

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA
ESCUELA DE POSGRADO
DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA BIOLÓGICAS



**“OBTENCIÓN DE VARIANTES DE FERRITINA DE SOYA CON
SELECTIVIDAD PARA CADMIO MEDIANTE CLONACIÓN Y
MUTAGÉNESIS *in vivo* EN *Saccharomyces cerevisiae*”**

Presentada por:

RENATO GONZALO RIVEROS ALCEDO

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR
DOCTORIS PHILOSOPHIAE EN CIENCIAS E INGENIERÍA
BIOLÓGICAS**

Lima – Perú

2024

RR final 27oct

INFORME DE ORIGINALIDAD

12%	12%	2%	2%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	hdl.handle.net Fuente de Internet	6%
2	repositorio.lamolina.edu.pe Fuente de Internet	2%
3	revistas.pucp.edu.pe Fuente de Internet	1%
4	Submitted to Universidad Continental Trabajo del estudiante	<1%
5	Submitted to Universidad Nacional Agraria La Molina Trabajo del estudiante	<1%
6	Renato G. Riveros, Ana A. Kitazono. "Identification of ferritin variants with increased cadmium selectivity by in vivo cloning and mutagenesis in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ", Bioresource Technology Reports, 2023 Publicación	<1%
7	idoc.pub Fuente de Internet	

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA
BIOLÓGICAS**

**“OBTENCIÓN DE VARIANTES DE FERRITINA DE SOYA CON
SELECTIVIDAD PARA CADMIO MEDIANTE CLONACIÓN Y
MUTAGÉNESIS *in vivo* EN *Saccharomyces cerevisiae*”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR
DOCTORIS PHILOSOPHIAE**

Presentada por:

RENATO GONZALO RIVEROS ALCEDO

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Dr. Gastón Zolla Benites
PRESIDENTE

Ph.D. Ana Kitazono Sugahara
ASESOR

Dra. Ilanit Samolski Klein
MIEMBRO

Dr. Ernesto Ormeño Orrillo
MIEMBRO

Dra. Carmen del Rosario Tamariz Ángeles
MIEMBRO EXTERNO

AGRADECIMIENTO

A Fondecyt que financió mis estudios de doctorado y tesis, al ser beneficiario del programa de becas con Convenio de Subvención N° 177-2015-FONDECYT.

A la Dra. Ana Kitazono por permitirme introducirme en el mundo de la biotecnología y formar parte de los proyectos y grupo de investigación. Por compartirme conocimientos y motivación por la investigación.

A mi jurado calificador el presidente Gastón Zolla, Ilanit Samolski, Carmen Tamariz y Ernesto Ormeño por el tiempo dedicado a evaluar mi tesis y mejorarlo con sus comentarios.

A mi familia, por el incondicional apoyo.

A mis amigos y compañeros del Laboratorio de Química Biológica y Bioanálisis, por el apoyo brindado en los ensayos y discusiones.

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1.	CADMIO Y SU TOXICIDAD.....	3
2.2.	CONTAMINACIÓN POR CADMIO.....	6
2.3.	LEVADURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y BIORREMEDIACIÓN	7
2.4.	RESPUESTA AL CADMIO EN <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
2.5.	FERRITINA	10
2.6.	FERRITINA Y CADMIO	12
2.7.	FERRITINA Y ACTIVIDAD FERROXIDASA	14
2.8.	CLONACIÓN <i>IN VIVO</i>	15
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
3.1.	LUGAR	17
3.2.	MATERIALES	17
3.2.1.	Cepas y plásmidos.....	17
3.2.2.	Materiales de uso rutinario	21
3.2.3.	Medios de cultivo.....	21
3.2.4.	Reactivos	22
3.2.5.	Equipos.....	22
3.3.	MÉTODOS.....	23
3.3.1.	Estrategia para la obtención de variantes de ferritina sH1hp	23
3.3.2.	Construcción de una biblioteca de plásmidos de variantes de ferritina en la región hidrofílica.....	30
3.3.3.	Construcción de variantes de ferritina sin actividad ferroxidasa.....	33
3.3.4.	Transformación de <i>saccharomyces cerevisiae</i>	36

3.3.5.	Tamizado de la biblioteca de variantes de ferritina.	36
3.3.6.	Análisis de plásmidos.....	37
3.3.7.	Fraccionamiento de las variantes de ferritina y análisis por SDS-PAGE	38
3.3.8.	Cuantificación de los niveles de remoción de cadmio	39
3.3.9.	Cuantificación de contenido de cadmio y hierro en extractos de proteína termoestable.....	40
3.3.10.	Análisis estadísticos	41
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
4.1.	OBTENCIÓN DE LA VARIANTE DE FERRITINA sH1hp.	42
4.1.1.	Obtención de los fragmentos a clonar mediante pcr.....	42
4.1.2.	Clonación <i>in vivo</i>	43
4.1.3.	Análisis de los transformantes que producen la variante sH1hp	44
4.2.	EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A CADMIO DE LA FERRITINA sH1hp	46
4.3.	CONSTRUCCIÓN DE UNA BIBLIOTECA DE PLÁSMIDOS PARA LA GENERACION DE VARIANTES ALEATORIAS DE LA SUBUNIDAD H1 DE LA FERRITINA DE SOYA.	47
4.4.	TAMIZADO DE LA BIBLIOTECA Y SELECCIÓN DE VARIANTES CON AFINIDAD PARA CADMIO.....	49
4.5.	CONSTRUCCIÓN DE VARIANTES DE FERRITINA SIN ACTIVIDAD FERROXIDASA.	52
4.6.	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE VARIANTES DE FERRITINA.....	54
4.7.	CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE REMOCIÓN DE CADMIO POR LEVADURAS QUE PRODUCEN LAS VARIANTES DE FERRITINA	56
4.8.	CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE CADMIO Y HIERRO EN FRACCIONES DE PROTEÍNA TERMOESTABLE.....	59
V.	CONCLUSIONES	64
VI.	RECOMENDACIONES	65
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

VIII. ANEXOS	73
--------------------	----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Estándares de calidad ambiental (ECA) vigentes para cadmio en aguas en Perú, Categoría 1.	5
Tabla 2: Iniciadores utilizados para la construcción de la cepa $P_{GPD}>SMF1$	19
Tabla 3: Iniciadores utilizados para la amplificación y generación de variante de ferritina sH1hp.....	29
Tabla 4: Iniciadores utilizados para la amplificación y generación de las variantes de ferritina.	35
Tabla 5: Iniciadores utilizados para la amplificación y generación de variantes de ferritina sin actividad ferroxidasa - Δfrx	35
Tabla 6: Resumen de las mutaciones correspondientes a cada una de las variantes de ferritina construidas.	54
Tabla 7: Resultados de porcentajes de remoción de cadmio del medio por las cepas de levadura expresando las diferentes variantes de ferritina.	57
Tabla 8: Resultados de contenido de cadmio (Cd) y hierro (Fe) en extractos de proteína termoestable.	60
Tabla 9: Relaciones molares Cd(II)/ferritina y Fe(III)/ferritina para variantes sH1, sH1hp- Δfrx y sH1trc- Δfrx	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Resumen de los efectos tóxicos inducidos por el cadmio a nivel celular.	5
Figura 2: Resultados de parámetros que exceden el estándar de calidad ambiental (ECA) para agua de consumo poblacional por región hidrográfica, entre los años 2000 y 2016	7
Figura 3: Función y regulación del factor de transcripción Yap1 en la respuesta celular a estresores como cadmio	9
Figura 4: Representación de los tres principales transportadores de cadmio en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
Figura 5: Almacenamiento de hierro en la ferritina.....	11
Figura 6: Ubicación del canal hidrofílico en el complejo de ferritina	12
Figura 7: Comparación de las secuencias aminoacídicas de la ferritina de soja (subunidad H1 y H2), de arveja y de caballo (Subunidad L).	14
Figura 8: Representación del ensamblaje in vivo de ADN recombinante por recombinación homóloga en <i>S. cerevisiae</i>	16
Figura 9: Estrategia seguida para la construcción de la cepa PGPD>SMF1.	18
Figura 10: Características del plásmido p416GPD-sH1.	20
Figura 11: Alineamiento de secuencias aminoacídicas de ferritina de soja (subunidad H1), de arveja y de caballo.	24
Figura 12: Modificaciones a introducir en sH1 para la obtención de la variante de ferritina híbrida soja -arveja sH1p.	24
Figura 13: Estrategia de PCR para la obtención de los fragmentos que permiten la inclusión de las secuencias modificadas de sH1.	25
Figura 14: Construcción de los plásmidos para la expresión de las variantes de ferritina mediante clonación <i>in vivo</i>	26
Figura 15: Estrategia seguida para la generación de la variante sH1hp.....	27
Figura 16: Representación de la mutagénesis aleatoria en el fragmento que codifica para los aminoácidos 155 a 159 de la ferritina de soja.....	30

Figura 17: Comparación de los aminoácidos codificados por tripletes (codones) generados a partir de secuencias aleatorias “NNN” o “NNK”	31
Figura 18: Esquema de amplificación del fragmento “F5” para la generación de las variantes de ferritina	32
Figura 19: Modificaciones a introducir en sH1 para la obtención de las variantes sin actividad ferroxidasa.	33
Figura 20. Estrategia seguida para la generación de la variante sH1hp sin actividad ferroxidasa (sH1hp- Δ frx).....	34
Figura 21. Proceso de tamizado de transformantes resistentes a cadmio.....	36
Figura 22. Análisis electroforético en gel de agarosa de productos de PCR de los fragmentos “F3” y “F4”	43
Figura 23. Resultados de la transformación de células de levadura.	44
Figura 24: Análisis electroforético en gel de agarosa de plásmidos que contienen la variante de ferritina.....	45
Figura 25: Verificación de los cambios nucleotídicos en la variante sH1hp.	45
Figura 26: Ensayo de resistencia a cadmio mediante diluciones en serie de mutantes <i>yap1</i> que producen sH1 o la variante sH1hp.....	46
Figura 27. Análisis electroforético de productos de PCR de los fragmentos “F5” y “F6” para la construcción de variantes aleatorias de sH1.	47
Figura 28: Ejemplo representativo de resultados de la transformación y generación de la biblioteca de variantes.	48
Figura 29: Ejemplo representativo del tamizado por réplica en placa.....	49
Figura 30: Ejemplo representativo de selección de los clones que tienen el fenotipo buscado: mayor resistencia a cadmio y menor resistencia a hierro respecto a la ferritina de soya nativa (sH1).....	50
Figura 31: Análisis electroforético en gel de agarosa de plásmidos que contienen variantes de ferritina.....	51
Figura 33: Análisis electroforético de los productos de PCR para generar los fragmentos “F7” y “F8” para la construcción de variantes de ferritina sin actividad ferroxidasa.....	53

Figura 34: Efectos de la presencia de las variantes de ferritina sobre el crecimiento en medio que contiene cadmio o hierro.	54
Figura 35: Electroforesis en gel SDS-PAGE de soluciones conteniendo proteína total y variantes de ferritina.....	55
Figura 36: Resultados de los niveles de remoción de cadmio en las cepas de levadura que expresan las variantes de ferritina.	58
Figura 37: Comparación de la proliferación celular de los diferentes transformantes en presencia de 100 μ M CdCl ₂	58
Figura 38: Contenido de cadmio y hierro en los extractos proteicos termoestables.	61

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Resultados de secuenciación de nucleótidos de la variante de ferritina sH1hp .	74
Anexo 2: Resultados de secuenciación de nucleótidos de la variante de ferritina sH1trc..	76
Anexo 3: Resultados de secuenciación de nucleótidos de la variante sin actividad ferroxidasa: sH1trc- Δ frx.....	78
Anexo 4: Análisis estadístico para las determinaciones de los niveles de remoción de cadmio.	80
Anexo 5: Análisis estadístico para las determinaciones de los niveles de contenido de cadmio.	81
Anexo 6: Análisis estadístico para las determinaciones de los niveles de contenido de hierro	82

RESUMEN

La ferritina es una proteína multimérica que almacena miles de iones férricos en numerosos organismos. A pesar de estar ausente en *Saccharomyces cerevisiae*, esta levadura es capaz de producir ferritinas heterólogas funcionales, como la subunidad H1 de la soya (sH1). Su selectividad hacia el hierro se basa en la actividad ferroxidasa, lo que permite la oxidación de iones ferrosos y su posterior almacenamiento. Asimismo, esta proteína también exhibe afinidades con el cadmio, y ejemplos importantes son las ferritinas de arveja y de caballo. Una comparación de las secuencias aminoacídicas de estas ferritinas permitió identificar una región que podría ser responsable de las diferentes especificidades. Por tanto, este estudio tuvo como objetivo producir en *S. cerevisiae* variantes de ferritina de soya con aumentada selectividad para cadmio. Por un lado, se incorporaron en sH1 dos aminoácidos de la secuencia de caballo y cinco de la de arveja, logrando la producción de la variante sH1hp en levadura, confiriendo una mayor resistencia al cadmio. Logrado esto, la región de cinco aminoácidos se sometió a mutagénesis aleatoria. La estrategia de clonación *in vivo* permitió la construcción eficiente de una biblioteca de plásmidos y la expresión inmediata de las variantes en *S. cerevisiae*. El tamizado de los transformantes obtenidos permitió identificar la variante sH1trc, que permitió el crecimiento de los transformantes en medios suplementados con cadmio. Además, para reducir la afinidad de las variantes de ferritina hacia el hierro, se mutaron los aminoácidos responsables de la actividad ferroxidasa. Finalmente, los extractos de proteína termoestable se sometieron a análisis por SDS-PAGE y cuantificación de cadmio. Se verificó así la producción de variantes de ferritina termoestables y que las variantes que carecían de actividad ferroxidasa tenían el mayor contenido de cadmio. En consecuencia, se logró una remoción de cadmio de hasta el 80 por ciento con estas variantes.

Palabras clave: Biorremediación, levadura, ferritina de soya H1, biblioteca de plásmidos.

ABSTRACT

Ferritin is a multimeric protein that stores thousands of ferric ions in numerous organisms, but one important exception is *Saccharomyces cerevisiae*. However, this yeast can produce high levels of functional heterologous ferritins, such as the soybean H1 subunit (sH1). Iron selectivity is based on ferroxidase activity, which allows the oxidation of ferrous ions and their eventual efficient storage. Likewise, this protein also exhibits affinities to other metal ions such as cadmium, important examples being pea and horse ferritins. A comparison of the amino acid sequences of these ferritins allowed the identification of a region that might be responsible for the different specificities. Therefore, this study aimed to produce soybean ferritin variants with increased cadmium selectivity in *S. cerevisiae*. On the one hand, two amino acids from horse ferritin and five from pea ferritin were incorporated into sH1, achieving the production of the sH1hp variant in yeast cells, which exhibited a greater resistance to cadmium. Once this was achieved, the five amino acid region was subjected to random mutagenesis. The *in vivo* cloning approach allowed the efficient construction of a plasmid library and the immediate expression of the variants in *S. cerevisiae*. The screening of the yeast transformants obtained allowed the identification of the sH1trc variant, which allowed the growth of the yeast transformants in media containing high concentrations of cadmium. Furthermore, to reduce the affinity of the ferritin variants towards iron, the amino acids responsible for the ferroxidase activity were also mutated. Finally, the thermostable protein fractions were subjected to analysis by SDS-PAGE and quantification of cadmium. With these assays, it was verified the production of thermostable ferritin variants and, in addition, that the variants that lacked ferroxidase activity had the highest cadmium content. Consequently, cadmium removal of up to 80 per cent was achieved with these variants.

Key words: Bioremediation, yeast, soybean H1 ferritin, plasmid library.

I. INTRODUCCIÓN

En el Perú, existe una alta incidencia de elevadas concentraciones de cadmio en fuentes de agua para consumo poblacional. Esta problemática se asocia con las descargas de aguas residuales domésticas e industriales, pasivos ambientales mineros y otros vinculados a las características naturales de las cuencas hidrográficas (Butler *et al.* 2017; Bernex 2019). Asimismo, se han reportado altas concentraciones de este metal tan nocivo en productos agrícolas como el cacao (Chavez *et al.* 2015). Este es un problema crítico que ocurre en el Perú desde hace algunos años, lo que dificulta la exportación de cacao y sus derivados a mercados internacionales como el de la Unión Europea (Chavez *et al.* 2015). Por consiguiente, esta situación amerita el desarrollo y aplicación de tecnologías eficientes de remoción de cadmio de los efluentes, fuentes de agua y suelos contaminados, para la solución de esta problemática de contaminación (Beltrán-Pineda & Gómez-Rodríguez 2016; Zug *et al.* 2019).

Así, ante esta situación preocupante, surgen los esfuerzos por remediar los ambientes contaminados. Los métodos tradicionales fisicoquímicos han sido probados ampliamente, sin embargo aún presentan serias desventajas que no viabilizan su uso (Soares & Soares 2012; Morelli *et al.* 2015). Ante esto, la biorremediación de contaminación por metales pesados utilizando levaduras constituye una alternativa biotecnológica que viene siendo estudiada ampliamente (Saleem *et al.* 2008; Soares & Soares 2012; Aguas Bonilla 2016). Una de las estrategias biotecnológicas donde interviene *Saccharomyces cerevisiae* como sistema hospedero eucariota, es la producción de proteínas recombinantes u oligopéptidos con gran capacidad de asociarse a metales pesados (Wysocki & Tamás 2010).

Es así como, en estudios recientes se ha reportado que algunas variantes de ferritina exhiben significativa afinidad por iones de cadmio (Si *et al.* 2017; Abe *et al.* 2019). La ferritina es una proteína multimérica de 24 subunidades que tiene como función principal el almacenaje de hasta 4500 iones de hierro (Narayanan *et al.* 2018). Esta proteína ha sido producida heterológamente en organismos como *Escherichia coli* y *S. cerevisiae* con gran éxito; incluso para la levadura se ha evidenciado que la expresión de ferritina de soya le confiere una mayor acumulación de hierro (Goto *et al.* 1999; Masuda *et al.* 2001; de Llanos *et al.* 2016). Tomando estos estudios como precedente, se planteó en esta tesis utilizar a la ferritina

de soya para la búsqueda de variantes con mayor selectividad para cadmio en la levadura *S. cerevisiae*.

S. cerevisiae cuenta con eficientes mecanismos para reparar vacíos en fragmentos de ADN mediante recombinación homóloga, mecanismo que adicionalmente, puede ser usado ventajosamente para la construcción de plásmidos mediante la técnica denominada “clonación *in vivo*” (Kitazono 2011). Para esta construcción son necesarios fragmentos de ADN que generalmente provienen de productos de Reacciones en Cadena de la Polimerasa (PCR). Esta herramienta biotecnológica permite amplificar fragmentos de ADN; y además, hace posible introducir cambios en la secuencia original; con la finalidad de realizar diversos estudios (Weiner *et al.* 1994). Por otro lado, *S. cerevisiae* es utilizado como plataforma biológica para tamizados de alto rendimiento, para la búsqueda e identificación de péptidos o variantes de proteínas con alguna propiedad particular (Casini *et al.* 2018).

La presente investigación tuvo como objetivo producir en la levadura *S. cerevisiae* variantes de ferritina de soya con aumentada selectividad para cadmio. Se construyeron así diferentes variantes, reemplazando aminoácidos específicos en la ferritina de soya, para estudiar sus efectos en la asociación a cadmio. Asimismo, se generó una biblioteca de plásmidos que permitió la generación de variantes de ferritina de soya con secuencias aleatorias en una región de cinco aminoácidos, identificada como importante determinante de la afinidad. De esta manera, con esta biblioteca de plásmidos es posible producir en *S. cerevisiae* numerosas variantes de ferritina de soya, de hasta 20^5 . En la presente tesis, una porción de esta fue analizada, permitiendo la identificación de variantes de ferritina con mayor selectividad para cadmio.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. CADMIO Y SU TOXICIDAD

El cadmio (Cd) pertenece al grupo XII de la tabla periódica de elementos químicos, es un metal blando de color blanco plateado, similar al zinc y al mercurio en sus propiedades físicas y químicas. El cadmio es resistente a la corrosión, insoluble en agua y no es inflamable y por estas propiedades, se utiliza como placa protectora de pilas y baterías. El cadmio también se usa en las barras de control de los reactores nucleares, absorbiendo neutrones para mantener el estado deseado de reacciones de fisión dentro de un reactor nuclear (Genchi *et al.* 2020).

El cadmio presenta alta toxicidad, incluso a muy bajas concentraciones, además puede acumularse en la cadena de alimentos. Se ha descrito que la exposición a cadmio puede dañar el sistema nervioso, sistema renal, generar debilitamiento óseo, vómitos severos, desórdenes psicológicos, y ha sido clasificado como carcinógeno por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA en inglés) (Joint *et al.* 1972). Además, este metal es altamente persistente, acumulándose en hígado y riñones, presentando una vida media biológica de 10 a 25 años. El cadmio puede ocasionar disfunción renal tubular, alta presión arterial, daño de pulmones y cáncer pulmonar. Es un inhibidor enzimático potente y se ha evidenciado que la deficiencia en hierro y vitamina C puede influir en la toxicidad de Cadmio (Gamboa 2019).

Junto con los fuertes efectos teratogénicos y mutagénicos relacionados con el cadmio, este también muestra efectos adversos en dosis bajas tanto en la reproducción humana masculina como femenina y afecta el embarazo o su resultado. Esto se debe a cambios en la expresión de muchos genes en el embrión, lo que lleva a la metilación aberrante de los mismos dentro de la placenta y el embrión. Los patrones de modificación epigenética inducidos por el cadmio se han relacionado con su capacidad para unirse fácilmente a los tioles, con el agotamiento del donante de metilo S-adenosil metionina, lo que da como resultado alteraciones del metiloma y, posteriormente, la alteración de la actividad de la ADN metiltransferasa. Así, esto puede causar trastornos del desarrollo placentario y fetal (Genchi *et al.* 2020).

Este metal pesado interfiere con biometales esenciales como zinc, magnesio, selenio, calcio y hierro, alterando su homeostasis y también alterando sus funciones biológicas. La absorción gastrointestinal de este metal está determinada en la dieta por el contenido de estos elementos esenciales, junto con vitaminas, polifenoles, antioxidantes y otras biomoléculas activas. La mayor ingesta de algunos bioelementos puede impedir la absorción y los efectos tóxicos del cadmio; al mismo tiempo, la deficiencia de algunas de estas sustancias biológicamente activas puede aumentar la absorción gastrointestinal y la acumulación de cadmio en el organismo (Gamboa 2019; Genchi *et al.* 2020).

Los iones de cadmio muestran una alta afinidad por las estructuras biológicas que contienen grupos sulfhidrilo (–SH, cisteína y glutatión GSH), así como grupos disulfuro (–S–S–, cistina y glutatión reducido GS-SG), provocando la alteración de sus funciones (Cabaleiro *et al.* 2008; Wysocki & Tamás 2010). A nivel celular, durante la exposición al cadmio, aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), como son los radicales superóxidos, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilos. Así, el cadmio induce al estrés oxidativo y la sobreproducción de EROs. El estrés oxidativo inducido por xenobióticos resulta en la oxidación y el daño de macromoléculas biológicamente importantes, como proteínas, ADN, lípidos y fosfolípidos de la membrana celular. Además, al reducir el potencial de las membranas mitocondriales, el cadmio interrumpe la fosforilación oxidativa y la síntesis de ATP (Cabaleiro *et al.* 2008; Genchi *et al.* 2020). En la Figura 1 se muestra un esquema general de los efectos del cadmio a nivel celular.

A nivel internacional, se han establecido diferentes límites de concentración de cadmio en suelos y agua para asegurar calidad e inocuidad; en este sentido es que se aplica un límite de seguridad de 3 mg/kg a los suelos de cultivo alimentario para consumo humano, y 3 µg/L al agua potable. El nivel de ingesta de cadmio tolerable establecido por la FAO/OMS es 25 µg por kilogramo de peso corporal por mes (0,83 µg/kg de peso corporal/día o 58 µg/día para una persona de 70 kg) (Satarug 2018; Gamboa 2019). En el Perú, los estándares de calidad ambiental (ECA) fijan los valores máximos permitidos de contaminantes en el ambiente. Así, los ECA para cadmio en aguas y suelos están definidos según el Decreto Supremo N° 004-2017-MINAM (Tabla 1) (MINAM 2017). El Estándar de calidad ambiental vigente para cadmio en suelos es de 1,4 mg/kg.

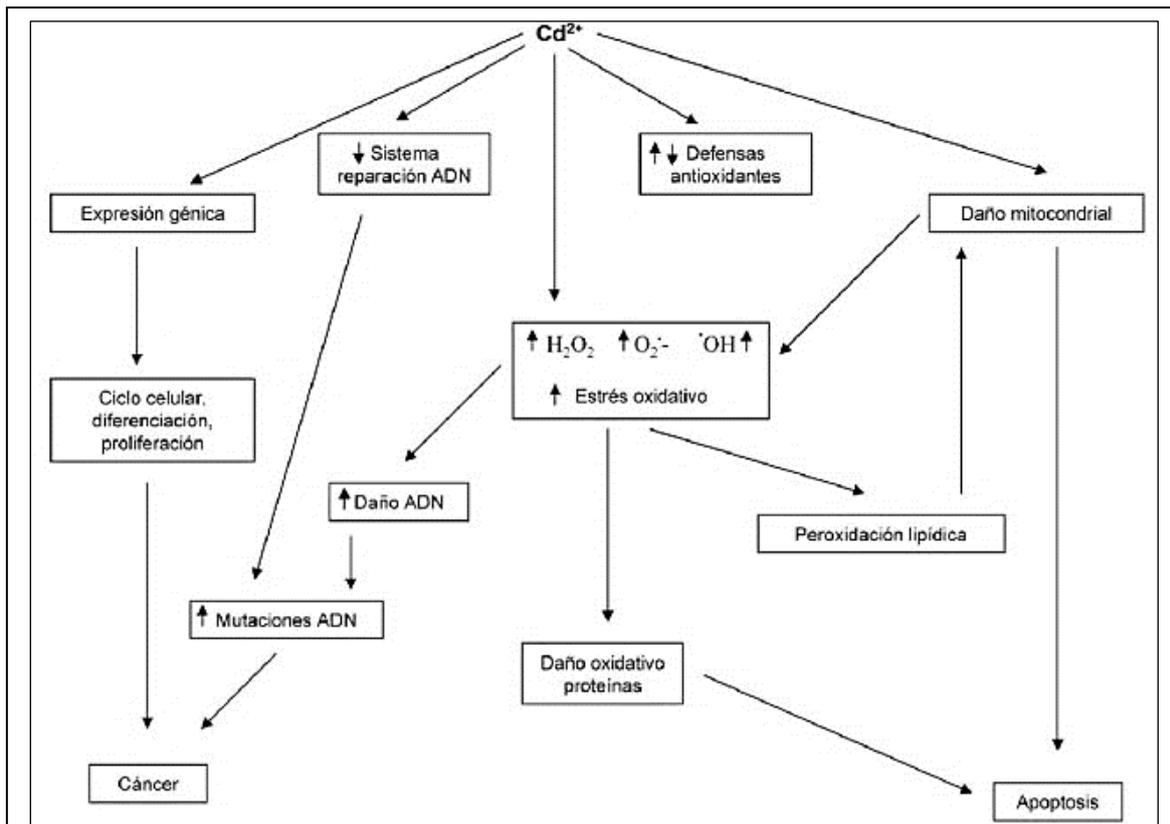


Figura 1. Resumen de los efectos tóxicos inducidos por el cadmio a nivel celular. La exposición a cadmio afecta la viabilidad celular debido a sus numerosos efectos adversos. Por un lado, induce al estrés oxidativo, lo que genera daño de macromoléculas como proteínas, ADN, lípidos y fosfolípidos de la membrana celular. Asimismo, puede producir daño mitocondrial, alterar los mecanismos de reparación de ADN y la expresión de genes, lo que puede desencadenar mutaciones y cáncer.

Fuente: Cabaleiro et al. (2008)

Tabla 1. Estándares de calidad ambiental (ECA) vigentes para cadmio en aguas en Perú, Categoría 1

Categoría 1 del ECA	Subcategoría	Uso del agua	Cadmio, mg/L
Poblacional y recreacional	A: aguas superficiales destinadas a la producción de agua potable	A1: agua que puede ser potabilizada con desinfección	0,003
		A2: agua que puede ser potabilizada con tratamiento convencional	0,005
		A3: agua que puede ser potabilizada con tratamiento avanzado	0,01
	B: aguas superficiales destinadas para recreación	B1: contacto primario	0,01

Fuente: Editado de MINAM (2017).

2.2. CONTAMINACIÓN POR CADMIO

El cadmio se encuentra en la naturaleza en bajas concentraciones, principalmente con los minerales de sulfuro de zinc, plomo y cobre. No obstante, debido a su amplia presencia, este metal se encuentra en cantidades medibles en algunos alimentos y cuerpos de agua. Asimismo, las actividades humanas contribuyen a la contaminación por cadmio, como la combustión de combustibles fósiles, los lixiviados generados por los vertederos, las tierras agrícolas y los desechos mineros, especialmente de las minas de zinc y plomo (Genchi *et al.* 2020).

Las altas concentraciones de cadmio en recursos hídricos, aire y suelos amenazan la salud de las poblaciones expuestas. El nivel de contaminación por cadmio en nuestros recursos hídricos, enmarcado dentro del contexto de América Latina, es realmente preocupante y constituye un serio peligro ambiental (Bernex 2019). La concentración de cadmio permitida es sobrepasada largamente en los cuerpos de agua pertenecientes a las tres regiones hidrográficas del Perú (Figura 2). Esto es extremadamente preocupante para la salud pública y ambiental, además de perjudicar la calidad de los cultivos.

