

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS



**“IDENTIFICACIÓN DE OLIGOPÉPTIDOS CON ACTIVIDAD
FOTOPROTECTORA MEDIANTE UN TAMIZADO GENÉTICO
EN LA LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae*”**

Presentada por:

RAQUEL MERINO URTEAGA

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGA

Lima – Perú

2024

**La UNALM es la titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación
(Art. 24. Reglamento de Propiedad Intelectual)**

TESIS RM

INFORME DE ORIGINALIDAD

15%	15%	1%	1%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.lamolina.edu.pe Fuente de Internet	13%
2	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%
3	worldwidescience.org Fuente de Internet	<1%
4	docplayer.com.br Fuente de Internet	<1%
5	Submitted to Universidad San Ignacio de Loyola Trabajo del estudiante	<1%
6	www.proteccioncivil.org Fuente de Internet	<1%
7	Dawn Kriss, Victoria Schussler, Elyse Driscoll, Lauren Bradley, Jessica Ford, Federica Pozzi, Elena Basso. "Materials Characterization with Multiband Reflectance Imaging at the Brooklyn Museum: A New Tool for the	<1%

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“IDENTIFICACIÓN DE OLIGOPÉPTIDOS CON ACTIVIDAD
FOTOPROTECTORA MEDIANTE UN TAMIZADO GENÉTICO
EN LA LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae*”**

Presentada por:

RAQUEL MERINO URTEAGA

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGA

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

Ph.D. Gretty Katherina Villena Chávez
PRESIDENTE

Mg. Sc. Roberto Carlos Mansilla Samaniego
MIEMBRO

Dr. Ernesto Aldo Ormeño Orrillo
MIEMBRO

Ph. D. Ana Akemi Kitazono Sugahara
ASESORA

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más profundo agradecimiento a mi directora de tesis, la Dra. Ana Kitazono Sugahara, por su invaluable orientación, paciencia, conocimiento, e inspirarme para tomar el camino de la investigación científica.

A los miembros del jurado, Dra. Gretty Villena Chávez, el Dr. Ernesto Ormeño Orrillo, Mg. Sc. Roberto Carlos Mansilla Samaniego, por la revisión del proyecto y su presencia durante mi sustentación.

Un especial agradecimiento a mi familia, en especial a mis padres Fany Urteaga y Jorge Merino, por su amor incondicional, comprensión y ánimo constante. Su confianza en mí desde temprana edad ha sido una fuente de motivación para superarme en mi desarrollo académico y personal.

Agradezco también a mis compañeros de la Facultad de Ciencias, de la especialidad de Biología, y a todo el personal del Laboratorio de Química Biológica y Bioanálisis, lugar en donde pasé largas horas de trabajo y experimentación, bajo un grato ambiente de colaboración que me enriqueció durante mi aprendizaje.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	vi
ABSTRACT	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 Radiación UV	3
2.2 Consecuencias biológicas.....	4
2.3 Fotoprotección	5
2.4 Bloqueadores solares.....	5
2.5 Filtros en bloqueadores	6
2.6 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
2.6.1 Expresión génica.....	8
2.7 Bibliotecas de plásmidos codificantes de péptidos semialeatorios.....	8
2.7.1 Plásmido pEGH	9
III. METODOLOGÍA.....	11
3.1 Lugar de ejecución	11
3.2 Materiales	11
3.2.1 Cepas y plásmidos	11
3.2.2 Materiales de uso rutinario	11
3.2.3 Medios de cultivo.....	11
3.2.4 Soluciones y reactivos.....	12
3.2.5 Reactivos de Biología molecular	12
3.2.6 Equipos.....	12
3.3 Métodos.....	13
3.3.1 Generación de fragmentos semialeatorios (SAdir) por PCR.....	13
3.3.2 Digestión del plásmido pEGH y tratamiento con fosfatasa	15
3.3.3 Transformación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y clonaje in vivo	15
3.3.4 Tamizado de transformantes.....	15

3.3.4.1	Primer procedimiento.....	15
3.3.4.2	Segundo procedimiento.....	17
3.3.5	Recuperación del ADN total de los transformantes.....	18
3.3.6	Transformación de E. coli por electroporación y purificación de plásmidos amplificados.....	19
3.3.7	Verificación de presencia de fragmento mediante digestión.....	19
3.3.8	Secuenciación de nucleótidos de los plásmidos seleccionados.....	20
3.3.9	Análisis de expresión génica de los oligopéptidos sintetizados.....	20
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
4.1	Obtención de fragmentos semialeatorios mediante PCR.....	21
4.2	Digestión de plásmido pEGH y tratamiento con fosfatasa antártica.....	21
4.3	Primer procedimiento de tamizado de transformantes.....	22
4.3.1	Clonaje in vivo y selección de candidatos iniciales.....	22
4.3.2	Pruebas de tamizado secuenciales por sembrado.....	24
4.3.3	Transformación en cepa Δ rad24 y repetición de tamizados.....	27
4.3.4	Tamizados finales por diluciones seriadas.....	28
4.4	Segundo procedimiento de tamizado de transformantes.....	31
4.5	Análisis de expresión génica de los oligopéptidos sintetizados.....	32
4.6	Análisis de secuenciamiento de nucleótidos de los plásmidos seleccionados.....	36
V.	CONCLUSIONES.....	38
VI.	RECOMENDACIONES.....	39
VII.	BIBLIOGRAFÍA.....	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Cepas y plásmidos.....	11
Tabla 2: Secuencias de los oligonucleótidos usados como plantillas y cebadores en la obtención de los fragmentos a ser clonados.....	14

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Incidencia de radiación UV en la piel y consecuencias biológicas.	4
Figura 2: Principales características del plásmido de expresión pEGH. GST: Gen codificante para la glutatión-S-transferasa; PGAL:.....	9
Figura 3: Representación gráfica del sistema de expresión regulada por el promotor GAL1/10 del plásmido pEGH.	10
Figura 4: Representación de la reacción de PCR utilizada para la construcción de los fragmentos semialeatorios.....	13
Figura 5: Descripción detallada de la correspondencia de bases en la construcción y amplificación del fragmento SAdir.	14
Figura 6: Representación del mecanismo de clonaje <i>in vivo</i> realizado por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15
Figura 7: Representación de parte de la metodología utilizada en el primer procedimiento de tamizaje.....	16
Figura 8: Replica de placa realizada con las placas de -URA rafinosa que han sido sembradas con transformantes.....	17
Figura 9: Representación del procedimiento seguido para la realización de la prueba de verificación con diluciones seriadas de los candidatos seleccionados previamente.	18
Figura 10: Protocolo de inducción de expresión y recuperación de proteínas	20
Figura 11: Análisis electroforético en gel de agarosa (1.2%) de la amplificación de las plantillas WYdir y SAdir..	21
Figura 12: Análisis electroforético en gel de agarosa 0.8% del plásmido pEGH digerido con la enzima <i>SalI</i> y tratado con la enzima fosfatasa antártica.....	22
Figura 13: Transformantes de levadura obtenidos al utilizar solo el plásmido linealizado y tratado por fosfatasa antártica.	23

Figura 14: Transformantes de levadura obtenidos por clonaje <i>in vivo</i> del fragmento semialeatorio. Izquierda:	23
Figura 15: Representación de resultados de tamizados secuenciales realizados para la verificación de actividad fotoprotectora conferida por los plásmidos presentes en los candidatos seleccionados. Arriba:	25
Figura 16: Análisis electroforético en gel de agarosa 2% de plásmidos purificados de los 42 candidatos seleccionados en el primer procedimiento de tamizaje y digeridos con las enzimas <i>Bam</i> HI y <i>Hind</i> III.	26
Figura 17: Análisis electroforético en gel de agarosa 0.8% de plásmidos purificados de los 42 candidatos seleccionados en el primer procedimiento de tamizaje.	26
Figura 18: Transformación en cepa $\Delta rad24$ y replica de placa realizado con transformantes del MIX de candidatos en medios -URA glucosa y YEP rafinosa/galactosa.	27
Figura 19: Prueba de diluciones seriadas para la verificación de resistencia a radiación UV de candidatos.	29
Figura 20: Prueba final en cepa $\Delta rad24$ de diluciones seriadas para la verificación final de resistencia a radiación UV de candidatos.	30
Figura 21: Replica de placa realizado con transformantes con la biblioteca plasmídica en la cepa $\Delta rad9$ para el segundo procedimiento de tamizaje.	31
Figura 22: Prueba de diluciones seriadas para la verificación de resistencia a radiación UV de candidatos en el segundo procedimiento de tamizaje.	32
Figura 23: Resultados del Western Blot para el análisis de expresión de cada candidato. Izquierda: Proteínas totales teñidas en membrana de nitrocelulosa.	34
Figura 24: Resultados del Western Blot utilizando a los diferentes transformantes de cada candidato. Izquierda:	35
Figura 25: Comparación entre de los 18 aminoácidos codificados por los plásmidos seleccionados.	36

