

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS



“DISEÑO DE TAMIZADOS GENÉTICOS EN *Saccharomyces cerevisiae* USANDO UNA BIBLIOTECA GENÓMICA DE PLÁSMIDOS MULTICOPIA”

Presentada por:

Luis Gabriel Gutiérrez Mesías

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Lima - Perú

2021

La UNALM es la titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación

(Art. 24. Reglamento de Propiedad Intelectual)

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS

“DISEÑO DE TAMIZADOS GENÉTICOS EN *Saccharomyces cerevisiae* USANDO UNA BIBLIOTECA GENÓMICA DE PLÁSMIDOS MULTICOPIA”

Presentada por:

Luis Gabriel Gutiérrez Mesías

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

Ph. D. Gretty Villena Chávez
PRESIDENTE

Mg. Sc. Roberto Mansilla Samaniego
MIEMBRO

Mg. Sc. Rosa Espejo Joya
MIEMBRO

Ph. D. Ana Kitazono Sugahara
ASESORA

Dedicatoria

**A Dios, por su amor infinito y su apoyo espiritual
constante para levantarme ante adversidades.**

**A mis padres, Pedro y Juana por su
invaluable amor y esperanza en mí.**

**Y a mis amigos “Los incompetentes”, por
los inolvidables momentos compartidos.**

Agradecimientos

Agradecido de todo corazón con la profesora Ana Kitazono, por su paciencia, dedicación, el alto interés en asesorarme y formarme como profesional en todos los ámbitos. Además, agradecer por permitirme estar presente en la evolución desde el inicio del Laboratorio de Química-Biológica y Bioanálisis.

Al proyecto InnovatePerú N°157-PNICP-PIAP-2015: “Identificación, caracterización y aplicación cosmeceútica de proteínas de levadura y oligopéptidos de secuencia aleatoria con actividad fotoprotectora o antioxidante” por la subvención otorgada.

A mis padres, por el apoyo constante durante todo el proyecto de mi formación académica. Por los valiosos valores que me inculcaron, la cual complementa de manera increíble ser un profesional.

A mi esposa, por el gran apoyo emocional y sobre todo espiritual que ha impulsado a trazarnos muchas metas para nuestro futuro como profesionales.

Un agradecimiento especial a mis amigos Anthony, Paola y Raquel que hicieron divertido el proceso de investigación en el Laboratorio. Y por último, a la señorita Bélgica Pérez por ayudarme a realizar mis ensayos facilitándome materiales de laboratorio.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
2.1.1. Sistema modelo.....	3
2.2. ESTRÉS OXIDATIVO EN <i>S. cerevisiae</i>	4
2.3. EFECTOS DE LA RADIACIÓN UV EN <i>S. cerevisiae</i>	7
2.4. BIBLIOTECAS GENÓMICAS EN TAMIZADOS GENÉTICOS.....	9
2.5. CONSTRUCCIÓN DE CEPAS MUTANTES DE <i>S. cerevisiae</i> USANDO MÓDULOS PARA LA ELIMINACIÓN DE GENES.	11
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
3.1. LUGAR.....	14
3.2. MATERIALES	14
3.2.1. Cepas y plásmidos	14
3.2.2. Materiales de uso rutinario.....	14
3.3. EQUIPOS.....	15
3.4. REACTIVOS	15
3.5. MEDIOS DE CULTIVO	16
3.6. MÉTODOS	17
3.6.1. Transformación de <i>S. cerevisiae</i>	17
3.6.2. Tamizado de transformantes.	17

a. Ensayos preliminares.....	17
b. Ensayos pre-tamizado	18
c. Primer método de tamizado.....	19
d. Segundo método de tamizado.	20
e. Ensayos post-tamizados.	22
3.6.3. Construcción de cepas mutantes de <i>s. cerevisiae</i>	23
3.6.4. Recuperación de adn total de levaduras transformantes.	25
3.6.5. Transformación de <i>e. coli</i> por electroporación y purificación de los plásmidos amplificados.....	26
3.6.6. Análisis de los plásmidos.	27
a. Análisis molecular	27
b. Confirmación del aumento de la resistencia a radiación UV o peróxido de hidrógeno usando mutantes.	27
c. Secuenciación de los plásmidos.....	28
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
4.1. ESTUDIOS PRELIMINARES	29
4.2. TRANSFORMACIÓN DE <i>S. cerevisiae</i> CON LA BIBLIOTECA GENÓMICA.	29
4.3. OPTIMIZACIÓN DE LOS PROTOCOLOS DE TAMIZADOS.....	30
4.3.1. Tamizado con radiación UV.....	31
4.3.2. Tamizado con peróxido de hidrógeno.	32
4.4. PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS PLÁSMIDOS.....	33

4.5.	CONSTRUCCIÓN DE CEPAS MUTANTES DE <i>S. cerevisiae</i> .	34
4.5.1.	Obtención de los módulos para eliminar los genes <i>rad9</i> , <i>rad24</i> y <i>yap1</i> ...	34
4.5.2.	Verificación de las cepas mutantes	35
4.6.	CONFIRMACIÓN DE LOS EFECTOS FOTOPROTECTORES O ANTIOXIDANTES DE LOS PLÁSMIDOS SELECCIONADOS.....	38
4.7.	IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES PRESENTES EN LOS PLÁSMIDOS ANALIZADOS.....	40
V.	CONCLUSIONES.....	45
VI.	RECOMENDACIONES.....	46
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
VIII.	ANEXOS.....	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Oligonucleótidos usados en la construcción y verificación de las cepas mutantes <i>rad9</i> , <i>rad24</i> y <i>yap1</i>	25
Tabla 2: Listados de genes de los candidatos ubicados en los fragmentos de la biblioteca genómica.	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Función y regulación del factor de transcripción Yap1 en la respuesta celular a peróxido de hidrógeno.....	5
Figura 2:	Generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) en <i>S. cerevisiae</i>	6
Figura 3:	Participación de tioredoxina y el NADPH en la reducción del peróxido de hidrógeno.	6
Figura 4:	Formación de dímeros de timina ciclobutano (a) y aductos (6-4) de pirimidina-pirimidina (b).....	7
Figura 5:	Funciones de Rad9 ante un daño al ADN para detener el ciclo celular.....	9
Figura 6:	Principales características del plásmido pRS202.....	10
Figura 7:	Plásmidos pUG construidos por Hegemann y colaboradores para la obtención de módulos para la eliminación de genes en <i>S. cerevisiae</i>	12
Figura 8:	Resumen de la estrategia seguida por los investigadores Connelly y Hieter para la construcción de la biblioteca genómica en el plásmido multicopia pRS202.....	16
Figura 9:	Determinación de la sensibilidad transformantes de cepas silvestres a radiación UV y peróxido de hidrógeno.	18
Figura 10:	Esquema del primer método de tamizado genético.	19
Figura 11:	Esquema general del segundo método de tamizado genético..	20
Figura 12:	Procedimiento del segundo método para tamizados genéticos de resistencia a UV.	21

Figura 13:	Procedimiento del segundo tamizado genético de resistencia a peróxido de hidrógeno	22
Figura 14:	Tratamientos finales de candidatos seleccionados en los tamizados. .	23
Figura 15:	Ensayos con mayor resolución de resistencia usando diluciones en serie.	28
Figura 16:	Transformaciones de la levadura <i>S. cerevisiae</i> con plásmido sin inserto o la biblioteca genómica.....	30
Figura 17:	Análisis de restricción de los plásmidos seleccionados de los tamizados genéticos con la enzima <i>SacI</i>	33
Figura 18.	Análisis de restricción de los plásmidos seleccionados de los tamizados genéticos con la enzima <i>ScaI</i>	34
Figura 19:	Análisis electroforético en gel de agarosa de productos de PCR para la construcción de módulos de eliminación de genes..	35
Figura 20:	Muestra representativa de una transformación de la levadura silvestre con los módulos de eliminación.	36
Figura 21:	Verificación de la eliminación de los genes <i>RAD9</i> , <i>RAD24</i> y <i>YAP1</i> ..	37
Figura 22:	Ensayos de sensibilidad de las cepas mutantes obtenidas.	38
Figura 23.	Confirmación del aumento de resistencia a radiación UV conferida por los plásmidos seleccionados.	39
Figura 24.	Confirmación del aumento de resistencia a peróxido de hidrógeno conferida por algunos de los plásmidos seleccionados.....	39
Figura 25.	Confirmación del aumento de resistencia a peróxido de hidrógeno conferido por los plásmidos en cepas mutantes <i>rad9</i>	40

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1.	Artículo científico publicado en la que reportamos un procedimiento que permite una fácil evaluación de la acción fotoprotectora de bloqueadores solares en <i>S. cerevisiae</i>	55
ANEXO 2.	Cámara usada para la irradiación UV de placas.	56
ANEXO 3.	Bloque de impresión de placas con terciopelo estéril.	71

RESUMEN

Los tamizados genéticos de sobreexpresión de proteínas son considerados métodos que utilizan análisis modernos para explorar sistemáticamente funciones de genes *in vivo*. En la presente investigación, se optimizaron los protocolos de dos tamizados que usaron una biblioteca genómica como fuente de diversidad génica. Esta biblioteca proviene de miles de diferentes fragmentos de ADN genómico de la levadura *S. cerevisiae*. En el primer método, se realizaron réplicas de colonia transformantes que fueron luego expuestas a radiación UV o sembradas en medio con peróxido de hidrógeno. En el segundo método, se utilizaron incubaciones de células transformantes los cuales se distribuyeron en placas para ser expuestas a radiación UV y paralelamente, otros cultivos de transformantes fueron tratados con peróxido de hidrógeno. Posterior a los tamizados, se realizaron ensayos con radiación UV y peróxido de hidrógeno para confirmar los fenotipos positivos mostrados. En el análisis de secuencias de los cinco plásmidos obtenidos de los tamizados, se encontraron genes involucrados en la reparación celular ante presencia de oxidantes. En conclusión, los métodos de tamizados diseñados mostraron ser eficientes para la selección de plásmidos que incluyen genes que contribuyen a mitigar o reparar los daños sometidos a las células de levadura.

Palabras clave: Tamizados genéticos, biblioteca genómica, radiación UV, peróxido de hidrógeno.

ABSTRACT

Genetic screenings that rely on protein overexpression are methods that use modern analysis to systematically explore gene functions *in vivo*. The present investigation involved the optimization of two screening protocols that used a genomic library as a source of genetic diversity. This library is formed by thousands of different fragments of genomic DNA from the yeast *S. cerevisiae*. In the first method, transformed colonies were transferred by replica plating, and the replicated plates were exposed to UV radiation or seeded in medium containing hydrogen peroxide. After the screenings, tests were carried out with UV radiation and hydrogen peroxide to confirm the positive phenotypes. A total of five plasmids were isolated in the screenings and their analysis identified genes involved in the cellular response to damaging agents. In conclusion, the optimized screening protocols allowed identification of genomic library plasmids that included genes involved in the response to cellular damage..

Key words: Genetic screens, genomic library, UV radiation, hydrogen peroxide.

I. INTRODUCCIÓN

Los tamizados genéticos son métodos clásicos que facilitan el descubrimiento de genes que tienen una función particular de interés. En esencia, los tamizados se realizan identificando un fenotipo característico y diseñando los protocolos que faciliten la selección de los genes involucrados. Por lo tanto, es importante utilizar organismos modelos de fácil manipulación y que cuenten con suficiente información genética. El más utilizado es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, el sistema biológico más popular en la investigación y la industria. Asimismo, posee mecanismos genéticos altamente conservados, cuyo estudio permite comprender fácilmente la biología de sistemas mucho más complejos (Forsburg 2001). Además, a partir del término de la secuenciación de su genoma en 1996 (Goffeau *et al.* 1996) y hasta inicios del 2018, el 78 por ciento de sus genes ya han sido caracterizados y se encuentran registrados y anotados en la base de datos “*Saccharomyces Genome Database*” (SGD).

Entre numerosos ejemplos, los tamizados genéticos de bibliotecas genómicas de *S. cerevisiae* han sido utilizados para comprender las funciones de genes que regulan la proliferación celular y las respuestas ante factores estresantes (Alberts *et al.* 2002; Forsburg 2001; Morano *et al.* 2012; Steensels *et al.* 2014). En las levaduras es frecuente el uso de bibliotecas con plásmidos multicopia para aislar genes basados en fenotipos causados por aumento de los niveles de expresión. Es el caso de la identificación del gen *ECL1*, un componente de la respuesta a estrés oxidativo que permite prolongar la vida cronológica de la levadura (Azuma *et al.* 2009). Mediante el uso de estrategias similares se logró identificar a los genes *STE12* y *STE4*, ya que su sobreexpresión activa la vía de respuesta de apareamiento en ausencia de feromonas exógenas (Ramer *et al.* 1992)

La radiación UV y agentes oxidantes son considerados como los principales factores estresantes que afectan la supervivencia celular. Existen muchos estudios que los han usado para poder analizar e identificar genes que funcionan en la organización de la respuesta celular a estos agentes estresantes. Es el caso de los genes *YAP1* e *ISC1*, que

cumplen roles en la resistencia a peróxido de hidrógeno; y genes como *RAD9*, *RAD24* y *RAD52* que son esenciales en la respuesta ante irradiación UV (Molin *et al.* 2007; Almeida *et al.* 2008; Terleth *et al.* 1990; Teo y Jackson 1997). Estos genes son parte de los 1175 y 354 genes registrados en la base de datos de *Saccharomyces* (SGD) relacionados a la resistencia al estrés oxidativo y a la respuesta a radiación UV, respectivamente.

La utilización de *S. cerevisiae* ha permitido el estudio de genes de especies relacionadas y hasta de especies distantes, como es el caso de los genes *MEC1* de *S. cerevisiae* y el gen ATM de humanos (Siede *et al.* 1996). Por lo tanto, es importante divulgar las ventajas de investigar y analizar genes de *S. cerevisiae*, tomando como base el uso de técnicas y herramientas moleculares como bibliotecas genómicas de plásmidos multicopia. Asimismo, es imprescindible entender los efectos dañinos que causan la radiación UV y los agentes oxidantes. Estos factores son dos de los principales responsables de la alta incidencia de cáncer a la piel y otros órganos (Stiefel y Schwack 2015).

El presente estudio tuvo como finalidad optimizar tamizados genéticos usando una biblioteca genómica de *S. cerevisiae* para identificar genes que al ser sobreexpresados confieren resistencia a radiación UV o peróxido de hidrógeno. Para mejorar los ensayos de resistencia, se construyeron mutantes que demuestran mayor sensibilidad a radiación UV y peróxido de hidrógeno (eliminación de los genes *RAD9* o *RAD24* y *YAP1*, respectivamente).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. *Saccharomyces cerevisiae*

2.1.1. SISTEMA MODELO

La levadura *S. cerevisiae* es uno de los principales organismos modelo eucariótico debido a su fácil manipulación genética y de cultivo, la disponibilidad de un gran número de protocolos y recursos, etc. También cuenta con un sistema genético altamente conservado del ciclo celular y principales vías metabólicas lo que ha impulsado las investigaciones en *S. cerevisiae* para ayudar a comprender sistemas biológicos más complejos (Forsburg 2001, Folch-mallol *et al.* 2004).

Por otra parte, la rapidez en el crecimiento, la fácil dispersión celular, facilidad de replicación en placas y aislamiento de mutantes en levaduras, son características que permiten acelerar y fácilmente optimizar los estudios experimentales en *S. cerevisiae* (Sherman 2002). Además, es posible trabajar con células diploides o haploides, siendo estas últimas las más utilizadas por su baja complejidad genómica, con 16 cromosomas que incluyen aproximadamente 6000 ORFs (marcos de lectura abierta) (Goffeau *et al.* 1996). La mayor parte de información registrada de la levadura se encuentra en la base de datos del genoma de *Saccharomyces* (SGD), la cual proporciona información biológica integral junto a herramientas de búsqueda y análisis (*Saccharomyces* Genome Database | SGD).

2.2. ESTRÉS OXIDATIVO EN *S. cerevisiae*.

Unas de las principales fuentes de agentes oxidantes provienen de la utilización de oxígeno en la respiración y otros procesos metabólicos. Los oxidantes biológicos más conocidos son las moléculas llamadas Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) que regulan procesos celulares, pero que también resultan muy nocivas para los organismos. A pesar de las condiciones pro-oxidantes de la vida aeróbica y de las distintas adversidades ambientales, las levaduras son capaces de mantener un ambiente intracelular en equilibrio. Sin embargo, si la concentración de EROs sobrepasa la capacidad celular para eliminarlos, se producen daños a una amplia variedad de componentes celulares que resultan de la peroxidación de lípidos, la oxidación de proteínas y daños genéticos a través de modificaciones en el ADN (Morano *et al.* 2012).

Sin embargo, existen muchos mecanismos de defensa que permiten mantener una concentración de EROs adecuada como: mecanismos no enzimáticos (glutación); mecanismos enzimáticos (catalasa y superóxido dismutasa (Sod1)), y a través de factores transcripcionales que ayudan a la expresión de genes que codifican para enzimas con actividad antioxidante (Yap1, Ace1 y Hap1) (Folch-mallol *et al.* 2004, Morano *et al.* 2012).

El gen *SOD1* codifica para la enzima superóxido dismutasa, una de las principales defensas que presenta la levadura frente a la acumulación de EROs. Estudios en cepas mutantes nulos en *SOD1* han evidenciado que en presencia de oxígeno y glucosa en el medio, la respiración se ve reprimida y por ende su crecimiento (Reddi y Culotta 2013).

Por otra parte, los factores transcripcionales como Yap1 inducen la expresión de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y la glutatión reductasa (Folch-mallol *et al.* 2004). Como se muestra en la Figura 1, en ausencia de agentes oxidantes, Yap1 es exportada del núcleo hacia el citoplasma mediante la proteína Crm1. Sin embargo, en presencia de peróxido de hidrógeno Yap1 cambia su conformación y no es reconocida por Crm1. Por lo tanto, Yap1 se acumula en el núcleo induciendo la transcripción de genes que codifican para las enzimas antioxidantes. Una vez superado el estrés oxidativo por las enzimas expresadas, la proteína Yap1 es degradada (Okazaki *et al.* 2007, Kuge *et al.* 1997).

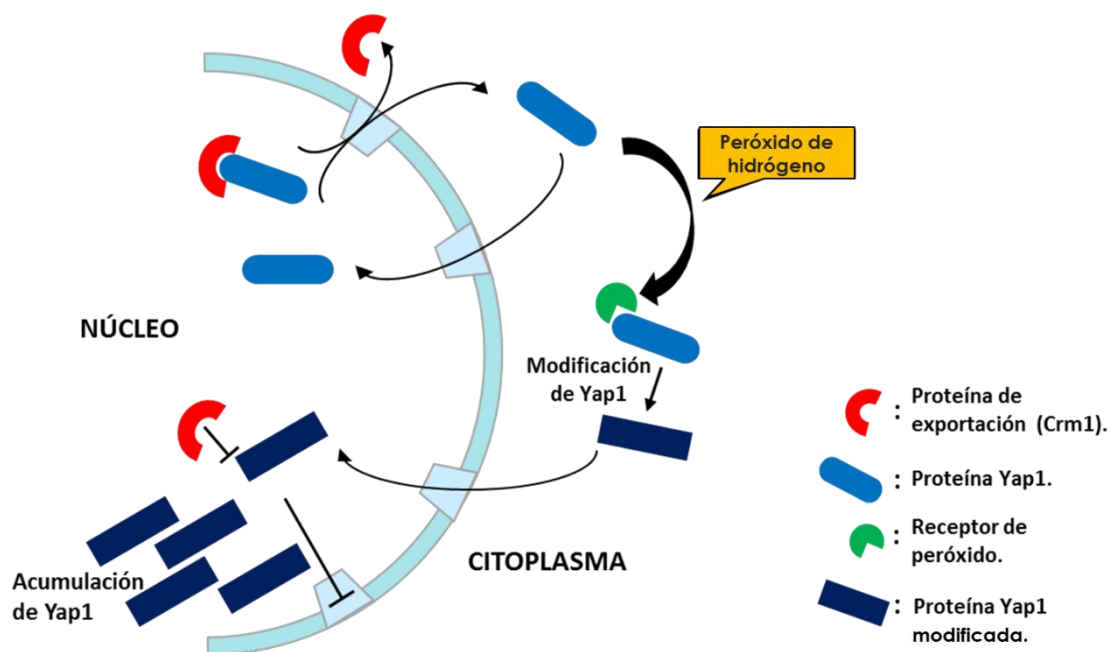


Figura 1: Función y regulación del factor de transcripción Yap1 en la respuesta celular a peróxido de hidrógeno. Presencia de este agente oxidante conduce a una modificación estructural de Yap1 que conduce a su transporte hacia el núcleo. A su vez, esta forma modificada de Yap1 no interactúa con la exportina Crm1 en el núcleo lo que conduce a su acumulación, permitiéndose así la transcripción de genes envueltos en la respuesta a estrés oxidativo.

FUENTE: Edición propia basado en Morano, 2012

Efectos del peróxido de hidrógeno en *S. cerevisiae*.