En suelos ácidos, el cadmio es más móvil, y puede ser más fácilmente absorbido por las plantas (Gamboa 2019). Esto se vincula estrechamente con la problemática relacionada a la continua presencia de cadmio en el cacao, lo cual amenaza su comercialización y consumo a nivel nacional e internacional. Se ha reportado recientemente que el contenido promedio de cadmio en granos de cacao peruano es de 0,91 ppm, lo que conduce a la producción de chocolates con alto contenido de cadmio (Zug *et al.* 2019). Recientemente, la Unión Europea ha establecido límites de contenido de cadmio para los chocolates. Así, aquellos cuyo contenido de cacao está entre 50 por ciento y 70 por ciento deben incluir menos de 0,6 ppm de cadmio, y los que superan al 70 por ciento, menos de 0,8 ppm (Gamboa 2019). Por tanto, las altas concentraciones de cadmio en el cacao orgánico peruano perjudican su mercado de exportación.

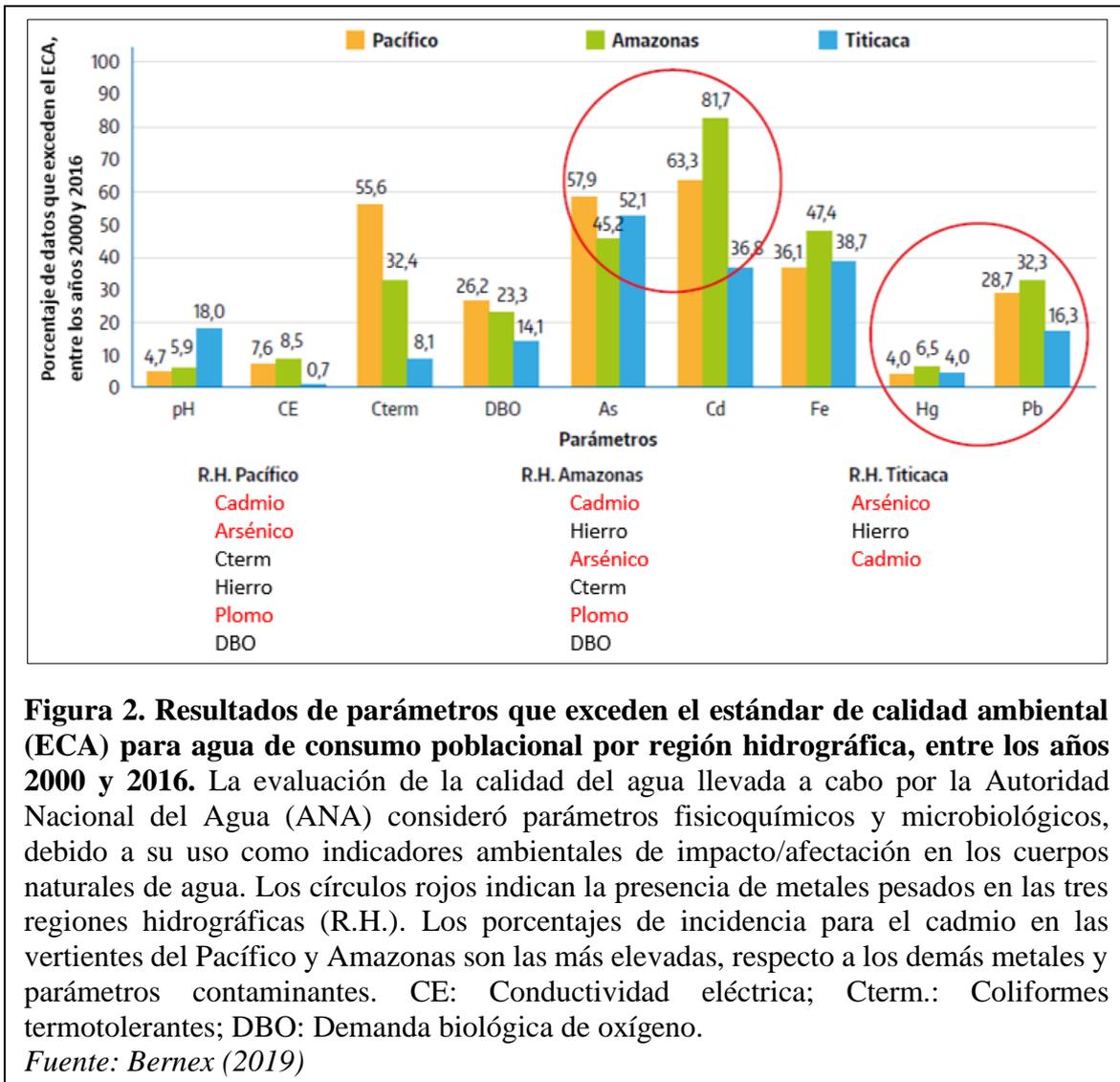


Figura 2. Resultados de parámetros que exceden el estándar de calidad ambiental (ECA) para agua de consumo poblacional por región hidrográfica, entre los años 2000 y 2016. La evaluación de la calidad del agua llevada a cabo por la Autoridad Nacional del Agua (ANA) consideró parámetros fisicoquímicos y microbiológicos, debido a su uso como indicadores ambientales de impacto/afectación en los cuerpos naturales de agua. Los círculos rojos indican la presencia de metales pesados en las tres regiones hidrográficas (R.H.). Los porcentajes de incidencia para el cadmio en las vertientes del Pacífico y Amazonas son las más elevadas, respecto a los demás metales y parámetros contaminantes. CE: Conductividad eléctrica; Cterm.: Coliformes termotolerantes; DBO: Demanda biológica de oxígeno.

Fuente: Bernex (2019)

2.3. LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae* Y BIORREMEDIACIÓN

S. cerevisiae es uno de los microorganismos más utilizados en la investigación biotecnológica, además de tener muy importantes aplicaciones industriales. Esta levadura es un organismo ubicuo e inocuo reconocido como GRAS que requiere condiciones sencillas para su cultivo, es de fácil crecimiento y presenta alta superficie celular. Su utilización en investigación biológica se debe principalmente a su sistema genético eucariota bien definido y maleable, además de poseer un sistema de transformación de ADN altamente versátil (Sherman 2002).

S. cerevisiae ha sido utilizada en la biorremediación de metales pesados, ya sea por su gran abundancia y disponibilidad (subproducto de la fermentación industrial) o porque estudios previos han determinado su eficiencia en mecanismos de biorremediación de metales tóxicos

como cadmio, cromo y plomo, a diferentes condiciones de pH y temperatura (Damodaran *et al.* 2011; Wang & Chen 2006). Es así como esta levadura ofrece dos mecanismos de remoción de metales: biosorción y bioacumulación. La biosorción se refiere a la capacidad de las levaduras, tanto vivas como muertas, de acumular metales en su superficie celular mediante procesos de quelación o acomplejamiento. Por otro lado, la bioacumulación involucra el pasaje de los metales hacia el citosol y su acumulación en él mediante diferentes mecanismos metabólicos. (Moreno-Rivas & Montfort 2019; Soares & Soares 2012). Por tanto, la levadura exhibe capacidades de bioacumulación intracelular de metales pesados, lo cual se logra con complejos enzimáticos o proteínas transportadoras que optimizan la entrada de metales pesados hacia el interior de la célula, los cuales luego son quelados por péptidos o proteínas y almacenados en compartimentos como la vacuola, inactivando así la toxicidad de los metales pesados (Wysocki & Tamás 2010). Sumándose estos procesos a la capacidad de la levadura para formar agregados o a la posibilidad de inmovilizarlas para una sedimentación rápida, convierten a la levadura en un potencial agente biorremediador con una significativa capacidad de remoción de metales pesados del agua contaminada (Li & Tao 2015; Sun *et al.* 2020).

Por tal motivo, a nivel internacional se vienen realizando diferentes estudios respecto a la manipulación genética de la levadura para poder usarla como agente biorremediador. Ya se ha reportado el uso de levaduras con capacidad incrementada de acumular metales debido a la sobreproducción de péptidos o proteínas que se unen a metales en el citoplasma, como proteínas ricas en cisteína y glutatión (GSH), un tripéptido constituido de cisteína, ácido glutámico y glicina, con un rol desintoxicante de EROs y metales pesados (Kuroda & Ueda 2010; Sun *et al.* 2019), así como proteínas heterólogas (Ullah *et al.* 2018). Los retos actuales involucran la producción de péptidos y proteínas recombinantes con alto poder quelante de metales pesados, así como la posibilidad de recuperación del metal y la reutilización de la biomasa de levadura.

2.4. RESPUESTA AL CADMIO EN *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae responde a la exposición a un metal/metaloide modificando su transcriptoma y proteoma. Por ello, esta levadura utiliza mecanismos y respuestas comunes para la protección contra la toxicidad de metales, secuestrándolos en compartimentos como la vacuola o también exportándolos (Figura 3). El ejemplo más importante son los genes involucrados en la asimilación del azufre y la biosíntesis de glutatión (GSH); estos genes están presentes en el grupo de genes inducidos como respuesta común al estrés oxidativo y

también son necesarios para la tolerancia a cadmio y arsénico (Wysocki & Tamás 2010). Estos mecanismos bioquímicos y moleculares, que involucran procesos de biotransformación, bioacumulación y transporte extracelular (exportación del contaminante), se deben principalmente a la activación de factores de transcripción y producción de proteínas/péptidos de unión específica; las cuales responden al estrés originado por la exposición a elementos nocivos (Wysocki & Tamás 2010).

En la levadura los mecanismos de respuesta ante la exposición a cadmio son regulados por varios genes. Por ejemplo, *YAP1* codifica para un factor de transcripción que actúa frente al estrés oxidativo generado por la exposición a cadmio (Figura 3), regulando la producción de Ycf1, un transportador vacuolar que permite almacenar el cadmio en la vacuola en forma de complejos glutatión-cadmio, $Cd^{+2}(GSH)_2$ (Bhuiyan *et al.* 2011). Además, Yap1 regula la producción de glutatión (GSH), el cual quelata el metal (Gomes *et al.* 2002). Así, una cepa de levadura con la delección del gen que codifica para *YAP1* posee hipersensibilidad a cadmio. Otros genes también participan en el mecanismo de respuesta, como *PCAI* que codifica para

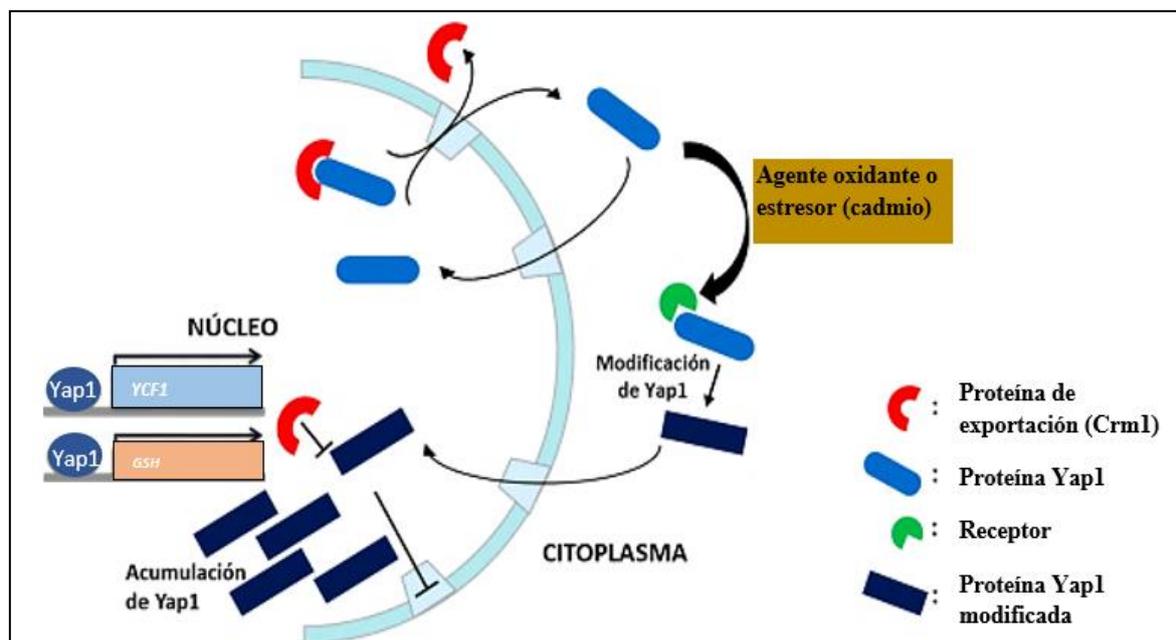


Figura 3. Función y regulación del factor de transcripción Yap1 en la respuesta celular a estresores como cadmio. Presencia de metales como cadmio conduce a un cambio conformacional en Yap1 debido a la interacción entre los grupos tiol de sus cisteínas (Cys598, Cys629) con el metal (Azevedo *et al.*, 2007), causando su transporte hacia el núcleo. A su vez, esta forma modificada de Yap1 no interactúa con la exportina Crm1 en el núcleo, permitiéndose así su permanencia en el núcleo y la transcripción de los genes involucrados en la respuesta a estrés oxidativo y detoxificación de metales pesados.

Fuente: Editado de Gutiérrez (2021)

un transportador que exporta iones de cadmio y *SMF1*, que codifica para un transportador que los importa (Wei *et al.* 2014; Wysocki & Tamás 2010). En este sentido, ya se ha demostrado que una cepa de levadura sobre productora de Smf1 muestra hipersensibilidad a cadmio, además de una mayor acumulación intracelular de este metal (Sun *et al.* 2019). Las funciones de estos genes se representan en la Figura 4.

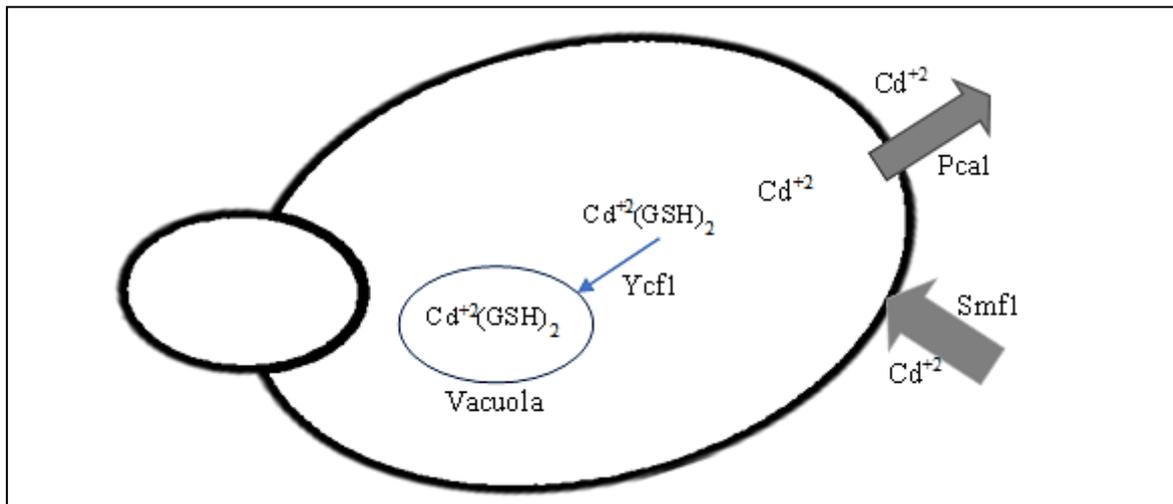


Figura 4. Representación de los tres principales transportadores de cadmio en *Saccharomyces cerevisiae*. Smf1 importa el cadmio y otros metales divalentes hacia la célula, Pca1 lo exporta, y Ycf1 transporta el cadmio hacia la vacuola en forma de complejos glutatión-cadmio, $Cd^{+2}(GSH)_2$.

Fuente: Wei *et al.* (2014)

2.5. FERRITINA

La ferritina es una proteína multimérica constituida de 24 subunidades o cadenas polipeptídicas, y su función radica en el almacenamiento de hierro. La ferritina está presente en células animales, vegetales y bacterias, sin embargo, los hongos carecen de esta proteína. En animales, las subunidades de ferritina se clasifican en ligera (L) y pesada (H), donde la subunidad H se asocia con la captación y oxidación del hierro ferroso (por su actividad de ferroxidasa), mientras que la subunidad L se asocia con la formación del núcleo de hierro en la proteína, o también llamado nucleación (Sheth & Brittenham 2000; Maity *et al.* 2019).

La ferritina en vegetales, o fitoferritinas, cuenta con dos tipos de subunidades H, que participan tanto en la oxidación del hierro ferroso como en la nucleación. Así, en el caso de la ferritina de soya, sus subunidades H1 y H2 se asocian sinérgicamente para formar el complejo heteropolimérico con una proporción mayor para la subunidad H1 (Masuda *et al.* 2001).

La ferritina es una proteína termoestable, con temperatura media de desnaturalización de 100 °C para fitoferritinas y 82 °C para ferritinas de animales; siendo las fitoferritinas más termoestables debido a la presencia de un péptido de extensión de aproximadamente treinta aminoácidos en los extremos N-terminal de sus subunidades (Zhang *et al.* 2019). A nivel experimental se ha determinado que la mayoría de las ferritinas solo pueden ser desnaturalizadas si son sometidas a temperaturas mayores a 80 °C por al menos 30 minutos. Esta termoestabilidad se debe principalmente a la arquitectura del complejo multimérico de ferritina en su forma madura, así como a los péptidos de extensión de cada una de las subunidades que conforman las ferritinas en plantas y bacterias (Zhang *et al.* 2019).

La ferritina logra almacenar los iones de hierro en su cavidad interna (Figura 5) debido a la presencia de varios canales de coordinación y entrada de iones férricos, siendo el principal un canal hidrofílico en el que convergen tres subunidades, lo que permite el ingreso y salida del metal (Figura 6) (Masuda *et al.* 2010; Masuda *et al.* 2018). Los iones de hierro luego de pasar por este canal son translocados al sitio activo de la proteína, el centro de ferroxidasa, donde ocurre la oxidación de Fe(II) a Fe(III). Finalmente, estos iones férricos son translocados e internalizados dentro del espacio hueco del complejo multimérico, formándose así el núcleo inorgánico de ferrihidrita, un mineral de óxido de hierro hidratado con fórmula química $5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, como se observa en la Figura 5 (Narayanan *et al.* 2018; Yang *et al.* 2015).

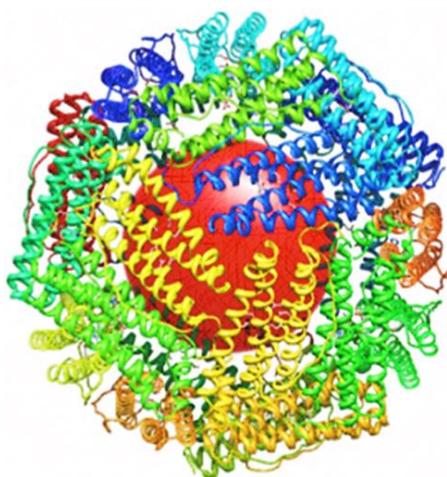
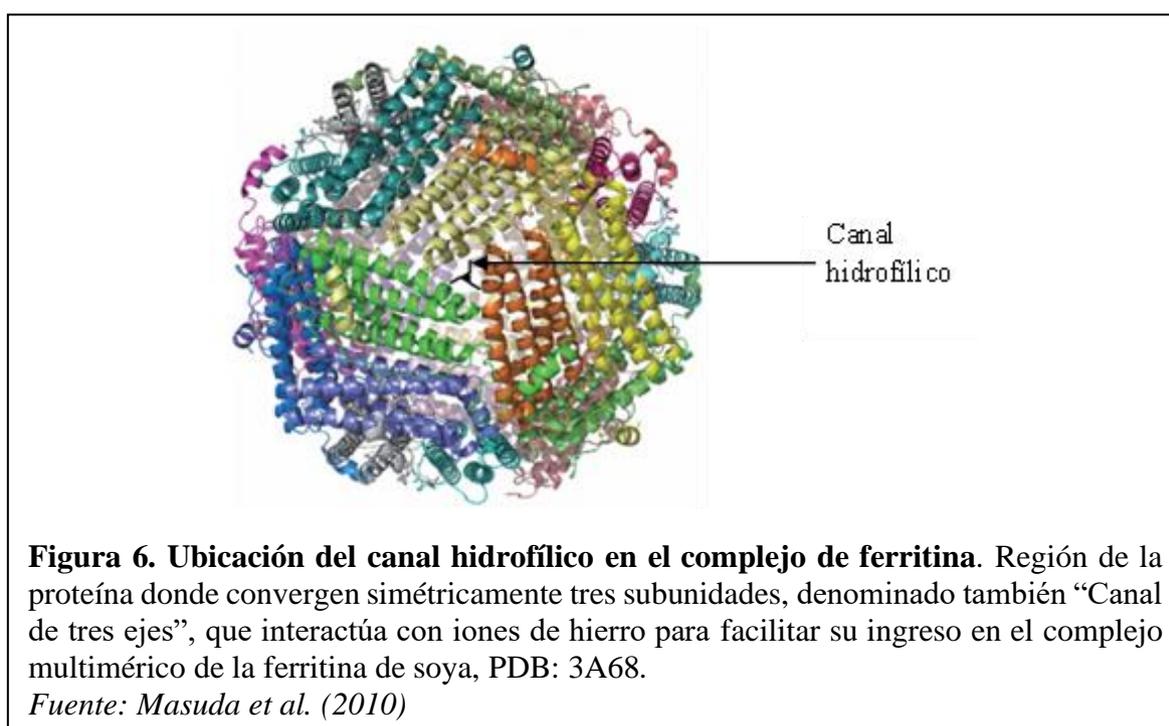


Figura 5. Almacenamiento de hierro en la ferritina. La esfera de color rojo representa el núcleo inorgánico que almacena el hierro en forma de ferrihidrita amorfa. Las estructuras con los diferentes colores representan a las subunidades (H o L en ferritinas de animales, H1 o H2 en fitoferritinas) que se asocian sinérgicamente para formar el complejo multimérico.

Fuente: Sánchez del Castillo et al. (2018)

2.6. FERRITINA Y CADMIO

En diferentes estudios se ha logrado identificar que la ferritina es capaz de almacenar iones diferentes al hierro, como magnesio, calcio, cadmio y plomo (Li *et al.* 2012; Si *et al.* 2017). Los sitios de unión que han sido identificados a nivel molecular son el canal hidrofílico principal y algunas otras regiones (Maity *et al.* 2019). Este canal hidrofílico (Figura 6), ha sido denominado como la estructura que permite asociarse con diferentes iones metálicos cargados positivamente, debido principalmente al campo electrostático negativo generados por residuos de aspartato y glutamato, conservados en la mayoría de ferritinas (Maity *et al.* 2019). Asimismo, las diversas conformaciones espaciales de las regiones proteicas permiten la generación de enlaces de coordinación con los iones metálicos, por ejemplo, la interacción entre los diferentes residuos aminoacídicos con un ion de cadmio adopta una conformación tetraédrica, que es propia de los sistemas de coordinación del cadmio (Fomina & Gadd 2014; Moreno-Rivas & Montfort 2019; Sóvágó & Várnagy 2013; Wang & Chen 2006).



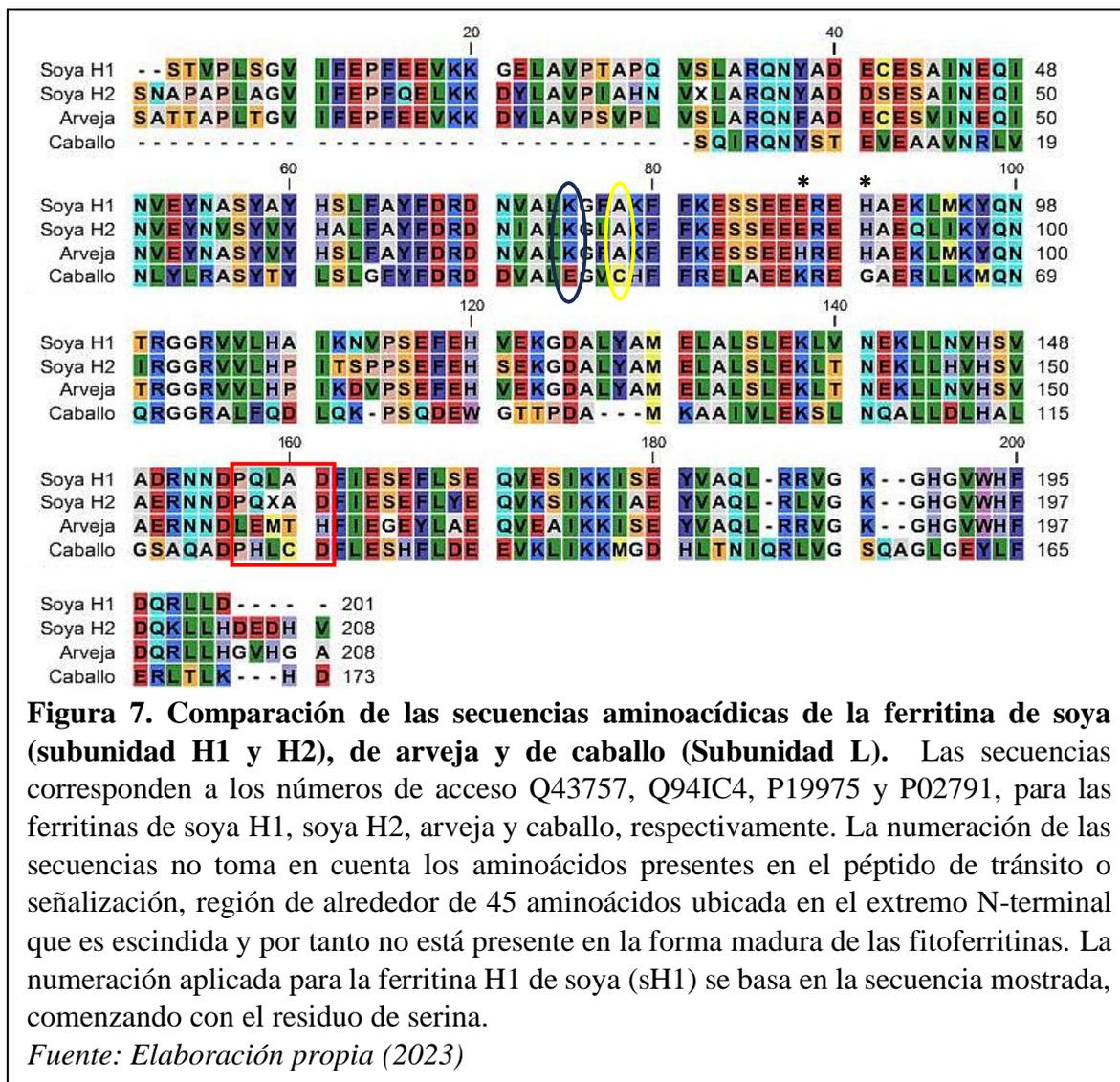
Respecto a la capacidad de algunas ferritinas de interactuar con el cadmio, se ha reportado que la subunidad L de caballo es capaz de asociarse con este metal en algunas regiones de su estructura proteica (Abe *et al.* 2019). Adicionalmente, modificaciones aminoacídicas mediante mutagénesis dirigida en esta ferritina, permitieron obtener variantes con mejores desempeños en la quelación de iones de cadmio (Abe *et al.* 2019). El aminoácido responsable

de esta asociación es la cisteína, que junto con la histidina son los aminoácidos que muestran mayor afinidad hacia el cadmio (Sóvágó & Várnagy 2013). Asimismo, en otros estudios se ha evidenciado que la ferritina de arveja acumula cantidades significativas de cadmio, así como de hierro, sin embargo, los sitios de unión o asociación no han sido dilucidados debido a que su estructura tridimensional aún no ha sido resuelta (Nirupa *et al.* 2019).

Por otro lado, en la levadura se ha logrado expresar diferentes ferritinas recombinantes (de Llanos *et al.* 2016; Kim *et al.* 2003; Shin *et al.* 2001), entre estas, las subunidades de ferritina de soya H1 y H2, lo cual ha logrado mayor acumulación de hierro en *S. cerevisiae*. Asimismo, se ha evidenciado que esta ferritina es capaz de ensamblarse en su forma nativa para capturar iones de hierro y proteger a las células de levadura del estrés oxidativo derivado de una exposición a altas concentraciones del metal (de Llanos *et al.* 2016). Teniendo esto como precedente, en esta investigación se utilizó a la subunidad H1 de la ferritina de soya para estudiar si su expresión modula la capacidad de la levadura para acumular y tolerar cadmio, así como la identificación de variantes con mejores desempeños en la quelación de cadmio.

En la Figura 7 se comparan las secuencias aminoacídicas de la ferritina de soya (subunidad H1 y H2) con aquellas ferritinas capaces de asociarse a cadmio. De acuerdo con este análisis se determinó que la ferritina de arveja y la subunidad H1 de la ferritina de soya comparten un 87.6 por ciento de identidad, diferenciándose significativamente solo en cinco aminoácidos que conforman el canal hidrofílico de coordinación de iones metálicos, entre las posiciones 155 y 159 (cuadrado rojo). De esto se deduce que estos cinco aminoácidos podrían ser los responsables de esa reportada acumulación de cadmio en la ferritina de arveja (Nirupa *et al.* 2019).

Asimismo, la ferritina de caballo (subunidad L) y la subunidad H1 de la ferritina de soya exhiben solo un 44.3 por ciento de identidad, encontrándose varias diferencias en las secuencias. De acuerdo con estudios previos (Granier *et al.* 1998), los residuos de ácido glutámico (E) en posición 44 (círculo azul) y cisteína (C) en posición 47 (círculo amarillo) son capaces de coordinar iones de cadmio.