RESUMEN

Se reportan dos metodologías basadas en tamizados genéticos para la identificación de oligopéptidos con secuencia semialeatoria que posean actividad fotoprotectora utilizando la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Se generó una biblioteca de plásmidos que codifica a dichos oligopéptidos mediante clonaje *in vivo*. La cepa mutante de levadura *Δrad9* fue transformada con el plásmido de expresión pEGH y plantillas semialeatorias de ADN. Dos procesos de tamizaje genético se desarrollaron en paralelo. En el primero, la levadura transformada fue inducida en caldo conteniendo galactosa, plaqueada en un medio selectivo y expuesta a irradiación UVB (302nm). Se evaluó la capacidad fotoprotectora de los oligopéptidos expresados en las colonias sobrevivientes mediante sembrado en áreas de mayor dimensión e irradiación inmediata. Se extrajo los plásmidos de los candidatos que presentaron un mayor crecimiento y se confirmó la presencia de los fragmentos clonados mediante digestión con enzimas de restricción. Se transformó a los plásmidos en la cepa de levadura *Δrad24*. Los transformantes fueron replicados en placas conteniendo medio inductor e irradiados. Los sobrevivientes fueron sometidos a tamizajes consecutivos por sembrado y plaqueo en diluciones seriadas, donde tres candidatos fueron seleccionados. En el segundo método de tamizaje, se plaqueó a los transformantes iniciales en *Δrad9* en medio selectivo. Posteriormente, se realizó pruebas de irradiación por replica de placa, tamizaje por sembrado y plaqueo con diluciones seriadas. Se recuperaron los plásmidos seleccionados para una segunda confirmación con la cepa mutante *Δrad24*, obteniéndose un candidato resistente a irradiación UV. Se analizó la expresión plasmídica de los candidatos obtenidos en ambos procesos de tamizaje a través de Western Blot, confirmando la presencia de los oligopéptidos fusionados a glutatión-S-transferasa (GST). Adicionalmente, 3 candidatos fueron secuenciados confirmando la ubicación de tirosina en las posiciones esperadas, y residuos de aminoácidos con carga como histidina, arginina y ácido glutámico. En conclusión, los métodos de tamizado genéticos de oligopéptidos semialeatorios permitieron la identificación de posibles péptidos biológicamente activos que poseen capacidad fotoprotectora.

Palabras Clave: *Saccharomyces cerevisiae*, fotoprotectora, oligopéptido, tamizado genético, irradiación UVB.

ABSTRACT

Here, we report two genetic screening methods for the identification of semi-random oligopeptides with photoprotective activity using the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. A plasmid library encoding for these oligopeptides was generated through *in vivo* cloning. The $\Delta rad9$ yeast mutant strain was transformed with the pEGH expression plasmid and semi-random DNA templates. Two genetic screenings were developed in parallel. In the first method, the transformed yeast was induced in a broth containing galactose, plated on selective media, and exposed to UVB radiation (302 nm). The photoprotective activity of the oligopeptides expressed in the surviving colonies was assessed by streaking in larger areas, followed by irradiation. Plasmids were extracted from candidates that showed greater growth, and the presence of cloned fragments was confirmed through restriction digestion. These plasmids were transformed into the $\Delta rad24$ yeast strain. We used replica plating to irradiate transformants on inducing media. Survivors underwent consecutive screenings via streaking and plating of serial dilutions, resulting in the selection of three candidates. In the second screening method, the initial $\Delta rad9$ transformants were plated on selective media. Subsequently, irradiation tests were conducted by replica plating, streaking, and serial dilutions. The selected plasmids were recovered for a second confirmation with the $\Delta rad24$ mutant strain, yielding one UV-resistant candidate. The plasmid expression of candidates obtained in both screenings was analyzed via Western Blot, confirming the presence of oligopeptides fused to glutathione-S-transferase (GST). Additionally, through sequencing we confirmed the presence of tyrosine, as expected, and other charged amino acid residues such as histidine, arginine, and glutamic acid. In conclusion, our genetic screening methods for semi-random oligopeptides enabled the identification of potential biologically active peptides with photoprotective properties.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, photoprotective, oligopeptides, genetic screenings, UVB radiation.

I. INTRODUCCIÓN

La radiación ultravioleta, principal fuente de energía en la tierra, es un factor fundamental para el desarrollo de la vida. Promueve la producción de vitamina D en la piel y, por lo tanto, cumple un papel protagónico en el mantenimiento de nuestra salud (Engelsen, 2010; Lucas et al., 2006; Trummer et al., 2016). Sin embargo, una excesiva exposición a esta se asocia con diferentes enfermedades del ser humano. Los rayos ultravioletas A y B, parte del espectro electromagnético emitido por el sol, afectan de manera sinérgica a nuestra epidermis y dermis (Sordo & Gutiérrez, 2013). Por ello, la radiación UV es considerada como el primer factor de riesgo responsable del desarrollo de cáncer a la piel, siendo clasificada como un agente cancerígeno del grupo 1 por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) (Cogliano et al., 2011; IARC, 2009).

Debido a la ubicación geográfica y a la topografía abrupta del territorio peruano, nuestro país presenta niveles de radiación ultravioleta considerados como extremadamente altos. En el caso de la costa y selva, la radiación solar oscila entre los índices 8 y 13 (alto y extremadamente alto). Por otro lado, las regiones andinas presentan niveles aún mayores entre 9 y 18 (muy alto y extremadamente alto). Esto se debe a que el grosor de la capa de ozono es menor en zonas con mayor altitud y, por ello, la sierra del Perú se ve en una situación más crítica (Rojas, 2018; Senamhi, 2018). Resulta oportuno señalar que, dependiendo de la actividad laboral de los individuos, estos pueden verse expuestos a un riesgo significativamente mayor. Diversos estudios han reportado que personas que trabajan al aire libre, estando expuestos constantemente a radiación solar, pueden doblar las probabilidades de desarrollar carcinoma de células escamosas y, aumentar en un 43% el riesgo de presentar un carcinoma de células basales (Schmitt, Seidler, Diepgen, & Bauer, 2011). Por ende, los productores que se dedican a actividades como la agropecuaria, cuyo número excede a los dos millones de personas, pertenecerían a la población peruana con mayor vulnerabilidad hacia los efectos nocivos de la radiación ultravioleta (INEI, 2014).

Dadas las condiciones que anteceden, la población nacional presenta una gran incidencia de neoplasias cutáneas. Según la Dirección General de Epidemiología (DGE), los casos de

cáncer de piel representan el 6,6% del total de cánceres registrados, ocupando el cuarto lugar en frecuencia en el país (Ramos & Rolando, 2013). Además, el Departamento de Epidemiología y Estadística del Cáncer del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN) ha señalado que se observa una evolución ascendente del número de casos de melanoma, pasando de 439 casos el año 2000 a 592 casos el año 2011 (Sordo & Gutiérrez, 2013). Ante la situación planteada, el Círculo Dermatológico del Perú (CIDERM) comenzó a realizar desde el año 1995 campañas de educación, prevención y detección temprana de cáncer de piel y melanoma, denominados “Día del Lunar”. El principal objetivo de estas campañas es crear conciencia de los efectos negativos derivados de la sobreexposición al sol y fomentar una cultura de prevención, incentivando el empleo de elementos que protejan contra la radiación UV, como el bloqueador solar (Redaccion EC, 2019; Redacción EC, 2019; Sordo & Gutiérrez, 2013).

Las lociones bloqueadoras son una importante defensa contra los graves efectos genotóxicos de la radiación UV. No obstante, existe un limitado número de componentes activos aprobados por entidades internacionales para su uso en bloqueadores solares. Solo son 16 los ingredientes aceptados por la FDA (Food and Drug Administration, Estados Unidos) (FDA, 2018), de los cuales algunos ya están siendo identificados como peligrosos contaminantes de ecosistemas marinos (Downs et al., 2016). Además, estudios han reportado que ciertos componentes llegan a ser absorbidos sistemáticamente en humanos, lo que genera efectos alérgicos y tóxicos severos (Ghazipura, McGowan, Arslan, & Hossain, 2017). Como puede observarse, existe la gran necesidad de identificar nuevos compuestos que posean un nivel de fotoprotección adecuado, no penetren la piel y reemplacen a estas fórmulas usadas en los protectores solares actuales que son potencialmente dañinas al medioambiente. Con este propósito, en el presente estudio se pretende identificar a oligopéptidos de secuencia semialeatoria que posean actividad fotoprotectora utilizando a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Radiación UV

La radiación ultravioleta, descubierta por Johann Wilhelm (Lodyga, Polan, Skotarczak, Mazur, & Adamski, 2015), es emitida por el sol. Dependiendo de su longitud de onda, esta se encuentra subdividida en los tres siguientes segmentos (Figura 1) (Friedberg et al., 2006):

- UVA (320 a 400 nm) – A pesar de ser la categoría con menor energía, representa el 95% del total de radiación UV emitida y es mínimamente atenuada por la capa de ozono. Penetra hasta las capas más profundas de la dermis, disrumpe el funcionamiento normal de las células, y afecta a vasos sanguíneos y a fibras de colágeno. Los rayos UVA dañan indirectamente al ADN, a través de la generación de especies reactivas de oxígeno, los cuales poseen una acción destructiva (Lodyga et al., 2015).
- UVB (295 a 320 nm) – comprende aproximadamente del 5-10% del espectro de radiación UV que llega a la superficie terrestre. Es absorbida por cromóforos en la capa cornea de la piel. Entre los elementos afectados se encuentran: melanina, ADN, ácido urocánico, proteínas, lípidos y aminoácidos. La radiación UVB daña directamente al ADN formando dímeros de pirimidina, los cuales, pueden llegar a generar mutaciones. Las reacciones inducidas por la radiación UVB son inmediatas, resultando en la liberación de mediadores inflamatorios que dilatan los capilares y causan la formación de eritemas.
- UVC (100 a 295nm) – Es el tipo de radiación UV más peligrosa ya que posee la menor longitud de onda y, por lo tanto, es la de mayor energía. Posee una alta mutagenicidad y una gran capacidad de generar eritemas. Además, es considerada como bactericida y bacteriostática, siendo utilizada en lámparas germicidas. No llega a incidir en la superficie terrestre ya que es absorbida por la capa de ozono en su totalidad (Lodyga et al., 2015).