En procesos celulares como la respiración mitocondrial y oxidaciones de NADH o NADPH, se generan radicales superóxidos que pueden ser convertidos rápidamente en peróxido de hidrógeno por la abundante presencia de la enzima superóxido dismutasa (Figura 2). El peróxido de hidrógeno es relativamente estable y sus propiedades le permiten penetrar las membranas (Okazaki *et al.* 2007). El peróxido dentro de la célula se puede reducir con hierro Fe^{+2} en la reacción de Fenton, para producir el radical hidroxilo que es altamente reactivo. En la reacción de Haber-Weiss, el superóxido puede donar un electrón al hierro Fe^{+3} , generando el radical hidroxilo y Fe^{+2} , que pueden reducir aún más el peróxido de hidrógeno (Morano *et al.* 2012).

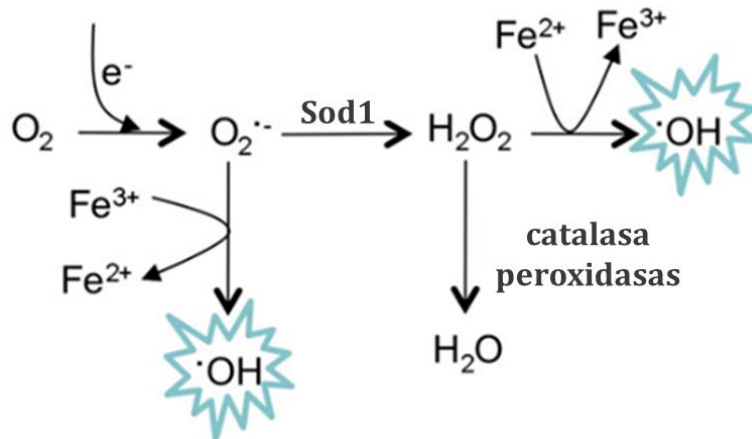


Figura 2: Generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) en *S. cerevisiae*.

FUENTE: Edición propia basado en Morano, 2012.

Además, las células controlan los niveles de EROs explotando el ciclo de reducción-oxidación del glutatión (redox) y el sistema de tiorredoxina, en el que se aceptan los electrones de NADPH, con la consiguiente reducción de peróxido de hidrógeno a agua (Figura 3). Las proteínas de la familia peroxiredoxina (Prx), actúan en conjunto en un ciclo redox que consta de tiorredoxina, tiorredoxina reductasa y NADPH (Trx / Trr / NADPH), reduciendo de forma directa al peróxido de hidrógeno (Okazaki *et al.* 2007).

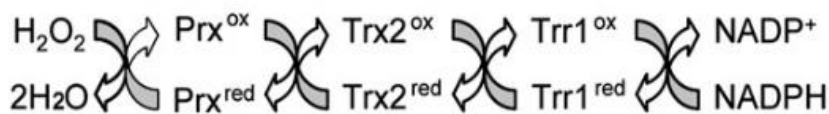


Figura 3: Participación de tiorredoxina y el NADPH en la reducción del peróxido de hidrógeno.

FUENTE: Morano, 2012.

El uso de peróxido de hidrógeno como agente oxidante ha sido de mucha utilidad en muchas investigaciones. En consecuencia, se ha logrado comprender los daños específicos que causan al ADN (Daroui *et al.* 2004). Además, ha sido posible descubrir funciones de genes y mecanismos bioquímicos como de los genes *YAPI*, *SOD1* y otros que codifican para proteínas de la familia peroxiredoxina, que actúan directamente con el peróxido de hidrógeno. Adicionalmente, se han realizado múltiples investigaciones de

proteínas y fármacos con el fin de generar compuestos antioxidantes (Yiannakopoulou y Tiligada 2009, Dimitrov *et al.* 2013).

2.3. EFECTOS DE LA RADIACIÓN UV EN *S. cerevisiae*.

Los daños ocasionados por la radiación UV en *S. cerevisiae* han sido muy estudiados, y entre ellos el más crucial se da a nivel de ADN, causando desde una reducción hasta una nula proliferación celular. La base de los efectos biológicos de la radiación UV, es su absorción por moléculas endógenas y una excitación asociada o incluso la ionización de aminoácidos específicos o ácidos nucleicos. Por lo tanto, genera daños directos al ADN y al ARN conduciendo a la formación de dímeros de timina ciclobutano y aductos (6-4) de pirimidina-pirimidina (Figura 4). Estos efectos dañinos aumentan considerablemente conforme las longitudes de onda de la radiación UV disminuyen. (Stiefel y Schwack 2015).

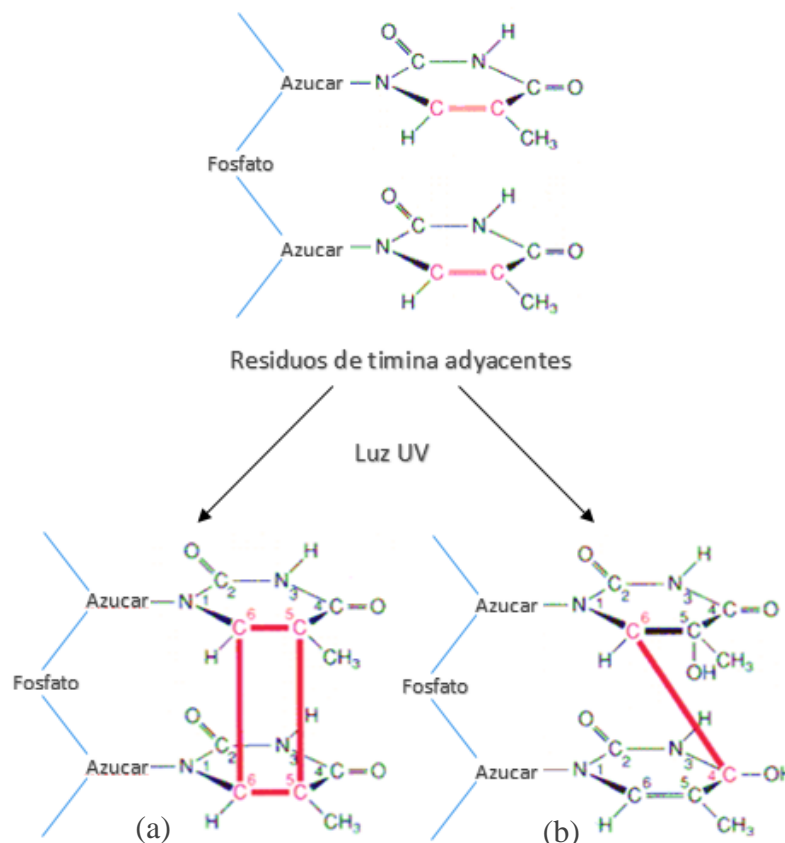


Figura 4: Formación de dímeros de timina ciclobutano (a) y aductos (6-4) de pirimidina-pirimidina (b).

FUENTE: Stiefel y Schwack 2015.

La levadura antes de entrar en replicación o mitosis repara el daño causado por la radiación UV mediante numerosas inducciones transcripcionales de genes como: *MEC1*, genes de la familia *RAD*, grupo de genes *DIN* (que incluyen genes implicados en la síntesis de ADN, ej. *POL1*, *CDC9*), *RNRI* (encargado de la formación de desoxirribonucleótidos), *RAD2* (reparación por escisión de nucleótidos), *MAG1* (reparación por escisión de ADN dañado por alquilación), *SNMI* (reparación de los enlaces cruzados), *RAD6* (reparación post-replicación), *PSMI* (reparación de incompatibilidad), *RAD51* (reparación recombinacional), y *PHR1* (fotoreactivación) (Sebastian *et al.*, 1990; Mieczkowski *et al.*, 2000). Entre estos, *MEC1* es uno de los genes más conocidos que codifica para la proteína fosfatidilinositol quinasa, requerida para la regulación del ciclo celular mediante cascadas de transducción de señales. La quinasa Mec1 modifica el estado de fosforilación normal a hiperfosforilado de proteínas como Rad9, Rad53 y Chk1 (Toh y Lowndes 2003), causando una detención del ciclo celular en fase G1/S, intra-S o G2/M; la regulación transcripcional de los genes de reparación del ADN, la represión transcripcional de las ciclinas y la estabilización de las horquillas de replicación (Weinert, 1998; Chen y Sánchez, 2004).

Existen genes que controlan específicamente algunos aspectos en el proceso del ciclo celular, como los genes *RAD9* y *RAD24* (“checkpoint”), y que además cumplen funciones cruciales ante daños al ADN o a la inhibición de su replicación (Paulovich *et al.* 1997). Como se indica en la Figura 5, el daño ocasionado al ADN por radiación UV induce la hiperfosforilación de Rad9 dependiente del complejo proteico Mec1 y Tel1, interactuando y activando específicamente a Rad53 y Chk1 para detener el ciclo celular en la interfase G2/M (Toh y Lowndes 2003). Rad53 detiene el ciclo celular junto a Mec1 ante una inestabilidad de las horquillas de la replicación de ADN. Estos eventos permiten que la célula pueda tener el tiempo necesario para reparar el daño antes de entrar a los eventos críticos, como la replicación del ADN o mitosis (Mieczkowski *et al.* 2000, Dohrmann y Sclafani 2006).

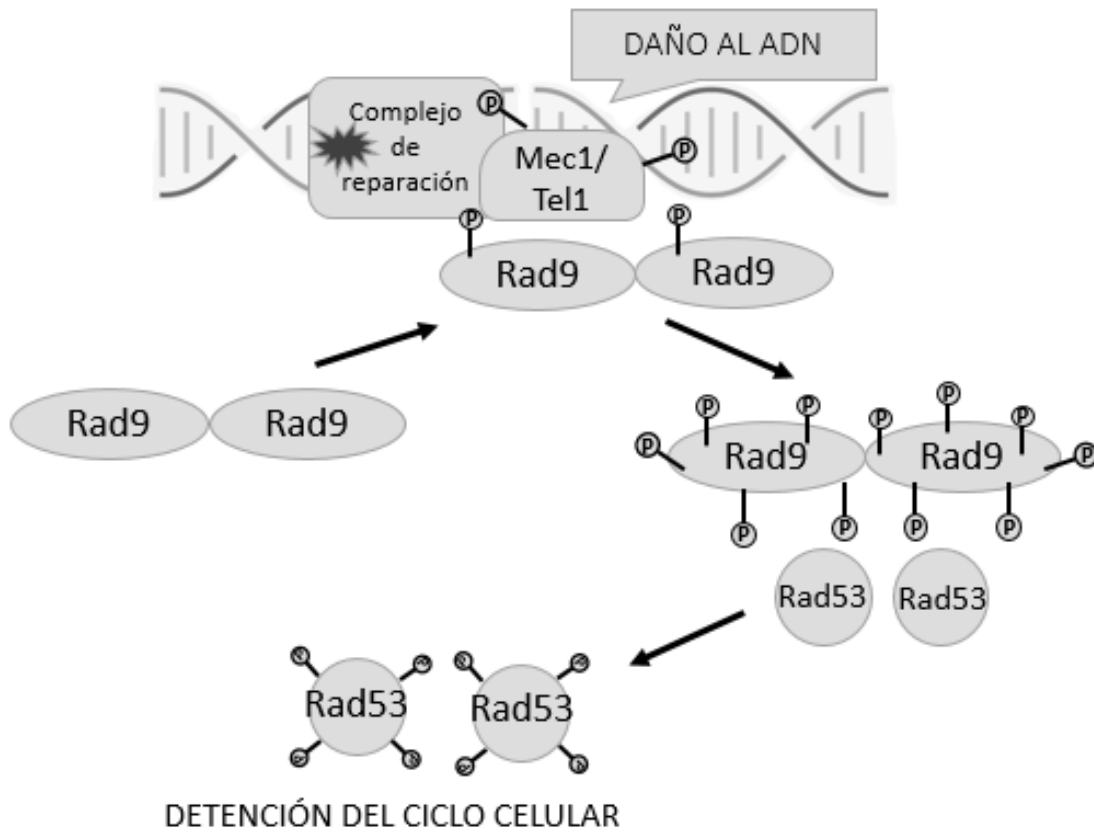


Figura 5: Funciones de Rad9 ante un daño al ADN para detener el ciclo celular.

FUENTE: Edición propia basado en Toh y Lowndes, 2003.

Por otro lado, la radiación UV puede incrementar dramáticamente los niveles de EROs, en la célula generando estrés oxidativo. Los daños oxidativos se generan a partir de modificaciones específicas de aminoácidos y escisión de péptidos hasta la pérdida de función enzimática. Además, causan peroxidación de lípidos lo cual afecta la fluidez de las membranas, y los productos de degradación pueden promover el inicio de la apoptosis en las mitocondrias (Lopez-Martinez *et al.* 2008, Green y Reed 1998).

2.4. BIBLIOTECAS GENÓMICAS EN TAMIZADOS GENÉTICOS.

Una biblioteca genómica es una colección de fragmentos de ADN, en la que se espera estén equitativamente incluidos todos los componentes de un genoma (Alberts *et al.* 2002). Estos fragmentos de ADN están clonados en un vector que permite su inclusión en células y por lo general, es un plásmido que cuenta con marcadores de selección con genes que confieren resistencia a antibióticos o genes que intervienen en la síntesis de un

nutriente esencial; y sitios de restricción que permiten solo un corte en el plásmido. Varios de estos plásmidos pueden mantenerse establemente tanto en *S. cerevisiae* como en *E. coli*, lo que facilita su amplificación y purificación.

Algunos de los plásmidos más usados en *S. cerevisiae* para tamizados de sobreexpresión contienen promotores fuertes como *GALI* (*PGALI*). Este promotor está fuertemente reprimido en células que utilizan glucosa como fuente de carbono y se induce más de 1000 veces cuando la fuente de carbono se cambia a galactosa (Yun *et al.* 1991). Además, se utilizan plásmidos que contienen el elemento genético multicopia dos micrones (2μ), el cual puede multiplicar hasta 200 veces el vector por cada célula y, por ende, permitir la sobreexpresión de los genes clonados (Figura 6).

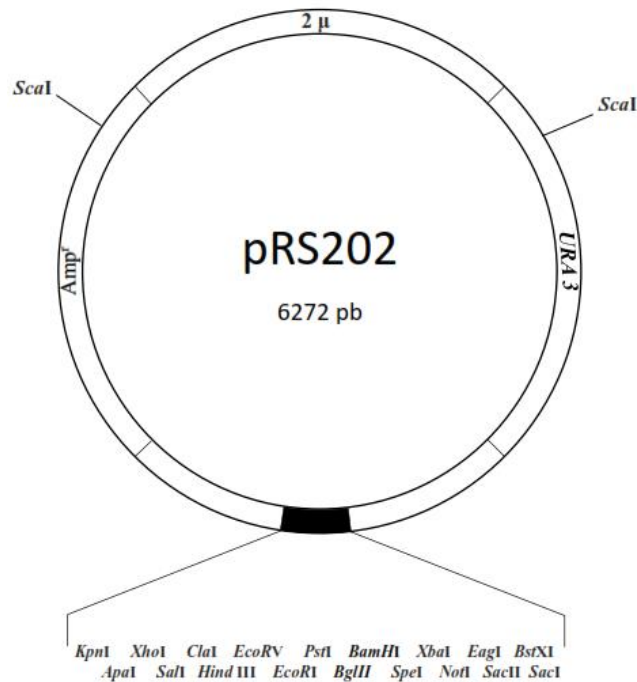


Figura 6: Principales características del plásmido pRS202. Se indica la posición de los dos marcadores presentes: gen *URA3*, permite la selección de los transformantes de *S. cerevisiae* en un medio sintético que carece de uracilo; *Amp^r*, gen que codifica para beta-lactamasa y selecciona transformantes de *E. coli* en medios de cultivo con ampicilina. También se indica el elemento genético multicopia 2μ . Se muestran los sitios de restricción que permiten solo un corte en el plásmido.

FUENTE: Edición propia, 2019

Los tamizados genéticos basados en los plásmidos multicopias son utilizados frecuentemente en levaduras. Por ejemplo, Ramer y colaboradores (1992) encontraron usando una biblioteca genómica, que la sobreexpresión de los genes *STE4* o *STE12* activa la vía de respuesta de apareamiento en ausencia de feromonas exógenas.

Por otro lado, la sobreproducción de las proteínas permite la manifestación de mecanismos de supresión. Estos conforman una de las herramientas más utilizadas en los tamizados genéticos, el cual se inicia con la búsqueda de genes relacionados funcionalmente, utilizando cepas que contienen una mutación parcial o eliminación total del gen que afecta la vía de interés. Por lo tanto, los genes encontrados en los tamizados que restauran el fenotipo de la cepa salvaje se les denominan supresores de la mutación (Prelich 1999). Así mismo, Valdivieso y colaboradores (1991) utilizaron una biblioteca genómica, donde al realizar los tamizados encontraron que la sobreexpresión del gen *CALI* no aumentó los niveles de su proteína. Sin embargo, restauró la actividad de la cepa mutante en el gen *CHS3*, la cual es requerido para la síntesis de quitina para la pared celular (Valdivieso *et al.* 1991).

2.5. CONSTRUCCIÓN DE CEPAS MUTANTES DE *S. cerevisiae* USANDO MÓDULOS PARA LA ELIMINACIÓN DE GENES.

Existen módulos que tienen la función de facilitar la eliminación completa de un gen. La recombinación homóloga es uno de los mecanismos base usados por estos métodos, la cual realiza la levadura para lograr la transposición de fragmentos de ADN (Orr-Weaver *et al.* 1981). Esta técnica tuvo un gran avance, cuando se hizo evidente que sólo secuencias homólogas de 30 a 45 pares de bases (pb) eran relevantes y necesarias para una eficiente integración (Guldener *et al.* 1996; Baudin *et al.* 1993). En este sentido, Hegemann y colaboradores construyeron los plásmidos pUG, que incluyen un gen marcador como *kanMX* (pUG6) que genera resistencia al antibiótico G418 (Guldener *et al.* 1996), el gen *ble* (pUG66) que atribuye resistencia a bleomicina (Gatignol *et al.* 1990); o los genes *HIS5* (pUG27) (Wach *et al.* 1997), *URA3* (pUG72) o *LEU2* (pUG73), los que codifican para enzimas que participan en la biosíntesis de histidina, uracilo y leucina, respectivamente (Gueldener 2002). Los módulos para eliminar genes se terminan de construir con la inclusión de las secuencias adyacentes al gen a eliminar, mediante la

amplificación por PCR usando uno de los plásmidos pUG como plantilla. Posteriormente, se transforma *S. cerevisiae* con el módulo y se seleccionan los transformantes en un medio de cultivo selectivo de acuerdo al gen marcador correspondiente.

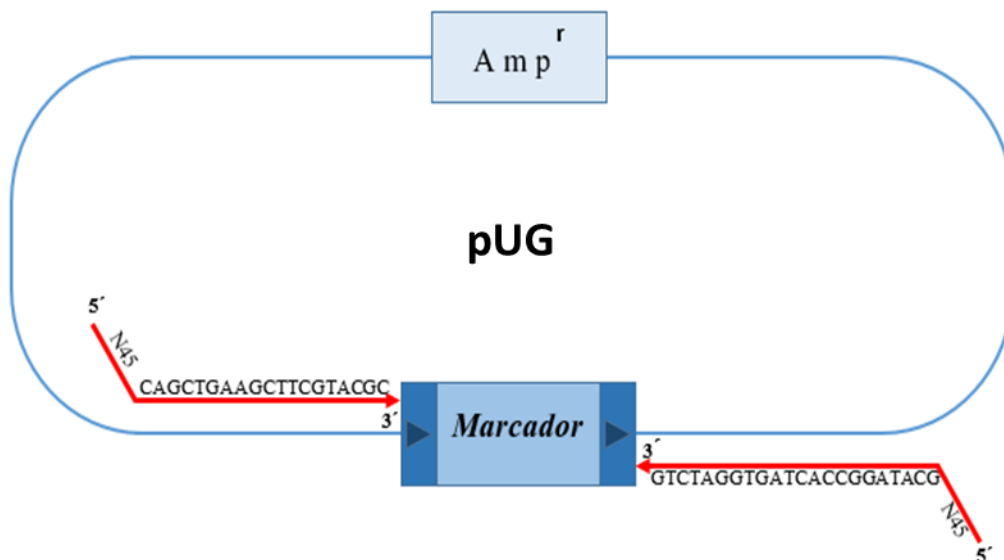


Figura 7: Plásmidos pUG construidos por Hegemann y colaboradores en el 2002 para la obtención de módulos para la eliminación de genes en *S. cerevisiae*. Las flechas en rojo representan los dos oligonucleótidos sintetizados para la amplificación por PCR. Cada oligonucleótido incluye secuencias derivadas del plásmido para la amplificación del módulo (CAGCTG...y GCATAGG...), y secuencias N45 que flanquean al gen a eliminar. Amp^r: gen que codifica para beta lactamasa y confiere resistencia a ampicilina en *E. coli*.

FUENTE: Edición propia basado en Gueldener et al. 2002.

