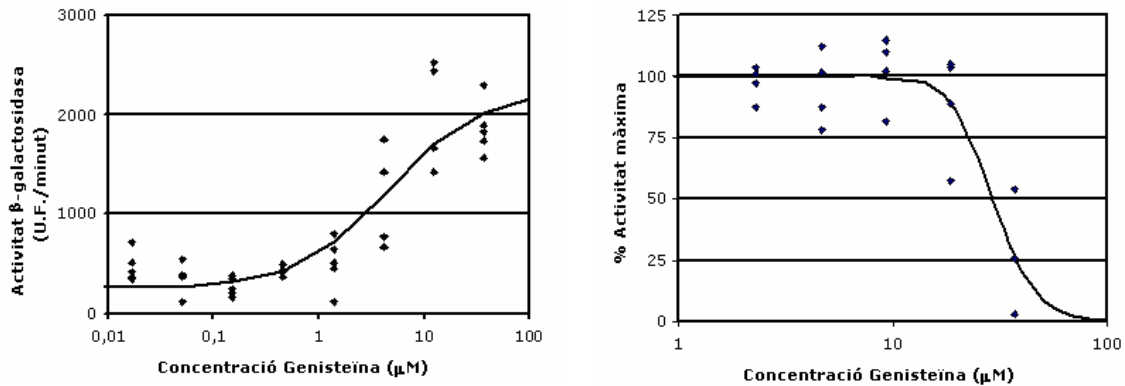


Figura IV.15. A) Corba dosi-resposta de la Genisteïna amb el sistema ER-RYA. La línia contínua indica la corba predita per l'equació (1') i els rombcs representen els valors individuals d'activitat (cinc rèpliques per a cada dilució). B) Efecte inhibitori de la Genisteïna amb el sistema YCM-RYA. Els cultius de llevat van ser incubats amb 0.5 µM de β-naftoflavona i diferents concentracions de Genisteïna. Els rombcs representen els valors relatius d'activació, referits a l'activitat mostrada per cultius incubats només amb β-naftoflavona. En ambdós gràfics les línies contínues representen les corbes dosi-resposta teòriques definides a partir de l'equació (1') en el cas del gràfic A i (2'') en el cas del gràfic B (veure Taula IV.4) (Noguerol *et al.*, 2006a).

Taula IV.4. Ajust de les dades de la corba dosi-resposta de la Genisteïna amb el sistema ER-RYA i de la corba d'inhibició amb el sistema YCM-RYA a les equacions de Hill cooperativa i no cooperativa (Noguerol *et al.*, 2006a).

Sistema	Model	K		P	
		Valor(µM)	Interval de confiança del 95%	Valor	Interval de confiança del 95%
ER-RYA ^{b)}	Equació de Hill (1')	2.91	(1.19 - 4.62)	1.00 ^{a)}	-
	Equació cooperativa de Hill (2')	2.83	(1.69 - 3.97)	0.90	(0.60 - 1.19)
YCM-RYA ^{c)}	Equació de Hill (1'')	38.82	(9.24 - 68.41)	1.00 ^{a)}	-
	Equació cooperativa de Hill (2'')	29.91	(24.00 - 35.81)	4.52	(1.50 - 7.53)

^{a)} Valor fixat en aquest model; ^{b)} Efecte agonista; ^{c)} Efecte antagonista.

IV.1.7.1. Discerniment entre els efectes tòxics i els efectes inhibitoris

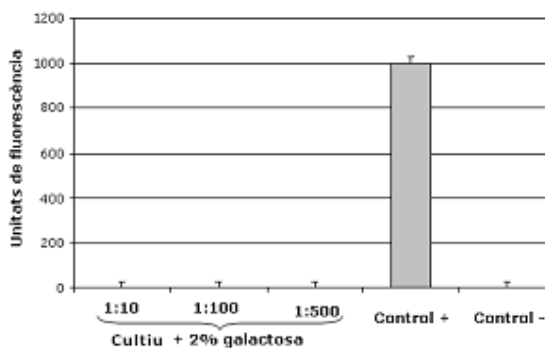
Els efectes antagònics poden ser fàcilment mimetitzats o emmascarats pels efectes citotòxics, en els que no es dona activació transcripcional degut a la inhibició de les funcions vitals de la cèl·lula de llevat. És en aquest aspecte a on temps d'incubació curts mostren el seu principal avantatge ja que els efectes citotòxics s'incrementen amb temps llargs d'exposició.

En aquest treball es presenta un assaig que permet discernir entre els efectes tòxics i els efectes inhibitoris dels lligands basat en la utilització de la soca W303D amb el gen *gus* però en aquest cas sota el control d'un promotor induïble en presència de galactosa, el *GAL1,10*, de manera que la transcripció del gen *gus*

només s'activarà en presència d'aquesta en el medi. L'assaig es basa en la incubació d'aquest sistema (sistema GAL1-GUS) amb el compost que es vol estudiar en presència de galactosa de manera que, si el compost és tòxic per al llevat, aquest matarà la cèl·lula i no s'observarà resposta. Per altra banda, si no és tòxic, no matarà el llevat i s'activarà la transcripció del gen *gus*. De la mateixa manera que abans, s'espera detectar l'expressió de l'enzim que s'obté a partir de la transcripció del gen reporter *gus*, la β -glucuronidasa, mitjançant la metabolització del seu substrat, el MUG, a un producte fluorescent.

En aquest treball es mostra l'exemple del Diclofluànid que va ser analitzat mitjançant l'ER-RYA i l'YCM-RYA. Amb aquest compost no va obtenir-se resposta en cap dels dos sistemes de manera que es va dubtar si el compost en qüestió era antagonista per a tots dos receptors o bé era tòxic per a les cèl·lules de llevat. Es va dur a terme un assaig per a discernir entre toxicitat i inhibició amb la soca GAL1-GUS incubant 2 hores en presència d'aquest compost amb 3 dilucions diferents (1:20, 1:100 i 1:500). En la Figura IV.16 es pot veure que no hi va haver activació del *gus* en cap dilució, confirmant així la toxicitat del compost. A més, es va realitzar un control positiu tan sols en presència de galactosa per a assegurar que el sistema funcionés correctament i un control negatiu incubant el cultiu en absència de galactosa i de compost.

Figura IV.16. Assaig per a discernir entre el possible efecte inhibitori o tòxic del Diclofluànid amb el sistema GAL1-GUS. Van realitzar-se tres dilucions del compost incubat en presència de galactosa al 2%. També es va incloure un control positiu (presència de galactosa al 2% i absència de compost) i un control negatiu (absència de galactosa i de compost). Els resultats que es mostren són els valors mitjans de tres replicats independents amb les seves desviacions estàndards.



IV.1.8. Discussió general

Els bioassaigs basats en la utilització de llevats s'estan convertint en eines generalitzades per a la detecció i quantificació de lligands de receptors nuclears, tant pels efectes agonistes com antagonistes. Com s'ha dit abans, aquesta detecció es troba amb diferents problemes quan s'analitzen mostres no convencionals. En aquest treball s'ha tractat de solucionar aquests problemes reduint el volum de cultiu i el temps d'incubació. Volums de cultiu petits permeten l'ús de quantitats

petites de mostres i la utilització de plaques de microtitulació, obrint la possibilitat a la mecanització del procés. Temps d'incubació curts, en molts casos menors que el temps de divisió en les condicions d'assaig, impliquen que la capacitat del cultiu cel·lular per a dividir-se no afecta a l'activitat total del reporter, a diferència d'aquells protocols que requereixen incubacions *overnight* a on la taxa de creixement representa la font de variabilitat més gran. Probablement aquesta és la causa principal per la qual la dispersió dels valors dels replicats d'un mateix experiment és menor que en els protocols amb incubacions més llargues. Això també minimitza el possible efecte de compostos tòxics, donat que temps llargs d'exposició incrementen la seva citotoxicitat.

Un problema típic de tots els mètodes basats en reporters enzimàtics en llevats és la relativa baixa permeabilitat del llevat, la qual cosa dificulta que l'enzim sintetitzat a partir de la transcripció del gen reporter entri en contacte amb el substrat afegit. L'article de Bovee *et al.*, 2005 tracta d'un RYA basat en l'ER amb *gfp* com a reporter que elimina la necessitat de substrats, ja que el producte d'aquest gen reporter és ell mateix fluorescent. Malgrat que això pot ser un avantatge per a alguns propòsits, la combinació de la flexibilitat per a poder adaptar aquest sistema a diversos receptors, temps curts d'incubació i alta sensibilitat per a la detecció del producte del gen és central en la valoració quantitativa del potencial de disrupció endocrina de compostos i de mostres ambientals. La permeabilització *in situ* de les cèl·lules de llevat és també un factor que contribueix a incrementar la precisió de l'assaig. La utilització del detergent Y-PER afegeix un altre pas, i uns 30 minuts, al procediment total. No obstant això, permet la detecció de nivells d'activitat molt dèbils i augmenta enormement la reproductibilitat de les rèpliques.

L'aspecte clau és la utilització de substrats fluorogènics. En aquest treball es proposa un mètode ràpid per a la detecció de lligands de diferents receptors de vertebrats basat en la utilització de substrats fluorogènics del gen reporter β -galactosidasa. Aquest sistema ha estat descrit en bacteris (Rowland *et al.*, 1999; Honeyman *et al.*, 2002), mamífers i sistemes de llevats (Zhang *et al.*, 1991). La detecció amb fluorescència presenta una sensibilitat intrínseca més gran, quan es compara amb l'absorbància, que permet temps d'incubació i volums de cultiu menors (veure Taula IV.5). També permet la utilització de cultius cel·lulars en la fase inicial de creixement exponencial (DO_{600} entre 0.1 i 0.2). Aquests cultius són molt més robusts i produeixen una millor resposta front l'estímul que en la fase tardanera exponencial (DO_{600} al voltant d'1), que és la que s'utilitza normalment per als mètodes cromogènics.

Taula IV.5. Quadre resum de diferents dades pràctiques comparant els dos tipus de detecció, colorimètrica i fluorimètrica.

	ONPG (detecció colorimètrica)	MUGal (detecció fluorimètrica)
Densitat òptica	0.5-1	0.1-0.2
Volum de cultiu	2 ml	50 µl
Temps d'incubació	<i>overnight</i>	4-6 hores
Tipus de mesura	Temps final	Cinètica
Automatització	No	Sí

En la Figura IV.8 es mostra un bon model per a comparar el comportament entre els protocols colorimètric i fluorimètric. Encara que les corbes dosi-resposta de la Figura IV.8 són similars, s'observen efectes tòxics de la progesterona a concentracions més baixes en el sistema colorimètric. Això probablement està relacionat amb la necessitat d'incubacions *overnight*, mentre que la detecció basada en fluorescència permet incubacions més curtes disminuint els possibles efectes citotòxics.

La combinació de la detecció per fluorescència amb densitats òptiques baixes permet una determinació precisa de l'activitat β -galactosidasa no amb mesures de punt final, com és el cas de la detecció colorimètrica amb les unitats de Miller, sinó mesurant directament les cinètiques d'aparició del producte fluorescent. Això permet la determinació exacta dels nivells basals de l'activitat β -galactosidasa, normalment molt baixos en molts sistemes, donat tant per una manca del promotor reporter com per la presència de lligands endògens no caracteritzats. Aquests valors van deduir-se matemàticament de les dades experimentals en el càlcul final de l'activitat total del lligand (terme "*B*" en les equacions (1) i (1')). Aquesta combinació de la quantificació de la cinètica de l'activitat β -galactosidasa i del càlcul de l'activitat total del lligand per mètodes de regressió no lineal a partir de les corbes dosi-resposta augmenta enormement la precisió de l'anàlisi, a la vegada que permet l'automatització del procés ja que no requereix vigilància contínua per cap operador. D'aquesta manera es facilita l'anàlisi estadística de les dades. Totes aquestes característiques combinades configuren un mètode flexible, ràpid i reproduïble per a avaluar la presència de possibles xenobiòtics en el medi ambient.

En resum, en aquest treball es presenta un protocol integrat per a optimitzar aquests procediments en termes de reproductibilitat i reduint al màxim el temps d'assaig. El protocol s'aprofita de la disponibilitat de substrats fluorogènics per a la β -galactosidasa i de la possibilitat d'utilitzar cèl·lules de llevat permeabilitzades *in situ* en plaques de microtitulació de 96 pouets. També descriu mètodes millorats de quantificació de l'activitat enzimàtica de la β -galactosidasa ajustant les dades a una corba dosi-resposta teòrica i determinant de manera automàtica i precisa els límits

de detecció. Una vegada establert el procés no es requereix la supervisió de l'usuari, obrint la possibilitat a l'automatització i a la robotització. Aquí es presenten dades a partir de tres sistemes basats en llevats (el del PR, el de l'AhR i el de l'ER), però el mètode es pot adaptar a la majoria de bioassaigs en llevats basats en la detecció enzimàtica. El procés es pot completar en poques hores, incloent-hi temps d'incubació i de detecció; de fet, en alguns casos el pas limitant és la pròpia resposta biològica de la cèl·lula de llevat a la presència de lligand.

En aquest punt, i per a facilitar les posteriors anàlisis de mostres, es va decidir que a partir d'aquest moment s'estudiarien dos receptors, l'ER i l'AhR. El PR va ser descartat degut a la seva elevada constant d'afinitat que dificulta la seva aplicació en la detecció de diferents tipus de substàncies, com són els disruptors endocrins, caracteritzades per trobar-se a la natura a baixes concentracions de manera que un sistema amb baixa afinitat, com és el PR-RYA, no és l'adequat per a aquest tipus d'assaigs. En el cas del RYA basat en l'AhR es va decidir treballar amb la soca YCM4 cedida per en Charles A. Miller (Miller, 1999). La raó per la qual es va decidir treballar amb aquesta soca és que, a part de presentar l'AhR humà en comptes de ratolí, és una soca molt més estable ja que el receptor i l'ARNT es troben integrats. A més, malgrat que el constructe quimèric del sistema AhR-RYA és farmacològicament indistingible del receptor sencer, estudis recents (Boronat *et al.*, 2007a) determinen que la presència de l'ARNT pot fer que s'incrementi el ventall de substàncies detectades a través d'aquest sistema. Això és degut a què determinades substàncies que no podrien ser detectades pel sistema AhR-RYA (per exemple, degut a un possible efecte antagònic que bloquegés o inactivés el receptor), sí que podran ser detectades amb el sistema YCM-RYA ja que, tot i no ser capaces d'activar el receptor, sí que facilitaran la unió d'aquest a l'ARNT i, per tant, la unió al DNA i la transcripció del gen reporter *lacZ*. També es va incloure en aquest estudi per tal d'evidenciar com el protocol establert era apropiat per a altres sistemes basats en soques de llevat ja construïdes.

Tot i que els dos RYA (ER-RYA i YCM-RYA) són similars, s'utilitzen per estudiar l'impacte químic en vertebrats enfocant-se fonamentalment a dues dianes diferents. L'ER es el receptor principal del cicle reproductor femení, de manera que la presència de lligands exògens pot tenir conseqüències importants en la capacitat reproductiva. Per exemple, els mateixos lligands poden feminitzar mascles, especialment en peixos, reduint d'aquesta manera la seva capacitat reproductiva (Segner *et al.*, 2003; Colborn *et al.*, 1993), tot i que els efectes directes sobre la fauna exposada continuen essent escassos (Mills and Chichester, 2005). Per altra banda, l'AhR controla un important conjunt d'enzims biotransformadors en diversos

teixits metabòlicament actius (fetge, cervell, ronyó, etc.). La seva expressió indeguda, lligada a la presència de lligands exògens, s'ha relacionat amb una plèthora de patologies, des de disfunció immune a càncer. La combinació d'ambdós sistemes pot proporcionar un mètode convenient i pràctic per a supervisar l'impacte humà en diferents ecosistemes com poden ser els llacs i rius.

IV.2. AVALUACIÓ PER RYA DE LES INTERACCIONS DE DOS RECEPTORS DE VERTEBRATS (ER I AHR) AMB DIFERENTS CONTAMINANTS PERSISTENTS I PESTICIDES

Cada any degut a la creixent demanda de biocides biodegradables i altres productes químics amb poc o cap impacte en els sistemes endocrins, s'estan desenvolupant i situant en el mercat nous compostos aparentment no tòxics, incloent-hi pesticides, biocides, surfactants i refrigerants. Per tal de realitzar una avaluació preliminar de les seves activitats de disrupció endocrina, van seleccionar-se alguns compostos aromàtics d'interès ambiental i es va analitzar la seva capacitat d'interaccionar amb dos receptors de vertebrats: l'ER i l'AhR. El fonament raonat va ser proporcionar una prova fàcil per a la detecció primerenca de possibles xenobiòtics amb estructures químiques tan diverses com fos possible.

En aquest treball van analitzar-se nous compostos plaguicides antiincrustants com són l'Irgarol, el Sea-Nine i el Diuron, així com derivats del BZT. Els perfils d'unió d'aquestes substàncies van comparar-se als d'alguns contaminants clàssics, com el 4,4'-DDT i l'HCB, així com al de diferents PCBs. D'acord amb aquestes dades s'han discutit les característiques estructurals requerides per a la unió a l'ER i a l'AhR, i la importància de l'aparent promiscuïtat d'aquests receptors en els programes de valoració ambiental.

IV.2.1. Anàlisi de la capacitat d'interacció amb l'ER i l'AhR

Els compostos analitzats es poden agrupar en diferents famílies: PCBs, BPA, ftalats (DEHP, DEP, DMP, DBP i BBP), fenilurees (Diuron, N-Demetil diuron, 1-(3,5-Diclorofenil)urea), benzotiazoles (BZT, MetBZT i BZT-OH) i compostos heterocíclics (Irgarol i Sea-Nine). L'HCB i el 4,4'-DDT es van incloure en aquest estudi degut a la seva importància ambiental. La Genisteïna també va ser analitzada i dos lligands coneguts de l'ER i l'AhR, el 17 β -estradiol i la β -naftoflavona, es van afegir com a referències. Les estructures de tots aquests compostos estan representades en les Figures VI.17, VI.18 i VI.19. Els experiments dosi-resposta es van dur a terme emprant ambdós sistemes RYA, ER-RYA i YCM-RYA. Per a simplificar, els resultats han estat expressats en EC₅₀ (Taules IV.6 i IV.7), valor que es pot comparar amb l'EC₅₀ del lligand natural i així obtenir una idea de la potència del xenobiòtic.

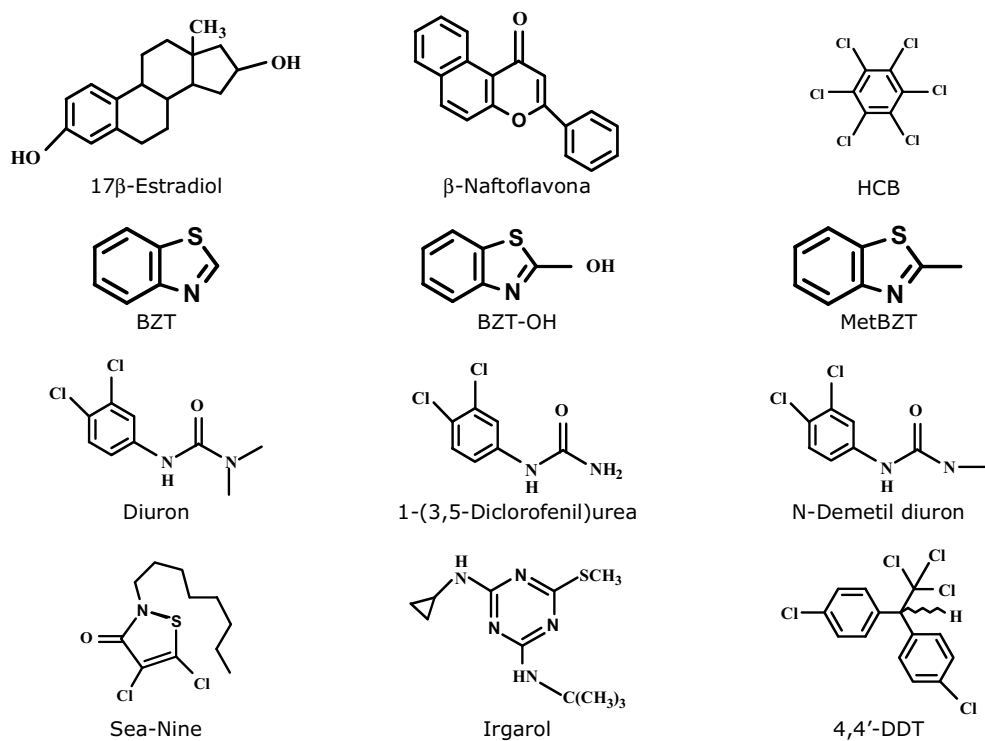


Figura IV.17. Estructures químiques de diferents compostos analitzats. Les abreviacions són: HCB, hexaclorobenzè; BZT, benzotiazole; BZT-OH, 3'-hidroxi benzotiazole; MetBZT, 2-metil benzotiazole; i 4,4'-DDT, 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)età (Noguerol *et al.*, 2006b).

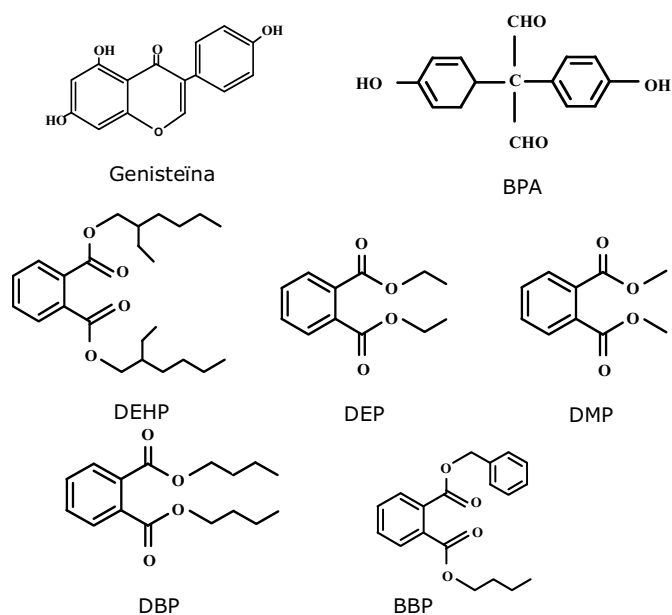


Figura IV.18. Estructures químiques de diferents compostos analitzats entre els que es troben la Genisteïna, el BPA i una sèrie de ftalats. Les abreviacions són: BPA, bisfenol A; DEHP, bis(2-etilhexil) ftalat; DEP, dietil ftalat; DMP, dimetil ftalat; DBP, dibutil ftalat; i BBP, butil benzil ftalat.

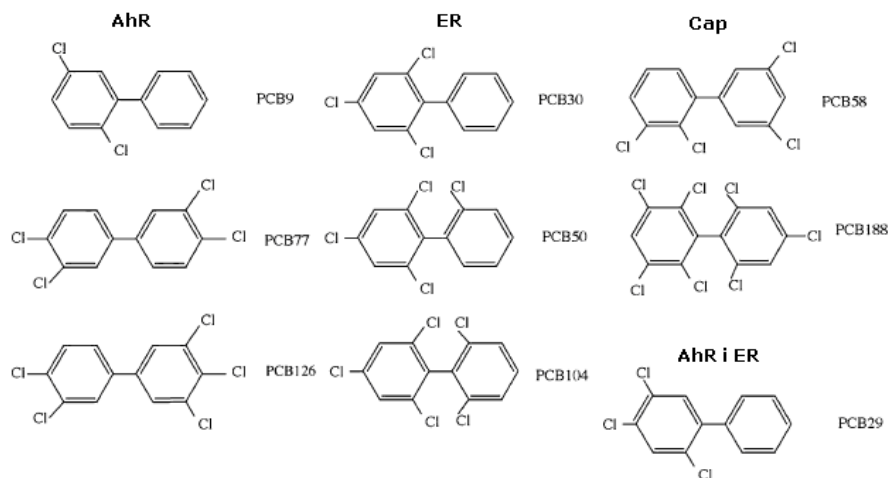


Figura IV.19. Estructures químiques dels PCBs analitzats en aquest treball agrupats pel seu potencial d'unió a l'ER i/o a l'AhR (Noguerol *et al.*, 2006b).

Taula IV.6. Valors de les EC_{50} per a l'AhR i l'ER de diferents productes químics analitzats amb els sistemes YCM-RYA i ER-RYA (Noguerol *et al.*, 2006b).

COMPOST	YCM-RYA EC_{50} (mg/l)	ER-RYA EC_{50} (mg/l)
17β-Estradiol	n.d	$2.91 \times 10^{-5} \pm 4.19 \times 10^{-6}$
β-Naftoflavona	0.14 ± 0.02	n.d
PCB9	0.40 ± 0.17	b.d.l
PCB29	1.12 ± 0.30	7.59 ± 4.86
PCB30	b.d.l	62.90 ± 23.10
PCB50	b.d.l	7.46 ± 2.28
PCB58	b.d.l	b.d.l
PCB77	0.014 ± 0.005	b.d.l
PCB104	b.d.l	5.33 ± 3.65
PCB126	0.90 ± 0.32	b.d.l
PCB188	b.d.l	b.d.l
HCB	7.70 ± 0.50	b.d.l
4,4'-DDT	b.d.l	b.d.l
Diuron	0.26 ± 0.10	>200
N-Demetil diuron	2.73 ± 1.21	b.d.l
1-(3,5-Diclorofenil)urea	40.60 ± 0.70	b.d.l
Irgarol	b.d.l	b.d.l
Sea-Nine	b.d.l	b.d.l
BZT-OH	6.92 ± 0.81	>10
BZT	10.21 ± 0.63	5.54 ± 1.31
MetBZT	11.01 ± 0.62	7.99 ± 2.97

n.d: no determinat.

b.d.l: per sota del límit de detecció (*below detection limit*).

En la Taula IV.6 els resultats del sistema YCM-RYA indiquen una interacció significativa de l'AhR amb els derivats de la fenilurea, les interaccions dels quals amb l'ER són molt dèbils o inexistents (Figura IV.20 C). Un patró similar es va observar per a l'HCB. Els benzotiazoles, en canvi, van promoure resposta en ambdós sistemes mentre que l'Irgarol, el Sea-Nine i el 4,4'-DDT van ser incapaços de respondre en cap dels dos sistemes RYA. Cap dels compostos va mostrar un efecte inhibitori significatiu sota les condicions de l'assaig. Els valors de les EC₅₀ obtinguts per als benzotiazoles i alguns PCBs amb l'ER-RYA són diversos ordres de magnitud més grans que l'EC₅₀ del 17β-estradiol i similars als valors obtinguts per a altres contaminants ambientalment rellevants, com el BPA o els ftalats (Taula IV.7, Céspedes *et al.*, 2004). En el cas de l'AhR, els valors de les EC₅₀ són similars, o fins i tot més baixos, que els del lligand utilitzat com a referència, la β-naftoflavona, indicant una afinitat relativament alta per a l'AhR, la qual cosa suggereix que aquests compostos poden plantejar un risc significatiu per al medi ambient.

Taula IV.7. Valors de les EC₅₀ per a l'AhR i l'ER de diferents productes químics analitzats amb els sistemes YCM-RYA i ER-RYA.

COMPOST	YCM-RYA EC ₅₀ (mg/l)	ER-RYA EC ₅₀ (mg/l)
17β-Estradiol	n.d	2.91x10 ⁻⁵ ±4.19x10 ⁻⁶
β-Naftoflavona	0.14±0.02	n.d
Genisteïna	b.d.l	0.78±0.19
BPA	b.d.l	1.64±0.39
DEHP	b.d.l	2.31±1.46
DEP	b.d.l	6.96±2.36
DMP	b.d.l	4.08±1.24
DBP	b.d.l	3.96±1.50
BBP	b.d.l	5.16±2.16

n.d: no determinat.

b.d.l: per sota del límit de detecció (*below detection limit*).

En la Taula IV.7 es mostren els valors de les EC₅₀ determinats per a diferents compostos analitzats, entre els que es troben la Genisteïna, el BPA i diferents ftalats, l'estructura dels quals està representada en la Figura IV.18. Els ftalats van interessar ja que són els responsables de l'estrogenicitat dels plàstics. El protocol proposat inclou la utilització de plaques de microtitulació ja que suposen una sèrie d'avantatges respecte els assaigs en tub (amb les plaques s'aconsegueix disminuir considerablement els volums de cultiu i de mostra necessaris i s'augmenta la processivitat del sistema fent possible l'anàlisi de més mostres a la vegada). Aquestes plaques acostumen a ser de plàstics estrogènics com és el poliestirè. Per

tal d'evitar la contaminació per estrogenicitat d'aquest material el protocol es basa en la utilització de plaques de microtitulació de polipropilè (NUNC™, Roskilde, Denmark), un plàstic no estrogènic (Garcia-Reyero *et al.*, 2004). En la Taula IV.7 es pot observar que aquest grup de compostos, els ftalats junt amb la Genisteïna i el BPA, només van respondre en el sistema ER-RYA.

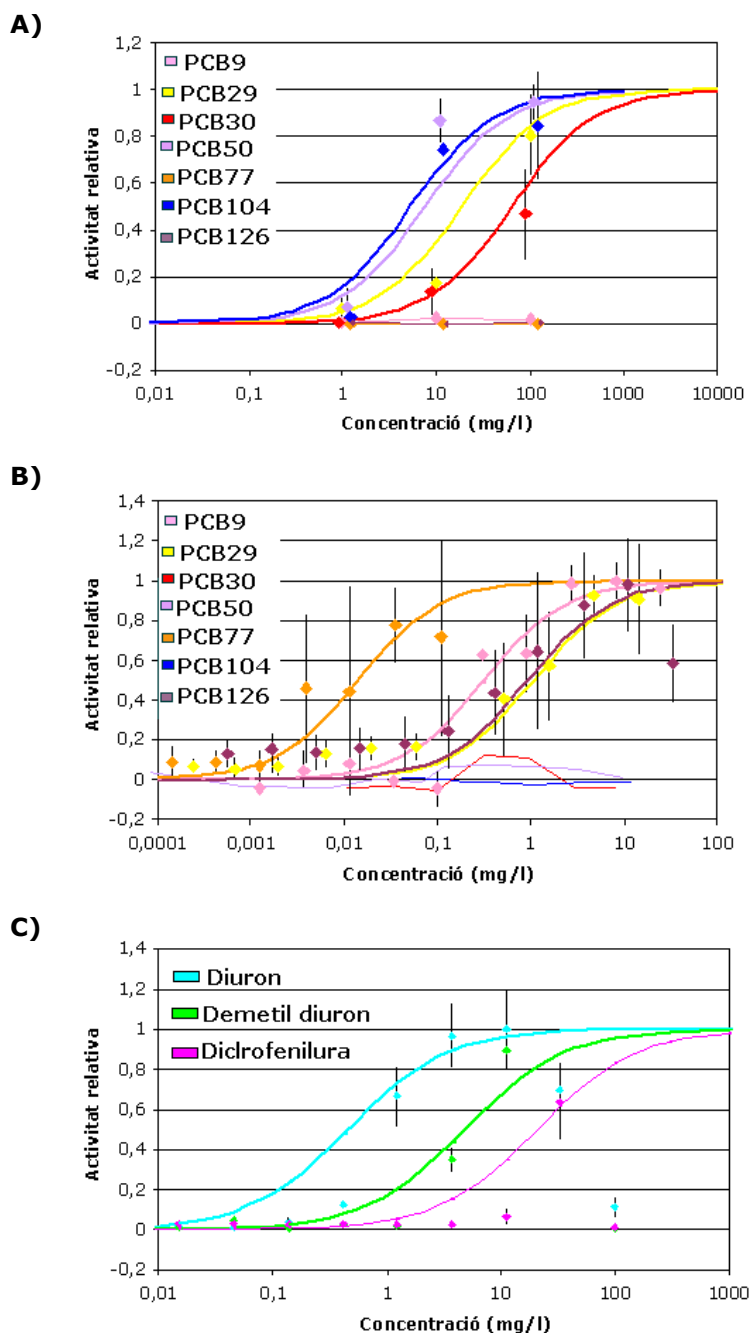


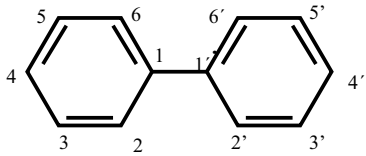
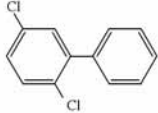
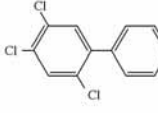
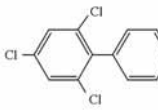
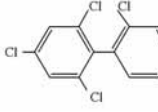
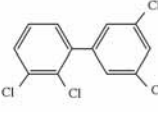
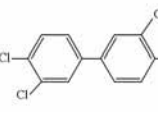
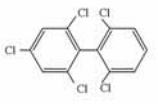
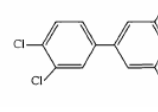
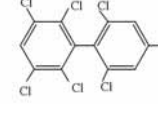
Figura IV.20. Corbes dosi-resposta de diferents compostos analitzats. En els gràfics A i B es mostren els resultats per a diferents PCBs amb els sistemes ER-RYA (A) i YCM-RYA (B). El gràfic C mostra la resposta del Diuron, N-Demetil diuron i 1-(3,5-Diclorofenil)urea amb el sistema YCM-RYA. Les dades estan expressades com a unitats relatives d'activitat (0 per als controls negatius i 1 per a les concentracions saturants de lligand) i es mostren com els valors mitjans amb les seves desviacions estàndards (barres) de com a mínim tres rèpliques per a cada concentració de compost. Les corbes sigmoïdals es corresponen a les corbes dosi-resposta predites per als diferents compostos, assumint l'equació de Hill i utilitzant els valors de la Taula IV.6 (Noguerol *et al.*, 2006b).