2.7. FERRITINA Y ACTIVIDAD FERROXIDASA

El centro de ferroxidasa comprende regiones aminoacídicas conservadas en la mayoría de las ferritinas de diferentes organismos, y cumple una función vital al ser el sitio activo de la proteína, que es donde se produce la oxidación de Fe(II) a Fe(III). Así, estos iones férricos son translocados e internalizados dentro del espacio hueco del complejo multimérico, formándose el núcleo inorgánico de ferrihidrita (Yang *et al.* 2015; Narayanan *et al.* 2018). De esta manera, la actividad ferroxidasa le da a la ferritina su capacidad para acumular miles de iones de hierro.

Algunos estudios previos (Treffry *et al.* 1993; Si *et al.* 2017; Maity *et al.* 2019) reportaron que la pérdida de la actividad ferroxidasa provoca una disminución drástica en la acumulación de hierro en la ferritina. Los residuos involucrados y claves en la actividad

ferroxidasa son el glutamato en posición 86 e histidina en posición 89 en la hélice B del complejo multimérico (indicadas con * en la Figura 7). En este sentido, estudios previos han evidenciado que, al introducir mutaciones en esas posiciones aminoacídicas, reemplazando el glutamato por lisina y la histidina por glicina, generan la pérdida de la actividad ferroxidasa y disminución significativa en la internalización de hierro (Treffry *et al.* 1993; Rucker *et al.* 1996). Asimismo, la subunidad L de la ferritina de caballo, así como la de otras ferritinas animales, poseen estos cambios en ambas posiciones aminoacídicas (ver Figura 7), debido a su falta de actividad ferroxidasa y función principal de nucleación de hierro (Treffry *et al.* 1993; Granier *et al.* 1998).

Tomando estas evidencias como precedentes, es que se planteó que la eliminación de la actividad ferroxidasa en la ferritina conllevaría a la producción de variantes con menor afinidad hacia el hierro y mayor predisposición a unirse a otros metales.

2.8. CLONACIÓN *IN VIVO*

La clonación *in vivo* realizada por *S. cerevisiae* es un método que aprovecha la capacidad de la levadura para realizar recombinación homóloga, un proceso que involucra la reparación de roturas de doble hebra en el ADN (Hua *et al.* 1997). Es mediante la clonación *in vivo* que se pueden construir plásmidos y ensamblar fragmentos de ADN en un solo paso, para la producción de péptidos y proteínas recombinantes en la levadura (Orr-Weaver *et al.* 1981). Por tanto, la clonación *in vivo* permite restaurar plásmidos después de la transformación de células de levadura con un plásmido receptor y fragmentos de ADN, ambos presentando zonas de homología de alrededor de 40 pares de bases que flanquean al sitio de inserción, para permitir la recombinación y su clonación (Ma *et al.* 1987; Hua *et al.* 1997; Kitazono 2009). Asimismo, si se transforma a las células de levadura con un plásmido linealizado, las eficiencias de clonación se ven aumentadas ya que las colonias solo podrán formarse en el medio selectivo si el plásmido ha sido reconstruido a través de la recombinación homóloga (Figura 8). Este mecanismo prácticamente carece de errores, implica bajos costos, y puede ser implementado en cualquier laboratorio por medio de la realización de técnicas básicas de biología molecular (Kitazono 2011).

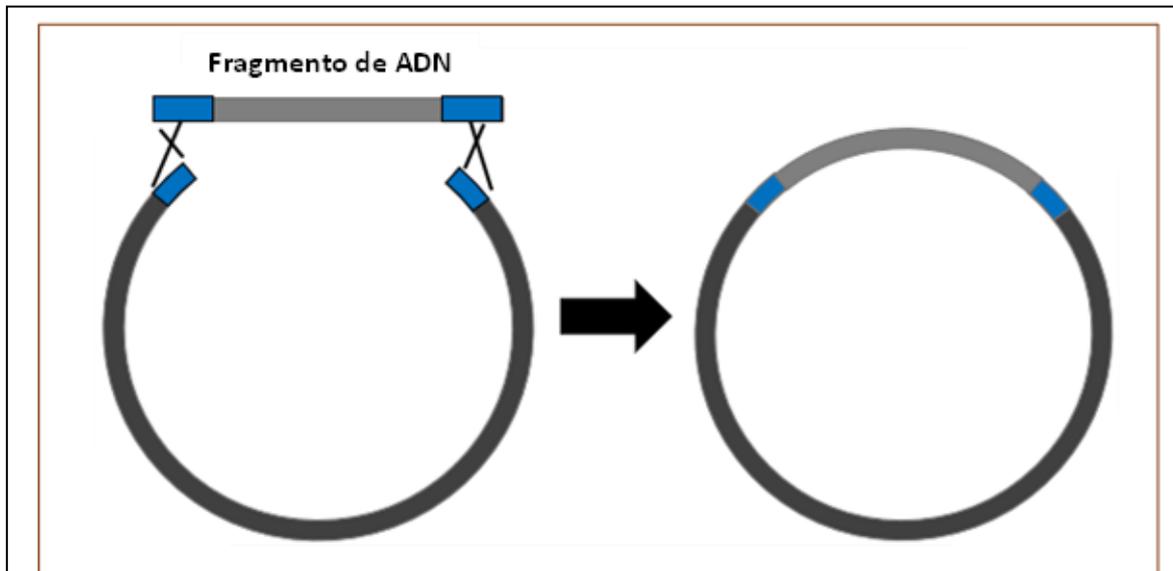


Figura 8. Representación del ensamblaje *in vivo* de ADN recombinante por recombinación homóloga en *S. cerevisiae*. La clonación *in vivo* es realizada por la maquinaria celular de la levadura dentro del núcleo, partiendo de un plásmido linealizado y fragmentos de ADN, ambos presentando zonas de homología de alrededor de 40 pares de bases (en azul) que flanquean al sitio de inserción, permitiendo la recombinación y la correcta construcción de plásmidos híbridos con uno o más insertos.

Fuente: Edición propia (2023)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR

La presente 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 & Rothstein 1989).
- El mutante *yap1* con genotipo *yap1::loxP-KanMX6-loxP*, construido en la cepa *Saccharomyces cerevisiae* W303-1a, provino de los stocks del laboratorio (Gutiérrez 2021). *YAP1* codifica para un factor de transcripción que regula la expresión de genes de respuesta ante la exposición a cadmio y otros compuestos tóxicos (Figura 3). Por tanto, las células que carecen de este gen presentan alta sensibilidad a cadmio, lo que facilitó los procesos de tamizado y ensayos de resistencia.
- La cepa sobre productora de Smf1 ($P_{GPD}>SMF1$) fue construida en *Saccharomyces cerevisiae* W303-1a. *SMF1* codifica para un transportador implicado en la importación de iones de cadmio (Figura 4). La cepa $P_{GPD}>SMF1$ sobre expresa este gen y demuestra mayor acumulación intracelular y alta sensibilidad a cadmio, de acuerdo con estudios reportados (Sun *et al.* 2019). Esta cepa se construyó mediante la integración de un marcador y el promotor de expresión constitutiva del gen que codifica para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (P_{GPD}) en la secuencia reguladora de *SMF1*. Para lograrlo, primero se amplificó por PCR el cassette conteniendo el gen que confiere resistencia a kanamicina usando el plásmido pUG6 como plantilla. Paralelamente, se amplificó por PCR la secuencia del promotor P_{GPD} usando el plásmido p416GPD como plantilla. Para cada amplificación se emplearon los iniciadores indicados en la Tabla 2, de tal forma

que cada fragmento incluía extremos con secuencias homólogas entre ellos (región celeste en la Figura 9), para ser posteriormente unidos mediante una PCR de fusión. A su vez, el producto de fusión contenía extremos con secuencias homólogas a la región reguladora del gen *SMF1*, para permitir su correcta integración al ser introducido en la levadura (Figura 9). La correcta construcción de la cepa $P_{GPD}>SMF1$ fue verificada mediante PCR.

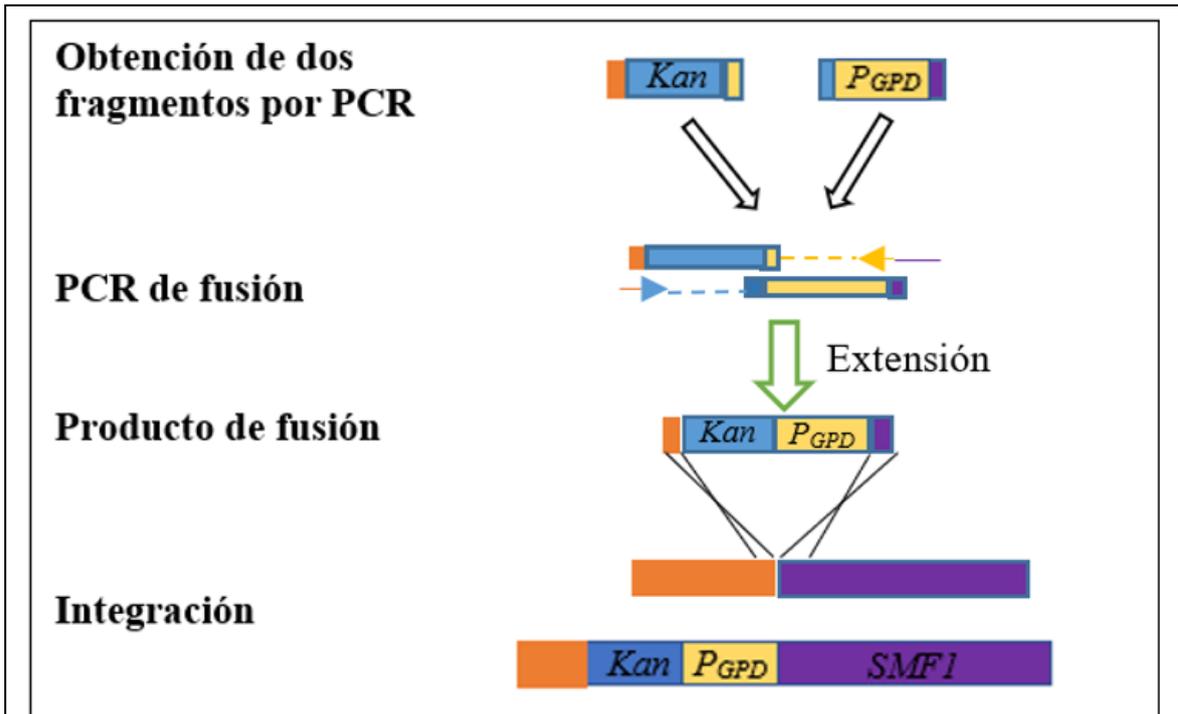


Figura 9. Estrategia seguida para la construcción de la cepa $P_{GPD}>SMF1$. Primero se amplificaron separadamente, por un lado, el gen que confiere resistencia al antibiótico kanamicina (rectángulo celeste) y por el otro, la secuencia P_{GPD} (rectángulo amarillo). Estos dos fragmentos presentaban secuencias homólogas en sus extremos para permitir su fusión mediante una tercera reacción de PCR. A su vez, este producto incluía extremos con secuencias homólogas al lugar de integración: la secuencia reguladora de *SMF1* (zona naranja) e inicio de la secuencia del gen (zona morada).

Fuente: Edición propia (2023)

Tabla 2: Iniciadores utilizados para la construcción de la cepa P_{GPD}>SMF1

NOMBRE	SECUENCIA	PROPÓSITO
upSMF1cassette DIR	AAGATATATATCAGCAGAAAACTAACTTTCTCA ATTAGGTCAAACAGCTGAAGCTTCGTACGC	Amplificación del cassette que contiene el gen que confiere resistencia a kanamicina
CassetteGPDrev	GAAATGGCGAGTATTGATAATGAGCATAGG CCACTAGTGGATCTG	
CassetteGPDdir	CAGATCCACTAGTGGCCTATGCTCATTATCAATAC TCGCCATTC	Amplificación del promotor P _{GPD}
GPDySMF1rev	GCATCCACAGCAACTGCAGCATGAGAAGGACCAA CGTTCACCATGGATCCACTAGTTCTAGAATCCGTC	
SMF1up45dir	AAGATATATATCAGCAGAAAACT	PCR de fusión
SMF1inicio45rev	GCATCCACAGCAACTGCAGCATGA	

Fuente: Elaboración propia

- *Escherichia coli* (TOP10) con genotipo: (*mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*), Φ 80*lacZ* Δ M15, Δ *lacX74*, *deoR*, *recA1*, *araD139*, Δ (*araleu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL*(*StrR*), *endA1*, *nupG*).
- Plásmidos: p416GPD, plásmido que cuenta con un promotor constitutivo GPD (P_{GPD} , gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) empleado para la construcción, clonación y expresión de variantes de ferritina de soya, y p416GPD-sH1 (Figura 10), plásmido que contiene el ADN complementario (ADNc) de la subunidad H1 de la ferritina de soya. Estos plásmidos fueron proporcionados gentilmente por el Dr. Sergi Puig del Departamento de Biotecnología, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Paterna, Valencia – España (de Llanos *et al.* 2016). Los plásmidos incluyen los genes marcadores *URA3* y *Amp^R* que permiten la selección de los transformantes de levadura y *E. coli*, respectivamente. Asimismo, posee un sitio de multiclonación ubicado entre el promotor P_{GPD} y el terminador *CYC1*.

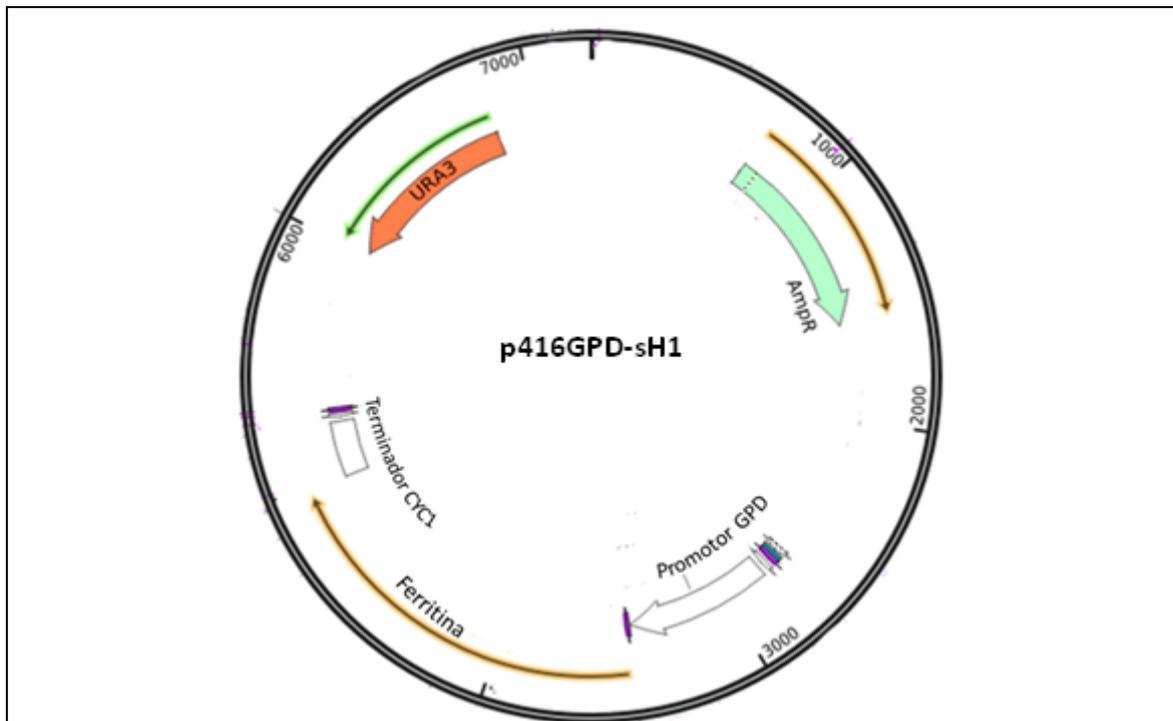


Figura 10. Características del plásmido p416GPD-sH1. Se muestran representados con flechas de color naranja y verde claro los genes marcadores *URA3* y *Amp^R*, respectivamente. La flecha de color amarillo, representa el ADNc de la ferritina de soya de la subunidad H1 clonado por De Llanos y colaboradores, entre el promotor de expresión constitutiva GPD y el terminador *CYC1*.

Fuente: Gutiérrez (2023); De Llanos *et al.* (2016)

Lista de plásmidos y su origen:

- p416GPD, (de Llanos *et al.* 2016)
- p416GPD-sH1, (de Llanos *et al.* 2016)
- p416GPD-sH1p, (Gutiérrez 2023)
- p416GPD-sH1hp, esta tesis
- p416GPD-sH1trc, esta tesis
- p416GPD-sH1- Δ frx, esta tesis
- p416GPD-sH1hp- Δ frx, esta tesis
- p416GPD-sH1trc- Δ frx, esta tesis

3.2.2. Materiales de uso rutinario

- Micropipetas y pipetas
- Placas Petri
- Matraces
- Palitos de dientes estériles
- Perlitas de vidrio de 0.4 mm y 4 mm de diámetro
- Tubos de ensayo
- Tubos cónicos para centrifuga
- Microplatos de 96 pocillos

3.2.3. Medios de cultivo

- Agar y caldo LB (Luria Bertani): Medio de enriquecimiento para *Escherichia coli* (MacWilliams & Liao 2006).
- Agar y caldo LB-Ampicilina: Medio para selección por resistencia a ampicilina (MacWilliams & Liao 2006).
- Agar y caldo -Ura: Medio sintético y completo que carece de uracilo (Ura) para la selección de transformantes de *S. cerevisiae* (Treco & Lundblad 1993).
- Agar y caldo YPD (Extracto de levadura, peptona y glucosa): Medio para el mantenimiento y propagación de levaduras (Treco & Lundblad 1993).

3.2.4. Reactivos

- Cloruro de cadmio
- Cloruro férrico
- Buffer Tris/EDTA (TE)
- Alcohol de 70 por ciento y 90 por ciento
- Buffer TE conteniendo acetato de litio
- Polietilenglicol (PEG) 3350
- Isopropanol
- Acetato de amonio
- Acetato de potasio
- Mezcla de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1)
- Ampicilina
- ADN polimerasa termo-resistente
- ADN de esperma de salmón
- Enzimas de restricción

3.2.5. Equipos

- Termociclador
- Electroporador
- Espectrofotómetro
- Agitador con baño María
- Congeladora de menos 20 °C
- Ultracongeladora de menos 80 °C
- Transiluminador con sistema de documentación
- Centrífuga refrigerada
- Microcentrífuga
- Mezclador de vórtice
- Cámaras de electroforesis
- Cabina de flujo laminar
- Balanza analítica
- Incubadora
- Refrigeradora
- Autoclave

3.3. MÉTODOS

3.3.1. Estrategia para la obtención de variantes de ferritina sH1hp

Como se indicó en la sección 2.6, estudios recientes han reportado que la ferritinas de *Equus caballus* (caballo) y de *Pisum sativum* (arveja) presentan mayor capacidad de acumulación de cadmio (Abe *et al.* 2019; Nirupa *et al.* 2019). Por ello, se analizaron y compararon las secuencias aminoacídicas de estas ferritinas con la de la subunidad H1 de soya (sH1). En el alineamiento, se identificaron regiones de alta variabilidad, las cuales son indicadas en la Figura 11. Respecto a la ferritina de arveja, ésta se diferencia de sH1 en cinco aminoácidos pertenecientes a la región hidrofílica de entrada de iones de hierro, entre las posiciones 155 y 159 (Figura 11). Por tanto, se dedujo que estos cinco aminoácidos podrían ser los responsables de la reportada acumulación de cadmio en la ferritina de arveja (Nirupa *et al.* 2019). Por esta razón, en una tesis previa (Gutiérrez 2023) se reemplazaron los residuos presentes en la ferritina de soya: prolina (P), glutamina (Q), leucina (L), alanina (A) y ácido aspártico (D); por los respectivos residuos de la ferritina de arveja en las mismas posiciones: leucina (L), ácido glutámico (E), metionina (M), treonina (T) e histidina (H). De esta manera, se construyó una variante de ferritina híbrida de soya-arveja sH1p (P155L Q156E L157M A158T D159H), como se muestra en la Figura 12.

Respecto a la secuencia de la ferritina de caballo (Subunidad L), se ha reportado que dos aminoácidos (ácido glutámico (E) en posición 73 y cisteína (C) en posición 76) participan en la quelación de iones de cadmio. En estas respectivas posiciones de la subunidad H1 de ferritina de soya, están presentes respectivamente, lisina (K) y alanina (A). Debido a estas diferencias, se generaron dos reemplazos aminoacídicos en la ferritina de soya: la lisina en posición 73 fue reemplazada por un ácido glutámico (mutación K73E) y la alanina en posición 76 fue reemplazada por una cisteína (mutación A76C), pudiendo dar lugar a una variante de ferritina híbrida de soya-caballo (K73E A76C). Una vez obtenidas las variantes de ferritina mencionadas, las mutaciones fueron combinadas para dar lugar a una nueva variante, denominada sH1~~hp~~, que incluye los dos aminoácidos de la subunidad L de ferritina de caballo (*horse* en inglés) y los cinco aminoácidos de la región hidrofílica de la ferritina de arveja (*pea* en inglés) (K73E A76C P155L Q156E L157M A158T D159H).

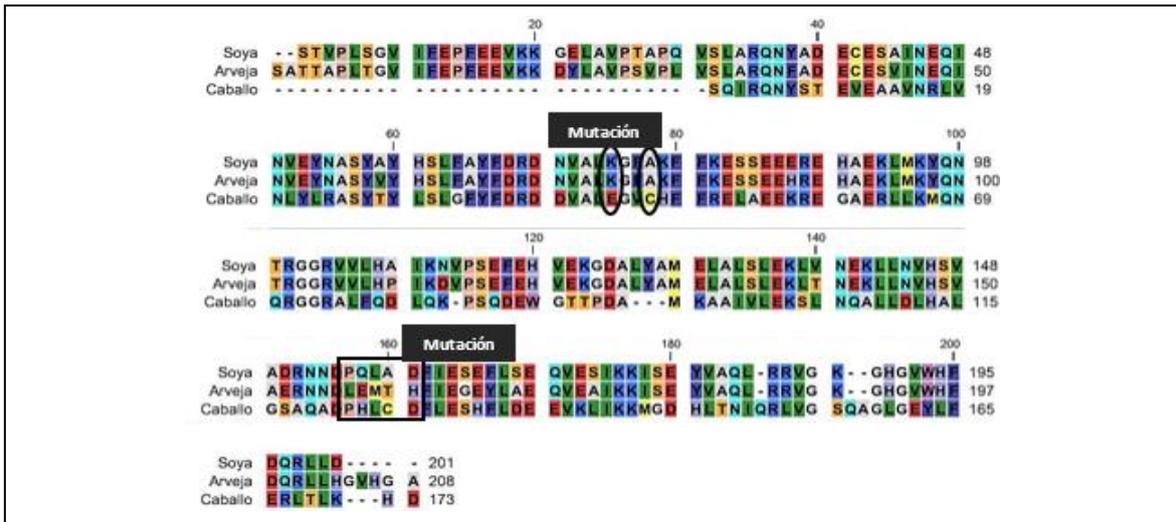


Figura 11. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la ferritina de soya (subunidad H1), de arveja y de caballo. Se indica las posiciones donde se generaron los cambios aminoacídicos en la ferritina de soya: un reemplazo de cinco aminoácidos en la región hidrofílica de la proteína, y dos mutaciones adicionales (K73E y A76C).
Fuente: Elaboración propia (2023)

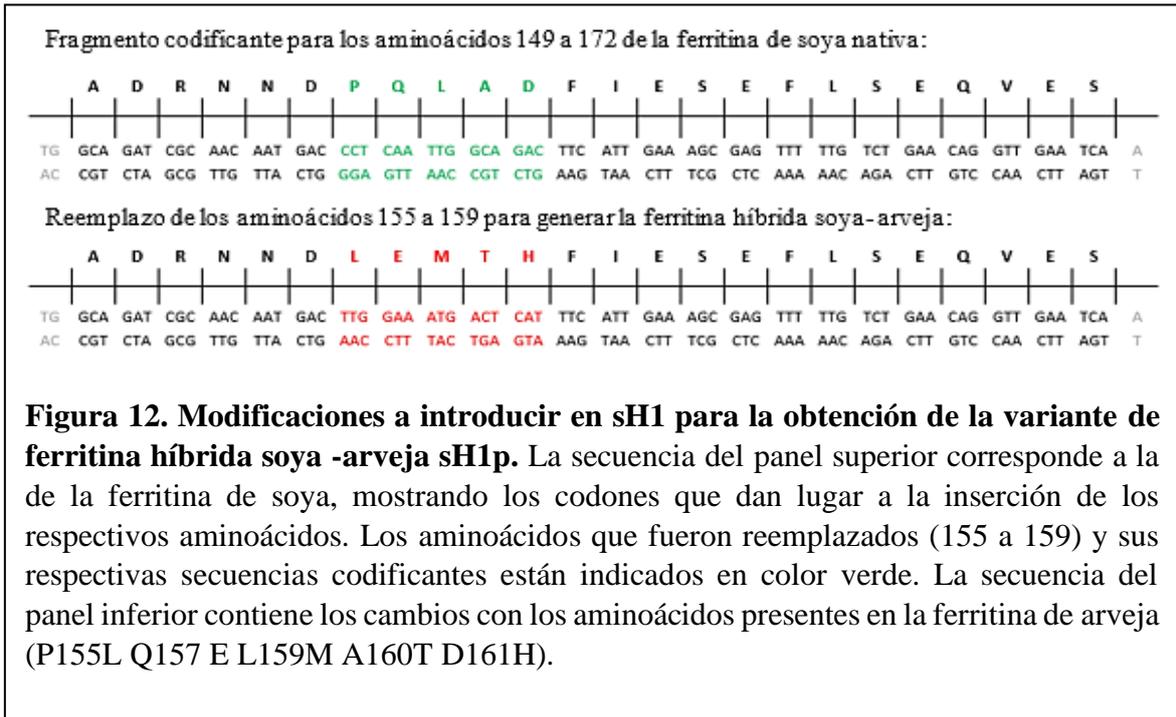
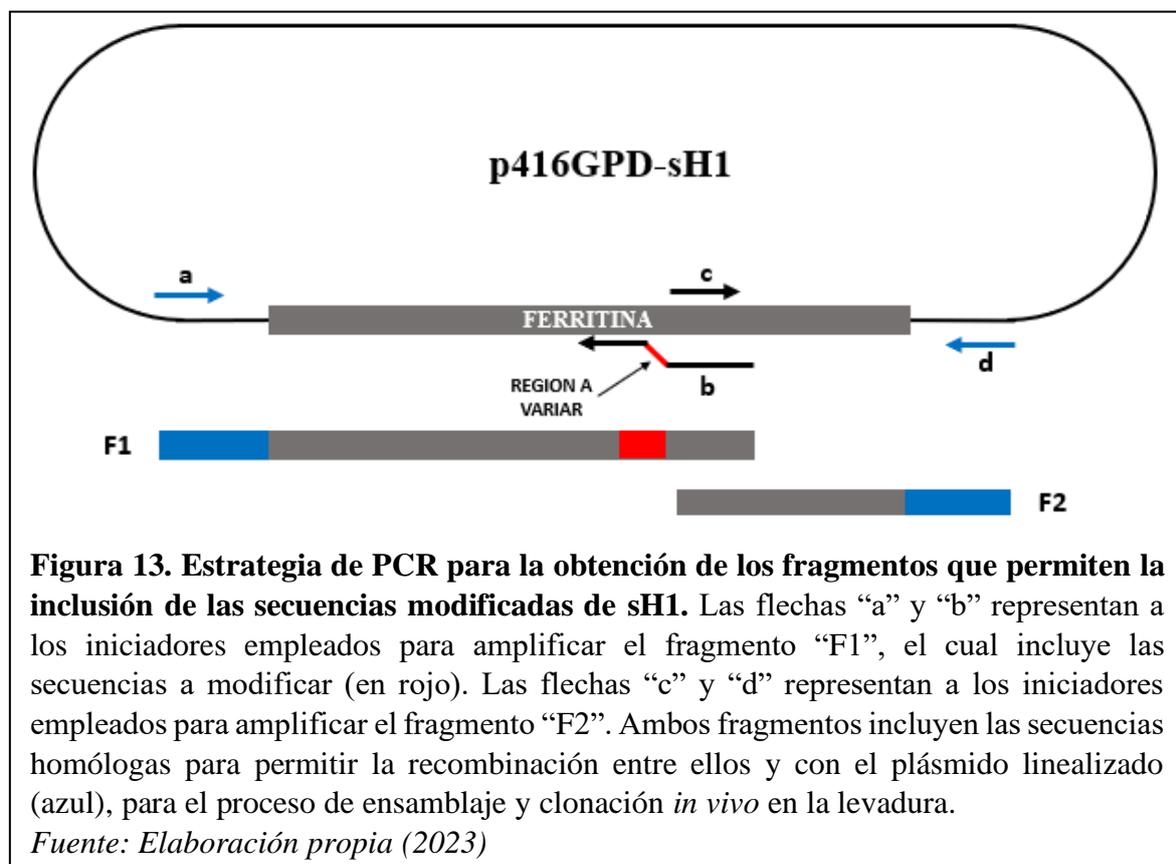


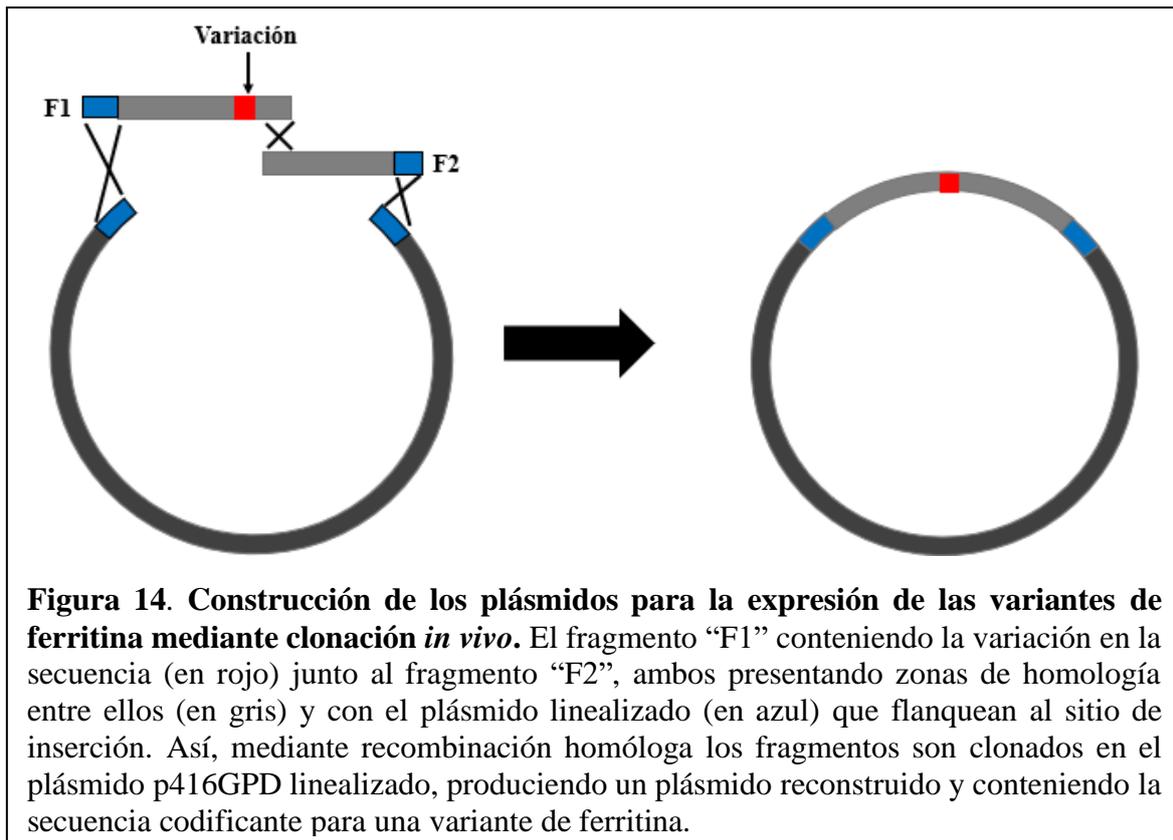
Figura 12. Modificaciones a introducir en sH1 para la obtención de la variante de ferritina híbrida soya -arveja sH1p. La secuencia del panel superior corresponde a la de la ferritina de soya, mostrando los codones que dan lugar a la inserción de los respectivos aminoácidos. Los aminoácidos que fueron reemplazados (155 a 159) y sus respectivas secuencias codificantes están indicados en color verde. La secuencia del panel inferior contiene los cambios con los aminoácidos presentes en la ferritina de arveja (P155L Q157 E L159M A160T D161H).

