

Optimización de una técnica de medida de disrupción endocrina por medio de *Saccharomyces cerevisiae* recombinantes

Keel, K. ⁽¹⁾, Míguez, D. ⁽¹⁾, Soares, A. ⁽²⁾, Parodi, A. ^(3,4)

⁽¹⁾ Departamento de Aguas y Productos Químicos, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU - ⁽²⁾ Cranfield University, School of Applied Science, Centre for Water Science, College Road, Cranfield, Bedfordshire, MK43 0AL - ⁽³⁾ Sección Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay - ⁽⁴⁾ Unidad de Biología Molecular, Instituto Pasteur, Uruguay.

Contacto: kkeel@latu.org.uy

Recibido: 1/07/2010 - Aprobado: 25/10/2010

Resumen

Los disruptores endocrinos son sustancias químicas, exógenas al organismo, capaces de alterar la homeostasis del sistema endocrino-reproductivo. Un grupo de ellos, los compuestos estrogénicos, pueden ocasionar efectos negativos sobre la capacidad reproductiva de algunos peces, disminución de la fertilidad, la aptitud sexual y la producción de esperma y feminización de los machos. En este trabajo se describe el desempeño analítico de un método para la cuantificación de estrogenicidad en aguas. Se utilizó la técnica Yeast Estrogen Screen (YES) con *Saccharomyces cerevisiae* recombinante, una levadura modificada genéticamente que expresa el receptor de estrógenos humano y un plásmido de expresión con el gen reportero lacZ, bajo el control de elementos de respuesta a estrógenos. Dicho gen codifica para la β -galactosidasa, que se secreta al medio y metaboliza un sustrato cromogénico, observándose un cambio de color que se mide a 420 nm. Se utilizaron estándares de 17 β -estradiol para realizar una curva de calibración en el rango de concentraciones entre 1.75 ng/l y 7.5 μ g/l. Las curvas sigmoides dosis-respuesta obtenidas se ajustaron mediante la función de Hill y los r^2 fueron mayores a 0,95. El límite de detección fue de 55 ng/l. La estrogenicidad para las muestras ensayadas fue no detectable.

Palabras clave: Estrogenicidad, YES, β -galactosidasa.

Abstract

Endocrine disruptors are exogenous chemical substances to the organism, capable of altering the homeostasis of the endocrine-reproductive system. A group of these, estrogenic compounds, may cause negative effects on reproductive capacity of some fish, decreasing fertility, sexual ability, sperm production and feminization of males. This paper describes the analytical performance of a method for the quantitation of estrogenicity in water. The technique used was the Yeast Estrogen Screen (YES) with recombinant *Saccharomyces cerevisiae*, a genetically modified yeast with human estrogen receptor expression and a plasmid with the lacZ reporter gene under the control of estrogen response elements. The gene coding for β -galactosidase, which is secreted to the medium catalyzes the metabolism of a chromogenic substrate, showing a color change measure to 420 nm. The standard 17 β -estradiol was used to build a calibration curve in the range of concentrations between 1.75 ng/l and 7.5 μ g/l. Sigmoid curves of dose - response obtained were fitted by the Hill function and r^2 was greater than 0.95. The method detection limit is 55 ng/l. The analyzed samples showed no detectable estrogenicity.

Keywords: Estrogenicity, YES, β galactosidase.

Introducción

Durante las dos últimas décadas se ha generado un gran interés por los disruptores endocrinos (endocrine disrupting compounds - EDC). Los EDC son sustancias químicas, exógenas al organismo, que tienen la capacidad de alterar la homeostasis del sistema endocrino-reproductivo (Argemi, 2005). En general, son sustancias lipofílicas, por lo cual se bioacumulan fácilmente en el tejido adiposo, persisten y pueden transmitirse en la cadena alimentaria.