IV.2.2. Requeriments estructurals per a la interacció dels PCBs amb l'ER i l'AhR. Establiment de relacions entre la seva estructura química i l'afinitat pels receptors

Una altra aplicació important d'aquests bioassaigs és l'establiment de relacions entre l'estructura química de diferents compostos i la seva afinitat per als receptors nuclears (Gaido *et al.*, 1997; Nishihara *et al.*, 2000; Garcia-Reyero *et al.*, 2004; Arulmozhiraja *et al.*, 2005), la qual cosa permetrà establir patrons predictius de comportament. Per a il·lustrar-ho, en aquest treball van analitzar-se 9 congèneres diferents de PCBs (Figura IV.19), els quals van mostrar un ampli rang de respostes amb els sistemes ER-RYA i YCM-RYA (Taules IV.6 i IV.8). Tres compostos (PCB30, PCB50 i PCB104) van respondre només en el sistema ER-RYA, mentre que altres tres (PCB9, PCB77 i PCB126) van ser detectats només pel sistema YCM-RYA. Dos més (PCB58 i PCB188) no van mostrar resposta en cap sistema, mentre que el PCB29 va ser detectat per ambdós sistemes (Taules IV.6 i IV.8, veure també la Figura IV.20 A i B). Com s'ha dit anteriorment, l'afinitat d'alguns d'aquests compostos per l'AhR iguala o fins i tot sobrepassa la de la β -naftoflavona, mentre que els valors de les EC_{50} per a l'ER són similars als d'altres contaminants estrogènics dèbils però significatius (Taules IV.6 i IV.8) (Céspedes *et al.*, 2004).

En les Taules IV.6 i IV.8 es mostren els diferents PCBs testats i les seves respectives EC_{50} amb els sistemes YCM-RYA i ER-RYA. En la Taula IV.8 també s'indica el nombre de clors en posició orto (2, 6, 2' i 6') que són els que determinaran la possibilitat de lliure rotació o no de la molècula. Més d'un clor substituent en aquestes posicions provocarà un impediment estèric que impossibilitarà l'adopció d'una conformació coplanària.

Taula IV.8. Quadre resum dels diferents PCBs testats amb les seves respectives EC_{50} per als sistemes YCM-RYA i ER-RYA. També està indicat el nombre de clors en posició 2, 6, 2' i 6'.

	YCM-RYA EC_{50} (mg/l)	ER-RYA EC_{50} (mg/l)	Clors en posició 2, 6, 2', 6'
 PCB9	0.40±0.17	b.d.l	1
 PCB29	1.12±0.30	7.59±4.86	1
 PCB30	b.d.l	62.90±23.10	2
 PCB50	b.d.l	7.46±2.28	3
 PCB88	b.d.l	b.d.l	1
 PCB77	0.014±0.005	b.d.l	0
 PCB104	b.d.l	5.33±3.65	4
 PCB126	0.90±0.32	b.d.l	0
 PCB188	b.d.l	b.d.l	4

b.d.l: per sota del límit de detecció (*below detection limit*).

L'observació de les estructures dels congèneres dels PCBs que interaccionen amb cada receptor va suggerir que només els congèneres planars (congèneres sense o amb un únic clor substituïent en les posicions 2, 6, 2', 6') són capaços d'unir-se a l'AhR. Cal que l'estructura pugui adoptar una conformació coplanària per a poder activar el receptor, o sigui, que la lliure rotació del enllaç entre els grups fenil no es vegi afectada pels clors substituïents, però sembla ser que no és suficient ja que alguns PCBs planars, com el PCB 58, no l'activen. Per altra banda, l'ER no necessita una estructura tan concreta ja que s'observa que un increment en la dificultat de rotació dels dos anells no afecta l'afinitat pel receptor, és a dir, no és tan selectiu i el criteri és molt més ampli, diferents PCBs amb diferents estructures són capaços d'activar-lo. En aquest cas, el clor substituïent en la posició 4 sembla facilitar la resposta en el sistema ER-RYA (Taula IV.8 i Figura IV.19). Una hipòtesi per a explicar la interacció amb aquest receptor es podria basar en la posició dels clors en l'estructura d'aquests productes. Tots ells presenten clors en posició 2 i 4; el clor en posició 4 podria coincidir amb la posició de l'OH del 17 β -estradiol, com es veu en la Figura IV.21 al fer una superposició d'ambdues molècules. Això, però, s'hauria de justificar analitzant altres PCBs diferents per a així poder arribar a establir una relació definitiva.

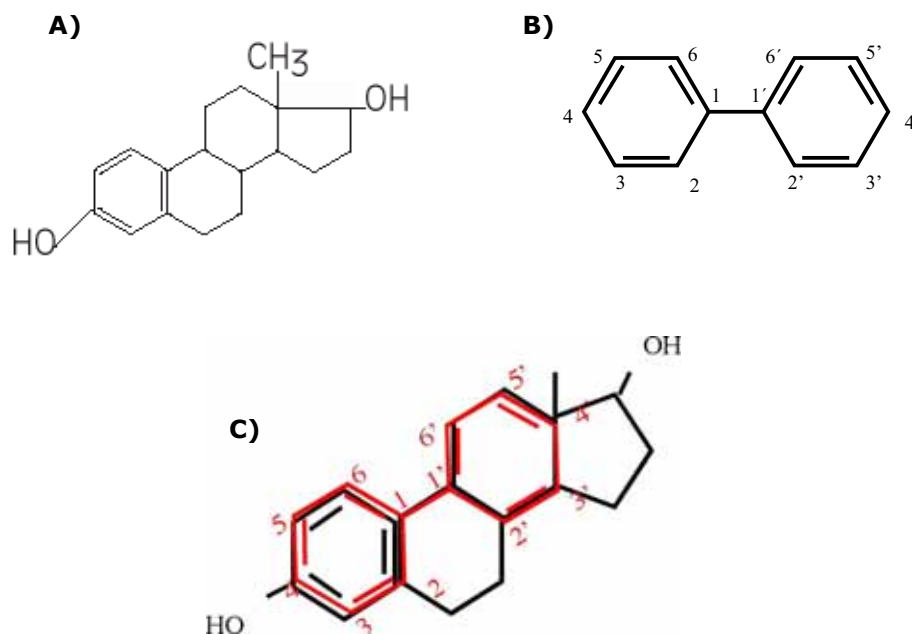


Figura IV.21. Comparació de l'estructura del 17 β -estradiol amb l'estructura general dels PCBs. A) Estructura del 17 β -estradiol. B) Numeració dels llocs de substitució dels PCBs. C) Superposició de l'estructura general dels PCBs amb l'estructura del 17 β -estradiol.

Està clar que, a diferència de l'AhR, l'ER pot reconèixer les estructures amb una conformació no coplanària. Els PCB30, PCB50 i PCB104 tenen estructures idèntiques en el primer anell de benzè però es diferencien en el nivell de substitucions del segon. El PCB104 va demostrar una afinitat similar per l'ER que el PCB50 i ambdós van mostrar valors d'EC₅₀ deu vegades més baixos que el PCB30, que és l'únic d'aquesta sèrie capaç d'adoptar una conformació quasi-coplanària (Figura IV.19). Un quart congènere amb una distribució idèntica de clors substituents (2', 4' i 6', en aquest cas), el PCB188, va ser indetectable per l'ER-RYA. En aquest cas el seu caràcter altament hidrofòbic, que redueix la seva biodisponibilitat, pot descartar el seu reconeixement pels sistemes basats en llevats (explicat detalladament més endavant).

A més de les observacions prèviament exposades està clar que hi ha d'haver altres requeriments estructurals per a la interacció amb tots dos receptors. Se sap que el PCB77 i el PCB126, que són estructuralment similars amb clors substituents en les posicions 3, 3', 4 i 4', són agonistes de l'AhR (Vezina *et al.*, 2004; Bemis *et al.*, 2005). El PCB29 té dos clors substituents en les posicions 4 i 5, que es podrien correspondre amb les posicions 3 i 4 del PCB77 (Figura IV.19), però en aquest cas va mostrar una afinitat relativament alta per als dos receptors. Comparant les afinitats relatives del PCB29 i el PCB9, es va observar que el clor substituent en la posició 4 del PCB29 sembla ser necessari per a la interacció amb l'ER, mentre que té una relativa influència en la unió a l'AhR (Taules IV.6 i IV.8, Figura IV.19). No obstant això, la coplanaritat no pot ser l'únic requeriment per a la unió amb l'AhR, ja que per exemple el PCB58, que pot adoptar una conformació coplanària com el PCB9 o el PCB29 però que no té cap clor substituent en les posicions 4 o 4', no va mostrar resposta en cap sistema (Taules IV.6 i IV.8, Figura IV.19).

La Taula IV.9 mostra els valors de les constants d'unio de l'ER i l'AhR per a diferents compostos organoclorats divulgades en la bibliografia (Scippo *et al.*, 2004; Connor *et al.*, 1997; Matthews and Zacharewski, 2000; Hestermann *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 1994). El RYA va predir correctament les constants d'unio del PCB104 per a l'ER i dels PCB29 i PCB77 per a l'AhR, així com la unio no detectable del PCB77 i del PCB126 amb l'ER. Aquest també pot ser el cas del 4,4'-DDT, el qual va mostrar una alta constant d'unio per a l'ER i activitat imperceptible amb l'ER-RYA (Taula IV.6). No obstant això, el RYA no va poder detectar la interacció entre el PCB188 i l'ER i va subestimar extremadament la constant d'afinitat del PCB126 per a l'AhR. Es va proposar que això podria ser degut a la natura altament hidrofòbica d'aquests compostos, amb 7 i 5 clors substituents respectivament, que podria reduir la seva biodisponibilitat.

Taula IV.9. Constants d'unió calculades per a diferents compostos organoclorats (Noguerol *et al.*, 2006b).

Receptor	Compost	K_i (mg/l)	Origen
ER	4,4'-DDT	211	Humà ^{a)}
	2,2',4',6'-TetraCB-4-ol	832	Ratolí ^{b)}
	2,2',4',6'-TetraCB-4-ol	3.7	Rata ^{b)}
	2,2',6,6'-TetraCB-4-ol	0.15±0.01	Humà ^{c)}
	2,2',6,6'-TetraCB-4-ol	0.09±0.03	<i>Rainbow trout</i> ^{c)}
	PCB77	b.d.l	Humà, <i>R. trout</i> ^{c)}
	PCB104	>3	Humà ^{c)}
	PCB104	0.4±0.2	<i>Rainbow trout</i> ^{c)}
	PCB126	b.d.l	Humà, <i>R. trout</i> ^{c)}
	PCB188	>4	Humà ^{c)}
AhR	PCB188	0.5±0.4	<i>Rainbow trout</i> ^{c)}
	PCB29	>2.5	Ratolí ^{d)}
	PCB77	0.018±0.004	Ratolí ^{d)}
	PCB77	0.25±0.12	<i>Poeciliopsis lucida</i> ^{e)}
	PCB126	0.0052±0.0024	<i>Poeciliopsis lucida</i> ^{e)}

b.d.l: per sota del límit de detecció (*below detection limit*).

^{a)} Scippo *et al.*, 2004; ^{b)} Connor *et al.*, 1997; ^{c)} Matthews and Zacharewski, 2000; ^{d)} Brown *et al.*, 1994;

^{e)} Hestermann *et al.*, 2000.

En el cas de l'ER-RYA, és interessant comparar les afinitats d'unió i els valors de les EC_{50} d'alguns PCBs amb els valors dels seus derivats hidroxilats. Per exemple, el 2, 2', 6, 6'-tetraclorobifenil-4-ol és estructuralment idèntic al PCB104, a excepció de la substitució d'un residu de clor en la posició 4 per un grup hidroxil que augmenta la seva afinitat per l'ER un ordre de magnitud (les dues versions mostrades en la Taula IV.9). El 2, 2', 4', 6'-tetraclorobifenil-4-ol té la mateixa disposició en termes de clors substituents que el PCB50 amb l'addició d'un grup hidroxil en la posició 4. La seva constant d'unió calculada per a l'ER de rata és similar al valor de l' EC_{50} obtingut amb l'ER-RYA per al PCB50 (Taulas IV.6 i IV.8). Això suggereix que la incorporació d'un grup hidroxil augmenta la polaritat i probablement la biodisponibilitat dels PCBs. No obstant això, no és un requeriment per a la detecció de la seva interacció mitjançant el RYA.

Molts lligands exògens de l'AhR i de l'ER són altament lipofílics degut a la seva natura aromàtica. Aquests compostos plantegen moltes dificultats tècniques per als bioassaigs. Per definició són relativament insolubles en aigua, la qual cosa implica la utilització de vehicles semipolars compatibles amb la viabilitat del bioassaig. A més, els compostos hidrofòbics presenten una tendència molt forta a fixar-se per adsorció a qualsevol material orgànic com són puntes de pipetes, tubs Eppendorf, plaques de cultiu cel·lular i plaques de microtitulació. Aquest problema va solucionar-se desenvolupant una versió de RYA que evitava l'adsorció dels

compostos a les superfícies de plàstic i la migració de les substàncies estrogèniques del material de plàstic a les solucions aquoses (Garcia-Reyero *et al.*, 2001; Noguerol *et al.*, 2006a; Garcia-Reyero *et al.*, 2005). Aquestes millores del RYA inclouen la utilització de material de vidre en lloc de plàstic per a emmagatzemar i manipular les mostres, i campanetes de Durham de vidre per a les incubacions. Això és especialment rellevant per als sistemes basats en l'AhR degut a la natura altament lipofílica de la majoria dels seus lligands. Un mètode alternatiu i més pràctic és la utilització de plaques de microtitulació sililades amb diclorodimetilsilà que impedeix la fixació dels compostos hidrofòbics.

IV.2.3. Discussió general: estudi de l'aparent promiscuïtat de l'ER i l'AhR, cross-talk entre les seves vies de senyalització i disseny de nous compostos per a substituir aquells que tenen un risc demostrat

En aquest treball s'han utilitzat dos sistemes basats en llevats per a analitzar la capacitat de diferents compostos químics per a unir i activar dos receptors de vertebrats íntimament relacionats amb els efectes biològics adversos de contaminació en la fauna exposada (l'ER i l'AhR). Van analitzar-se diferents compostos entre els quals es troben contaminants ben coneguts com alguns PCBs, el 4,4'-DDT i l'HCB, junt amb nous contaminants menys coneguts com el Sea-Nine, l'Irgarol i el Diuron. Els resultats van mostrar la capacitat d'alguns d'aquests compostos per a interaccionar amb un o tots dos receptors i van proporcionar indicis sobre la relació entre la seva estructura i l'activitat biològica. En concret, les dades mostrades aquí van suggerir que la llista de substàncies aromàtiques capaces d'interaccionar amb l'ER i/o l'AhR amb afinitat significativa és molt més gran del que s'esperava. Per exemple, els benzotiazoles i les fenilurees s'han de sumar a la llista de possibles lligands de l'AhR juntament amb l'HCB. A més, es va mostrar que l'AhR pot tenir una promiscuïtat intrínseca de lligand comparable a la de l'ER, una característica no apreciada totalment en el passat degut a les dificultats tècniques que implica l'anàlisi per RYA de substàncies altament lipofíliques. Mentre que la natura promíscua de l'ER s'ha conegut sempre (Elsby *et al.*, 2000), la idea de què l'AhR tingui un ampli espectre similar de possibles lligands exògens només s'ha conegut recentment (Denison and Nagy, 2003; Noguerol *et al.*, 2006b). La promiscuïtat de l'AhR pot tenir profundes conseqüències en termes d'avaluació de riscos degut als greus efectes de salut associats als seus lligands coneguts fins ara (Gonzalez and Fernandez-Salguero, 1998; Shimizu *et al.*, 2000; Abbott *et al.*, 1994; Poland and Knutson, 1982; Connor *et al.*, 1997; Aoki, 2001).

La capacitat d'alguns d'aquests productes químics d'interaccionar amb tots dos receptors és especialment rellevant. Aquest és el cas dels benzotiazoles i del PCB29. Tot i que no hi ha dades *in vivo* disponibles, sembla ser que els efectes biològics d'aquestes substàncies, i d'altres amb aquesta característica, poden ser molt més greus que els esperats considerant la interacció amb només un dels receptors. A més, hi ha evidències de *cross-talk* entre les vies de senyalització de l'ER i l'AhR. Per exemple, els enzims implicats en el metabolisme de l'estradiol són regulats per l'AhR i alguns del seus lligands, com la β -naftoflavona, actuen com a antiestrògens a través de la seva interacció amb l'AhR (Navas and Segner, 2000). En concret, el complex AhR-ARNT activat per lligand és capaç d'activar l'ER mimetitzant els estrògens (Ohtake *et al.*, 2003). Això podria explicar parcialment l'alta toxicitat observada durant la intoxicació per PCBs industrials i altres compostos organoclorats, com s'observa en les síndromes de Yusho i de Yu-Cheng (Aoki, 2001).

Els valors d'afinitat obtinguts en aquest treball per a moltes substàncies són similars als valors calculats per a molts contaminants ambientalment rellevants (Scippo *et al.*, 2004; Céspedes *et al.*, 2004; Andersen *et al.*, 1999). No obstant això, els valors relativament alts de les EC_{50} obtinguts en aquest treball (sobre mg/l) s'han de considerar només com una indicació de la viabilitat estructural de la unió a l'ER i/o a l'AhR. Cal tenir en compte que els valors d'afinitat es poden modular per canvis en les cadenes laterals, per exemple, alquilació o desalquilació (Garcia-Reyero *et al.*, 2004) o per l'oxidació o la reducció de grups en l'anell principal (Shiraishi *et al.*, 2003). Aquestes modificacions degudes a biotransformacions en l'ambient o al metabolisme de l'animal contaminat poden canviar les afinitats d'unió i la biodisponibilitat i, per tant, la toxicitat diversos ordres de magnitud (Shiraishi *et al.*, 2003). Tot i que algunes d'aquestes transformacions poden esdevenir en llevat (Layton *et al.*, 2002), els compostos modificats tenen una petita influència en els resultats del RYA, mentre que són més rellevants en els efectes biològics en vertebrats.

Un dels resultats estructurals més importants dels estudis dels lligands de receptors és el disseny de nous compostos per a substituir aquells que tenen un risc demostrat. Aquest és el cas de dos dels compostos analitzats aquí, l'Irgarol i el Sea-Nine. Els dos són compostos heterocíclics amb propietats antiincrustants. Cap dels dos va ser detectat ni per YCM-RYA ni per ER-RYA, suggerint que no van ser reconeguts pels receptors corresponents. Tots dos són solubles en aigua i relativament biodisponibles. L'Irgarol presenta un anell aromàtic heterocíclic, mentre que el nucli d'isotiazole del Sea-Nine és capaç d'adoptar una conformació

planar en compostos relacionats (Frydenvang *et al.*, 2002). En conjunt, aquestes dades van suggerir que els compostos heterocíclics, fins i tot aromàtics o planars, poden ser incapaços d'interaccionar amb l'ER o l'AhR i, per tant, són una bona font de nous compostos amb riscos ambientals més baixos.

Els bioassaigs basats en la utilització de llevats, malgrat ser unes eines extremadament útils en l'anàlisi dels riscos ambientals, no són i no poden ser l'única font d'informació quan s'analitzen compostos nous o poc caracteritzats en termes d'avaluació de riscos. Els mecanismes per a la disrupció endocrina poden incloure altres receptors amb gran importància en l'homeòstasi animal. Per exemple, s'ha demostrat que el 4,4'-DDE té efectes feminitzants en mamífers a través de la inhibició de la unió d'andrògens naturals al seu receptor (Kelce *et al.*, 1995). Una altra possible font de disrupció endocrina pot venir de la interacció de substàncies exògenes amb el receptor d'hormona tiroïdal (TR) i el receptor de l'àcid retinoic. Aquests receptors nuclears també tenen lligands endògens hidrofòbics, però la seva interacció amb compostos antropogènics és en gran part desconeguda (Arulmozhiraja *et al.*, 2005; Shiraishi *et al.*, 2003; Schriks *et al.*, 2006). La disrupció tiroïdal pot ser causada per diversos goitrògens, molts d'ells actuant a diferents nivells i no només, o no necessàriament, a través de la unió al TR. Per tant, el control d'aquesta classe particular de disrupció requeriria una anàlisi *in vitro* més exhaustiva (DeVito *et al.*, 1999). En tot cas, la combinació dels assaigs basats en llevats amb diferents receptors de vertebrats proporciona, sens dubte, sistemes barats i d'alt rendiment per a detectar i monitoritzar com a mínim un gran nombre de substàncies possiblement bioperilloses.

IV.3. INTERCALIBRAT EUROPEU PER A LA DETECCIÓ D'ESTROGENICITAT EN MOSTRES D'AIGUA MITJANÇANT RYA

Els objectius principals de l'*EU Water Framework Directive* (WFD) són la prevenció de qualsevol deteriorament dels llacs i rius i la protecció i millora de l'estat químic i biològic dels ecosistemes aquàtics i dels pantans associats. Per a dur a terme aquests objectius es necessiten dades fiables i comparables. Els mètodes biològics són una bona eina per a obtenir aquestes dades ja que amb ells s'aconsegueixen tant dades quantitatives com informació sobre la toxicitat o ecotoxicitat. Com a conseqüència d'això una part del projecte SWIFT-WFD (*6th EU RTD Framework Program* nº SSPI-CT-2003-502492) va ser l'assaig i la validació d'alguns sensors biològics, la identificació de problemes i la definició de les recomanacions per a altres aplicacions. Com a part del procés per a aconseguir aquests objectius va organitzar-se un intercalibrat entre diferents laboratoris europeus, un era el nostre, per a provar la idoneïtat d'un assaig biològic basat en llevats, el RYA, per a detectar activitat estrogènica en mostres d'aigües residuals.

L'exercici es va realitzar com a part del projecte: "*Screening Methods for Water Data Information in Support of the Implementation of the Water Framework Directive* (SWIFT-WFD)" recolzat per la Unió Europea i va ser la primera experiència d'inter-laboratori amb mostres ambientals per a la detecció d'activitat estrogènica. L'objectiu d'aquest exercici va ser provar la capacitat dels mètodes basats en la utilització de llevats per a detectar compostos estrogènics amb independència de l'operador i així validar el protocol proposat anteriorment. Amb aquesta finalitat van repartir-se als diferents laboratoris europeus participants dues sèries d'una col·lecció d'11 mostres codificades. En aquest exercici també es va repartir la soca de llevat modificada genèticament per a detectar lligands de l'ER humana descrita anteriorment, sistema ER-RYA (Noguerol *et al.*, 2006a).

IV.3.1. Intercalibrat 1

IV.3.1.1. Descripció dels resultats

En total van participar set laboratoris europeus (Alemanya, Holanda, Àustria, França, Noruega, Bèlgica i Espanya), un d'ells el nostre, que van analitzar dues sèries (A i B) d'11 mostres codificades aleatòriament amb un total de 14 sèries.

En la Taula IV.10 es mostren els resultats obtinguts pel nostre laboratori amb el seu interval de confiança del 95%. Els resultats estan expressats com a equivalents d'estradiol en nM (EEQ).

Taula IV. 10. EEQ mesurats en les diferents mostres analitzades amb els seus respectius intervals de confiança del 95%.

	EEQ mesurats (nM)	
	Sèrie A	Sèrie B
Mostra 1	b.d.l	b.d.l
Mostra 2	b.d.l	1.02 (0.89-1.27)
Mostra 3	1.15 (1.10-1.73)	3.09 (2.84-3.27)
Mostra 4	b.d.l	b.d.l
Mostra 5	5.58 (3.29-9.48)	1.19 (0.46-3.08)
Mostra 6	b.d.l	b.d.l
Mostra 7	5.67 (2.29-13.99)	4.42 (2.06-9.47)
Mostra 8	b.d.l	b.d.l
Mostra 9	18.80 (10.43-33.89)	11.12 (8.98-13.77)
Mostra 10	0.14 (0.13-0.15)	0.16 (0.13-0.18)
Mostra 11	3.83 (2.34-6.26)	5.28 (2.61-10.69)

Les mostres estan codificades de la següent manera: 1, Metanol (Blanc); 2, Influent d'una STP (planta de tractament d'aigües residuals, *Sewage Treatment Plant*) de Martorell; 3, Efluent d'una STP de Martorell; 4, Efluent d'una STP d'Igualada; 5, Mostra 4 fortificada amb estradiol 10 nM; 6, Mostra 4 fortificada amb nonilfenol 5 µM; 7, Mostra 4 fortificada amb estradiol 10 nM i nonilfenol 5 µM; 8, Solució estàndard de nonilfenol 5 µM; 9, Solució estàndard de Genisteïna 200 µM; 10, Solució estàndard d'estradiol 1 nM; i 11, Solució estàndard d'estradiol 10 nM.
b.d.l: per sota del límit de detecció (*below detection limit*).

La Figura IV.22 mostra una representació gràfica de l'activitat estrogènica, determinada en totes les mostres per cada laboratori participant.

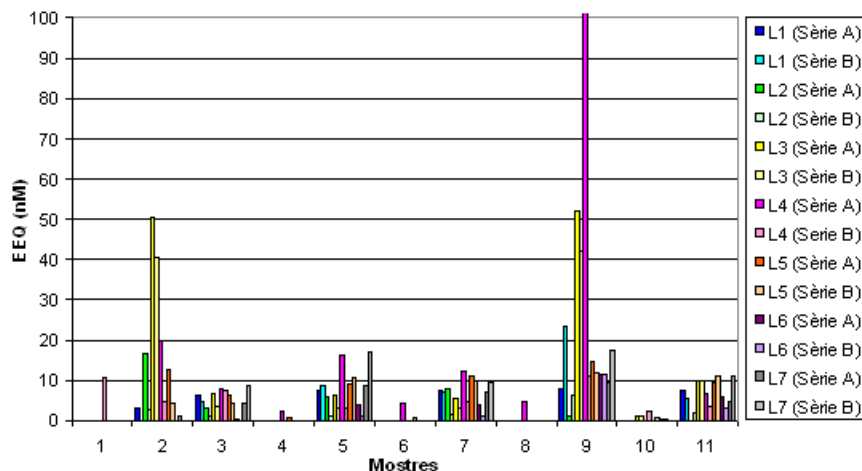


Figura IV.22. Valors d'estrogenicitat en EEQ (nM) de totes les mostres distribuïdes en aquest exercici. L'eix de les X representa les mostres numerades d'1 a 11. Els valors determinats per cada laboratori (classificats per codis de nombres en la llegenda) en ambdues sèries (A i B) estan identificats per barres amb diferent color. L'activitat estrogènica de la mostra 9A de l'L4 va ser calculada en 210 nM equivalents d'estradiol (fora d'escala).

IV.3.1.2. Límit de detecció i anàlisi de falsos positius i negatius

El propòsit de l'*screening* per bioassaigs basats en la utilització de llevats és obtenir una resposta qualitativa, sí o no, respecte a la presència d'activitat estrogènica i no una quantificació. Això implica que els paràmetres més importants a analitzar són les respostes positives falses, les respostes negatives falses, les desviacions estàndards i el LOD. Els falsos positius en teoria no representen un problema ja que aquelles mostres amb una resposta positiva seran analitzades amb més deteniment. No obstant això, un elevat nombre de falsos positius implicaria que l'assaig no és convenient com a mètode de *screening* pràctic i ràpid. Els falsos negatius són més importants ja que impliquen que la mostra no serà analitzada més endavant i les possibles substàncies o contaminants estrogènics presents romandran desapercebuts. El LOD, especialment en presència d'una matriu, és molt important. Interessa un LOD suficientment baix amb una preparació de les mostres raonablement simple, sinó el requeriment de facilitat de manipulació no s'assolirà.

En total van participar set laboratoris que van analitzar dues sèries d'11 mostres cadascun d'ells, és a dir, van fer-se 14 determinacions per mostra. En la Figura IV.23 s'indica el nombre de determinacions positives i negatives per a cada mostra a més de la seva representació gràfica.

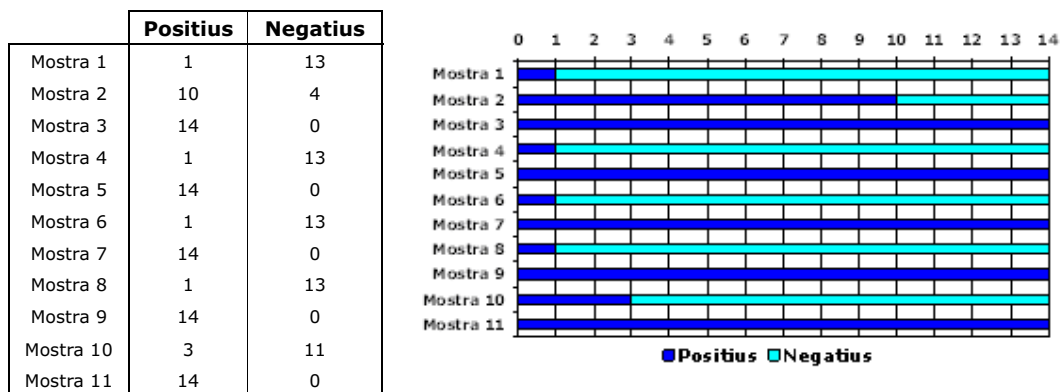


Figura IV.23. Nombre i representació gràfica de les determinacions que van classificar les mostres com a estrogèniques (positius) i no estrogèniques (negatius).

Un control negatiu (mostra 1: metanol) va ser inclòs en l'exercici per a analitzar l'índex de falsos positius. Tan sols una determinació de les 14 anàlisis va identificar aquesta mostra com a estrogènica, la qual cosa va representar un índex de falsos positius del 7%. Altres tres mostres (mostres 4, 6 i 8) també van ser classificades com a no estrogèniques exhibint essencialment el mateix perfil que el control negatiu així com la mateixa proporció de falsos positius.

Les mostres 3, 5, 7, 9 i 11 van ser classificades com a estrogèniques en totes les anàlisis, la mostra 10 en 3 de les 14 determinacions i la mostra 2 en 10 de les 14 anàlisis. La mostra 10 consistia en estradiol 1 nM dissolt en metanol, que equival a una concentració d'estradiol de 100 pM en l'assaig, una concentració que en principi està per sobre del límit de detecció del sistema ER-RYA (34 pM, Noguero *et al.*, 2006a). No obstant això, només 3 dels 14 assaigs van detectar activitat estrogènica en aquesta mostra suggerint que en les condicions de l'exercici el límit de detecció va ser més alt del que s'havia anticipat. La mateixa conclusió es va extreure de les mostres 4, 6, i 8 classificades com a no estrogèniques en la majoria de les seves determinacions. Un increment en el LOD representa un problema ja que significa que les mostres s'han de concentrar més, la qual cosa no és viable ja que implica la utilització de grans volums de mostra. Un altre problema associat a això és que a l'incrementar la concentració de les mostres també s'incrementa la possibilitat d'assolir concentracions tòxiques per al llevat. Per altra banda, els quatre resultats negatius de la mostra 2 van ser considerats falsos negatius, la qual cosa va implicar un índex de falsos negatius del 28%. El fet de què tots els falsos negatius es correspongueren a la mateixa mostra va suggerir que això era degut als efectes de la matriu.