Además, los módulos están constituidos por dos secuencias *loxP* que flanquean al gen marcador correspondiente a cada plásmido pUG. Los sitios *loxP* provienen del bacteriófago P1 y constan de 34 pb, compuestos de dos repeticiones invertidas de 13 pb separadas por una secuencia central asimétrica de ocho pb. Estas secuencias son utilizadas para eliminar si es necesario el segmento de ADN que se encuentra entre los sitios. Esta eliminación se realiza mediante la inducción de la expresión de la enzima Cre, la cual identifica los sitios *loxP* para recombinarlos específicamente. La recombinación entre los sitios *loxP* puede ocurrir ya sea inter- o intra-molecularmente, cuando los sitios están

presentes en ADN superenrollado o lineal, e independientemente de la orientación relativa de los sitios *loxP* en el fragmento de ADN (Gatignol *et al.* 1990).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR

Este trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Química Biológica y Bioanálisis del Departamento Académico de Química, en la Universidad Nacional Agraria La Molina.

3.2. MATERIALES

3.2.1. CEPAS Y PLÁSMIDOS

- *Saccharomyces cerevisiae* (W303-1a) con genotipo: *MATa leu2-3,112 his3-11,15 ura3-1 ade2-1 can1-100 trp1-1* (Thomas y Rothstein 1989).
- *Escherichia coli* (*TOP10*) con genotipo: (*mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)*, *Φ80lacZΔM15*, *ΔlacX74*, *deoR*, *recA1*, *araD139*, *Δ(araleu)7697*, *galU*, *galK*, *rpsL(StrR)*, *endA1*, *nupG*).
- Plásmido pRS202.
- Plásmido pUG6.

3.2.2. MATERIALES DE USO RUTINARIO

- Matraces.
- Micropipetas y pipetas.
- Placas Petri.
- Microplatos de 96 pocillos.
- Tubos de ensayos.
- Perlitas de vidrio de 0.4 mm y 4 mm de diámetro.

3.3. EQUIPOS

- Termociclador.
- Agitador con baño María.
- Electroporador.
- Balanza analítica.
- Congeladora de menos 20 °C.
- Ultracongeladora de menos 80 °C.
- Transiluminador con sistema de documentación.
- Incubadora.
- Cámaras de electroforesis y fuentes de poder.
- Cabina de flujo laminar.
- Refrigeradora.
- Autoclave.

3.4. REACTIVOS

- Alcohol de 70 y 90 por ciento.
- Peróxido de hidrógeno 10 Volúmenes.
- Buffer Tris/EDTA (TE).
- Isopropanol.
- Buffer TE conteniendo acetato de litio.
- Polietilenglicol (PEG) 3350.
- Acetato de amonio.
- Acetato de potasio.
- Mezcla de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1).
- Ampicilina.
- G418.
- ADN de esperma de salmón.
- ADN polimerasa termo-resistente.
- Enzimas de restricción.
- Biblioteca genómica.

La biblioteca genómica utilizada fue construida por los investigadores Connolly y Hieter (1996). Esta biblioteca fue construida usando el ADN genómico de la cepa de *S. cerevisiae* YPH1 (*MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101*) (Sikorski y Hieter 1989). Los investigadores realizaron una doble digestión del plásmido pRS202 con las enzimas de restricción *Bam*HI (GGATCC) y *Bgl*II (AGATCT) (producidas por *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus globiggi*, respectivamente). Luego de una digestión parcial con la enzima *Sau*3A (GATC) del ADN genómico de YPH1, los fragmentos fueron ligados en los sitios de restricción *Bam*HI y *Bgl*II del plásmido pRS202. Los productos de ligación se usaron para transformar *E. coli* (DH5 α). Los investigadores demostraron que desde una muestra base de la biblioteca de 19.500 transformantes, 32 de los 36 plásmidos analizados tenían insertos con tamaños medios de 6-8 Kb (Connolly y Hieter 1996).

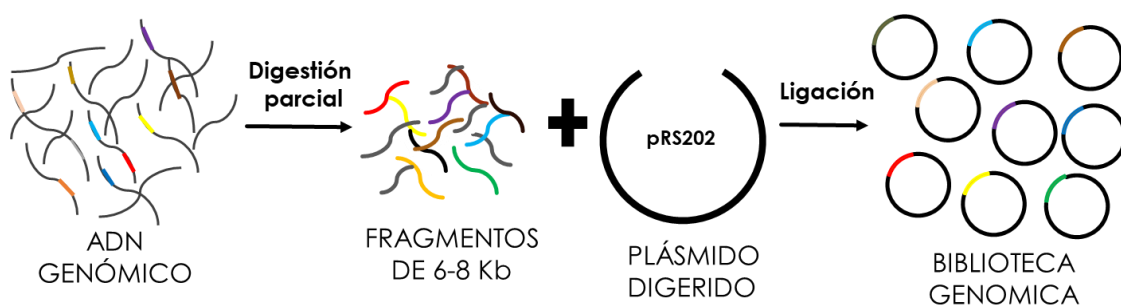


Figura 8: Resumen de la estrategia seguida por los investigadores Connolly y Hieter para la construcción de la biblioteca genómica en el plásmido multicopia pRS202.

FUENTE: Edición propia, 2019.

3.5. MEDIOS DE CULTIVO

- Agar y caldo LB (Luria Bertani): Medio de enriquecimiento para *E. coli*.
- Agar y caldo LB-Ampicilina: Medio para selección por resistencia a ampicilina.
- Agar y caldo –URA: Medio sintético y completo que carece de uracilo (-Ura) para la selección de transformantes de *S. cerevisiae*.
- Agar y caldo YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose): Medio para el mantenimiento y propagación de levaduras.
- Agar y caldo YPD-G418: Medios para la selección por resistencia a kanamicina.

3.6. MÉTODOS

3.6.1. TRANSFORMACIÓN DE *S. cerevisiae*.

Se empleó un protocolo donde se utiliza acetato de litio con buffer TE para enjuagar a las células que están en fase exponencial de su crecimiento. Se utilizaron 2 µg de la biblioteca genómica, 0.2 µg del plásmido pRS202 y productos de PCR provenientes de la construcción de módulos para la eliminación de genes. Se incubó 1 hora en 50 por ciento de PEG en acetato de litio con buffer TE y luego se trasladaron a un baño María a 42°C por 20 minutos. Finalmente la suspensión de células se incubó a 30°C en caldo YPD durante 1 hora (Schiestl y Gietz 1989).

3.6.2. TAMIZADO DE TRANSFORMANTES.

a. Ensayos preliminares

La búsqueda de genes que proporcionen resistencia ante la radiación UV y oxidantes fue motivada por estudios preliminares que compararon el efecto fotoprotector de diferentes lociones bloqueadoras, la cual utilizó a *S. cerevisiae* como organismo modelo para evidenciar estos efectos a través de su sobrevivencia a radiación UV (Gutiérrez *et al.* 2017).

En la investigación se usaron levaduras silvestres cultivadas en caldo YPD durante tres días a temperatura ambiente con agitación constante de 5 rpm. Estas suspensiones celulares se sonicaron y sembraron de forma homogénea en toda la superficie de placas YPD. Por otra parte, se esparcieron suspensiones de lociones bloqueadoras en láminas de celofán para colocarlas sobre cada placa sembrada. Las placas cubiertas con las láminas de celofán fueron expuestas a diferentes dosis de radiación UV. Estas láminas segmentadas en cuatro áreas permitían visualizar los efectos fotoprotectores de las lociones con respectivos controles (Anexo 1).

Estos ensayos preliminares motivaron la ejecución del presente estudio para buscar genes que expresen proteínas que intervengan en la protección ante radiaciones solares y compuestos oxidantes. Este trabajo se desarrolló como un componente del proyecto

“Identificación, caracterización y aplicación cosmeceútica de proteínas de levadura y oligopéptidos de secuencia aleatoria con actividad fotoprotectora o antioxidante” financiado por InnovatePeru.

b. Ensayos pre-tamizado

El objetivo de estos ensayos fue determinar las dosis adecuadas para lograr niveles evidentes de mortalidad en las células que funcionan como control. Se realizaron análisis de cientos de transformantes escogidos aleatoriamente mediante siembras en placas YPD y –URA (Figura 9). Después de una hora de incubación, las placas YPD se irradiaron por 20, 30, 40 o 60 segundos en una cámara con lámpara UV de 256 nm, posicionada a 43 cm de altura (Anexo 2). También se incubaron las siembras en placas YPD conteniendo 5, 7.5 o 10 mM de peróxido de hidrógeno.

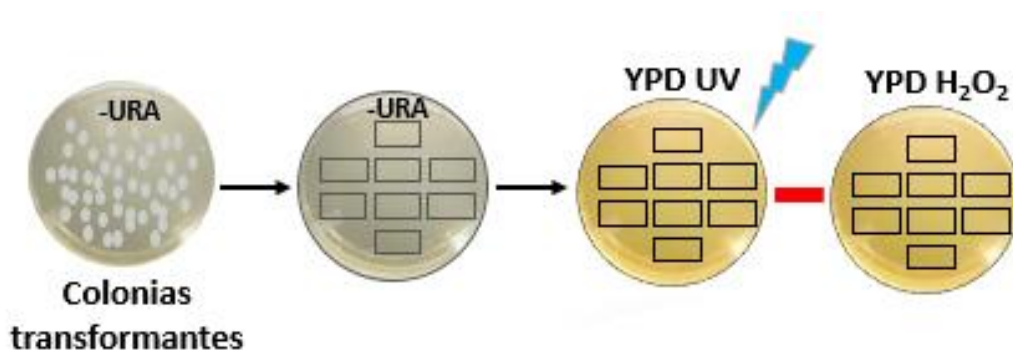


Figura 9: Determinación de la sensibilidad de cepas silvestres transformadas a radiación UV y peróxido de hidrógeno. Cada ensayo estaba compuesto de siembras en placas –URA, YPD (control), YPD con peróxido de hidrógeno, y YPD irradiado con UV.

FUENTE: Edición propia, 2019.

c. Primer método de tamizado.

Se realizaron impresos de placas de colonias transformantes en placas YPD y -URA, mediante un bloque metálico que sujeta un terciopelo estéril para retener las células (Anexo 3). Como se muestra en la figura 10, las placas impresas de YPD se trataron con 30, 40 y 60 segundos de irradiación UV. Además, se realizaron impresos en placas YPD conteniendo peróxido de hidrógeno con concentraciones de 3 o 5 mM. Luego de los tratamientos e incubación por 1 a 2 días, las colonias que mostraron crecimiento robusto fueron inoculadas en placas -URA.

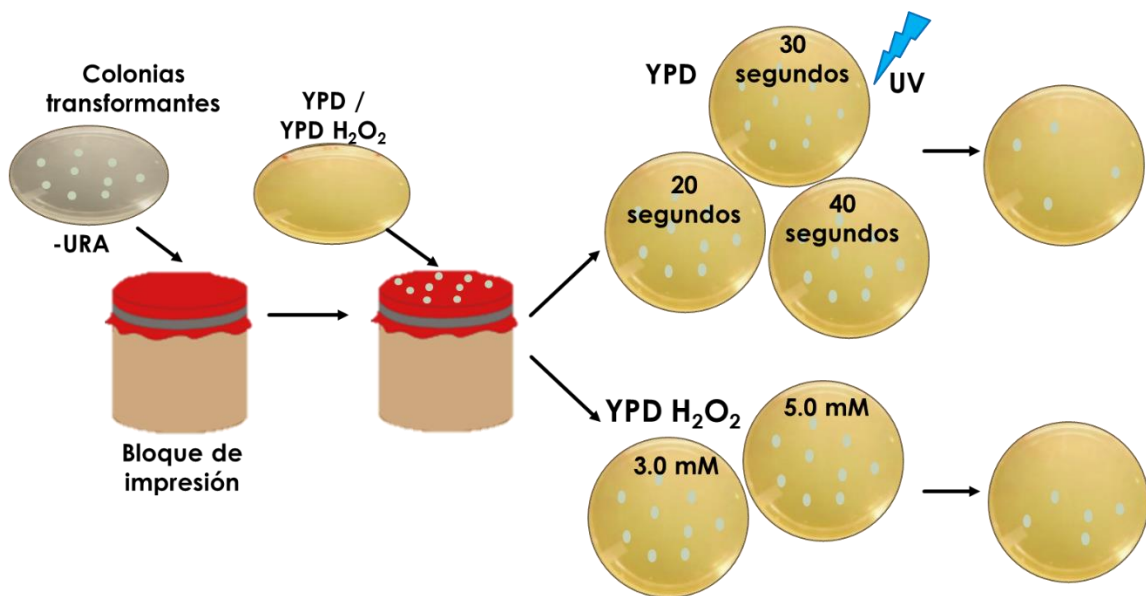


Figura 10: Esquema del primer método de tamizado genético. Los impresos se realizaron de colonias transformantes de cinco días de incubación de placas -URA.

FUENTE: Edición propia, 2019.

d. Segundo método de tamizado.

Este método se inició a partir suspensiones de células, inmediatamente después del proceso de transformación. Estas células se incubaron durante 2, 4 y 15 horas en 5 mL de caldo -URA a 30°C con agitación constante, en tubos de 15 mL (Figura 11). Estos procedimientos se realizaron independientemente para tamizados con radiación UV y peróxido de hidrógeno (Figuras 12 y 13).

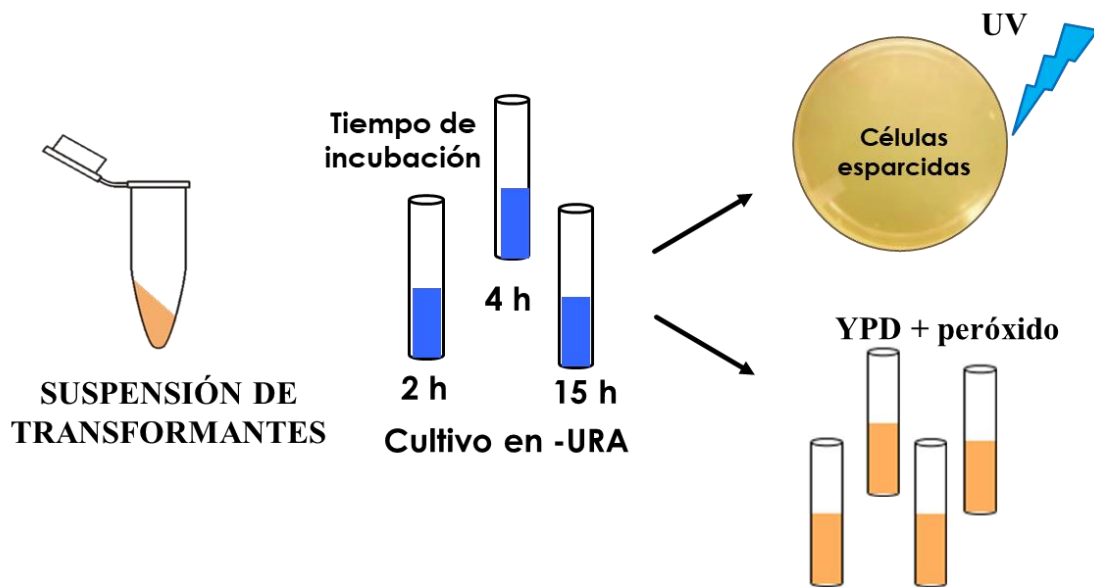


Figura 11: Esquema general del segundo método de tamizado genético. Se muestra la iniciación del tamizado mediante diferentes tiempos de incubación de transformantes y procedimientos a seguir con las células incubadas.

FUENTE: Edición propia, 2019.

En los tratamientos con radiación UV, los transformantes incubados en caldo -URA se repartieron y esparcieron sobre toda la superficie de placas YPD. Las placas sembradas y secas fueron tratadas con radiación UV durante 30, 40 y 60 segundos. Después de su incubación por 1 a 2 días, las colonias que mostraron crecimiento robusto fueron sembradas en placas -URA para verificar la presencia del plásmido de la biblioteca.

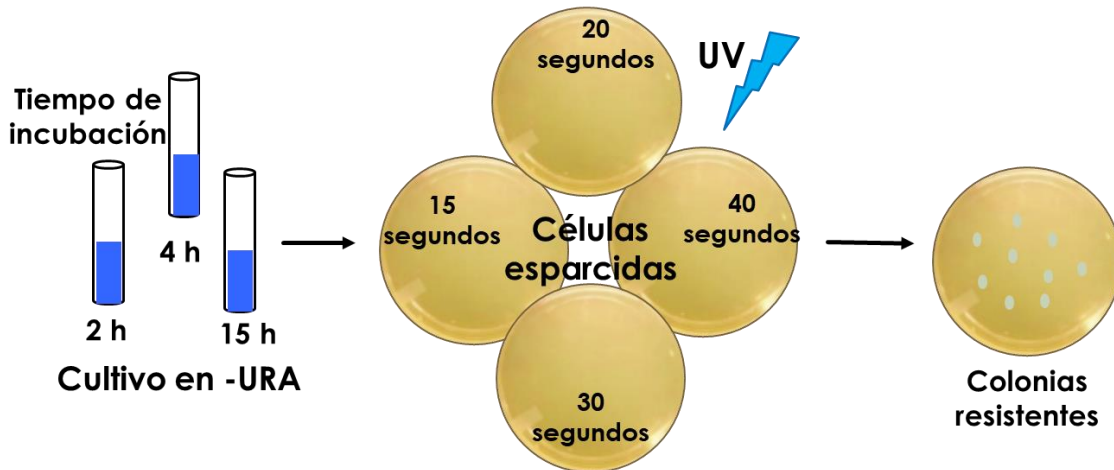


Figura 12: Procedimiento del segundo método para tamizados genéticos de resistencia a UV. Las suspensiones de células se esparcieron en suficientes placas para que dosis de UV afecte a un alto porcentaje de células.

FUENTE: Edición propia, 2019.

Para tratamientos con peróxido de hidrógeno las células incubadas en caldo -URA se centrifugaron, el sedimento celular fue separado y resuspendido en 10 mL de YPD, y se incubó por una hora. Transcurrido este tiempo, se adicionó peróxido de hidrógeno para obtener concentraciones de 15, 20, 30 y 40 mM. Se incubó con agitación constante durante 20, 40 y 60 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, las células fueron colectadas por centrifugación, lavadas con agua destilada estéril, resuspendidas en el mismo medio, y sembradas en placas conteniendo agar -URA que fueron luego incubadas a 30°C.

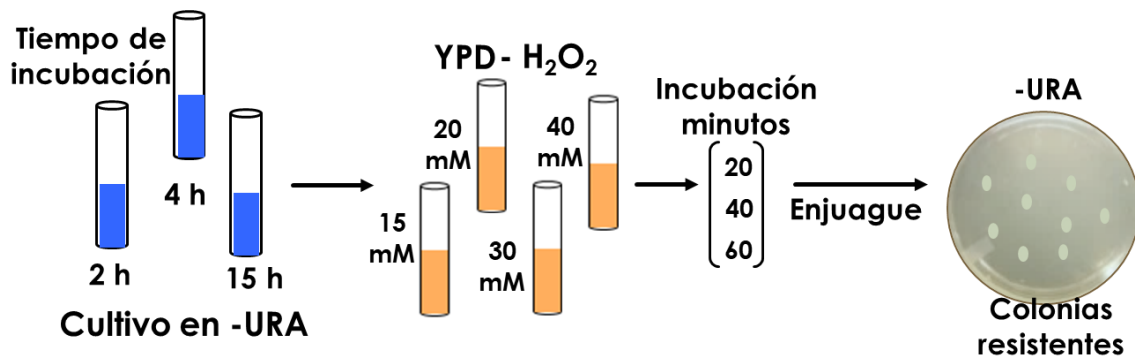


Figura 13: Procedimiento del segundo tamizado genético de resistencia a peróxido de hidrógeno. Se muestran tratamientos con peróxido de hidrógeno en caldo YPD y diferentes tiempos de incubación. Luego de enjuagar las células con agua destilada estéril, se sembraron y recuperaron las células que crecieron en placas -URA.

FUENTE: Edición propia, 2019.

e. Ensayos post-tamizados.

Posterior a los tamizados descritos, se realizaron ensayos de confirmación de resistencia en los diferentes tratamientos, como se muestra en la Figura 14. Se realizaron siembras en medios con agar YPD (control), -URA (control), YPD irradiado con UV, y YPD con peróxido de hidrógeno en áreas de 4, 8.6 y 17.2 cm². Se incubó durante 1 hora, y se sometió a tratamientos con radiación UV en las placas tratadas durante 15, 20 y 30 segundos; y con placas YPD conteniendo peróxido de hidrógeno, a concentraciones de 2,5 y 3 mM.