Los EDC pueden ser encontrados en ambientes naturales: feromonas, micoestrógenos, fitoestrógenos y hormonas esteroideas presentes en desechos humanos y animales, los cuales son descargados a efluentes municipales y plantas de tratamiento que en muchas ocasiones no tienen tecnología para removerlos (Wolfand, 2007). Entre los EDC artificiales se encuentran insecticidas, muchos de ellos de uso doméstico, como el diclorodifeniltricloroetano (DDT) y sus metabolitos, el aldrin y el paratión, funguicidas (mancozeb, zineb), moluscocidas (tributilestaño) y herbicidas (atrazina, trifluralin)

(Jobling, 2002). Además, pertenecen a este grupo sustancias de uso cotidiano en el hogar o la industria, como alquilfenoles (tensoactivos no iónicos en artículos de limpieza y en ciertos alimentos elaborados), bifenilos policlorados (PCBs) (lubricantes y aisladores en transformadores), ftalatos (componentes de plásticos blandos en juguetes infantiles), bisfenol-A (policarbonatos y resinas epoxi, en maderas transparentes y envases de alimentos, respectivamente), estrógenos artificiales, como el dietilestilbestrol - DES (anticonceptivo), 3-benzofenona (componente de los filtros UV en cremas) y contaminantes ambientales, como las dioxinas, los furanos y ciertos hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) (Olea, 2001).

Los EDC pueden ser la causa de: incremento de anomalías reproductivas y disfunciones sexuales, tanto en humanos como en la vida salvaje (Arnold, 1996), aumento de ciertos cánceres, como por ejemplo el de seno (De Boever, 2001), baja cantidad de esperma (Jobling, 2002), disminución de la fertilidad (Parrott, 2005), cambio de la aptitud sexual (Kristensen, 2005), feminización de peces machos (Lange, 2001), anatomía gonadal modificada, concentraciones

hormonales alteradas en plasma (Arnold, 1996).

Años atrás se utilizaban los ensayos químicos para determinar la presencia de compuestos estrogénicos; hoy en día los estudios basados en bioindicadores son los más aplicados. Estos indicadores no sólo distinguen activadores xenobióticos mediados a través de unión ligando-receptor, como los estrógenos, sino también a aquellos que pueden estimular indirectamente eventos intracelulares (Biales, 2007).

Funcionamiento del Biosensor - *Saccharomyces cerevisiae* recombinante

En este caso se utilizan como biosensor levaduras *Saccharomyces cerevisiae* manipuladas genéticamente, con el objetivo de otorgarle la capacidad de detectar el potencial estrogénico de compuestos con actividad hormonal por medio de respuestas colorimétricas. Esta técnica lleva por nombre "Yeast Estrogen Screen" (YES), según lo establecido por el protocolo de Routledge y Sumpter (1996). *Saccharomyces cerevisiae* es un organismo al que se le conoce totalmente su genoma y es considerado también como modelo simple de célula eucariótica. Para transformarlo en un biosensor se lo modifica específicamente, con la adición de la secuencia de ADN del receptor estrogénico humano (hER- α) en el genoma propio de la levadura y de un plásmido que lleva un gen reportero (lac-Z), el cual codifica para la síntesis de la enzima β -galactosidasa gracias a la ayuda del promotor transcripcional y secuencias específicas de ADN que se comportan como elementos de respuesta a estrógenos (estrogen responsive elements -ERE).

Los estrógenos tienen la capacidad de unirse a los receptores de estrógeno y luego regular la expresión de ciertos genes (Figura 1). El receptor de estrógeno es expresado desde el genoma de la levadura (1) y capaz de unirse a los ERE, los cuales se ubican por delante de un promotor fuerte del plásmido de expresión (2). Cuando la levadura modificada se expone a un contaminante con potencial estrogénico, se une al receptor hormonal y éste se transforma en un receptor activo (3). El receptor activo modula así positivamente la transcripción génica. Esto provoca la expresión del gen reportero lac-Z (4) y la producción de la enzima β -galactosidasa, que es secretada al medio (5). Esta enzima puede metabolizar sustratos cromogénicos como O-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG), hidrolizado en una solución alcalina a galactosa y O-nitrophenol (ONP). Se observa un cambio de color de incoloro a amarillo debido a la presencia de ONP; la medida de absorbancia se realiza a 420 nm (6).