IV.3.1.3. Anàlisi de l'exactitud i precisió

En la Taula IV.11 es mostren els valors mitjans de l'activitat estrogènica determinada en les 11 mostres per tots els grups participants. La major part dels valors van mostrar desviacions estàndards d'ordre similar als valors mitjans. Aquesta aparentment elevada dispersió va ser deguda a uns pocs valors extrems. Quan s'excloïen els valors màxims i mínims de totes les mostres (Taula IV.11, columna "EEQ (nM) excloent valors extrems"), els coeficients de variació van baixar per sota de 0.5 (Taula IV.11, "columna Coeficient de variació (SD/X)"). Els coeficients de variació, també anomenats desviacions estàndards relatives, mostren com de gran és la desviació estàndard respecte la mitjana. Les excepcions van ser les mostres 2 i 10 que van demostrar una gran dispersió dels valors. En el cas de la mostra 2, segurament es tracta d'alguna interferència degut a la gran complexitat de la matriu d'aquesta mostra; mentre que en el cas de la mostra 10, és un problema del límit de detecció ja que aquest no va ser el mateix en tots els grups participants.

Taula IV.11. Activitat estrogènica determinada mitjançant el sistema sensor ER-RYA expressada en EEQ (nM). En aquesta taula també s'indica el nombre de determinacions per a cada mostra analitzada (*n*) i els valors màxims (Valor Màx.) i mínims (Valor Mín.) per a cada determinació. A partir dels EEQ calculats excloent els valors extrems van determinar-se els coeficients de variació (SD/X).

Mostra	<i>n</i>	EEQ (nM)	Valor Màx.	Valor Mín.	EEQ (nM) excloent valors extrems	Coefficient de variació (SD/X)
1	14	0.8±2.8	10.6	0.0	b.d.l	
2	14	20.9±24.1	81.0	0.0	17.6±24.3	1.38
3	14	6.9±3.1	13.0	1.0	7.2±1.6	0.22
4	14	0.2±0.7	2.5	0.0	b.d.l	
5	14	9.1±4.8	18.0	2.9	8.9±4.6	0.45
6	14	0.3±1.1	4.3	0.0	b.d.l	
7	14	8.5±4.0	18.0	3.0	8.2±3.8	0.47
8	14	0.3±1.3	4.8	0.0	b.d.l	
9	14	41.4±47.8	200.0	9.0	30.9±14.0	0.45
10	14	0.3±0.7	2.3	0.0	0.2±0.5	2.35
11	14	8.5±3.9	18.0	3.0	8.1±3.7	0.42

b.d.l: per sota del límit de detecció (*below detection limit*).

IV.3.1.4. Potencial estrogènic relatiu i comparació dels EEQ mesurats vers els valors dels EEQ teòrics

El potencial estrogènic relatiu d'un compost es pot estimar mitjançant diferents proves. Alguns dels valors trobats en la bibliografia (Petrovic *et al.*, 2004; Rutishauser *et al.*, 2004; Folmar *et al.*, 2002; Segner *et al.*, 2003; Körner *et al.*, 2000; Murk *et al.*, 2002; Garcia-Reyero *et al.*, 2004; Legler *et al.*, 2002; Céspedes *et al.*, 2004) es mostren en la Taula IV.12. Tots els valors estan expressats com a EC₅₀ relatives a l'EC₅₀ del 17β-estradiol. Aquest valor es coneix amb el nom de factor d'equivalència a l'estradiol (EEF, *Estradiol Equivalency Factor*). Com es mostra en la Taula IV.12, hi ha una gran discrepància entre els diferents valors estimats, la qual cosa és deguda a què els assaigs utilitzen diferents receptors d'estrògens i diferents elements reporter. Això significa que no existeix un valor universal d'EEF associat a cada compost sinó que aquests valors estan molt relacionats amb l'assaig utilitzat. És per això que no es va poder establir un valor definitiu. En aquest treball per a poder calcular els valors teòrics de l'activitat estrogènica esperada en les mostres analitzades es va decidir utilitzar el valor mitjà.

Taula IV.12. Diferents valors trobats en la bibliografia de la potència estrogènica relativa dels compostos identificats i quantificats en les mostres assajades. Els valors estan expressats en M. S'ha calculat també el valor mitjà per a cada compost.

EEF (M)								
OP	NP	NP ₁ EO	E1	E2	E3	EE2	DES	
1.00x10 ⁻⁰⁵ c)	7.20x10 ⁻⁰⁷ a)	4.00x10 ⁻⁰⁶ c)	0.02 f)	1 c)	0.37 f)	0.18 f)	0.05 f)	
4.88x10 ⁻⁰⁴ g)	1.00x10 ⁻⁰⁴ b)	1.00x10 ⁻⁰⁵ c)	0.10 c)	1 c)	0.0024 d)	1.20 c)	1.10 a)	
6.28x10 ⁻⁰⁴ g)	2.30x10 ⁻⁰⁵ c)	3.80x10 ⁻⁰⁶ c)	0.38 d)	1 c)	0.09732 i)	1.90 a)	2.50 a)	
1.00x10 ⁻⁰⁴ b)	2.50x10 ⁻⁰⁵ d)	7.44x10 ⁻⁰⁶ e)	0.07 c)	1 a)		1.20 c)	2.30 a)	
1.40x10 ⁻⁰⁶ c)	7.50x10 ⁻⁰⁵ d)	1.3x10 ⁻⁰⁵ f)	0.056 c)	1 a)		1.20 h)		
7.80x10 ⁻⁰⁶ d)	1.10x10 ⁻⁰³ d)			1 a)		0.80 c)		
3.30x10 ⁻⁰⁵ d)	5.70x10 ⁻⁰⁴ c)			1 f)		0.70 a)		
5.00x10 ⁻⁰⁵ c)	5.00x10 ⁻⁰⁴ c)			1 h)		0.96 g)		
1.6x10 ⁻⁰⁴ f)	2.33x10 ⁻⁰⁴ e)			1 g)		1.07 g)		
	4.00x10 ⁻⁰⁴ f)					0.82 g)		
						0.40 g)		
						1.90 a)		
Mitjanes	1.64x10⁻⁰⁴	3.03x10⁻⁰⁴	7.65x10⁻⁰⁶	0.125	1.00	0.16	1.03	1.49

En aquesta taula les abreviacions són: NP, Nonilfenol; OP, Octilfenol; NP₁EO, Nonilfenol monoetoxilat; E2, 17β-estradiol; E3, estriol; EE2, 17α-etinilestradiol; DES, dietilestilbestrol; i E1, estrona.

a) Folmar *et al.*, 2002; b) Körner *et al.*, 2000; c) Murk *et al.*, 2002; d) Rutishauser *et al.*, 2004; e) Céspedes *et al.*, 2005; f) Céspedes *et al.*, 2004; g) Segner *et al.*, 2003; h) Legler *et al.*, 2002; i) Blair *et al.*, 2000.

S'ha demostrat en estudis previs (Rutishauser *et al.*, 2004) que l'estrogenicitat dels compostos analitzats presents en les mostres és additiva així que l'activitat estrogènica estimada de cada mostra es pot calcular a partir de la suma dels EEQ teòrics de tots els seus components, els quals, a la seva vegada, s'obtenen a partir del producte de l'EEF per la seva concentració (Fórmula IV.1).

$$EEQ = \sum_i EEF_i \times c_i$$

Fórmula IV.1. Fórmula que permet calcular els EEQ teòrics de les diferents mostres analitzades.

Aquests bioassaigs no proporcionen una caracterització química exacta dels lligands dels receptors nuclears (Beck *et al.*, 2003; Coldham *et al.*, 1997; Gaido *et al.*, 1997; Garcia-Reyero *et al.*, 2004; Rehmann *et al.*, 1999). És per això que s'ha inclòs una comparació dels resultats del RYA amb els resultats de l'anàlisi química de les mostres, la qual cosa va donar una informació valuosa per a l'avaluació de l'assaig. El grup del Dr. Damià Barceló va dur a terme una anàlisi per cromatografia líquida i espectrometria de masses (LC-MS) de totes les mostres estudiades. En el cas dels estàndards, van confirmar-se les concentracions esperades. Per altra banda, l'anàlisi dels extractes de les mostres reals va determinar les concentracions

dels alquilfenols i de les hormones presents en elles. Aquestes concentracions es mostren en la Taula VII.1 de l'Annex I. S'ha de tenir en compte que aquestes mostres van ser concentrades durant la seva preparació. En concret, les mostres 2 i 3 provenien de l'influent i efluent, respectivament, d'una STP de Martorell i van ser concentrades 1667 vegades. La mostra 4 provenia de l'efluent d'una STP d'Igualada i durant la seva preparació va ser concentrada 400 vegades. Per tant, les concentracions reals en les mostres de les aigües residuals d'Igualada i Martorell eren 1667 i 400 vegades més baixes, respectivament. Els nivells de les concentracions dels alquilfenols i de les hormones en les mostres reals va ser confirmat en estudis previs (González *et al.*, 2004).

En la Taula IV.13 es mostren els valors d'activitat estrogènica teòrica calculats per a les diferents mostres reals analitzades. Aquests valors estan expressats en EEQ (nM) i van ser estimats a partir del sumatori dels equivalents teòrics de tots els grups de compostos químics presents que, a la seva vegada, van ser calculats a partir del producte de l'EEF per la concentració de compost (Fórmula IV.1).

Taula IV.13. Activitat estrogènica teòrica estimada en les mostres reals. Els valors s'han expressat com a EEQ en nM.

	EEQ teòrics (nM)		
	Alquilfenols	Hormones	Total
Mostra 2	89.1	12.6	101.70
Mostra 3	2.45	3.34	5.79
Mostra 4	1.07	b.d.l	1.07
Mostra 5	1.07	5.29	6.36
Mostra 6	2.07	b.d.l	2.07
Mostra 7	2.07	5.29	7.36

b.d.l: per sota del límit de detecció (*below detection limit*).

Quatre estàndards van ser inclosos en l'estudi (mostres 8, 9, 10 i 11). Els estàndards contenien concentracions conegudes de NP, Genisteïna i 17 β -estradiol. En el cas de les mostres 8 (solució estàndard de nonilfenol 5 μ M), 9 (solució estàndard de Genisteïna 200 μ M) i 11 (solució estàndard de 17 β -estradiol 10 nM) s'esperava una clara resposta positiva, mentre que la mostra 10 (solució estàndard de 17 β -estradiol 1 nM) es va analitzar a una concentració propera al LOD.

En la Taula IV.14 es poden veure els valors d'estrogenicitat mesurats (Taula IV.14, columna "EEQ mesurats") i esperats (Taula IV.14, columna "EEQ teòrics") per als quatre estàndards inclosos. Els valors mesurats per a les mostres 9 i 11 van ser propers als valors esperats, calculats a partir de les seves concentracions multiplicades per l'EEF, és a dir, pel quocient entre l'EC₅₀ del 17 β -estradiol i l'EC₅₀

del compost (Garcia-Reyero *et al.*, 2004; Bovee *et al.*, 2005). Ni el 17 β -estradiol 1 nM (mostra 10) ni el NP 5 μ M (mostra 8) van presentar resposta en la majoria de les determinacions, corroborant l'increment en el límit de detecció de l'assaig. No obstant això, s'ha de precisar que les tres determinacions positives de l'activitat estrogènica de la mostra 10 van mesurar la seva estrogènicitat real amb una bona precisió.

Taula IV.14. Activitat estrogènica mesurada i teòrica en EEQ (nM) per als quatre estàndards inclosos en l'assaig: mostra 8, solució estàndard de nonilfenol 5 μ M; mostra 9, solució estàndard de Genisteïna 200 μ M; mostra 10, solució estàndard de 17 β -estradiol 1 nM; i mostra 11, solució estàndard de 17 β -estradiol 10 nM.

Estàndard	Mostra	EEQ mesurats (nM) (extrems exclosos)	EEQ teòrics (nM)
Nonilfenol 5 μ M	8	b.d.l	4.2 ^{a)}
Genisteïna 200 μ M	9	30.9 \pm 14.0	20.9 ^{b)}
Estradiol 1 nM	10	0.2 \pm 0.5	1
Estradiol 10 nM	11	8.1 \pm 3.7	10

^{a)} EEQ teòrics calculats a partir de Garcia-Reyero *et al.*, 2004.

^{b)} EEQ teòrics calculats a partir de Noguerol *et al.*, 2006a.

b.d.l: per sota del límit de detecció (*below detection limit*).

En la Figura IV.24 s'ha traçat un gràfic relacionant els equivalents mesurats amb els equivalents teòrics calculats per a les diferents mostres.

	EEQ mesurats (nM)	EEQ teòrics (nM)
Mostra 1	b.d.l	0
Mostra 2 ^{a)}	17.6	101.7
Mostra 3	7.2	5.79
Mostra 4	b.d.l	1.07
Mostra 5	8.9	6.36
Mostra 6	b.d.l	2.07
Mostra 7	8.2	7.36
Mostra 8	b.d.l	4.2
Mostra 9	30.9	20.9
Mostra 10	0.2	1
Mostra 11	8.1	10

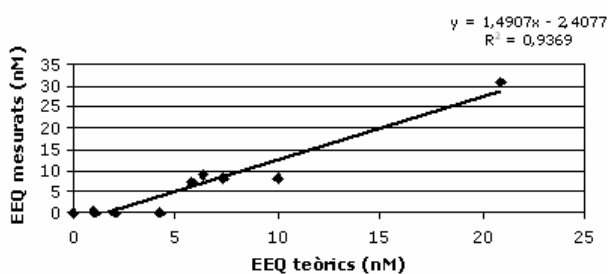


Figura IV.24. Comparació dels EEQ mesurats amb el sistema ER-RYA amb els EEQ teòrics per a les diferents mostres analitzades. Els valors per sota del límit de detecció van fixar-se en 0 per tal de facilitar el traçat del gràfic.

^{a)} Aquesta mostra està fora d'escala i s'ha eliminat del gràfic. Tampoc s'ha tingut en compte en la regressió.

b.d.l: per sota del límit de detecció (*below detection limit*).

Es va trobar una correlació significativa entre els resultats del RYA i l'activitat estrogènica estimada calculada a partir de les dades de la composició química de les mostres i el potencial relatiu dels compostos. No obstant això, l'activitat

estrogènica estimada s'ha de considerar amb moltes reserves. Una de les raons per a explicar això és que els valors de la bibliografia per als potencials estrogènics relatius en alguns casos varien més d'un factor de 1000 d'un estudi a un altre. Per a calcular aquests valors amb més exactitud, seria convenient determinar els potencials estrogènics dels compostos sota les mateixes condicions d'assaig. Una altra raó és que només es van tenir en compte certs compostos però és possible que les mostres reals presentin altres compostos estrogènics sense identificar. Les mostres 4, 6 i 8 van ser classificades com a no estrogèniques i només una determinació de les 14 anàlisis les va identificar com a estrogèniques. Malgrat això, a partir del càlcul dels EEQ teòrics, aquestes mostres finalment van ser considerades falsos negatius.

IV.3.1.5. Efectes de la matriu

Les mostres de la 2 a la 7 es corresponen a mostres reals que provenen d'extractes de STPs situades en les rodalies de Barcelona. En concret, les mostres 2 i 3 són extractes de les aigües de l'influent i de l'efluent, respectivament, d'una STP de Martorell, mentre que la mostra 4 es correspon a l'efluent de les aigües d'una SPT d'Igualada. Les localitzacions i els resultats anteriors d'aquestes SPTs han estat publicats prèviament (Céspedes *et al.*, 2005). Per altra banda, les mostres 5, 6 i 7 es corresponen a unes alíquotes de la mostra 4 (efluent de les aigües de la SPT d'Igualada) fortificades respectivament amb 10 nM de 17 β -estradiol, 5 μ M de NP i una combinació d'ambdós.

Les mostres 5 (mostra 4 fortificada amb 17 β -estradiol 10 nM) i 7 (mostra 4 fortificada amb 17 β -estradiol 10 nM i nonilfenol 5 μ M) van mostrar valors d'activitat estrogènica molt similars als observats en la mostra 11, que és l'estàndard de 17 β -estradiol 10 nM, indicant que ni la matriu de la mostra 4 ni la presència del NP en la mostra 7 van influenciar en l'anàlisi (Taula IV.11). Els resultats de la mostra 6 (mostra 4 fortificada amb nonilfenol 5 μ M) van corroborar la troballa de què una concentració de 5 μ M de NP era imperceptible en les condicions assajades en aquest exercici (Figura IV.22, Taula IV.11). En resum, es pot dir que el RYA va detectar de manera reproducible els estrògens endògens (mostra 3) o afegits (mostres 5 i 7) en mostres complexes naturals. Així doncs, aquests resultats van mostrar una gran capacitat del RYA per a detectar estrogenicitat en mostres reals complexes. L'única excepció va ser la mostra 2, que va presentar una gran dispersió de valors en diferents determinacions (Figura IV.22, Taula IV.11). Aquesta mostra era la més complexa ja que era la que contenia una major càrrega química.

IV.3.1.6. Recomanacions per a incrementar la reproductibilitat i la robustesa de l'anàlisi

Van suggerir-se les següents recomanacions amb la finalitat d'incrementar la reproductibilitat i la robustesa de l'anàlisi:

- Introducció de més sèries repetides per a corroborar els valors d'estrogenicitat.
- Utilització de factors de dilució més petits (en el protocol va proposar-se un factor de dilució 1:3) per a augmentar l'exactitud en les determinacions d'estrogenicitat.
- Estimació dels EEF en el mateix estudi per a millorar la comparació amb els resultats de l'anàlisi química.

IV.3.2. Intercalibrat 2

IV.3.2.1. Introducció de millores per a incrementar la reproductibilitat i la robustesa de l'anàlisi

Es va repetir l'experiència anterior aplicant les millores proposades. D'aquesta manera, 4 laboratoris europeus, incloent el nostre, van analitzar 6 sèries d'11 mostres cadascuna codificades aleatòriament. En aquest cas, però, no va proporcionar-se ni un protocol detallat ni una soca de llevat concreta, sinó que interessava comparar els resultats obtinguts per diferents laboratoris, és a dir, diferents operadors, cadascun amb el protocol que utilitzés rutinàriament i amb el seu propi sistema de bioassaig amb llevats. S'havia d'analitzar una sèrie per setmana amb cultius diferents per a assegurar que la variabilitat intra-laboratori també es tenia en compte. Per tal de garantir la reproductibilitat i la robustesa de l'assaig, cada laboratori va ser proveït amb una solució estàndard de 17 β -estradiol amb una concentració coneguda. També van enviar-se solucions estàndards de concentració coneguda de NP i Genisteïna per a aconseguir una millor estimació del seu potencial estrogènic. Aquest treball ha estat enviat a publicar (Brix *et al.*, enviat a publicar). En aquesta tesi s'han inclòs els resultats més rellevants realitzats per la Dra. Rikke Brix per a explicar les conclusions relacionades amb els resultats obtinguts per RYA.

IV.3.2.2. Descripció dels resultats

Va fer-se una primera avaluació dels resultats comparant les respostes mesurades en la mostra 1 que contenia el 17 β -estradiol 10 nM. Els resultats que van obtenir-se estan expressats en la Taula IV.15.

Taula IV.15. Activitat estrogènica expressada en EEQ (nM) determinada en la mostra 1 (17 β -estradiol 10 nM) pels diferents laboratoris participants.

	EEQ mesurats (nM)
Laboratori 1	13.21
Laboratori 2	2.41
Laboratori 3	9.19
Laboratori 4	8.50

Està clar que un laboratori (laboratori 2) va obtenir un valor clarament més baix que la resta de laboratoris participants. Aquesta resposta del laboratori 2, sobre un factor de 4 més baix del que s'esperava, també podia observar-se en les anàlisis de les solucions estàndards de concentració coneguda. Així doncs, per a corregir possibles errors constants, tots els valors mesurats van ser multiplicats per un factor de correcció calculat a partir de l'anàlisi de la solució estàndard de 17 β -estradiol. Això va donar lloc a una gran millora en la consistència de les dades de manera que es va poder recomanar com una garantia de qualitat del mètode.

En la Taula IV.16 es mostren tots els valors d'activitat estrogènica determinats per tots els grups participants expressats en EEQ (nM). Els valors en negreta van considerar-se valors extrems i van eliminar-se per al posterior tractament de les dades.

Taula IV.16. Activitat estrogènica mesurada expressada com a EEQ (nM).

	Laboratori 1						Laboratori 2						Laboratori 3						Laboratori 4					
	A	B	C	D	E	F	A	B	C	D	E	F	A	B	C	D	E	F	A	B	C	D	E	F
Mostra 1	13.72	14.90	3.09	8.31	6.48	13.06	10.74	13.04	6.81	11.96	6.06	7.36	11.11	8.90	14.47	11.97	5.20	5.01	7.10	13.20	9.00	13.70	12.10	7.70
Mostra 2	8.68	16.95	4.12	8.12	9.31	9.91	19.16	11.98	10.54	9.87	6.95	12.20	14.33	10.71	16.32	17.66	10.36	21.58	12.50	12.90	14.40	13.30	17.40	18.80
Mostra 3	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l	0.12	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l
Mostra 4	22.53	22.09	13.24	6.50	19.07	29.90	9.01	11.98	5.16	8.90	6.32	5.63	14.39	8.08	9.51	27.45	17.96	9.59	19.90	23.50	25.20	26.60	23.30	19.60
Mostra 5	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l	1.04	b.d.l	b.d.l	b.d.l	0.61	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l
Mostra 6	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l	1.23	b.d.l	b.d.l	1.14	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l
Mostra 7	5.87	6.56	1.58	3.62	3.57	5.79	2.35	1.48	0.88	1.13	1.00	0.45	5.44	5.61	8.33	4.37	2.32	7.32	10.40	b.d.l	7.00	b.d.l	6.10	12.20
Mostra 8	20.64	17.44	5.08	8.46	7.06	9.20	7.88	5.38	9.88	6.56	3.43	4.89	13.91	10.18	23.95	11.80	11.09	19.14	10.90	17.10	13.40	16.20	16.80	17.40
Mostra 9	5.42	6.91	6.36	3.23	5.61	4.43	0.99	1.16	1.2	1.17	0.41	0.28	5.80	4.73	6.27	4.787	3.04	5.21	7.80	b.d.l	8.40	6.60	9.40	2.00
Mostra 10	16.64	30.71	7.40	6.57	10.71	11.04	5.68	3.86	7.09	6.75	4.67	2.95	15.60	18.62	17.58	12.62	6.36	17.89	14.30	13.60	13.20	14.20	14.60	17.40
Mostra 11	26.40	17.54	11.44	7.01	10.52	12.92	11.90	9.38	10.95	12.59	5.29	5.82	22.00	20.26	20.43	29.49	13.70	18.21	15.80	17.30	15.80	20.00	20.70	19.40

Les mostres estan codificades de la següent manera: 1, Solució estàndard de 17β-estradiol 10 nM; 2, Solució estàndard de 17β-estradiol 15 nM; 3, Metanol (Blanc); 4, Solució estàndard de Genisteïna 100 µM; 5, Solució estàndard de nonilfenol 50 µM; 6, Solució estàndard de nonilfenol 100 µM; 7, Effluent d'una STP de Martorell; 8, Mostra 7 fortificada amb 17β-estradiol 10 nM; 9, Mostra 7 fortificada amb amb nonilfenol 50 µM; 10, Mostra 7 fortificada amb 17β-estradiol 10 nM i nonilfenol 50 µM; i 11, Mostra 7 fortificada amb 17β-estradiol 15 nM. Els resultats en negreta van ser considerats valors extrems.
b.d.l.: per sota del límit de detecció (*below detection limit*).

IV.3.2.3. Anàlisi de falsos positius i negatius

Després d'eliminar els valors extrems es va determinar l'índex de falsos positius i falsos negatius. Una mostra dissenyada per a determinar l'índex de falsos positius que en teoria no havia de donar cap resposta estrogènica, el metanol, va ser inclosa en l'assaig. Després d'eliminar els valors extrems no hi va haver cap resposta positiva falsa per a aquesta mostra que es va classificar com a no estrogènica en totes les determinacions. Pel que fa a l'índex de falsos negatius, aquest va dependre de la sensibilitat de l'assaig utilitzat. La Taula IV.17 mostra els valors dels LOD del 17 β -estradiol per als diferents laboratoris participants.

Taula IV.17. Límit de detecció en nM del 17 β -estradiol determinat pels quatre laboratoris participants.

	LOD (nM)
Laboratori 1	2.5
Laboratori 2	0.034
Laboratori 3 ^{a)}	1.09 (0.31-2.7)
Laboratori 4	≤0.1

^{a)} En el cas del laboratori 3 el LOD del 17 β -estradiol variava en cada placa. En aquest estudi es va determinar entre 0.31 i 2.7 nM amb una mitjana de 1.09.

Amb aquests valors de LOD no hauria d'haver cap problema per a detectar estrogènicitat en totes les mostres, a excepció del blanc (metanol) i del NP. El laboratori 4, però, no va detectar activitat estrogènica en 3 determinacions de les mostres reals teòricament estrogèniques (mostres 7 i 9), la qual cosa va implicar 3 falsos negatius per a les mostres reals.

Per altra banda, només els laboratoris 1 i 3 haurien de mostrar sensibilitat per a l'estàndard de concentració coneguda de NP (veure més endavant). No obstant això, en el cas del laboratori 1 utilitzant els EEF calculats per aquest laboratori (més endavant) s'esperava trobar una resposta de 0.63 nM per a la mostra 5 (NP 50 μ M) i de 1.26 nM per a la mostra 6 (NP 100 μ M), ambdós valors per sota del LOD (2.5 nM, Taula IV.17) de manera que els resultats mesurats (b.d.l, Taula IV.16) van ser els esperats. En el cas del laboratori 3, a partir dels valors dels EEF (més endavant) s'esperava una resposta de 0.16 nM per a la mostra 5 (NP 50 μ M) i de 0.32 nM per a la mostra 6 (NP 100 μ M), ambdós valors molt propers o menors al LOD calculat per aquest laboratori (0.31-2.7 nM, Taula IV.17) de manera que els resultats obtinguts es van correspondre amb els mesurats de la Taula IV.16. Així que en conclusió no es poden esperar respostes positives per a les mostres 5 (NP 50 μ M) i 6 (NP 100 μ M) de manera que els únics resultats realment falsos negatius van ser les 3 determinacions positives en mostres reals dutes a terme pel laboratori 4.

IV.3.2.4. Variació intra i inter-laboratoris

Per a les 11 mostres de les 6 sèries van calcular-se els següents paràmetres: valor mitjà (X), desviació estàndard (SD) i coeficient de variació (SD/X). La Taula IV.18 mostra tots aquests paràmetres estadístics per a cada laboratori participant junt amb els paràmetres totals calculats a partir de la consideració dels valors de tots els laboratoris (Taula IV.18, columna "Tots els laboratoris"). Les desviacions estàndards entre els diferents laboratoris (inter-laboratoris) van variar entre 0 i 7.9 nM (Taula IV.18, columna "Tots els laboratoris SD") mentre que les desviacions estàndards relatives o coeficients de variació expressats en percentatge van variar entre 0 i 72.5% (Taula IV.18, columna "Tots els laboratoris SD/X (%)").

Taula IV.18. Paràmetres estadístics de les diferents mostres analitzades per cada grup participant i considerant totes les dades com a conjunt (columna "Tots els laboratoris"). Els valors estan expressats en nM.

	Tots els laboratoris			Laboratori 1			Laboratori 2			Laboratori 3			Laboratori 4		
	X	SD	SD/X (%)	X	SD	SD/X (%)	X	SD	SD/X (%)	X	SD	SD/X (%)	X	SD	SD/X (%)
Mostra 1	9.8	3.4	35.2	9.9	4.7	47.3	9.3	3.0	31.6	9.4	3.8	40.3	10.5	2.9	27.6
Mostra 2	12.8	4.3	33.6	9.5	4.2	43.9	11.8	4.1	34.6	15.2	4.3	28.3	14.9	2.6	17.4
Mostra 3	0	0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Mostra 4	16.1	7.9	49.1	18.9	8.1	43.0	7.8	2.6	33.3	14.5	7.3	50.7	23.0	2.8	12.1
Mostra 5	0	0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.4	162.5	0.0	0.0	0.0
Mostra 6	0	0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.6	155.1	0.0	0.0	0.0
Mostra 7	3.7	2.7	72.5	4.5	1.9	42.1	1.2	0.6	53.3	5.6	2.1	38.3	4.7	4.6	97.3
Mostra 8	12	5.6	46.6	11.3	6.2	55.1	6.3	2.3	36.3	15.0	5.4	36.2	15.3	2.6	17.0
Mostra 9	4.2	2.8	66.4	5.3	1.3	25.0	0.9	0.4	47.5	5.0	1.1	22.5	5.7	3.8	67.1
Mostra 10	11.3	5.1	44.8	10.5	4.0	37.9	5.2	1.6	31.6	14.0	4.8	34.0	14.5	1.5	10.3
Mostra 11	14.5	5.1	35.1	11.9	3.8	32.3	9.3	3.1	33.4	18.9	3.2	17.0	18.2	2.1	11.8

En aquesta taula X representa el valor mitjà de totes les determinacions; SD, les desviacions estàndards; i SD/X, els coeficients de variació (expressats en percentatge). Es mostren els valors per a cada laboratori i els valors dels paràmetres totals calculats a partir de la consideració dels valors de tots els laboratoris.

Les dades van mostrar que la variació entre laboratoris (variació inter-laboratoris) va ser comparable a la variació dins d'un mateix laboratori (variació intra-laboratori) i, a més, aquesta variació intra-laboratori estava en el mateix ordre de magnitud per a tots els laboratoris participants. Així doncs, no van trobar-se diferències entre el funcionament dels diferents laboratoris. No obstant això, es va continuar observant una gran variació i, per tant, treballs futurs haurien d'incloure controls de qualitat per a assegurar que el sistema funciona correctament en tot moment.

Els assaigs basats en la utilització de llevats són assaigs biològics i com a tals tenen una gran variació inherent. Uns coeficients de variació grans representen un problema ja que es requeriria una gran quantitat de repeticions per a cerciorar que

la determinació fos la correcta. Com que no hi ha estudis d'inter-laboratoris amb bioassaigs basats en llevats publicats prèviament, no és possible comparar amb resultats d'altres estudis.

IV.3.2.5. Potencial estrogènic relatiu

El potencial estrogènic relatiu d'un compost es pot estimar mitjançant diferents proves. Com s'ha explicat abans, hi ha una gran discrepància entre els diferents valors dels EEF estimats. És per això que en aquest treball cada laboratori participant va determinar el potencial estrogènic del NP i de la Genisteïna a partir de l'anàlisi de les solucions estàndards de concentració coneguda. És evident que, fins i tot utilitzant tan sols bioassaigs basats en llevats, hi va haver una gran variació en les determinacions d'aquest valor. Mentre que hi va haver diferències d'un factor de 10 entre els valors determinats pels laboratoris 1 (1.26×10^{-5}) i 3 (3.30×10^{-6}), els laboratoris 2 i 4 no van detectar estrogenicitat associada al NP. Tot i que els laboratoris 1 i 3 van utilitzar el mateix protocol, van trobar-se diferències significatives en les determinacions dels valors dels EEF del NP i la Genisteïna, la qual cosa corroborava la necessitat de què cada laboratori estimés els EEF de tots els compostos per tal d'aconseguir una millor correlació amb els valors mesurats.

De la mateixa manera que abans, el grup del Dr. Damià Barceló va dur a terme una anàlisi per LC-MS de totes les mostres estudiades (Taula VII.2 de l'Annex I). S'ha de tenir en compte que aquestes mostres van ser concentrades i, per tant, les concentracions reals en les mostres de les aigües residuals eren 400 vegades més baixes. Els nivells de les concentracions dels alquilfenols i les hormones en les mostres reals havia estat confirmat en estudis previs (González *et al.*, 2004).

A partir de la determinació química de les concentracions dels alquilfenols i hormones presents en les mostres (Taula VII.2 de l'Annex I) i tenint en compte la Fórmula IV.1, va estimar-se l'activitat estrogènica teòrica de les diferents mostres analitzades. En la Figura IV.25 s'ha traçat un gràfic relacionant els equivalents mesurats amb els equivalents teòrics calculats per a les diferents mostres. La figura mostra una correlació significativa entre els valors teòrics i els mesurats.

	EEQ mesurats (nM)	EEQ teòrics (nM)
Mostra 1	9.8	10
Mostra 2	12.8	15
Mostra 3	b.d.l	0
Mostra 4 ^{a)}	16.1	3.73
Mostra 5	b.d.l	0.22
Mostra 6	b.d.l	0.43
Mostra 7	3.7	5.57
Mostra 8	12	15.57
Mostra 9	4.2	5.79
Mostra 10	11.3	16.31
Mostra 11	14.5	20.57

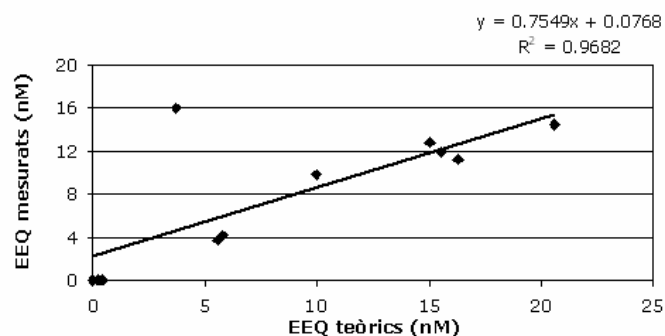


Figura IV.25. Comparació dels EEQ mesurats amb el sistema ER-RYA amb els EEQ teòrics estimats per a les diferents mostres analitzades. Els valors per sota del límit de detecció van fixar-se en 0 per tal de facilitar el traçat del gràfic.