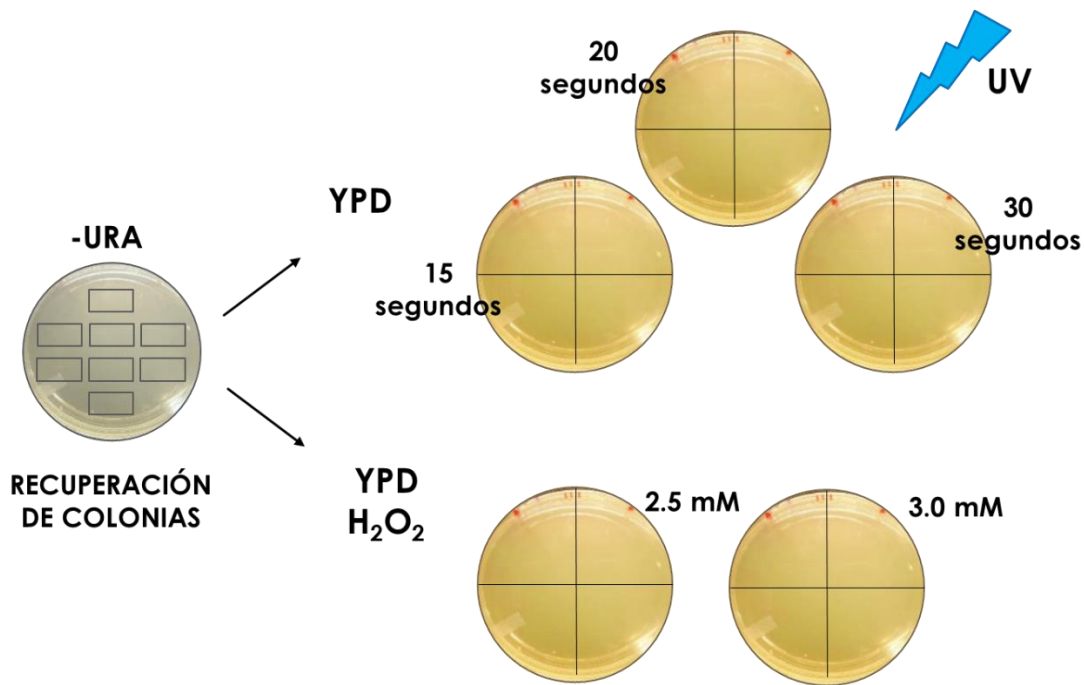


Figura 14: Tratamientos finales de candidatos seleccionados en los tamizados. Como en los ensayos anteriores, estas pruebas se realizaron con sus respectivos controles en placas.

FUENTE: Edición propia, 2019.

3.6.3. CONSTRUCCIÓN DE CEPAS MUTANTES DE *S. cerevisiae*.

Con el propósito de maximizar la sensibilidad y resolución de los ensayos de fotoprotección y capacidad anti-oxidante se construyeron mutantes que carecen de los genes *RAD9*, *RAD24* y *YAP1*. El método usado se basa en el plásmido pUG6 desarrollado por J. Hegemann y colaboradores, que incluye el módulo *loxP-KanMX-loxP*, que confiere resistencia al antibiótico G418 (Guldener *et al.* 1996). Para dirigir el módulo a los respectivos loci de los genes *RAD9*, *RAD24* y *YAP1* y permitir su reemplazo, se realizó una amplificación por PCR usando como plantilla el plásmido pUG6 y los respectivos primers (Tabla 1). Estos oligonucleótidos incluyen secuencias homólogas al módulo permitiendo su amplificación (secuencias subrayadas en los oligonucleótidos listados en el Tabla 1), y secuencias que flanquean al gen diana para que el producto de PCR resultante pueda reemplazarlo correctamente mediante recombinación homóloga. Luego de la transformación de la cepa de levadura W303 con los respectivos productos de PCR, se seleccionaron los transformantes usando un medio que contiene G418. Los

transformantes fueron luego evaluados, verificando su aumentada sensibilidad a radiación UV o peróxido de hidrógeno, así como la eliminación de cada gen y su reemplazo por el módulo *loxP-KanMX-loxP*. Esta verificación se realizó mediante PCR, usando el ADN genómico de los transformantes como plantilla, y primers específicos para los genes y para el módulo *loxP-KanMX-loxP*.

Tabla 1: Oligonucleótidos usados en la construcción y verificación de las cepas mutantes rad9, rad24 y yap1.

GEN OBJETIVO	OLIGONUCLEÓTIDOS (5' → 3')
<i>Eliminación del gen</i>	
Y1HgDir	CCTGAGCCCCTGGTTGACTTGTGCATGAACACGAGCCATTTTGTAG <u>CAGCTGAAGCTTCGTACGC</u>
Y1HgRv	TTAGTTCATATGCTTATTCAAAGCTAATTGAACGTCTTCTGCATT <u>GCATAGGCCACTAGTGGATCTG</u>
R9HgDir	TCGTGGATATTTGCAACGATGAGCAATGTGAAGTGAGCAAGATA <u>GCAGCTGAAGCTTCGTACGC</u>
R9HgRv	TCATCTAACCTCAGAAATAGTGTTGTATATATCATTGTCCGTAAT <u>GCATAGGCCACTAGTGGATCTG</u>
R24HgDir	TGATTCAACACCACTAATTATCAAGTTTGTTCCTGTCTGAATGAT <u>CAGCTGAAGCTTCGTACGC</u>
R24HgRv	TTAGAGTATTTCCAGATCTGAATCTGAAAGGGACTCACTGATAA <u>CGCATAGGCCACTAGTGGATCTG</u>
<i>Específicos al gen/ primers de verificación</i>	
Y1chk486UP	AAACGGCAGTAAACGACGCC
Y1chk496DW	CCATCAATGCTATGAGTGCC
R9chk492UP	TATCGACGAAACCTCAAGGG
R9chk462DW	CATCAAACAGCCATGCATGC
R24chk424UP	GTTGTGATATTTCCGCATCC
R24chk519DW	CTACGTCTGATGAGGAAAGC
<i>Específicos al módulo/ primers de verificación</i>	
HgchkUPRv	GCGTACGAAGCTTCAGCTG
HgchkDWDDir	CAGATCCACTAGTGGCCTATGC

FUENTE: Edición propia, 2019.

3.6.4. RECUPERACIÓN DE ADN TOTAL DE LEVADURAS TRANSFORMANTES.

Se realizó la extracción del ADN total a partir de las suspensiones de células de levadura. Se empleó un buffer de ruptura (1.2 por ciento de SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8.0, 1mM EDTA), asistido con una mezcla vigorosa con perlas de vidrio de 5 mm de diámetro en presencia de fenol/cloroformo usando un agitador de vórtice (Schneegurt *et al.* 2003). El sobrenadante acuoso fue recuperado por centrifugación y luego tratado con isopropanol y etanol para la precipitación y lavado de los ácidos nucleicos. El sedimento seco conteniendo los ácidos nucleicos totales fue finalmente disuelto en buffer TE (Tris-EDTA).

3.6.5. TRANSFORMACIÓN DE *E. coli* POR ELECTROPORACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS AMPLIFICADOS.

Se emplearon las muestras de ADN total que incluían los plásmidos para transformar la cepa TOP10 de *E. coli* por electroporación. Para la preparación de las células electrocompetentes, se dejó crecer un inóculo durante toda la noche, y luego de cuatro ciclos de centrifugación y enjuague en frío, se resuspendió en suficiente agua fría estéril para lograr una densidad de 2×10^{11} células/mL. Para la electroporación, se mezclaron 40 μ L de la suspensión celular con 1 μ L de la solución de ADN total recuperado de la levadura, transfiriendo la mezcla a una cubeta de electroporación de ranura de 1mm para someterla a un pulso eléctrico de 1700V. Inmediatamente después se añadió 1mL de caldo LB y se transfirió a microtubos para su incubación a 37°C por una hora, finalmente se sembró en placas conteniendo medio LB-Ampicilina.

Las colonias de *E. coli* obtenidas fueron cultivadas en caldo LB-Ampicilina para la amplificación y purificación de los plásmidos. El método usado se basa en cambios de pH para la eliminación del ADN genómico, la adición de la mezcla acetato de potasio 5M/fenol (7:3), y la precipitación del ADN plasmídico con alcohol etílico helado. Los sedimentos de ácidos nucleicos obtenidos fueron disueltos en 50 μ L de buffer TE que contenía 20 μ g/mL de ribonucleasa y finalmente llevados a incubación por 30 minutos a 37°C.

3.6.6. ANÁLISIS DE LOS PLÁSMIDOS.

a. Análisis molecular

Se analizaron los plásmidos purificados por electroforesis en gel de agarosa, para confirmar la cantidad obtenida y comparar los respectivos patrones de migración. Además, se realizaron digestiones con las enzimas de restricción *ScaI* y *SacI* para la generación de los mapas de restricción, y de esta manera seleccionar con seguridad los plásmidos que contenían insertos.

b. Confirmación del aumento de la resistencia a radiación UV o peróxido de hidrógeno usando mutantes.

Se transformaron cepas silvestres y mutantes de levadura (descritos en 3.6.4) con los plásmidos seleccionados purificados (Figura 15). Se realizaron tratamientos a los transformantes descritos en el punto “e” de los métodos de tamizados. Además, se realizaron tratamientos con radiación UV y peróxido de hidrogeno en siembras diluidas en serie. Para estos ensayos, los transformantes se sembraron e incubaron en caldo – URA a 30°C con agitación constante hasta alcanzar el estado de saturación del crecimiento (4-5 días). La suspensión del cultivo se sonicó para obtener células dispersas individuales. Cada cultivo fue diluido en serie en proporciones 1:3 en placas de 96 pocillos, con agua destilada estéril. Finalmente, los cultivos diluidos se sembraron en alícuotas de 3µL en placas con agar-YPD para realizar los respectivos tratamientos.

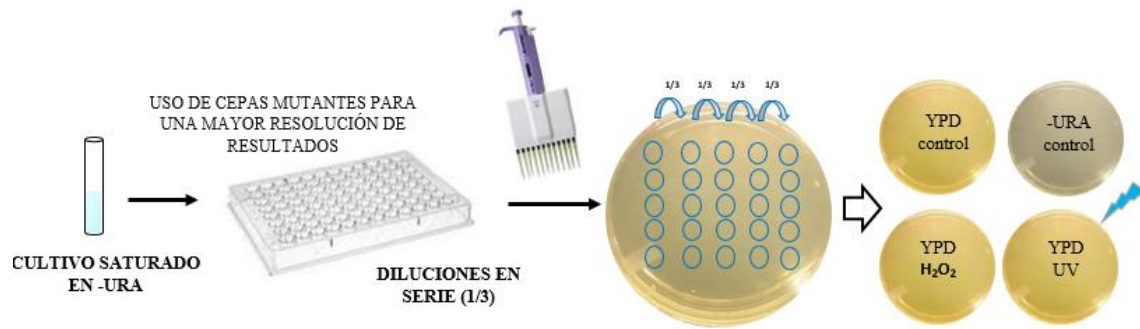


Figura 15: Ensayos de confirmación de la resistencia con mayor resolución usando diluciones en serie. En esta etapa se utilizó las cepas mutantes *rad9*, *rad24* y *yap1* que son sensibles a radiación UV y peróxido de hidrógeno, respectivamente.

FUENTE: Edición propia, 2019.

c. Secuenciación de los plásmidos.

Los plásmidos fueron purificados empleando el kit Zyppy Plasmid Miniprep de ZYMO RESEARCH. La secuenciación fue llevada a cabo por Macrogen Inc., Seúl-Korea del Sur (Macrogen Online Sequencing Order System).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ESTUDIOS PRELIMINARES

El método y la ecuación aplicada en la investigación publicada sugieren que el método de Mansur no es adecuado para analizar el efecto de los filtros solares con valores de FPS (Factor de protección solar) superiores a 15. Sin embargo, en los ensayos de sobrevivencia de células de *S. cerevisiae* luego de exponerlas a radiación UV evidenciaron correlación respecto a los FPS declarados. En este contexto, las dosis de irradiación utilizadas en el estudio fueron extrapoladas para la optimización de dosis adecuadas para lograr niveles evidentes de mortalidad en las células (Gutiérrez *et al.* 2017).

4.2. TRANSFORMACIÓN DE *S. cerevisiae* CON LA BIBLIOTECA GENÓMICA.

Se transformó cultivos de levadura silvestre con el plásmido pRS202 o la biblioteca genómica para conocer los números de transformantes aproximados a utilizar en los tamizados (Figura 16). Se obtuvo en promedio $3.05 \cdot 10^4$ transformantes por microgramo de plásmido pRS202 y $9.68 \cdot 10^4$ transformantes por microgramo de la biblioteca, usando acetato de litio en buffer TE y choque térmico (Schiestl y Gietz 1989). La biblioteca genómica proporcionada describe que contiene una concentración aproximada, lo cual podría explicarse la alta eficiencia de transformación de la biblioteca comparado con el plásmido pRS202. En este contexto, fue importante obtener estos datos para realizar los cálculos sobre la cantidad de transformantes con la biblioteca que serán tamizadas.

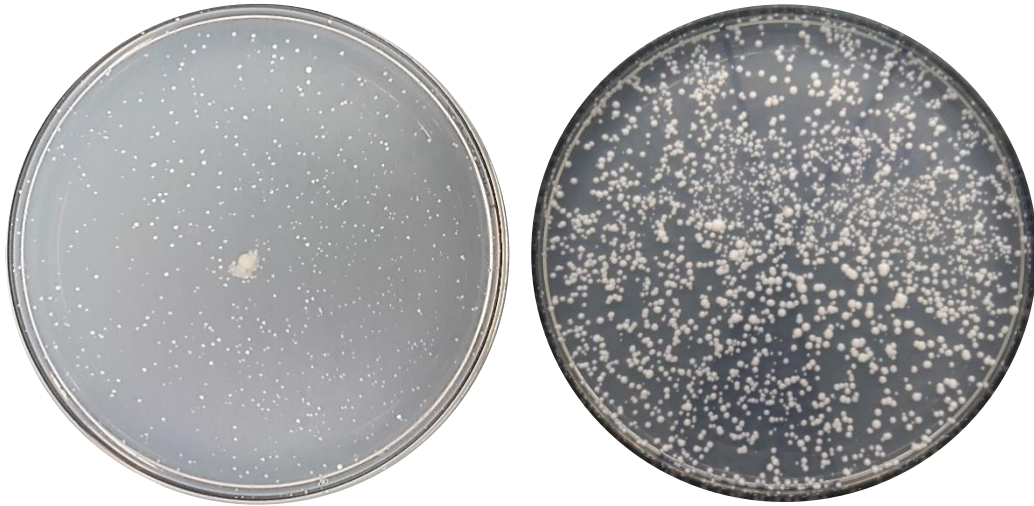


Figura 16: Transformaciones de la levadura *S. cerevisiae* con plásmido sin inserto o la biblioteca genómica. A la izquierda se muestra una transformación con el plásmido pRS202 con una eficiencia de $3.05 \cdot 10^4$ transformantes por microgramo de ADN. A la derecha se muestra transformantes de la biblioteca genómica con una eficiencia de transformación de $9.68 \cdot 10^4$ colonias por microgramo de ADN.

FUENTE: Edición propia, 2019.

4.3. OPTIMIZACIÓN DE LOS PROTOCOLOS DE TAMIZADOS.

A partir de los resultados de eficiencia de transformación obtenidos, se analizaron aproximadamente $1 \cdot 10^5$ transformantes en cada tamizado, cantidad que permite inferir que estuvieron representados todos los fragmentos del genoma de la levadura. Los ensayos pre-tamizado se diseñaron con el objetivo de definir las dosis adecuadas de radiación UV y peróxido de hidrógeno para tratar a las células en medios con agar.

El primer método de tamizado que se probó abarcó grandes cantidades de transformantes. Se aplicaron las dosis de radiación UV y peróxido de hidrógeno definidos en los ensayos de pre-tamizado. Sin embargo, placas de YPD con 5 mM resultaron ser muy tóxicas para las células impresas. Inicialmente, este método se diseñó para que la selección de colonias resistentes ubicados en placas YPD se realice en las placas originales de transformantes (-URA), pero éstas colonias resistentes a los tratamientos eran difíciles de ubicar en sus placas originales. Por tal motivo, se optó por seleccionar las colonias candidatas en las placas YPD que habían sido tratadas con radiación UV y peróxido de hidrógeno. Se

obtuvieron numerosas colonias candidatas que resistieron a los tratamientos, pero al sembrarlas en agar –URA muchos de los candidatos no crecieron, probablemente porque carecían del plásmido. Además, al realizar los ensayos de confirmación de resistencias (3.6.2.e) a los candidatos restantes, muy pocos respondieron positivamente.

En el segundo método, la incubación de las células durante 15 horas en caldo –URA inmediatamente después de la transformación, permitió que se acondicionen al medio sintético y puedan expresar los genes situados en el plásmido de la biblioteca. En comparación con el método de impresión de transformantes en placas, este método resultó en una menor selección inicial de candidatos, pero una mayor proporción de estos exhibieron crecimiento en medio -URA.

4.3.1. TAMIZADO CON RADIACIÓN UV.

Las células de levadura al ser transformadas con la biblioteca genómica poseen diferentes fragmentos genómicos en el vector, formándose cepas distintas, lo cual conlleva a un difícil manejo en la determinación de la dosis de radiación UV de las miles de cepas obtenidas. Para este caso, se usaron como referencia las dosis de radiación UV requeridas para obtener un nivel alto de mortalidad de células de levadura transformadas con pRS202, que funcionaron como control.

En los ensayos previos a los tamizados con la lámpara casera, mostraron que dosis de 30 a 40 segundos de irradiación causaban mortalidad de colonias transformadas con pRS202 (control) en siembras de 4 cm², y dosis de 30 y 20 segundos en áreas de 8.6 y 17.2 cm² respectivamente. En muchas investigaciones han utilizado equipos como el CL-1000 Ultraviolet Crosslinker (UVP) que contiene cinco lámparas de 8 Watts y emite 120 mJ/cm² de radiación UV (254 nm), a estas dosis de energía el equipo en 30 segundos realiza entrecruzamientos de ácidos nucleicos purificados. Zhou y colaboradores utilizaron este equipo para irradiar levaduras y demostraron que la ubiquitinación inducida por UV del complejo Rad4-Rad23 de levadura regula la respuesta transcripcional que controla la producción de dNTP y la supervivencia celular después del daño por UV (Zhou et al. 2015).

Es importante destacar que los daños ocasionados por radiaciones UV activan muchas redes de genes y por esta razón, muchas de las respuestas no son las mismas en todas las células (Terleth *et al.* 1990), por tal motivo es difícil encontrar una dosis exacta en la que los transformantes con pRS202 reduzcan su crecimiento (Petin y Kim 2004).

Con respecto al segundo método, tiempos de radiación de 40 y 60 segundos fueron los más adecuados para aplicar a células transformadas con la biblioteca, en este caso las dosis aumentaron por la mayor concentración de células esparcidas en las placas.

Los cientos de candidatos seleccionados en los diferentes tamizados, se sembraron en placas –URA para recuperar solo colonias transformantes con la biblioteca. Los ensayos post-tamizados permitieron la selección de 30 candidatos.

4.3.2 TAMIZADO CON PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.

En los ensayos previos a los tamizados, se determinó que los medios debían contener de 2.5 a 3 mM de peróxido de hidrógeno. Estas placas se utilizaron para el primer método de tamizado y en ensayos post-tamizados siguiendo los diferentes métodos.

Al igual que en tamizados con UV en el segundo método de tamizado, las células transformantes se incubaron en –URA para permitir la expresión de los genes. En este tamizado fue muy importante que las células se encuentren en contacto directo con el peróxido de hidrógeno, por tal motivo los ensayos se realizaron en caldo YPD. El peróxido de hidrógeno no causa altos daños como tal al interior de la célula. Sin embargo, su facilidad de cruzar membranas hace posible que pueda reaccionar con algunos metales de transición, como el hierro o el cobre reducidos, formando radicales hidroxilo (HO[•]), uno de los radicales con mayor reactividad (Folch-mallol *et al.* 2004).

Se obtuvieron cientos de candidatos que respondieron en los diferentes tamizados con peróxido. En los ensayos post-tamizado, siembras de 4 cm² en placas YPD con una concentración de 2.5 y 3 mM de peróxido, descartó un alto porcentaje de los candidatos seleccionados inicialmente. Posteriormente, los ensayos en áreas de 8.6 y 17.2 cm² solo se realizaron en placas YPD con 2.5 mM de peróxido de hidrógeno, dando lugar a la selección de dos colonias.

4.4. PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS PLÁSMIDOS.

La comparación de pRS202 con los plásmidos candidatos intactos y digeridos por enzimas de restricción en un gel electroforético, evidenció que solo seis plásmidos contenían fragmentos de ADN proveniente de la biblioteca (Figuras 17 y 18). Es interesante notar que durante la construcción de la biblioteca genómica, los investigadores reportaron que en una muestra que tomo como base a 19,5 mil transformantes, de 36 clones analizados, 32 tenían insertos con un tamaño promedio de 6-8 kilobases (Kb), uno tenía solo el vector y tres fueron mucho más pequeños de lo esperado (Connelly y Hieter 1996).