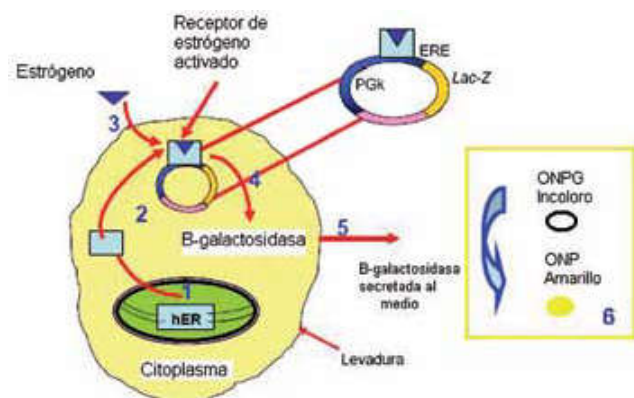


Figura 1. Esquema de las reacciones en cadena que ocurren luego de que un compuesto estrogénico se une al receptor de estrógenos incorporado en la levadura (extraída y modificada de Routledge, 1996).

El objetivo de este trabajo fue poner a punto la técnica de YES, realizar un estudio de desempeño analítico del método, comparando su sensibilidad con la obtenida por otros autores y, por último, aplicarlo en la determinación de posible estrogénicidad de muestras ambientales, tales como agua natural y efluentes.

Materiales y Métodos

El agua usada para la realización de soluciones fue ultrapura (agua miliQ de resistividad mayor a 18,2 M Ω) y esterilizada previamente con filtración por 0,2 μ m. El material utilizado fue esterilizado y todas las manipulaciones se realizaron en ambiente estéril. Las placas de selección se prepararon agregando 20 ml de YNB (Yeast Nitrogen Base without Amino Acid, Difco, 67 g/l), 4 g de bactoagar (Amresco, grado bacteriológico) y 156 ml de agua, luego de ser autoclavadas se le adicionaron 2 ml de solución de Lisina (L-Histidina-HCl, Amresco USP grade, 2,4 g/l), 2 ml de solución de Histidina (L-Histidina-HCl, Amresco FCC grade, 2,4 g/l) y 20 ml de solución de dextrosa 20% (Mallinckrodt Chemical, Estados Unidos). Luego se colocaron aproximadamente 15 ml de medio por cada placa de aproximadamente 10 cm de diámetro (Nelson, 2007). El medio de crecimiento fue preparado con 100 ml de YNB previamente autoclavado (67 g/l), 100 ml de dextrosa 20%, 10 ml de lisina (1,8 g/500ml) y 10 ml de histidina (1,2 g/500ml) para 1000 ml de volumen final. Luego se esteriliza filtrando por filtros de 0,2 μ m (cellulose nitrate filter, Santorius, Goettingen, Alemania) (Nelson, 2007).

Extracción de muestras en fase sólida

Las muestras ensayadas fueron provenientes de la zona de mezcla de un efluente cloacal con agua natural y un efluente industrial de producción de pulpa de celulosa con tratamiento secundario, ambas con posible presencia de sustancias estrogénicas. Se realizó una toma de 1 litro de muestra, acidificando con H₂SO₄ hasta pH 2,0 y se filtró por 0,45 μ m (filtros de membrana de vidrio, Macherey Nagel, Deutshan, Suiza). Se realizó una extracción en fase reversa (Sep-Pak® Vac 6cc, 500mg, Waters, Irlanda) con equipo de filtración Easy-Prep (Whatman, Inglaterra). Previamente la columna se acondicionó con 5 ml de metanol anhidro y 5 ml de agua. Luego de la extracción la columna se centrifugó por 10 minutos a 2000 g y se secó bajo corriente de nitrógeno. La elución se realizó con 5 ml de acetona, luego se secó bajo corriente de nitrógeno y se reconstituyó en 1 ml de etanol absoluto. Se almacenó a 4 °C hasta la realización del ensayo (máximo 14 días) (Pawlowski, 2004).