^{a)} Aquesta mostra no s'ha tingut en compte en la regressió.

b.d.l: per sota del límit de detecció (*below detection limit*).

Dels estudis anteriors es va observar que els resultats obtinguts amb els bioassaigs basats en la utilització de llevats van mostrar una correlació positiva significativa amb els valors teòrics esperats estimats a partir de l'anàlisi química. Aquesta anàlisi es pot utilitzar com un *screening* preliminar de les mostres d'aigua i així eliminar de manera ràpida aquelles que no presentin resposta i només realitzar l'anàlisi química de les mostres restants. És difícil predir les conseqüències en termes de benefici econòmic que això implicarà, però no hi ha dubte de què resultarà en una gran reducció del cost total.

IV.3.2.6. Discussió general

De la mateixa manera que abans, van avaluar-se la robustesa i la reproductibilitat de l'assaig. En aquest cas, l'estudi va resultar en només 3 falsos negatius i cap fals positiu en les mostres reals. Es va demostrar la importància d'una calibració interna amb 17 β -estradiol, al no existir uns valors estàndards de referència, per tal de garantir una millor reproductibilitat en termes inter-laboratori. A més, l'estudi també va demostrar la necessitat d'estimar els EEF de tots els compostos presents per a obtenir una correlació significativa amb els valors mesurats per RYA. No obstant això, es va continuar observant una gran variació i, per tant, treballs futurs haurien d'incloure controls de qualitat per a assegurar que el sistema funciona correctament en tot moment. Per altra banda, va demostrar-se que el RYA va ser capaç de donar més que una resposta qualitativa respecte la presència de compostos estrogènics. Va mostrar-se una correlació significativa entre els valors teòrics esperats calculats a partir de l'anàlisi química dels compostos estrogènics identificats i l'estrogenicitat mesurada per RYA, la qual cosa va donar suport a la

seva aplicabilitat. Amb una optimització dels mètodes que conduís a una reducció de la variabilitat intra i inter-laboratori, aquests bioassaigs es podrien utilitzar com una eina independent per a la determinació d'estrogenicitat.

IV.4. MONITORITZACIÓ DE L'ACTIVITAT ESTROGÈNICA EN AIGÜES RESIDUALS I DELS PRODUCTES DE LA SEVA DESACTIVACIÓ ENZIMÀTICA

IV.4.1. Valoració per RYA de l'eliminació de l'activitat estrogènica després del tractament de mostres d'aigua residual per depuradores

IV.4.1.1. Estudi de l'Estació Depuradora d'Aigües Residuals de Terrassa

Els procediments de bioassaigs dirigits per fraccionament i identificació química que combinen el fraccionament químic de mostres complexes i la identificació per anàlisis químiques de compostos actius amb l'*screening* de les fraccions individuals per mètodes bioanalítics (Brack, 2003; Thomas *et al.*, 1999; Desbrow *et al.*, 1998) representen una millora en la monitorització de matrius complexes com ara aigües de depuradores.

Aquest procediment va aplicar-se en una sèrie de mostres agafades en 7 dies consecutius, del 27 de març al 2 d'abril del 2006, tant a l'entrada (influent) com a la sortida (efluent) de l'Estació Depuradora d'Aigües Residuals (EDAR) de Terrassa. L'EDAR de Terrassa se situa en la zona de les Fonts, en el marge dret de la riera de Rubí. Aquestes mostres van ser sotmeses pel grup de la Dra. Sílvia Lacorte a un fraccionament químic amb diferents solvents obtenint-se tres fraccions (Fracció I, Fracció II i Fracció III) cadascuna amb una sèrie de compostos químics diferents. En la Fracció I van obtenir-se els compostos menys solubles en aigua i amb concentracions més elevades. Aquesta Fracció I va ser analitzada i quantificada per cromatografia de gasos i espectrometria de masses (GC-MS) determinant-se la presència de NP i dos derivats seus, el NP₁E0 i el NP₂E0. La cromatografia líquida i espectrometria de masses/masses (LC-MS/MS) va ser utilitzada per a les Fraccions II i III a on es trobaven els compostos solubles en aigua i amb concentracions més baixes. En concret, en la Fracció II van obtenir-se el BPA i les hormones esteroidees (E1, E2, E3 i EE2) i en la Fracció III les hormones conjugades, productes que s'obtenen per biotransformació.

Nosaltres vam ser els encarregats de la determinació de l'estrogenicitat per RYA amb el sistema ER-RYA de les diferents fraccions obtingudes i quantificades pel grup de la Dra. Sílvia Lacorte. En la Taula IV.19 es mostren els EEQ determinats en cada fracció.

Taula IV.19. Taula resum dels EEQ determinats amb el sistema ER-RYA. Les dades estan expressades en equivalents d'estradiol (pM) amb un interval de confiança del 95%.

			EEQ mesurats (pM)		
			Mostres Fracció I	Mostres Fracció II	Mostres Fracció III
Mostres Efluent	27-03-06	Dilluns	8.24 (6.89-9.86)	b.d.l	b.d.l
	28-03-06	Dimarts	6.70 (4.98-9.02)	2.84 (1.61-5.03)	b.d.l
	29-03-06	Dimecres	11.67 (10.80-12.62)	b.d.l	b.d.l
	30-03-06	Dijous	10.70 (6.26-18.28)	n.d	b.d.l
	31-03-06	Divendres	3.21 (2.55-4.06)	b.d.l	b.d.l
	04-01-06	Dissabte	2.92 (2.53-3.37)	b.d.l	b.d.l
	04-02-06	Diumenge	3.48 (3.20-3.79)	n.d	b.d.l
Mostres Influent	27-03-06	Dilluns	52.00 (26.14-103.43)	b.d.l	b.d.l
	28-03-06	Dimarts	59.04 (34.51-101.00)	7.01 (5.55-8.85)	b.d.l
	29-03-06	Dimecres	82.42 (39.51-171.95)	n.d	b.d.l
	30-03-06	Dijous	46.21 (33.53-63.69)	b.d.l	b.d.l
	31-03-06	Divendres	91.24 (62.61-134.93)	n.d	b.d.l
	04-01-06	Dissabte	21.82 (16.07-29.64)	9.65 (7.00-13.30)	b.d.l
	04-02-06	Diumenge	55.47 (33.22-92.60)	n.d.	b.d.l

b.d.l: per sota del límit de detecció (*below detection limit*).

n.d: no determinat per mostra insuficient.

Només es va detectar activitat en les mostres que es corresponien a la Fracció I (la dels alquilfenols) i en 3 mostres de la Fracció II, tot i això, la resposta observada era molt baixa. En aquest moment es va deduir que segurament les concentracions dels compostos identificats en les Fraccions I i II es trobaven al voltant del LOD així que es va decidir estudiar les dades químiques obtingudes pel grup de la Dra. Sílvia Lacorte. En la Taula VII.3 de l'Annex II es mostren les concentracions presents en els vials analitzats per RYA dels diferents compostos identificats en les mostres de les Fraccions I i II, les úniques que van presentar una certa estrogenicitat per RYA.

Es va veure que les concentracions dels compostos quantificats es trobaven al voltant o per sota del LOD (Taula IV.20) i, per tant, en principi eren indetectables amb aquest sistema. Cal tenir en compte que aquestes concentracions es corresponen a les concentracions presents en els vials de les mostres analitzades per RYA i que en el protocol del RYA la dilució d'assaig més petita es correspon a un factor 1:10 de la concentració present en el vial, per tant, encara es dilueix més la mostra. Degut a això, les mostres van haver de ser concentrades mitjançant evaporació. Això, però, va afegir un cert component d'incertesa a les dades i va posar de manifest que l'aplicabilitat d'aquest protocol era dubtosa.

Taula IV.20. Límits de detecció (en ng/l) dels compostos químics presents en les Fraccions I i II (Céspedes *et al.*, 2004).

Compostos	NP	NP ₁ EO	NP ₂ EO	BPA	E1	E2	E3	EE2
LOD (ng/l)	19.8x10 ³	748.63 x10 ³	b.d.l	490.32x10 ³	533.9	10	27.4	53.8

En aquesta taula les abreviacions són: NP, nonilfenol; NP₁EO, nonilfenol monoetoxilat; NP₂EO, nonilfenol dietoxilat; BPA, bisfenol A; E1, estrona; E2, 17β-estradiol; E3, estriol; i EE2, 17α-etinilestradiol.

b.d.l: per sota del límit de detecció (*below detection limit*).

En les Taules IV.21 i IV.22 es mostren els EEQ teòrics totals i els EEQ mesurats amb el sistema ER-RYA de les Fraccions I i II. Els EEQ teòrics totals es van estimar a partir del sumatori dels equivalents teòrics calculats per a tots els compostos químics presents.

Taula IV.21. Taula resum dels EEQ teòrics estimats a partir de les concentracions de NP, NP₁EO i NP₂EO i dels EEQ determinats amb el sistema ER-RYA per a cada mostra de la Fracció I. Les dades estan expressades en equivalents d'estradiol (pM) amb un interval de confiança del 95%. Els EEQ teòrics es van calcular a partir del producte de la concentració del compost pel seu EEF.

MOSTRES FRACCIÓ I	EEQ teòrics (pM) ^{a)}			EEQ teòrics totals (pM)	EEQ mesurats (pM)	
	NP	NP ₁ EO	NP ₂ EO			
Mostres Efluent	27-03-06 Dilluns	3.70	0.38	b.d.l	4.08	8.24 (6.89-9.86)
	28-03-06 Dimarts	b.d.l	0.56	b.d.l	0.56	6.70 (4.98-9.02)
	29-03-06 Dimecres	b.d.l	0.70	b.d.l	0.70	11.67 (10.80-12.62)
	30-03-06 Dijous	b.d.l	0.32	b.d.l	0.32	10.70 (6.26-18.28)
	31-03-06 Divendres	1.93	0.65	b.d.l	2.58	3.21 (2.55-4.06)
	04-01-06 Dissabte	10.64	0.43	b.d.l	11.07	2.92 (2.53-3.37)
	04-02-06 Diumenge	0.55	0.46	b.d.l	1.01	3.48 (3.20-3.79)
Mostres Influent	27-03-06 Dilluns	54.50	>1.06	b.d.l	>55.56	52.00 (26.14-103.43)
	28-03-06 Dimarts	56.47	>1.06	b.d.l	>57.53	59.04 (34.51-101.00)
	29-03-06 Dimecres	44.01	>1.06	b.d.l	>45.06	82.42 (39.51-171.95)
	30-03-06 Dijous	48.56	>1.06	b.d.l	>49.62	46.21 (33.53-63.69)
	31-03-06 Divendres	57.56	>1.06	b.d.l	>58.62	91.24 (62.61-134.93)
	04-01-06 Dissabte	51.53	>1.06	b.d.l	>52.59	21.82 (16.07-29.64)
	04-02-06 Diumenge	30.18	>1.06	b.d.l	>31.24	55.47 (33.22-92.60)

En aquesta taula les abreviacions són: NP, nonilfenol; NP₁EO, nonilfenol monoetoxilat; i NP₂EO, nonilfenol dietoxilat.

^{a)} EEQ teòrics calculats a partir de Céspedes *et al.*, 2004.

b.d.l: per sota del límit de detecció (*below detection limit*).

Taula IV.22. Taula resum dels EEQ teòrics estimats a partir de les concentracions del BPA i de les hormones. També es mostren els EEQ determinats amb el sistema ER-RYA per a cada mostra de la Fracció II. Les dades estan expressades en equivalents d'estradiol (pM) amb un interval de confiança del 95%. Els EEQ teòrics es van calcular a partir del producte de la concentració del compost pel seu EEf.

MOSTRES FRACCIÓ II			EEQ teòrics (pM) ^{a)}					EEQ teòrics totals (pM)	EEQ mesurats (pM)
			BPA	E1	E2	E3	EE2		
Mostres Efluent	27-03-06	Dilluns	0.002	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l	0.002	b.d.l
	28-03-06	Dimarts	0.01	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l	0.01	2.84 (1.61-5.03)
	29-03-06	Dimecres	0.02	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l	0.02	b.d.l
	30-03-06	Dijous	0.01	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l	0.01	n.d
	31-03-06	Divendres	0.03	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l	0.03	b.d.l
	04-01-06	Dissabte	0.01	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l	0.01	b.d.l
	04-02-06	Diumenge	0.001	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l	0.001	n.d
	27-03-06	Dilluns	b.d.l	b.d.l	b.d.l	8.30	b.d.l	8.30	b.d.l
Mostres Influent	28-03-06	Dimarts	0.15	0.39	b.d.l	20.57	b.d.l	21.11	7.01 (5.55-8.85)
	29-03-06	Dimecres	0.18	b.d.l	b.d.l	10.90	b.d.l	11.08	n.d
	30-03-06	Dijous	0.26	0.50	b.d.l	3.91	b.d.l	4.67	b.d.l
	31-03-06	Divendres	0.09	b.d.l	b.d.l	3.80	b.d.l	3.89	n.d
	04-01-06	Dissabte	0.15	0.29	b.d.l	19.13	b.d.l	19.57	9.65 (7.00-13.30)
	04-02-06	Diumenge	0.07	0.45	b.d.l	9.10	b.d.l	9.62	n.d.

En aquesta taula les abreviacions són: BPA, bisfenol A; E1, estrona; E2, 17 β -estradiol; E3, estriol; i EE2, 17 α -etinilestradiol.

^{a)} EEQ teòrics calculats a partir de Céspedes *et al.*, 2004.

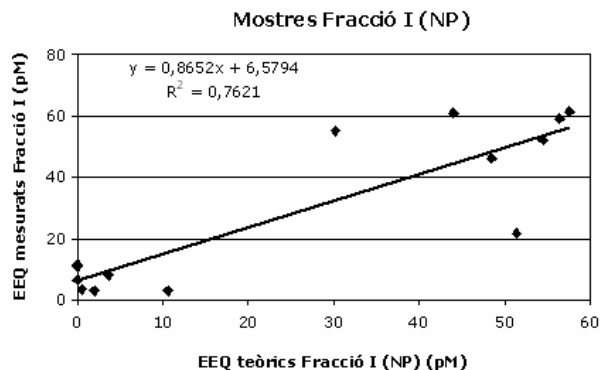
b.d.l: per sota del límit de detecció (*below detection limit*).

n.d: no determinat per mostra insuficient.

És important destacar que els valors teòrics d'estrogenicitat calculats tant en les mostres de la Fracció I com en les mostres de la Fracció II es corresponen a valors molt propers al LOD del sistema (34 pM, Noguero *et al.*, 2006b). En quant a les mostres de la Fracció II, es pot observar en la Taula IV.22 que aquelles en les que es va determinar estrogenicitat per RYA es corresponien a les que presentaven una major concentració d'E3, mentre que l'E2 i l'EE2 presentaven concentracions per sota del LOD (b.d.l, Taula VII.3 de l'Annex II).

En la Figura IV. 26 hi ha una representació gràfica dels EEQ mesurats en la Fracció I vers els EEQ teòrics estimats a partir de les concentracions de NP. En aquest cas, no s'han tingut en compte els valors calculats a partir del NP₂EO ja que l'EEf està per sota del límit de detecció (Céspedes *et al.*, 2004) i del NP₁EO ja que no es disposava de les dades químiques precises per a fer els càlculs reals (Taula VII.3 de l'Annex II).

Figura IV.26. Representació gràfica dels EEQ mesurats en la Fracció I vers els EEQ teòrics estimats a partir de les concentracions de NP presents. Els valors per sota del límit de detecció s'han fixat en 0 per tal de facilitar el traçat dels gràfics.



En la Fracció I es pot observar una correlació significativa entre els EEQ mesurats i els EEQ teòrics. En el cas de les mostres de la Fracció II, no es va poder traçar aquest gràfic degut al baix nombre de resultats positius obtinguts amb el RYA i a la gran quantitat de mostres no analitzades per falta de quantitat de mostra suficient per a la realització del RYA. Per altra banda, és evident la presència d'una major activitat estrogènica en l'influent respecte l'efluent que indica un bon funcionament de la depuradora en quant a l'eliminació de la possible estrogènicitat. Aquest efecte queda reflectit en la composició química (Taula VII.3 de l'Annex II) a on es pot veure que les mostres corresponents a l'influent estan molt més carregades químicament que les de l'efluent.

IV.4.1.2. Estudi de dues depuradores de Brasil

Aquesta monitorització per RYA de l'estrogènicitat de diferents mostres tractades per depuradores també va aplicar-se a una sèrie de mostres del Brasil. Aquestes mostres es poden classificar en mostres d'aigua tractades per al consum humà en una planta de tractament d'aigua d'Araraquara (Brasil) i mostres d'aigua de rebuig tractades per a la seva eliminació en els rius en una planta de tractament d'aigües residuals de Bueno de Andrade (Brasil). Van analitzar-se diferents mostres per al consum humà en l'influent i efluent de la depuradora d'Araraquara i diferents mostres d'aigua de rebuig en l'influent i efluent de la depuradora de Bueno de Andrade.

En la Taula IV.23 es mostren les concentracions d'E1, E2 i EE2 determinades en cada mostra pel grup de la Dra. Eliana Varanda, els EEQ teòrics i els EEQ mesurats amb el sistema ER-RYA. De la mateixa manera que abans, l'activitat estrogènica estimada de les mostres es va calcular a partir de la suma dels EEQ teòrics de tots els seus components calculats a partir del producte de la seva concentració per l'EEF corresponent (Taula IV.12).

Taula IV.23. Taula resum de les concentracions en ng/l dels compostos identificats i quantificats pel grup de la Dra. Eliana Varanda presents en les diferents mostres analitzades. La columna "n" representa el nombre de mostres analitzades. També es mostren els EEQ teòrics estimats i els EEQ determinats amb el sistema ER-RYA. Les dades estan expressades en equivalents d'estradiol (pM) amb un interval de confiança del 95%.

	n	Concentració (ng/l)			EEQ teòrics (pM) ^{a)}	EEQ mesurats (pM)
		E1	E2	EE2		
A	9	b.d.l	0.625	0.325	3.56	b.d.l
B	9	b.d.l	1.275	0.325	5.94	b.d.l
C	9	3.125	7.375	b.d.l	28.55	423.09 (210.71-951.06)
D	9	0.275	7.875	b.d.l	29.04	b.d.l

"A" representa les mostres d'aigua per al consum humà de l'influent de la depuradora d'Araraquara, "B" representa les mostres d'aigua per al consum humà de l'efluent de la depuradora d'Araraquara, "C" representa les mostres d'aigua de rebuig de l'influent de la depuradora de Bueno de Andrade i "D" representa les mostres d'aigua de rebuig de l'efluent de la depuradora de Bueno de Andrade. En aquesta taula les abreviacions són: E1, estrona; E2, 17 β -estradiol; i EE2, 17 α -etinilestradiol.

^{a)} EEQ teòrics calculats a partir dels EEf de la Taula IV.12.

b.d.l: per sota del límit de detecció (*below detection limit*).

De la mateixa manera que abans, pot observar-se que l'estrogenicitat estimada, EEQ teòrics, a partir dels compostos químics determinats i quantificats per LC-MS en les diferents mostres analitzades està just en el LOD de l'assaig (34 pM, Noguero *et al.*, 2006a) i, a més, només explica un tant per cent de l'estrogenicitat total mesurada en les mostres d'aigua de rebuig de l'influent de la depuradora de Bueno de Andrade (C, Taula IV.23).

IV.4.1.3. Discussió general

La indústria química cada any crea nombrosos compostos nous que tenen el potencial d'interferir en el delicat balanç hormonal de les persones i animals que s'hi exposen. Aquest risc és especialment evident en la fauna aquàtica exposada als abocaments urbans i industrials que contenen molts d'aquests xenobiòtics, la presència i la concentració dels quals és un excel·lent indicador de l'impacte humà. De fet, els disruptors endocrins estan presents en pràcticament tots els rius, llacs i estuaris (Yin *et al.*, 2002).

La detecció de disruptors endocrins presenta diferents problemes. Per una banda, és necessari controlar un gran nombre de substàncies amb unes propietats químiques molt diferents. Per altra banda, cada mostra pot presentar una extraordinària complexitat de compostos que complica la seva anàlisi. En el nostre laboratori (Garcia-Reyero *et al.*, 2001) s'ha desenvolupat un procediment integrat químic-ecotoxicològic que combina la utilització del LC-MS amb el RYA per a

avaluar el potencial de disrupció endocrina de diferents mostres. Aquest procediment s'ha aplicat en estudis previs a mostres d'aigua de dos afluent del riu Llobregat i de diferents STPs que aboquen en ell (Garcia-Reyero *et al.*, 2001; Céspedes *et al.*, 2005). Els resultats van ser consistents amb dades obtingudes prèviament de l'anàlisi química de les mostres (Castillo *et al.*, 1999; Solé *et al.*, 2000) que mostraven quantitats de diferents contaminants estrogènics com el NP, l'E3 i el DES. Va trobar-se una correlació quasi-lineal entre la presència d'activitat biològica i les concentracions de xenobiòtics, la qual cosa demostrava la complementarietat d'ambdós mètodes. A més, aquest estudi va demostrar la importància de la utilització del RYA en l'anàlisi de mostres naturals complexes. En definitiva, aquest procediment integrat es va presentar com una eina ràpida, senzilla i amb baix cost per a la detecció d'activitat estrogènica en mostres d'aigua i sediments.

En les mostres de l'EDAR de Terrassa va demostrar-se que l'estrogenicitat de les aigües analitzades estava associada bàsicament als alquilfenols, en concret al NP, presents només en la Fracció I. Això va ser corroborat amb una correlació significativa entre els EEQ mesurats i els EEQ teòrics estimats (Figura IV.26). De fet, estudis recents mostren que els alquilfenols poden explicar gran part de l'estrogenicitat present en les mostres d'aigua (Rutishauser *et al.*, 2004; Céspedes *et al.*, 2005; Quirós *et al.*, 2005).

En el cas de les mostres del Brasil, va observar-se que els EEQ teòrics estimats a partir dels compostos químics determinats i quantificats eren menors que els EEQ mesurats per RYA en les mostres d'aigua de rebuig de l'influent de la depuradora de Bueno de Andrade (C, Taula IV.23). Això és degut a què hi ha d'haver altres compostos amb activitat estrogènica presents en aquestes mostres, a part dels identificats i quantificats, que no es tenen en compte en els càlculs dels EEQ teòrics però sí en la determinació de l'estrogenicitat per RYA o a un possible efecte sinèrgic degut a què el RYA mesura directament la resposta total dels estrògens presents en una mostra donada tenint en compte els possibles efectes sinèrgics i/o antagònics de les combinacions dels compostos presents en barreges químiques complexes. En les mostres d'aigua de rebuig es veu clarament com el tractament de la depuradora de Bueno de Andrade elimina l'estrogenicitat present.

IV.4.2. Valoració per RYA de l'eliminació de l'activitat estrogènica d'hormones naturals i sintètiques d'aigües residuals per diferents tractaments enzimàtics

Una font freqüent de diferents disruptors endocrins com els estrògens esteroides naturals i sintètics són les plantes de tractament d'aigües residuals (Körner *et al.*, 2000; Layton *et al.*, 2000; Kolpin *et al.*, 2002; DEPA, 2002; Auriol *et al.*, 2006b). En aquest treball que ha estat acceptat en la revista *Chemosphere* (Auriol *et al.*, 2007) s'ha estudiat l'activitat estrogènica residual dels principals estrògens esteroides després de tractar enzimàticament mostres d'aigua sintètica i d'aigua municipal residual que contenien concentracions ambientals d'E1, E2, E3 i EE2. L'aparició d'aquests compostos en el medi ambient pot ser nociva per als organismes aquàtics, fins i tot a baixes concentracions com 0.1 ng/l (DEPA, 2003; Auriol *et al.*, 2006b).

L'aigua sintètica que va utilitzar-se era aigua desionitzada purificada amb aproximadament 100 ng/l de concentració d'estrògens i va ser preparada diluint una solució concentrada d'un estoc d'estrògens amb una quantitat apropiada de tampó fosfat (0.1 M). Per altra banda, l'aigua municipal residual provenia de l'efluent d'un reactor de processament de fangs activats d'una STP de Rolla, Missouri (EEUU). La recollida i el processament de les mostres d'aigua residual va ser tal i com està descrit en Auriol *et al.*, 2006a.

Els tractaments enzimàtics aplicats en aquest estudi van ser catalitzats per l'HRP (peroxidasa del rave picant, *horseradish peroxidase*) i per la lacasa de *Trametes versicolor*. Aquests processos enzimàtics són molt interessants degut al seu reconegut potencial per a oxidar contaminants ambientals com fenols (Wagner and Nicell, 2003; Gianfreda *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2005), alquilfenols (Sakuyama *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2003; Wagner and Nicell, 2005), BPA (Huang and Weber, 2005; Kim and Nicell, 2006a; Kim and Nicell, 2006b) i estrògens esteroides (Suzuki *et al.*, 2003; Auriol *et al.*, 2006a; Tamagawa *et al.*, 2006).

El grup del Dr. Youssef Filali-Meknassi va aplicar aquests dos tractaments enzimàtics per a eliminar els estrògens esteroides de l'efluent de les mostres d'aigua residual i, a més, va fer experiments en paral·lel en l'aigua sintètica. Totes les reaccions enzimàtiques van ser aturades després d'una hora de tractament. En la Figura IV.27 es mostra el descens de la concentració d'estrògens a diferents activitats enzimàtiques.

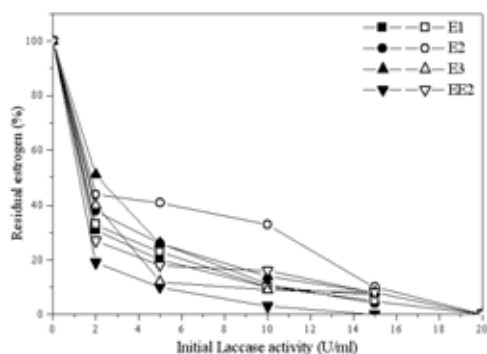
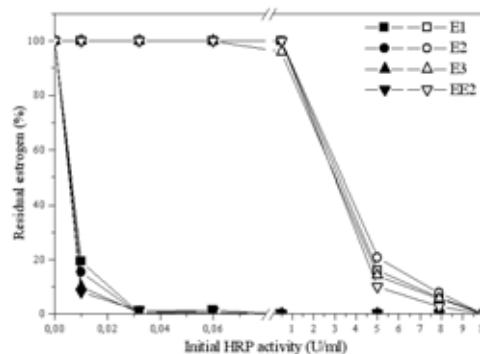
A) Procés catalitzat per la lacasa**B) Procés catalitzat per l'HRP**

Figura IV.27. A) Descens de les concentracions d'estrògens en el procés catalitzat per la lacasa. Els símbols negres representen el tractament de l'aigua sintètica i els símbols blancs representen el tractament de l'aigua residual. B) Descens de les concentracions d'estrògens en el procés catalitzat per l'HRP. Els símbols negres representen el tractament de l'aigua sintètica i els símbols blancs representen el tractament de l'aigua residual (Auriol *et al.*, 2007).

L'anàlisi per LC-MS que va dur a terme el grup del Dr. Filali-Meknassi va mostrar que els estrògens estudiats eren totalment oxidats després d'una hora de tractament enzimàtic (Auriol *et al.*, 2007). De fet, es va demostrar analíticament que ambdós procediments enzimàtics eliminaven completament la barreja d'estrògens (E1, E2, E3, i EE2) de les aigües residuals, tot i que el sistema catalitzat per l'HRP es veia més afectat per la natura de la matriu que el sistema catalitzat per la lacasa. En concret, es va veure que per al tractament enzimàtic amb lacasa es requeria la mateixa dosi inicial (20 U/ml) per a eliminar completament la mateixa quantitat d'estrògens en les mostres d'aigua residual que en l'aigua sintètica després d'una hora de tractament (Figura IV.27 A). En el cas del tractament per l'HRP de les aigües residuals, es requeria més activitat inicial (8-10 U/ml) que en el tractament de l'aigua sintètica (0.032 U/ml) per a eliminar completament la mateixa concentració d'estrògens (Figura IV.27 B). Segons els resultats del LC-MS, aquestes activitats inicials dels enzims es corresponien a les activitats òptimes per a assolir concentracions finals per sota del LOD després d'una hora de tractament enzimàtic.

Hi ha poques dades disponibles en la bibliografia sobre l'eliminació d'estrògens esteroides d'aigües residuals per sistemes enzimàtics combinats amb la desaparició de l'estrogenicitat corresponent. L'objectiu d'aquest estudi va ser avaluar l'eliminació de l'estrogenicitat associada als estrògens estudiats (E1, E2, E3 i EE2) en mostres d'aigua residual pels procediments catalitzats per l'HRP i per la lacasa. En aquest estudi, la valoració de l'estrogenicitat abans i després del tractament enzimàtic va ser realitzada per nosaltres mitjançant el RYA.

La Figura IV.28 és una representació dels EEQ i de l'activitat estrogènica residual en funció del temps de tractament enzimàtic (0, 1, 3 i 5 hores). Les mostres d'aigua sintètica van demostrar ser molt sensibles a ambdós tractaments. Una hora de tractament amb lacasa va eliminar pràcticament tota l'activitat estrogènica d'aquestes mostres, mentre que el tractament amb HRP eliminava només un 98% de l'estrogenicitat en el mateix període de temps, augmentant fins a més d'un 99% a les 3-5 hores. Respecte el tractament de les mostres d'aigua residual, els sistemes catalitzats per la lacasa i l'HRP després d'una hora de tractament van reduir l'activitat estrogènica un 97% i un 88%, respectivament. En el cas del tractament catalitzat per la lacasa, l'activitat estrogènica va eliminar-se pràcticament del tot després d'un tractament de 3-5 hores (98%); mentre que en el cas del tractament catalitzat per l'HRP, després de 5 hores encara persistia una certa activitat estrogènica.

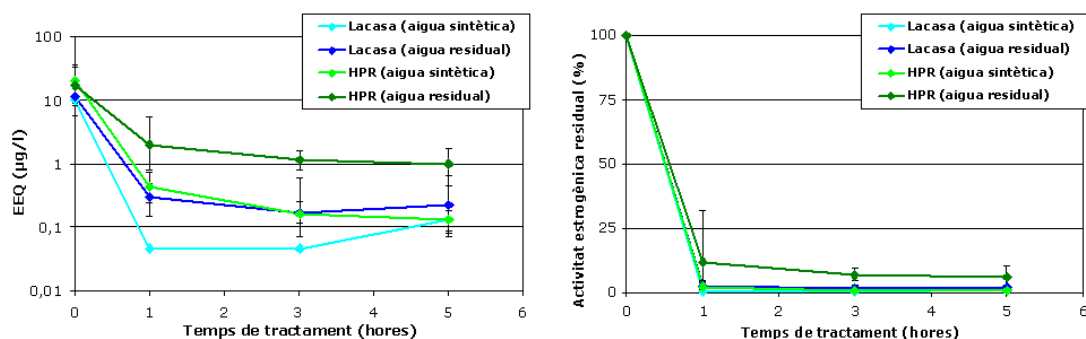


Figura IV.28. EEQ i activitat estrogènica residual (en %) a diferents temps de tractament amb lacasa i HRP de les mostres d'aigua sintètica i aigua residual. Les barres representen el límit de confiança del 95%. L'activitat inicial de la lacasa va ser de 20 U/ml, mentre que la de l'HRP va ser de 0.032 U/ml en el cas de l'aigua sintètica i 10 U/ml en les aigües residuals.

IV.4.2.1. Discussió general

Mitjançant el RYA va confirmar-se que els dos tractaments enzimàtics van ser molt eficients en eliminar l'activitat estrogènica de les mostres d'aigua analitzades. En el cas de les mostres d'aigua sintètica, l'anàlisi per LC-MS del grup del Dr. Filali-Meknassi mostrava que després d'una hora de tractament amb HRP les concentracions residuals dels estrògens estaven per sota del LOD (0.59-1.32 ng/l). El 2% de l'activitat estrogènica restant s'ha d'atribuir a altres fonts, per exemple, podria ser degut a concentracions residuals d'estrògens (per sota del LOD del LC-MS) o a un fenomen sinèrgic dels quatre estrògens romanents. Això és consistent amb altres estudis previs (Suzuki *et al.*, 2003; Tamagawa *et al.*, 2006) que parlen

d'una bona eliminació de l'estrogenicitat associada a E1, E2, E3 i EE2 per tractaments catalitzats per la Mn-peroxidasa i la lacasa.