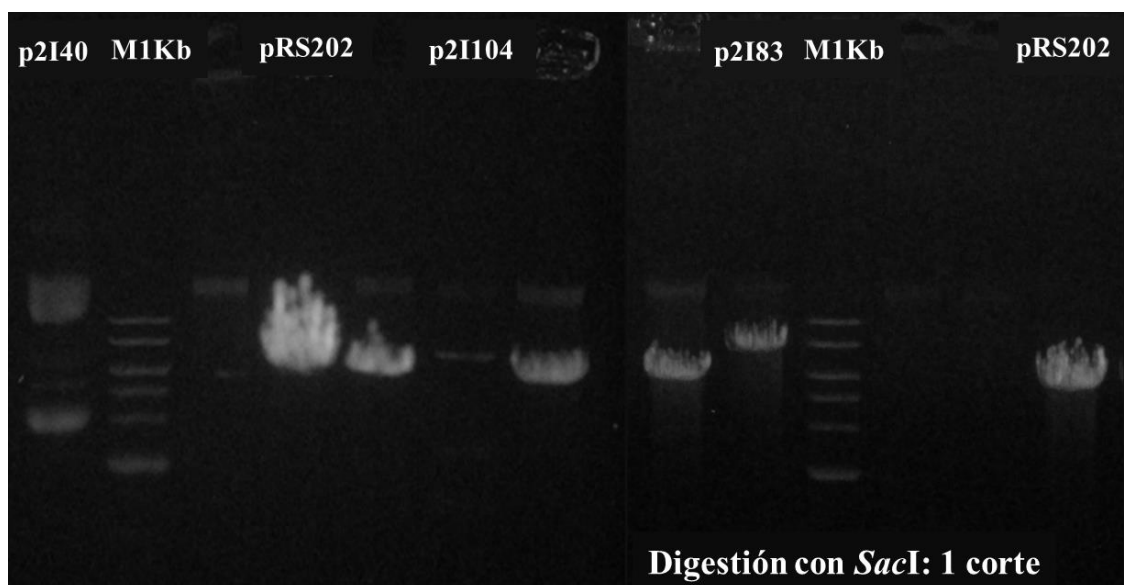


Figura 17: Plásmidos seleccionados de los tamizados genéticos digeridos con *SacI*. Se utilizó un marcador (M) de 1 Kb de tamaño para detectar diferencias de tamaños entre los plásmidos linearizados.

FUENTE: Edición propia, 2019.

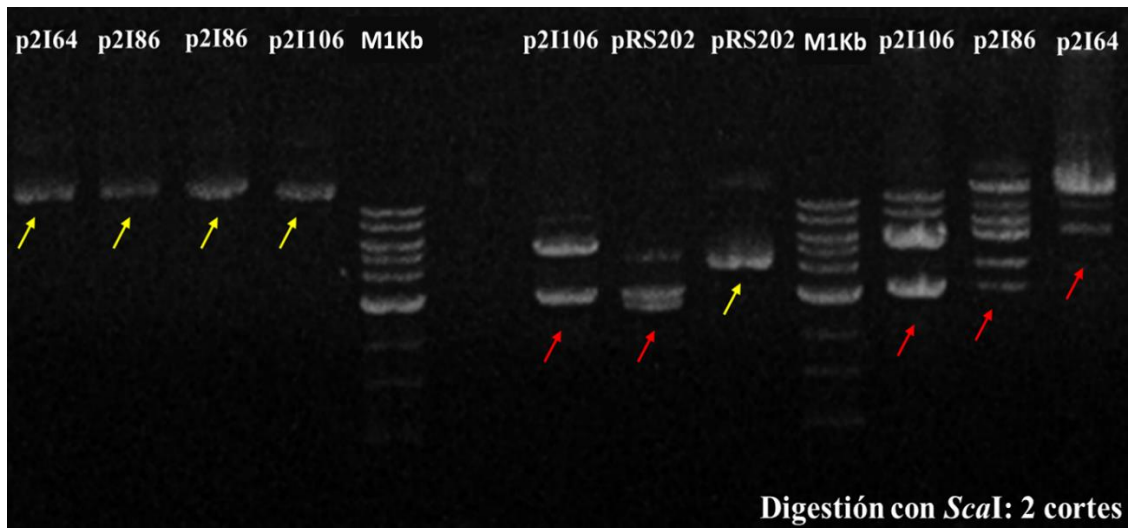


Figura 18. Plásmidos seleccionados de los tamizados genéticos digeridos con *ScaI*. Las flechas amarillas indican plásmidos sin digerir. Las flechas de rojo indican digestiones de los plásmidos. Se muestran dos fragmentos de 3,127 y 3,145 Kb de tamaño en el plásmido pRS202 digerido y fragmentos de mayor tamaño en los candidatos.

FUENTE: Edición propia, 2019.

4.5. CONSTRUCCIÓN DE CEPAS MUTANTES DE *S. cerevisiae*.

4.5.1. OBTENCIÓN DE LOS MÓDULOS PARA ELIMINAR LOS GENES *RAD9*, *RAD24* Y *YAP1*.

En primer lugar, la amplificación de los módulos mediante PCR usando el plásmido pUG6 como plantilla y los oligonucleótidos diseñados descritos en la Tabla 1, se evidenció en el gel electroforético mostrado en la Figura 19 con las bandas que muestran un tamaño aproximado de 1.7 kilobases (Kb).

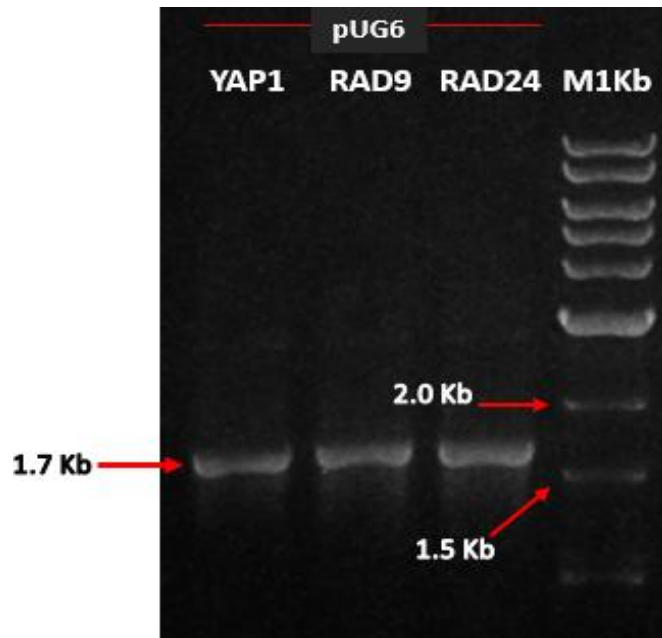


Figura 19: Análisis electroforético en gel de agarosa de productos de PCR para la construcción de módulos de eliminación de genes. Se usó como plantilla el plásmido pUG6 y primers específicos para cada gen. Los tamaños de los fragmentos esperados fueron en cada caso de 1.7 Kb. M1Kb, marcador de 1 Kb.

FUENTE: Edición propia, 2019.

4.5.2. VERIFICACIÓN DE LAS CEPAS MUTANTES

Se obtuvieron células transformantes con los módulos generados por PCR. Estas células crecieron en placas YPD conteniendo G418, lo cual muestra una alta posibilidad que se ha realizado la recombinación entre el módulo construido y el gen objetivo (Figura 20).



Figura 20: Muestra representativa de una transformación de la levadura silvestre con los módulos de eliminación. Se pueden observar un gran número de pequeñas colonias que cesaron su crecimiento por acción del antibiótico. Las células que logran formar colonias de tamaños superiores son aquellas que han adquirido el módulo de eliminación con el marcador *loxP-kanMX-loxP* y son por tanto resistentes al antibiótico G418.

FUENTE: Edición propia, 2019.

La utilización de los primers Y1chk486UP, R9chk492UP y R24chk424UP (Secuencias específicas para el gen a eliminar) y el primer HgchkUPRv (Específico para el módulo) en las reacciones por PCR, dio como resultado bandas amplificadas del ADN genómico aislado de transformantes que corresponden al módulo *loxP:kan:loxP*. El análisis electroforético mostrado en la Figura 21 confirmó la total eliminación de los genes *RAD9*, *RAD24* y *YAP1* (Guldener *et al.* 1996).

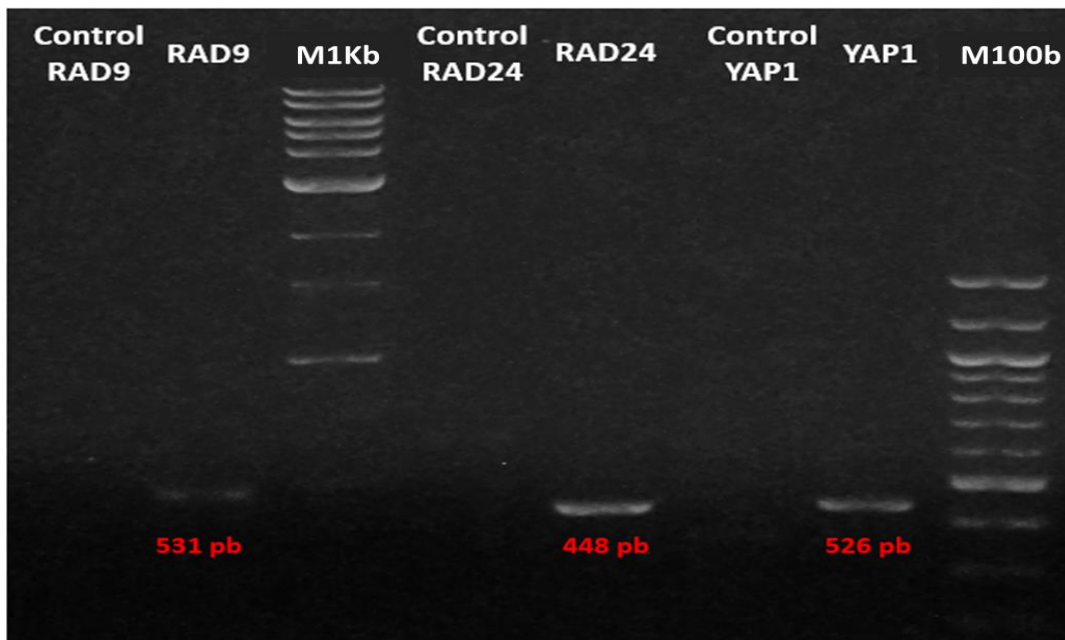


Figura 21: Verificación de la eliminación de los genes *RAD9*, *RAD24* y *YAP1*. Los controles *RAD9*, *RAD24* y *YAP1* corresponden a ensayos de PCR donde se usaron primers específicos para cada gen y ADN genómico de la cepa silvestre de levadura como plantilla. Las cepas mutantes *rad9*, *rad24* y *yap1*, mostraron bandas esperadas de 531, 448 y 526 pb respectivamente de acuerdo a los primers de verificación diseñados específicamente para cada gen.

FUENTE: Edición propia, 2019.

Por otro lado, en los ensayos de sensibilidad de las cepas mutantes obtenidas, las cepas mutantes *rad9* y *rad24* mostraron sensibilidad con 30 segundos de radiación UV en placas YPD, y la cepa *yap1* mostró sensibilidad en placas YPD con 2.5 mM de peróxido de hidrógeno (Figura 21).

De otro lado, la construcción de la cepa mutante *rad9* ha servido como aporte en los ensayos de fotoprotección *in vivo* del artículo recientemente aceptado por la revista de la Sociedad Química del Perú. Este trabajo ha permitido demostrar que los bloqueadores comerciales con valores de factor de protección solar (FPS) mayor a 50 ofrecen similares niveles de fotoprotección (Merino *et al.* Aceptado el 07 de diciembre de 2018)

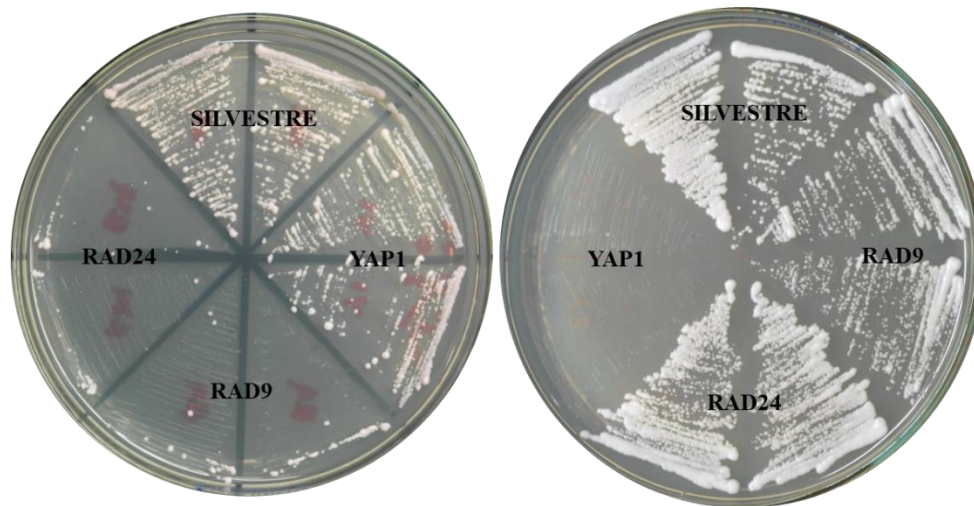


Figura 22: Ensayos de sensibilidad de cepas mutantes obtenidas. A la izquierda se muestra crecimiento en una placa YPD irradiada con UV por 15 segundos. A la derecha, crecimiento en una placa YPD conteniendo 2.5 mM de peróxido de hidrógeno.

FUENTE: Edición propia, 2019

4.6. CONFIRMACIÓN DE LOS EFECTOS FOTOPROTECTORES O ANTIOXIDANTES DE LOS PLÁSMIDOS SELECCIONADOS.

Los tratamientos aplicados a transformantes silvestres con los plásmidos purificados (re-transformación), evidenció que existen diferencias respecto a transformantes con el plásmido pRS202 como se muestra en las Figuras 23 y 24.

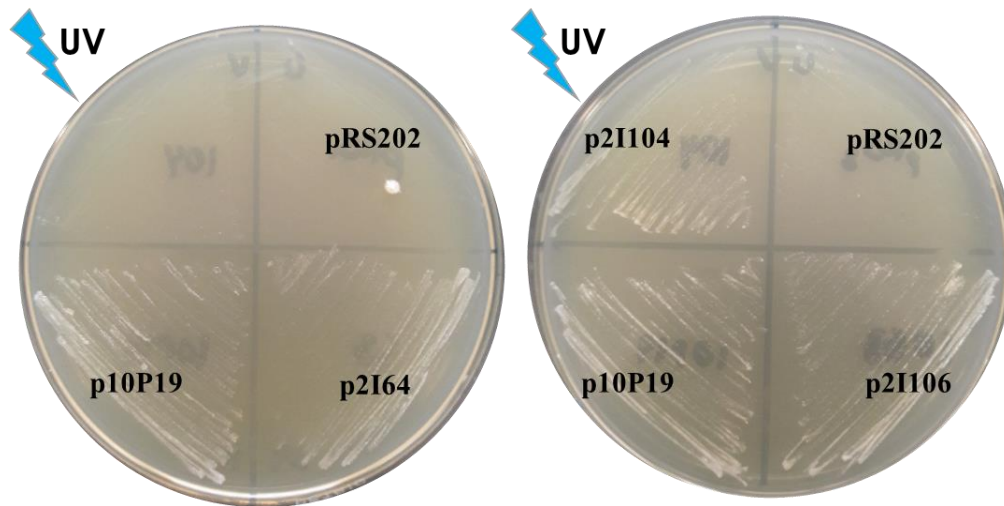


Figura 23. Confirmación del aumento de resistencia a radiación UV conferida por los plásmidos seleccionados. Se muestran siembras de células silvestres transformadas con los plásmidos purificados y pRS202 como control. Se observa mayor crecimiento de plásmidos purificados en placas irradiadas durante 30 segundos.

FUENTE: Edición propia, 2019.

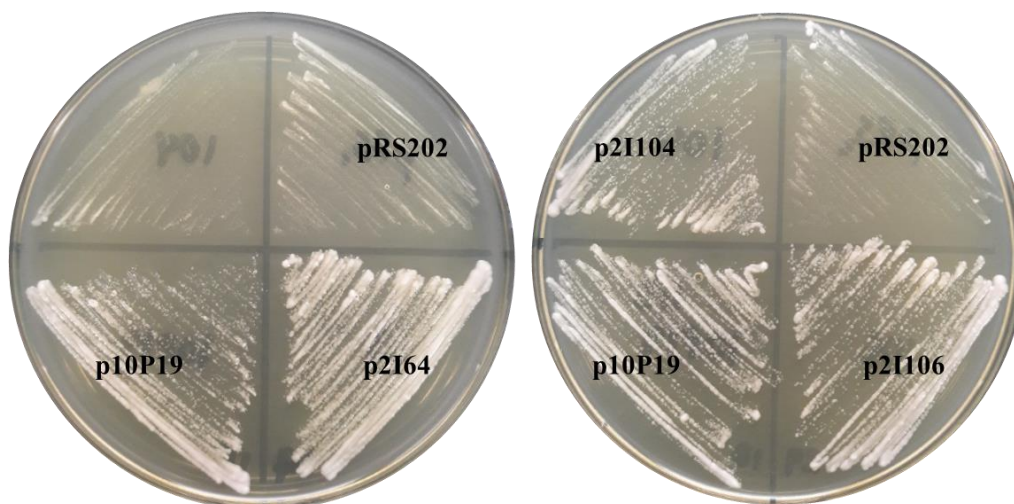


Figura 24. Confirmación del aumento de resistencia a peróxido de hidrógeno conferida por algunos de los plásmidos seleccionados. Se muestran siembras de algunos transformantes con los plásmidos purificados tratados en placas YPD que contenían 2.5 mM de peróxido de hidrógeno.

FUENTE: Edición propia, 2019.

Sumado a estos ensayos de confirmación, las cepas mutantes *rad9* y *rad24* también se transformaron con los plásmidos seleccionados. Los ensayos realizados mostraron que los transformantes eran demasiado susceptibles a las radiaciones proporcionada por la lámpara UV. Sin embargo, en ensayos con peróxido de hidrógeno estas cepas transformantes mostraron resultados parecidos a los ensayos con células silvestres como se observa en la Figura 25. Por otro lado, la cepa mutante *yap1* no respondió de forma positiva al proceso de transformación, y por este motivo no se pudieron realizar los ensayos de resistencia a peróxido.

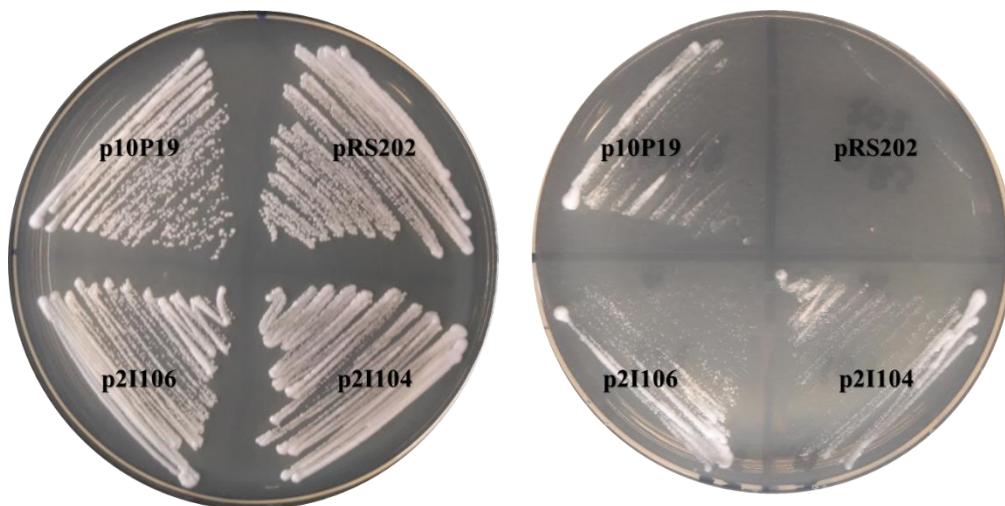


Figura 25. Confirmación del aumento de resistencia a peróxido de hidrógeno conferido por los plásmidos en cepas mutantes *rad9*. A la izquierda se muestra siembras de transformantes en placas YPD para verificar el estado de crecimiento de los transformantes y a la derecha placas YPD que contenían 2,5 mM de peróxido de hidrógeno e incubadas a temperatura ambiente durante un día.

FUENTE: Edición propia, 2019.

4.7. IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES PRESENTES EN LOS PLÁSMIDOS ANALIZADOS.

Se secuenciaron cinco plásmidos seleccionados con los primers universales T3 y T7. La secuenciación de estos candidatos dio a conocer presencia de genes completos o parciales,

genes de dudosa y desconocida actividad, al realizar los análisis en la base de datos de *Saccharomyces*.