Para introducir estos cambios y obtener las variantes de ferritina se empleó la clonación *in vivo* de dos fragmentos de ADN en el plásmido p416GPD, siguiendo la estrategia descrita en las Figuras 13 y 14. Los fragmentos “F1” y “F2” fueron obtenidos por PCR, usando como plantilla al plásmido p416GPD-sH1, el cual contiene la secuencia codificante (ADNc) de la ferritina de soya de la subunidad H1 (sH1), y los iniciadores indicados en la Figura 13. Estos

fragmentos incluyen la parte inicial y final de la secuencia codificante de sH1 y secuencias comunes en sus extremos para permitir la recombinación homóloga. En la amplificación del fragmento “F1”, se utilizaron los iniciadores que permiten la inclusión de los cambios deseados. El fragmento “F2” amplificado corresponde en su totalidad a las secuencias de la ferritina de soya e incluye 40 nucleótidos homólogos al fragmento “F1” para permitir la clonación de la secuencia completa en el plásmido. Para la generación de la variante sH1hp (con aminoácidos provenientes de ferritina de caballo y arveja), se empleó como plantilla el plásmido conteniendo el ADNc de la variante híbrida soya-arveja, previamente construido como parte de otra tesis (Gutiérrez 2023).

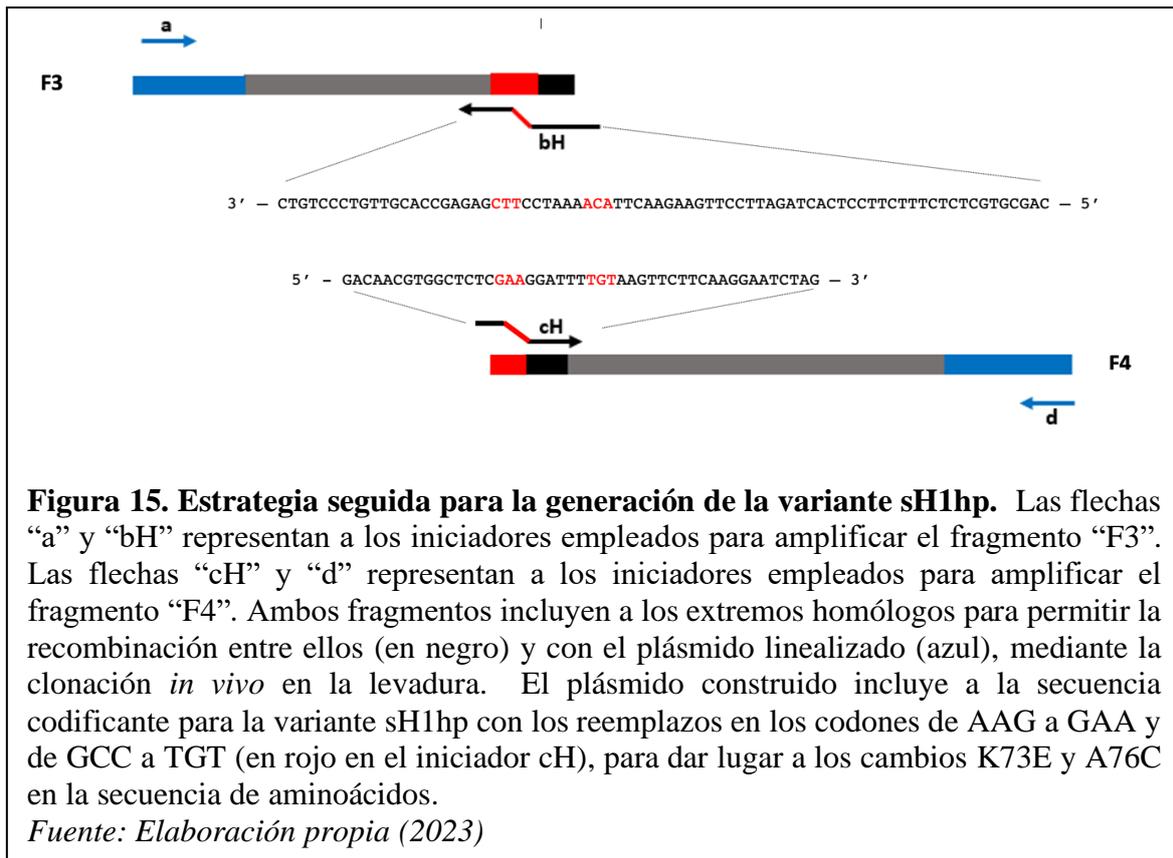


Para la clonación *in vivo*, se co-transformó a la levadura con los dos fragmentos F1 y F2 y el plásmido p416GPD linealizado. La levadura se encargó de ensamblar los fragmentos por recombinación homóloga (clonación *in vivo*) como muestra la Figura 14. Se obtuvo así el plásmido conteniendo la secuencia que codifica para la respectiva variante de ferritina de soya.



a. Generación de variantes por PCR

Las variantes de ferritina de soja fueron construidas como se describe en la Figura 13, con el respectivo diseño de iniciadores para generar los reemplazos requeridos. De esta manera, contándose ya con el plásmido conteniendo la secuencia codificante de la variante híbrida soja-arveja (denominado p416GPD-sH1p) se procedió a la construcción de la variante que incluye a las secuencias derivadas de caballo y arveja (sH1hp). Para su construcción se siguió el mismo procedimiento indicado en la Figura 13, solo que para este caso se utilizó como plantilla al plásmido p416GPD-sH1p, y los iniciadores “a” y “bH” para la amplificación del Fragmento “F3” (Tabla 3 y Figura 15). El iniciador bH, contiene 20 bases homólogas al plásmido para la amplificación (parte final del iniciador), 6 que corresponden a la secuencia a introducir de la ferritina de caballo (en rojo), y 40 que son homólogas a la secuencia del fragmento “F4”. Para la obtención del Fragmento “F4”, se utilizó el mismo plásmido como plantilla y los iniciadores “cH” y “d” que contienen secuencias homólogas al fragmento “F3” y al plásmido (Figura 15).



Con la secuencia del plásmido p416GPD-sH1 se diseñaron los iniciadores mostrados en la Tabla 3. En el diseño se tuvieron en cuenta la temperatura de fusión (T_m) de los iniciadores utilizados en cada reacción de PCR, en donde “a”, “bP” y “bH” tenían similar T_m , y de igual manera “c”, “cH” y “d”. Los iniciadores fueron sintetizados por la compañía MacroGen Inc. (Seúl, Corea).

b. Digestión del plásmido y tratamiento con fosfatasa alcalina

La levadura realiza la clonación *in vivo* con mayor eficiencia si el plásmido receptor, p416GPD en este caso, se encuentra linealizado (Gutiérrez 2023). Así, para obtener el plásmido lineal, se utilizó la enzima de restricción *BamH1* que realiza un corte en el sitio de multiclonación. La reacción se realizó con un buffer estándar para la enzima según el protocolo sugerido por el proveedor. Se utilizó 5 μ g del plásmido y se incubó durante 3 horas a 37 °C. Luego de este procedimiento se corrió electroforesis en gel para verificar si la digestión había sido completa. Para evitar la recirculación del plásmido, se trató con fosfatasa alcalina para eliminar los grupos fosfatos. El protocolo de desfosforilación empleado fue similar al de la tesis de Huanca (2020), que consistió en un tratamiento en el que se agregó 133 μ L de una mezcla de fenol/cloroforno e inmediatamente se colocó en el

mezclador de vórtice. Todo esto para desnaturalizar y precipitar las proteínas. Después de la precipitación, las muestras fueron centrifugadas y al sobrenadante acuoso se le agregó la quinta parte del volumen de acetato de amonio 7.5 M y el doble de etanol al 96 por ciento. Luego de reposar por 20 minutos a -20 °C se centrifugó y se recuperó el sedimento conteniendo el ADN, el cual fue lavado con etanol al 70 por ciento. Finalmente, este sedimento fue disuelto y tratado con 2 µL de fosfatasa alcalina 5 U/µL (NEB) y con 10 µL del respectivo buffer a 37 °C por 30 minutos. Terminada la incubación, la enzima fue inactivada a 65 °C por 20 min.

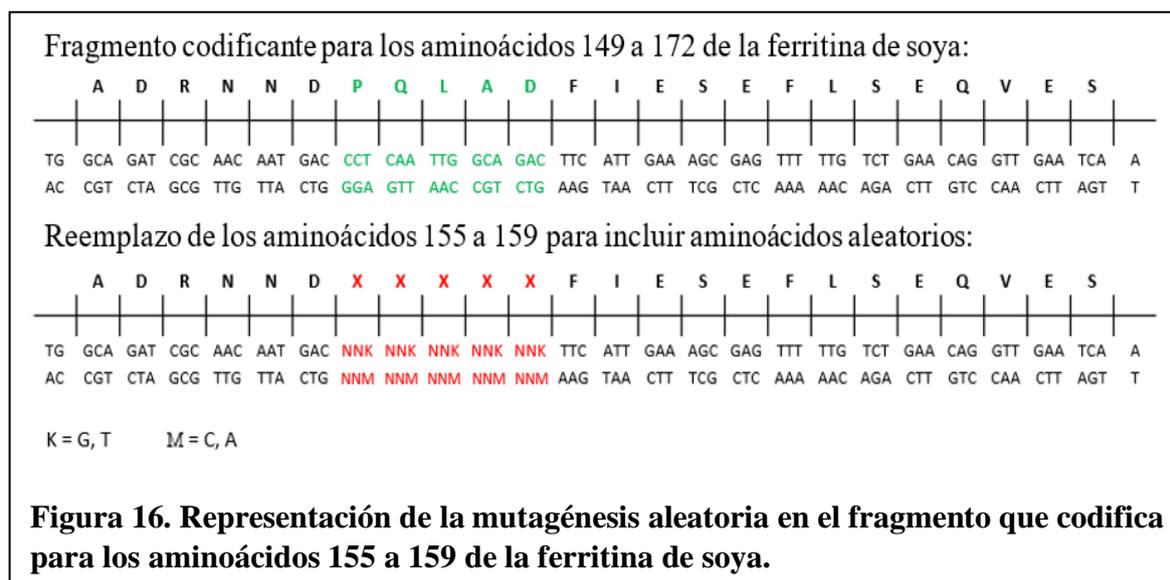
Tabla 3: Iniciadores utilizados para la generación de la variante sH1hp

NOMBRE	SECUENCIA	FUNCIÓN
a	AAACACCAGAACTTAGTTTCGACGGATTCTAGAAC TAGTGGATCCATGG	Iniciador directo para la generación de los fragmentos “F1”, “F3”, “F5” y “F7”
d	GACCTAGACTTCAGGTTGTC	Iniciador reverso para la generación de los fragmentos “F2”, “F4”, “F6” y “F8”
bH	CAGCGTGCTCTCTTTCTTCCTCACTAGATTCCTTGA AGAACTTACA AAATCCTTCGAGAGCCACGTTGTCC CTGTC	Iniciador reverso para la introducción de los cambios K73E y A76C en el fragmento “F3”
cH	GACAACGTGGCTCTCGAAGGATTTGTAAAGTTCTTC AAGGAATCTAG	Iniciador directo para la amplificación del fragmento “F4” e introducción de los cambios K73E y A76C (derivados de la subunidad L de la ferritina de caballo)
bP	TTGATTCAACCTGTTTCAGACAAAACTCGCTTTCAA TGAAATGAGTCATTCCAA GTCATTGTTGCGATCTG CCA	Iniciador reverso para la introducción de los cambios P155L Q156E L157M A158T D159H (derivados de la ferritina de arveja) en el fragmento “F1”
c	TTCATTGAAAGCGAGTTTTTGTCTG	Iniciador directo para la amplificación del fragmento “F2” para la introducción de los cambios P155L Q156E L157M A158T D159H (derivados de la ferritina de arveja)

Fuente: Elaboración propia

3.3.2. Construcción de una biblioteca de plásmidos de variantes de ferritina en la región hidrofílica

Tomando en cuenta que la secuencia de cinco aminoácidos (155 a 159) de la región hidrofílica es el principal canal de coordinación de iones metálicos, cambios aleatorios en esta región podría conducir a la identificación de una o más variantes con mayor selectividad por cadmio. Por tanto, esta porción de la secuencia de sH1 fue sometida a una mutagénesis aleatoria (Figura 16). Así, tomando en cuenta que cualquiera de los 20 aminoácidos podría ser incluido en cada posición, para la región mutagenizada de cinco aminoácidos, la diversidad máxima de variantes a obtener es de 20^5 (3,2 millones).



En la Figura 16, la secuencia del panel superior corresponde a la de la ferritina de soya nativa, mostrando los codones que dan lugar a la inserción de los respectivos aminoácidos representados con abreviaturas de una letra. El panel inferior muestra la estrategia seguida para mutagenizar aleatoriamente los cinco aminoácidos con los tripletes NNK, que solo permite la inclusión de G o T en la última base en cada codón (representado como “K”); mientras que M representa a los nucleótidos C y A. Esta estrategia permitió la eficiente inclusión de secuencias aleatorias que codifiquen para cualquiera de los 20 aminoácidos en cada posición “X”, así como disminuir la probabilidad de obtener secuencias repetidas en la biblioteca y reducir la probabilidad de obtener codones de terminación.

Para la mutagénesis aleatoria, se empleó como estrategia el uso de tripletes NNK, el cual incluye cualquiera de las cuatro bases (A, T, C o G) en las dos primeras posiciones de cada codón (NN*) pero solo G o T (denotado como “K”) en la tercera. Por tanto, esta estrategia permite la generación de solo 32 posibles codones (Figura 17), en lugar de las 64 que se generarían con un triplete aleatorio NNN. Así, con el uso de esta estrategia se disminuye la redundancia en la biblioteca generada (Kille *et al.* 2013). Además, la combinación de bases que permite esta estrategia acepta la inclusión de un solo codón de terminación (TAG; Figura 17), ya que los otros dos (TAA y TGA) no pueden generarse al no permitirse la inclusión de C o A en la tercera posición. Aplicar esta estrategia permitió contar con todas las posibles secuencias codificantes para la eventual inclusión de todos los posibles 20 aminoácidos en cada posición, y reducir la presencia de codones de terminación.

		Segunda base del codón									
		T		C		A		G			
Primera base del codón	T	TTT	Phe	TCT	Ser	TAT	Tyr	TGT	Cys	T	Tercera base del codón
		TTC	Phe	TCC	Ser	TAC	Tyr	TGC	Cys	C	
		TTA	Leu	TCA	Ser	TAA		TGA		A	
		TTG	Leu	TCG	Ser	TAG		TGG	Trp	G	
	C	CTT	Leu	CCT	Pro	CAT	His	CGT	Arg	T	
		CTC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg	C	
		CTA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg	A	
		CTG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg	G	
	A	ATT	Ile	ACT	Thy	AAT	Asn	AGT	Ser	T	
		ATC	Ile	ACC	Thy	AAC	Asn	AGC	Ser	C	
		ATA	Ile	ACA	Thy	AAA	Lys	AGA	Arg	A	
		ATG	Met	ACG	Thy	AAG	Lys	AGG	Arg	G	
	G	GTT	Val	GCT	Ala	GAT	Asp	GGT	Gly	T	
		GTC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly	C	
		GTA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly	A	
		GTG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly	G	

Figura 17. Comparación de los aminoácidos codificados por tripletes (codones) generados a partir de secuencias aleatorias “NNN” o “NNK”.

En la Figura 17 se muestra el código genético, que especifica la relación entre cada triplete de desoxirribonucleótidos (codón) y la inclusión de un aminoácido específico. De esta manera, para cada triplete o codón, la primera base está determinada por las letras T, C, A y G ubicadas en la primera columna; la segunda base, por las letras de la primera fila; y la tercera base, por las letras de la última columna. Los codones de terminación e iniciación se

indican sombreados en rosa y verde, respectivamente. La zona sombreada de amarillo incluye a los codones que tienen como tercera base a C y A y, por tanto, éstos no serían generados cuando se emplea la estrategia con tripletes “NNK” causando así su exclusión. Debido a ello, con esta estrategia solo podrían generarse 32 posibles codones, incluyendo a un solo codón de terminación “TAG”.

Por la estrategia seguida para la generación de mutaciones, se sintetizó un iniciador “reverso” (iniciador “bR” en Figura 18 y Tabla 4) que contenía la secuencia complementaria (y en sentido reverso), por ello este iniciador incluye los tripletes MNN. Este iniciador reverso “bR” contiene 15 nucleótidos (resaltados en color rojo) para la inclusión de diferentes combinaciones de codones, que junto con el iniciador “a” permitió la obtención de los fragmentos “F5” (Figura 18).

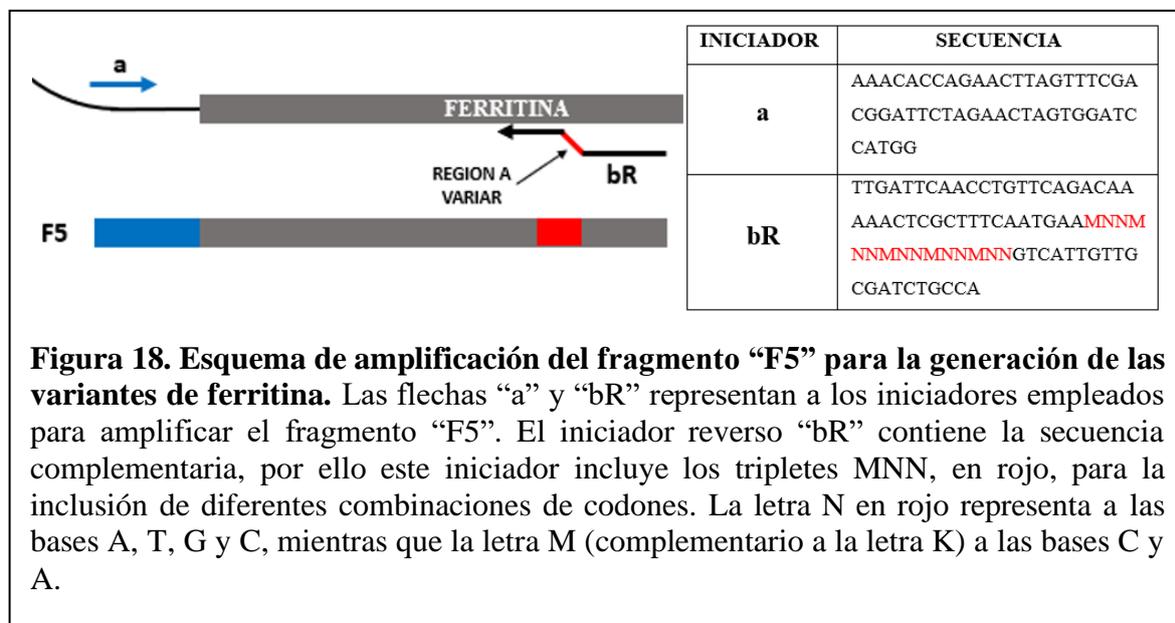
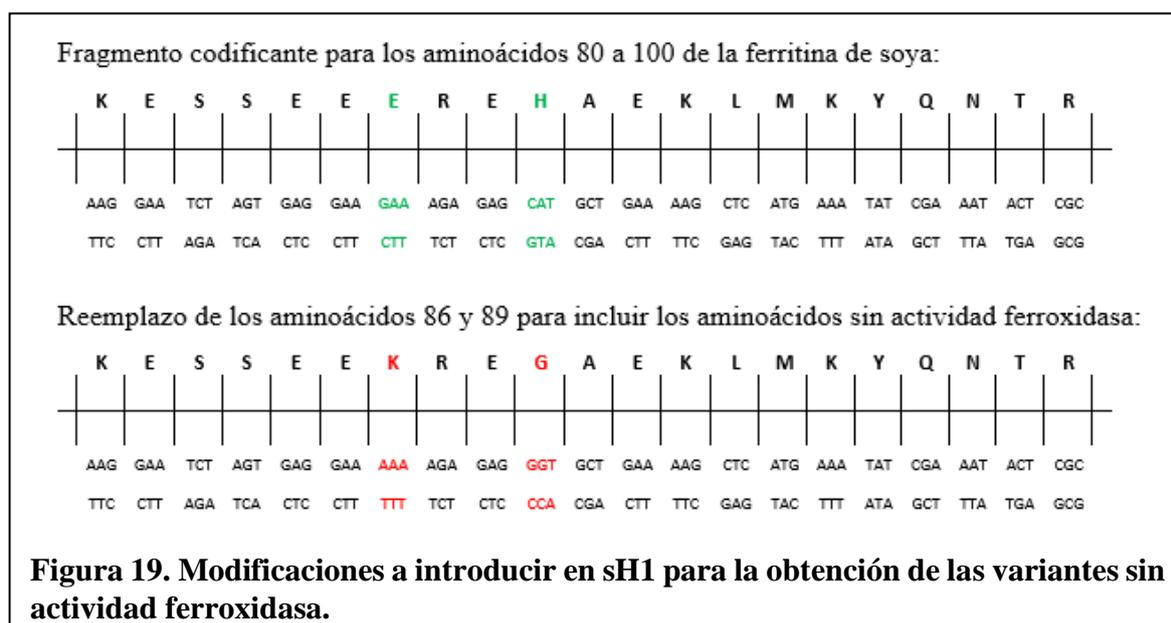


Figura 18. Esquema de amplificación del fragmento “F5” para la generación de las variantes de ferritina. Las flechas “a” y “bR” representan a los iniciadores empleados para amplificar el fragmento “F5”. El iniciador reverso “bR” contiene la secuencia complementaria, por ello este iniciador incluye los tripletes MNN, en rojo, para la inclusión de diferentes combinaciones de codones. La letra N en rojo representa a las bases A, T, G y C, mientras que la letra M (complementario a la letra K) a las bases C y A.

3.3.3. Construcción de variantes de ferritina sin actividad ferroxidasa

Previamente en la literatura descrita en la sección 2.7, se indicó que estudios previos han evidenciado que la pérdida de la actividad ferroxidasa provoca una disminución drástica en la acumulación de hierro en la ferritina. Los residuos involucrados en la actividad ferroxidasa son el glutamato en posición 86 e histidina en posición 89, en la ferritina sH1. En este sentido, se ha reportado que, al introducir mutaciones en esas posiciones aminoacídicas, reemplazando el glutamato por lisina y la histidina por glicina, generan la pérdida de la actividad ferroxidasa y disminución significativa en la internalización de hierro (Rucker *et al.* 1996; Treffry *et al.* 1993). Los cambios aminoacídicos incorporados se basan en la secuencia de la subunidad L de la ferritina de caballo (Figura 7), la cual carece de actividad ferroxidasa y tiene como función principal la nucleación de hierro (Granier *et al.* 1998; Treffry *et al.* 1993). De esta manera, se generaron dos reemplazos aminoacídicos en cada una de las variantes de ferritina: el glutamato en posición 86 fue reemplazada por una lisina (mutación E86K) y la histidina en posición 89 fue reemplazada por una glicina (mutación H89G), como se muestra en la Figura 19, dando lugar a las variantes de ferritina de soja sin actividad ferroxidasa, que fueron denotadas como “-Δfrx” (E86K H89G).



En la Figura 19, la secuencia del panel superior corresponde a la de la ferritina de soja, mostrando los codones que dan lugar a la inserción de los respectivos aminoácidos. Los aminoácidos que fueron reemplazados (86 y 89) y sus respectivas secuencias codificantes están indicados en color verde. La secuencia del panel inferior contiene los cambios a incluir: E86K H89G.

La estrategia empleada para realizar estos cambios aminoacídicos fue la misma estrategia descrita en la sección 3.3.1.; así, las variantes se construyen tal y como se describe en la Figura 20. En la obtención de los Fragmentos “F7”, se utilizaron como plantillas a los plásmidos que contienen los ADNc de las diferentes variantes de ferritina (p416GPD-sH1, p416GPD-sH1hp) y los iniciadores “a” y “bFRX” para la amplificación (Tabla 5 y Figura 20). Este último (bFRX), contiene 20 nucleótidos homólogos al plásmido para la amplificación (parte final del iniciador), 6 nucleótidos (en rojo) que corresponden a la secuencia a reemplazar, y 40 nucleótidos homólogos a la secuencia del fragmento “F8”, que sirvieron para ensamblar los fragmentos “F7” y “F8” junto con el plásmido p416GPD mediante recombinación homóloga. Para la obtención de los Fragmentos “F8”, se utilizaron los mismos plásmidos (que contiene cada uno el ADNc de sH1, sH1hp) como plantilla y los iniciadores “cFRX” y “d” que contienen secuencias homólogas al fragmento “F7” y al plásmido.

Los iniciadores diseñados y empleados para esta parte se indican en la Tabla 5. Los iniciadores fueron sintetizados por la compañía MACROGEN INC (Seul, Corea).