Reconstitución de levadura recombinante

Se trabajó con la cepa de levadura recombinante (*Saccharomyces cerevisiae*, cepa BJ3505) que contiene el receptor de estrógenos humano (Gaido, 1997). Para la reconstitución se colocaron los filtros con la cepa de levadura en forma invertida dentro de una placa de selección, se cultivaron a 30 °C y se esperó entre cinco y siete días a que las colonias se hicieran visibles.

Luego de crecidas se repicaron las colonias a otra placa de selección y una vez que crecieron nuevamente se seleccionó una colonia y se la colocó en medio Gold en un tubo de polipropileno (medio Gold en Nelson, 2007, p. 88). Se mantuvo toda la noche a 30 °C con agitación (300 rpm). Con el fin de conservar la levadura para subsiguientes análisis, se extrajeron alícuotas iguales de cultivo de levadura y de solución autoclavada de glicerol 30% y se las mantuvo a -80 °C.

Ensayo de estrogenicidad

Se cultivó toda la noche 1 ml del cultivo de levadura, almacenado a -80°C , con 9 ml de medio de crecimiento (30°C y 300 rpm). A la mañana siguiente se adicionó 10 ml de medio de crecimiento y se permitió crecer hasta la tarde; luego se diluyó con mismo medio hasta densidad óptica de 0,03 (660 nm). Se adicionaron 100 μl de solución de sulfato de cobre pentahidratado 10 mm, por cada 20 ml de solución de levadura. Se colocaron 5 ml del cultivo en tubos de 50 ml, se dispuso de 10 tubos para blanco con agregado de 5 μl de etanol absoluto, dos tubos por cada muestra con agregado de 5 μl de cada extracto de muestra y un tubo por cada estándar de estradiol (5 μl de estándar correspondiente). Los estándares se realizaron a partir de diluciones seriadas de un stock de 1.89 g/l (material certificado, Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Alemania) en etanol absoluto. Las concentraciones fueron desde 1.75 ng/l a 7.5 $\mu\text{g/l}$. A continuación se incubó 18 hs a 30°C y 300 rpm y se diluyó posteriormente con medio de crecimiento hasta que la OD fuera de 0.25 (660 nm).

Para la continuación del ensayo se utilizó el kit Yeast β Galactosidase Assay (Thermo Fisher Scientific, 2010). Se colocaron 70 μl de cada uno de los tubos ensayados por triplicado en una placa de ELISA (en tres pocillos de la placa se colocaron 70 μl de medio de crecimiento). Se agregó 70 μl de solución de trabajo (mezcla 1:1 de Y-PER reagent y β galactosidase Assay buffer) y se midió absorbancia a 660 nm con un lector de multiplaca, Multiskan EX de Thermo Scientific, Shanghai, China. Se comenzó el conteo con el cronómetro y al aparecer un color amarillo se midió absorbancia a 420 nm (aproximadamente 2 a 4 horas después de agregada la solución de trabajo) (Yeast β Galactosidase Assay Kit Instrucciones Microplate Plate Assay Protocol, non-stopped).

Cálculos y tratamiento estadístico

$$\text{Actividad } (\beta - \text{Galactosidasa}) = \frac{1000 \times (A_{420\text{muestra}} - A_{420\text{mediodecultivo}})}{T_{(\text{minutos})} \times V_{(\text{ml})} \times A_{(660\text{muestra}} - A_{660\text{mediodecultivo}})}$$

T: tiempo transcurrido desde agregado de solución de trabajo hasta la medida.

V: volumen final del cultivo

$$\text{Actividad relativa: } \frac{\text{Actividad } \beta\text{-Galactosidasa} \times 100}{\text{Mayor actividad de la } \beta\text{-Galactosidasa obtenida en estándar}}$$

Para el análisis estadístico se trabajó con las actividades relativas. Los ensayos de dosis-respuesta fueron ajustados mediante la función de Hill (inrate Hill-n/Michaelis-Menten/line/quadratic/lag-phase/monomolecular) en el programa SIMFIT de la Universidad de Salamanca. Luego se calculó una sigmoide de tres parámetros usando una regresión no lineal.

$$\text{respuesta} = \frac{V_{\max} \times \text{Dosis}^n + C}{K^n + \text{Dosis}^n}$$

V_{\max} : es la respuesta máxima obtenida.