Los genes de algunos candidatos tienen cierta participación en mecanismos de defensa cuando la célula se encuentra expuesta a oxidantes; como el plásmido p2I64, que contiene el gen *ANTI* requerida para la proliferación peroxisomal en respuestas a estímulos ambientales (Schrader *et al.* 2016, Van Roermund *et al.* 2001), lo cual se pudo haber generado al irradiar o al estar en un medio con peróxido de hidrogeno las células de levadura. Unas de las principales actividades de los peroxisomas es contribuir al metabolismo de los radicales libre mediante distintas enzimas y peroxidasas que se encuentran en su interior, y posiblemente atribuyeron al crecimiento de transformantes ante daños por peróxido de hidrógeno o por radiaciones UV. También se encontró el gen *YPR127W* que codifica a piridoxal reductasa, esta enzima está involucrada en la vía de síntesis de vitamina B6 (Zuzuarregui *et al.* 2006). Esta vitamina es un cofactor para más de 140 reacciones enzimáticas esenciales y se propuso recientemente como un antioxidante eficaz y desempeñando un papel en la fotoprotección de las plantas (Szydlowski *et al.* 2013). Por último, el gen *CTRL*, que codifica para un transportador de cobre de alta afinidad de membrana plasmática cuya presencia confiere resistencia a estrés oxidativo (Dancis *et al.* 1994), Además, este plásmido contiene genes como *YPR123C* y *YPR126C* con funciones dudosas hasta el momento, y fragmentos del gen *AXLI* que codifica para una endoproteasa específica haploide de feromona de apareamiento de factor a.

En el plásmido p2I104, se encontraron genes como: *PEX5*, que codifica para un receptor de señal de la membrana peroxisomal para importar proteínas del citosol a la matriz peroxisomal (Distel *et al.* 1996, Heiland y Erdmann 2005). También se encontró el gen *TRS23*, un componente central del complejo proteico (TRAPP), que regula el transporte de partículas entre organelos, como el tráfico entre retículo endoplasmático (RE)-Golgi, tráfico intragolgi, tráfico endosomas-golgi, y la autofagia (Sacher *et al.* 2000) *MNN10*, que codifica para una subunidad de la manosiltransferasa del complejo de Golgi (Dean y Poster 1996); y además, contiene parte del gen *PRP28* que codifica para una proteína de unión al ARN involucrado en su isomerización en el sitio de empalme 5'.

El plásmido p2I106 contiene el gen *SEC27*, que codifica para una proteína esencial del complejo multi-proteico COPI, que está involucrado en el transporte de proteínas y lípidos del retículo endoplasmático al aparato de Golgi y viceversa (Duden *et al.* 1994). Además, contiene el gen *YGL138C* con función desconocida hasta el momento (*Saccharomyces* Genome Database / SGD), y fragmento del gen *MRM2* que codifica para la enzima 2 'O-ribosa metiltransferasa mitocondrial y es requerido para la metilación de U (2791) en 21S rRNA.

En general, los genes encontrados tienen alguna participación en procesos del metabolismo de agentes oxidantes, lo cual concuerda con los daños ocasionados por las radiaciones UV donde involucra oxidación de ácidos grasos y peroxidación de lípidos que afecta la fluidez de la membrana (Moriyama *et al.* 2018, Lopez-Martinez *et al.* 2008). Por otro lado, hay genes que posiblemente solo han mejorado la rapidez de crecimiento de la levadura, como el gen *DSDI* encontrado en el plásmido p2I86, que codifica para la enzima D-serina deshidratasa la cual convierte la D-serina en piruvato y amoníaco (Ito *et al.* 2008).

Tabla 2: Listados de genes de los candidatos ubicados en los fragmentos de la biblioteca genómica.

PLÁSMIDOS	GENES	DESCRIPCIÓN	GENES INCOMPLETOS	DESCRIPCIÓN
p2I64	<i>ANTI</i>	Proliferación peroxisomal.	<i>AXLI</i>	Endoproteasa específica haploide de feromona de apareamiento de factor a.
	<i>YLH47</i>	Proteína de la membrana interna mitocondrial.		
	<i>YPR127W</i>	Enzima piridoxal reductasa involucrada en la vía de síntesis de vitamina B6.		
	<i>CTRI</i>	Transportador de cobre de alta afinidad de membrana plasmática.		
p2I86	<i>DSD1</i>	D-serina deshidratasa; convierte la D-serina en piruvato y amoníaco.	<i>GCNI</i>	Regulador positivo de la actividad de la quinasa Gcn2p.
			<i>MDS3</i>	Componente putativo de la vía reguladora de la TOR (quinasa).
p2I104	<i>PEX5</i>	Requerido para la importación de proteínas de la matriz peroxisomal.	<i>PRP28</i>	Involucrado en la isomerización de ARN en el sitio de empalme 5' y para el intercambio de U6 por snRNA U1 en el sitio de empalme 5'.
	<i>TRS23</i>	Regula el transporte de partículas entre organelos.		
	<i>MNN10</i>	Una subunidad de la manosiltransferasa del complejo de Golgi.		

Continúa...

...continuación

p83			<i>SEC4</i>	Esencial para la secreción exocítica mediada por vesículas y la autofagia.
			<i>BLM10</i>	Se une al proteasoma central y estimula la degradación de la proteína mediada por el proteasoma.
p21106	<i>SEC27</i>	Involucrado en el transporte de proteínas y lípidos del retículo endoplasmático al aparato de Golgi y viceversa.	<i>MRM2</i>	Requerido para la metilación de U (2791) en 21S rRNA.

FUENTE: Edición propia, 2019.

V. CONCLUSIONES

1. Los métodos de tamizados genéticos diseñados demostraron ser una estrategia muy útil para poder encontrar genes de interés en respuestas a eventos estresantes.
2. Mediante estudios previos y ensayos pre-tamizado se logró optimizar las dosis requeridas de radiación UV y de peróxido de hidrógeno en los métodos de tamizados genéticos diseñados.
3. Se logró diseñar dos métodos de tamizados genéticos donde se obtuvieron candidatos resistentes a los daños sometidos. Además, confirmaron su capacidad de conferir resistencia a radiación UV o a peróxido de hidrógeno.
4. Se construyeron cepas mutantes *rad9* y *rad24*, las cuales evidenciaron sensibilidad a radiación UV y a peróxido de hidrógeno en el caso de la cepa mutante *yap1*.
5. La secuenciación de los plásmidos seleccionados permitió establecer si los genes encontrados participan en procesos biológicos de reparación celular ante radiaciones UV y/u oxidantes.

VI. RECOMENDACIONES

1. Realizar tamizados con los métodos diseñados utilizando las cepas mutantes *rad9*, *rad24* y *yap1*, los cuales se construyeron en la investigación.
2. Realizar un sub-clonaje de los fragmentos incluidos en los plásmidos candidatos obtenidos de tamizados, para determinar el gen específico que confiere resistencia.
3. Investigar el efecto de la expresión de los genes encontrados cuya función continúa siendo desconocida según la base de datos de *Saccharomyces*. Además, realizar estudios de las posibles actividades de los fragmentos de genes conocidos encontrados, mediante el aislamiento de sus secuencias (sub-clonaje) y realizar los ensayos descritos en la investigación.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alberts; Johnson; Lewis; Raff; Roberts; Walter. 2002. Molecular biology of the cell. s.l., Garland Pub.
2. Almeida, T; Marques, M; Mojzita, D; Amorim, M; Silva, R; Almeida, B; Rodrigues, P; Ludovico, P; Hohmann, S; Moradas-Ferreira, P; Corte-Real, M; Costa, V. 2008. Isc1p Plays a Key Role in Hydrogen Peroxide Resistance and Chronological Lifespan through Modulation of Iron Levels and Apoptosis. *Molecular biology of the cell* 19(1):865–876.
3. Azuma, K; Ohtsuka, H; Mita, S; Murakami, H; Aiba, H. 2009. Identification and characterization of an Ecl1-family gene in *Saccharomyces cerevisiae* (en línea). *Biosci Biotechnol Biochem* 73(12):2787-2789.
4. Baudin, A; Ozier-kalogeropoulos, O; Denouel, A; Lacroute, F; Cullin, C. 1993. A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research* 21(14):3329-3330.
5. Connelly, C; Hieter, P. 1996. Budding yeast SKP1 encodes an evolutionarily conserved kinetochore protein required for cell cycle progression. *Cell* 86(2):275-285.
6. Dancis, A; Yuan, DS; Haile, D; Askwith, C; Eide, D; Moehle, C; Kaplan, J; Klausner, RD. 1994. Molecular characterization of a copper transport protein in *S. cerevisiae*: An unexpected role for copper in iron transport. *Cell* 76(2):393-402.
7. Daroui, P; Desai, SD; Li, TK; Liu, AA; Liu, LF. 2004. Hydrogen Peroxide Induces Topoisomerase I-mediated DNA Damage and Cell Death. *Journal of Biological Chemistry* 279(15):14587-14594.

8. Dean, N; Poster, JB. 1996. Molecular and phenotypic analysis of the *S. cerevisiae* MNN10 gene identifies a family of related glycosyltransferases. *Glycobiology* 6(1):73-81.
9. Dimitrov, MD; Pesheva, MG; Venkov, P V. 2013. New cell-based assay indicates dependence of antioxidant biological activity on the origin of reactive oxygen species. *s.l., s.e., vol.61. 4344-4351 p.*
10. Distel, B; Erdmann, R; Gould, SJ; Blobel, G; Crane, DI; Cregg, JM; Dodt, G; Fujiki, Y; Goodman, JM; Just, WW; Kiel, JAKW; Kunau, WH; Lazarow, PB; Mannaerts, GP; Moser, HW; Osumi, T; Rachubinski, RA; Roscher, A; Subramani, S; Tabak, HF; Tsukamoto, T; Valle, D; Van Der Klei, I; Van Veldhoven, PP; Veenhuis, M. 1996. A unified nomenclature for peroxisome biogenesis factors. *Journal of Cell Biology* 135(1):1-3.
11. Dohrmann, PR; Sclafani, RA. 2006. Novel role for checkpoint Rad53 protein kinase in the initiation of chromosomal DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 174(1):87-99.
12. Duden, R; Hosobuchi, M; Hamamoto, S; Winey, M; Byers, B; Schekman, R. 1994. Yeast β - and β' -coat proteins (COP). Two coatomer subunits essential for endoplasmic reticulum-to-Golgi protein traffic. *Journal of Biological Chemistry* 269(39):24486-24495.
13. Folch-mallol, JL; Garay-arroyo, A; Lledías, F; Robles, A a C. 2004. La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Latinoamericana De Microbiología* 46:24-46.
14. Forsburg, SL. 2001. The art and design of genetic screens: zebrafish (en línea). *Nature Reviews Genetics* 2(12):956-966.
15. Gagnon, A; Dassain, M; GCrard Tiraby. 1990. Cloning of *Saccharomyces cerevisiae* promoters using a probe vector based on phleomycin resistance. *gene*

91(november):35-41.

16. Goffeau, A; Barrell, BG; Bussey, H; Davis, RW; Dujon, B; Feldmann, H; Galibert, F; Hoheisel, JD; Jacq, C; Johnston, M; Louis, EJ; Mewes, HW; Murakami, Y; Philippsen, P; Tettelin, H; Oliver, SG. 1996. Life with 6000 Genes conveniently among the different interna- Old Questions and New Answers The genome . At the beginning of the se- of its more complex relatives in the eukary- cerevisiae has been completely sequenced *Schizosaccharomyces pombe* indicate. *Science* 274(October):546-567.
17. Green, DR; Reed, JC. 1998. Mitochondria and apoptosis. (Cover story). *Science* 281(5381):1309.
18. Gueldener, U. 2002. A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast (en línea). *Nucleic Acids Research* 30(6):23e-23.
19. Guldener, U; Heck, S; Fielder, T; Beinhauer, J; Hegemann, JH. 1996. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast (en línea). *Nucleic Acids Res* 24(13):2519-2524.
20. Gutiérrez Mesías, LG; Romero Qwisgaard, AM; Chávez Untiveros, GP; Augusto Palomino Kobayashi, L; Moromisato Shimabukuro, LE; Kitazono Sugahara, AA. 2017. Comparison of the Photoprotective Effects of Sunscreens Using Spectrophotometric Measurements or the Survivability of Yeast Cells Exposed To Uv Radiation. *Rev Soc Quím Perú* 294(3):294-307.
21. Heiland, I; Erdmann, R. 2005. Biogenesis of peroxisomes Topogenesis of the peroxisomal membrane and matrix proteins. 272:2362-2372.
22. Ito, T; Hemmi, H; Kataoka, K; Mukai, Y; Yoshimura, T. 2008. A novel zinc-dependent D-serine dehydratase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal* 409(2):399-406.

23. Kuge, S; Jones, N; Nomoto, A. 1997. Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *EMBO Journal* 16(7):1710-1720.
24. Lopez-Martinez, G; Elnitsky, MA; Benoit, JB; Lee, RE; Denlinger, DL. 2008. High resistance to oxidative damage in the Antarctic midge *Belgica antarctica*, and developmentally linked expression of genes encoding superoxide dismutase, catalase and heat shock proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38(8):796-804.
25. Macrogen Online Sequencing Order System. 2018. (en línea, sitio web). Consultado 5 sep. 2018.
26. Mieczkowski, P; Dajewski, W; Podlaska, A; Skoneczna, A; Ciesla, Z; Sledziwska-Gojska, E. 2000. Expression of UMP1 is inducible by DNA damage and required for resistance of *S. cerevisiae* cells to UV light. *Current Genetics* 38(2):53-59.
27. Molin, M; Renault, J-P; Lagniel, G; Pin, S; Toledano, M; Labarre, J. 2007. Ionizing radiation induces a Yap1-dependent peroxide stress response in yeast (en línea). *Free Radical Biology and Medicine* 43(1):136-144.
28. Morano, KA; Grant, CM; Moye-Rowley, WS. 2012. The response to heat shock and oxidative stress in *saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 190(4):1157-1195.
29. Moriyama, A; Yamada, I; Takahashi, J; Iwahashi, H. 2018. Oxidative stress caused by TiO₂ nanoparticles under UV irradiation is due to UV irradiation not through nanoparticles. *Chemico-Biological Interactions* 294:144-150.
30. Okazaki, S; Tachibana, T; Naganuma, A; Mano, N; Kuge, S. 2007. Multistep Disulfide Bond Formation in Yap1 Is Required for Sensing and Transduction of H₂O₂ Stress Signal. *Molecular Cell* 27(4):675-688.
31. Orr-Weaver, TL; Szostak, JW; Rothstein, RJ. 1981. Yeast transformation: a

- model system for the study of recombination. (en línea). Proceedings of the National Academy of Sciences 78(10):6354-6358.
32. Paulovich, AG; Margulies, RU; Garvik, BM; Hartwell, LH. 1997. RAD9, RAD17, and RAD24 are required for S phase regulation in *Saccharomyces cerevisiae* in response to DNA damage. *Genetics* 145(1):45-62.
 33. Petin, VG; Kim, JK. 2004. Survival and recovery of yeast cells after combined treatment with ionizing radiation and heat. *Radiation research* 161(1):56-63.
 34. Prelich, G. 1999. Suppression mechanisms: Themes from variations. *Trends in Genetics* 15(7):261-266.
 35. Ramer, SW; Elledge, SJ; Davis, RW. 1992. Dominant genetics using a yeast genomic library under the control of a strong inducible promoter. (en línea). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(23):11589-93.
 36. Reddi, AR; Culotta, VC. 2013. NIH Public Access. *Cell* 152(1-2):224–235.
 37. Van Roermund, C; Drissen, R; Van Den Berg, M; Ijlst, L; Hettema, EH; Tabak, HF; Waterham, HR; Wanders, RJA. 2001. Identification of a Peroxisomal ATP Carrier Required for Medium-Chain Fatty Acid α -Oxidation and Normal Peroxisome Proliferation in. *Society* 21(13):4321-4329.
 38. *Saccharomyces Genome Database | SGD*. 2018. (en línea, sitio web). Consultado 5 sep. 2018. Disponible en <https://www.yeastgenome.org/>.
 39. Sacher, M; Barrowman, J; Schieltz, D; Yates, JR; Ferro-Novick, S. 2000. Identification and characterisation of five new subunits of TRAPP. *European Journal of Cell Biology* 79(2):71-80.
 40. Schiestl, RH; Gietz, DR. 1989. High efficiency transformation of intact yeast cells

- using single stranded nucleic acids as a carrier (en línea). *Current Genetics* 16(5-6):339-346.
41. Schiestl, RHR; Gietz, RDR. 1989. High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Current Genetics* 16(5-6):339-346.
 42. Schneegurt, M a; Dore, SY; Kulpa, CF. 2003. Direct extraction of DNA from soils for studies in microbial ecology. *Current issues in molecular biology* 5(1):1-8.
 43. Schrader, M; Costello, JL; Godinho, LF; Azadi, AS; Islinger, M. 2016. Proliferation and fission of peroxisomes - An update. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1863(5):971-983.
 44. Sherman, F. 2002. Getting Started with Yeast • Contents • Methods in *Enzymology* 350(2002):3-41.
 45. Siede, W; Allen, JB; Elledge, SJ; Friedberg, EC. 1996. The *Saccharomyces cerevisiae* MEC1 gene, which encodes a homolog of the human ATM gene product, is required for G1arrest following radiation treatment. *Journal of Bacteriology* 178(19):5841-5843.
 46. Sikorski, RS; Hieter, P. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122(1):19-27.
 47. Steensels, J; Snoek, T; Meersman, E; Nicolino, MP; Voordeckers, K; Verstrepen, KJ. 2014. Improving industrial yeast strains: Exploiting natural and artificial diversity. *FEMS Microbiology Reviews* 38(5):947-995.
 48. Stiefel, C; Schwack, W. 2015. Photoprotection in changing times - UV filter efficacy and safety, sensitization processes and regulatory aspects. *International Journal of Cosmetic Science* 37(1):2-30.

49. Szydlowski, N; Bürkle, L; Pourcel, L; Moulin, M; Stolz, J; Fitzpatrick, TB. 2013. Recycling of pyridoxine (vitamin B6) by PUP1 in Arabidopsis. *Plant Journal* 75(1):40-52.
50. Teo, SH; Jackson, SP. 1997. Identification of *Saccharomyces cerevisiae* DNA ligase .4. Involvement in DNA double-strand break repair. *EMBO Journal* 16(15):4788-4795.
51. Terleth, C; Schenk, P; Poot, R; Brouwer, J; van de Putte, P. 1990. Differential repair of UV damage in rad mutants of *Saccharomyces cerevisiae*: a possible function of G2 arrest upon UV irradiation [published erratum appears in *Mol Cell Biol* 1991 Feb;11(2):1184]. *Mol Cell Biol* 10(9):4678-4684.
52. Thomas, BJ; Rothstein, R. 1989. Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell* 56(4):619-630.
53. Toh, GW-L; Lowndes, NF. 2003. Role of the *Saccharomyces cerevisiae* Rad9 protein in sensing and responding to DNA damage. (en línea). *Biochemical Society transactions* 31(Pt 1):242-6.
54. Valdivieso, MH; Mol, PC; Shaw, JA; Cabib, E; Duran, A. 1991. CAL1, a gene required for activity of chitin synthase 3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology* 114(1):101-109.
55. Wach, A; Brachat, A; Christina Alberti-Segui; Corinne Reischung; Philippsen, P. 1997. Heterologous HIS3 Marker and GFP Reporter Modules for PCR-Targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13:1065–1075.
56. Yiannakopoulou, EC; Tiligada, E. 2009. Protective effect of salicylates against hydrogen peroxide stress in yeast. *Journal of Applied Microbiology* 106(3):903-908.
57. Yun, SJ; Hiraoka, Y; Nishizawa, M; Takio, K; Titani, K; Nogi, Y; Fukasawa, T.

1991. Purification and characterization of the yeast negative regulatory protein GAL80. *Journal of Biological Chemistry* 266(2):693-697.
58. Zhou, Z; Humphries, N; Eijk, P Van; Waters, R; Yu, S; Kraehenbuehl, R; Hartsuiker, E; Reed, SH. 2015. UV induced ubiquitination of the yeast Rad4 – Rad23 complex promotes survival by regulating cellular dNTP pools. *43(15):7360-7370*.
59. Zuzuarregui, A; Gil, C; Monteoliva, L; del Olmo, ML. 2006. Transcriptomic and proteomic approach for understanding the molecular basis of adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to wine fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 72(1):836-847.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1. Artículo científico que detalla procedimientos sobre la evaluación de los bloqueadores solares en *S. cerevisiae*.