Pel que fa a les mostres d'aigua residual, l'estrogenicitat mesurada després del temps de reacció va mostrar que ambdós tractaments permetien la seva detoxificació a un nivell rellevant. Una activitat estrogènica baixa encara present després del tractament es pot atribuir a restes residuals d'estrògens, efectes sinèrgics o, més probablement, a la presència d'altres compostos estrogènics sense identificar resistents als dos tractaments enzimàtics com, per exemple, pesticides, fenols, alquilfenols, BPA, etc.

Aquests resultats corroboren la viabilitat de l'eliminació de l'activitat estrogènica pels tractaments amb lacasa i HRP, tot i que suggereixen que la lacasa té una eficàcia més alta tant en mostres netes (aigua sintètica) com en mostres complexes (aigua residual), donada una menor activitat estrogènica residual després del seu tractament en comparació amb els mateixos experiments utilitzant l'HRP.

IV.5. DETERMINACIÓ PER RYA DE L'ESTROGENICITAT EN SEDIMENTS DE L'EMBASSAMENT DE FLIX, VALORACIÓ I ANÀLISI ESTADÍSTICA DELS RESULTATS OBTINGUTS

L'embassament de Flix es troba en la comarca de la Ribera d'Ebre (Tarragona) a la llera del riu Ebre (Figura IV.29) i presenta altíssims nivells de contaminació química provinent de l'acumulació de residus d'una fàbrica de l'empresa del grup Ercros (abans Erkimia). La caracterització química d'aquesta contaminació està essent objecte d'estudi per part del grup d'investigació del Dr. Joan O. Grimalt, que ha cedit les mostres necessàries per a aquest treball (Figura IV.30).

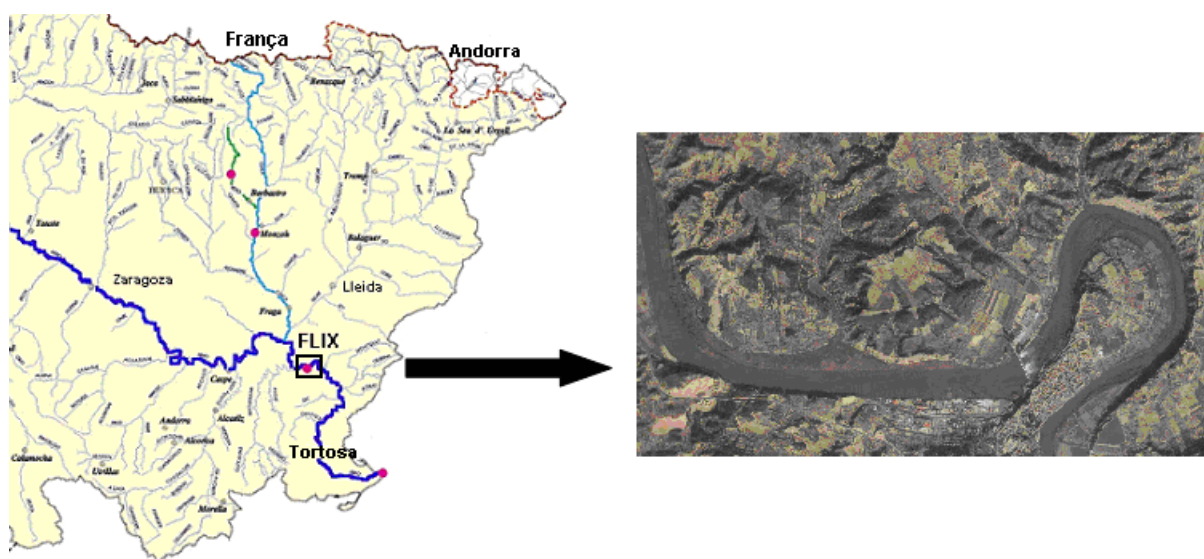


Figura IV.29. Mapa de la zona de l'embassament de Flix.



Figura IV.30. Localització dels llocs de mostreig en l'embassament de Flix (punts roses).

Dins d'aquest treball es va plantejar l'estudi de contaminants químics, fonamentalment compostos organoclorats, que es troben emmagatzemats entre els sediments retinguts en l'embassament de Flix. Van mostrejar-se cinc testimonis sedimentaris (Taula IV.24) i van analitzar-se els contaminants presents. La campanya de mostreig es va dur a terme el gener i febrer del 2001. Els testimonis estaven situats al llarg del marge dret de l'embassament, lloc en el que s'acumulen els materials abocats davant de la fàbrica (Figura IV.30). Els testimonis que van agafar-se eren suficientment representatius de les activitats que es van dur a terme en la fàbrica ja que cobrien tota la zona d'influència d'aquests abocaments.

Taula IV.24. Característiques dels testimonis mostrejats en l'embassament de Flix.

Nom del testimoni	Penetració (cm)	Recuperació (cm)	Longitud (E)	Latitud (N)
VC1	260	151	0°32'5.4"	41°14'1.6"
VC2	320	193	0°32'12"	41°14'0.57"
VC3	250	144	0°32'16.5"	41°14'1.2"
VC4	350	241	0°32'27"	41°13'59.8"
VC5	120	87.5	0°32'36.8"	41°13'58.1"

IV.5.1. Determinació per RYA de l'activitat estrogènica present en els sediments

Després de tractar les mostres per a obtenir els extractes adequats (ASE per als extractes orgànics i lixiviació per als lixiviats) es va realitzar un RYA amb el sistema ER-RYA. En la Taula IV.25 es mostren els resultats obtinguts expressats com a equivalents de 17 β -estradiol (EEQ) representats amb un interval de confiança del 95%. La nomenclatura de les mostres fa referència al testimoni al que pertanyen i a la seva profunditat (en cm).

Taula IV.25. Activitat estrogènica mesurada amb el sistema sensor ER-RYA. Les dades estan expressades en equivalents de 17 β -estradiol (nM) amb un interval de confiança del 95%. S'han analitzat els dos extractes obtinguts (extractes orgànics i lixiviats).

	EEQ mesurats (nM)	
	Extractes orgànics	Lixiviats
VC1017	b.d.l	b.d.l
VC1020	b.d.l	0.11 (0.07-0.16)
VC1023	b.d.l	b.d.l
VC1031	b.d.l	b.d.l
VC1040	9.32 (5.88-14.79)	0.12 (0.10-0.13)
VC1044	b.d.l	b.d.l
VC1050	b.d.l	b.d.l
VC1091	b.d.l	1.25 (1.08-1.46)
VC1103	b.d.l	0.17 (0.15-0.9)
VC1130	b.d.l	b.d.l
VC1151	b.d.l	b.d.l
VC2005	b.d.l	b.d.l
VC2020	b.d.l	b.d.l
VC2050	b.d.l	b.d.l
VC2078	b.d.l	b.d.l
VC2106	b.d.l	0.10 (0.07-0.13)
VC2133	b.d.l	b.d.l
VC2142	12.03 (7.44-19.44)	b.d.l
VC2150	b.d.l	0.20 (0.16-0.25)
VC2159	b.d.l	b.d.l
VC2174	b.d.l	b.d.l
VC2191	b.d.l	0.10 (0.10-0.11)
VC3011	b.d.l	b.d.l
VC3020	b.d.l	b.d.l
VC3029	b.d.l	b.d.l
VC3038	b.d.l	0.17 (0.16-0.17)
VC3051	0.27 (0.24-0.31)	b.d.l
VC3064	0.001	b.d.l
VC3067	0.001	0.13 (0.07-0.26)
VC3078	b.d.l	b.d.l
VC3093	b.d.l	b.d.l
VC3103	b.d.l	b.d.l
VC3120	0.14 (0.13-0.15)	b.d.l
VC3144	b.d.l	b.d.l
VC4006	b.d.l	0.15 (0.13-0.17)
VC4018	b.d.l	0.15 (0.07-0.31)
VC4038	b.d.l	b.d.l
VC4051	b.d.l	b.d.l
VC4062	0.23 (0.14-0.39)	b.d.l
VC4075	b.d.l	b.d.l
VC4088	0.16 (0.10-0.24)	b.d.l
VC4100	1.17 (0.81-1.70)	b.d.l
VC4119	b.d.l	b.d.l
VC4134	b.d.l	0.09 (0.05-0.016)
VC4146	b.d.l	1.62 (0.80-3.29)
VC4158	b.d.l	0.24 (0.15-0.36)
VC4170	b.d.l	b.d.l
VC4200	b.d.l	b.d.l
VC4216	b.d.l	0.16 (0.13-0.21)
VC4237	b.d.l	4.18 (2.20-7.94)
VC5011	b.d.l	b.d.l
VC5014	b.d.l	b.d.l
VC5020	b.d.l	b.d.l
VC5029	b.d.l	b.d.l
VC5038	b.d.l	b.d.l
VC5047	b.d.l	b.d.l
VC5056	b.d.l	b.d.l
VC5065	b.d.l	b.d.l
VC5068	b.d.l	b.d.l
VC5074	b.d.l	b.d.l

b.d.l: per sota del límit de detecció (*below detection limit*).

IV.5.2. Anàlisi de contaminants presents en les mostres de sediments

Es van analitzar un total de 60 mostres de l'embassament de Flix. En la Taula VII.4 de l'Annex III es pot veure la concentració, determinada pel grup del Dr. Grimalt, dels diferents compostos organoclorats identificats i quantificats en cada mostra, que es poden agrupar en:

- Clorobenzens (CBs): PeCB i HCB
- Policlorobifenils (PCBs): PCB28, PCB52, PCB101, PCB118, PCB138, PCB153, PCB180 i PCB209
- DDEs: 4,4'-DDT i 4,4'-DDE
- Hexaclorociclohexans (HCHs): α -HCH, β -HCH i γ -HCH

Les concentracions dels compostos organoclorats (CBs, PCBs, DDEs i HCHs) trobades en els sediments de l'embassament de Flix van ser molt elevades, tant si es comparen amb dades de sediments de zones remotes com amb dades industrials.

En la Figura IV.31 es pot observar una representació gràfica dels valors d'estrogenicitat de la Taula IV.25 determinats mitjançant el RYA per a cada mostra junt amb les concentracions (Taula VII.4 de l'Annex III) dels diferents grups de compostos analitzats.

En la Taula VII.5 de l'Annex III està indicat el tant per cent de la quantitat total de matèria orgànica (TOC, *Total Organic Content*) present en cada mostra en relació amb la profunditat (en cm) en la que es va recollir. En la Figura IV.32 es pot veure la seva representació gràfica.

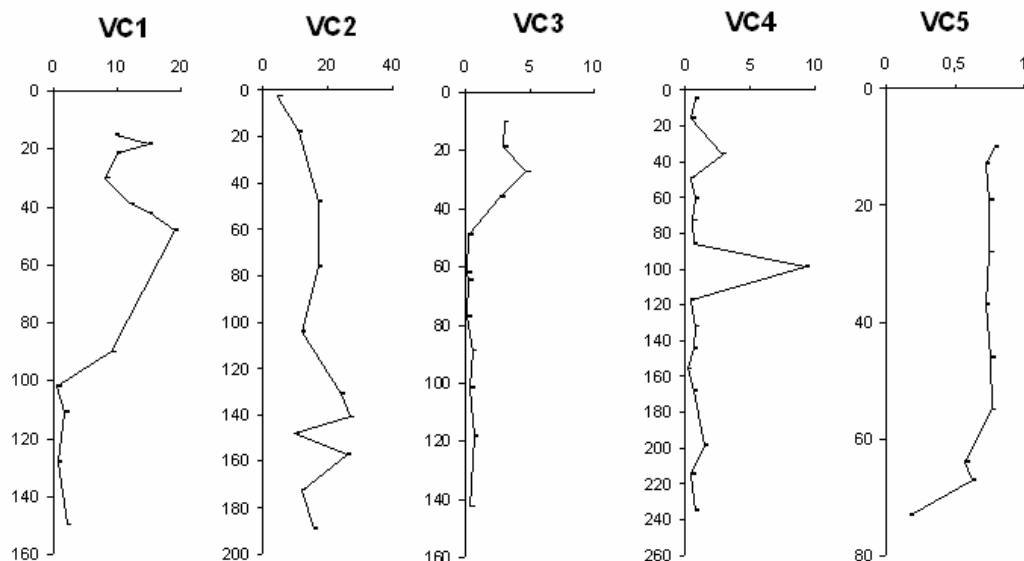


Figura IV.32. Representació de la quantitat total de matèria orgànica (en tant per cent) present en cada mostra (eix de les X) en funció de la profunditat en cm (eix de les Y).

La composició va ser predominantment fangosa la qual cosa va contrastar amb la de l'altra banda del riu que estava formada majoritàriament per sorres. El dipòsit de fangs que es va trobar en el costat dret del riu va considerar-se fonamentalment d'origen antropogènic.

IV.5.3. Valoració i anàlisi estadística dels resultats obtinguts

Tots els càlculs estadístics es van fer amb l'SPSS v.13.0.1 package (SPSS Inc., Chicago, Ill.). A menys que s'indiqui el contrari, els nivells de significació es van fixar en $p < 0.05$. La normalitat de les distribucions es va provar amb la prova de Kolmogorov-Smirnov.

IV.5.3.1. Prova de Kolmogorov-Smirnov

La prova de Kolmogorov-Smirnov compara la funció de distribució observada d'una variable amb una distribució teòrica determinada, en aquest cas la normal, i d'aquesta manera s'utilitza per a comprovar si aquesta variable es distribueix normalment. L'estadístic Z de Kolmogorov-Smirnov es calcula a partir de la diferència més gran (en valor absolut) entre les funcions de distribució teòrica i

observada. Aquesta prova contrasta si les observacions podrien procedir raonablement de la distribució especificada.

La Taula IV.26 mostra en primer lloc el nombre de mostres (n) i els paràmetres de la distribució teòrica, en aquest cas la normal (Mitjana i Desviació típica). A continuació mostra l'estadístic Z de Kolmogorov-Smirnov i el seu nivell crític, la significació bilateral (Sig. (bilateral)). En aquest cas, s'han analitzat els valors originals i els seus valors logarítmics.

Taula IV.26. Taula resum dels paràmetres calculats amb la prova de Kolmogorov-Smirnov mitjançant el programa SPSS per a determinar si se segueix una distribució normal.

	Valors originalss										Valors logarítmics ^{a)}				
	n	Paràmetres normals		Z de Kolmogorov-Smirnov	Sig. (bilateral)	n	Paràmetres normals		Z de Kolmogorov-Smirnov	Sig. (bilateral)					
		Mitjana	Desviació típica				Mitjana	Desviació típica							
RYA	A	60	0.3896	19.484	36.715	0.0000	7	-0.1046	0.8287	0.7460	0.6330				
	B	60	0.1496	0.5910	31.234	0.0000	16	-0.6384	0.4936	12.190	0.1030				
CBS	PeCB	60	87.817.333	182.472.409	24.431	0.0000	60	34.804	0.8265	16.920	0.0070				
	HCB	60	197.405.833	164.030.426	0.8875	0.4102	60	40.339	0.6673	14.020	0.0390				
PCBs	PCB28	60	12.498.833	40.217.837	29.803	0.0000	56	22.900	0.7858	10.390	0.2310				
	PCB52	60	5.363.000	17.468.800	30.094	0.0000	57	20.833	0.6562	11.690	0.1300				
	PCB101	60	2.062.350	4.115.109	25.608	0.0000	58	19.258	0.5650	10.840	0.1910				
	PCB118	60	1.047.305	2.207.919	26.095	0.0000	59	16.279	0.5394	10.930	0.1840				
	PCB138	60	3.544.000	5.969.371	23.468	0.0000	59	22.080	0.5320	0.6080	0.8530				
	PCB153	60	1.837.983	2.973.958	23.380	0.0000	59	19.214	0.5654	0.6900	0.7280				
	PCB180	60	1.526.333	2.087.671	20.670	0.0004	58	19.535	0.4389	0.7430	0.6390				
PCB209	60	6.345.333	10.022.424	22.820	0.0001	60	23.908	0.6624	0.6640	0.7710					
DDEs	4,4'-DDT	60	10.989.917	58.141.324	35.685	0.0000	60	19.584	0.7523	13.310	0.0580				
	4,4'-DDE	60	3.109.833	6.146.282	25.151	0.0000	60	20.825	0.6145	0.7460	0.6350				
HCHs	α-HCH	60	61.050	62.791	22.041	0.0001	33	10.111	0.1900	0.9730	0.3010				
	β-HCH	60	761.587	1.998.480	29.921	0.0000	31	16.152	0.7176	11.640	0.1330				
	γ-HCH	60	87.783	182.979	24.454	0.0000	24	12.068	0.3232	0.5270	0.9440				

En aquesta taula "A" representa els valors d'estrogenicitat dels extractes orgànics analitzats amb el sistema ER-RYA i "B" representa els valors d'estrogenicitat dels llixiviats amb el sistema ER-RYA. S'indica en primer lloc el nombre de mostres (n) i els paràmetres de la distribució teòrica, en aquest cas la normal (Mitjana i Desviació típica). A continuació es mostra l'estadístic Z de Kolmogorov-Smirnov i el seu nivell crític, la significació bilateral (Sig. (bilateral)).

^{a)} Només s'han inclòs els valors que estan per sobre del LOD.

Els paràmetres analitzats van demostrar una distribució no-normal ja que els valors dels nivells crítics van ser molt petits ($\sigma < 0.05$), a excepció de l'HCB ($\sigma > 0.05$). No obstant això, els valors logarítmics segueixen una distribució normal i, per tant, es poden aplicar proves paramètriques amb aquests valors normalitzats.

IV.5.3.2. Anàlisi factorial

L'anàlisi factorial és una tècnica de reducció de dades que serveix per a trobar grups homogenis de variables, o factors, que expliquin la majoria de la variància observada a partir d'un conjunt nombrós de diferents variables. Aquests grups homogenis es formen entre les variables que correlacionen molt entre si procurant que uns grups siguin independents dels altres. El seu objectiu és identificar el nombre mínim de factors capaços d'explicar el màxim d'informació continguda en les dades.

Així doncs, es va calcular la matriu de components principals dels compostos químics identificats i quantificats amb el mètode d'extracció d'anàlisi de components principals i el mètode de rotació Varimax amb normalització de Kaiser. Varimax és un mètode de rotació que simplifica la interpretació dels factors a la vegada que minimitza el nombre de variables que tenen saturacions (és a dir, correlacions entre les variables originals) altes en cada factor. Per altra banda, Kaiser contrasta si les correlacions parcials entre les variables són suficientment petites. La matriu de components principals és una matriu que expressa la variabilitat conjunta de totes les variables i conté les correlacions entre les variables originals i cadascun dels factors. De cara a simplificar els resultats, es va treballar amb els valors logarítmics dels compostos agrupats en classes. Van obtenir-se dos components que estan representats en la Figura IV.33 a on també s'indica el percentatge de la variància total explicada per cadascun d'ells.

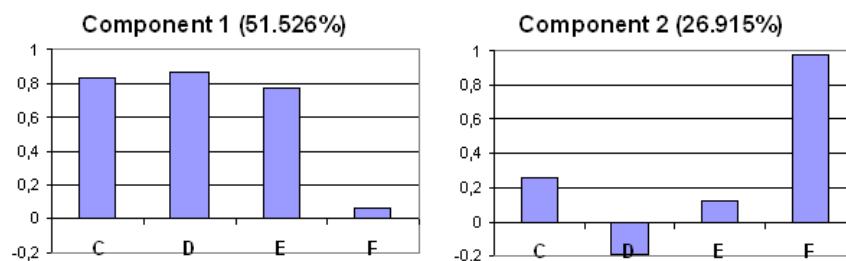


Figura IV.33. Components principals que van obtenir-se a partir de l'anàlisi factorial dels compostos químics amb el programa SPSS. En aquest gràfic "C" representa els CBs, "D" representa els PCBs, "E" representa els DDEs, i "F" representa els HCHs.

L'anàlisi de components principals intenta identificar variables, o factors, que expliquin la configuració de les correlacions dins d'un conjunt de variables observades. El primer component representa el 51,526% de la variància total i mostra una forta contribució dels CBs, PCBs i els DDEs. Totes aquestes variables s'associen a un únic factor perquè constitueixen un grup diferenciat de variables dins de la matriu de correlacions. Un 26,915% de la variància total s'associa al segon component que està fortament relacionat amb els HCHs. Els dos components expliquen un 80% de la variabilitat total. A més, es pot observar que clarament es diferencien dos grups de compostos que correlacionen entre ells. Per una banda, els compostos aromàtics que inclouen els CBs, PCBs i els DDEs; i, per altra banda, els HCHs.

A continuació en la Figura IV.34 s'ha representat gràficament, classificant els diferents testimonis amb diferents colors, com es relacionen entre si els dos components principals que es van obtenir i que estan representats en la Figura IV.33.

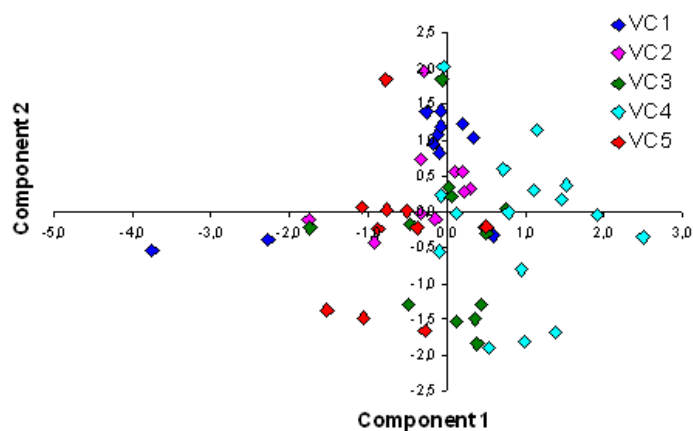


Figura IV.34. Gràfic que relaciona entre si les puntuacions calculades a partir dels dos components principals obtinguts en l'anàlisi factorial i que estan representats en la Figura IV.33. Els diferents testimonis es poden identificar amb colors diferents.

En aquesta figura es pot observar que més o menys les mostres de cada testimoni queden agrupades entre elles i que, en concret, el testimoni VC4 està clarament diferenciat respecte els altres.

IV.5.3.3. Comparació de la composició química de les mostres estrogèniques i no estrogèniques

Es van analitzar les diferències en la composició química entre les mostres estrogèniques i no estrogèniques emprant la prova T de Student. Aquesta prova requereix normalitat, així doncs, es van utilitzar els valors logarítmics.

La Taula IV.27 mostra els valors p calculats a partir dels logaritmes de les concentracions dels diferents compostos analitzats. El valor p representa la probabilitat de la hipòtesi nul·la, és a dir, de què les dues poblacions comparades tinguin la mateixa composició química. En la taula s'indiquen amb un asterisc els valors p significatius en el nivell 0.05 ($p < 0.05$), amb dos asteriscs (**) els significatius en el nivell 0.01 ($p < 0.01$) i amb tres asteriscs (***) els significatius en el nivell 0.001 ($p < 0.001$).

Taula IV.27. Valors p calculats a partir dels logaritmes de les concentracions dels diferents compostos.

	Mostres estrogèniques versus no estrogèniques			Extractes orgànics estrogènics versus lixiviats estrogènics
	Total (extractes orgànics i lixiviats)	Extractes orgànics	Lixiviats	
PeCB	0.042 *	0.043 *	0.203	0.153
HCB	0.109	0.143	0.265	0.295
CBs	0.076	0.091	0.241	0.211
PCB28	0.000 ***	0.001 **	0.002 **	0.502
PCB52	0.002 **	0.001 **	0.042 *	0.149
PCB101	0.012 *	0.015 *	0.092	0.319
PCB118	0.004 **	0.018 *	0.023 *	0.561
PCB138	0.011 *	0.083	0.033 *	0.890
PCB153	0.013 *	0.070	0.058	0.728
PCB180	0.060	0.179	0.206	0.880
PCB209	0.000 ***	0.003 **	0.000 ***	0.966
PCBs	0.000 ***	0.006 **	0.007 **	0.415
4.4'-DDT	0.044 *	0.020 *	0.207	0.414
4.4'-DDE	0.064	0.022 *	0.347	0.120
DDEs	0.037 *	0.008 **	0.239	0.232
α-HCH	0.168	0.263	0.279	0.741
β-HCH	0.692	0.756	0.832	0.882
γ-HCH	0.757	0.047 *	0.161	0.043
HCHs	0.756	0.956	0.850	0.808

Valors de significació: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

Es van trobar diferències significatives en la composició química dels compostos, sobretot de PCBs, entre les mostres estrogèniques i les no estrogèniques tant en els extractes orgànics com en els lixiviats. Aquestes diferències són encara més significatives quan s'agrupen totes les mostres que com a mínim han donat positiu

en un dels dos extractes (extractes orgànics més lixiviats). En canvi, no es van observar diferències de composició entre els extractes orgànics estrogènics i els lixiviats estrogènics.

En la Figura IV.35 s'observa una representació gràfica dels valor mitjà dels logaritmes de les concentracions en ng/g de sediment per a cada compost analitzat de les mostres estrogèniques i no estrogèniques.

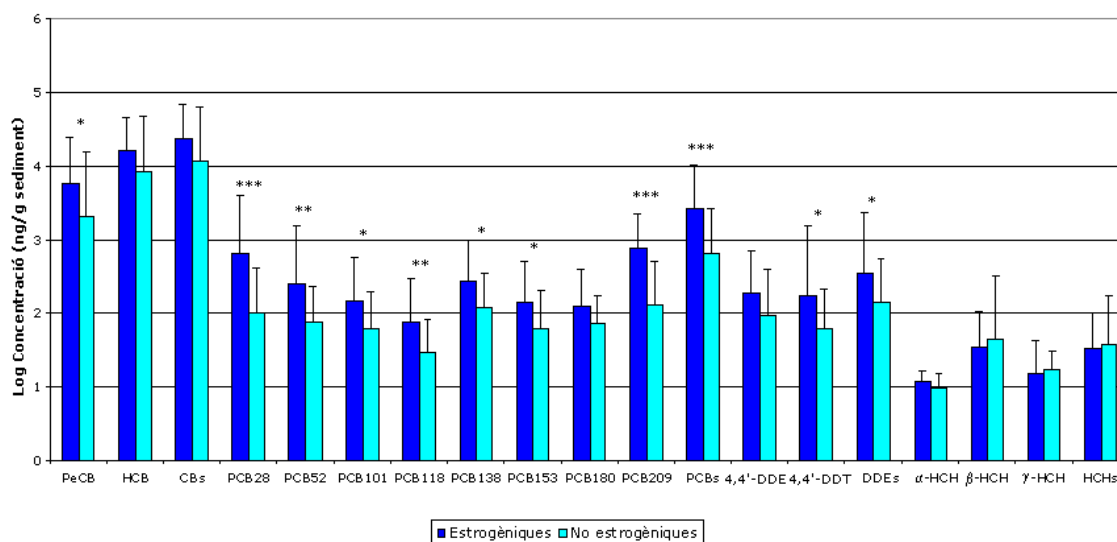


Figura IV.35. Representació gràfica dels termes mitjans dels logaritmes de les concentracions (en ng/g de sediment) dels diferents compostos analitzats de les mostres estrogèniques i no estrogèniques. Les barres representen les desviacions estàndard dels valors logarítmics. Les diferències significatives entre mostres estrogèniques i no estrogèniques s'han senyalat amb asteriscs: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

IV.5.3.4. Correlació entre la composició química i l'estrogenicitat dels extractes orgànics i dels lixiviats

Els paràmetres R i p calculats a partir de les rectes de regressió dels valors logarítmics de les concentracions dels diferents compostos químics presents en les mostres estrogèniques es mostren en la Taula IV.28.

Taula IV.28. Taula amb els valors dels paràmetres *R* i *p* calculats a partir de les rectes de regressió dels logaritmes de les concentracions dels diferents compostos químics.

	Extractes orgànics		Lixiviats	
	<i>R</i>	<i>p</i>	<i>R</i>	<i>p</i>
PeCB	-0.004	0.993	0.036	0.896
HCB	-0.209	0.653	0.077	0.777
CBs	-0.091	0.847	0.045	0.870
PCB28	-0.830	0.021 *	0.644	0.007 **
PCB52	-0.740	0.057	0.659	0.005 **
PCB101	-0.814	0.026 *	0.661	0.005 **
PCB118	-0.802	0.030 *	0.635	0.008 **
PCB138	-0.816	0.025 *	0.652	0.006 **
PCB153	-0.836	0.019 *	0.642	0.007 **
PCB180	-0.861	0.013 *	0.595	0.015 *
PCB209	-0.805	0.029 *	0.472	0.065
PCBs	-0.805	0.029 *	0.639	0.008 **
4,4'-DDT	-0.860	0.013 *	-0.006	0.983
4,4'-DDE	-0.702	0.078	-0.028	0.919
DDEs	-0.609	0.147	0.002	0.995
α-HCH	0.175	0.707	-0.776	0.000 ***
β-HCH	0.987	0.000 ***	0.381	0.146
γ-HCH	-1.000	n.a	-0.204	0.449
HCHs	0.144	0.758	-0.086	0.750

Valors de significació: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.
n.a: no aplicable.

En el cas dels lixiviats van trobar-se correlacions positives i significatives entre l'estrogenicitat i les concentracions de diferents PCBs, mentre que en els extractes orgànics aquestes correlacions van ser negatives. Això s'observa en la Figura IV.36 a on es comparen els valors logarítmics de la composició química dels PCBs (en ng/g de sediment) amb els valors logarítmics de l'estrogenicitat (EEQ en nM) dels extractes orgànics (Figura IV.36 A) i dels lixiviats (Figura IV.36 B).

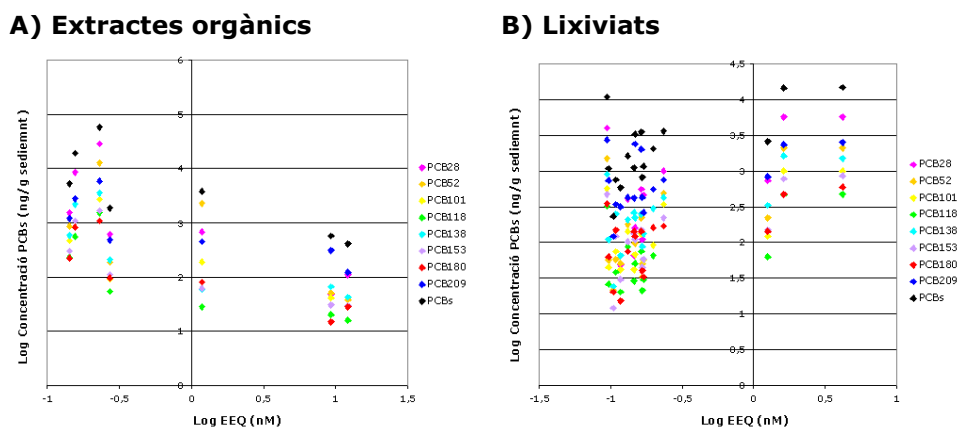


Figura IV.36. Representació gràfica dels valors logarítmics de la concentració de PCBs (en ng/g de sediment) vers els valors logarítmics de l'estrogenicitat (en EEQ) dels extractes orgànics (A) i dels lixiviats (B).

Les correlacions negatives entre els PCBs i l'estrogenicitat en els extractes orgànics es podrien explicar per un fenomen d'inhibició (explicat més endavant). En la Taula IV.29 es mostra el terme mitjà dels logaritmes de les concentracions dels diferents grups de compostos analitzats (CBs, PCBs, DDEs i HCHs) en les mostres estrogèniques i no estrogèniques dels extractes orgànics i dels llixiviats.

Taula IV.29. Mitjanes i desviacions estàndards ($X \pm SD$) dels logaritmes de les concentracions (en ng/g de sediment) de CBs, PCBs, DDEs i HCHs dels extractes orgànics i dels llixiviats en les mostres estrogèniques i no estrogèniques.

	Extractes orgànics i Llixiviats		Extractes orgànics		Llixiviats	
	Mostres estrogèniques	Mostres no estrogèniques	Mostres estrogèniques	Mostres no estrogèniques	Mostres estrogèniques	Mostres no estrogèniques
CBs	4.38±0.47	4.06±0.74	4.56±0.45	4.12±0.64	4.30±0.45	4.13±0.73
PCBs	3.42±0.60	2.82±0.60	3.57±0.78	2.97±0.62	3.31±0.51	2.94±0.69
DDEs	2.54±0.82	2.15±0.59	2.86±0.76	2.22±0.67	2.39±0.80	2.26±0.67
HCHs	1.51±0.48	1.57±0.68	1.55±0.46	1.55±0.63	1.53±0.51	1.56±0.65

La Taula IV.29 mostra que les concentracions de PCBs en les mostres estrogèniques són superiors que les de les no estrogèniques. En el cas dels extractes orgànics (valors en negreta), aquesta diferència és d'un factor de 4 mentre que en el cas dels llixiviats la diferència és menor (2.5x).