K_n : dosis a la cual se obtiene un 50% de actividad relativa.

N: coeficiente de Hill.

C: constante.

Resultados y Discusión

En el Gráfico 1 se observa que la levadura modificada ha respondido frente a la presencia de un compuesto estrogénico como el 17 β -estradiol al que fue expuesta, expresando actividad de la β -galactosidasa. Asimismo, se puede observar que la respuesta de la actividad relativa de la β -galactosidasa frente a logaritmo de diferentes concentraciones de 17 β -estradiol (desde 1.75 ng/l a 7.5 $\mu\text{g/l}$) es de tipo sigmoide.

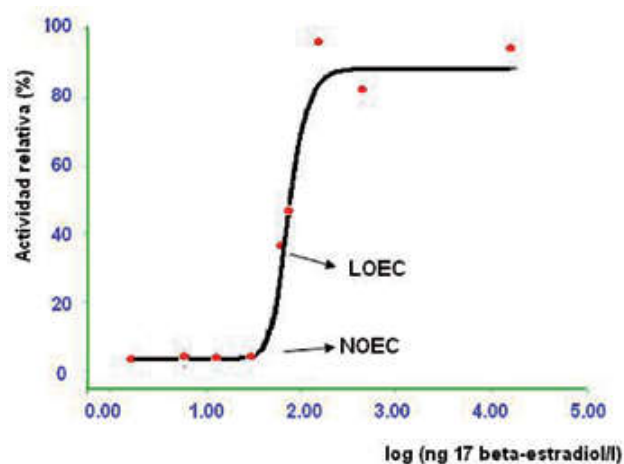


Gráfico 1. Actividad relativa de la β -galactosidasa obtenida luego de la exposición de las levaduras modificadas a diferentes concentraciones de 17 β -estradiol.

Para estos datos de actividad relativa se realizó un ajuste según la función de Hill y se obtuvieron los valores de parámetros de la ecuación que se observan en la Tabla 1. Se puede apreciar que la respuesta máxima obtenida está entre 59 y 99% de actividad. A partir del valor de K_m calculado (1.851 ± 0.087) se puede calcular el EC50, concentración de 17 β -estradiol con la cual se produce una actividad estrogénica igual al 50% del máximo obtenido. El EC50 en nuestro caso se calcula como la potencia en base 10 del valor de K_m y es de $70,8 \pm 13$ ng/l. Este último valor de EC50 calculado concuerda con los obtenidos por Gaido en 1997 ($65,9 \pm 8$ ng/l) y por Routledge en 1996 ($55,3 \pm 18$ ng/l).

Parámetro	Valor
V_{\max}	$79,07 \pm 20$
K_m	$1,851 \pm 0,087$
C	3,880
n	19,87
$r^2 = 0,976$	

Tabla 1. Valores de los parámetros obtenidos para la función de Hill calculada luego del ajuste de datos con el programa SIMFIT.

El coeficiente de correlación aceptable, según publicaciones anteriores, es $r^2 > 0.95$ (Nelson, 2007) y el obtenido en nuestro ensayo fue de 0.976, el cual se encuentra dentro de valores admisibles.

Se determinaron también los valores NOEC (mayor concentración ensayada sin efecto observable) y LOEC (menor concentración ensayada con efecto observable) (EPSI/RM/46): 30 y 59 ng/l, respectivamente. Si son comparados con los obtenidos por Gaido (1997) y Routledge (1996): 8 ng/l (NOEC) y 27 ng/l (LOEC),

los valores de este estudio son mayores. Para determinarlos más precisamente, resta realizar mayor número de ensayos con nuevos puntos entre ambas concentraciones.