294

Recibido el 21-04-17
Aprobado el 13-09-17

COMPARISON OF THE PHOTOPROTECTIVE EFFECTS OF SUNSCREENS USING SPECTROPHOTOMETRIC MEASUREMENTS OR THE SURVIVABILITY OF YEAST CELLS EXPOSED TO UV RADIATION

Luis Gabriel Gutiérrez Mesías^a, Anthony Mijail Romero Qwisgaard^a,
Giuliana Paola Chávez Untiveros^a, Luciano Augusto Palomino Kobayashi^a,
Luis Enrique Moromisato Shimabukuro^b, Ana Akemi Kitazono Sugahara^{c*}

ABSTRACT

This work focuses on simple methods that allow comparison of the photoprotective effects of sunscreens. One such method described by Mansur and colleagues relies on the spectrophotometric measurements of the organic filters extracted with ethanol. The extracts are subjected to absorbance measurements in the of 290 to 320 nm range, with 5 nm intervals. The sunscreen sun protection factor (SPF) is estimated with an equation that relates each absorbance value with their respective erythema effect, at the wavelength used for each measurement. In the current work, three commercial sunscreens were assayed using this method, which produced SPF values that were markedly lower than those declared by the manufacturers. These results prompted a more thorough analysis, which concluded that the Mansur method is not suitable for assaying sunscreens with SPF values above 15. The analysis included a survey of the data previously reported by several authors that had used the same method. On the other hand, this report also includes the optimization of a yeast serial dilution assay that allows reliable comparison of the photoprotection levels conferred by sunscreens. Importantly, this yeast assay could be applied to compare the photoprotective effects of products with a wide range of SPF values, including sunscreen lotions, filter suspensions or solutions, natural product extracts, etc.

Key words: Sun protection factor, SPF, UV radiation, Mansur equation

^a Department of Biology – School of Sciences - Universidad Nacional Agraria La Molina

^b SkinClean Laboratory, (Calle B Mz. D Lote 51 - Independencia - Lima 28 - Perú)

^{c*} Correspondence|author, Department of Chemistry – School of Sciences – Universidad Nacional Agraria La Molina, Av. La Molina S/N – La Molina – Lima 12 – Perú, Tel. +51-13-6147800 ext. 305, Email: anakitazono@lamolina.edu.pe

COMPARISON OF THE PHOTOPROTECTIVE EFFECTS OF SUNSCREENS USING SPECTROPHOTOMETRIC MEASUREMENTS OR THE SURVIVABILITY OF YEAST CELLS EXPOSED TO UV RADIATION

Luis Gabriel Gutiérrez Mesías^a, Anthony Mijail Romero Qwisgaard^a, Giuliana Paola Chávez Untiveros^a, Luciano Augusto Palomino Kobayashi^a, Luis Enrique Moromisato Shimabukuro^b, Ana Akemi Kitazono Sugahara^{a*}

ABSTRACT

This work focuses on simple methods that allow comparison of the photoprotective effects of sunscreens. One such method described by Mansur and colleagues relies on the spectrophotometric measurements of the organic filters extracted with ethanol. The extracts are submitted to absorbance measurements in the of 290 to 320 nm range, with 5nm intervals. The sunscreen sun protection factor (SPF) is estimated with an equation that relates each absorbance value with their respective erythemal effect, at the wavelength used for each measurement. In the current work, three commercial sunscreens were assayed using this method, which produced SPF values that were markedly lower than those declared by the manufacturers. These results prompted a more thorough analysis, which concluded that the Mansur method is not suitable for assaying sunscreens with SPFs above 15. The analysis included a survey of the data previously reported by several authors that had used the same method. On the other hand, this report also includes the optimization of a yeast serial dilution assay that allows reliable comparison of the photoprotection levels conferred by sunscreens. Importantly, this yeast assay could be applied to compare the photoprotective effects of products with a wide range of SPFs, including sunscreen lotions, filter suspensions or solutions, natural product extracts, *etc.*

Key words: sun protection factor, SPF, UV radiation, Mansur equation

COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS FOTOPROTECTORES DE LOCIONES BLOQUEADORAS USANDO MEDICIONES ESPECTROFOTOMÉTRICAS O LA SOBREVIVENCIA DE CÉLULAS DE LEVADURAS EXPUESTAS A RADIACIÓN UV

RESUMEN

Este trabajo reporta la optimización de ensayos simples para comparar los efectos fotoprotectores de bloqueadores solares. Uno de estos métodos es el de Mansur y colaboradores, que se basa en mediciones espectrofotométricas de los filtros orgánicos extraídos con etanol. Las absorbancias de los extractos son medidas en el rango de 290 a 320 nm con intervalos de 5 nm. En este método el factor de protección solar (FPS) es calculado con una ecuación que relaciona los valores de absorbancia con los respectivos efectos eritémicos a la longitud de onda utilizada en cada medición. En este trabajo se analizaron tres bloqueadores con el método Mansur, obteniéndose valores de FPS mucho menores a los declarados. Este resultado motivó un análisis más minucioso que determinó que el método Mansur no es adecuado para bloqueadores con FPS mayor a 15. El análisis incluyó revisiones de los datos de FPS reportados por diversos autores usando el mismo método. Este trabajo también incluye la optimización de un ensayo simple que usa diluciones seriadas de cultivos de levadura para comparar muy eficientemente, los efectos fotoprotectores de los bloqueadores solares. Este ensayo con levaduras permite comparar los efectos fotoprotectores en un amplio rango de FPS y puede incluir lociones comerciales, soluciones de extractos naturales, y activos en suspensión o solución.

Palabras clave: factor de protección solar, FPS, radiación UV, ecuación Mansur.

INTRODUCTION

The demand for topical sunscreens increases each year as the recommendations to protect our skin from sun exposure become more widespread. These recommendations are based on the demonstrated correlation between extended exposure to the solar ultraviolet (UV) radiation and the occurrence of skin damage, premature aging, and skin cancer¹. This problem is particularly critical in countries located close to the equator like Peru, and this was one of the main motivations for this work.

The UV radiation that reaches the earth surface is composed of 95% UVA (320 - 400 nm) and 4% UVB (280 - 320 nm) radiations. UVB is the predominant cause of erythema or sunburn and DNA damage, due to the formation of pyrimidine dimers. On the other hand, UVA is more related to tanning and photoaging but can also cause DNA damage indirectly through the formation of reactive oxygen species. UVC radiation (200 - 280 nm) is not normally present on the earth surface, except at regions of very high altitude².

Because of their increasingly important functions, it is critical that the general public understands the degree of protection against UVA and UVB that sunscreens are able to provide. Currently, nearly sixty active compounds are allowed in the making of sunscreen products. These are divided into two main categories, depending on their physicochemical properties and mechanisms of action: The organic filters act by absorbing the UV radiation; and the other group mainly formed by inorganic compounds, act by reflecting or dispersing it^{1,3,4}.

Regarding the parameters used to measure and define sunscreen efficiency, the term “sun protection factor” (SPF) is the most widely known and applied. The SPF of a sunscreen is measured in a laboratory. It is defined as the amount of UV radiation (exposure time) needed to produce a sunburn (erythema) on skin protected with a sunscreen, relative to that of unprotected skin¹⁻⁴.

The standard method for SPF determination is based on the *in vivo* measurement of the minimal erythema dose (MED) on volunteers with and without sunscreen application. However, this method is not devoid of flaws since some reports have demonstrated that it is unreliable to determine an SPF on the basis of a single assay. For example, a study performed on sixty different sunscreen products found that the discrepancies in the found and claimed SPFs were significantly greater when testing products of higher SPFs⁵. Furthermore, the standard *in vivo* assay is not only difficult and costly to implement but also and importantly, requires irradiation of small areas of the skin of volunteers. This fact raises some ethical implications that need to be considered.

There are several *in vitro* methods that have proved efficient and are widely used, but require specialized equipment and materials. Most of these methods are based on the spectrophotometric analysis in the 290 - 400 nm range of solid artificial substrates on which the sunscreen is spread. The substrate most favored is made of polymethylmethacrylate (PMMA)⁶. This method cannot be applied without these substrates and a specialized spectrophotometer or this reason, it has been important to count on simpler methods to quantify the photoprotective capabilities of sunscreens for research, regulatory, or consumer information purposes. One such method was reported by Mansur *et. al.* in 1986, which involves a simple UV-spectrophotometric assay of alcohol extracts of commercial sunscreens⁷, and has been used in several studies⁸⁻¹³.

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* has long been used to study the responses to DNA damage caused by UV irradiation. Yeast cells can be easily cultured and therefore, offer multiple advantages as a testing system for the photoprotection capabilities of sunscreens. For example, yeast has been used to demonstrate the significant higher protective effects of the widely used sunscreen benzophenone, over its deleterious effects due to production of reactive oxygen species elicited by UV irradiation¹⁴.

The aim of this work was to compare the photoprotective effects of commercial sunscreens using two methods: The spectrophotometric assay proposed by Mansur *et al.*, and one based on the survival rates of yeast cells upon exposure to UV radiation. The

latter, while not a quantitative assay, could be used to simply and accurately compare the photoprotective effects of commercial sunscreens in their terminated form, filter solutions or lotions, and natural product extracts.

EXPERIMENTAL PART

Sunscreens and control lotions and gels. Four lotions were purchased in different stores in the city of Lima. One is a moisturizing lotion (used as a control, “LC”), and the other three were sunscreens with claimed SPF values of 50 or 60 (“L1”, “L2”, “L3”). The declared lotion compositions are listed in Table 1.

Table 1: Composition of the commercial lotions tested

Name	Photoactive compounds	Bases and excipients
LC	None	lanolin, cetyl alcohol, cetareth-6 and stearyl alcohol, cetareth-25, beeswax acid, paraffinum liquidum, methylparaben, propylparaben, tocopheryl acetate, polyether-1, sodium perborate, boric acid, glycerin, fragrance, aqua
L1	Octyl methoxycinnamate Benzophenone-3 Octyl salicylate Diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate	glycerin, dimethicone, glyceryl stearate/PEG 100 stearate, ceteryl alcohol, acrylates copolymer, phenoxyethanol, triethanolamine, fragrance, DMDM hydantoin, acrylates/c 10-30 alkyl acrylate crosspolymer, lecithin, EDTA, methylparaben, propylparaben, phospholipids, hydrogenated lecithin, tocopheryl acetate, retinyl palmitate, carbomer, disodium EDTA, magnesium ascorbyl phosphate, imidazolidinyl urea, carrageenan, ethylparaben, butylparaben, isobutylparaben, aqua
L2	Octocrylene Homosalate Butyl methoxydibenzoylmethane Ethylhexyl salicylate (octyl salicylate) Benzophenone-3 (oxybenzone) Titanium dioxide Diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate Phenylbenzimidazole sulfonic acid	cyclopentasiloxane, dicaprylyl carbonate, glycerin, propylheptyl caprylate, silica, dimethicone, triethanolamine, caprylyl methicone, nylon-12, potassium cetyl phosphate, triacontanyl PVP, trimethylsiloxysilicate, phenoxyethanol, stearyl dimethicone, xanthan gum, acrylates/c10-30 alkyl acrylate crosspolymer, biosaccharide gum-2, biosaccharide gum-3, disodium EDTA, methylisothiazolinone, BHT, tocopheryl, acetate, camellia sinensis leaf extract, theobroma cacao seed extract, aqua
L3	Octocrylene Butyl methoxydibenzoylmethane Butylene glycol dicaprylate/dicaprate Titanium dioxide Ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine	glycerin, alcohol denat., c12-15 alkyl benzoate, bis-, dicaprylyl carbonate, glyceryl stearate citrate, hydrogenated coco-glycerides, myristil myristate, tocopheryl acetate, stearyl alcohol, vp/hexadecene copolymer, ethylhexylglycerin, xanthan gum, trimethoxycaprylylsilane, trisodium EDTA, sodium citrate, citric acid, sodium acrylates/c10-30 alkyl acrylate crosspolymer, aqua

Additionally, two gels were manufactured for some of the yeast assays (see below), one was a control (“GC”) and the other had an SPF of 30 (“G30”). “GC” included the base Gransil EP-9® and excipients, while “G30” also included octocrylene, homosalate, benzophenone-3, and avobenzone.

Spectrophotometric assays. The method described by Joao De Souza Mansur *et al.* was used to determine the SPF values⁷, with a few modifications as described. Whenever possible, all suspensions and solutions were kept protected from light until their immediate use. For each lotion sample, 1,0 g was weighed, transferred to a 100 mL volumetric flask, and mixed with 80 mL ethanol on a rotatory shaker for 45 min. Enough ethanol was added to complete the volume and the suspension was well mixed.

An aliquot of each suspension was centrifuged at 13700xg for 5 minutes. 150 µL microliters of the clear supernatant were diluted to 25 mL with ethanol, thus obtaining a

lotion solution with a final concentration of 0,06 mg/mL. This concentration is lower than that called in the original protocol of 0,2 mg/mL but was preferred to allow absorbance readings below 0,800. Thus, to apply the denoted “Mansur equation” for the estimation of the SPFs, a dilution factor of 3,333 was applied on all the absorbance values. A Biomate 3 spectrophotometer (ThermoFisher) was used to measure absorbances in the 290 – 320 nm range (with 5 nm intervals), using ethanol as blank. All the extractions and absorbance measurements were repeated independently at least three times, and the averages were used to apply Mansur equation⁷:

$$SPF = CF \times \sum_{290 \text{ nm}}^{320 \text{ nm}} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times ABS(\lambda)$$

Where: CF is the correction factor (=10); “EE”, the erythemal effect of radiation at wavelength λ ; “I”, the solar intensity spectrum; and “ABS”, the absorbance. “EE”, “I”, and “ABS” are values obtained or applied for every wavelength (λ). The values for each of the [EE(λ)xI(λ)] products have been reported by the authors as normalized on the basis of the work by Sayre *et. al.*, and are: 0,0150 for 290nm; 0,0817 for 295nm; 0,2874 for 300nm; 0,3278 for 305nm; 0,1864 for 310nm; 0,0839 for 315nm; and 0,0180 for 320nm^{7,15}.

Spectrophotometric assays using homosalate. Homosalate (Salisol®) was obtained from “Salicylates and Chemicals” (Mumbai, India). To apply the protocol described by Mansur *et al.* and in order to obtain absorbance values within the acceptable range of 0,200 to 0,800, the following modifications were adopted: An 8% w/w homosalate solution was diluted weighing 1,5 g and adding ethanol up to 50 mL. This solution was diluted again, measuring 200 μ L and adding ethanol up to 25 mL. With this final dilution, the prepared solution contains the original 8% w/w standard solution with a concentration of 0,24 mg/mL instead of 0,2 mg/mL, which is the concentration obtained when following Mansur’s protocol for the sunscreen lotions. Therefore, the dilution factor 0,8333 was applied to all absorbance values obtained before applying Mansur equation.

Yeast strains and culture conditions. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* strain used for all assays was of the W303 background (*MATa leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15*)¹⁶. Yeast cells were grown on YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) broth, or solid media containing 2% agar. All cultures were grown at room temperature, with rotating agitation for liquid cultures, for 2 to 3 days.

In vivo photoprotection assays using *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast cells were grown on rich YPD broth with shaking and at room temperature for three days. Aliquots

of these cultures were spread onto YPD plates using sterile glass beads to obtain a uniform distribution of cells. For the serial dilution assays, the three day cultures were briefly sonicated to disrupt cell aggregates and serially diluted with sterile water to obtain 100, 500 and 2500 fold dilutions. 4 μ L of each dilution were spotted in two rows on sections of YPD plates, and the spots were allowed to dry. Each plate was covered with a cellophane sheet similarly divided in sections, each of which was covered with suspensions of the lotions or gels to be tested. These suspensions were made weighing 2 g of the gel or lotion, and adding enough water or alcohol as suitable to produce a suspension that is easily spreadable on the cellophane sheet. The area of each cellophane section was estimated so that to have spread on it a volume of the suspension to produce a layer of 2 mg/cm² of the lotion or gel, to mimic the conditions recommended for sunscreen application on the skin prior to sunlight exposition¹.

For UVB irradiation, the source was a VWR transilluminator (VWR International, U.S.A.) with four 8W light tubes that emit 302 nm radiation. The transilluminator was positioned 10 cm above the plate covered with the cellophane sheet so that the UVB radiation impacted directly on it for 2 minutes, at maximum intensity.

For UVC irradiation (254 nm), the cellophane-covered plates were positioned at the base of a wood chamber that included two GE G15T8 germicide lamps (UV radiance RG-3, 4,9W) located 43 cm above. These exposures were for one minute.

RESULTS AND DISCUSSION

Spectrophotometric assays. The method described by Mansur *et al.*, was applied to determine the SPF values of three commercial lotions and the results are shown in Table 2. Surprisingly, all found SPF values were markedly lower than those expected (declared), ranging from 16,8 to 39,4% (Table 3).

Table 2, Spectrophotometric determination of the SPFs of three commercial lotions using the method developed by Mansur *et al.*⁷

Wavelength (nm)	Absorbances* (ABS)			[EE(λ)xI(λ)]	Products [EE(λ)xI(λ)] x ABS		
	L1	L2	L3		L1	L2	L3
290	0,490	0,413	0,247	0,015	0,007355	0,006194	0,003710
295	0,574	0,485	0,283	0,0817	0,046923	0,039645	0,023101
300	0,586	0,484	0,295	0,2874	0,168345	0,139173	0,084807
305	0,601	0,519	0,303	0,3278	0,196926	0,170019	0,099460
310	0,613	0,501	0,312	0,1864	0,114186	0,093371	0,058110
315	0,583	0,471	0,320	0,0839	0,048879	0,039545	0,026876
320	0,487	0,434	0,331	0,018	0,008763	0,007811	0,005964
$\Sigma\{[EE(\lambda)xI(\lambda)] \times ABS\}$					0,591	0,496	0,302
SPF**					19,712	16,525	10,067

* Averages of three independent assays

** Obtained after applying the correction factor of 10 and the dilution factor of 3,333
The deviation standard values for L1, L2 and L3 were 0,1; 0,2; and 0,2; respectively

Table 3: Comparison of the found and declared SPF values for the tested lotions

Sample	Found SPF	Declared SPF	%
L1	19,7	50	39,4
L2	16,5	60	27,5
L3	10,1	60	16,8

% = (Found SPF/Declared SPF)*100

These findings prompted a more thorough analysis on reported studies that had used the Mansur method to quantify the SPFs of commercial sunscreens^{8,9, 11-13}, and the results are listed in Table 4. All reported results were compared with the respective declared SPF value for each sunscreen lotion tested. While there was a good agreement for the lotions with SPF 15, the found values started differing considerably as the declared SPF values increase. For lotions of SPFs higher than 50, the found values corresponded to only the 13,7 - 59,2% of those declared.

Table 4: Comparison of the found and declared SPF values from reported studies using the method developed by Mansur *et al.*⁷

Declared SPF	Found SPF (average)	Number of samples	St. Dev.	%*	References
15	14,9	19	0,7	99,3	8,11-13
20	15,6	13	2,1	78,0	8,9,11-13
30	22,1	7	5,1	73,7	8,9,12,13
50	29,6	10**	11	59,2	9,11,12
60	23,1	1	N,A,	38,5	11
90	12,3	2	2,3	13,7	12

*% = (Found SPF/Declared SPF) x 100

**Several of these indicated SPF values of "50+"

Altogether, these results suggest that the Mansur method is not suitable to assay sunscreens of SPF values above 15. However, this easy and simple method has been used by several investigators to determine the SPF values of extracts from natural products or lotions prepared with these, and commercial sunscreens⁸⁻¹³.

The list of standard sunscreen lotions recommended by the Food and Drug Administration (FDA) and other international organizations includes 8% w/w homosalate, to provide an SPF value of 4,0¹⁷. For this reason, Mansur *et al.* used this standard lotion to develop their equation. Therefore, given the discrepancies in the results and to confirm the adequacy of the followed procedure, the spectrophotometric assays were also run using an 8% w/w homosalate standard solution, and the results are shown in Figure 1. While the absorption spectrum shows an optimum wavelength of 305 nm, similar to that reported by the manufacturer of 307 nm, the SPF value obtained was also significantly lower than the expected value of 4,0. Nevertheless, the UV specific extinction value obtained was close to that reported in the certificate of analysis received, proving that the absorbance readings and calculations applied were correct.