La intensidad de radiación UV proveniente del sol incrementa con la altitud de la superficie terrestre. La radiación que llega a regiones altas transcurre por un camino más corto a través

de la atmósfera, lo que conlleva una menor absorción de estos rayos por la capa de ozono. En un cielo despejado, la dosis efectiva de radiación eritematosa incrementa en un 18% \pm 2% por cada 1000 metros de aumento en altitud (Blumthaler, Ambach, & Ellinger, 1997).

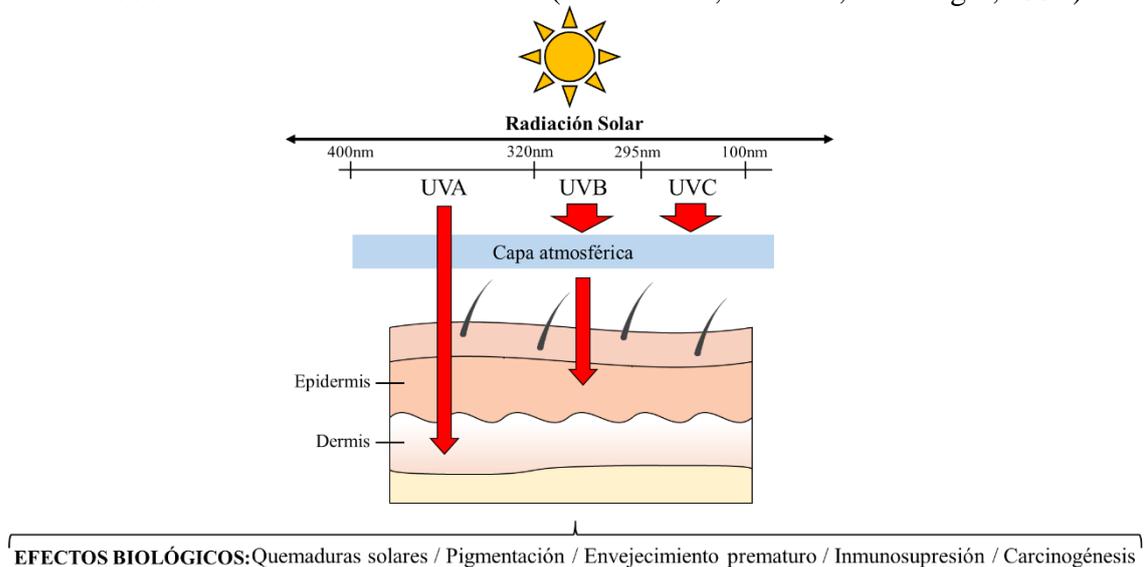


Figura 1: Incidencia de radiación UV en la piel y consecuencias biológicas.

2.2 Consecuencias biológicas

Desde los comienzos de la vida, los organismos han tenido que lidiar con los efectos genotóxicos causados por la radiación UV proveniente del sol. La atmósfera primitiva, antes de la formación de la capa de ozono, impidió que se genere vida en zonas donde no existía una capa protectora de agua contra esta radiación letal. Es solo cuando se generó una capa de ozono lo suficientemente gruesa (hace aproximadamente 600 millones de años) es que fue posible una masiva diversificación de la vida, tiempo conocido como la explosión Cámbrica. Luego de ello, hace aproximadamente 420 millones de años, los niveles de ozono aumentaron al punto de permitir que los organismos sobrevivan en la superficie de la tierra, periodo conocido como Silúrico (Berkner & Marshall, 1964).

En la actualidad, la radiación UV continúa generando efectos negativos para los organismos vivientes, siendo considerada una gran fuente de peligro. Al exponerse a radiación UV, los seres humanos pueden sufrir de las siguientes consecuencias adversas (Lodyga et al., 2015):

- Quemaduras solares – Se manifiestan en forma de eritema. Individuos con fotodermatosis son especialmente sensible a esta reacción.

- Pigmentación y envejecimiento prematuro – Se genera un fotoenvejecimiento en la piel, cuya presentación clínica incluye a líneas, arrugas, piel seca, hiperqueratosis, hiperpigmentación, telangiectasias y la pérdida de elasticidad.
- Inmunosupresión – Se reduce significativamente la cantidad de células Langerhans, lo que conlleva a la debilitación de los mecanismos de vigilancia inmunológica y consecuentemente contribuye al desarrollo de cáncer a la piel.
- Carcinogénesis – Se produce queratosis actínica y el carcinoma escamoso, como consecuencias de la exposición crónica a dosis acumulativas de radiación UV. Por otro lado, exposición periódica y excesiva (a dosis altas) durante la infancia puede ocasionar melanoma maligno y el carcinoma basocelular.

2.3 Fotoprotección

Entre las medidas de protección contra la radiación UV que la piel ha desarrollado, se encuentran: el engrosamiento de la capa epidérmica, diversos mecanismos de reparación de ADN, apoptosis, la acción de enzimas antioxidantes y pigmentación. Sin embargo, todas estas medidas endógenas pueden no ser suficientes. Es necesario tomar mayores esfuerzos para defendernos de los efectos deletéreos anteriormente mencionados. Por lo tanto, se debe evadir la exposición a la radiación solar (especialmente entre las 10am y 2pm), utilizar sombreros o gorros y ropa de materiales con un alto valor de protección solar y lentes de sol, además de aplicar de manera correcta y constante el bloqueador solar.

2.4 Bloqueadores solares

Por convenio, se define al valor FPS (factor de protección solar) como la medida de protección contra radiación UV de una determinada loción bloqueadora. Es calculada como la dosis mínima de radiación UV que causa una reacción eritematosa (enrojecimiento de la piel, DEM) usando el bloqueador solar, sobre la cantidad de radiación que resulta en el mismo efecto sin usar la loción. Se utiliza la siguiente fórmula (Schalka & Manoel, 2011):

$$\text{FPS} = \frac{\text{DEM (con protección)}}{\text{DEM (sin protección)}}$$

Se ha identificado que una loción con FPS de 15 provee una protección del 93% contra rayos UVB, así como de un 97% para un bloqueador de FPS 30 y de 98% para uno de FPS 50. Sin embargo, esto no viene a reflejar el nivel de protección real que confieren al ser aplicados

en la piel por los usuarios. Diversos factores como el sudor o las condiciones medio ambientales del momento generan que el valor de FPS esperado pueda disminuir hasta en 10 veces (Sivamani, Ghiya, & Maibach, 2010). Además, el público en general usa de manera errónea a las lociones bloqueadoras al aplicarlo en cantidades insuficientes (óptimo 2 mg/cm²), no utilizarlo con una periodicidad adecuada (cada dos horas o más al entrar en contacto con agua), o al pensar que valores de FPS altos garantizan una protección contra la radiación UV por un tiempo muy prolongado (Merino et al., 2018).

2.5 Filtros en bloqueadores

Dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas, pueden dividirse en (Schalka & Manoel, 2011):

- Filtros inorgánicos (mecanismo físico) – Son partículas de óxidos de metales los cuales son capaces de reflejar o dispersar la radiación incidente a través de mecanismos ópticos. Los más representativos son óxidos de zinc (ZnO) y dióxido de titanio (TiO₂). Las principales características de los filtros inorgánicos son su permeabilidad baja y alta fotoestabilidad.
- Filtros orgánicos (mecanismo químico) – Son moléculas que interfieren con la radiación incidente al absorberla. El filtro actúa como un cromóforo exógeno que absorbe la energía de un fotón, pasando a un estado excitado. Al retornar a su estado basal, libera la energía a una longitud de onda mayor, en el rango de luz visible (como fluorescencia) o en el rango de luz infrarroja (como calor).

Solo existen 16 ingredientes (filtros) activos que han sido aprobados para su uso en bloqueadores solares por la FDA (Food and Drug Administration, Estados Unidos), entre los cuales se encuentran los siguientes (FDA, 2018):

- Acido p-aminobenzoico (PABA)
- Avobenzona
- Cinoxato
- Dioxibenzona
- Homosalato
- Mentil antranilato
- Octocrileno
- Octil metoxicinamato

- Octil salicilato
- Benzofenona-3
- Padimato
- Ácido fenilbenzimidazol sulfónico
- Sulisobenzona
- Dioxido de titanio
- Salicilato de trolamina
- Oxido de zinc

A pesar de encontrarse entre la lista de principios activos aprobados para uso tópico en lociones para humanos, algunos de estos compuestos están siendo identificados como tóxicos. Uno de ellos es la benzofenona-3 (BP3) la cual ha estado en el mercado por varios años y solo recientemente ha llamado la atención del público. Estudios han reportado que el BP3 es absorbido sistemáticamente en humanos, a una razón de 2% luego de su aplicación en la piel. Además, se ha identificado que el BP3 está estadísticamente asociado a toxicidad reproductiva en humanos y animales. En humanos, la exposición a BP3 ha sido asociada con una disminución en edad gestacional, implicando un parto temprano. El peso de una niña recién nacida decrece en 21 gramos por unidad de incremento de la concentración de BP3 en la madre. Por otro lado, el peso de un niño recién nacido llega a aumentar entre 26-46 gramos por incremento de exposición maternal al BP3 (Ghazipura et al., 2017).

Adicionalmente, la benzofenona-3 ha sido identificada como contaminante de ambientes marinos por su alta genotoxicidad hacia corales, lo que causa una decoloración en ellos. El BP3 es un disruptor endocrino el cual induce la osificación de la plánula, siendo capaz de transformar a la larva plánula de un estado móvil a una condición sésil, lo que termina por encasillarla en su propio esqueleto (Downs et al., 2016). Es por ello que su uso en protectores solares ha sido prohibido en regiones como Hawaii (Moulite, 2018).