IV.5.4. Anàlisi de falsos positius i negatius

La Taula IV.30 mostra els valors dels EEQ teòrics calculats en aquelles mostres que van donar com a mínim una resposta positiva amb l'ER-RYA.

Taula IV.30. EEQ teòrics calculats en els extractes orgànics i llixiviats que com a mínim van donar una resposta positiva en el RYA. Els EEQ teòrics s'han calculat a partir de Noguero *et al.*, 2006; Garcia-Reyero *et al.*, 2005; i Scippo *et al.*, 2004.

	Mostres estrogèniques	EEQ teòrics ($\mu\text{g/l}$)
Extractes orgànics	VC1040	0.667
	VC2142	0.364
	VC3051	1.770
	VC3120	1.815
	VC4062	31.337
	VC4088	12.827
	VC4100	2.205
	VC1020	0.287
Llixiviats	VC1040	0.167
	VC1091	0.458
	VC1103	0.402
	VC2191	0.033
	VC3038	0.188
	VC3067	0.147
	VC4006	14.574
	VC4134	0.860
	VC4146	1.122
	VC4158	0.302
	VC4216	0.330
	VC4237	1.272

En la Figura IV.37 es pot veure la representació gràfica dels valors logarítmics dels EEQ teòrics de les diferents mostres analitzades calculats a partir del sumatori dels equivalents teòrics de tots els grups de compostos químics presents (CBs, PCBs, DDEs, i HCHs).

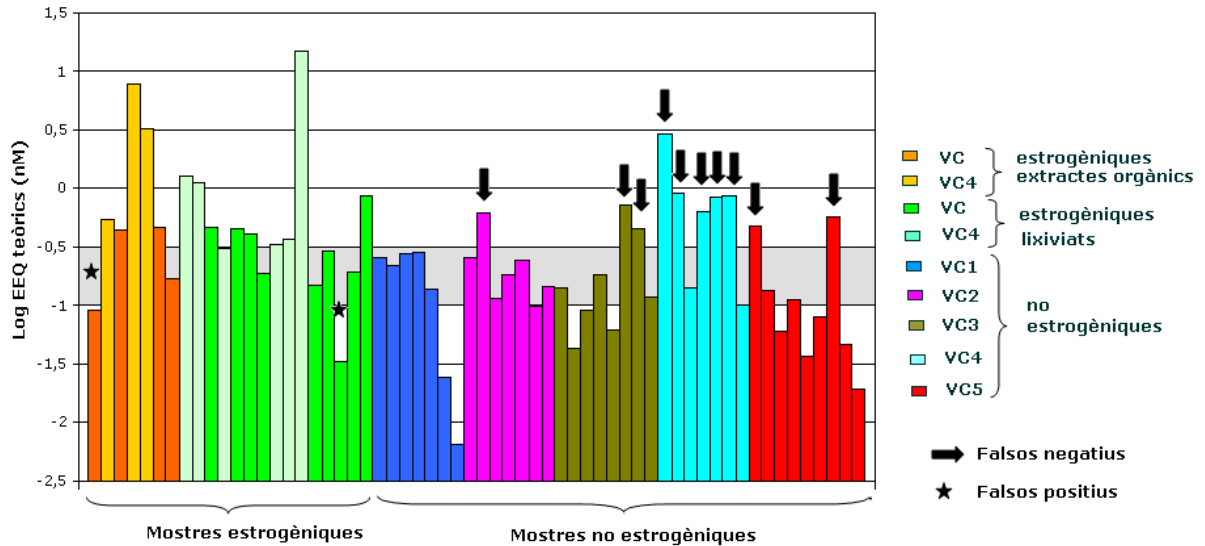


Figura IV.37. Representació gràfica dels logaritmes dels EEQ teòrics de les diferents mostres analitzades. La zona grisa representa el marge entre les mostres que estan per sota del LOD i les clarament positives. Les mostres en les que va detectar-se estrogenicitat amb l'ER-RYA s'han representat en color taronja (extractes orgànics) i verd (lixiviats). Les mostres estrogèniques de color més clar (taronja clar i verd clar) pertanyen al VC4. La resta de les mostres no van presentar estrogenicitat i s'han etiquetat amb diferents colors segons els testimonis als quals pertanyen (veure llegenda). "VC" fa referència a totes les mostres sense classificar per testimonis.

Les mostres amb uns EEQ teòrics per sota de 100 pM (corresponent al valor -1 de la Figura IV.37) es van considerar per sota del LOD. Per sobre de 300 pM (corresponent al valor -0.5 de la Figura.IV.37) van ser considerades estrogèniques. Els falsos negatius (fletxes negres) són aquelles mostres en les que no va detectar-se estrogenicitat amb l'ER-RYA però sí que haurien de presentar-ne tenint en compte els càlculs teòrics, en aquest cas, aquelles que tenien un valor logarítmic per sobre de -0.5. Per altra banda, els falsos positius (estrelletes negres) eren aquelles mostres que sí van presentar estrogenicitat per RYA però que no n'haurien de tenir segons els seus càlculs teòrics (valor logarítmic per sota de -1).

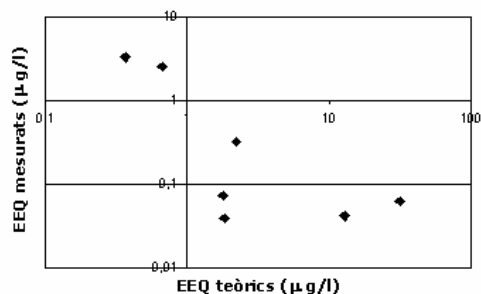
El VC4, que és el que té un major nombre de mostres, és el que aparentment presenta més proporció de falsos negatius (fletxes negres). El VC1 no presenta cap fals negatiu, el VC2 en té 1, el VC3 en té 2, el VC4 en té 5 i el VC5 en té 2. En total hi ha 10 falsos negatius en 60 mostres que representa un índex de falsos negatius del 16.66%. Pel que fa als falsos positius tan sols dues mostres (VC1040 i VC2142,

estrelletes negres), que teòricament haurien de ser estrogèniques, no van ser detectades mitjançant el RYA (índex de falsos negatius del 3.33%)

IV.5.5. Comparació dels EEQ mesurats vers els valors dels EEQ teòrics

Per a veure realment quina era la relació entre els equivalents mesurats i els equivalents teòrics es va traçar un gràfic relacionant-los (Figura IV.38).

A) Extractes orgànics



B) Lixiviats

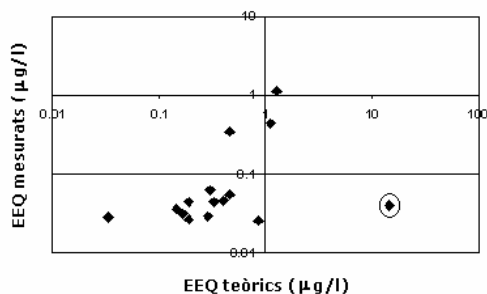


Figura IV.38. Gràfics doble logarítmics que comparen els EEQ determinats amb el sistema ER-RYA de les diferents mostres analitzades amb els seus valors teòrics. Només s'han inclòs els valors de les mostres positives en l'ER-RYA.

En els lixiviats s'observa una relativa bona correlació entre l'activitat real mesurada per RYA i l'activitat teòrica estimada a partir de les concentracions amb l'excepció d'una única mostra marcada amb un cercle. En el cas dels extractes orgànics, la correlació va ser inversa, com es veu en la Taula IV.28 per als PCBs. Això probablement és degut a la presència d'algun compost, que no té perquè ser un PCB però que s'extreu amb ells, que deu inhibir o disminuir l'eficiència de l'assaig o de l'extracció. La inhibició s'observa a partir d'1 ng/g d'equivalents teòrics en sediment en els extractes orgànics i de 10 ng/g en els lixiviats.

Si es comparen els EEQ teòrics de totes les mostres, queda clar que les mostres estrogèniques van presentar una estrogenicitat teòrica major (3.2x) que les no estrogèniques en ambdós tipus d'extractes, essent més gran la diferència en els extractes orgànics que en els lixiviats (2.9x front 1.9x) (Taula IV.31).

Taula IV.31. Mitjanes i desviacions estàndards ($X \pm SD$) dels logaritmes dels EEQ teòrics (en nM) calculats en les mostres estrogèniques i no estrogèniques dels extractes orgànics i dels lixiviats.

	Extractes orgànics i Lixiviats		Extractes orgànics		Lixiviats	
	Mostres estrogèniques	Mostres no estrogèniques	Mostres estrogèniques	Mostres no estrogèniques	Mostres estrogèniques	Mostres no estrogèniques
EEQ teòrics	-0.31±0.60	-0.78±0.53	-0.20±0.68	-0.66±0.57	-0.40±0.56	-0.69±0.59

IV.5.6. Discussió general

L'estrogenicitat observada en els sediments de l'embassament de Flix es pot considerar relativament moderada. El valor mitjà dels EEQ teòrics de les mostres de l'embassament és de 0.5 nM (-0.31 ± 0.60 , Taula IV.30), valor que està en el mateix rang que valors trobats en altres estudis, com en les aigües de l'influent de depuradores de la conca del riu Llobregat (Céspedes *et al.*, 2005). En els dos intercalibrats en els que es va participar (apartat IV.3), les mostres van ser considerades estrogèniques a partir d'uns equivalents (teòrics i mesurats) d'1nM. En les mostres de l'embassament de Flix només hi ha 6 mostres amb una estrogenicitat mesurada per RYA per sobre d'aquest valor (Taula IV.25). Pel que fa als EEQ teòrics, en la Figura IV.37 també es van trobar tan sols 6 mostres amb una estrogenicitat teòrica superior a 1 nM (0.5 en el gràfic), de les quals una es correspon a un fals negatiu. Si es comparen aquestes dades amb les mostres analitzades en els intercalibrats (Figures IV.24 i IV.25), es pot observar que les mostres de Flix estan en la part baixa del marge d'estrogenicitat observada, en concret, només hi ha una (VC2142) que passa de 10nM.

Per a calibrar el possible impacte de l'activitat estrogènica dels sediments de Flix, cal tenir en compte que les mostres de l'intercalibrat són mostres d'aigua mentre que en el cas de Flix es tracta de sediments, a on els compostos sempre estan més concentrats i, possiblement, estan menys biodisponibles. Amb tot això, es pot concloure que les mostres de l'embassament de Flix són poc estrogèniques i, per tant, es pot predir que aquestes mostres no representen un impacte endocrí fort per a les poblacions de peixos i altres animals que hi visquin. Tan sols en el cas d'un animal que mengés directament el sediment, es podria veure afectat.

L'estrogenicitat observada en els sediments de Flix es pot explicar majoritàriament per les concentracions dels compostos químics estudiats. Es va trobar una correlació positiva i significativa (Taula IV.28) entre els compostos químics, especialment els PCBs, i l'estrogenicitat en els lixiviats que es veu emmascarada en el cas dels extractes orgànics per un efecte inhibitori d'alguns compostos que no s'ha pogut caracteritzar. Aquesta correlació també es pot veure en la Figura IV.37 en la que s'ha establert una zona en gris que representa el marge entre les mostres que estan clarament per sota del LOD (EEQ teòrics < 100 pM) i les clarament positives (EEQ teòrics > 300 pM). Tenint en compte que la dilució d'assaig més baixa en el RYA va ser 1:10, aquests valors corresponen a una concentració en l'assaig d'entre 10-30 pM que coincideix amb el LOD calculat per a l'ER-RYA (34 pM, Noguerol *et al.*, 2006a). Per altra banda, l'índex de falsos positius va ser molt baix (3.33%), la

qual cosa va confirmar que no hi havia cap altre compost rellevant en quant a estrogenicitat. Pel que fa als falsos negatius (16.66%), la meitat es van correspondre a mostres del VC4, testimoni que ja s'havia vist que presentava una composició química diferenciada dels altres (Figura IV.34). Ara per ara, no tenim dades que permetin explicar aquests falsos negatius.

Un aspecte que podria alterar el pronòstic d'una baixa estrogenicitat dels sediments de Flix seria l'activació biològica dels compostos. Això és així perquè en alguns casos els receptors de vertebrats *in vivo* no interaccionen amb els compostos originals sinó amb algun dels seus metabòlits. Per exemple, com ja s'ha mencionat (Taula IV.9), la hidroxilació d'aquests compostos augmenta la seva afinitat per l'ER. En aquest cas, va suggerir-se que la incorporació d'un grup hidroxil augmentava la polaritat i, probablement, la biodisponibilitat dels PCBs. El llevat, a diferència d'altres organismes superiors com és el cas dels humans, no és capaç d'activar certs compostos. S'han fet estudis per LC-MS que indiquen que *Saccharomyces cerevisiae* és capaç d'hidroxilar congèneres clorats, com és el cas dels PCBs (Layton et al., 2002), però amb una baixa activitat. Per tal de fer més sensible el sistema RYA als metabòlits secundaris dels compostos organoclorats, actualment s'està desenvolupant en el nostre laboratori un assaig combinat de generació de metabòlits secundaris i RYA basat en microsomes hepàtics que presenten els enzims necessaris per a la metabolització dels diferents xenobiòtics analitzats. Aquest procediment serà molt útil per a avaluar el veritable potencial de disrupció endocrina en mostres complexes. Tot i així, dades prèvies d'un estudi que s'està realitzant en el nostre laboratori sobre peixos de l'embassament de Flix i aigües avall confirmen que no hi ha efectes de disrupció endocrina degut a la contaminació química present en l'embassament de Flix.

V. CONCLUSIONS

Del treball presentat en aquesta tesi es poden extreure les següents conclusions:

1.- El protocol de RYA desenvolupat en aquest treball permet, en principi, una automatització de tot el procés. El mètode d'elecció es basa en la utilització de gens de resposta enzimàtica i la detecció d'aquesta activitat per substrats fluorogènics, facilitada per la permeabilització química del llevat i quantificada a temps real en un espectrofluorímetre de plaques.

2.- L'anàlisi estadística dels límits de detecció va mostrar que els valors de LOD calculats per als sistemes ER-RYA i YCM-RYA van coincidir aproximadament amb l' EC_{10} .

3.- L'anàlisi per RYA de la capacitat d'interacció entre l'ER i l'Ahr i una selecció de compostos aromàtics d'interès mediambiental va mostrar que l'Ahr pot tenir una promiscuitat intrínseca de lligand comparable a la de l'ER, una característica no apreciada totalment en el passat degut a les dificultats tècniques que implica l'anàlisi per RYA de substàncies altament lipofíliques.

4.- L'observació de les estructures dels congèneres de PCBs analitzats que interaccionen amb cada receptor va suggerir que, en el cas de l'Ahr, cal que l'estructura pugui adoptar una conformació coplanària per a poder activar el receptor. El criteri d'unió a l'ER sembla ser més ampli i no requereix la coplanaritat del lligand.

5.- Els resultats de l'intercalibrat europeu per a la detecció d'estrogenicitat en mostres d'aigua mitjançant RYA van mostrar una gran capacitat del RYA per a detectar estrogenicitat de manera reproducible en mostres complexes reals tant pel que fa als estrògens endògens com als afegits. El mètode va ser capaç de donar no només una resposta qualitativa sinó que va mostrar una significativa correlació entre els valors teòrics esperats, calculats a partir de l'anàlisi química dels compostos estrogènics coneguts, i l'estrogenicitat mesurada per RYA.

6.- La monitorització de diferents mètodes de tractament d'aigües residuals per RYA va corroborar la viabilitat de l'eliminació de l'activitat estrogènica pels tractaments aplicats. L'activitat estrogènica de les mostres tractades per depuradores va mostrar una forta contribució del nonilfenol i una menor relació amb la presència d'hormones naturals i sintètiques. La desaparició de l'activitat estrogènica per un procés de desactivació d'hormones per tractament enzimàtic va mostrar una correlació significativa amb les dades químiques.

7.- L'anàlisi dels sediments de diferents testimonis de l'embassament de Flix va demostrar una activitat estrogènica relativament baixa correlacionada amb les concentracions dels compostos organoclorats analitzats, essencialment amb els PCBs. Aquestes concentracions van bastar per a explicar tota l'estrogenicitat observada.

VI. BIBLIOGRAFIA

Abbott, B.D.; Perdew, G.H.; Birnbaum, L.S. Ah receptor in embryonic mouse palate and effects of TCDD on receptor expresión. *Toxicol. Appl. Pharm.* **1994**. *126* (1), 16–25.

Adachi, J.; Mori, Y.; Matsui, S.; Takigami, H.; Fujino, J.; Kitagawa, H.; Miller, C. A.; Kato, T.; Saeki, K.; Matsuda T. Indirubin and indigo are potent aryl hydrocarbon receptor ligands present in human urine. *J. Biol. Chem.* **2001**. *276* (34), 31475-31478.

Ahel, M.; Giger, W.; Koch, M. Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment—I. Occurrence and transformation in sewage treatment. *Water Res.* **1994**. *28*, 1131–1142.

Ahel, M.; Schaffner, C.; Giger, W. Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment—III. Occurrence and elimination of their persistent metabolites during infiltration of river water to groundwater. *Water Res.* **1996**. *30*, 37–46.

Ahlborg, U.G.; Brower, A.; Fingerhut, M.A.; Jacobson, J.L.; Jacobson, S.W.; Kennedy, S.W.; Kettrup, A.A.; Koeman, J.H.; Poiger, H.; Rappe, C. Impact of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and biphenyls on human and environmental health, with special emphasis on application of the toxic equivalency factor concept. *Eur. J. Pharmacol.* **1992**. *228*, 179-199.

Aktas, N.; Cicek, H.; Ünal, A.T.; Kibarer, G.; Kolankaya, N.; Tanyolaç, A. Reaction kinetics for laccase-catalyzed polymerization of 1-naphtol. *Bioresource Technol.* **2001**. *80* (1), 29-36.

Alcock, R.E.; Gemmill, R.; Jones, K.C. Improvements to the UK PCDD/F and PCB atmospheric emission inventory following an emissions measurement programme. *Chemosphere.* **1999**. *38*, 759-770.

Alhasan, S.A.; Ensley, J.F.; Sarkar, F.H. Genistein induced molecular changes in a squamous cell carcinoma of the head and neck cell line. *Int J Oncol.* **2000**. *16*, 333-338.

Andersen, H.; Andersson, A.; Arnold, S.; Autrup, H.; Barfoed, M.; Beresford, N.; Bjerregaard, P.; Christiansen, L.; Gissel, B.; Hummel, R.; Jorgensen, E.; Korsgaard, B.; LeGuevel, R.; Leffers, H.; McLachlan, J.; Moller, A.; Nielsen, J.; Olea, N.; Oles-

Karasko, A.; Pakdel, F.; Pedersen, K.; Perez, P.; Skakkeboek, N.; Sonnenschein, C.; Soto, A.; Sumpter, J.; Thorpe, S.; Grandjean, P. Comparison of short-term estrogenicity tests for identification of hormone-disrupting chemicals. *Environ. Health Perspect.* **1999**. *107*, 89–108.

Aoki, Y. Polychlorinated Biphenils, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, and polychlorinated dibenzofurans as endocrine disrupters-what we have learned from Yusho disease. *Environmental Research.* **2001**. *86*, 2-11.

Arrhenius, A; Backhaus, T.; Gronvall, F.; Junghans, M.; Scholze, M.; Blanck, H. Effects of three antifouling agents on algal communities and algal reproduction: mixture toxicity studies with TBT, Irgarol, and Sea-Nine. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2006**. *50* (3), 335-345.

Arulmozhiraja, S.; Shiraishi, F.; Okumura, T.; Iida, M.; Takigami, H.; Edmonds, J.; Morita, M. Structural requirements for the interaction of 91 hydroxylated polychlorinated biphenyls with estrogen and thyroid hormone receptors. *Toxicol. Sci.* **2005**. *84*, 49-62.

Atlas, E.; Giam, C.S. Global transport of organic pollutants: ambient concentrations in remote marine atmosphere. *Science.* **1981**. *211*, 163-165.

Auriol, M.; Filali-Meknassi, Y.; Adams, C.D.; Tyagi, R.D. Natural and synthetic hormone removal using the horseradish peroxidase enzyme: temperature and pH effects. **2006a**. *Water Res.* *40*, 2847-2856.

Auriol, M.; Filali-Meknassi, Y.; Tyagi, R.D.; Adams, C.D.; Surampalli, R.Y.. Endocrine disrupting compounds removal from the wastewater treatment plant, a new challenge. **2006b**. *Process Biochem.* *41* (3), 525-539.

Auriol, M.; Filali-Meknassi, Y.; Adams, C.D.; Tyagi, R.D.; Noguerol, T.-N.; Piña, B. Removal of estrogenic activity of natural and synthetic hormones from a municipal wastewater: efficiency of horseradish peroxidase and laccase from *Trametes versicolor*. *Chemosphere.* **2007**, en premsa.

Barron, M. Bioconcentration. *Environ. Sci. Technol.* **1990**. *24*, 1612-1618.

Barrón-Gonzalez, A.; Arias-Martinez, J.; Castro-Romero, I. Antiestrogens: mechanism of action and clinical applications. *Salud Publica Mex.*, **2001**. *43* (6), 577-584.

Baumard, P.; Budzinski, H.; Garrigues, P.; Sorbe, J.; Burgeot, T.; Belloq, J. Concentrations of PAHs (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) in various marine organisms in relation to those in sediments and to trophic level. *Mar. Poll. Bull.* **1998**. *36*, 951-960.

Beck, V.; Unterrieder, E.; Krenn, L.; Kubelka, W.; Jungbauer, A. Comparison of hormonal activity (estrogen, androgen and progestin) of standardized plant extracts for large scale use in hormone replacement therapy. *J Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2003**. *84*, 259-268.

Begon, M.; Harper, J.L.; Townsend, C.M. Ecology. Individuals, populations and communities. 3^a ed. Blackwell, London. **1996**.

Bemis, J.C.; Nazarenko, D.A.; Gasiewicz, T.A. Coplanar polychlorinated biphenyls activate the aryl hydrocarbon receptor in developing tissues of two TCDD-responsive lacZ mouse lines. *Toxicol Sci.* **2005**. *87* (2), 529-536.

Bensimon, G.; Lacomblez, L.; Meininger, V. A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *N. Engl. J. Med.* **1994**. *330* (9), 585-591.

Bernes, C. Persistent organic pollutants. A Swedish view of an international problem. Swedish Environment Protection Agency. **1998**.

Blair, R. M. ; Fang, H.; Branham, W.S.; Hass, B.S.; Dial, S.L.; Moland, C.L.; Tong, W.; Shi, L.; Perkins, R.; Sheehan, D.M. The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: Structural diversity of ligands. *Toxicological Sciences.* **2000**. *54* (1), 138-153.

Boronat, S.; Piña, B. Development of RNR3- and RAD54-GUS reporters for testing genotoxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**. *386*, 1625-1632.

Boronat, S.; Casado, S.; Navas, J.M.; Piña, B. Modulation of aryl hydrocarbon receptor transcriptional activation by carbaryl, a non-conventional ligand. *FEBS Journal.* **2007a**, en premsa.

Boronat, S.; Garcia-Reyero, N.; Fonts, R.; Fernández, P.; Grimalt, J.O.; Piña, B. Aryl Hydrocarbon Receptor ligand activity in sediments from Remote European Lakes. *Freshwater Biology.* **2007b**, en premsa.

Bourguet, W.; Ruff, M.; Chambon, P.; Gronemeyer, H.; Moras, D. Crystal structure of the ligand-binding domain of the nuclear receptor RXR- α . *Nature*. **1995**. 375, 377-382.

Bovee, T.; Heskamp, H.; Hamers, A.; Hoogenboom, R.; Nielen, M. Validation of a rapid yeast estrogen bioassay, based on the expression of green fluorescent protein, for the screening of estrogenic activity in calf urine. *Anal. Chem. Acta*. **2005**. 529, 57-64.

Brack, W. Effect-directed analysis: a promising tool for the identification of organic toxicants in complex mixtures? *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2003**. 377 (3), 397-407.

Breman, J.G.; Alilio, M.S.; Mills, A. Conquering the intolerable burden of malaria: What's new, what's needed: a summary. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **2004**. 71 (2 Suppl), 1-15.

Brent, R.; Ptashne, M. Mechanism of action of the *lexA* gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1981**. 78 (7), 4204-4208.

Brent, R.; Ptashne, M. A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell*. **1985**. 43, 729-736.

Brix, R.; Noguerol, T.-N.; Piña, B.; Balaam, J.; Nilsen, A.J.; Tollefsen, K.E.; Levy, W.; Schramm, K.-W.; Barceló, D. Inter-comparison of estrogenicity in water determined by yeast-based assays. Enviat a publicar.

Brown, M.M.; Schneider, U.A.; Petrulis, J.R.; Bunce, N.J. Additive binding of polychlorinated biphenyls and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin to the murine hepatic Ah receptor. *Toxicol Appl Pharmacol*. **1994**. 129, 243-251

Cahill, P.A.; Knight, W.; Billinton, N.; Barker, M.G.; Walsh, L.; Keenan, P.O.; Williams, C.V.; Tweats, D.J.; Walmsley, R.M. The GreenScreen genotoxicity assay: a screening validation programme. *Mutagenesis*. **2004**. 19 (2), 105-119.

Cammarata, P.R.; Chu, Shaoyou; Moor, Andrea; Wang, Zhaohui; Yang, Shao-Hua; Simpkins, J.W. Subcellular distribution of native estrogen receptor α and β subtypes in cultured human lens epithelial cells. *Experimental Eye Research*. **2004**. 78 (4), 861-871.

Can, A.; Semiz, O.; Cinar, O. Bisphenol-A induces cell cycle delay and alters centrosome and spindle microtubular organization in oocytes during meiosis. *Mol. Hum. Reprod.* **2005**. *11* (6), 389-396.

Carson, R. Silent Spring. Houghton Mifflin Company. **1962**.

Carver, L.; Jackiw, V.; Bradfield, C. J. The 90-kDa heat shock protein is essential for Ah receptor signaling in a yeast expression system. *Biol. Chem.* **1994**. *269*, 30109-30112.

Castillo, M.; Barceló, D. Analysis of industrial effluents to determine endocrine-disrupting chemicals. *Trends Anal. Chem.* **1997**. *16*, 574-583.

Castillo, M.; Alonso, M.; Riu, J.; Barceló, D. Identification of polar, ionic and highly water soluble organic pollutants in untreated wastewaters. *Environ. Sci. Technol.* **1999**. *33*, 1300-1306.

Castillo, M.; Martínez, E.; Ginebreda, A.; Tirapu, L.; Barceló, D. Determination of non-ionic surfactants and polar degradation products in influent and effluent water samples and sludges of sewage treatment plants by a generic solidphase extraction protocol. *Analyst.* **2000**. *125*, 1733-1739.

Catelli, M.G.; Binart, N.; Jung-Testas, I.; Renoir, J.M.; Baulieu, E.E.; Feramisco, J.R.; Welch, W.J. The common 90-kd protein component of non-transformed '8S' steroid receptors is a heat-shock protein. *EMBO J.* **1985**. *4*, 3131-3135.

Céspedes, R.; Petrovic, M.; Raldúa, D.; Saura, U.; Piña, B.; Lacorte, S.; Viana, P.; Barceló, D. Integrated procedure for determination of endocrine-disrupting activity in surface waters and sediments by use of the biological technique recombinant yeast assay and chemical analysis by LC-ESI-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**. *378*, 697-708.

Céspedes, R.; Lacorte, S.; Raldúa, D.; Ginebreda, A.; Barceló, D.; Piña, B. Distribution of endocrine disruptors in the Llobregat River basin (Catalonia, NE Spain). *Chemosphere.* **2005**. *61*, 1710-1719.

Choi, K.C.; Jeung, E.B. The biomarker and endocrine disruptors in mammals. *J. Reprod. Dev.* **2003**. *49* (5), 337-345.

Colborn, T.; vom Saal, F.S.; Soto, A.M. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.* **1993**. *101* (5), 378–384

Colborn, T. Environmental estrogens: health implications for humans and wildlife. *Environ. Health Perspect.* **1995**. *103* (Suppl 7), 135–136.

Colborn, T.; Dumanoski, D.; Myers, J.P. Our Stolen Future. *Plume, Penguin Books USA Inc., NY*. **1997**.

Coldham, N.G.; Dave, M.; Sivapathasundaram, S.; McDonnell, D.P.; Connor, C.; Sauer, M.J. Evaluation of a recombinant yeast cell estrogen screening assay. *Environ Health Perspect.* **1997**. *105* (7), 734-742.

Connor, K.; Ramamoorthy, K.; Moore, M.; Mustain, M.; Chen, I.; Safe, S.; Zacharewski, T.; Gillesby, B.; Joyeux, A.; Balaguer, P. Hydroxylated polychlorinated biphenyls (PCBs) as estrogens and antiestrogens: structure-activity relationships. *Toxicol. Appl. Pharm.* **1997**. *145* (1), 111–123.

Cooper, R.L.; Kavlock, R.J. Endocrine disruptors and reproductive development: a weight-of-evidence overview. *Journal of Endocrinology*. **1997**. *152*, 159-166.

Cornwell, T.; Cohick, W.; Raskin, I. Dietary phytoestrogens and health. *Phytochemistry*. **1999**. *65* (8), 995–1016.

Cox, M.B.; Miller, C.A. 3rd. The p23 co-chaperone facilitates dioxin receptor signaling in a yeast model system. *Toxicol. Lett.* **2002**. *129* (1-2), 13-21.

Crews, D.; Bergeron, J.M.; McLachlan, J.A. The role of estrogen in turtle sex determination and the effect of PCBs. *Environmental Health Perspectives*. **1995**. *103*, 73-77.

D'Adamo, R.; Pelosi, S.; Trotta, P.; Sansone, G. Bioaccumulation and biomagnification of polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic organisms. *Marine Chemistry*. **1997**. *56*, 45-49.

Dachs, J.; Van Ry, D.A.; Eisenreich, S.J. Occurrence of estrogenic nonylphenols in the urban and coastal atmosphere of the lower Hudson River estuary. *Environ. Sci. Technol.* **1999**. *33*, 2676-2679.

Danish Environmental Protection Agency (DEPA) Feminisation of fish - The effect of estrogenic compounds and their fate in sewage treatment plants and nature. *Danish Environmental Protection Agency, Environment Minister, Denmark, Environmental project N° 729*, 84 p. **2002**.

Danish Environmental Protection Agency (DEPA) Evaluation of analytical chemical methods for detection of estrogens in the environment. *Danish Environmental Protection Agency, Danish Ministry of the Environment, Working Report N° 44*, 69 p. **2003**.

Degen, G.H.; Bolt, H.M. Endocrine disruptors: update on xenoestrogens. *Int Arch Occup Environ Health*. **2000**. 73 (7), 433-441.

Denison, M.S.; Nagy, S.R. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. **2003**. 43, 309-334.

Desbrow, C.; Routledge, E.J.; Brighty, G.C.; Sumpter, J.P.; Waldock, M. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environmental Science and Technology*. **1998**. 32, 1549-1558.

DeVito, M.; Biegel, L.; Brouwer, A.; Brown, S.; Brucker-Davis, F.; Cheek, A.O.; Christensen, R.; Colborn, T.; Cooke, P.; Crissman, J.; Crofton, K.; Doerge, D.; Gray, E.; Hauser, P.; Hurley, P.; Kohn, M.; Lazar, J.; McMaster, S.; McClain, M.; McConnell, E.; Meier, C.; Miller, R.; Tietge, J.; Tyl, R. Screening methods for thyroid hormone disruptors. *Environ. Health Perspect*. **1999**. 107 (5), 407-415.

De Voogt, P.; Brinkman, U. Production, properties and usage of polychlorinated biphenyls. In *Halogenated biphenyls, naphthalenes, dibenzodioxins and related products; Kimbrough and Jensen, Eds.; Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical division)*. **1989**. pp 3-45.

Duty, S.M.; Singh, N.P.; Silva, M.J.; Barr, D.B.; Brock, J.W.; Ryan, L.; Herrick, R.F.; Christiani, D.C.; Hauser, R. The relationship between environmental exposures to phthalates and DNA damage in human sperm using the neutral comet assay. *Environ. Health Perspect*. **2003**. 111, 1164-1169.

Edwards, D.P. The role of coactivators and corepressors in the biology and mechanism of action of steroid hormone receptors. *J Mammary Gland Biol* **2000**. 5 (3), 307–324.