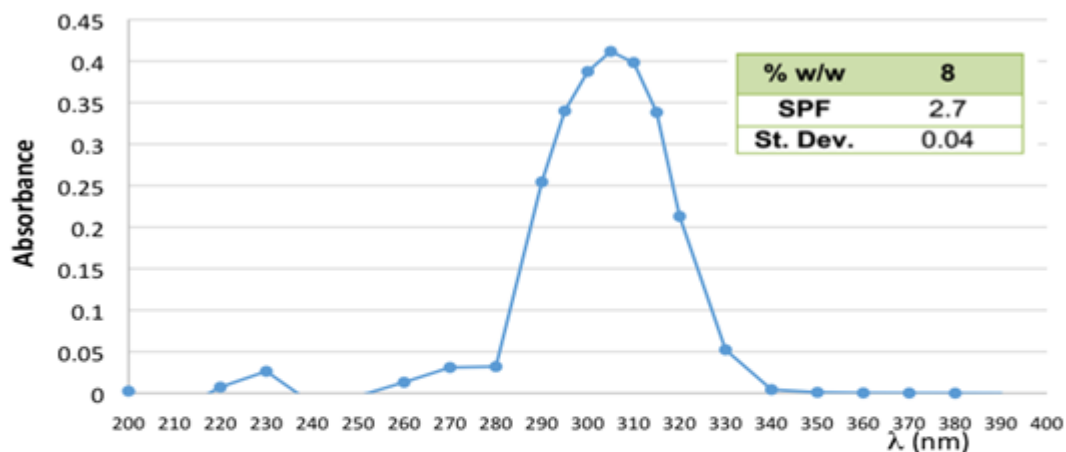
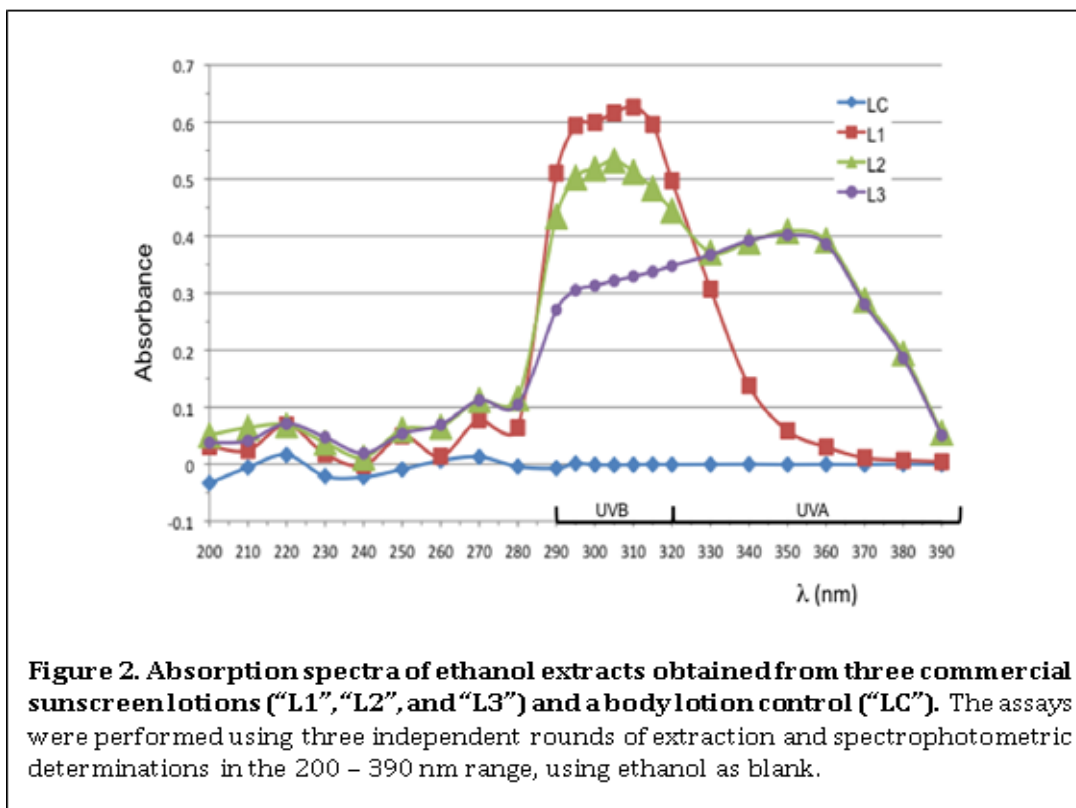


Figure 1. Absorption spectrum of an ethanolic solution of homosalate and the results of the spectrophotometric determination of the SPF of an 8% w/w solution. The spectrum shows a peak at 305 nm, characteristic of homosalate. A lotion containing 8% w/w homosalate is used as the standard sunscreen for the recommended *in vivo* assays that follow the changes in the minimal erythemal dose, with an expected SPF of 4. The SPF value obtained using the Mansur method and equation was 2,7 (67.5%).

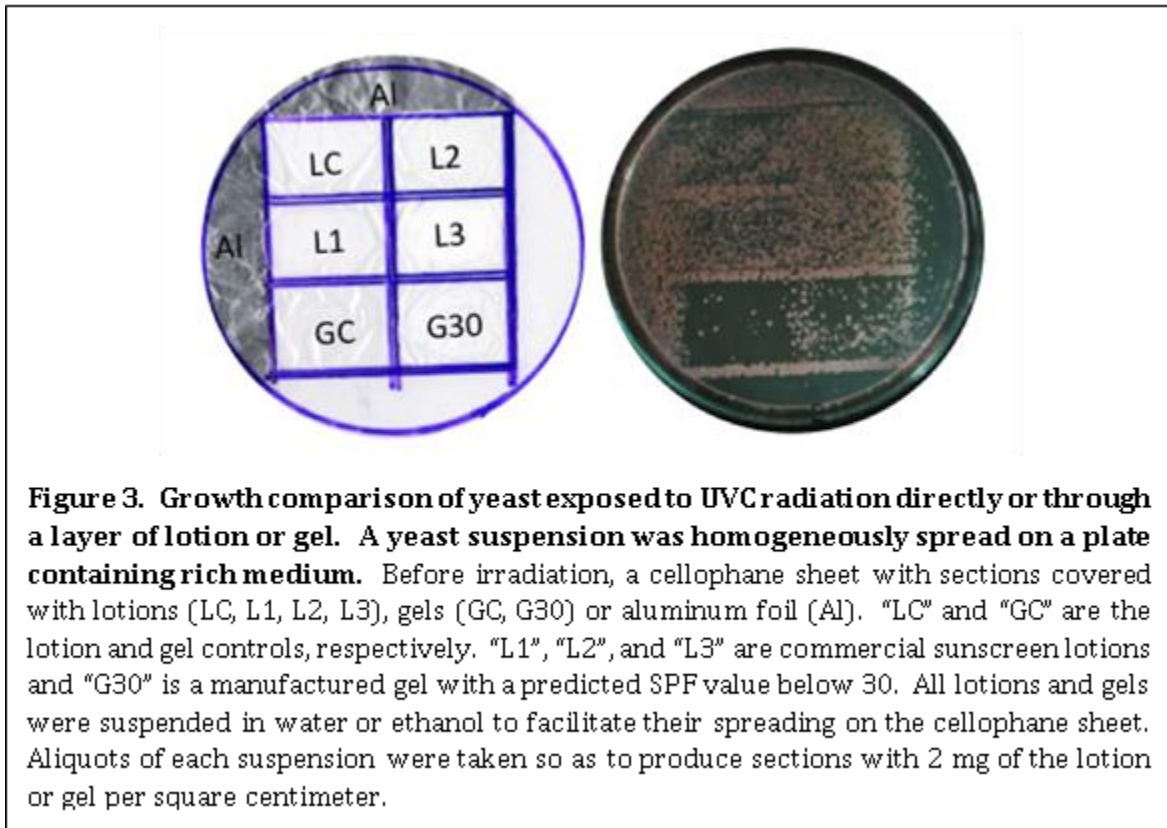
One explanation for the discrepancy could be the fact that Mansur *et al.* used a homosalate standard lotion for the development of their equation. It is then possible that one or more of the excipients had been extracted into the ethanolic solution and contributed to the obtained absorbances in the 290 – 320 nm range, thus causing the overestimation of the SPF values. The concentrations of those excipients remain basically unchanged during the manufacturing of higher SPF sunscreens and therefore, do not proportionately produce that overestimation. Accordingly, when applying the Mansur method and equation to determine the SPFs of high SPF sunscreens, the values obtained are lower.

On the other hand, the labels for the tested lotions L1, L2 and L3 indicated they all included UVA and UVB sunscreen actives, as most modern sunscreens do¹. In order to determine if these photoactive compounds were efficiently recovered with the ethanolic extractions, the lotions were processed as described, and the absorbances of the final solutions were measured in the 200 – 390 nm range. The absorption spectra shown in Figure 2 indicated that both UVA and UVB filters were recovered for L2 and L3 but not for L1. The ethanolic extract of the latter exhibited the highest absorbances in the UVB range but the lowest values for wavelengths above 330 nm (UVA range). Accordingly, the found SPF for L1 was closer to its declared value than for the other two lotions (Table 3), since only the absorbances for the UVB range are taking into account for its estimation using the Mansur method. Therefore, this simple spectrophotometric method is not only inaccurate and inefficient but also, does not comprise the photoprotective effects of UVA

actives such as butyl methoxydibenzoylmethane (avobenzone, Parsol 1789), which is included in both L2 and L3^{1,3,4}. Importantly, filters such as titanium dioxide and zinc oxide are not soluble in ethanol and thus, their photoprotective effects are also not taking into account when using the Mansur method.



***In vivo* photoprotection assays using yeast cells.** The results shown above prompted the search for a more reliable, simple and efficient means to demonstrate and compare the photoprotective capabilities of sunscreen lotions. Thus, a commonly used method based on the survival rates of cultures of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* was optimized and adapted for this purpose. First, plates containing solid rich medium covered with homogeneous layers of yeast cells were used. Before irradiation, each plate was covered with a cellophane sheet divided in small sections on which, aliquots of lotion or gel suspensions had been homogeneously spread. Besides these and to serve as controls, parts of the cellophane sheet were covered with aluminum foil (to provide a shield against the UV radiation), and others were left uncovered (unprotected control). The amount of suspension spread was estimated so that to achieve layers of 2 mg of the gel or lotion per square cm (2 mg/cm²), the thickness of sunscreens that is recommended for adequate protection of the skin¹ (Figure 3). The cellophane-covered plates were irradiated with UVC radiation for 1 minute, as described.



This procedure allowed only a qualitative comparison of the photoprotective effects, but it was possible to clearly distinguish between the sections that were left unprotected (no growth) and those that were less or more protected (lotion and gel sunscreens and controls, or aluminum foil). The SPF-30 gel (G30) allowed formation of a higher number of colonies than its respective control (GC). It was also possible to clearly distinguish higher photoprotective effects for the L1, L2 and L3 sunscreens than for the lotion control (LC).

In order to improve the resolution of the assay, the method was modified using small aliquots of 5 fold serial dilutions of yeast cultures instead of the yeast layers (Figures 4 and 5). In these assays, the rich media on the plates were spotted with the same three serial dilutions in two identical rows, on each of four sections. On the other hand, a cellophane sheet divided in four sections was also prepared to cover each plate. In each of the cellophane sheets, one of the sections was covered with a piece of aluminum foil, a lotion or gel suspension to produce a thickness of 2 mg/cm², or left unprotected. The cellophane-sheet covered plates were then irradiated as indicated.

With this simple assay it was possible to efficiently compare the photoprotective effects of the lotions or gels on the yeast cells spotted on the plate, within the range limited by the totally exposed and unprotected sections ("–"), and the fully protected ones covered with aluminum foil ("AI").

Figure 4 shows a representative set of results for an assay of photoprotection against UVB radiation. Here, the lotion control provided no protection, with the spotted cells showing lack of growth, similar to the unprotected section. Meanwhile, the photoprotective effects of the L1, L2 and L3 sunscreens are evident since yeast cells are able to show robust growth in the respective sections, while no colony was formed in the LC or unprotected section. Comparing the UVB photoprotective effects of the lotions, it is possible to conclude that L1>L3>L2>>>>>LC. Under these assay conditions, yeast cells were not able to survive when UVB irradiated under the sections covered with the G30 or GC samples. It is important to note here that the SPF values obtained using the Mansur method (Table 2) are 19,7, 16,5 and 10,1 for the L1, L2 and L3 lotion, respectively. Similarly, the absorption spectrum in Figure 2 suggests that the UVB photoprotection effects for L3 are considerably lower than L2. The yeast assay indicates the opposite, providing more evidence for the inadequacy of the spectrophotometric method.

Figure 5 shows results obtained following the same procedure except that the cellophane-covered plates were exposed to UVC. Here, lotions L1, L2 and L3 showed similar levels of strong protection. On the other hand, a small number of colonies were able to form in the areas covered with LC and G30 but no growth was evident in the GC and unprotected sections. This high protection level correlates better with the declared SPF values for the lotions. It is important to note that the protective effects of titanium dioxide and zinc oxide filters are more evident against UVC, and this fact is probably the reason behind the robust growth observed in the L1, L2 and L3 sections. The G30 gel lacks both of these filters.

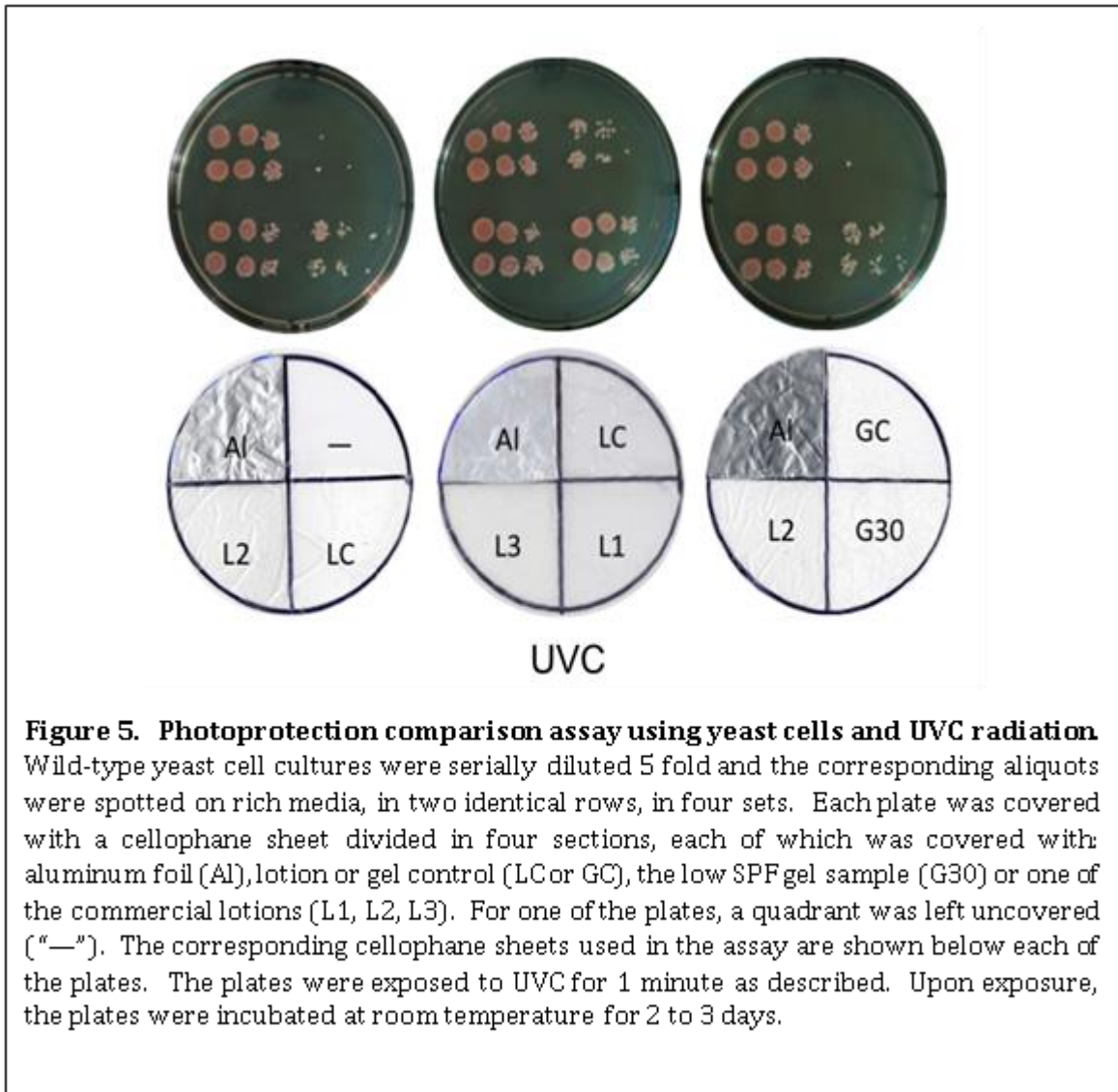


Figure 5. Photoprotection comparison assay using yeast cells and UVC radiation. Wild-type yeast cell cultures were serially diluted 5 fold and the corresponding aliquots were spotted on rich media, in two identical rows, in four sets. Each plate was covered with a cellophane sheet divided in four sections, each of which was covered with: aluminum foil (AI), lotion or gel control (LC or GC), the low SPF gel sample (G30) or one of the commercial lotions (L1, L2, L3). For one of the plates, a quadrant was left uncovered (“—”). The corresponding cellophane sheets used in the assay are shown below each of the plates. The plates were exposed to UVC for 1 minute as described. Upon exposure, the plates were incubated at room temperature for 2 to 3 days.

Besides providing a very simple and efficient means to compare the photoprotective effects of sunscreens, the described yeast assay offers the opportunity to show in a very didactic manner, the benefits of sunscreen usage. More simpler versions of this assay have already been implemented in school exercises in the U.S.A. that allow the students to learn firsthand about the dangers of sun exposure without adequate photoprotection¹⁸. Therefore, this yeast assay could be efficiently used not only to compare sunscreens in an academic or regulatory setting, but also to educate the general public about the imperative need to protect oneself from the dangerous effects of UV radiation.

CONCLUSION

This study demonstrates that the denoted "Mansur method" and "Mansur equation" should not be used to assay sunscreens of SPFs above 15. Further, a yeast assay is described that could be used to simply and reliably compare the photoprotection levels conferred by sunscreens.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank "InnovatePerú" (Contract N°157-PNICP-PIAP-2015) and the Research Support Office at the "Universidad Nacional Agraria La Molina" (Grant for scientific and technological research - UNALM 2013) for providing the funding that made this work possible. We also thank Mr. José Kitazono and Ms. Bélgica Pérez for their help throughout these studies.

REFERENCES

1. Jou PC, Feldman RJ, Tomecki KJ. UV protection and sunscreens: What to tell patients. *Cleve Clin J Med*. 2012;79:427-436.
2. Diffey BL. What is light? *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2002;18:68-74.
3. Jansen R, Wang SQ, Burnett M, Osterwalder U, Lim HW. Photoprotection: part I. Photoprotection by naturally occurring, physical, and systemic agents. *J Am Acad Dermatol*. 2013;69:853 e1-12.
4. Jansen R, Osterwalder U, Wang SQ, Burnett M, Lim HW. Photoprotection: part II. Sunscreen: development, efficacy, and controversies. *J Am Acad Dermatol*. 2013;69:867 e1-14.
5. Miksa S, Lutz D, Guy C. Relevance of Sun Protection Factor claim: Review of a study with 60 different commercial sunscreen products from European market. *Household Pers. Care Today*. 2016;11:64-68.
6. Cole C. Sunscreens--what is the ideal testing model? *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2014;30:81-87.
7. Mansur JS, Breder MNR, Mansur MCA, Azulay RD. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *An Bras Dermatol*. 1986;61:121-124.
8. Dutra EA, Oliveira DAGdCe, Kedor-Hackmann ERM, Santoro MIRM. Determination of sun protection factor (SPF) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry. *Rev Bras Cienc Farm*. 2004;40:381-385.

9. Fonseca AP, Rafaela N. Determination of Sun Protection Factor by UV-Vis Spectrophotometry. *Health Care: Curr Rev.* 2013;1:108 e1-e4
10. Inocente-Camones MÁ, Tomas-Chota GE, Huamán-Malla J, Muñoz-Jáuregui AM, García-Morán RI, Quispe-Fuentes G, et al. Actividad antioxidante y fotoprotectora in vitro de una loción y gel elaborados con extracto estabilizado de camu camu (*Myrciaria dubia*, Kunth). *Rev Soc Quim Peru.* 2014;80:65-77.
- 11 Mbanga L, Mulenga M, Mpiana PT, Bokolo K, Mumbwa M, Mvingu K. Determination of Sun Protection Factor (SPF) of Some Body Creams and Lotions Marketed in Kinshasa by Ultraviolet Spectrophotometry. *Int J Adv Res Chem Sci.* 2014;1:7-13.
12. Omar KA, Abdulrahman RS. Determinations of Sun Protection Factor (SPF) of some sunscreens marketed in Kurdistan Region by UV-Visible spectrometry and study their Rheological properties. *Int J Pharm Chem.* 2015; 05:40-44.
13. Sudhahar V, Balasubramanian V. Sun production factor (SPF) determination of marketed sunscreen formulation by in-vitro method using UV-VIS spectrophotometer. *Arch Appl Sci Res.* 2013;5:119-122.
14. Beckett A, McClure B, Zimmerman K. Benzophenone and Padimate-O Protect *Saccharomyces cerevisiae* From UV Radiation and Cause Little Harm From UV-Induced Reactive Chemical Species. *J Exp Microbiol Immunol.* 2004;5:37-43.
15. Sayre RM, Agin PP, Levee GJ & Marlowe E. A comparison of in vivo and in vitro testing of suncreening formulas. *Photochem and Photobiol.* 1979; 29: 559-566.
16. Thomas BJ, Rothstein R. Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell.* 1989;56:619-630.
17. Food and Drug Administration (FDA). Sunscreen drug products for over-the-counter human use - Testing procedures. United States: FDA; 2016.
18. Association for Biology Laboratory Education (ABLE). Tested Studies for Laboratory Teaching. En: D'Costa AR, Santoro I, editors. 31st Annual ABLE Conference. Proceedings of the 30th Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE); June 9-13, 2009; University of Delaware Newark, DE: K.L. Clase; 2009. P. 371-382.

ANEXO 2. Cámara UV artesanal que contiene dos tubos germicidas de 15 Watts.



ANEXO 3. Bloque de impresión de placas con terciopelo estéril.