2.6 *Saccharomyces cerevisiae*

Comúnmente conocido como la levadura de la cerveza, ha sido a lo largo de la historia profundamente estudiado. Su enfoque y razón principal de investigación fue en un inicio el entendimiento de la fermentación alcohólica (Barnett, 1998). Luego, su estudio se popularizó hasta posicionarse como principal organismo modelo eucariótico por la facilidad con la que se puede manipular genéticamente. *Saccharomyces cerevisiae* ha sido el primer eucarionte en ser transformado con plásmidos, además de ser el primero con el cual se logró

la eliminación de genes (knockouts) y el primero en poseer su genoma completo secuenciado en el año 1996 (Sherman, 2002). Muchos aspectos de biología celular han sido explorados en este organismo, desde transducción de señales a control del ciclo celular. Los genes identificados han sido usados como sondas para descubrir vías metabólicas e identificar a sus homólogos en organismos mayores (Forsburg, 2001). La levadura puede crecer como haploide, lo que permite recuperar mutaciones recesivas. Por otro lado, también se puede desarrollar como diploide, pudiéndose realizar fáciles análisis genéticos como complementación, recombinación y epistasis.

2.6.1 Expresión génica

Saccharomyces cerevisiae es un excelente sistema para la expresión de proteínas recombinantes eucariontes ya que puede sobreexpresar a proteínas endógenas como heterólogas. Al ser de fácil manipulación genética, una cepa puede optimizarse para la expresión de proteínas específicas. Además, muchas proteínas eucariontes contienen modificaciones postraduccionales que pueden llevarse a cabo en la levadura, pero no en sistemas de expresión bacterianos. Por último, en comparación con sistemas de expresión por cultivo de células de mamíferos, *Saccharomyces cerevisiae* crece mucho más rápido y a menor costo, pudiéndose realizar cultivos a mayor escala con altos niveles de eficiencia y rentabilidad (Ostergad, Olsson, & Nielsen, 2000).

2.7 Bibliotecas de plásmidos codificantes de péptidos semialeatorios

Durante las últimas décadas ha habido un incremento en la demanda de péptidos biológicamente activos para una variedad de finalidades, entre las que se encuentran: actividad antioxidante, como péptidos bioactivos en hidrolizados de cañihua (Chirinos et al., 2018); capacidad antimicrobiana, como péptidos derivados de pediocina PA-1 (Albayrak, 2011); el desarrollo de vacunas y, finalmente, estudios estructurales donde péptidos son usados para identificar los factores que influyen la estructura tridimensional de las proteínas. Un factor limitante es el tiempo y esfuerzo que demanda trabajar con una molécula a la vez. Por ello es que se están desarrollando maneras de sintetizar grandes números de péptidos de manera económica, confiable y rápida (Lloyd-Williams, Albericio, & Giralt, 1997). Otro factor es la necesidad de desarrollar nuevas estrategias para tamizarlos entre un pool de péptidos expresados en una biblioteca. Un ejemplo utilizando la levadura es el ensayo de doble híbrido el cual es una herramienta poderosa para descifrar interacciones

entre proteínas para dilucidar vías metabólicas (Albayrak, 2011; Barreto, Aparicio, Bharathikumar, DeCoteau, & Geyer, 2012).

2.7.1 Plásmido pEGH

Es el plásmido que se empleará en este estudio. Fue inicialmente reportado en 1993 como herramienta de expresión de la proteína Ras2, la cual requiere la incorporación de modificaciones postraduccionales para su correcta funcionalidad (Mitchell, Marshall, & Deschenes, 1993). Este vector, cuya secuencia completa es conocida, ha sido desde entonces ampliamente usado como plásmido de expresión para la producción de altos niveles de proteínas fusionadas con la etiqueta glutatión-S-transferasa (GST) en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Pierce & Wendland, 2016) (Figura 2).

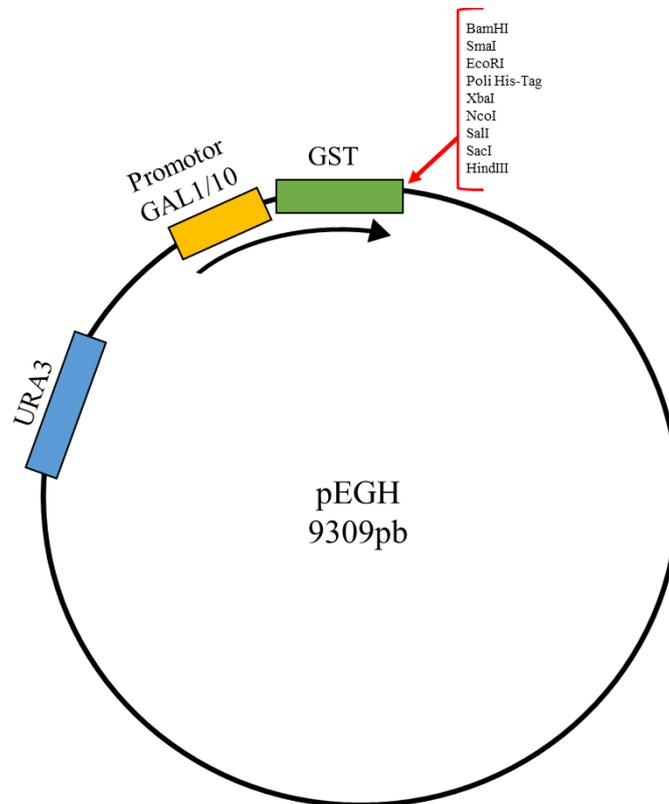


Figura 2: Principales características del plásmido de expresión pEGH. GST: Gen codificante para la glutatión-S-transferasa; PGAL: Promotor que regula la expresión de genes responsables del metabolismo de galactosa; URA3: Gen que codifica para la orotidina-5-fosfato descarboxilasa y funciona como un marcador de selección de transformantes en medios sintéticos que carecen de uracilo.

El plásmido controla la expresión génica de estas proteínas químicas mediante el promotor *GAL1/10*, el cual es inducido con la presencia de galactosa en el medio y reprimido por glucosa (West, Chen, Putz, Butler, & Banerjee, 1987) (Figura 3).

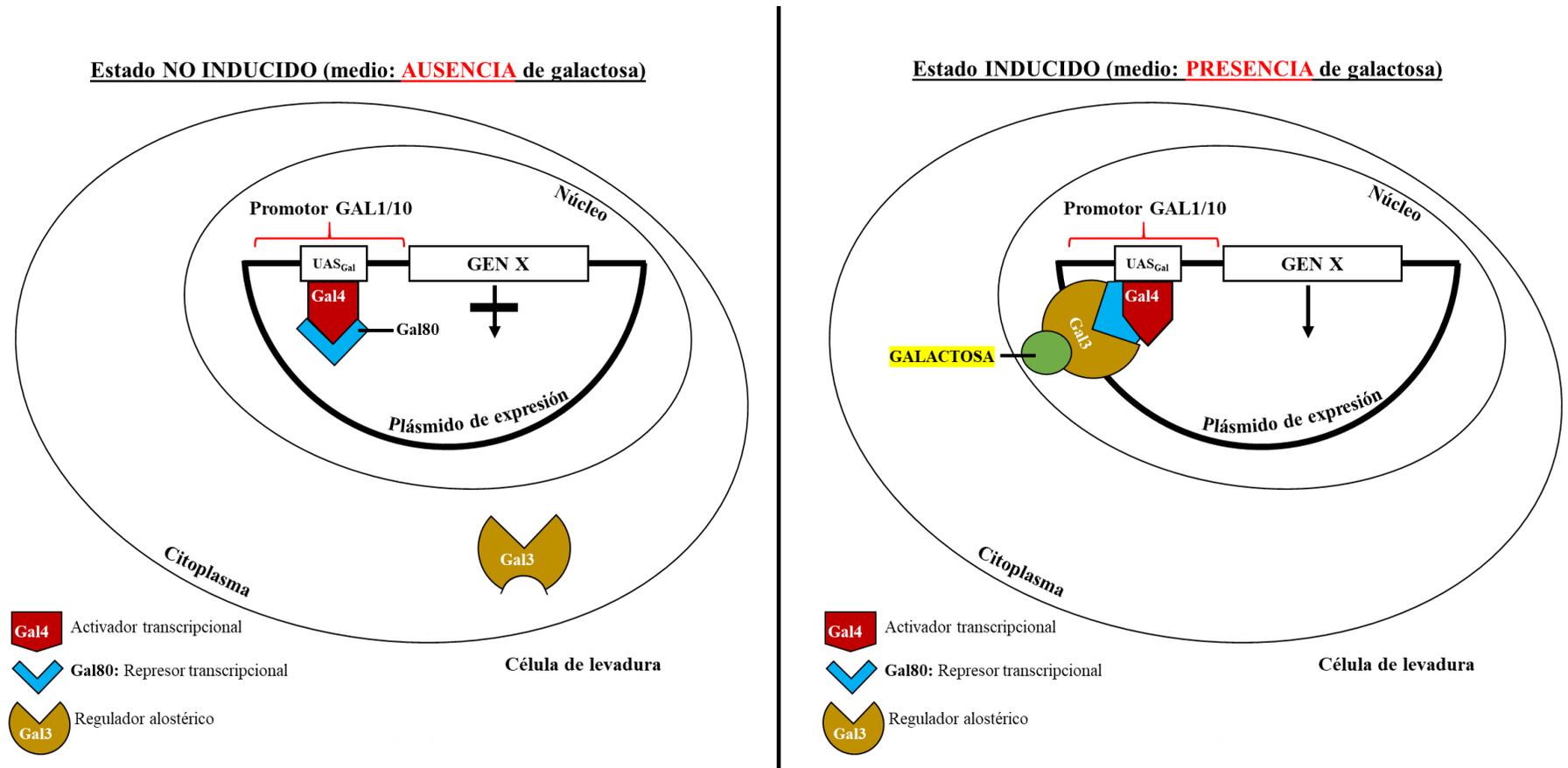


Figura 3: Representación gráfica del sistema de expresión regulada por el promotor GAL1/10 del plásmido pEGH. Izquierda: Estado reprimido del promotor en un medio carente de galactosa. El factor de transcripción Gal4 es inactivado por el represor transcripcional Gal80. Derecha: Estado inducido del promotor en un medio cuya fuente de carbono es la galactosa. El regulador alostérico Gal3 es activado y transportado al núcleo celular en donde se liga y genera un cambio estructural en el represor Gal80, lo que permite la activación del factor transcripcional Gal4