Elsby, R.; Ashby, J.; Sumpter, J.P.; Brooks, A.N.; Pennie, W.D.; Maggs, J.L.; Lefevre, P.A.; Odum, J.; Beresford, N.; Paton, D.; Park, B.K. Obstacles to the prediction of estrogenicity from chemical structure: assay-mediated metabolic transformation and the apparent promiscuous nature of the estrogen receptor. *Biochem. Pharmacol.* **2000**. 60 (10), 1519–1530.

Erikson, M. Analytical chemistry of PCBs. 2nd ed. Lewis Publishers. **1997**.

Falkay, G.; Hercseg, J.; Sas, M. Microsomal lipid peroxidation in human pregnant uterus and placenta. *Bioch. Diophys. Res. Comm.* **1977**. 39, 843-851.

Fang, H.; Tong, W.; Perkins, R.; Soto, A.M.; Prechtel, N.V.; Sheehan, D.M. Quantitative comparisons of in vitro assays for estrogenic activities. *Environ. Health Perspect.* **2000**. 108 (8), 723-729.

Fanti, P.; Monier-Faugere, M.C. ; Geng, Z. ; Schmidt, J.; Morris, P.E.; Cohen, D.; Malluche, H.H. The phytoestrogen genistein reduces bone loss in short-term ovariectomized rats. *Osteoporos Int.* **1998**. 8 (3), 274-281.

Feldman, D.; Krishnan, A. Estrogens in unexpected places: possible implications for researchers and consumers. *Environ. Health Perspect.* **1995**. 103 (Suppl 7), 129-133.

Fent, K. Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. *Toxicol. In Vitro.* **2001**. 15, 477-488.

Fernández, P.; Vilanova, R.; Grimalt, J.O. Sediment fluxes of polycyclic aromatic hydrocarbons in european high altitude mountain lakes. *Environ. Sci. Technol.* **1999**. 33, 3716-3722.

Fernández, P.; Vilanova, R.; Martínez, C.; Appleby, P.; Grimalt, J. The historical record of atmospheric pyrolytic pollution over Europe registered in the sedimentary PAH from remote mountain lakes. *Environmental Science and Technology.* **2000**. 24, 1906-1913.

Fernández, P.; Grimalt, J.O; Vilanova, M.R. Atmospheric gas-particle partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons in high mountain regions of Europe. *Environ. Sci. Technol.* **2002**. *36*, 1162-1168.

Fernández-Salguero, P.M.; Hilbert, D.M.; Rudikoff, S.; Ward, J.M.; González, F.J. Aryl-hydrocarbon receptor deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1996**. *140*, 173-179.

Fernandez-Salguero, P.M.; Ward, J.M., Sundberg, J.P.; Gonzalez, F.J. Lesions of aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice. *Vet. Pathol.* **1997**. *34*, 605- 614.

Folmar, L.C.; Hemmer, M.J.; Denslow, N.D.; Kroll, K.; Chen, J.; Cheek, A.; Richman, H.; Meredith, H.; Grau, E.G. A comparison of the estrogenic potencies of estradiol, ethynylestradiol, diethylstilbestrol, nonylphenol and methoxychlor in vivo and in vitro. *Aquatic Toxicology.* **2002**. *60*, 101-110.

Foster, P.M. Mode of action: impaired fetal leydig cell function-effects on male reproductive development produced by certain phthalate esters. *Crit Rev Toxicol.* **2005**. *35* (8-9), 713-719.

Fotsis, T. Genistein, a dietary ingested isoflavonoid, inhibits cell proliferation and in vitro angiogenesis. *J. Nutr.* **1995**. *125*, 790S-797S.

Fotsis, T.; Pepper, M.S.; Aktas, E.; Breit, S.; Rasku, S.; Adlercreutz, H.; Wähälä, K.; Montesano, R.; Schweigerer, L. Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. *Cancer Res.* **1997**. *57*, 2916-2921.

Fry, D.M.; Toone, T.K. DDT-induced feminization of gull embryos. *Science.* **1981**. *213*, 922-924.

Frydenvang, K.; Greenwood, J.; Vogensen, S.; Brehm, L. Structural Features of ATPA and Thio-ATPA - Potent and Selective GluR5 Receptor Agonists. Crystal Structure Determinations and Quantum Chemical Calculations. *Struct. Chem.* **2002**. *13*, 479-490.

Gaido, K.W.; Leonard, L.S.; Lovell, S.; Gould, J.C.; Babai, D.; Portier, C.J.; McDonnell, D.P. Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1997**. *143* (1), 205-212.

Gangolli, S.D. Testicular effects of phthalate esters. *Environ. Health Perspect.* **1982.** *45*, 77-84.

Garcia-Reyero, N.; Grau, E.; Castillo, M.; López de Alda, M.; Barceló, D.; Piña, B. Monitoring of endocrine disruptors in surface waters by the yeast recombinant assay. *Environm. Toxicol. Chem.* **2001.** *20* (6), 1152-1158.

Garcia-Reyero, N. Disrupció endocrina i contaminants ambientals: detecció per bioassaig. Genètica. Barcelona, Universitat de Barcelona. Tesi doctoral. **2003.**

Garcia-Reyero, N.; Requena, V.; Petrovic, M.; Fischer, B.; Hansen, P.; Díaz, A.; Ventura, F.; Barceló, D.; Piña, B. Estrogenic potential of halogenated derivatives of nonylphenol ethoxylates and carboxylates. *Environ. Toxicol. Chem.* **2004.** *23* (3), 705-711.

Garcia-Reyero, N.; Piña, B.; Grimalt, J.O.; Fernandez, P.; Fonts, R.; Polvillo, O.; Martrat, B. Estrogenic activity in sediments from european mountain lakes. *Environ. Sci. Technol.* **2005.** *39*, 1427-1435.

Gianfreda, L.; Sannino, F.; Rao, M.A.; Bollag, J-M. Oxidative transformation of phenols in aqueous mixtures. *Water Research.* **2003.** *37*, 3205-3215.

Giesy, J.P.; Jones, P.D.; Kannan, K.; Newsted, J.L.; Tillitt, D.E.; Williams, L.L. Effects of chronic dietary exposure to environmentally relevant concentrations to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on survival, growth, reproduction and biochemical responses of female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* **2002.** *59*, 35-53.

Gill, W.H.; Schumacher, F.B.; Bibbo, M.; Straus, F.H.; Schoenberg, H.W. Association of diethylstilbestrol exposure in utero with cryptorchidism, testicular hypoplasia and semen abnormalities. *Journal of Urology.* **1979.** *122*, 36-39.

Giraldo, J.; Vivas, N.; Vila, E.; Badia, A. Assessing the (a)symmetry of concentration-effect curves: empirical versus mechanistic models. *Pharmacol. Ther.* **2002.** *95* (1), 21-45.

Goldey, E.S.; Kehn, L.S.; Lau, C.; Rehnberg, G.L.; Crofton, K.M. Development exposure to polychlorinated biphenyls (Aroclor 1254) reduces circulating thyroid hormone concentrations and causes hearing deficits in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology.* **1995.** *135*, 77-88.

Goldstein, A.L.; McCusker, J.H. Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **1999**. *15* (14), 1541–1553.

González, S.; Petrovic, M.; Barceló, D. Simultaneous extraction and fate of linear alkylbenzene sulfonates, coconut diethanol amides, nonylphenol ethoxylates and their degradation products in wastewater treatment plants, receiving coastal waters and sediments in the Catalanian area (NE Spain). *J. Chromatogr. A*. **2004**. *1052* (1-2), 111-120.

Gonzalez, F.J.; Fernandez-Salguero, P. The aryl hydrocarbon receptor. Studies using the AHR-null mice. *Drug Metab.Dispos.***1998**. *26* (12), 1194–1198.

Graumann, K.; Jungbauer, A. Agonistic and synergistic activity of tamoxifen in a yeast model system. *Biochem. Pharmacol.* **2000**. *59* (2), 177–185.

Gray, L.E.; Ferrell, J.M.; Ostby, J.S. Alteration of behavioral sex differentiation by exposure to estrogenic compounds during a critical neonatal period: Effects of zearalenone, methoxychlor, and estradiol in hamsters. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **1985**. *80*, 127-136.

Gray, L.E.; Kelce, W.R.; Monosson, E.; Ostby, J.S.; Birnbaum, L.S. Exposure to TCDD during development permanently alters reproductive function in male Long Evans rats and hamsters: reduced ejaculated and epididymal sperm numbers and sex accessory gland weights in offspring with normal androgenic status. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **1995**. *131*, 101-118.

Gray, L.E.; Ostby, J.S. In utero 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) alters reproductive morphology and function in female rat offspring. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **1995**. *133*, 285-294.

Green, S.; Kumar, V.; Theulaz, I.; Wahli, W.; Chambon, P. The N-terminal DNA-binding 'zinc finger' of the oestrogen and glucocorticoid receptors determines target gene specificity. *EMBO J.* **1988**. *7*, 3037-3044.

Green, S.; Chambon, P. Nuclear Hormone Receptors. In Parker, M. G. (ed.), Academic Press, London. **1991**.

Grimalt, J.O.; Gómez-Belinchon, J.I.; Llop, R.; Albaigès, J. Water-phase distribution of hexachlorbenzene in a deltaic environment of the Ebro Delta (Western

Mediterranean) by the study of sedimentary lipid markers. *Mar. Geol.* **1988.** *17*, 1893-1903.

Grimalt, J.O.; Sunyer, J.; Moreno, V.; Amaral, O.; Sala, M.; Rosell, A.; Albaigés, J. Risk excess of soft-tissue sarcoma and thyroid cancer in a community exposed to airborne organochlorinated compound mixtures with a high hexabenzene content. *Intern. J. Cancer.* **1994.** *56*, 200-203.

Grimalt, J.O.; Fernández, P.; Berdié, L.; Vilanova, R.M.; Catalan, J.; Psenner, R.; Hofer, R.; Appleby, P.G.; Rosseland, B.O.; Lien, L.; Massabuau, J.C.; Battarbee, R.W. Selective trapping of organochlorine compounds in mountain lakes of temperate areas. *Environ. Sci. Technol.* **2001.** *35*, 2690-2697.

Guengerich, F.P.; Uebler, D.C. Enzymatic activation of chemicals to toxic metabolites. *CRC Critical Reviews In Toxicology.* **1986.** *14*, 259-307.

Hahn, M.E.; Karchner, S.I.; Shapiro, M.A.; Perera, S.A. Molecular evolution of two vertebrate aryl hydrocarbon (dioxin) receptors (AHR1 and AHR2) and the PAS family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1997.** *94* (25), 13743-13748.

Hahn, M.E. The aryl hydrocarbon receptor: a comparative perspective. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **1998.** *121*, 23-53.

Hanahan, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **1983.** *166*, 557-580.

Hankinson, O. The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1995.** *35*, 307-340.

Harner, T.; Mackay, D.; Jones, K.C. Model of the long-term exchange of PCBs between soil and the atmosphere in the southern UK. *Environ. Sci. Technol.* **1995.** *29*, 1200-1209.

Harrad, S.J.; Sewart, A.P.; Alcock, R.; Boumphrey, R.; Burnett, V.; Duarte-Davidson, R.; Halsall, C.; Sanders, G.; Waterhouse, K.; Wild, S.R.; Jones, K.C. Polychlorinated biphenyls (PCBs) in the british environment: Sinks, sources and temporal trends. *Environ. Pollut.* **1994.** *85*, 131-146.

Heiser, V.; Engemann, S.; Bröcker, W.; Dunkel, I.; Boeddrich, A.; Walter, S.; Nordhoff, E.; Lurz, R.; Schugardt, N.; Rautenberg, S.; Herhaus, C.; Barnickle, G.; Böttcher, H.; Lehrach, H.; Wanker, E.E. Identification of benzothiazoles as potential

polyglutamine aggregation inhibitors of Huntington's disease by using an automated filter retardation assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2002**. 99 Suppl 4, 16400-16406.

Hellou, J.; Mackay, D.; Banoub, J.H. Dietary and aqueous exposure of finfish to organochlorine compounds: a case study. *Arch. Of Environmental Contamination and Toxicology*. **1998**. 34, 280-288.

Hestermann, E.V.; Stegeman, J.J.; Hahn, M.E. Relative contributions of affinity and intrinsic efficacy to aryl hydrocarbon receptor ligand potency. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2000**. 168 (2), 160-172.

Hoff, R.M.; Strachan, W.M.J.; Sweet, C.J.; Chan, C.H.; Shackleton, M.; Bidleman, T.F.; Brice, K.A.; Burniston, D.A.; Cussion, S.; Gatz, D.F.; Harlin, K.; Schroeder, W.H. Atmospheric deposition of toxic chemicals to the great lakes: A review of data through 1994. *Atmos. Environ.* **1996**. 30 (20), 3505-3527.

Honeyman, A.; Cote, C.; Curtiss, R.J. Construction of transcriptional and translational lacZ gene reporter plasmids for use in *Streptococcus mutans*. *J. Microbiol. Methods*. **2002**. 49 (2), 163-171.

Holmes, D.S.; Quigley, M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **1981**. 114, 193-197.

Horii, T.; Ogawa, T.; Nakatani, T.; Hase, T.; Matsubara, H.; Ogawa, H. Regulation of SOS functions: purification of *E. coli* LexA protein and determination of its specific site cleaved by the RecA protein. *Cell*. **1981**. 27 (3 Pt 2), 515-22.

Huang, Q.; Tang, J.; Weber, W.J.Jr. Precipitation of enzyme-catalyzed phenol oxidative coupling products: Background ion and pH effects. *Water Research*. **2005**. 39 (13), 3021-3027.

Huang, Q.; Weber W.J.Jr. Transformation and removal of bisphenol A from aqueous phase via peroxidase-mediated oxidative coupling reactions: efficacy, products, and pathways. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, 39 (16), 6029-6036.

Hunt, P.A.; Koehler, K.E.; Susiarjo, M.; Hodges, C.A.; Ilagan, A.; Voigt, R.C.; Thomas, S.; Thomas B.F.; Hassold, T.J. Bisphenol A exposure causes meiotic aneuploidy in the female mouse. *Current Biology*. **2003**. 13, 546-553.

Idrissi, F-Z.; Piña, B. Functional divergence between the half-sites of the DNA-binding sequence for the yeast transcriptional regulator Rap1p. *Biochem. J.* **1999**. *341 (Pt 3)*, 477-82.

Iguchi, T.; Watanabe, H.; Katsu, Y.; Mizutani, T.; Miyagawa, S.; Suzuki, A.; Kohno, S.; Sone, K.; Kato, H. Developmental toxicity of estrogenic chemicals on rodents and other species. *Congenit Anom (Kyoto)*. **2002**. *42 (2)*, 94-105.

Ikeda, M.; Hirokawa, M.; Satani, N.; Kinoshita, T.; Watanabe, Y.; Inoue, H.; Tone, S.; Ishikawa, T.; Minatogawa, Y. Molecular cloning and characterization of a *steroid* receptor-binding regulator of G-protein signaling protein cDNA. *Gene*. **2001**. 273, 207-214.

Jacobs, M.N.; Dickins, M.; Lewis, D.F. Homology modelling of the nuclear receptors: human oestrogen receptor β (hER β), the human pregnane-X-receptor (PXR), the Ah receptor (AhR) and the constitutive androstane receptor (CAR) ligand binding domains from the human oestrogen receptor α (hER α) crystal structure, and the human peroxisome proliferator activated receptor α (PPAR α) ligand binding domain from the human PPAR γ crystal structure. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2003**. *84 (2-3)*, 117-132.

Jacobson, J.L.; Jacobson, S.W.; Humphrey, H.B. Effects of exposure to PCBs and related compounds on growth and activity in children. *Neurotoxicology and Teratology*. **1996**. *12*, 319-326.

Jefferson, R.A.; Kavanagh, T.A.; Bevan, M.W. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **1987**. *6 (13)*, 3901-3907.

Jimonet, P.; Audiau, F.; Barreau, M.; Blanchard, J.C.; Boireau, A.; Bour, Y.; Coleno, M.A.; Doble, A.; Doerflinger, G.; Huu, C.D.; Donat, M.H.; Duchesne, J.M.; Ganil, P.; Gu er emy, C.; Honor, E.; Just, B.; Kerphirique, R.; Gontier, S.; Hubert, P.; Laduron, P.M.; Le Blevec, J.; Meunier, M.; Miquet, J.M.; Nemecek, C.; Pasquet, M.; Piot, O.; Pratt, J.; Rataud, J.; Reibaud, M.; Stutzmann, J.-M.; Mignani, S. Riluzole Series. Synthesis and in vivo "antiglutamate" activity of 6-substituted-2-benzothiazolamines and 3-substituted-2-imino-benzothiazolines. *J. Med. Chem.* **1999**. *42 (15)*, 2828-2843.

Johnson, J.L.; Craig, E.A. A role for the Hsp40 Ydj1 in repression of basal steroid receptor activity in yeast. *Molecular and Cellular Biology*. **2000**. *20 (9)*, 3027-3036.

Jones, P.B.; Galeazzi, D.R.; Fisher, J.M.; Whitlock, J.P.Jr. Control of cytochrome P1-450 gene expression by dioxin. *Science*. **1985**. 277, 1499-1502.

Kashiyama, E.; Hutchinson, I.; Chua, M.-S.; Stinson, S.F.; Phillips, L.R.; Kaur, G.; Sausville, E.A.; Bradshaw, T.D.; Westwell, A.D.; Stevens, M.F.G. Antitumor benzothiazoles. 8. Synthesis, metabolic formation, and biological properties of the C- and N-oxidation products of antitumor 2-(4-aminophenyl)benzothiazoles. *J. Med. Chem.* **1999**. 42(20), 4172-4184.

Kelce, W.R.; Stone, C.R.; Laws, S.L.; Gray, L.E.; Kemppainen, J.A.; Wilson, E.M. Persistent DDT metabolite pp'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature*. **1995**. 375, 581-585.

Kent, F. Fish cell lines as versatile tool in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. *Toxicology in Vitro*. **2001**. 15, 477-488.

Kim, Y-J.; Nicell, J.A. Impact of reaction conditions on the laccase-catalyzed conversion of bisphenol A. *Bioresource Technol.* **2006a**. 97 (12), 1431-1442.

Kim, Y-J.; Nicell, J.A. Laccase-catalyzed oxidation of bisphenol A with the aid of additives. *Process Biochem.* **2006b**. 41 (5), 1029-1037.

Kleinsasser; N.H.; Weissacher, H.; Kastenbauer, E.R.; Dirschedl, P.; Wallner, B.C.; Harréus, U.A. Altered genotoxicity in mucosal cells of head and neck cancer patients due to environmental pollutants. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol* **2000**. 257, 337-342.

Kolpin, D.W.; Furlong, E.T.; Meyer, M.T.; Thurman, E.M.; Zaugg, S.D.; Barber, L.B.; Buxton, H.T. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* **2002**. 36, 1202-1211.

Kolluri, S.K.; Weiss, C.; Koff, A.; Gottlicher, M. p27(Kip1) induction and inhibition of proliferation by the intracellular Ah receptor in developing thymus and hepatoma cells. *Genes Dev.* **1999**. 13, 1742-1753.

Körner, W.; Bolz, U.; Süßmuth, W.; Hiller, G.; Schuller, W.; Hanf, V.; Hagenmaier, H. Input/output balance of estrogenic active compounds in a major municipal sewage plant in Germany. *Chemosphere*. **2000**. 40 (9-11), 1131-1142.

Kuil, C.W.; Brouwer, A.; van der Saag, P.T.; van der Burg, B. Interference between progesterone and dioxin signal transduction pathways. Different mechanisms are involved in repression by the progesterone receptor A and B isoforms. *J. Biol. Chem.* **1998**. *273*(15), 8829-8834.

Kuiper, G.G.J.M.; Enmark, E.; Pelto-Huikko, M.; Nilsson, S.; Gustafsson, J-A. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad. Sci. USA.* **1996**. *93*, 5925-5930.

Lacomblez, L.; Bensimon, G.; Leigh, P.N.; Guillet, P.; Meininger, V. Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic Lateral Sclerosis/Riluzole Study Group II. *Lancet.* **1996**. *347* (9013), 1425-1431.

Lang, V. Polychlorinated biphenyls in the environment. *Review J. of Chromat.* **1992**. *596*, 1-43.

Layton, A.C.; Gregory, B.W.; Seward, J.R.; Schultz, T.W.; Sayler, G.S. Mineralization of steroidal hormones by biosolids in wastewater treatment systems in Tennessee USA. *Environ. Sci. Technol.* **2000**. *34*, 3925-3931.

Layton, A.C.; Sanseverino, J.; Gregory, B.W.; Easter, J.P.; Sayler, G.S.; Schultz, T.W. In vitro estrogen receptor binding of PCBs: measured activity and detection of hydroxylated metabolites in a recombinant yeast assay. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2002**. *180*, 157-163.

Legler, J.; Jonas, A.; Lahr, J.; Vethaak, A.D.; Brouwer, A.; Murk, A.J. Biological measurement of estrogenic activity in urine and bile conjugates with the in vitro ER-CALLUX reporter gene assay. *Environ. Toxicol. Chem.* **2002**. *21*, 473-479.

Leonhardt, S.A.; Edwards, D.P. Mechanism of action of progesterone antagonists. *Exp. Biol. Med. (Maywood).* **2002**. *227* (11), 969-980.

Leskinen, P.; Michelini, E.; Picard, D.; Karp, M.; Virta, M. Bioluminescent yeast assays for detecting estrogenic and androgenic activity in different matrices. *Chemosphere.* **2005**. *61* (2), 259-66.

Little, J.W.; Mount, D.W.; Yanisch-Perron, C.R. Purified lexA protein is a repressor of the recA and lexA genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1981**. *78* (7), 4199-4203.

Longtine, M.S.; McKenzie, A.; Demarini, D.J.; Shah, N.G.; Wach, A.; Brachat, A.; Philippsen, P.; Pringle, J.R. Additional modules for versatile and economical PCR-

based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **1998**. *14* (10), 953-961.

Looser, R.; Ballschmitter, K. Biomagnification of polychlorinated biphenyls (PCBs) in freshwater fish. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1998**. *360*, 816-819.

López de Alda, M.J.; Barceló, D. Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by fully automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-diode array detection. *J. Chromatogr. A*. **2001**. *911* (2), 203-210.

Lucier, G.W.; Portier, C.J.; Gallo, M.A. Receptor mechanisms and dose-response models for the effects of dioxins. *Environ. Health Perspect.* **1993**. *101*, 36-44.

Lund, B. The role of metabolism in the toxicokinetics of persistent organic pollutants. *Organohalogen Compounds*. **1998**. *37*, 341-344.

Mably, T.A.; Moore, R.W.; Goy, R.W.; Peterson, R.E. In utero and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. 2. Effects on sexual behavior and the regulation of luteinizing hormone secretion in adulthood. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1992**. *114*, 108-117.

Maffini, M.V.; Rubin, B.S.; Sonnenschein, C.; Soto, A.M. Endocrine disruptors and reproductive health: the case of bisphenol-A. *Molecular and Cellular Endocrinology*. **2006**. *254-255*, 179-186.

Mak, H.Y.; Hoare, S.; Henttu, P.M.; Parker, M.G. Molecular determinants of the estrogen receptor-coactivator interface. *Mol. Cell Biol.* **1999**. *19* (5), 3895-3903.

Mangelsdorf, D.J.; Thummel, C.; Beato, M.; Herrlich, P.; Schütz, G.; Umesono, K.; Blumberg, B.; Kastner, P.; Mark, M.; Chambon, P.; Evans, R.M. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*. **1995**. *83*, 835-839

Matikainen, T.; Pérez, G.I.; Jurisicova, A.; Pru, J.K.; Schlezinger, J.J.; Ryu, H.Y.; Laine, J.; Sakai, T.; Korsmeyer, S.J.; Casper, R.F.; Sherr, D.H.; Tilly, J.L. Aromatic hydrocarbon receptor-driven Bax gene expression is required for premature ovarian failure caused by biohazardous environmental chemicals. *Nat. Genet.* **2001**. *28*, 355-360.

Matthews, J.; Zacharewski, T. Differential binding affinities of PCBs, HO-PCBs, and aroclors with recombinant human, rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*), and

green anole (*Anolis carolinensis*) estrogen receptors, using a semi-high throughput competitive binding assay. *Toxicol. Sci.* **2000**. *53* (2), 326–339.

McDonald, J.P.; Frank, E.G.; Levine, A.S.; Woodgate, R. Intermolecular cleavage by UmuD-like mutagenesis proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1998**. *95* (4), 1478-1483.

McLachlan, J.A.; Dixon, R.L. Toxicologic comparison of experimental and clinical exposure to diethylstilbestrol during gestation. *Advances in Sex Steroid Hormone Research.* **1977**. *3*, 309-336.

McVeety, B.D.; Hites, R.A. Atmospheric deposition of polycyclic aromatic hydrocarbons to remote lakes: a mass balance approach. *Atmos. Environ.* **1988**. *22*, 511-536.

Messina, M.J.; Persky, V. ; Setchell, K.D. ; Barnes, S. Soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data. *Nutr Cancer.* **1994**. *21* (2), 113-131.

Miller, C.A. A human aryl hydrocarbon receptor signaling pathway constructed in yeast displays additive responses to ligand mixtures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1999**. *160* (3), 297-303.

Mills, L.J.; Chichester, C. Review of evidence: are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? *Sci. Total Environ.* **2005**. *343* (1-3), 1–34.

Morabito, N.; Crisafulli, A.; Vergara, C.; Gaudio, A.; Lasco, A.; Frisina, N.; D’Anna, R.; Corrado, F.; Pizzoleo, M.A.; Cincotta, M.; Altavilla, D.; Ientile, R.; Squadrito, F. Effects of genistein and hormone-replacement therapy on bone loss in early postmenopausal women: a randomized double-blind placebo-controlled study. *J Bone Miner Res.* **2002**. *17* (10), 1904-1912.

Mueller, S.O. Xenoestrogens: mechanisms of action and detection methods. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**. *378* (3), 582-587.

Muir, D.C.G.; Norstrom, R.J.; Simon, M. Organochlorine contaminants in arctic marine food chains: accumulation of specific polychlorinated biphenyls and chlordane-related compounds. *Environ. Sci. Technol.* **1988**. *22*, 1071-1079.

Muir, D.C.G.; Ford, C.A.; Grift, N.P.; Metner, D.O.; Lockhart, W.L. Geographic variation of chlorinated hydrocarbons in burbot (*Lota lota*) from remote lakes and

rivers in Canada. *Environmental Contamination and Toxicology*. **1990**. *19*, 530-542.

Muir, D.C.G.; Omelchenko, A.; Grift, N.P.; Savoie, D.A.; Lockhart, W.L.; Wilkinson, P.; Brunskill, G.J. Spatial trends and historical deposition of polychlorinated biphenyls in Canadian midlatitude and Arctic lake sediments. *Environ. Sci. Technol.* **1996**. 3609-3617.

Murk, A.J.; Legler, J.; Lipzig, M.M.H.; Meerman, J.H.N.; Bekfroid, A.C.; Spenkelink, A.; Burg, B.V.D.; Rijs, G.B.J.; Vethaak, D. Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three in vitro bioassays. *Environ. Toxicol. Chem.* **2002**. *21*, 16-23.

Nagy, L.; Schwabe, J. Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. *Trends Biochem. Sci.* **2004**. *29* (6), 317-324.

Navas, J.M.; Segner, H. Antiestrogenicity of beta-naphthoflavone and PAHs in cultured rainbow trout hepatocytes: evidence for a role of the arylhydrocarbon receptor. *Aquat. Toxicol.* **2000**. *51* (1), 79-92.

Nebert, D.W.; Puga, A.; Vasiliou, V. Role of the Ah receptor and the dioxin-inducible [Ah] gene battery in toxicity, cancer, and signal transduction. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1993**. *685*, 624-640.

Newton, I. DDT and other organo-chlorines. In Population Ecology of Raptors. Poyser, **1979**.

Nicell, J.A. Enzymatic treatment of waters and wastes. Chemical degradation methods for wastes and pollutants: environmental and industrial applications. M.A. Tarr (ed.), Marcel Dekker Inc., New York. **2003**.

Nishihara, T.; Nishikawa, J.; Kanayama, T.; Dakeyama, F.; Saito, K.; Imagawa, M.; Takatori, S.; Kitagawa, Y.; Hori, S.; Utsumi, H. J Estrogenic activities of 517 chemicals by yeast two-hybrid assay. *Health Sci.* **2000**. *46*, 282-298.

Noguerol, T-N.; Boronat, S.; Jarque, S.; Barceló, D.; Piña, B. Detection of hormone receptor ligands in yeast by fluorogenic methods. *Talanta*. **2006a**. *69*, 351-358.

Noguerol, T-N.; Boronat, S.; Casado, M.; Raldúa, D.; Barceló, D.; Piña, B. Evaluating the interactions of vertebrate receptors with persistent pollutants and

antifouling pesticides using recombinant yeast assays. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006b**. 385, 1012–1019.

Nolte, R.T.; Wisely, G.B.; Westin, S.; Cobb, J.E.; Lambert, M.H.; Kurokawa, R.; Rosenfeld, M.G.; Willson, T.M.; Glass, C.K.; Milburn, M.V. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Nature*. **1998**. 395, 137-143.

Norstrom, R.J.; Simon, M.; Muir, D.C.G.; Schweinsburg, R.E. Organochlorine contaminants in arctic marine food chains: identification, geographical distribution, and temporal trends in polar bears. *Environ. Sci. Technol.* **1988**. 22, 1063-1071.

Odum, J.; Lefevre, P.A.; Tittensor, S.; Paton, D.; Routledge, E.J.; Beresford, N.A.; Sumpter, J.P.; Ashby, J. The rodent uterotrophic assay: Critical protocol features, studies with nonyl phenols, and comparison with a yeast estrogenicity assay. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. **1997**. 25 (2), 176-188.

Ohtake, F.; Takeyama, K.; Matsumoto, T.; Kitagawa, H.; Yamamoto, Y.; Nohara, K.; Tohyama, C.; Krust, A.; Mimura, J.; Chambon, P.; Yanagisawa, J.; Fujii-Kuriyama, Y.; Kato, S. Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature*. **2003**. 423 (6939), 545-550.

Örmo, M.; Cubitt, A.B.; Kallio, K.; Gross, L.A.; Tsien, R.Y.; Remington, S.J. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science*. **1996**. 273 (5280), 1392-1395.

Pabo, C.O.; Sauer, R.T. Protein-DNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.*, **1984**. 53, 293-321.

Parker, M.G. Nuclear Hormone Receptors. *Academic Press*. **1991**.

Pawlowski, S.; Ternes, T.A.; Bonerz, M.; Rastall, A.C.; Erdinger, L.; Braunbeck, T. Estrogenicity of solid phaseextracted water samples from two municipal sewage treatment plant effluents and river Rhine water using the yeast estrogen screen. *Toxicology in Vitro*. **2004**. 18, 129–138.

Peterson, R.E.; Theobald, H.M.; Kimmel, G.L. Developmental and reproductive toxicity of dioxins and related compounds: cross-species comparisons. *Crit. Rev. Toxicol.* **1993**. 23, 283-335.

Petrovic, M.; Díaz, A.; Ventura, F.; Barceló, D. Simultaneous determination of halogenated derivatives of alkylphenol ethoxylates and their metabolites in sludges, river sediments, and surface, drinking, and wastewaters by liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2001a**. *73*, 5886-5895.

Petrovic, M.; Eljarrat, E.; López de Alda, M.J.; Barceló, D. Analysis and environmental levels of endocrine-disrupting compounds in freshwater sediments. *Trends Anal. Chem.* **2001b**. *20*, 637-648.

Petrovic, M.; Solé, M.; López de Alda, M.; Barceló, D. Endocrine disruptors in sewage treatment plants, receiving river waters and sediments: integration of chemical analysis and biological effects in feral carp. *Environ. Toxicol. Chem.* **2002a**. *21 (10)*, 2146-2156.

Petrovic, M.; Rodríguez Fernández-Alba, A.; Borrull, F.; Marce, R.; González Mazo, E.; Barceló, D. Occurrence and distribution of nonionic surfactants, their degradation products, and linear alkylbenzene sulfonates in coastal waters and sediments in Spain. *Environ. Toxicol. Chem.* **2002b**. *21*, 37-46.

Petrovic, M.; Eljarrat, E.; Lopez de Alda, M.J.; Barceló, D. Endocrine disrupting compounds and other emerging contaminants in the environment: a survey on new monitoring strategies and occurrence data. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**. *378*, 549-562.