El límite de detección (LD) se determinó a partir de la realización de 10 blancos, con el agregado de 5 µl de etanol absoluto al cultivo de levadura. Se calculó como la concentración correspondiente de 17 β-estradiol para la actividad relativa promedio obtenida más tres desvíos estándares; el resultado obtenido fue de 55 ng/l (21,9% de actividad relativa). Coincide este valor con el EC20 para este ensayo, valor arbitrario utilizado como límite de detección por Lorenzen (2004).

Muestras	Actividad relativa promedio (%)	Resultado (ng/l)
Zona de mezcla de efluente cloacal con agua natural	21	No detectable
Efluente industrial de producción de pulpa de celulosa con tratamiento secundario	21	No detectable
LD: 55 pg/l		

Tabla 2. Resultados de estrogenicidad para muestras ensayadas.

En la Tabla 2 se puede apreciar que las muestras ensayadas no presentaban actividad estrógena por encima del límite de detección del método. Para el ensayo de cada muestra se realizó una toma de 1 litro y luego de su filtración se concentró hasta un volumen final de 1 ml, por lo que el límite de detección considerado para compuestos estrógenos en la muestra fue de 55 pg/l. Ambas muestras arrojaron actividades estrógenas menores al límite de detección.

El ensayo YES ha sido utilizado como un screening para sustancias estrógenas, pero debemos considerar que sus resultados se podrían ver indirectamente afectados por antiestrógenos, los cuales suprimen la actividad de la β-galactosidasa, dando como resultado falsos negativos en la muestra a ensayar (Buckley, 2010; Conroy, 2005). Para verificar ausencia de antiestrógenos en las muestras se debería realizar agregados de concentraciones conocidas de 17 β-estradiol y verificar su recuperación (Buckley, 2010).

Conclusiones

Se logró con éxito poner a punto el método de YES para determinar potencial de estrogenicidad en muestras ambientales. Además, fueron determinados algunos parámetros que describen el desempeño analítico del método, obteniendo para ellos valores aceptables.

Por último, es posible concluir que la actividad estrógena en las muestras provenientes de zona de mezcla de un efluente cloacal con agua natural y un efluente industrial de producción de pulpa de celulosa con tratamiento secundario fue no detectable para el método de screening utilizado.

Reconocimientos

María Victoria Carrara, por el apoyo en el filtrado y tratamiento de muestras. Personal de los departamentos de Aguas y Productos Químicos, Medio Ambiente y Microbiología de LATU. Dr. Kevin Gaido (CIHT Centers for Health Research, Research Triangle Park, NC, USA), por proporcionar la cepa de levadura modificada y a la Universidad de Cranfield por el mantenimiento de la cepa.