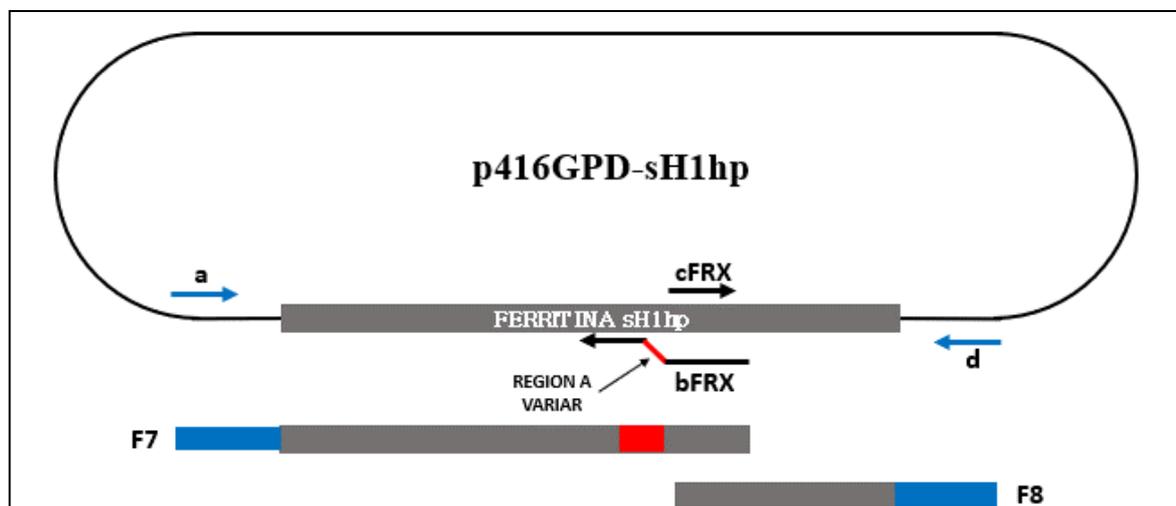


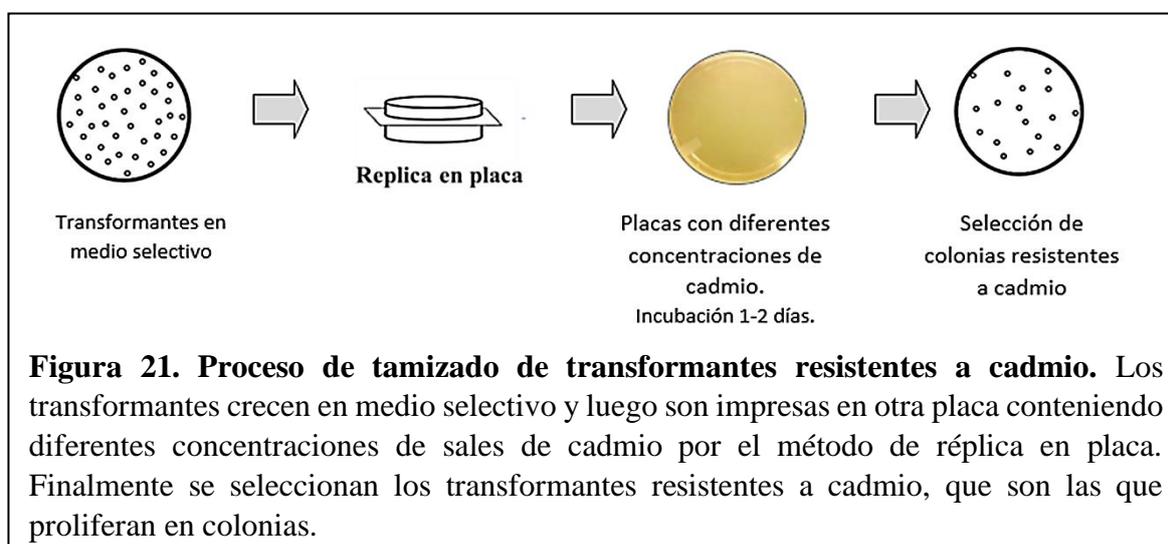
Figura 20. Estrategia seguida para la generación de la variante sH1hp sin actividad ferroxidasa (sH1hp-Δfrx). Las flechas “a” y “bFRX” representan a los iniciadores empleados para amplificar el fragmento “F7”, el cual incluye las secuencias que generan los cambios E86K y H89G (en rojo). Las flechas “cFRX” y “d” representan a los iniciadores empleados para amplificar el fragmento “F8”. Ambos fragmentos incluyen las secuencias homólogas para permitir la recombinación entre ellos y con el plásmido linealizado (azul), para el proceso de ensamblaje y clonación *in vivo* en la levadura. *Fuente: Elaboración propia (2023)*

3.3.4. Transformación de *Saccharomyces cerevisiae*

Se utilizó una suspensión de células de una cepa que carece del gen *YAP1* (cepa susceptible a cadmio) en la fase exponencial de su crecimiento. Se empleó un protocolo similar al empleado en la tesis de Gutiérrez (2023), así, se utilizaron 150 ng de plásmido p416GPD linealizado previamente, 30 ng del fragmento “F1”(o “F3”) y 10 ng del fragmento “F2” (o “F4”). Las suspensiones celulares fueron tratadas con acetato de litio/TE y 50 por ciento de polietilenglicol durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación constante. A continuación, se aplicó un choque térmico en un baño María a 42 °C durante 20 minutos y después de recuperar el sedimento celular por centrifugación, se añadió caldo YPD, se homogenizó e incubó por una hora a temperatura ambiente. Finalmente, las células tratadas fueron sembradas en medio sintético que carece de uracilo (-Ura) para permitir el crecimiento y selección de los transformantes (Schiestl y Gietz 1989).

3.3.5. Tamizado de la biblioteca de variantes de ferritina

Las células transformadas con la biblioteca de variantes de ferritina fueron sembradas en un medio sintético que carece de uracilo (-Ura), luego se realizaron réplicas en placa, utilizando medio rico (YPD) con una concentración de cloruro de cadmio de 75 μM (Figura 21). Se utilizó esta concentración ya que, en estudios previos con cepas sensibles a cadmio (*yap1*), se ha evidenciado crecimiento hasta 60 μM CdCl_2 (Gomes *et al.* 2002). Después de algunos días de incubación, se seleccionaron aquellos transformantes que formaron colonias, debido a una mayor resistencia a cadmio. Se tomó en cuenta la especificidad de las colonias resistentes a cadmio, verificando que su crecimiento en medio conteniendo hierro sea igual o menor a los controles (ferritina nativa). Por tanto, la fuerza de selección fue la resistencia a cadmio.



3.3.6. Análisis de plásmidos

a. Extracción de ADN total de levaduras transformantes.

Se realizó la extracción del ADN total a partir de las suspensiones de células de levadura, de acuerdo con protocolos de estudios previos (Gutiérrez 2021). Se empleó un buffer de ruptura (1.2 por ciento de SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA), asistido con una mezcla vigorosa con perlas de vidrio de 0,4 mm de diámetro en presencia de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) usando un agitador de vórtice. El sobrenadante acuoso se recuperó por centrifugación y luego se trató con etanol para la precipitación y lavado de los ácidos nucleicos. El sedimento seco que contenía los ácidos nucleicos totales fue disuelto en buffer TE (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA) (Schneegurt & Dore 2003).

b. Amplificación y recuperación de los plásmidos en *E. coli*

Se emplearon las muestras de ADN total que incluían los plásmidos para transformar la cepa TOP10 de *Escherichia coli* por electroporación. El protocolo empleado fue similar al de Gutiérrez (2023). Para la preparación de las células electrocompetentes, las células obtenidas por un cultivo de 16 a 18 horas fueron sometidas a 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 mezcló 40 μ L de la suspensión celular con 1 μ L de la solución de ADN total recuperado de la levadura, transfiriéndose la mezcla a una cubeta de electroporación de ranura de 1mm para someterla a un pulso eléctrico de 1700 V. 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 células transformadas expresaban el gen que codifica para la beta-lactamasa, presente en el plásmido p416GPD, lo cual permitió que proliferen y formen colonias en un medio de cultivo con el antibiótico ampicilina.

Las colonias transformantes de *E. coli* fueron cultivadas en caldo LB-Ampicilina para lograr la amplificación y purificación de los plásmidos. El método usado se basó en cambios de pH para la eliminación del ADN genómico, la adición de la mezcla acetato de potasio 5 M con una solución de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (proporción 7:3), y la precipitación del ADN plasmídico con alcohol etílico helado. Los sedimentos de ácidos nucleicos obtenidos

fueron disueltos en 50 μL de buffer TE que contenían 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ribonucleasa A y finalmente fueron llevados a incubación por 30 minutos a 37°C.

c. Evaluación de la resistencia a cadmio y hierro

Se utilizaron cultivos de transformantes de levadura $P_{\text{GPD}} > SMFI$ que estuvieron incubados en tubos con 4 mL de caldo –Ura a 30 °C y agitación constante, hasta llegar a la fase estacionaria de su crecimiento. Se utilizó esta cepa de levadura para las transformaciones debido a su capacidad para permitir la entrada de más iones de cadmio en las células de levadura y así reportar los efectos de las variantes de ferritina en la resistencia y captación de cadmio (Sun *et al.* 2019). Los cultivos de las diferentes cepas fueron tratados con ultrasonido antes de sus diluciones, para poder separar los agregados celulares. Así, los cultivos se diluyeron en serie 1/3 en placas de 96 pocillos con agua destilada estéril. Finalmente, los cultivos diluidos se sembraron en alícuotas de 3 μL en medio sólido YPD que contenían cloruro de cadmio 60 μM y en medio sólido –Ura que contenían cloruro férrico 3 mM.

d. Secuenciación de plásmidos

Los plásmidos de interés fueron purificados usando “Zyppy Plasmid Miniprep kit” (Zymo Research) y enviados para su secuenciamiento a la compañía MACROGEN INC. La secuenciación contempló solo la región clonada en el plásmido, para ello se emplearon cebadores específicos para las reacciones correspondientes.

3.3.7. Fraccionamiento de las variantes de ferritina y análisis por SDS-PAGE

Se realizó un fraccionamiento de las variantes de ferritina partiendo de extractos proteicos de transformantes de levadura $P_{\text{GPD}} > SMFI$, tal y como se ha reportado por un estudio previo (de Llanos *et al.* 2016). Primero, se recolectaron células de cultivos de 100 mL con una densidad óptica de 1,0 y se lavaron dos veces con agua destilada y una vez con tampón PBS. A continuación, las células se resuspendieron en 800 μL de tampón PBS y se rompieron con agitación vigorosa utilizando un vórtex en presencia de perlas de vidrio de 1 mm de diámetro. Los productos de la lisis se centrifugaron durante 3 min a $10\,000 \times g$ a 4 °C y los sobrenadantes se transfirieron a tubos nuevos. Dado que la ferritina es una proteína termoestable, desnaturalizada solo si es sometida a temperaturas mayores a 80 °C por al menos 30 minutos (Zhang *et al.* 2019), se pudo purificar parcialmente calentando el extracto

crudo a 75 °C durante 15 minutos. Las proteínas precipitadas se eliminaron por centrifugación y los sobrenadantes transparentes se transfirieron a tubos nuevos, cuyas concentraciones de proteína se determinaron utilizando el kit *Precision red* (ADV02, Cytoskeleton). Para esta cuantificación se elaboró previamente una curva de calibración utilizando soluciones estándar de seroalbúmina bovina (BSA) en tampón PBS, para establecer una correlación entre concentración de proteínas y absorbancias. Una vez determinadas las concentraciones, se resolvieron diez microgramos de proteínas termoestables mediante SDS-PAGE al 14 por ciento en condiciones desnaturalizantes. Finalmente, el gel se tiñó para la visualización de proteínas utilizando azul de Coomassie brillante al 0,08 por ciento.

3.3.8. Cuantificación de los niveles de remoción de cadmio

Se cuantificó la remoción y captación de cadmio por las cepas de levadura que expresan las variantes sH1 seleccionadas. Se trabajó con cultivos de transformantes $P_{GPD}>SMFI$ expuestos a una concentración de 100 μM CdCl_2 . Durante un lapso de 24 horas, se tomaron muestras a diferentes horas, estas fueron centrifugadas para luego cuantificar los cambios en la concentración de cadmio en el sobrenadante. De esta manera, los niveles de remoción expresados como porcentajes se calcularon por la diferencia entre el cadmio inicial y el cadmio residual todavía presente en el medio después de un período de tiempo. Para la cuantificación se empleó el método colorimétrico de la ditizona (Ganotes *et al.* 1962). Este ensayo consiste en la formación de un complejo cadmio-ditizona en medio básico, para luego ser extraído con cloroformo y leer las absorbancias a 522 nm. Este método cuantifica un rango amplio de concentración de cadmio en solución: 0.0005 mg/L – 2mg/L (0.05 μM - 200 μM). Previo a la cuantificación de cadmio en los sobrenadantes mediante lectura de absorbancias, se generó una curva de calibración con soluciones estándar de cadmio en caldo YPD, que es el medio de cultivo utilizado para los ensayos de remoción. Como blanco se empleó caldo YPD (sin cadmio) con la adición de los reactivos (NaOH, ditizona, cloroformo).

3.3.9. Cuantificación de contenido de cadmio y hierro en extractos de proteína termoestable

Al ser la ferritina una proteína termoestable (Zhang *et al.* 2019), se cuantificó el contenido de cadmio y hierro en extractos de proteína termoestable obtenidos a partir de la biomasa de transformantes de levadura $P_{GPD}>SMFI$ que expresan las variantes sH1. Se trabajaron con cultivos expuestos a cadmio (100 μM CdCl_2) y hierro (2 mM FeCl_3), para comparar la selectividad de las variantes por ambos metales. Durante un lapso de 12 horas, se tomaron muestras a diferentes horas, la biomasa recolectada pasó por varios lavados para después ser sometida a una lisis celular; luego de una centrifugación, se recuperó el sobrenadante, o extracto crudo de proteínas totales. Este extracto fue sometido a un tratamiento térmico a 75 °C por 15 minutos, después de una centrifugación, se recuperó el sobrenadante, o extracto de proteínas termoestables. Con ello se cuantificó el contenido de proteínas mediante el método descrito en la sección 3.3.7.

Por otro lado, el contenido de cadmio se determinó con el método colorimétrico de la ditizona (Ganotes *et al.* 1962), con un paso previo de acidificación de la ferritina por adición de tampón acetato [pH = 4,8], para liberar los iones de cadmio del complejo proteico. Para la cuantificación de cadmio en los extractos mediante absorbancias, se generó una curva de calibración con soluciones estándar de cadmio en tampón PBS, empleándose como concentraciones patrón 15, 30, 45, 60 y 75 μM CdCl_2 . El método de cuantificación se basó en la reacción del cadmio presente en los extractos con la ditizona en medio básico (adición de NaOH 1N), para generar un complejo de color rojo, el cual se extrajo con cloroformo. Para la reacción colorimétrica se empleó 10 μg de proteína termoestable, 500 μL de solución de ditizona al 1 por ciento, 10 μL de NaOH 1N, 25 μL de solución de clorhidrato de hidroxilamina al 20 por ciento y 1000 μL de cloroformo. El producto de reacción se cuantificó colorimétricamente a una longitud de onda de 522 nm, utilizándose como blanco tampón PBS con la adición de los reactivos.

Para la determinación del contenido de hierro, se utilizó el método colorimétrico de la ferrozina (Tamarit *et al.* 2006), basado en la formación de un complejo de hierro reducido en medio ácido, de color magenta. Para la cuantificación de hierro en los extractos mediante absorbancias, se generó una curva de calibración con soluciones estándar de hierro en tampón PBS. Para la reacción colorimétrica se empleó 10 μg de proteína termoestable, 850 μL de tampón acetato [pH = 4,8], 80 μL de ascorbato de sodio (500 mM) y 64 μL de ferrozina (17 mg/mL). El producto se cuantificó a una longitud de onda de 565 nm.

Los análisis relacionados con el extracto de proteínas termoestables proveniente de la cepa que solo expresa el plásmido vacío (control) representaron las concentraciones basales de metales en levadura sin expresión de ferritina.

3.3.10. Análisis estadísticos

Respecto a las determinaciones cuantitativas, cada ensayo se realizó por triplicado, con muestras biológicas obtenidas en días diferentes. Se realizaron los análisis estadísticos pertinentes para obtener promedios, desviaciones estándar, análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias con la prueba de Tukey, considerando un nivel de significancia de 0.05. Estos análisis fueron realizados con el programa Minitab®. Además, para las cuantificaciones de la remoción de cadmio, se tuvieron como controles correspondientes a la cepa que expresa solo el plásmido vacío y la cepa que expresa la ferritina de soya nativa. Para las determinaciones de cadmio y hierro en extractos de proteína termoestable, se tuvieron como controles correspondientes a los extractos proteicos obtenidos de las cepas que expresan solo el plásmido vacío y de la cepa que expresa la ferritina de soya nativa.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

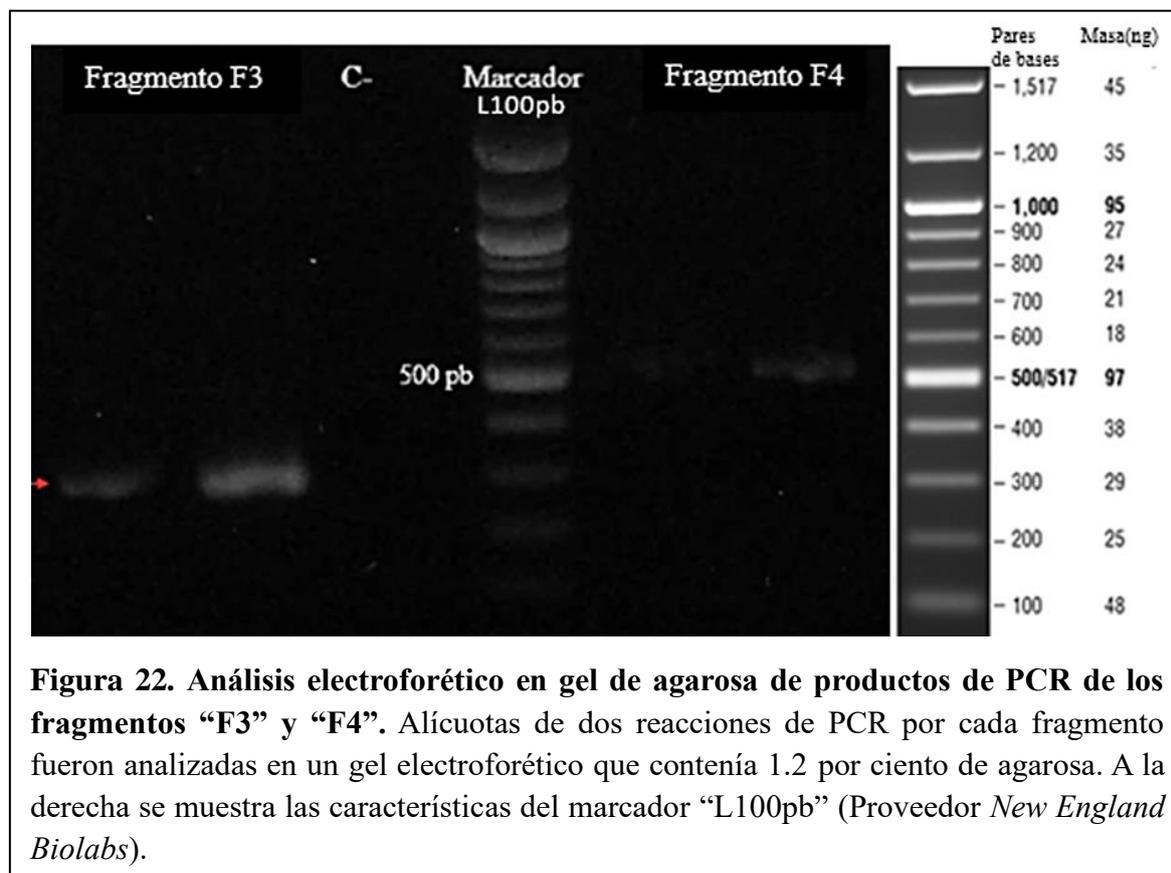
4.1. OBTENCIÓN DE LA VARIANTE DE FERRITINA sH1hp

Con la información disponible sobre la ferritina de soya fue posible realizar un análisis detallado acerca de su secuencia, dominios y las funciones que desempeñan (Masuda *et al.* 2010). De esta manera, se alinearon las secuencias aminoacídicas de las ferritinas de soya, arveja y caballo (Figura 11), encontrándose muchas regiones conservadas, y también se encontró una zona de variabilidad conformada por cinco aminoácidos (155 a 159) que forman parte del canal hidrofílico encargado de la entrada del hierro al complejo multimérico. Asimismo, la ferritina de caballo (subunidad L) y la subunidad H1 de la ferritina de soya (sH1) exhiben solo un 44.3 por ciento de identidad, encontrándose varias diferencias en las secuencias. Contando con la estructura tridimensional de la ferritina de caballo (código de acceso 1AEW en *Protein Data Bank*), se pudo verificar que dos residuos presentes solo en la subunidad L de la ferritina de caballo son capaces de coordinar iones de cadmio (E44 y C47). Con este análisis se planteó la incorporación de cambios aminoacídicos en la secuencia de la ferritina de soya (sH1), para dar lugar a una variante híbrida denominada sH1hp. El plásmido conteniendo la variante de ferritina híbrida soya-arveja, construida en una tesis desarrollada en nuestro laboratorio (Gutiérrez 2023), se empleó como plantilla para introducir los cambios aminoacídicos de la ferritina de caballo y producir la variante sH1hp. Para ejecutar estos cambios o mutaciones, se empleó una estrategia basada en la amplificación por PCR de dos fragmentos de ADN: “F3” y “F4”, ambos contienen los cambios nucleotídicos y juntos conforman la secuencia codificante de la variante sH1hp. Luego, estos fragmentos fueron ensamblados junto al plásmido p416GPD mediante clonación *in vivo* y recombinación homóloga.

4.1.1. Obtención de los fragmentos a clonar mediante PCR

La amplificación de los fragmentos “F3” y “F4”, que unidos darán lugar a la variante de ferritina sH1hp, fue confirmada mediante análisis electroforético en un gel de agarosa al 1.2 por ciento. La estimación se infiere a través del marcador “L100pb” que muestra tamaños conocidos en las diferentes bandas. Como se muestra en la Figura 22, el fragmento “F3”

tiene una longitud aproximada de 322 pb, y el fragmento “F4” una longitud de 512 pb, los cuales son los tamaños esperados.



4.1.2. Clonación *in vivo*

La Figura 23 muestra resultados representativos de varios ensayos de transformación. En promedio se obtuvo una eficiencia de transformación de 3.2×10^4 UFC/ μ g de ADN para las células que fueron tratadas con el plásmido linealizado y los fragmentos (panel a), y 0.2×10^4 UFC/ μ g de ADN para las que recibieron solo el plásmido p416GPD linealizado (control). Esta diferencia demuestra una alta eficiencia para la clonación *in vivo*, ya que solo la presencia de los fragmentos F3 y F4 en las mezclas de transformación podrían permitir el ensamblaje correcto del plásmido y la eventual expresión de la variante sH1hp. Así, se pudo deducir que más del 90 por ciento de las colonias obtenidas incluían a plásmidos con la variante de ferritina deseada.

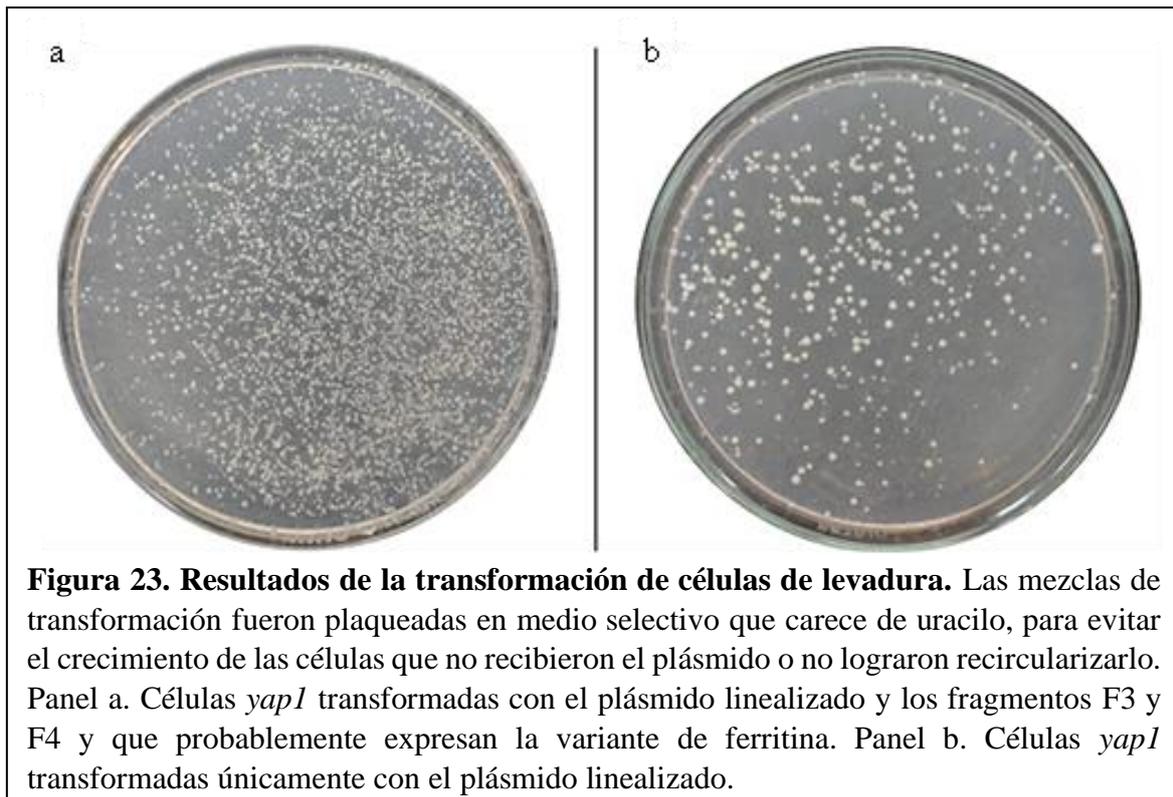


Figura 23. Resultados de la transformación de células de levadura. Las mezclas de transformación fueron plaqueadas en medio selectivo que carece de uracilo, para evitar el crecimiento de las células que no recibieron el plásmido o no lograron recircularizarlo. Panel a. Células *yap1* transformadas con el plásmido linealizado y los fragmentos F3 y F4 y que probablemente expresan la variante de ferritina. Panel b. Células *yap1* transformadas únicamente con el plásmido linealizado.

4.1.3. Análisis de los transformantes que producen la variante sH1hp

a. Digestión de plásmidos

Del análisis de los transformantes se espera que cada uno de ellos albergue el plásmido conteniendo ambos fragmentos “F3” y “F4”, que ensamblados representan la variante de ferritina, con un tamaño esperado de 720 pb. Así, para verificar la clonación de ambos productos de PCR, se escogieron al azar dos colonias transformantes de la Figura 23a. Los plásmidos extraídos y amplificados de las colonias escogidas se digirieron con la enzima de restricción *BamH1*. Como se muestra en la Figura 24, el gel electroforético que contiene 0,8 por ciento de agarosa mostró que la colonia “1” contenía una sola banda y con un tamaño aproximado de 6500 pb, mayor al plásmido p416GPD digerido “control” (5778 pb). En la colonia “2” aparentemente la digestión fue parcial. En el gel electroforético se utilizó el marcador “L1Kb” que contiene diez fragmentos de ADN de extremos que varían de 500 pb a 10 kilobases (kb), para verificar los tamaños de los productos digeridos.

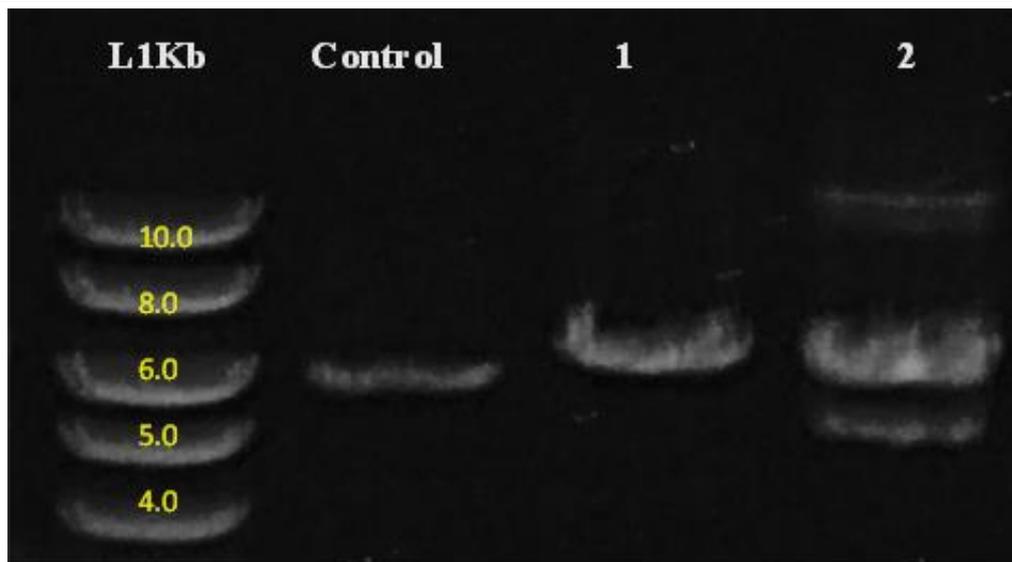
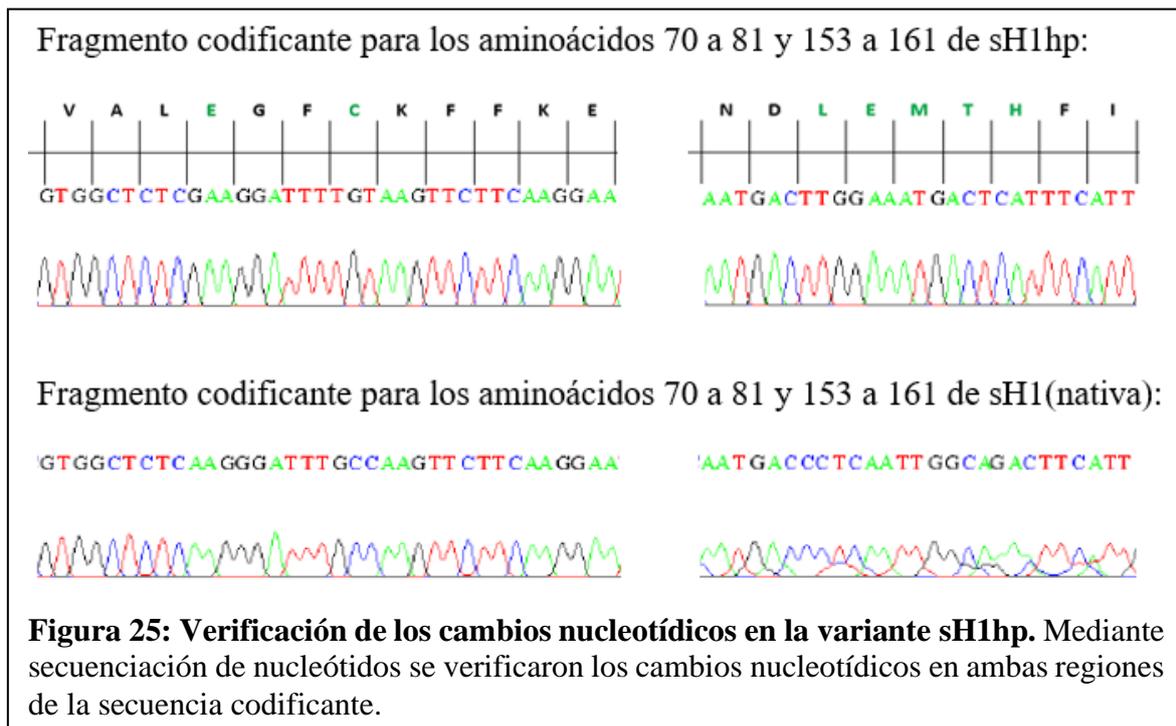


Figura 24: Análisis electroforético en gel de agarosa de plásmidos que contienen la variante de ferritina. Control: plásmido p416GPD digerido que muestra un tamaño cercano a 6.0 kb, según el marcador L1Kb. sH1hp (1 y 2): plásmidos digeridos de las colonias escogidas al azar muestran un tamaño superior a 6.0 kb. L1Kb: marcador de 1 kb. La digestión fue realizada con la enzima de restricción *BamH1*.

b. Secuenciación de los plásmidos.