III. METODOLOGÍA

3.1 Lugar de ejecución

La 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

Tabla 1: Cepas y plásmidos

	Descripción
Cepa	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> W303	Genotipo: <i>MATa leu2-3,112 his3-11,15 ura3-1 ade2-1 can1-100 trp1-1</i> (Thomas y Rothstein 1989).
<i>Δrad9</i>	Derivado de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> W303, (<i>Δrad9</i>) Cepa sensible a radiación UV
<i>Δrad24</i>	Derivado de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> W303, (<i>Δrad24</i>) Cepa sensible a radiación UV
TOP10	Cepa de <i>E. coli</i> para clonación
Plásmido	
pEGH	Vector de clonación. (promotor <i>GAL1/10</i> , marcador de selección <i>URA3</i> , expresión de proteínas fusionadas a GST)

3.2.2 Materiales de uso rutinario

- Matraces
- Micropipetas
- Palitos de dientes estériles
- Pipetas y micropipetas
- Tubos de ensayo estériles (15ml y 50ml)
- Microplatos
- Piezas de terciopelo
- Agua destilada estéril
- Tubos de microcentrífugas

3.2.3 Medios de cultivo

- Medio Agar -URA glucosa (medio de cultivo sintético carente de uracilo + glucosa)
- Medio Agar -URA rafinosa (medio de cultivo sintético carente de uracilo + rafinosa)

- Medio YPD (Yeast extract peptone dextrose)
- Medio YEP rafinosa/galactosa (Medio rico para inducción de expresión de oligopeptidos)
- Medio Luria Bertani

3.2.4 Soluciones y reactivos

- Alcohol al 70% y al 90%
- Solución tampón 0.5X TE
- Isopropanol
- 10x Acetato de Litio/TE
- Solución tampón de ruptura
- Solución tampón de electroforesis TBE 0.5X

3.2.5 Reactivos de Biología molecular

- Agarosa
- Azul de bromofenol
- Bromuro de etidio
- Buffer para ADN polimerasa termoestable
- Cloruro de magnesio
- Desoxirribonucleótidos (dNTPs)
- ADN de esperma de salmón
- Marcador 100bp de ADN
- Marcador 1kb de ADN
- Taq ADN polimerasa
- Enzimas de restricción *SalI*, *HindIII* y *BamHI*

3.2.6 Equipos

- Agitador con baño María
- Balanza analítica
- Congeladoras de -20°C y 80°C
- Equipo baño María
- Incubadora
- Refrigeradora
- Agitador rotatorio
- Mezclador de vórtice
- Sonicador

- Termociclador
- Transiluminador

3.3 Métodos

3.3.1 Generación de fragmentos semialeatorios (SAdir) por PCR

El diseño del PCR se basó en dos ciclos: en el primero se colocó a las dos plantillas de extensión complementarias SAdir y EXTrv, en el segundo se añadieron a los cebadores EG22rv y EG24dir para una mayor amplificación del fragmento completo (Figura 4). Se utilizaron plantillas diseñadas anteriormente en el mismo laboratorio (Chávez, 2018) (Tabla 2, Figura 5).

En reacción con un volumen final de 25µl se utilizó: 0.5µl de la plantilla SAdir (5mM), 0.5µl de la plantilla complementaria EXTrv (5mM), 0.5µl de los cebadores EG22rv y EG24dir (50mM), 0.25µl de la enzima Taq DNA polymerase, 2.5µl del 10X Taq Buffer, 0.625µl de nNTPs (10mM) y 1.25µl de MgCl (50mM). Los parámetros que se utilizaron fueron:

Ciclo1 (Sin incluir cebadores)	Ciclo 2 (Cebadores añadidos)
Desnaturalización: 95°C x 30 segundos	Desnaturalización: 95°C x 30 segundos
Hibridación: 69°C x30 segundos	Hibridación: 69°C x30 segundos
Extensión: 72°C x20 segundos	Extensión: 72°C x20 segundos

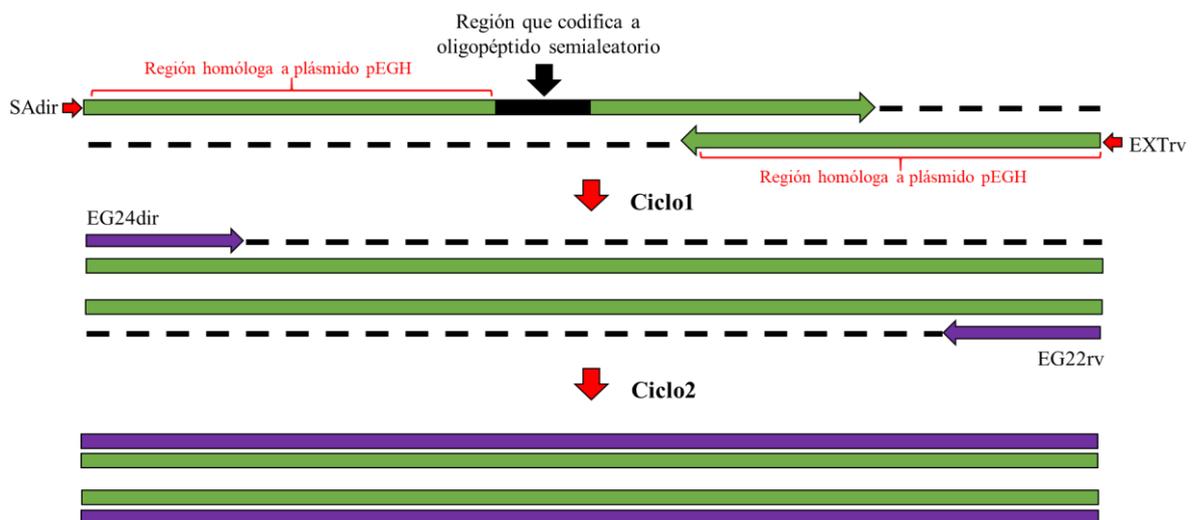


Figura 4: Representación de la reacción de PCR utilizada para la construcción de los fragmentos semialeatorios. En el primer ciclo se utilizaron dos plantillas de extensión SAdir y EXTrv (en verde) para la generación del producto completo, en el segundo ciclo se produce una amplificación utilizando los cebadores EG24dir y EG22rv con secuencias derivadas de los extremos de este.

Tabla 2: Secuencias de los oligonucleótidos usados como plantillas y cebadores en la obtención de los fragmentos a ser clonados.

Nombre	Secuencia	Número de bases
Plantilla Semialeatoria SAdir	TCG CAT CAC CAT CAC CAT CAC GGT GGT GGT CTA GAC TCC ATG GGT CGA CNN N ₆ TAY (N ₉ TAY) ₃ TGK TAY TAA TCG AGC TCA AGC TTA ATT CAT CGT GAC TGA CTG ACG ATC TGC CTC	150
Plantilla complementaria de extensión EXTrv	CA GAG GTT TTC ACC GTC ATC ACC GAA ACG CGC GAG GCA GAT CGT CAG TCA GTC ACG	56
Cebador EG24dir	TCG CAT CAC CAT CAC CAT CAC GG	23
Cebador EG22rv	CA GAG GTT TTC ACC GTC ATC AC	22

N representa a cualquier base: A, T, C, o G; Y representa a la base T o C para formar los codones TAT o TAC (codificantes para tirosina). K representa a la base G o T para formar los codones TGG o TGT (codificantes para triptófano y cisteína, respectivamente)



Figura 5: Descripción detallada de la correspondencia de bases en la construcción y amplificación del fragmento SAdir. Las plantillas y cebadores están indicados según el gráfico anterior.

3.3.2 Digestión del plásmido pEGH y tratamiento con fosfatasa

Se trató 5µg del plásmido pEGH con la enzima de restricción *SalI* (secuencia de reconocimiento: g/tcgac) por 3 horas. Luego se inactivó a la enzima a 95°C y se purificó el ADN digerido removiendo proteínas y sales del medio. Inmediatamente se trató con la enzima fosfatasa antártica (New England Biolabs) para la desfosforilación de los extremos 5'- del ADN plasmídico y evitar su posible recircularización.

3.3.3 Transformación de *Saccharomyces cerevisiae* y clonaje in vivo

Se utilizó una suspensión de la cepa mutante *Δrad9*, para realizar las siguientes transformaciones: con el plásmido pEGH digerido por *SalI* (170ng) y el fragmento de SAdir a clonar (30ng), con el plásmido pEGH digerido por *SalI* (control negativo), y con el plásmido pEGH sin digerir (control positivo) (Figura 6). Se empleó un protocolo de transformación que utiliza acetato de litio y choque térmico a 42°C. Se incubaron a los transformantes por una hora en caldo YEP refinosa, y fueron sembrados en medio selectivo carente de uracilo (Guthrie & Fink, 1991; Sherman, 2002).