Pham, T.A.; Hwung, Y.P.; Santiso, M.D.; McDonnell, D.P.; O'Malley, B.W. Ligand-dependent and -independent function of the transactivation regions of the human estrogen receptor in yeast. *Mol. Endocrinol.* **1992**. *6*, 1043-1050.

Pike, A.C.; Brzozowski, A.M.; Hubbard, R.E. A structural biologist's view of the oestrogen receptor. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **2000**. *74 (5)*, 261-268.

Pinto, B.; Garritano, S.; Reali, D. Occurrence of estrogen-like substances in the marine environment of the Northern Mediterranean Sea. *Marine Pollution Bulletin.* **2005**. *50 (12)*, 1681-1685.

Poland, A.; Knutson, J.C. 2,3,7,8 Tetrachlordibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1982**. *22*, 517-554.

Porta, M.; Malats, N.; Jarrod, M.; Grimalt, J.; Rifà, F.; Carrato, A.; Guarner, L.; Salas, A.; Santiago-Silva, M.; Corominas, J.; Andreu, M.; Real, F. Serum levels of organochlorine compounds and K-Ras mutations in exocrine pancreatic cancer. *Lancet*. **1999**. *354*, 2125-2129.

Prasher, D.C. Using GFP to see the light. *Trends Genet*. **1995**. *11* (8), 320-323.

Quirós, L.; Céspedes, R.; Lacorte, S.; Viana, P.; Raldúa, D.; Barceló D.; Piña B. Detection and evaluation of endocrine-disruption activity in water samples from Portuguese rivers. *Environ. Tox. Chem.*, **2005**. *24*, 389-395.

Rapaport, R.A.; Eisenreich, S.J. Historical atmospheric inputs of high molecular weight chlorinated hydrocarbons to Eastern North America. *Environ. Sci. Technol*. **1988**. *22*, 931-941.

Rehmann, K.; Schramm, K.W.; Kettrup, A.A. Applicability of a yeast oestrogen screen for the detection of oestrogen-like activities in environmental samples. *Chemosphere*. **1999**. *38* (14), 3303-3312.

Ribes, S. Procesos de acumulación de los contaminantes orgánicos persistentes en zonas de alta montaña. Universitat Politècnica de Catalunya. Tesi doctoral. **2003**.

Rogan, W.J.; Gladen, B.C.; Hung, K.L.; Koong, S.L.; Taylor, J.S.; Wu, Y.C.; Yang, D.; Ragan, N.B.; Hsu, C.C. Congenital poisoning by polychlorinated biphenyls and their contaminants in Taiwan. *Science*. **1988**. *241* (4863), 334-336.

Rogan, W.J. Yu-Cheng. Chapter 14 in Halogenated Biphenyls, Terphenyls, Naphthalenes, Dibenzodioxins, and Related Products. R.D. Kimbrough and A.A. Jensen, Eds., Elsevier, Amsterdam. **1989**.

Rogan, W.J.; Gladen, B.C.; McKinney, J.D. Polychlorinated biphenyls (PCBs) and dichlorodiphenyl dichloroethane (DDE) in human milk: effects on growth, morbidity and duration of lactation. *American Journal of Public Health*. **1995**. *77*, 1294-1297.

Routledge, E.J.; Sumpter, J.P. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ. Toxicol. and Chem*. **1995**. *15* (3), 241-248.

Rowland, B.; Purkayastha, A.; Monserrat, C.; Casart, Y.; Takiff, H.; McDonough, K.A. Fluorescence-based detection of *lacZ* reporter gene expression in intact and

viable bacteria including *Mycobacterium* species. *FEMS Microbiol. Lett.* **1999**. 179 (2), 317-325.

Ruff, M.; Gangloff, M.; Wurtz, J.M.; Moras, D. Estrogen receptor transcription and transactivation: Structure-function relationship in DNA- and ligand-binding domains of estrogen receptors. *Breast Cancer Res.* **2000**. 2 (5), 353-359.

Rutishauser, B.V.; Pesonen, M.; Escher, B.I.; Ackermann, G.E.; Aerni, H.R.; Suter, M.J.F.; Eggen, R.I.L. Comparative analysis of estrogenic activity in sewage treatment plant effluents involving three in vitro assays and chemical analysis of steroids. *Environ. Toxicol. Chem.* **2004**. 23, 857-864.

Safe, S.H. Modulation of gene expression and endocrine response pathways by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related compounds. *Pharmacol. Ther.* **1995a**. 67 (2), 247-281.

Safe, S.H. Environmental and dietary estrogens and human health: Is there a problem? *Envir. Health Perspect.* **1995b**. 103, 346.

Safe, S. Clinical correlates of environmental endocrine disruptors. *Trends Endocrinol. Metab.* **2005**. 16 (4), 139-144.

Sakuyama, H.; Endo, Y.; Fujimoto, K.; Hatano, Y. Oxidative degradation of alkylphenols by horseradish peroxidase. *J. Bioscience Bioeng.* **2003**. 96, 227-231.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. Molecular cloning: a laboratory manual. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1989**.

Santiago-Josefat, M.B. Regulación transcripcional por el receptor de dioxina en ausencia de xenobióticos. Bioquímica y Biología Molecular y Genética. Málaga, Universidad de Málaga. **2002**.

Schaldach, C.M.; Riby, J.; Bjeldanes, L.F. Lipoxin A4: a new class of ligand for the Ah receptor. *Biochemistry.* **1999**. 38, 7594-7600.

Schmitt, M.; Gellert, G.; Lichtenberg-Frate, H. The toxic potential of an industrial effluent determined with the *Saccharomyces cerevisiae*-based assay. *Water Research.* **2005**. 39, 3211-3218.

Schneider, J. C.; Guarente, L. Vectors for expression of cloned genes in yeast: regulation, overproduction, and underproduction. *Methods Enzymol.* **1991.** *194,* 373-88.

Schriks, M.; Vrabie, C.M.; Gutleb, A.C.; Faassen, E.J.; Rietjens, I.M.; Murk, A.J. T-screen to quantify functional potentiating, antagonistic and thyroid hormone-like activities of poly halogenated aromatic hydrocarbons (PHAHs). *Toxicol In Vitro.* **2006.** *20 (4),* 490-498.

Scippo, M.L.; Argiris, C.; Van De Weerd, C.; Muller, M.; Willemsen, P.; Martial, J.; Maghuin-Rogister, G. Recombinant human estrogen, androgen and progesterone receptors for detection of potential endocrine disruptors. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004.** *378,* 664-669.

Scrimshaw, M.D.; Lester, J.N. In-vitro assays for determination of oestrogenic activity. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004.** *378 (3),* 576-581.

Segner, H.; Navas, J.M.; Schäfers, C.; Wenzel, A. Potencies of estrogenic compounds in in vitro screening assays and in life cycle tests with zebrafish in vivo. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* **2003.** *54,* 315-322.

Shang, D.Y.; Macdonald, R.W.; Ikonomu M.G. Persistence of nonylphenol ethoxylate surfactants and their primary degradation products in sediments from near a municipal outfall in the strait of georgia, british columbia, canada. *Environ. Sci. Technol.* **1999.** *33 (9),* 1366-1372.

Shao, R.; Markstrom, E.; Friberg, P.A.; Johansson, M.; Billig, H. Expression of progesterone receptor (PR) A and B isoforms in mouse granulosa cells: stage-dependent PR-mediated regulation of apoptosis and cell proliferation. *Biol. Reprod.* **2003.** *68 (3),* 914-921.

Sharpe, R.M.; Fisher, J.S.; Millar, M.M.; Jobling, S.; Sumpter, J.P. Gestational and lactational exposure of rats to xenoestrogens results in reduced testicular size and sperm production. *Environ. Health Perspect.* **1995.** *103,* 1136-1143.

Sherman, F. Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* **1991.** *194,* 3-21.

Shi, D.F.; Bradshaw, T.D.; Wrigley, S.; McCall, C.J.; Lelieveld, P.; Fitchner, I.; Stevens, M.F. Antitumor Benzothiazoles. 3. Synthesis of 2-(4-

Aminophenyl)benzothiazoles and evaluation of their activities against breast cancer cell lines in vitro and in vivo. *J. Med. Chem.* **1996**. 39 (17), 3375-3384.

Shibata, H.; Spencer, T.E.; Oñate, S.A.; Jenster, G.; Tsai, S.Y.; Tsai, M.J.; O'Malley, B.W. Role of co-activators and co-repressors in the mechanism of steroid/thyroid receptor action. *Recent Prog. Horm. Res.* **1997**. 14, 141-164.

Shimizu, Y.; Nakatsuru, Y.; Ichinose, M.; Takahashi, Y.; Kume, H.; Mimura, J.; Fujii-Kuriyama, Y.; Ishikawa, T. Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2000**. 97 (2), 779-782.

Shiraishi, F.; Okumura, T.; Nomachi, M.; Serizawa, S.; Nishikawa, J.; Edmonds, J.S.; Shiraishi, H.; Morita, M. Estrogenic and thyroid hormone activity of a series of hydroxy-polychlorinated biphenyls. *Chemosphere.* **2003**. 52 (1), 33-42.

Simonich, S.; Hites, R. Global distribution of persistent organochlorine compounds. *Science.* **1995**. 269, 1851-1854.

Sipes, I.G.; Schnellmann, R.G. Biotransformation of PCBs: Metabolic pathways and mechanisms. In polychlorinated biphenyls (PCBs): mammalian and environmental toxicology. S. Safe and O. Hutzinger, Eds. Springer-Verlag, Heidelberg. **1987**.

Sogawa, K.; Fujii-Kuriyama, Y. Ah receptor, a novel ligand-activated transcription factor. *J. Biochem.* **1997**. 122, 1075-1079.

Solé, M.; López de Alda, M.J.; Castillo, M.; Porte, C.; Ladegaard-Pedersen, K.; Barceló, D. Estrogenicity determination in sewage treatment plants and surface waters from the Catalanian area (NE Spain). *Environ. Sci. Technol.* **2000**. 34, 5076-5083.

Solé, M.; Raldúa, D.; Barceló, D.; Porte, C. Long-term exposure effects in vitellogenin, sex hormones, and biotransformation enzymes in female carp in relation to a sewage treatment works. *Ecotoxicol Environ. Safe.* **2003a**. 56 (3), 373-380.

Solé, M.; Raldúa, D.; Piferrer, F.; Barceló, D.; Porte, C. Feminization of wild carp, *Cyprinus carpio*, in a polluted environment: plasma steroid hormones, gonadal morphology and xenobiotic metabolizing system. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* **2003b**. 136 (2), 145-156.

Sonne, S.B.; Hoei-Hansen, C.E.; Fisher, J.S.; Leffers, H.; Rajpert-de Meyts, E.; Skakkebaek, N.E. Do environmental factors play a role in the aetiology of carcinoma in situ testis and the testicular dysgenesis syndrome? *Verh Dtsch Ges Pathol.* **2004.** *88*, 144-51.

Soto, A.M.; Justicia, H.; Wray, J.; Sonnenschein, C. p-Nonylphenol: A estrogenic xenobiotic released from 'modified' polystyrene. *Environmental Health Perspectives.* **1991.** *92*, 167-173.

Squadrito, F.; Altavilla, D.; Crisafulli, A.; Saitta, A.; Cucinotta, D.; Morabito, N.; D'Anna, R.; Corrado, F.; Ruggeri, P.; Frisina, N.; Squadrito, G. Effect of genistein on endothelial function in postmenopausal women: a randomized, double-blind, controlled study. *Am J Med.* **2003.** *114 (6)*, 470-476.

Sundstrom, G.; Hutzinger, O.; Safe, S. The metabolism of chlorobiphenyls: A review. *Chemosphere.* **1976.** *5*, 267-298.

Sutter, T.R.; Tang, Y.M.; Hayes, C.L.; Wo, Y.Y.; Jabs, E.W.; Li, X.; Yin, H.; Cody, C.W.; Greenlee, W.F. Complete cDNA sequence of a human dioxin-inducible mRNA identifies a new gene subfamily of cytochrome P450 that maps to chromosome 2. *J. Biol. Chem.* **1994.** *269 (18)*, 13092-13099.

Suzuki, K.; Hirai, H.; Murata, H.; Nishida, T. Removal of estrogenic activities of 17 β -estradiol and ethinylestradiol by ligninolytic enzymes from white rot fungi. *Water Res.* **2003.** *37*, 1972-1975.

Tamagawa, Y.; Yamaki, R.; Hirai, H.; Kawai, S.; Nishida, T. Removal of estrogenic activity of natural steroidal hormone estrone by ligninolytic enzymes from white rot fungi. *Chemosphere.* **2006.** *65 (1)*, 97-101.

Tanabe, S.; Tatsukawa, R.A. PCBs and the environment. Ed. Waid, J.S.; CRC Press: Boca Raton, Florida, USA. **1986.**

Tanaka, T.; Nose, M.; Endo, A.; Fujii, T.; Taniguchi M. Treatment of Nonylphenol with Laccase in a Rotating Reactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* **2003.** *96 (6)*, 541-546.

Tham, D.T.; Gardner, C.D.; Haskell, W.L. Clinical review 97: Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological, and mechanistic evidence. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1998.** *83 (7)*, 2223-2235.

Thomas, K.V.; Benstead, R.E.; Thain, J.E.; Waldock, M.J. Toxicity Characterization of Organic Contaminants in Industrialized UK Estuaries and Coastal Waters. *Marine Pollution Bulletin*. **1999**. 38, 925.

Thomas, K.V.; Hurst, M.R.; Matthiessen, P.; Waldock, M.J. Characterization of estrogenic compounds in water samples collected from United Kingdom estuaries. *Environ. Toxicol. Chem.* **2001**. 20 (10), 2165-2170.

Tolosa, I. Contribució al coneixement del cicle biogeoquímic dels contaminants orgànics a la Mediterrània nord-occidental, Universitat de Barcelona. Tesi doctoral. **1993**.

United States Environmental Protection Agency (US EPA) Office of Pesticide Programs. Health Effects Division. Tox oneliners. EPA chem. code 035505 – diuron. *U.S. Environmental Protection Agency N° 12*, 23-24p. **1999**.

Vakharia, D.; Gierthy, J. Rapid assay for estrogen receptor binding PCB metabolic products generated using human liver microsomes and characterized by HPLC fractionation. *Toxicol. In Vitro*. **1999**. 13, 275-282.

Vakharia, D.; Gierthy, J. Use of a combined human liver microsome-estrogen receptor binding assay to assess potential estrogen modulating activity of PCB metabolites. *Toxicol Lett*. **2000**. 114 (1-3), 55-65

Van den Belt, K.; Berckmans, P.; Vangenechten, C.; Verheyen, R.; Witters, H. Comparative study on the in vitro/in vivo estrogenic potencies of 17 β -estradiol, estrone, 17 α -ethynylestradiol and nonylphenol. *Aquat. Toxicol*. **2004**. 66 (2), 183-195.

Van Ry, D.A.; Dachs, J.; Gigliotti, C.L.; Brunciak, P.A.; Nelson, E.D.; Eisenreich, S.J. Atmospheric seasonal trends and environmental fate of alkylphenols in the Lower Hudson River estuary. *Environ. Sci. Technol*. **2000**. 34, 2410-2417.

Vezina, C.; Walker, N.; Olson, R. Subchronic exposure to TCDD, PeCDF, PCB126, and PCB153: effect on hepatic gene expression. *Environ. Health Perspect*. **2004**. 112 (16), 1636-1644.

Vojtek, A. B.; Hollenberg, S.M.; Cooper, J. A. Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell*. **1993**. 74 (1), 205-214.

Wach, A.; Brachat, A.; Pohlmann, R.; Philippsen, P. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **1994**. *10* (13), 1793-1808.

Wagner, M.; Nicell, J.A. Impact of the presence of solids on peroxidase-catalyzed treatment of aqueous phenol. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2003**. *78*, 694-702.

Wagner, M.; Nicell, J.A. Evaluation of horseradish peroxidase for the treatment of estrogenic alkylphenols. *Water Qual. Res. J. Canada*. **2005**. *40* (2), 145-154.

Walker, K.; Vallero, D.A.; Lewis, R.G. Factors influencing the distribution of lindane and other hexachlorocyclohexanes in the environment. *Environ. Sci. Technol.* **1999**. *33*, 4373-4378.

Wania, F.; Mackay, D. Tracking the distribution of persistent organic pollutants. *Environmental Science and Technology*. **1996**. *30*, 390A-396A.

Wathne, B.M.; Patrick, S.; Cameron, N. (Eds.). AL:PE Acidification of mountain lakes: Paleolimnology and Ecology. Part 2: Remote mountain lakes as indicators of air pollution and climate change. *Report 3538-97. Norwegian Institute for Water Research (NIVA), Oslo*. **1997**.

Welshons, W.V.; Lieberman, M.E.; Gorski, J. Nuclear localization of unoccupied oestrogen receptors. *Nature*. **1984**. *307* (5953), 747-749.

Wester, P.W.; van der Ven, L.T.; Vos, J.G. Comparative toxicological pathology in mammals and fish: some examples with endocrine disrupters. *Toxicology*. **2004**. *205* (1-2), 27-32.

Whitfield, G.K.; Hsieh, J-C.; Nakajima, S.; MacDonald, P.N.; Thompson, P.D.; Jurutka, P.W.; Haussler, C.A.; Haussler, M.R. A highly conserved region in the hormone binding domain of the human vitamin D receptor contains residues vital for heterodimerization with retinoid X receptor and for transcriptional activation. *Molecular Endocrinology*. **1995**. *9* (9), 1166-1179.

Whitfield, G.K.; Jurutka, P.W.; Haussler, C.A.; Haussler, M.R. Steroid Hormone receptors: evolution, ligands, and molecular basis of biologic function. *Journal of Cellular Biochemistry Supplements*. **1999**. *32-33*, 110-122.

Willet, K.; Ulrich, E.; Hites, R. Differential toxicity and environmental fates of hexachlorohexane isomers. *Environ. Sci. Technol.* **1998**. *32*, 2197-2207.

Williams, S.P.; Sigler, P.B. Atomic structure of progesterone complexed with its receptor. *Nature*. **1998**. 393 (6683), 392-396.

Wittlinger, R.; Ballschmitter, K. Congener specific determination of polychlorinated biphenyls (PCB) and occurrence of alpha- and gamma- hexachlorocyclohexane (HCH), 4,4'-DDE and 4,4'-DDT in continental air. *Chemosphere*. **1987**. 16, 2497-2513.

Yin, G.G.; Kookana, R.S.; Ru, Y.J. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environment International* **2002**. 28 (6), 545-551.

Ying, G.G.; Williams, B.; Kookana, R. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates – a review. *Environment International*. **2002**. 28 (3), 215-226.

Yoshida, M.; Hayakawa, I.; Hayashi, N.; Agatsuma, T.; Oda, Y.; Tanzawa, F.; Iwasaki, S.; Koyama, K.; Furukawa, H.; Kurakata, S.; Sugano, Y. Synthesis and biological evaluation of benzothiazole derivatives as potent antitumor agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**. 15(14), 3328-3332.

Zhang, Y.Z.; Naleway, J.J.; Larison, K.D.; Huang, Z.J.; Haugland, R.P. Detecting *lacZ* gene expression in living cells with new lipophilic, fluorogenic β -galactosidase substrates. *FASEB J.* **1991**. 5 (15), 3108-3113.

Zhang, Z.; Cergnet, M.; Mullins, C.; Williamson, M.; Bessert, D.; Skoff, R. Comparison of in vivo and in vitro subcellular localization of estrogen receptors α and β in oligodendrocytes. *Journal of Neurochemistry*. **2004**. 89, 674-684.

VII. ANNEXOS

ANNEX I

Taula VII.1. Concentracions dels alquilfenols (en mg/l) i hormones (en µg/l) presents en els extractes de les mostres reals.

	OP	NP	NP fortificat	NP ₁ EO	E1	E2	E2 fortificat	E3	EE2	DES	Genisteïna
Mostra 2	20.74	9.94		1	0.34	b.d.l		7.82	b.d.l	b.d.l	b.d.l
Mostra 3	0.33	0.64		12	4.48	0.27		b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l
Mostra 4	0.27	0.14	0.62	1.17	b.d.l	b.d.l	1.44	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l

En aquesta taula les abreviacions són: OP, Octilfenol; NP, Nonilfenol; NP₁EO Nonilfenol monoetoxilat; E2, 17β-estradiol; E3, estriol; EE2, 17α-etinilestradiol; E1, estrona; i DES, dietilestilbestrol.

b.d.l: per sota del límit de detecció (*below detection limit*).

Taula VII.2. Concentracions dels alquilfenols (en mg/l) i hormones (en µg/l) presents en els extractes de les mostres reals.

	OP	NP	NP fortificat	NP ₁ EO	E1	E2	E2 fortificat	E3	EE2	DES	Genisteïna
Mostra 7	0.31	0.27		6.01	6.18	b.d.l		4.20	b.d.l	b.d.l	b.d.l
Mostra 8	0.31	0.27		6.01	6.18	b.d.l	2.7	4.20	b.d.l	b.d.l	b.d.l
Mostra 9	0.31	0.27	11.02	6.01	6.18	b.d.l		4.20	b.d.l	b.d.l	b.d.l
Mostra 10	0.31	0.27	11.02	6.01	6.18	b.d.l	2.7	4.20	b.d.l	b.d.l	b.d.l
Mostra 11	0.31	0.27		6.01	6.18	b.d.l	4.1	4.20	b.d.l	b.d.l	b.d.l

En aquesta taula les abreviacions són: OP, Octilfenol; NP, Nonilfenol; NP₁EO Nonilfenol monoetoxilat; E2, 17β-estradiol; E3, estriol; EE2, 17α-etinilestradiol; E1, estrona; i DES, dietilestilbestrol.

b.d.l: per sota del límit de detecció (*below detection limit*).

ANNEX II

Taula VII.3. Concentracions en ng/l dels compostos de les Fraccions I i II identificats i quantificats pel grup de la Dra. Sílvia Lacorte.

		Composició química (ng/l)									
		Fracció I					Fracció II				
		NP	NP _{1EO}	NP _{2EO}	BPA	E1	E2	E3	EE2		
	27-03-06	1998	7729	3058	21.4	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l		
	28-03-06	b.d.l	11389	3844	42.8	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l		
	29-03-06	b.d.l	14251	2952	118	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l		
Mostres Efluent	30-03-06	b.d.l	6594	b.d.l	98.7	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l		
	31-03-06	1041	13279	3517	223	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l		
	04-01-06	5739	8760	3199	101	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l		
	04-02-06	297	9419	2256	14.3	b.d.l	b.d.l	b.d.l	b.d.l		
	27-03-06	29397	>21595 ^{a)}	29572	b.d.l	b.d.l	b.d.l	6.94	b.d.l		
	28-03-06	30457	>21595 ^{a)}	20804	1163	5.62	b.d.l	17.2	b.d.l		
	29-03-06	23736	>21595 ^{a)}	25797	1381	b.d.l	b.d.l	9.12	b.d.l		
Mostres Influent	30-03-06	26195	>21595 ^{a)}	17585	2059	7.15	b.d.l	3.27	b.d.l		
	31-03-06	31045	>21595 ^{a)}	27796	675	b.d.l	b.d.l	3.18	b.d.l		
	04-01-06	27797	>21595 ^{a)}	16654	1175	4.08	b.d.l	16.0	b.d.l		
	04-02-06	16279	>21595 ^{a)}	20327	537	6.47	b.d.l	7.61	b.d.l		

En aquesta taula les abreviacions són: NP, nonilfenol; NP_{1EO}, nonilfenol monoetoxilat; NP_{2EO}, nonilfenol dietoxilat; BPA, bisfenol A; E1, estrona; E2, 17 β -estradiol; E3, estriol; i EE2, 17 α -etililestradiol.

^{a)} Màxim nivell de detecció per GC-MS del NP_{1EO}.

b.d.l: per sota del límit de detecció (*below detection limit*).

ANNEX III

En la Taula VII.4 es pot veure la concentració, determinada pel grup del Dr. Grimalt, dels diferents compostos organoclorats analitzats i que s'agrupen en:

- Clorobenzens (CBs): PeCB i HCB
- Policlorobifenils (PCBs): PCB28, PCB52, PCB101, PCB118, PCB138, PCB153, PCB180 i PCB209
- DDEs: 4,4'-DDT i 4,4'-DDE
- Hexaclorociclohexans (HCHs): α -HCH, β -HCH i γ -HCH

Taula VII.4. Concentracions en ng/g de sediment dels diferents grups de compostos analitzats (CBs, PCBs, DDEs i HCHs) per a cada mostra.

	CBs	PCBs	DDEs	HCHs
VC1017	46000	601	141	220
VC1020	44900	1087	216	183
VC1023	31800	622	187	149
VC1031	19900	555	182	241
VC1040	25100	581	162	96
VC1044	45000	939	417	109
VC1050	39400	648	119	69.8
VC1091	14400	2582	810	11
VC1103	5500	1156	490	214
VC1130	167	88.13	38	8.2
VC1151	27	2.2	12	3.4
VC2005	32000	573	580	36
VC2020	25600	424	190	700
VC2050	28400	252	200	41
VC2078	46000	393	420	29
VC2106	30000	1080	281	27
VC2133	24000	1390	369	33
VC2142	16400	412	164	11
VC2150	12200	2037	917	13
VC2159	1070	512	168	8.9
VC2174	15000	1442	77	16
VC2191	940	229	16	15
VC3011	34000	511	272	22
VC3020	972	373.8	8.6	15
VC3029	71300	480	140	14
VC3038	45300	804	403	0
VC3051	40700	1850	920	17
VC3064	26000	1608	200	0
VC3067	22800	1610	84	0
VC3078	11400	306	120	0
VC3093	17800	800	340	746.2
VC3103	22600	1031	1160	7.3
VC3120	8200	5370	160	0
VC3144	6000	434	250	10
VC4006	34500	1104	45800	15
VC4018	54700	3225	366	18.8
VC4038	47700	4100	7900	40
VC4051	27500	804	228	1023.6
VC4062	63000	58400	10860	22
VC4075	12000	1298	123	6
VC4088	48000	19200	5510	31
VC4100	214000	3849	420	173
VC4119	71000	5830	530	42
VC4134	38000	10800	155	0
VC4146	35600	14280	143	6.6
VC4158	43000	3560	9.9	42
VC4170	23400	10990	38	0
VC4200	64000	8590	700	0
VC4216	8900	3515	139	29
VC4237	18600	14690	155	160
VC5011	2054	1003	46	16
VC5014	10490	2638	840	15
VC5020	5470	1424	84	0
VC5029	18300	416	64	12
VC5038	7560	969	93	12
VC5047	3110	330	37	0
VC5056	1460	473.8	80	25.1
VC5065	22300	518	20	694.6
VC5068	24000	425	15	13
VC5074	1819	135.9	29	0

Les concentracions dels compostos organoclorats (CBs, PCBs, DDEs i HCHs) trobades en els sediments de l'embassament de Flix van ser molt elevades tant si es comparen amb dades de sediments de zones remotes com amb dades industrials. Per exemple, les concentracions d'HCB van variar entre 15-36000, 780-28000, 940-67000, 3500-74000 i 1200-23000 ng/g en els testimonis VC1, VC2, VC3, VC4 i VC5, respectivament. Aquests valors es poden comparar amb altres concentracions com dades trobades en sediments marins o lacustres de zones remotes (0.05-1.8 ng/g), zones de contaminació moderada (1.5-14 ng/g) i zones industrials i urbanes (75-180 ng/g). Com es pot veure, els valors de referència són molt més baixos que els trobats en els sediments de l'embassament de Flix. De manera semblant, les concentracions de PeCB van ser molt altes, 12-14000, 50-18000, 32-32000, 2000-140000 i 19-3300 ng/g en els testimonis VC1, VC2, VC3, VC4 i VC5, respectivament. Pel que fa a aquests dos contaminants, les zones dels testimonis VC3 i VC4 són les que van mostrar concentracions més altes.

Les concentracions de PCBs també van trobar-se molt per sobre del descrit en la bibliografia. Els nivells trobats van ser 2.2-130800, 229-2037, 306-5370, 804-58400 i 135.9-2638 ng/g en els testimonis VC1, VC2, VC3, VC4 i VC5, respectivament. En àrees remotes es troben valors de 0.6-30 ng/g i en zones sota influència industrial i urbana les concentracions són de l'ordre de 100-500 ng/g. Independentment del fet que les dades referenciades corresponien a la suma de diferents congèneres, el contrast és prou fort com per a mostrar de forma clara que les concentracions en l'embassament de Flix estaven per sobre de les descrites en la bibliografia. Les zones al voltant del VC1 i VC4 són les que van mostrar uns nivells més alts d'aquests compostos.

Les concentracions de DDEs també van ser altes en relació a estudis anteriors. Els nivells trobats van ser 12-4900, 16-917, 8.6-1160, 9.9-45800 i 15-840 ng/g en els testimonis VC1, VC2, VC3, VC4 i VC5, respectivament. Els valors descrits en la bibliografia de sediments marins i lacustres són de l'ordre de 0.1-5 ng/g i en zones d'aportacions industrials i urbanes són de l'ordre de 50-400 ng/g. Novament, en els sediments de l'embassament es trobaven nivells clarament més alts. Un aspecte important a esmentar és que les concentracions més altes trobades en l'embassament es corresponen a un predomini clar del 4,4'-DDT, és a dir, probablement reflecteixen la conservació d'aquest contaminant, el sintetitzat originalment, en les mostres que són objecte d'estudi.

Els isòmers dels HCHs que es van trobar són els α , β i γ amb fort predomini dels β . No es van trobar concentracions de δ -HCH ni ϵ -HCH. Les concentracions totals

d'aquests compostos comportaven valors de 0-241, 8.9-700, 0-746.2, 0-1023.6 i 0-694.6 ng/g en els testimonis VC1, VC2, VC3, VC4 i VC5, respectivament. Aquests valors són alts quan es troben per sobre de 200 ng/g. El predomini de l'isòmer β probablement és degut al fet que aquest és el compost més insoluble en aigua d'aquest grup, la qual cosa afavoria la seva retenció en els sediments.

En la Taula VII.5 s'indica el tant per cent de TOC present en cada mostra en relació amb la profunditat (en cm) en la que es va recollir.

Taula VII.5. Tant per cent de TOC present en cada mostra i profunditat (en cm) en la que es van agafar la mostra.

	Secció (cm)	TOC%		Secció (cm)	TOC%
VC1017	15-18	9.7	VC3093	89-97	0.64
VC1020	18-21	15	VC3103	102-105	0.4
VC1023	21-24	10	VC3120	118.5-121	0.7
VC1031	30-33	8.2	VC3144	143-146	0.39
VC1040	39-42	12	VC4006	38903	0.74
VC1044	42-45	15	VC4018	16-20	0.48
VC1050	48-51	19	VC4038	35.5-38-40	2.8
VC1091	90-93	9.2	VC4051	49-52	0.35
VC1103	102-105	0.67	VC4062	61-63.5	0.83
VC1130	128-131	0.78	VC4075	73-76	0.55
VC1151	150-153	2.1	VC4088	86-89	0.72
VC2005	38871	4.9	VC4100	98.5-102	9.2
VC2020	18-21	11	VC4119	117-120	0.38
VC2050	48-51	17	VC4134	132-135	0.81
VC2078	76-79	17	VC4146	144.5-147	0.7
VC2106	104-107	12	VC4158	156-159	0.23
VC2133	131-135	24	VC4170	168-171	0.65
VC2142	141-144	27	VC4200	198.5-202	1.5
VC2150	148-151	10	VC4216	214-217	0.46
VC2159	157-160	26	VC4237	235-238	0.75
VC2174	172.5-177	12	VC5011	41548	0.79
VC2191	189-192	16	VC5014	13-16	0.72
VC3011	10-13.5	3.1	VC5020	19-22	0.75
VC3020	19-22	3	VC5029	28-31	0.75
VC3029	27.5-30	4.8	VC5038	37-40	0.72
VC3038	36-39	2.8	VC5047	46-49	0.76
VC3051	49-52	0.25	VC5056	55-58	0.77
VC3064	62-65	0.16	VC5065	64-67	0.57
VC3067	65-69.5	0.31	VC5068	67-70	0.62
VC3078	77-79	0.24	VC5074	73-76	0.18

Els marges del contingut en matèria orgànica (Taula VII.5) dels testimonis VC1, VC2, VC3, VC4 i VC5 van ser, respectivament, 0.78-19%, 4.9-27%, 0.16-4.8%, 0.23-9.2% i 0.18-0.79%. Els testimonis VC1 i VC2 tenien, en general, continguts de matèria orgànica molt elevats. Com a referència val dir que els nivells de

matèria orgànica riu avall van ser inferiors a l'1.5%. Aquestes dades indiquen que aproximadament la meitat del dipòsit de sediments tenia uns continguts importants de matèria orgànica clarament d'origen antropogènic.