La secuenciación realizada por MACROGEN INC (Anexo 1) confirmó que los cambios realizados en las dos regiones de la secuencia se realizaron con éxito en el plásmido seleccionado (Figura 25). Este análisis demostró un 100 por ciento de eficiencia en la estrategia de clonación *in vivo* aplicada, con la totalidad de las secuencias esperadas.



también parecen mejorar la asociación a cadmio, lo cual es consistente con un estudio anterior (Granier *et al.* 1998).

4.3. CONSTRUCCIÓN DE UNA BIBLIOTECA DE PLÁSMIDOS PARA LA GENERACION DE VARIANTES ALEATORIAS DE LA SUBUNIDAD H1 DE LA FERRITINA DE SOYA.

Con la finalidad de identificar variantes de sH1 con mayor selectividad por cadmio, la región hidrofílica de cinco aminoácidos fue sometida a mutagénesis aleatoria, construyéndose una biblioteca de plásmidos. Así, esta biblioteca construida permite la inclusión de aminoácidos aleatorios en cada una de las cinco posiciones (155 a 159), lo que podría dar lugar por tanto a la síntesis de 3,2 millones (20^5) de variantes de sH1 posibles. Para esta construcción, se empleó la estrategia explicada en la sección 3.3.2., con la generación de los fragmentos “F5” y “F6”, para su posterior ensamblaje junto al plásmido p416GPD mediante clonación *in vivo*.

a. Generación de variantes de ferritina por PCR

Como se describió en las figuras 16 y 18, para la generación de la biblioteca de plásmidos se usaron fragmentos “F5” contruidos con el iniciador “bR”. Para las amplificaciones se

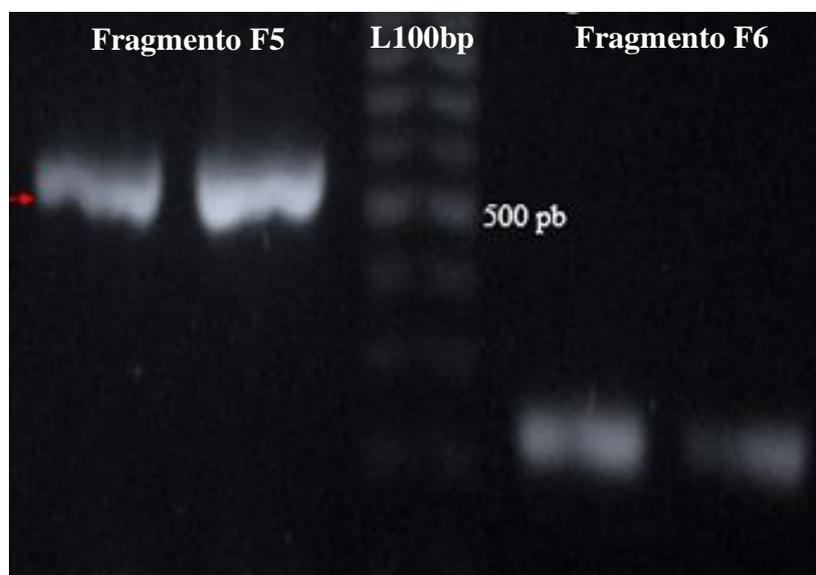


Figura 27. Análisis electroforético de productos de PCR de los fragmentos “F5” y “F6” para la construcción de variantes aleatorias de sH1. En la parte izquierda se muestran amplificaciones del Frag. “F5” utilizando el iniciador “bR” y a la derecha las amplificaciones del Frag. “F6”. Se utilizó un gel electroforético con 1.2 por ciento de agarosa. L100pb: marcador de 100 pb. La longitud del Frag. “F5” fue de 568 pb y para el Frag. “F6” fue de 236 pb. Cada carril contiene 2 μ L de la reacción total.

emplearon 15 ciclos de PCR. Los tamaños esperados para el fragmento “F5” o con la variación aleatoria es de 568 pb, mientras que para el fragmento “F6” el tamaño esperado es de 236 pb, este fragmento “F6” unido a “F5” permitió completar la secuencia codificante de las variantes de ferritina. En la Figura 27 se muestran las bandas obtenidas para cada fragmento.

b. Transformación de levaduras con la biblioteca de plásmidos

Luego de la obtención de los fragmentos “F5” y “F6”, se prepararon alícuotas con concentraciones adecuadas para cada reacción de transformación. Se utilizaron 150 ng del plásmido p416GPD linealizado, 10 ng del fragmento “F6” y 35 ng del fragmento “F5”. Para verificar la eficiencia de la transformación y clonación *in vivo*, se realizaron un total de cinco reacciones de transformación, obteniéndose una eficiencia de transformación de 1.8×10^4 UFC/ μg de ADN, esto para las células que fueron tratadas con el plásmido lineal y los fragmentos “F5” y “F6” (Figura 28, panel a), y 0.5×10^4 UFC/ μg de ADN para las que recibieron solo el plásmido p416GPD linealizado (control).

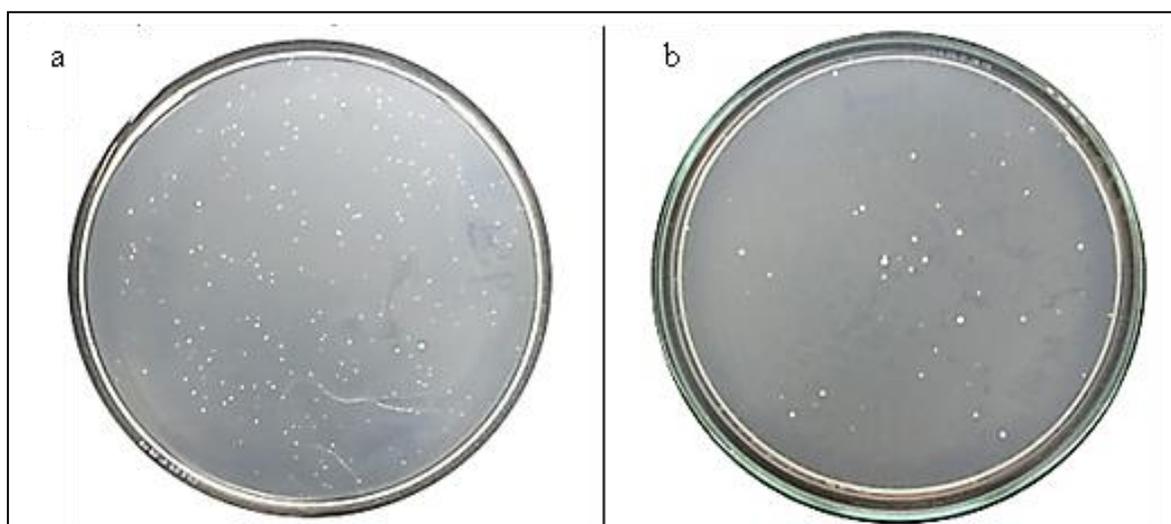
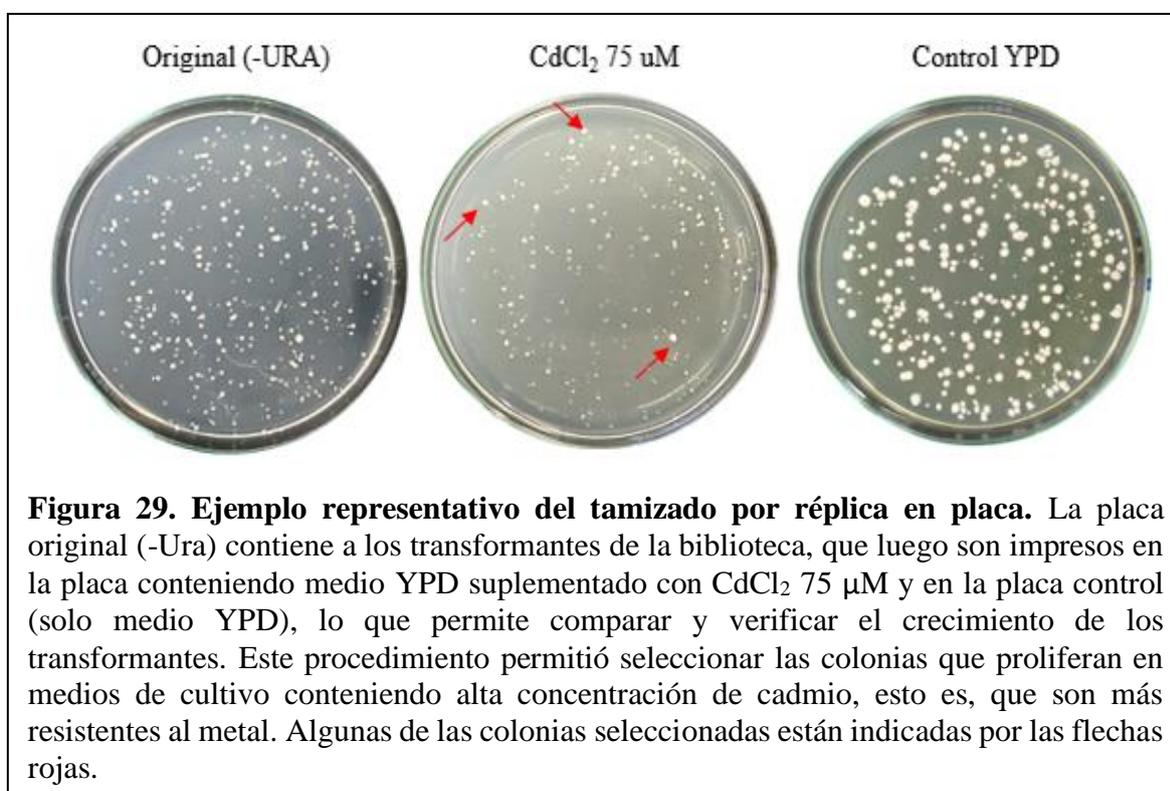


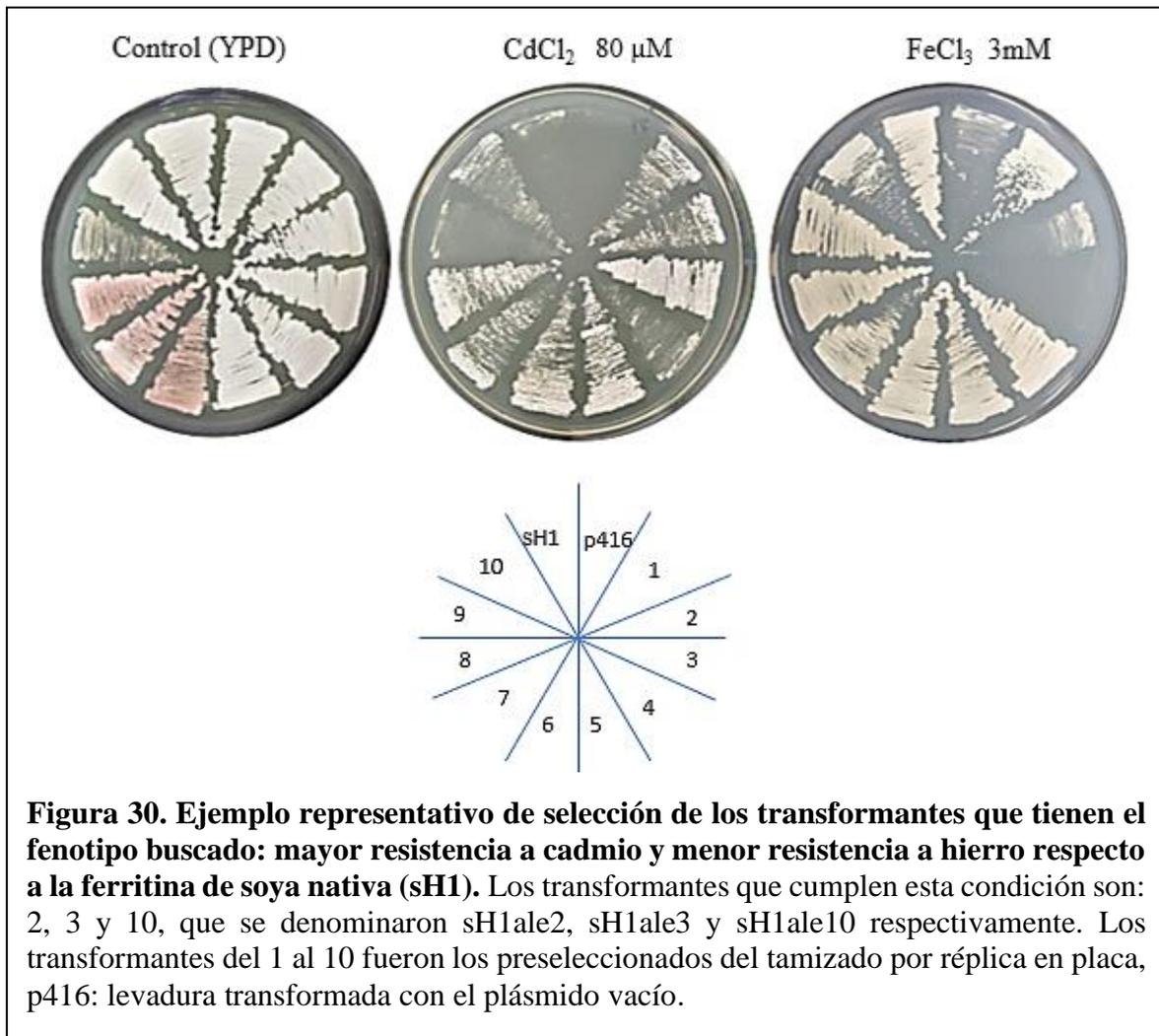
Figura 28. Ejemplo representativo de resultados de la transformación y generación de la biblioteca de variantes. Las mezclas de transformación fueron plaqueadas en medio selectivo que carece de uracilo, para evitar el crecimiento de las células que no recibieron el plásmido o no lograron recircularizarlo. Panel a. Células *yap1* transformadas con el plásmido linealizado y los fragmentos F5 y F6, y que probablemente expresan una variante de ferritina. Panel b. Células *yap1* transformadas únicamente con el plásmido linealizado.

4.4. TAMIZADO DE LA BIBLIOTECA Y SELECCIÓN DE VARIANTES CON AFINIDAD PARA CADMIO

Una vez generada la biblioteca de variantes de ferritina de soya, se empleó como estrategia de tamizado el procedimiento de réplica en placa, para obtener la mayor cantidad posible de candidatos (variantes de ferritina) que promuevan una mayor asociación a cadmio en levadura, basadas en su capacidad de proliferar y formar colonias en medios conteniendo altas concentraciones de cadmio (Figura 29). De esta manera, se realizaron varias rondas de tamizado, hasta identificar candidatos que mostraban el fenotipo buscado. Aproximadamente cinco mil transformantes fueron tamizados, y los seleccionados luego fueron caracterizados, para análisis posteriores.



Una vez identificados los posibles candidatos, el paso siguiente en la selección consistió en realizar inoculaciones en parches simultáneos de cada transformante en una placa conteniendo cadmio (80 μM CdCl_2) y en otra conteniendo hierro (3 mM FeCl_3), con la finalidad de evaluar la especificidad de asociación con cadmio respecto al hierro, de los mutantes de ferritina (Figura 30).



Los transformantes inicialmente seleccionados fueron sometidos a extracción y recuperación de los plásmidos contenidos para su análisis, que involucró primero la verificación de la correcta clonación y presencia de la secuencia codificante de ferritina en el plásmido, mediante amplificación por PCR (Figura 31). El tamaño esperado de la amplificación fue de 715 pb.

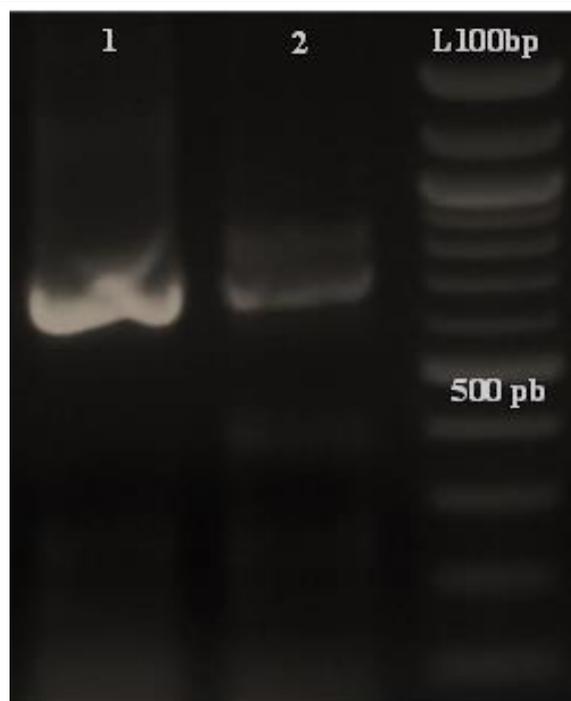


Figura 31: Análisis electroforético en gel de agarosa de plásmidos que contienen variantes de ferritina. Variantes (1 y 2): Amplificación de la secuencia correspondiente al ADNc de ferritina, empleando los plásmidos de las colonias seleccionadas, muestran el tamaño esperado de 715 pb. L100bp: marcador de 100 pb.

Una vez realizada la verificación, se realizaron re-transformaciones con los plásmidos recuperados y se procedió a realizar ensayos de resistencia a cadmio y hierro, para confirmar el fenotipo buscado. Así, los plásmidos seleccionados fueron sometidos a secuenciación de nucleótidos para deducir los aminoácidos responsables de esa mayor selectividad por cadmio.

De las variantes seleccionadas, sH1ale10 resultó tener la misma secuencia nucleotídica de sH1, sin ninguna variación; mientras que sH1ale2 y sH1ale3 resultaron tener la misma secuencia nucleotídica, por lo que se trató de una misma variante de ferritina. Curiosamente, el análisis de secuenciación de nucleótidos (Anexo 2) reveló que esta variante, denominada finalmente sH1trc, tenía dos cambios incorporados en la región (P155L Q156K) y un codón de terminación introducido en la posición 158, lo que resultó en un polipéptido al que le faltaban los últimos 44 residuos. En la Figura 32 se muestra una comparación de la porción de la secuencia para sH1, sH1trc y sH1hp.

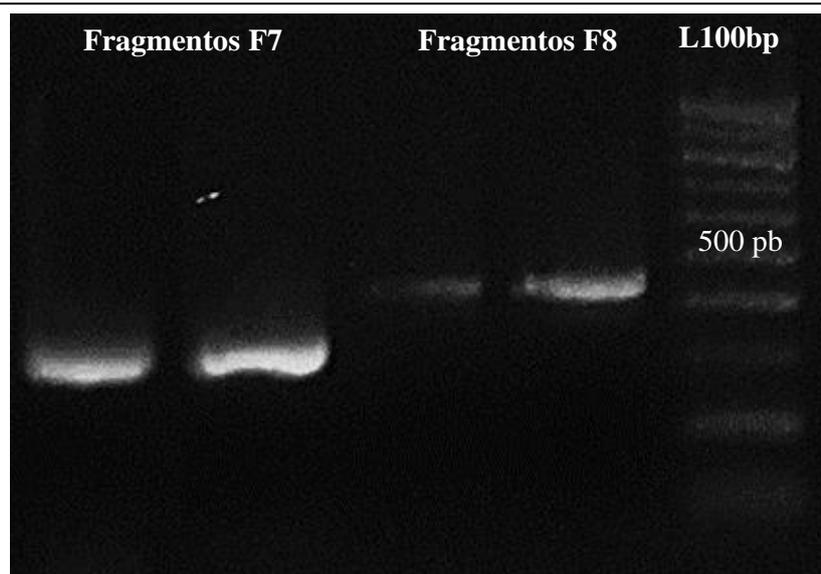


Figura 33. Análisis electroforético de los productos de PCR para generar los fragmentos “F7” y “F8” para la construcción de variantes de ferritina sin actividad ferroxidasa. En la parte izquierda se muestran amplificaciones del Frag. “F7” utilizando el iniciador “bFRX” y a la derecha las amplificaciones del Frag. “F8”. Se utilizó un gel electroforético con 1.2 por ciento de agarosa. L100pb: marcador de 100 pb. La longitud del Frag. “F7” fue de 361 y para el Frag. “F8” fue de 446. Cada carril contiene 2 μ L de la reacción total.

Una vez obtenidos los diferentes fragmentos de ADN conteniendo las mutaciones en el centro de ferroxidasa, se procedió a realizar la clonación *in vivo* para la construcción de tres variantes de ferritina sin actividad ferroxidasa: sH1- Δ frx, sH1hp- Δ frx y sH1trc- Δ frx.

La secuenciación realizada por MACROGEN INC confirmó que los cambios realizados en las dos regiones de la secuencia (3 nucleótidos en cada una) se realizaron con éxito en los plásmidos seleccionados (Anexo 3). Este análisis demostró un 100 por ciento de eficiencia en la estrategia de clonación *in vivo* aplicada, con la totalidad de las secuencias esperadas.

Una vez comprobadas las secuencias y construcciones correctas, las cuales se encuentran resumidas en la Tabla 6, se procedió a evaluar las resistencias al cadmio y al hierro conferidas por todas las variantes de ferritina y los resultados se presentan en la Figura 34.

Para este ensayo y los siguientes se utilizó la cepa $P_{GPD}>SMF1$ para las transformaciones, debido a su capacidad para permitir la entrada de más iones de cadmio en las células de levadura y así reportar los efectos de las variantes de ferritina en la resistencia y captación de cadmio (Sun *et al.* 2019).

Todas las variantes otorgaron una mayor resistencia al cadmio en comparación con la ferritina nativa de soya H1 (sH1) y el control (—). Además, las variantes de ferritina desprovistas de actividad ferroxidasa conferían menor resistencia al hierro en comparación con sus contrapartes con actividad ferroxidasa. La adición combinada de cadmio y hierro al medio afecta drásticamente el crecimiento de las células de levadura y, curiosamente, solo la variante sH1trc-Δfrx permitió un mejor crecimiento que las demás.

Tabla 6. Listado de los cambios introducidos en cada una de las variantes de ferritina construidas

Variante	Cambios
sH1	Ninguno
sH1-Δfrx	E86K H89G
sH1hp	K73E A76C P155L Q156E L157M A158T D159H
sH1hp-Δfrx	E86K H89G K73E A76C P155L Q156E L157M A158T D159H
sH1trc	P155L Q156K A158*
sH1trc-Δfrx	E86K H89G P155L Q156K A158*

A158* representa la introducción de un codón de terminación en esta posición, generando el truncamiento del polipéptido.

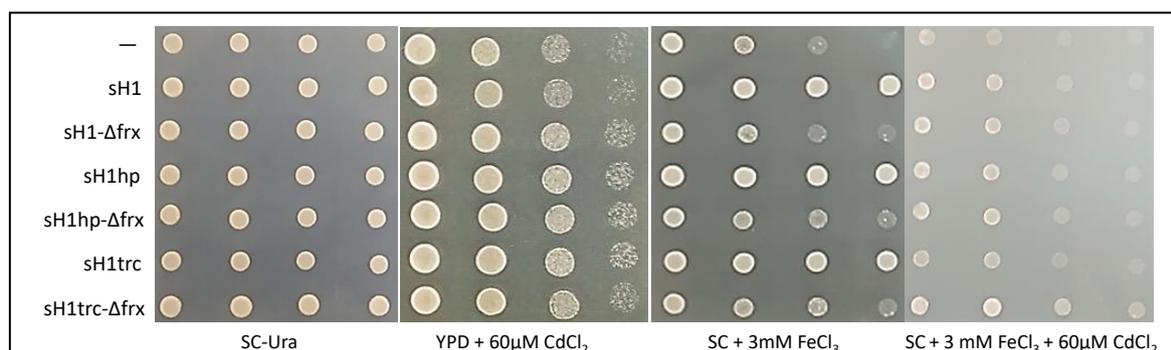
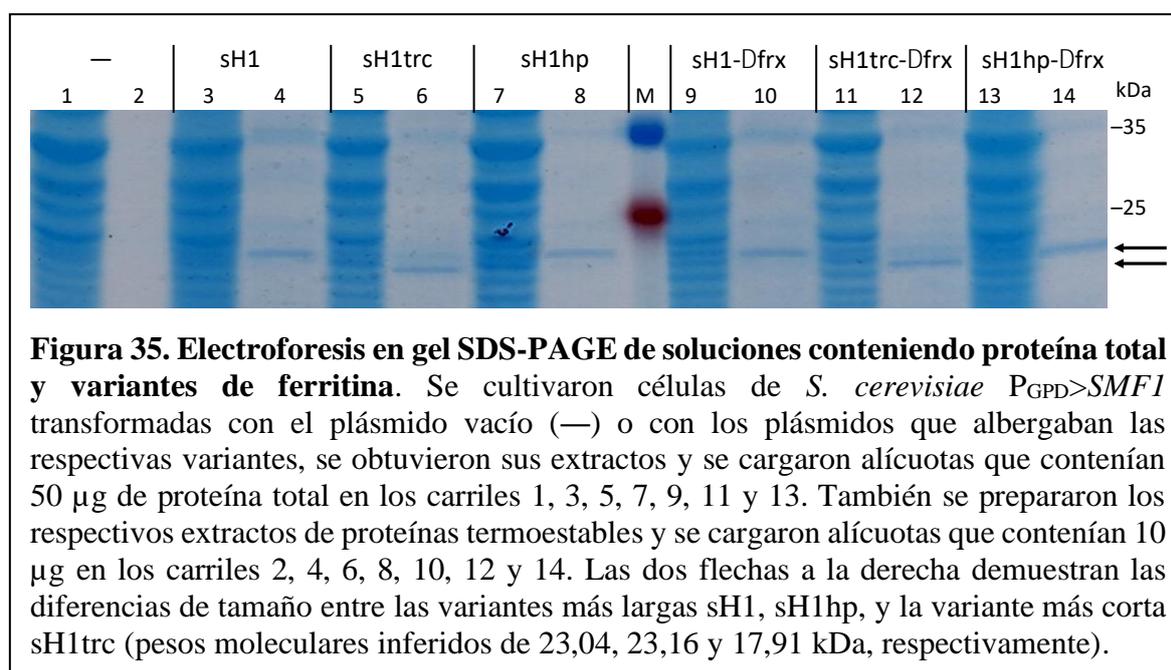


Figura 34. Efectos de la presencia de las variantes de ferritina sobre el crecimiento en medio que contiene cadmio o hierro. Células de *S. cerevisiae* que sobre expresaban *SMFI* fueron transformadas con el plásmido sin inserto (—) o con los plásmidos que albergaban las variantes de ferritina indicadas. Los cultivos de las mismas densidades celulares se diluyeron tres veces en serie y se aplicaron alícuotas de 3 µL de las diluciones en medio (YPD o -Ura) que contenía cadmio y/o hierro, en las concentraciones indicadas.

4.6. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE VARIANTES DE FERRITINA

La expresión de variantes de ferritina en células de levadura se analizó mediante SDS-PAGE al 14 por ciento y se tiñó para la visualización de proteínas, como se muestra en la Figura 35. En ésta se muestra una banda de proteína correspondiente a un peso molecular de

alrededor de 23 kDa para las subunidades de ferritina de soya H1 (sH1) y de las variantes sH1- Δ frx, sH1hp y sH1hp- Δ frx; que es el tamaño esperado de acuerdo con la estimación basada en el número de aminoácidos y en línea con lo descrito en un estudio previo (Masuda et al. 2001). Por otro lado, y como era de esperar del análisis de secuenciación de nucleótidos, para las variantes sH1trc y sH1trc- Δ frx, las bandas de proteína están situadas un poco más abajo en el gel, debido al truncamiento de la proteína en la posición 158. Es importante resaltar que, dado que estas bandas se obtuvieron a partir de extractos de proteínas termoestables, estos resultados demostraron que, en todos los casos, las variantes condujeron a la formación de complejos de ferritina termoestables y aparentemente funcionales.



Como se puede apreciar en la Figura 35, los carriles de las muestras antes del tratamiento térmico (proteínas totales) tienen un contenido de proteína superior a la proporción 5:1 (50 y 10 μ g, respectivamente). Esto se puede explicar por la presencia de algunas bandas adicionales a las correspondientes a las subunidades de ferritina señaladas en la Figura 35. De acuerdo con estudios previos (Shin *et al.* 2001; Kim *et al.* 2003), en ensayos de expresión de ferritina basados en SDS-PAGE, además de las subunidades individuales de ferritina (monómeros) pueden verse bandas adicionales de mayor peso molecular, que podrían corresponder a la sinergia de dos o más monómeros de ferritina. Debido a la naturaleza termoestable de la ferritina como complejo multimérico, su desnaturalización completa no es tan sencilla de llevarse a cabo con tratamientos térmicos ni con agentes desnaturizantes como el SDS (Jiang *et al.* 2020). Por esta razón, estudios previos han empleado tratamientos más agresivos, como el uso de úrea y/o temperaturas mayores de calentamiento, para

desnaturalizar la ferritina hasta sus subunidades individuales (Liu, Jin & Theil 2003; Yu *et al.* 2019; Jiang *et al.* 2020).