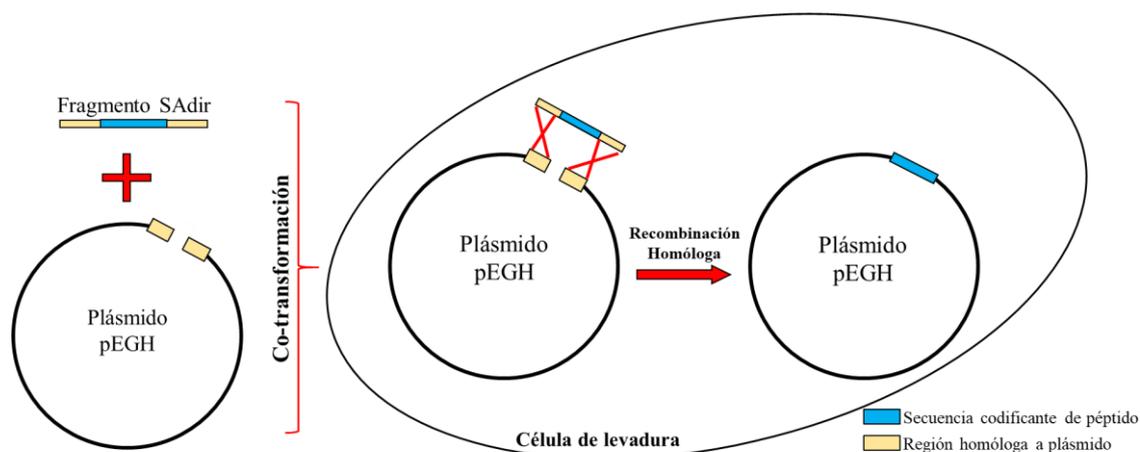


Figura 6: Representación del mecanismo de clonaje *in vivo* realizado por *Saccharomyces cerevisiae*

3.3.4 Tamizado de transformantes

En el tamizado de transformantes para la selección de oligopéptidos con capacidad fotoprotectora se probaron dos procedimientos en paralelo (Guthrie & Fink, 1991; Sherman, 2002).

3.3.4.1 Primer procedimiento

Inmediatamente luego de transformar a la levadura, se cambió el medio YEP refinosa (utilizado para resuspender e incubar a las células transformadas por una hora) con caldo -

URA rafinosa/galactosa y se dejó incubando por 15 horas a 30°C. Luego se plaqueó cada transformación en medio selectivo -URA glucosa. Al pasar 30 minutos se procedió a irradiar cada placa con lámpara UVB (302nm), proveniente de un transiluminador VWR de cuatro tubos de 8 W. Las colonias que crecieron fueron consideradas candidatos que expresan oligopéptidos que poseen una posible capacidad fotoprotectora. A continuación, se transfirió a estos candidatos en medio -URA rafinosa y se dejó crecer por 4 días a 30°C. Se evaluó la fotoprotección de estos al sembrarlos en áreas de 4 cm² en placas -URA glucosa (control de crecimiento), YPD en duplicado (Control de crecimiento) y YEP rafinosa/galactosa (contiene el inductor galactosa). Luego de incubar a una placa YPD y a la placa de YEP rafinosa/galactosa por 4 horas a 30°C (con el objetivo de inducir la expresión) se las irradió por 12 segundos a 12cm de distancia. De esta manera se seleccionaron a los que presenten un mayor crecimiento en la placa con el inductor YEP rafinosa/galactosa (Figura 7). Se realizó un segundo tamizado siguiendo el mismo procedimiento anterior, pero sembrando a los candidatos elegidos en áreas de 8cm². De esta manera, se redujo el número de candidatos iniciales.

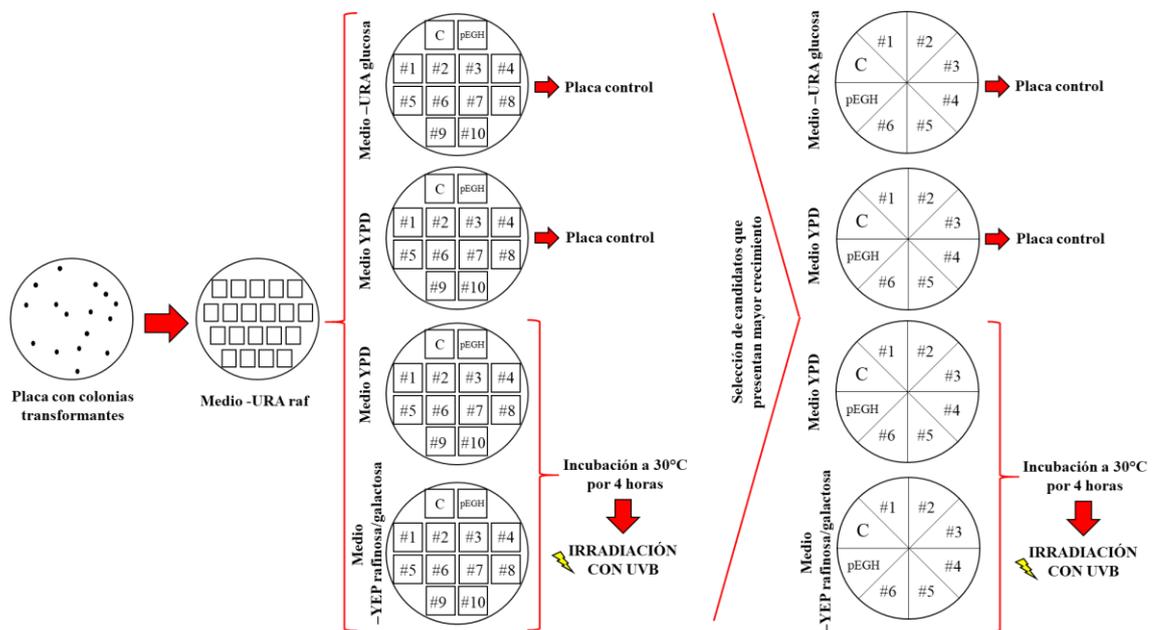


Figura 7: Representación de parte de la metodología utilizada en el primer procedimiento de tamizaje. Se sembró en medio -URA rafinosa a cada candidato que haya crecido en la placa de transformación irradiada. Luego se realizaron dos pruebas de tamizado sembrando en áreas de 4cm² y 8 cm² con cada candidato para seleccionar a los que presenten un mayor crecimiento luego de irradiar a la placa con medio inductor (YEP rafinosa/galactosa)

Posteriormente se extrajo el ADN total de cada candidato elegido para recuperar y purificar el plásmido utilizando *Escherichia coli*. La presencia del fragmento clonado fue confirmada por digestión con enzimas de restricción. Al ser el número de plásmidos seleccionados a este

nivel alto (46) se decidió mezclarlos en cantidades proporcionales. Esta mezcla de plásmidos seleccionados fue utilizada para transformar a la cepa mutante *Δrad24*, la cual también posee sensibilidad a radiación UV y una mayor estabilidad genética en comparación a la cepa mutante *Δrad9*, usada en la fase inicial. Los transformantes fueron plaqueados en medio -URA rafinosa. Luego de tres días de crecimiento las colonias formadas se replicaron a placas conteniendo medio -URA glucosa y YEP rafinosa/galactosa (Figura 8). Estos últimos fueron irradiados después de incubarlos por 4 horas a 30°C. Las colonias que crecieron en el medio con inductor fueron identificadas en las placas de -URA glucosa y seleccionadas. Se verificó nuevamente la capacidad fotoprotectora de estas colonias sembrándolas en áreas de 4cm² y 8 cm² (procedimiento explicado anteriormente). Como prueba final se dejó crecer a saturación a las candidatas y se plaquearon diluciones seriadas en medio -URA glucosa (control), medio YPD en duplicado (control), y medio YEP rafinosa/galactosa (medio con inductor). Luego de incubar a las placas YPD y YEP rafinosa/galactosa por 4 horas a 30°C, fueron irradiadas. Se seleccionó a los candidatos que presenten el fenotipo deseado (mayor crecimiento en la placa con inductor irradiada) (Figura 9).

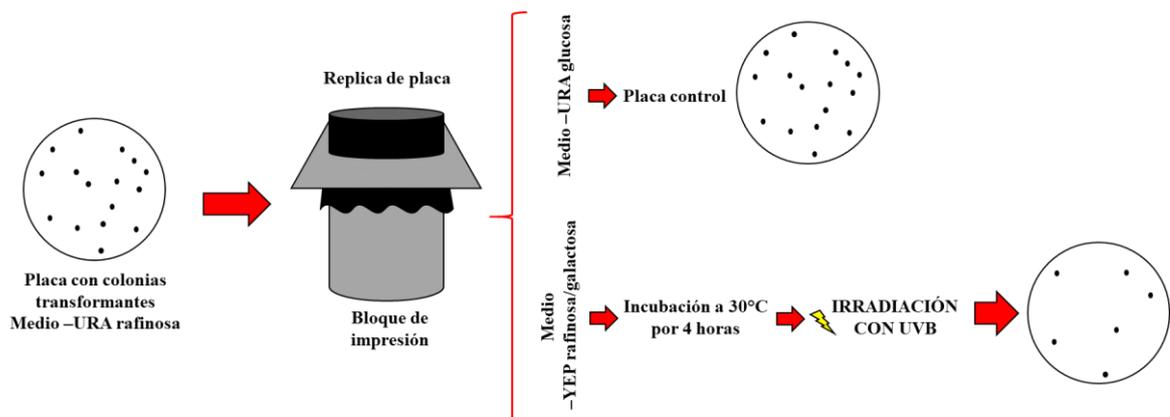


Figura 8: Replica de placa realizada con las placas de -URA rafinosa que han sido sembradas con transformantes. Se utilizaron a los medio -URA glucosa y YEP rafinosa/galactosa para la réplica, siendo este último irradiado. Se escogieron a los candidatos que presentaron crecimiento luego de la irradiación.