Referencias

- ARGEMI, F.; CIANNI, N.; PORTA, A. Disrupción endocrina: perspectivas ambientales y salud pública. En: *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 2005, 39(3):291-300.
- ARNOLD, S.; COLLINS, B.; ROBINSON, M.; GUILLETTE, L.; MCLACHLAN J. Differential interaction of natural and synthetic estrogens with extracellular binding proteins in a yeast estrogen screen. En: *Steroids*. 1996, 61(11):642-646.
- BIALES, A.; BENCIC, D.; FLICK, R.; LAZORCHAK, J.; LATTIER, D. Quantification and associated variability of induced vitellogenin gene transcripts in fathead minnow (*Pimephales promelas*) by quantitative real-time polymerase chain reaction assay. En: *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2007, 26(2):287-296.
- BUCKLEY, J. Quantifying the antiestrogen activity of wastewater treatment plant effluent using the yeast estrogen screen. En: *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2010, 29:73-78.
- CONROY, O.; QUANRUD, D.; ELA, W.; WICKE, D.; LANSEY, K. Y ARNOLD, R. Fate of wastewater hER-agonists and h-ER antagonists during soil aquifer treatment. En: *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2005, 39:2287-2293.
- DE BOEVER, P.; PIETERS, G.; SICILIANO, S.; D'HOOGHE, W.; VERSTRAET, W. Optimization of a yeast estrogen screen and its applicability to study the release of estrogenic isoflavones from a soygerm powder. En: *Environmental Health Perspectives*. 2001, 109(7):691-697.
- CANADA. ENVIRONMENT CANADA. *Guidance document on statistical methods for environmental toxicity test*. Ottawa: Environment Canada, 2007. (Environmental Protection Series; 1/RM/46)
- GAIDO, K.; LEONEL, L.; LOVELL, S.; GOULD, J.; BABAI, D.; PORTIER, C.; MCDONNELL, D. Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. En: *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1997, 143(1):205-212.
- JOBLING, S.; COEY, S.; WHITMORE, J. G.; KIME, D. E.; VAN LOOK, K.J.W.; MCALLISTER, B.G.; BERESFORD, N.; HENSHAW, A.C.; BRIGHTY, G.; TYLER, C.R.; SUMPTER, J. P. Wild intersex roach (*Rutilus rutilus*) have reduced fertility. En: *Biology of Reproduction*. 2002, 67(2):515-524.
- KRISTENSEN, T.; BAATRUP, E.; BAYLEY, M. 17β Ethinylestradiol reduces the competitive reproductive fitness of the male guppy (*Poecilia reticulata*). En: *Biology of Reproduction*. 2005, 72(1):150-156.
- LANGE, R.; HUTCHINSON, T.; CROUDACE, C.; SIEGMUND, F.; SCHWEINFURTH, H.; HAMPE, P.; PANTER, G.; SUMPTER, J. Effects of the synthetic estrogen 17 α ethinylestradiol on the life-cycle of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). En: *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2001, 20(6):2001-2012.
- LORENZEN, A.; HENDEL, J.; CONN, K.; BITTMAN, S.; KWABIAH, A.; LAZAROVITZ, G.; MASSÉ, D.; MCALLISTER, T.; TOPP, E. Survey of hormone activities in municipal biosolids and animal manures. En: *Environmental Toxicology*. 2004, (19):216-225.
- NELSON, James. *Screening of endocrine disrupting compounds using estrogen receptor transcriptional activation in vitro bioassay*. Burnaby: Symon Fraser University, 2007. (Thesis of Master Science)
- OLEA SERRANO, N.; ZULUAGA, A. Exposición infantil a disruptores endocrinos. En: *An Esp Pediatr*. 2001, 54(1):58-62.
- PARROTT, J.L.; BLUNT, B.R. Life-cycle exposure of fathead minnows (*Pimephales promelas*) to an ethinylestradiol concentration below 1 ng/L reduces egg fertilization success and demasculinizes males. En: *Environmental Toxicology*. 2005, 20(2):131-141.
- PAWLOWSKI, S.; TERNES, T.; BONERZ, M.; RASTALL, A.; ERDINGER, L.; BRAUNBECK, T. Estrogenicity of solid phase-

- extracted water samples from two municipal sewage treatment plant effluents and river Rhine water using the yeast estrogen screen. En: *Toxicology in Vitro*. 2004, 18(1):129-138.
- ROUTLEDGE, J.; SUMPTER, J. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. En: *Environmental Toxicology and Chemistry*. 1996, 15(3):241-248.
 - THERMO FISHER SCIENTIFIC. Yeast β galactosidase microplate plate assay protocol (non-stopped). En: THERMO FISHER SCIENTIFIC. *Yeast β galactosidase assay kit instructions*. Rockford: Pierce Biotechnology, 2010. (N° 75768)
 - UNIVERSIDAD DE SALAMANCA. *Paquete estadístico Simfit*. [En línea]. Salamanca: Universidad de Salamanca, [s.d]. [Consulta junio 2010]. Disponible en: <http://simfit.usal.es/>
 - WOLFAND, J.; MARYLAND, B. Active ingredient in oral contraceptives (17alfa-ethinylestradiol) alters male competitive courtship behaviors and secondary sexual characteristics in fathead minnows (*Pimephales promelas*). En: *Journal of the U.S. SJWP*. 2007.
-