4.7. CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE REMOCIÓN DE CADMIO POR LEVADURAS QUE PRODUCEN LAS VARIANTES DE FERRITINA

Se cuantificaron los niveles de remoción de cadmio, expuestas a una concentración de 100 μM de CdCl_2 , en las cepas de levadura que expresan las variantes de ferritina seleccionadas, las cuales conferían a la levadura mayor resistencia a cadmio. Además, se evaluaron las cepas de levadura que expresan la ferritina de soya nativa (sH1) y la que expresa el plásmido vacío (control). El nivel de remoción en cada caso se expresó como porcentaje de cadmio removido, el cual se calculó por la diferencia entre el cadmio inicial y el cadmio residual todavía presente en el medio después de un período de tiempo. Las cuantificaciones fueron realizadas por triplicado, con muestras biológicas colectadas en diferentes días. Los análisis de significancia correspondientes fueron hechos con el programa Minitab®, cuyos resultados se muestran en el Anexo 4.

Los resultados se presentan en la Tabla 7 y Figura 36, mostrando que, en los diferentes tiempos evaluados, las cepas que expresan las variantes sH1hp y sH1trc son capaces de remover mayores porcentajes de cadmio respecto al control (—) y la cepa de levadura que expresa la ferritina de soya nativa (sH1). Además, también se evaluaron los niveles de crecimiento de las diferentes cepas (Figura 37), analizadas mediante lecturas de densidad óptica a 600nm (DO_{600}). Así se determinó que, las células que expresaban las variantes sH1hp y sH1trc (con o sin actividad ferroxidasa) mostraron un mejor crecimiento en comparación con los controles. La remoción para estas cepas alcanza porcentajes de hasta el 80 por ciento para tiempos de exposición de 12 y 24 horas. Se concluye así que estas variantes le confieren a la levadura mayor capacidad de acumulación y remoción de cadmio del medio.

Tabla 7. Niveles de remoción de cadmio del medio por las cepas de levadura que expresan las diferentes variantes de ferritina. Los análisis fueron realizados por triplicado. Las variantes resaltadas de amarillo son las que promueven significativamente mayor remoción de cadmio del medio comparado a los controles (plásmido vacío y sH1)

	2 horas			4 horas			6 horas		
Plásmido vacío	6.4	13.5	5.9	10.2	16.2	10.0	19.2	24.1	19.4
sH1	17.5	27.4	24.5	27.9	32.7	27.8	34.8	54.4	34.6
sH1-Δfrx	19.4	28.7	27.8	29.5	33.3	29.7	39.7	55.8	39.4
sH1hp	22.3	32.0	29.5	33.4	44.5	33.2	41.6	60.4	41.5
sH1hp-Δfrx	24.7	33.3	32.7	38.9	46.5	38.4	48.5	66.3	50.0
sH1trc	27.6	33.3	30.0	39.1	46.5	38.5	47.5	63.0	47.8
sH1trc-Δfrx	28.3	39.3	33.1	39.2	51.8	38.7	50.0	65.7	49.8
	8 horas			12 horas			24 horas		
Plásmido vacío	30.7	26.7	29.5	33.1	30.0	33.1	37.5	33.3	37.5
sH1	44.5	61.7	44.2	52.6	63.7	49.2	54.8	69.6	61.6
sH1-Δfrx	49.7	62.4	49.2	52.2	65.0	53.9	58.6	70.9	63.7
sH1hp	53.6	68.3	59.9	67.5	74.9	70.9	76.0	78.9	77.7
sH1hp-Δfrx	59.4	74.2	60.6	70.7	81.5	74.1	78.4	83.5	80.5
sH1trc	59.1	65.7	61.3	67.6	73.6	70.5	77.7	82.8	77.5
sH1trc-Δfrx	59.9	71.6	61.8	70.0	79.5	73.4	77.5	84.1	80.5

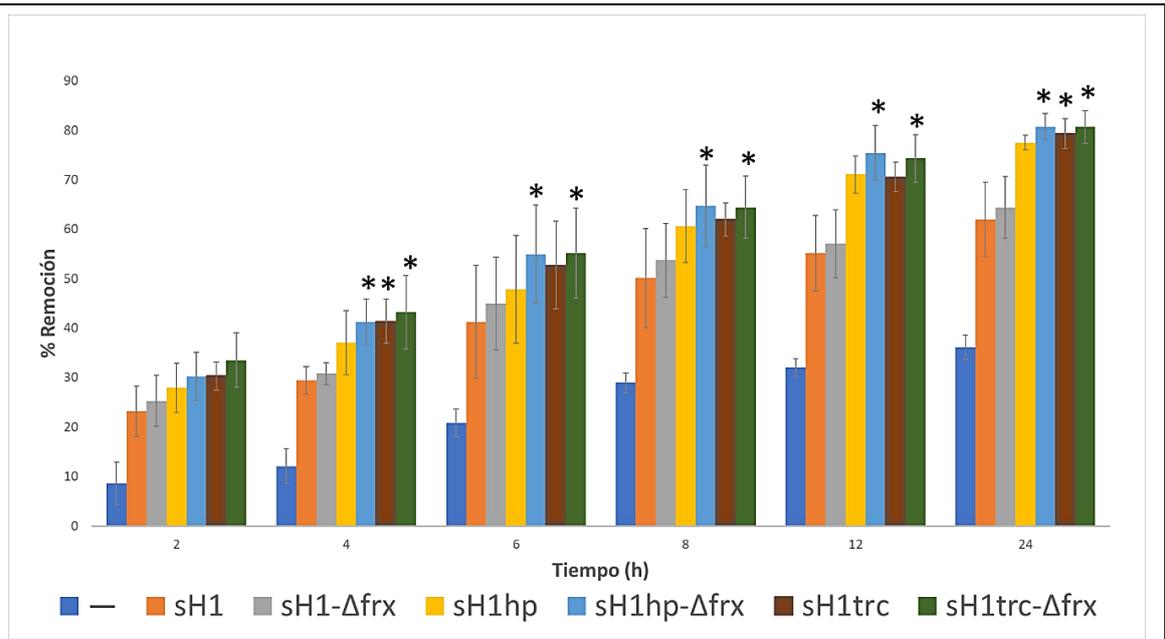


Figura 36. Resultados de los niveles de remoción de cadmio en las cepas de levadura que expresan las variantes de ferritina. La concentración de cadmio en el medio se determinó hasta las 24 horas para cultivos de transformantes $P_{GPD}>SMF1$ expuestos a $100 \mu\text{M}$ de CdCl_2 . El porcentaje de cadmio removido (%Remoción) se calculó por la diferencia entre el cadmio inicial y el cadmio residual todavía presente en el medio después de un período de tiempo. Los asteriscos representan un aumento significativo en la capacidad de remoción en comparación con las cepas que expresan sH1 (con valor $p < 0,05$). Los resultados representan la media \pm desviación estándar, de tres experimentos independientes.

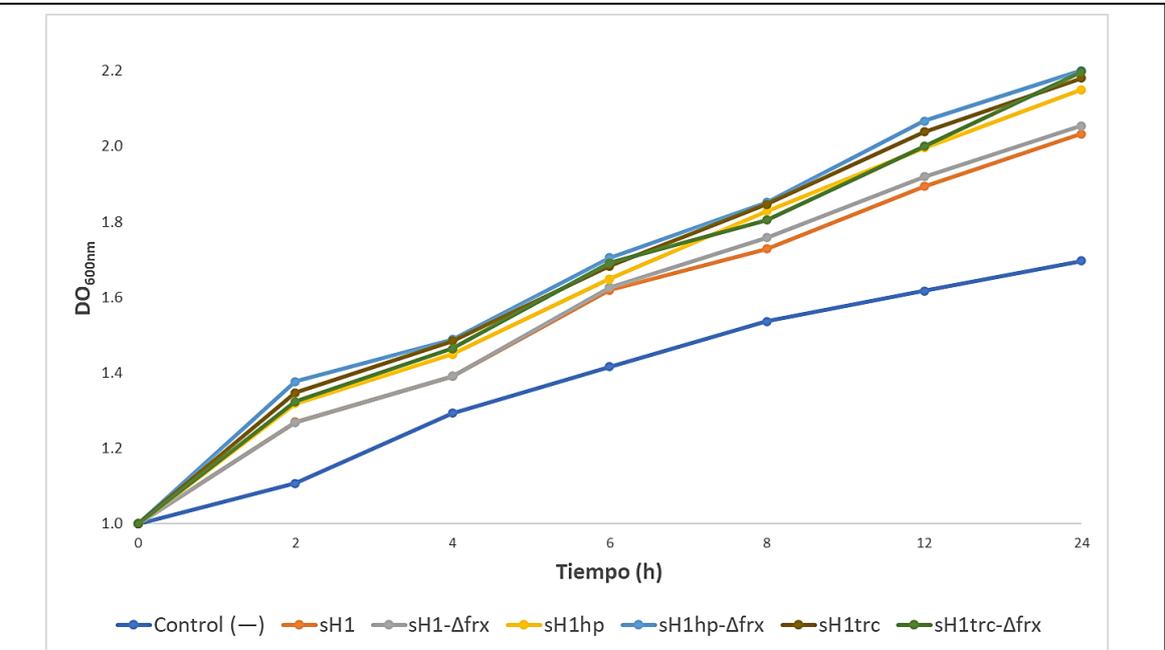


Figura 37. Comparación de la proliferación celular de los diferentes transformantes en presencia de $100 \mu\text{M}$ CdCl_2 . Las diferencias en crecimiento celular se determinaron hasta las 24 horas para cultivos de transformantes $P_{GPD}>SMF1$ expuestos a $100 \mu\text{M}$ de CdCl_2 . Estos niveles de crecimiento fueron analizados por $\text{DO}_{600\text{nm}}$.

4.8. CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE CADMIO Y HIERRO EN FRACCIONES DE PROTEÍNA TERMOESTABLE

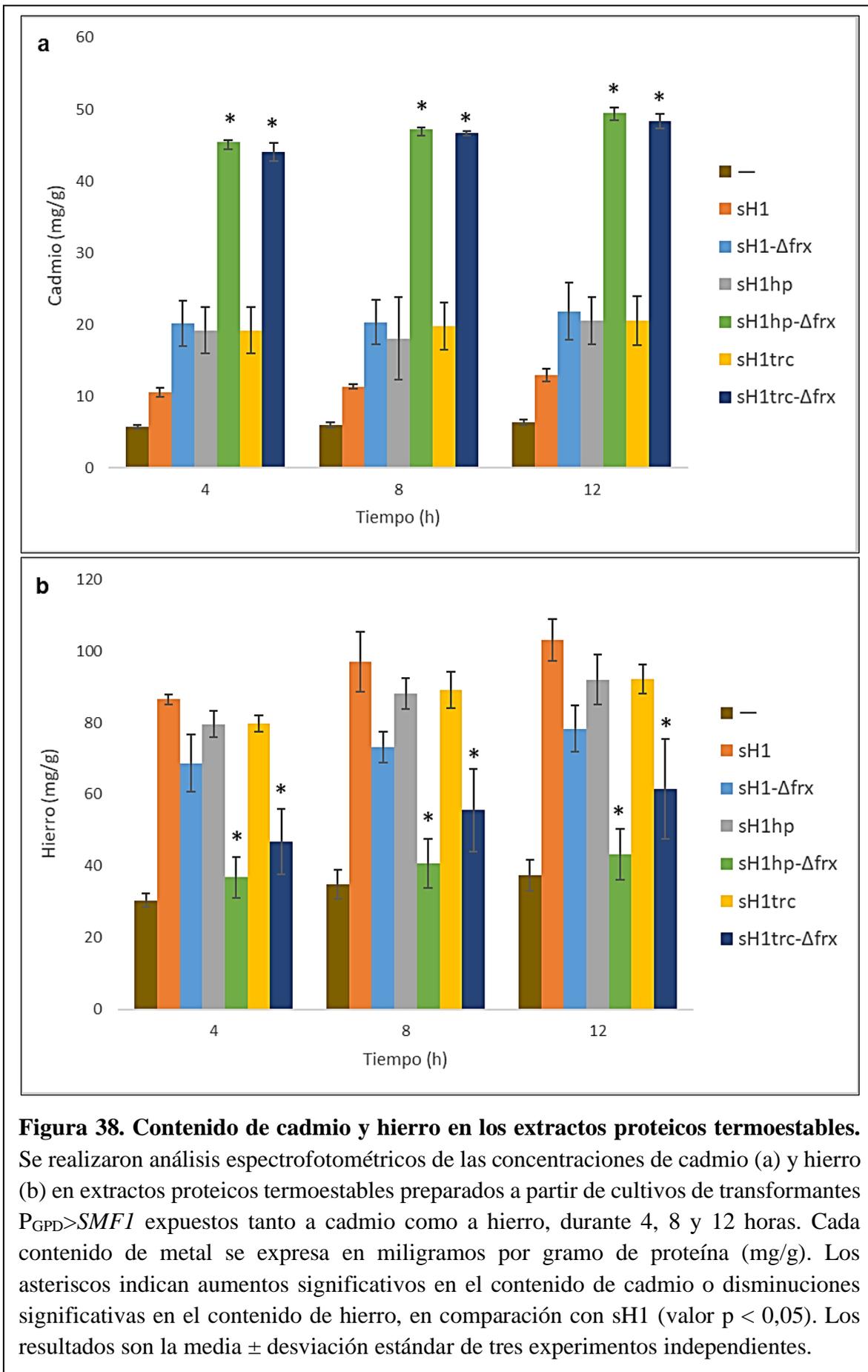
Para confirmar que las capacidades de remoción se debían a la asociación específica con las variantes de ferritina, se analizaron los contenidos de cadmio y hierro en los extractos proteicos termoestables obtenidos de cultivos expuestos simultáneamente a CdCl₂ (100 μM) y FeCl₃ (2 mM). Los resultados expresados como miligramos de cada metal por gramo de proteína termoestable se muestran en la Tabla 8 y Figura 38. Las cuantificaciones fueron realizadas por triplicado, con muestras biológicas colectadas en tratamientos realizados en diferentes días. Los análisis de significancia correspondientes fueron realizados con el programa Minitab®, cuyos resultados se muestran en los Anexos 5 y 6.

Los resultados relacionados con el contenido de cadmio (Figura 38a) revelaron que las variantes sH1hp-Δfrx y sH1trc-Δfrx acumularon cantidades significativas de cadmio, de aproximadamente 50 mg/g, casi cuatro veces mayor al contenido de cadmio que el control sH1. Asimismo, sus contenidos de hierro fueron más bajos (Figura 38b), particularmente para la variante sH1hp-Δfrx.

Sobre la base de estos resultados, todas las modificaciones de aminoácidos introducidas en sH1 condujeron a una mayor preferencia de unión a cadmio, particularmente en la variante sH1hp-Δfrx. En este sentido, los cambios introducidos dentro de la región de cinco aminoácidos (posiciones 155 a 159), que componen el canal hidrofílico del complejo de ferritina, aparentemente conducen a cambios en la selectividad hacia iones metálicos distintos al hierro, como también han sugerido otros estudios (Masuda *et al.* 2010; Si *et al.* 2017). Por otro lado, los reemplazos aminoacídicos relacionados con la ferritina de caballo también parecieron mejorar la selectividad hacia el cadmio, lo cual es consistente con un estudio anterior (Granier *et al.* 1998), el cual también indicó que los aminoácidos conservados en la mayoría de las ferritinas, como como los ácidos glutámicos presentes en el centro de ferroxidasa (subunidades H de ferritinas animales) o en el centro de nucleación (subunidades L de ferritinas animales), podrían intervenir en la quelación de los iones de cadmio. Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio, así como en otros (Treffry *et al.* 1993; Rucker *et al.* 1996), reportan que las mutaciones del centro de ferroxidasa (E86K H89G) son fundamentales para virar la selectividad de la ferritina hacia otros metales diferentes al hierro.

Tabla 8. Contenido de cadmio (Cd) y hierro (Fe) en los extractos de proteína termoestable. Los análisis fueron realizados por triplicado. Las variantes resaltadas de amarillo son las que promueven significativamente un mayor contenido de cadmio y menor contenido de hierro comparado con sH1

	4 horas			8 horas			12 horas		
	Cd/Proteína (mg/g)								
Plásmido vacío	5.6	6.0	5.7	5.6	6.4	6.0	5.9	6.6	6.6
sH1	11.1	10.7	9.9	11.4	11.6	11.0	11.9	13.7	13.2
sH1-Δfrx	17.8	23.8	18.8	18.8	23.9	18.2	19.1	26.4	20.0
sH1hp	17.3	22.9	17.3	12.3	23.7	18.0	18.4	24.4	18.7
sH1hp-Δfrx	45.4	45.7	45.3	47.2	47.2	47.4	50.4	49.1	49.0
sH1trc	17.2	22.9	17.4	17.8	23.6	18.0	18.6	24.5	18.6
sH1trc-Δfrx	42.7	44.8	44.8	46.4	47.0	46.6	48.4	49.3	47.3
	4 horas			8 horas			12 horas		
	Fe/Proteína (mg/g)								
Plásmido vacío	30.2	32.5	28.6	37.8	38.4	30.5	41.7	41.4	32.8
sH1	86.3	85.3	87.9	97.8	104.7	98.1	102.1	109.3	102.1
sH1-Δfrx	74.7	71.7	59.5	81.0	75.4	68.1	81.6	83.0	71.1
sH1hp	79.3	83.3	76.0	84.9	92.5	87.6	95.5	98.8	92.2
sH1hp-Δfrx	40.8	39.4	30.2	46.7	45.0	32.8	48.3	48.0	35.1
sH1trc	81.6	80.3	77.3	88.2	94.8	87.9	96.8	96.5	91.9
sH1trc-Δfrx	52.0	52.0	36.1	69.4	59.2	42.7	75.7	69.4	45.4



Cuando se analizaron los contenidos de cadmio y hierro en los extractos de proteínas termoestables que contenían sH1trc o sH1trc- Δ frx (Figura 38), los resultados mostraron que sH1trc- Δ frx puede acumular cantidades mayores de cadmio, de alrededor de 50 mg/g, con un aumento de tres veces en comparación con sH1. Al mismo tiempo, el contenido de hierro en sH1trc era tan alto como en sH1, de unos 90 mg/g, pero descendía a unos 55 mg/g cuando se eliminaba la actividad ferroxidasa (sH1trc- Δ frx). Sin embargo, es interesante que, incluso sin actividad ferroxidasa, la variante sH1trc- Δ frx es capaz de acumular mayores cantidades de hierro que el control (plásmido vacío). En este sentido, estos resultados se correlacionan con el crecimiento y resistencia mostrados por la cepa de levadura que expresa sH1trc- Δ frx en medio suplementado con cadmio y hierro (Figura 34). Este hallazgo podría explicarse en base a los cambios aminoacídicos P157L Q158K, que corresponden a la región hidrofílica (Masuda *et al.* 2010; Si *et al.* 2017), y la peculiaridad de esta variante en cuanto a su truncamiento en la posición aminoacídica 158 y su menor tamaño (alrededor del 80 por ciento de la secuencia nativa). Sin embargo, la capacidad de sH1trc para interactuar con hierro o cadmio, y su termoestabilidad, confirma que esta variante parece ensamblarse en una gran proteína multimérica y que es capaz de almacenar cadmio y hierro. Curiosamente, estudios previos han reportado que subunidades más cortas de ferritina, como las de sH1trc, son capaces de formar complejos multiméricos de 8 o 12 subunidades, las cuales son reportadas como mini-ferritinas, pero que mantienen las mismas características que las ferritinas de 24 subunidades (Ilari *et al.* 2002; Wang *et al.* 2018).

Dado que los análisis SDS-PAGE de los extractos de proteínas termoestables sugirieron el ensamblaje correcto de todos los complejos multiméricos de ferritina (Figura 35), y también se determinaron los respectivos contenidos de cadmio (Figura 38a), fue posible estimar las relaciones molares, o el número de iones almacenados por molécula de ferritina (Tabla 9), tal y como se realizó en un estudio previo con otras ferritinas (Si *et al.* 2017). Considerando 550 kDa como peso molecular para el complejo de ferritina de soya (Masuda *et al.* 2001) y 440 kDa para la variante sH1trc- Δ frx (80 por ciento de la secuencia nativa), las relaciones molares aproximadas de Cd (II) en la variante sH1hp- Δ frx fue de 250 y en la variante sH1trc- Δ frx fue de 200, mientras que en sH1 fue de 50. Por lo tanto, los cambios introducidos en las dos variantes dieron como resultado un aumento de hasta 5 veces en la selectividad por cadmio.

Tabla 9. Relaciones molares Cd(II)/ferritina y Fe(III)/ferritina para las variantes sH1, sH1hp-Δfrx y sH1trc-Δfrx. Se reportan los valores promedio obtenidos a partir de los resultados incluidos en la Tabla 8 y los pesos moleculares: 550 kDa para ferritina de soya, 440 kDa para la variante sH1trc-Δfrx, 112 Da para Cd(II) y 56 Da para Fe(III)

Variante	Relación molar Cd(II)/ferritina	Relación molar Fe(III)/ferritina
sH1	49,6	1000,1
sH1hp-Δfrx	250,3	100,4
sH1trc-Δfrx	198,7	183,8

Se realizaron estimaciones similares con respecto a las relaciones molares de Fe (III) en las variantes sH1, sH1hp-Δfrx y sH1trc-Δfrx, que mostraron valores de 1000, 100 y 183, respectivamente. Sugiriendo así una disminución significativa en la unión a hierro en las variantes construidas. La relación molar de 1000 Fe(III) para sH1 es consistente con un estudio anterior, que reportó relaciones molares entre 1000 a 2000 para la ferritina humana recombinante expresada en levadura (Kim *et al.* 2003).

Con todos los resultados obtenidos hasta este punto, las variantes de ferritina identificadas con mayor selectividad por cadmio (sH1hp-Δfrx y sH1trc-Δfrx) resultarían de interés para su potencial aplicación en biorremediación de aguas y suelos contaminados por cadmio, Así, estas variantes de ferritina pueden ser producidas intracelularmente en *Saccharomyces cerevisiae* o en otro microorganismo para incrementar sus capacidades bioacumuladoras de cadmio, o pueden ser empleadas como nanopartículas proteicas independientes para la quelación y remoción de este metal (Si *et al.* 2017; Song *et al.* 2021). Sin embargo, es necesario realizar mayores estudios respecto a la especificidad de unión de estas variantes de ferritina a otros iones metálicos, como el plomo, arsénico, cromo o zinc, ya que en ambientes contaminados existe la posibilidad de encontrar diferentes contenidos de metales pesados (Si *et al.* 2017; Sun *et al.* 2019; Sun *et al.* 2020). En estos escenarios, las capacidades de las variantes de ferritina para remover cadmio podrían variar y ser menores a los resultados reportados en el presente estudio. Finalmente, la identificación de estas variantes de ferritina con las características de interés demuestra la viabilidad de rediseñar las funciones de la ferritina utilizando la estrategia de mutagénesis y clonación *in vivo* en *Saccharomyces cerevisiae*.

V. CONCLUSIONES

- Mediante mutagénesis dirigida y clonación *in vivo* en *S. cerevisiae* se logró la construcción de la variante sH1hp, que incluía los cambios K73E y A76C (derivados de la subunidad L de la ferritina de caballo) y P155L Q156E L157M A158T D159H (derivados de la ferritina de arveja). Esta variante demostró conferir a la levadura una mayor resistencia al cadmio que sH1.
- Se construyó una biblioteca de plásmidos con secuencias aleatorias que permitió la identificación de una variante de ferritina funcional y con mayor selectividad hacia el cadmio: sH1trc.
- Se construyeron las respectivas variantes de ferritina carentes de actividad ferroxidasa: sH1- Δ frx, sH1hp- Δ frx y sH1trc- Δ frx; las cuales mostraron mayor selectividad por cadmio y menor afinidad por hierro en comparación a sus contrapartes con actividad ferroxidasa.
- Los resultados demostraron que las variantes sH1hp- Δ frx y sH1trc- Δ frx presentan mayor selectividad por cadmio. Sus relaciones molares de asociación Cd(II)/ferritina mostraron un contenido de hasta 5 veces mayor que el de sH1.
- Las células de levadura que expresan sH1hp- Δ frx o sH1trc- Δ frx son capaces de remover hasta el 80 por ciento de las sales de cadmio del medio de cultivo.
- Todas las variantes de ferritina demostraron ser termoestables y funcionales, incluyendo sH1trc y sH1trc- Δ frx a pesar de presentar un truncamiento en la cadena polipeptídica, produciendo una ferritina de menor tamaño.

VI. RECOMENDACIONES

- Continuar los ensayos de remoción con aguas residuales y/o aguas provenientes de sitios contaminados por cadmio, para evaluar las eficiencias de remoción.
- Continuar los estudios respecto a la especificidad de unión de las variantes de ferritina al cadmio u otros iones metálicos, como el plomo o zinc, para establecer el uso potencial de estas variantes en aplicaciones de biorremediación.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, S., Ito, N., Maity, B., Lu, C., Lu, D., & Ueno, T. 2019. Coordination design of cadmium ions at the 4-fold axis channel of the apo-ferritin cage. *Dalton Transactions*, 48(26), 9759-9764.
- Aguas Bonilla, D. M. 2016. Evaluación de la capacidad de remoción de cadmio mediante levaduras (*Metschnikowia pulcherrima*, *Lecythophora ps.* LE034), aisladas del volcán Tungurahua. Tesis Lic. Ambato, Ecuador, Universidad Técnica de Ambato, 56 p.
- Azevedo, D., Nascimento, L., Labarre, J., Toledano, M. B., & Rodrigues-Pousada, C. 2007. The *S. cerevisiae* Yap1 and Yap2 transcription factors share a common cadmium-sensing domain. *FEBS letters*, 581(2), 187-195.
- Beltrán-Pineda, M. E., & Gómez-Rodríguez, A. M. 2016. Biorremediación de Metales Pesados Cadmio (Cd), Cromo (Cr) y Mercurio (Hg), Mecanismos Bioquímicos e Ingeniería Genética: Una Revisión. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 12(2), 172-197.
- Bernex, N. 2019. Perú: el doble reto de la calidad del agua y seguridad hídrica. In Roldán & T. J. G, Jiménez B, Vammen K, Vaux H, González E, et al., editors (Eds.), *Calidad del agua en las Américas* (pp. 533-580). IANAS-UNESCO.
- Bhuiyan, M. S. U., Min, S. R., Jeong, W. J., Sultana, S., Choi, K. S., Song, W. Y., & Liu, J. R. 2011. Overexpression of a yeast cadmium factor 1 (YCF1) enhances heavy metal tolerance and accumulation in *Brassica juncea*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 105(1), 85-91.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Butler, L., Lall, U., & Bonnafous, L. 2017. Cumulative heavy metal contamination in mining areas of the Rimac, Peru basin. In: New York: Columbia Water Centre: Columbia University.

- Cabaleiro, T., Lafuente, A., Romero, A., & Caride, A. 2008. Posible papel protector de la melatonina frente a la toxicidad neuroendocrina inducida por cadmio. *Revista de Toxicología*, 25(1-3), 3-11.
- Casini, A., Olivieri, M., Petris, G., Montagna, C., Reginato, G., Maule, G., & Demichelis, F. 2018. A highly specific SpCas9 variant is identified by in vivo screening in yeast. *Nature biotechnology*, 36(3), 265-271.
- Chavez, E., He, Z., Stoffella, P., Mylavarapu, R., Li, Y., Moyano, B., & Baligar, V. 2015. Concentration of cadmium in cacao beans and its relationship with soil cadmium in southern Ecuador. *Science of the total environment*, 533, 205-214.
- Damodaran, D., Suresh, G., & Mohan, R. 2011. Bioremediation of soil by removing heavy metals using *Saccharomyces cerevisiae*. 2nd International Conference on Environmental Science and Technology IPCBEE,
- de Llanos, R., Martínez-Garay, C. A., Fita-Torró, J., Romero, A. M., Martínez-Pastor, M. T., & Puig, S. 2016. Soybean ferritin expression in *Saccharomyces cerevisiae* modulates iron accumulation and resistance to elevated iron concentrations. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(10), 3052-3060.
- Fomina, M., & Gadd, G. M. 2014. Biosorption: current perspectives on concept, definition and application. *Bioresource technology*, 160, 3-14.
- Gamboa, N. 2019. El cadmio, ¿su presencia nos alerta de la contaminación antropogénica? *Revista de Química*, 33(1-2), 14-16.
- Ganotes, J., Larson, E., & Navone, R. 1962. Suggested dithizone method for cadmium determination. *Journal-American Water Works Association*, 54(7), 852-854.
- Genchi, G., Sinicropi, M. S., Lauria, G., Carocci, A., & Catalano, A. 2020. The effects of cadmium toxicity. *International journal of environmental research and public health*, 17(11), 3782.
- Gomes, D., Fragoso, L., Riger, C., Panek, A., & Eleutherio, E. 2002. Regulation of cadmium uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1573(1), 21-25.
- Goto, F., Yoshihara, T., Shigemoto, N., Toki, S., & Takaiwa, F. 1999. Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. *Nature biotechnology*, 17(3), 282-286.
- Granier, T., Comberton, G., Gallois, B., Langlois d'Estaintot, B., Dautant, A., Crichton, R. R., & Précigoux, G. 1998. Evidence of new cadmium binding sites in recombinant horse L-chain ferritin by anomalous Fourier difference map calculation. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 31(4), 477-485.