3.3.4.2 Segundo procedimiento

Cada transformación de la cepa mutante *Δrad9*, realizada con los fragmentos semialeatorios y el plásmido pEGH digerido, se plaqueó en medio -URA rafinosa y se incubó por 3 días a 30°. Las colonias formadas se replicaron a las placas con medio -URA glucosa y YEP rafinosa/galactosa (Figura 8). Estos últimos fueron irradiados después de ser incubadas por 4 horas a temperatura ambiente. Las colonias que crecieron después de ser irradiadas en el medio con inductor fueron identificadas en las placas de -URA glucosa y seleccionadas.

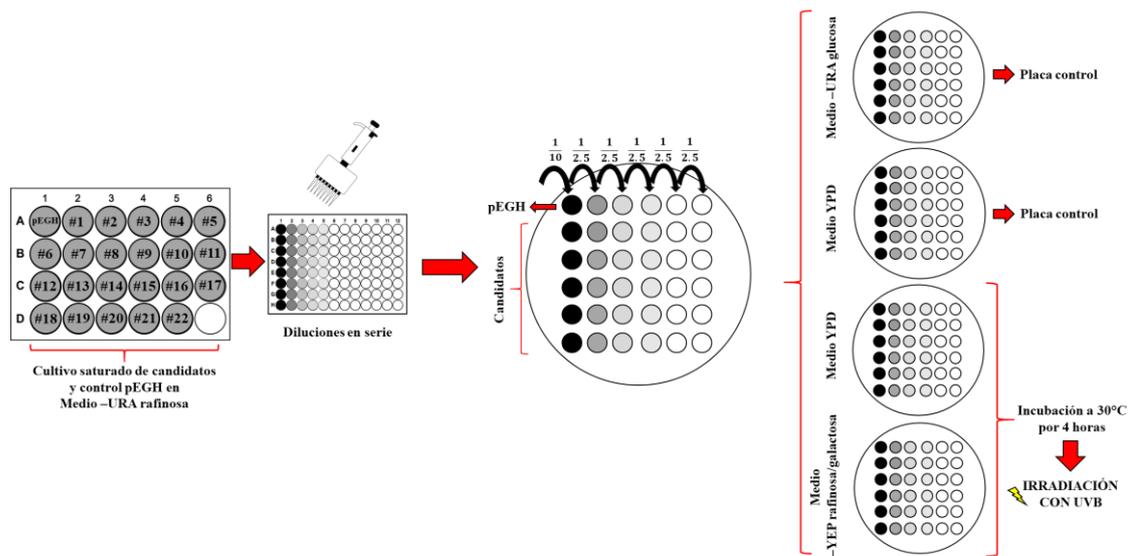


Figura 9: Representación del procedimiento seguido para la realización de la prueba de verificación con diluciones seriadas de los candidatos seleccionados previamente. Se dejó crecer a saturación a cada candidato en medio -URA rafinosa y luego se realizaron diluciones seriadas que fueron plaqueadas en medios control (-URA glucosa, YPD) y medios sujetos a tratamiento con radiación UV (YEP rafinosa galactosa y YPD). Se seleccionaron a los candidatos que presenten un mayor crecimiento luego de irradiar a la placa con medio inductor (YEP rafinosa/galactosa)

Se evaluó nuevamente la capacidad fotoprotectora de estas colonias al sembrarlas en áreas de 4cm^2 y 8cm^2 e irradiarlas, siguiendo el mismo procedimiento explicado anteriormente (Figura 7). Se realizó el plaqueo de diluciones seriadas de los candidatos seleccionados a este punto para confirmar la capacidad fotoprotectora presente en cada candidato seleccionado (Figura 9). Se extrajo el ADN total de las colonias finalmente seleccionadas para recuperar y purificar el plásmido correspondiente, luego de lograr su amplificación en *Escherichia coli*. La presencia del fragmento clonado fue confirmada por digestión. Se retransformó a la levadura con los plásmidos obtenidos y se realizó el plaqueo de diluciones seriadas nuevamente para comprobar la actividad fotoprotectora del oligopéptido codificado en ellos (Figura 9).

3.3.5 Recuperación del ADN total de los transformantes

Los transformantes seleccionados fueron sembrados en 3,5 ml de caldo de -URA glucosa y se dejaron crecer por 2 días a 30°C . Luego se centrifugó 3 ml de las suspensiones de células eliminando el sobrenadante y resuspendiendo en el líquido remanente. Se agregó 200 μl del buffer de ruptura de levaduras (1.2% SDS, 100mM NaCl, 10mM Tris pH 8.0, 1mM EDTA), además, se agregaron suficientes perlitas de vidrio (mitad del volumen) y 200 μl de una mezcla de fenol/cloroformo. Se mezcló en vortex por aproximadamente 2 minutos y luego se centrifugó a máxima velocidad. El sobrenadante acuoso fue retirado y transferido a un

tubo nuevo. Se precipitó a los ácidos nucleicos tratando al sobrenadante con acetato de amonio 10M y alcohol etílico helado. El sedimento de ADN fue resuspendido en 50 µl de solución tampón TE (Guthrie & Fink, 1991).

3.3.6 Transformación de *E. coli* por electroporación y purificación de plásmidos amplificados.

Se transformó con cada ADN total recuperado de los candidatos seleccionados a la cepa TOP10 de *Escherichia coli* (*F*-*mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)- Φ 80*lacZ* Δ *M15- Δ lacX74* *recA1* *araD139- Δ (araleu)* *galU galK rps 7697 L (StrR) endA1 nupG*). Para la preparación de las células electrocompetentes se dejó crecer un inóculo en 20 ml de caldo LB a 37°C durante toda la noche. Luego se diluyó hasta alcanzar una densidad óptica a 600nm (DO_{600nm}) de 0.1 en 50 ml de caldo LB y se dejó crecer hasta una DO_{600nm} de 0.5. Se centrifugó el volumen total a 4°C por 10 minutos y luego se realizaron dos lavados con 40 ml de agua destilada estéril helada. Se resuspendió en 1ml de agua destilada estéril.

Para la electroporación se mezclaron 40 µl de la suspensión celular competente con 1 µl de la solución de ADN total recuperado de cada transformante. Se lo sometió a un pulso eléctrico de 1700V utilizando cubetas de electroporación de 1mm. Se añadió 1ml de caldo LB y se transfirió la suspensión a tubos de microcentrífuga para incubarlos a 37°C por una hora. Finalmente se plaqueó en medio LB-ampicilina.

Para la purificación de plásmidos se realizó un cultivo de 3ml de caldo LB-ampicilina y se dejó incubando por una noche. Se colectaron las células por centrifugación y luego se eliminó el sobrenadante. A cada tubo se le añadió 100 µl de la solución tampón fría GTE. Se agitó en vortex y se añadió 200 µl de SDS/NaOH. Luego, se mezcló por inversión, se añadió 100 µl de una mezcla de 3M acetato de potasio con fenol (7:3) y se mezcló vigorosamente por 30 segundos. Se centrifugó y recuperó el sobrenadante con el cual se realizó la precipitación de ácidos nucleicos utilizando isopropanol. Se realizaron lavados con etanol al 90% y luego se disolvió al sedimento con 50 µl de la solución tampón TE con RNasa 20 µg/ml. Se dejó incubar por 30 minutos a 37°C y se guardaron a los plásmidos purificados a -20°C.

3.3.7 Verificación de presencia de fragmento mediante digestión

Cada plásmido fue digerido con las enzimas BamHI y HindIII. Para ello se mezcló 10 µl del plásmido purificado o 5 µl del plásmido pEGH control, 0.5 µl de cada enzima de restricción, 2 µl de la solución tampón 10X, 0.25 µl de albúmina de suero bovino 10mg/ml y agua

destilada estéril para un volumen final de 20 μ l. Se dejó incubando por 2 horas a 37°C. Para revelar la presencia del fragmento se realizó electroforesis en gel de agarosa 2%.

3.3.8 Secuenciación de nucleótidos de los plásmidos seleccionados.

Para el secuenciamiento de los plásmidos seleccionados se los purificó utilizando el kit Zyppy Plasmid Miniprep de ZYMO RESEARCH. Los análisis de secuenciación fueron realizados por la compañía MacroGen Inc., Seúl-Korea del Sur (www.macrogen.com).

3.3.9 Análisis de expresión génica de los oligopéptidos sintetizados

Se utilizaron cultivos de la cepa *Δrad24* transformada con los plásmidos seleccionados de la biblioteca para evaluar el nivel de expresión génica producida luego de 4 horas de inducción. Para ello se partió de un cultivo a saturación en caldo -URA glucosa el cual fue utilizado para inocular 15ml de caldo -URA rafinosa a una DO_{600nm} de 0.05. Se dejó incubando en agitación a 30°C hasta llegar a una DO_{600nm} de 1 (aproximadamente 16 horas). Luego se centrifugó todo el cultivo para resuspender el sedimento celular en 15ml de caldo -URA rafinosa/galactosa (medio inductor de expresión génica). Se tomaron alícuotas en los siguientes tiempos: 0 y 4 horas de inducción. Inmediatamente luego de la toma de alícuotas se las centrifugó y el sedimento fue congelado a -80°C (Figura 10). Al momento de hacer la lisis celular se resuspendió el pellet con PBS glicerol 10% y se le sometió a agitación utilizando perlas de vidrio en un mezclador de vórtice. Los extractos proteicos fueron obtenidos después de una centrifugación. Se procedió a la cuantificación de la concentración de proteínas totales utilizando el ensayo BCA de PierceTM. Luego se cargó una cantidad igual (50 a 200ug) de proteínas en un gel de 12% de poliacrilamida para realizar la electroforesis. Para la tinción de membrana de nitrocelulosa se utilizó el kit PierceTM Reversible Protein Stain. Posteriormente se realizó el immunoblotting usando un anticuerpo monoclonal anti-GST (Novagen) a una dilución de 1:5000 y un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa a una dilución de 1:1000. Para la detección, se usó un kit de Quimioluminiscencia (Pierce) y autoradiografía.