- Gutiérrez Mesías, L. G. 2021. Diseño de tamizados genéticos en *Saccharomyces cerevisiae* usando una biblioteca genómica de plásmidos multicopia. Tesis Lic. Lima, Perú, UNALM. 84 p.
- Gutiérrez Mesías, L. G. 2023. Búsqueda de variantes de ferritina con elevada capacidad de acumulación de hierro en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis Mag. Lima, Perú, UNALM. 69 p.
- Hua, S.-b., Qiu, M., Chan, E., Zhu, L., & Luo, Y. 1997. Minimum Length of Sequence Homology Required for in Vivo Cloning by Homologous Recombination in Yeast. *Plasmid*, 38(2), 91-96.
- Huanca Juarez, J. 2020. Búsqueda de oligopéptidos aleatorios con capacidad fotoprotectora en *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis Lic. Lima, Perú, UNALM. 76 p.
- Ilari, A., Ceci, P., Ferrari, D., Rossi, G. L., & Chiancone, E. 2002. Iron incorporation into *Escherichia coli* Dps gives rise to a ferritin-like microcrystalline core. *Journal of Biological Chemistry*, 277(40), 37619-37623.
- Jiang, B., Chen, X., Sun, G., Chen, X., Yin, Y., Jin, Y., & Fan, K. 2020. A natural drug entry channel in the ferritin nanocage. *Nano Today*, 35, 100948.
- Joint, F., Additives, W. E. C. o. F., & Organization, W. H. 1972. *Evaluación de diversos aditivos alimentarios y de los contaminantes mercurio, plomo y cadmio: decimosexto informe del Comité Mixto FAO/OMS, Ginebra, 4-12 de abril de 1972*. Ginebra: Organizaci'on Mundial de la Salud.
- Kille, S., Acevedo-Rocha, C. G., Parra, L. P., Zhang, Z.G., Opperman, D. J., Reetz, M. T., & Acevedo, J. P. 2013. Reducing codon redundancy and screening effort of combinatorial protein libraries created by saturation mutagenesis. *ACS synthetic biology*, 2(2), 83-92.
- Kim, H.J., Kim, H.M., Kim, J.H., Ryu, K.S., Park, S.M., Jahng, K.Y., & Kim, D.H. 2003. Expression of heteropolymeric ferritin improves iron storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology*, 69(4), 1999-2005.
- Kitazono, A. A. 2009. Improved gap-repair cloning method that uses oligonucleotides to target cognate sequences. *Yeast*, 26(9), 497-505.
- Kitazono, A. A. 2011. Optimized protocols and plasmids for in vivo cloning in yeast. *Gene*, 484(1-2), 86-89.
- Kuroda, K., & Ueda, M. 2010. Engineering of microorganisms towards recovery of rare metal ions. *Applied and environmental microbiology*, 87(1), 53-60.

- Li, C., Li, Z., Li, Y., Zhou, J., Zhang, C., Su, X., & Li, T. 2012. A ferritin from *Dendrorhynchus zhejiangensis* with heavy metals detoxification activity. *PloS one*, 7(12), e51428.
- Li, P.-S., & Tao, H.-C. 2015. Cell surface engineering of microorganisms towards adsorption of heavy metals. *Crit Rev Microbiol*, 41(2), 140-149.
- Liu, X., Jin, W., & Theil, E. C. 2003. Opening protein pores with chaotropes enhances Fe reduction and chelation of Fe from the ferritin biomineral. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(7), 3653-3658.
- Ma, H., Kunes, S., Schatz, P. J., & Botstein, D. 1987. Plasmid construction by homologous recombination in yeast. *Gene*, 58(2-3), 201-216.
- MacWilliams, M. P., & Liao, M. K. 2006. Luria broth (LB) and Luria agar (LA) media and their uses protocol. *ASM MicrobeLibrary*. American Society for Microbiology.
- Maity, B., Hishikawa, Y., Lu, D., & Ueno, T. 2019. Recent progresses in the accumulation of metal ions into the apo-ferritin cage: Experimental and theoretical perspectives. *Polyhedron*, 172, 104-111.
- Masuda, T., Goto, F., & Yoshihara, T. 2001. A novel plant ferritin subunit from soybean that is related to a mechanism in iron release. *Journal of Biological Chemistry*, 276(22), 19575-19579.
- Masuda, T., Goto, F., Yoshihara, T., & Mikami, B. 2010. Crystal structure of plant ferritin reveals a novel metal binding site that functions as a transit site for metal transfer in ferritin. *Journal of Biological Chemistry*, 285(6), 4049-4059.
- Masuda, T., Zang, J., Zhao, G., & Mikami, B. 2018. The first crystal structure of crustacean ferritin that is a hybrid type of H and L ferritin. *Protein Science*, 27(11), 1955-1960.
- MINAM. 2017. Decreto Supremo N° 004-2017-MINAM. Aprueban estándares de calidad ambiental (ECA) para agua y establecen disposiciones complementarias. Ministerio del Ambiente. *Diario Oficial El Peruano*, 7 de junio.
- Morelli, I. S., Coppotelli, B. M., Madueño, L., & Del Panno, M. T. 2015. La biorremediación en la era post-genómica. *Revista Química Viva*, 126-35.
- Moreno-Rivas, S. C., & Montfort, G. R.C. 2019. Descontaminación de arsénico, cadmio y plomo en agua por biosorción con *Saccharomyces cerevisiae*. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 21(S2), 51-68.
- Narayanan, S., Firlar, E., Foroozan, T., Farajpour, N., Covnot, L., Yassar, R. S., & Shokuhfar, T. 2018. Light on the Biomineralization of Ferritin. *Microscopy and Microanalysis*, 24(S1), 1324-1325.

- Nirupa, N., Prasad, M. N. V., & Kirti, P. B. 2019. Expression of Pea (*Pisum sativum*) Seed Ferritin Gene in Indian Mustard (*Brassica juncea*) Enhances Accumulation of Iron and Cadmium. In *Transgenic Plant Technology for Remediation of Toxic Metals and Metalloids* (pp. 499-521). Elsevier.
- Orr-Weaver, T. L., Szostak, J. W., & Rothstein, R. J. 1981. Yeast transformation: a model system for the study of recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(10), 6354-6358.
- Rucker, P., Torti, F. M., & Torti, S. V. 1996. Role of H and L Subunits in Mouse Ferritin". *Journal of Biological Chemistry*, 271(52), 33352-33357.
- Saleem, M., Brim, H., Hussain, S., Arshad, M., & Leigh, M. 2008. Perspectives on microbial cell surface display in bioremediation. *Biotechnology advances*, 26(2), 151-161.
- Satarug, S. 2018. Dietary cadmium intake and its effects on kidneys. *Toxics*, 6(1), 15.
- Schneegurt, M. A., & Dore, S. Y. 2003. Direct extraction of DNA from soils for studies in microbial ecology. *Current issues in molecular biology*, 5(1), 1-8.
- Sherman, F. 2002. Getting started with yeast. In *Methods in enzymology*, 350, 3-41. Academic Press.
- Sheth, S., & Brittenham, G. M. 2000. Genetic disorders affecting proteins of iron metabolism: clinical implications. *Annual review of medicine*, 51(1), 443-464.
- Shin, Y.M., Kwon, T.H., Kim, K.S., Chae, K.S., Kim, D.H., Kim, J.H., & Yang, M.S. 2001. Enhanced iron uptake of *Saccharomyces cerevisiae* by heterologous expression of a tadpole ferritin gene. *Applied and environmental microbiology*, 67(3), 1280-1283.
- Si, K., Ming, T., Li, Y., Qiu, X., Chen, L., Zhou, J., & Cheong, L.Z. 2017. Heavy metal detoxification by recombinant ferritin from *Apostichopus japonicus*. *RSC Advances*, 7(66), 41909-41918.
- Soares, E. V., & Soares, H. M. (2012). Bioremediation of industrial effluents containing heavy metals using brewing cells of *Saccharomyces cerevisiae* as a green technology: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 19(4), 1066-1083.
- Song, X., Zheng, Y., Zhu, L., Zhang, L., Meng, H., Yu, R., & Zhang, C. 2021. Development of robust and facile purification process for production of recombinant human ferritin heavy chain nanoparticle from *Escherichia coli*. *Process Biochemistry*, 104, 1-9.
- Sun, G. L., Reynolds, E. E., & Belcher, A. M. 2019. Designing yeast as plant-like hyperaccumulators for heavy metals. *Nature communications*, 10(1), 1-12.

- Sun, G. L., Reynolds, E. E., & Belcher, A. M. 2020. Using yeast to sustainably remediate and extract heavy metals from waste waters. *Nature Sustainability*, 3(4), 303-311.
- Sóvágó, I., & Várnagy, K. 2013. Cadmium (II) complexes of amino acids and peptides. In *Cadmium: From Toxicity to Essentiality* (pp. 275-302). Springer.
- Tamarit, J., Irazusta, V., Moreno-Cermeño, A., & Ros, J. 2006. Colorimetric assay for the quantitation of iron in yeast. *Analytical biochemistry*, 351(1), 149-151.
- Thomas, B. J., & Rothstein, R. 1989. Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell*, 56(4), 619-630.
- Treco, D. A., & Lundblad, V. 1993. Preparation of yeast media. *Current protocols in molecular biology*, 23(1), 1-13.
- Treffry, A., Bauminger, E., Hechel, D., Hodson, N., Nowik, I., Yewdall, S. J., & Harrison, P. 1993. Defining the roles of the threefold channels in iron uptake, iron oxidation and iron-core formation in ferritin: a study aided by site-directed mutagenesis. *Biochemical Journal*, 296(3), 721-728.
- Ullah, I., Wang, Y., Eide, D. J., & Dunwell, J. M. 2018. Evolution, and functional analysis of Natural Resistance-Associated Macrophage Proteins (NRAMPs) from *Theobroma cacao* and their role in cadmium accumulation. *Scientific reports*, 8(1), 14412.
- Wang, J., & Chen, C. 2006. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: a review. *Biotechnology advances*, 24(5), 427-451.
- Wang, W., Wang, L., Chen, H., Zang, J., Zhao, X., Zhao, G., & Wang, H. 2018. Selective elimination of the key subunit interfaces facilitates conversion of native 24-mer protein nanocage into 8-mer nanorings. *Journal of the American Chemical Society*, 140(43), 14078-14081.
- Wei, W., Smith, N., Wu, X., Kim, H., Seravalli, J., Khalimonchuk, O., & Lee, J. 2014. YCF1-mediated cadmium resistance in yeast is dependent on copper metabolism and antioxidant enzymes. *Antioxidants & redox signaling*, 21(10), 1475-1489.
- Weiner, M. P., Costa, G. L., Schoettlin, W., Cline, J., Mathur, E., & Bauer, J. C. 1994. Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction. *Gene*, 151(1-2), 119-123.
- Wysocki, R., & Tamás, M. J. 2010. How *Saccharomyces cerevisiae* copes with toxic metals and metalloids. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(6), 925-951.
- Yang, R., Zhou, Z., Sun, G., Gao, Y., & Xu, J. 2015. Ferritin, a novel vehicle for iron supplementation and food nutritional factors encapsulation. *Trends in Food Science & Technology*, 44(2), 189-200.

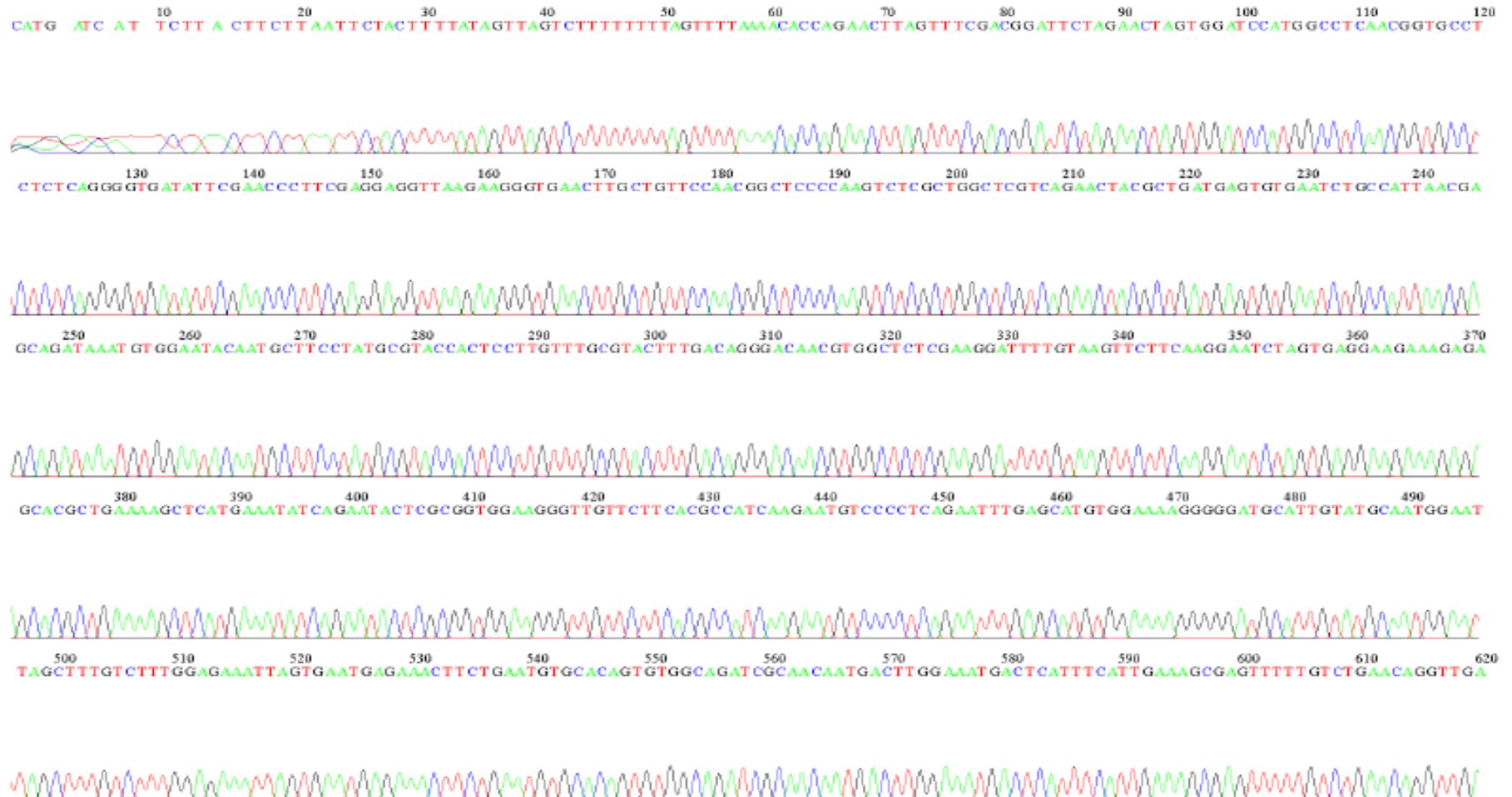
- Yu, J., Zhang, T., Xu, H., Dong, X., Cai, Y., Pan, Y., & Cao, C. 2019. Thermostable iron oxide nanoparticle synthesis within recombinant ferritins from the hyperthermophile *Pyrococcus yayanosii* CH1. RSC advances, 9(67), 39381-39393.
- Zhang, X., Zang, J., Chen, H., Zhou, K., Zhang, T., Lv, C., & Zhao, G. 2019. Thermostability of protein nanocages: the effect of natural extra peptide on the exterior surface. RSC advances, 9(43), 24777-24782.
- Zug, K. L. M., Yupanqui, H. A. H., Meyberg, F., Cierjacks, J. S., & Cierjacks, A. 2019. Cadmium Accumulation in Peruvian Cacao (*Theobroma cacao* L.) and Opportunities for Mitigation. Water, Air, & Soil Pollution, 230(3), 72.

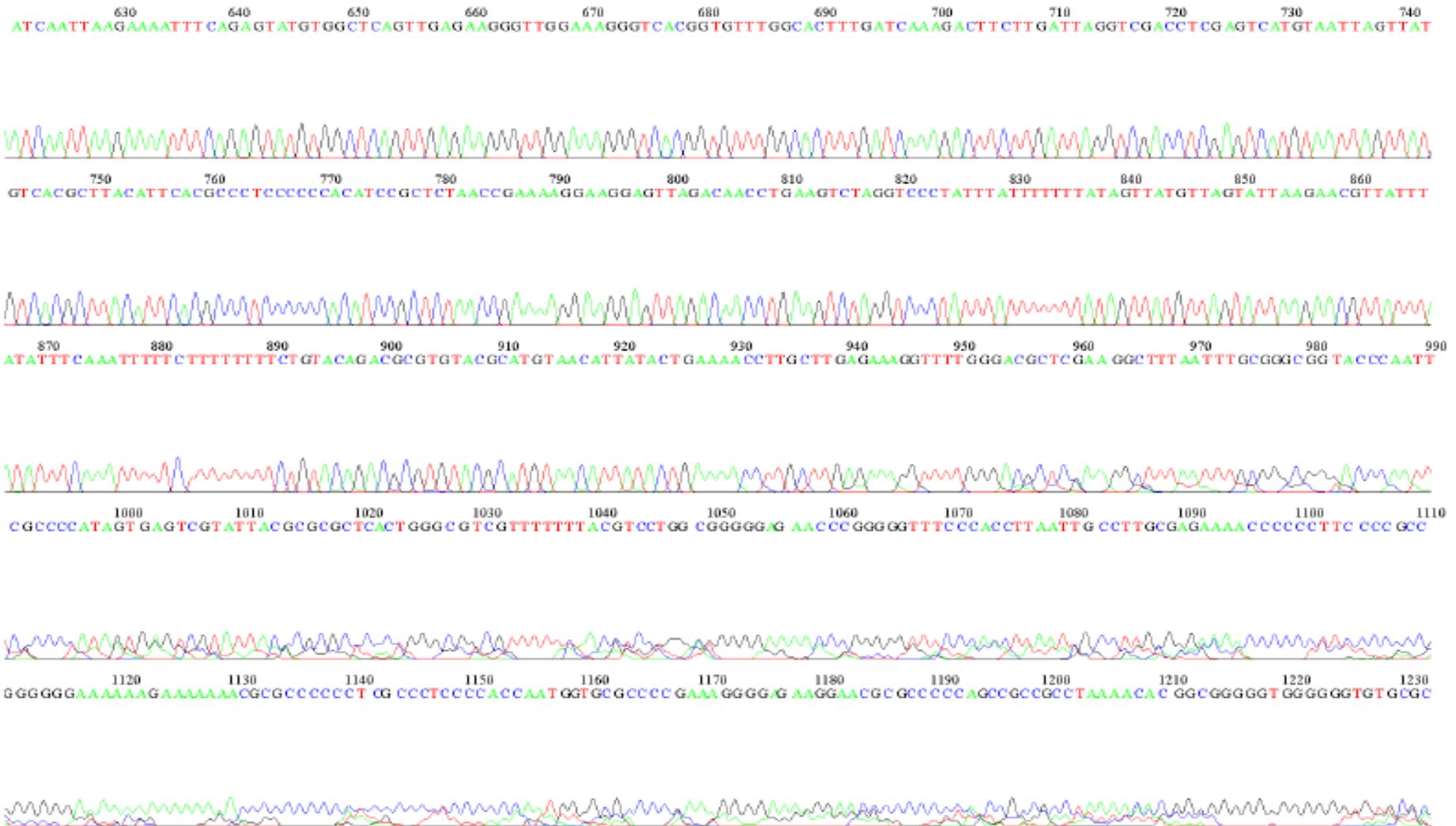
VIII. ANEXOS

Anexo 1. Resultados de secuenciación de nucleótidos de la variante de ferritina sH1hp



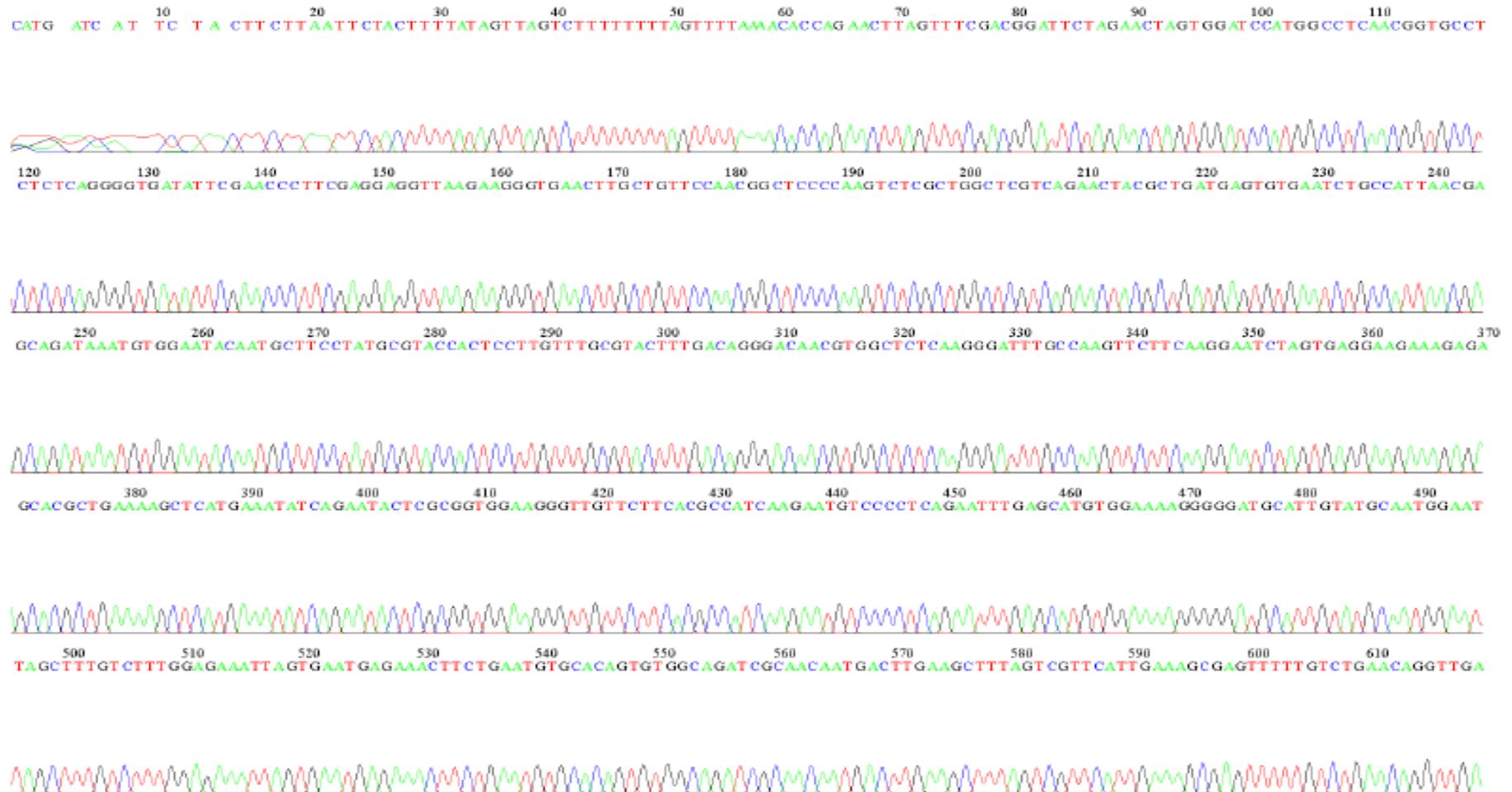
File: *H1-HIB1_p416GPD3352FW.ab1* Run Ended: 2021/11/10 23:36:44 Signal G:1935 A:3040 C:3745 T:4593
Sample: *H1-HIB1_p416GPD3352FW* Lane: 88 Base spacing: 16.332882 1240 bases in 15100 scans Page 1 of 2



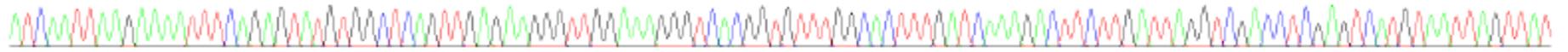


Anexo 2. Resultados de secuenciación de nucleótidos de la variante de ferritina sH1trc

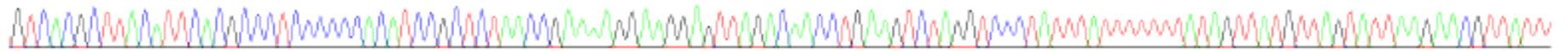
File: H1-T14_p416GPD3352FW.ab1 Run Ended: 2021/11/10 23:36:44 Signal G:2766 A:4424 C:5740 T:6841
Sample: H1-T14_p416GPD3352FW Lane: 87 Base spacing: 15.991961 1333 bases in 16186 scans Page 1 of 2



620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740
ATCAATTAAGAAAATTT CAGAGTATGTGGCTCAGTTGAGAAGGGTTGGAAAGGGTCACGGTGTGGCACTTTGATCAAAGACTTCTTGATTAGGTCGACCTCGAGTCATGTAATTAGTTAT



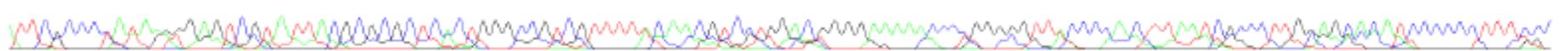
750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860
GTCACGCTTACATTACGCGCCTCCCCCACATCCGCTCTAACCGAAAAGGAAGGAGTTAGACAACCTGAAGTCTAGGTCCCTATTTATTTTTTTATAGTTATGTTAGTATTAAAGAACGTTATT



870 880 890 900 910 920 930 940 950 960 970 980
TATATTTCAAATTTTTCTTTTTTTTCTGTACAGACGCGTGTACGCATGTAACATTATCTGAAAACCTTGCTTGAAGAAAGTTTTGGGACCGTCGAAAGGCTTTAA TTTGCGGCCGGTACCCAA



990 1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110
TTCGCCCTATAAAGGAGTCGTATTACGGCGCGCTCCTGCGGCGTCTGTTTTTCAAAGTCTCTGGACGGGGAGAAAACCGGGGTTACCCCAACTTAATCGCCCTTGGAGCACATCCCCCTTTCG



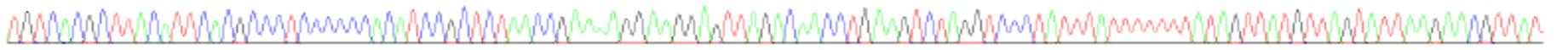
1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200 1210 1220 1230
CCACCGGGGGAAATAACGAGAAAGGCGGCAACCCATTGCCCTTCCC AAMATTGGGCCACCCCGAAAAGGGGAAAAGGAACCGCCCCGTACC GCGCATAAACGCGGGGGGGGGGGGG



630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740
AATCAATT AAGAAAATTT CAGAGTATGTGGCTCAGTTGAG AAGGGTTGGAAGGGT CACGGTGTTTGGCACTTTGATCAAAGACTTCTTGATTAGGT CGACCTCGAGTCATGTAATTAGTTA



750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860
TGT CACGCTTACATT CACGCCCTCCCCCACATCCGCTCTAACCGAAAAGG AAGGAGTTAGACAACTGAAGTCTAGGTCCTATTTATTTTTATAGTTATGTTAGTATT AAGAACGTTAT



870 880 890 900 910 920 930 940 950 960 970 980 990
TTATATTTCAAATTTTTCTTTTTTTCTG FACAGACGCGTGTACGCATGTAACTTATCTGAAAACCTTGCTTGAG AAGGTTTTGGGACGCTCGAAAGGCTTTAATTTGEGGCCGGTACCCAAAT



1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110
TCGCCTATAGTGAGTCGTATTACGCGCGCTCACTGGGCGTCTGTTTTACAACTGTCGTGACTGGGAAAAACCTGGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCGCTTTCGCCAGCTG



1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200 1210 1220 1230 1240
GCGTAAT AACGAAGAAAGGCCCGCACCCATTGCCCTTCCQACAAATTGC GCAGCCCGGAA GGGCGAAAGAACGC CCCC GTAAAGGCCCATAMCGC GCCGGGGGGGGGGGGTTTTTCGCCCCCG



1250 1260 1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360
GCGTAAT AACGAAGAAAGGCCCGCACCCATTGCCCTTCCQACAAATTGC GCAGCCCGGAA GGGCGAAAGAACGC CCCC GTAAAGGCCCATAMCGC GCCGGGGGGGGGGGGTTTTTCGCCCCCG

Anexo 4. Análisis estadístico para las determinaciones de los niveles de remoción de cadmio

Análisis de varianza

Origen de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de cuadrados	F	Valor P
Variante de ferritina	5	92227	29056,7	18,68	0,000
Error	102	37364	663,6		
Total	107				

Comparaciones de medias con el Test de Tukey

Variante	N	Promedio	Agrupamiento		
sH1	18	47,85			C
sH1-Δfrx	18	56,96			C
sH1hp	18	59,76		B	C
sH1hp-Δfrx*	18	69,34	A		
sH1trc	18	60,09		B	C
sH1trc-Δfrx*	18	69,81	A		

*Variantes con promedios que no comparten una letra son significativamente diferentes

Anexo 5. Análisis estadístico para las determinaciones de los niveles de contenido de cadmio

Análisis de varianza

Origen de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de cuadrados	F	Valor P
Variante de ferritina	5	55918	9319,6	45,50	0,000
Error	48	11469	204,8		
Total	53	67387			

Comparaciones de medias con el Test de Tukey

Variante	N	Promedio	Agrupamiento		
sH1	9	10,57			C
sH1-Δfrx	9	17,79		B	C
sH1hp	9	17,32		B	C
sH1hp-Δfrx*	9	47,54	A		
sH1trc	9	20,61		B	C
sH1trc-Δfrx*	9	44,27	A		

*Variantes con promedios que no comparten una letra son significativamente diferentes

Anexo 6. Análisis estadístico para las determinaciones de los niveles de contenido de hierro

Análisis de varianza

Origen de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de cuadrados	F	Valor P
Variante de ferritina	5	387028	64504,6	71,37	0,000
Error	48	50614	903,8		
Total	53	437642			

Comparaciones de medias con el Test de Tukey

Variante	N	Promedio	Agrupamiento		
sH1	9	99,20	A		
sH1- Δ frx	9	76,67		B	C
sH1hp	9	92,10	A		
sH1hp- Δ frx*	9	40,22			C
sH1trc	9	90,17	A		
sH1trc- Δ frx*	9	51,64			C

*Variantes con promedios que no comparten una letra son significativamente diferentes