Figura 10: Protocolo de inducción de expresión y recuperación de proteínas

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Obtención de fragmentos semialeatorios mediante PCR

Utilizando parámetros de PCR previamente optimizados en el laboratorio, se amplificó a la plantilla semialeatoria que luego fue utilizada para la construcción de la biblioteca de plásmidos en *Saccharomyces cerevisiae*. Como control se amplificó a la plantilla WYdir, cuyo producto dio referencia al tamaño esperado para el resto de los fragmentos. Finalmente, se procedió a juntar cada reacción generando una mezcla única y diversa de fragmentos semialeatorios (Figura 11).

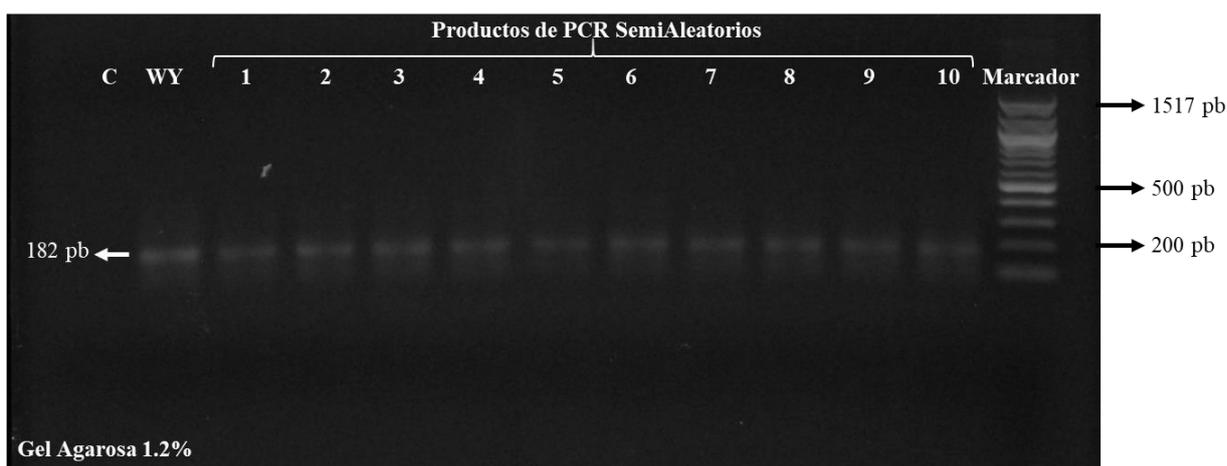


Figura 11: Análisis electroforético en gel de agarosa (1.2%) de la amplificación de las plantillas WYdir y SAdir. Para ambas reacciones se utilizó a la misma plantilla complementaria EXTrv y a los cebadores EG24dir y EG22dir. Se cargaron alícuotas de 4 μ l.

4.2 Digestión de plásmido pEGH y tratamiento con fosfatasa antártica.

Previo a la co-transformación de pEGH con los fragmentos semialeatorios, se digirió a este plásmido utilizando a la enzima de restricción *SalI* y se procedió a tratarlo con la enzima fosfatasa antártica, generando finalmente a un vector linealizado cuyos extremos 5' se encuentran desfosforilados (Figura 12). La importancia de este proceso radica en que la presencia del plásmido lineal estimula a la maquinaria de recombinación en la levadura e incrementa significativamente la eficiencia de clonaje *in vivo* (Orr-Weaver, Szostak, & Rothstein, 1981). Al utilizar un vector digerido que contiene un marcador de selección como

URA3 y sembrar en un medio carente de uracilo, solo se permitirá que las células de levadura recombinantes crezcan. Estos transformantes habrán llegado a recircularizar el plásmido (URA^+) y, en el proceso, habrán integrado a la secuencia de ADN de interés al vector (Oldenburg, Vo, Michaelis, & Paddon, 1997).

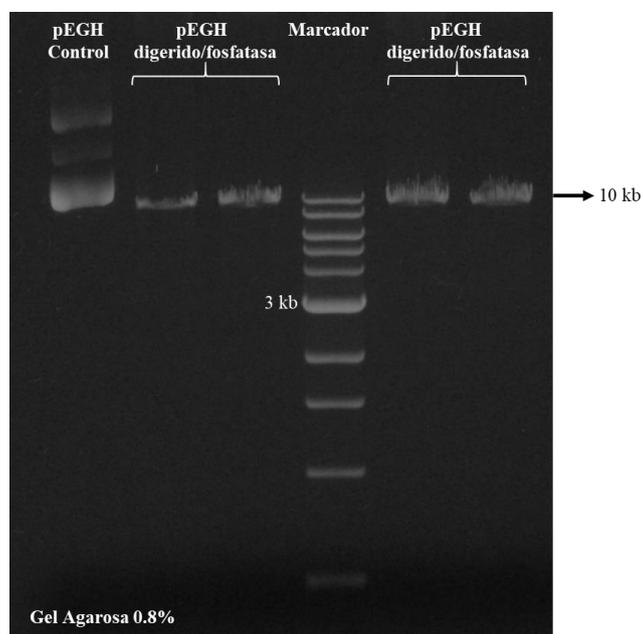


Figura 12: Análisis electroforético en gel de agarosa 0.8% del plásmido pEGH digerido con la enzima *SaI* y tratado con la enzima fosfatasa antártica. El tamaño esperado del vector linealizado es de 9309pb. Como control se utilizó al plásmido pEGH sin digerir.

4.3 Primer procedimiento de tamizado de transformantes.

4.3.1 Clonaje in vivo y selección de candidatos iniciales

Se utilizó la cepa mutante de $\Delta rad9$ de *Saccharomyces cerevisiae*. El producto del gen *RAD9* es esencial para el arresto inducido por daño al ADN durante la división celular. Al ser irradiadas con luz ultravioleta, células de levadura con esta mutación continuarán dividiéndose sin corregir lesiones letales a su ADN, por lo que terminan muriendo (Weinert & Hartwell, 1988). Aprovechando esta sensibilidad a luz UV, utilizamos esta cepa para clonación *in vivo* y tamizaje. Se obtuvo una eficiencia de clonación de 9.5×10^3 colonias por μg de ADN total (a una proporción molar de aproximadamente 1:9 de vector: fragmento), calculada como $[(\# \text{transformantes pEGH digerido/fosfatasa/semialeatorio} - \# \text{transformantes pEGH digerido/fosfatasa}) \times 5]$ (Figura 13 y 14). Se debe tomar en cuenta que, durante este proceso se incubó, durante aproximadamente 16 horas, a las células transformantes en caldo -URA rafinosa/galactosa para inducir la expresión. Por ello, es posible que los transformantes hayan, por lo menos, duplicado su número antes de ser plaqueados.

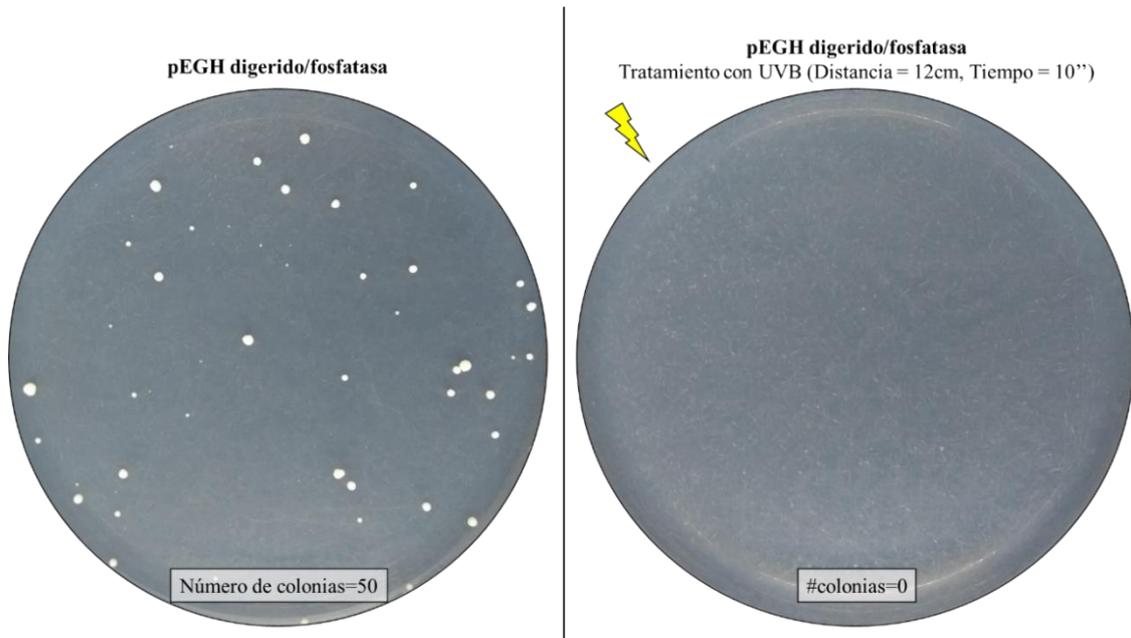


Figura 13: Transformantes de levadura obtenidos al utilizar solo el plásmido linealizado y tratado por fosfatasa antártica. Izquierda: Placa control de transformantes que hayan recircularizado el plásmido. Derecha: Placa control de transformantes que hayan recircularizado el plásmido y sobrevivido a un tratamiento con UVB por 10 segundos a 12 centímetros.

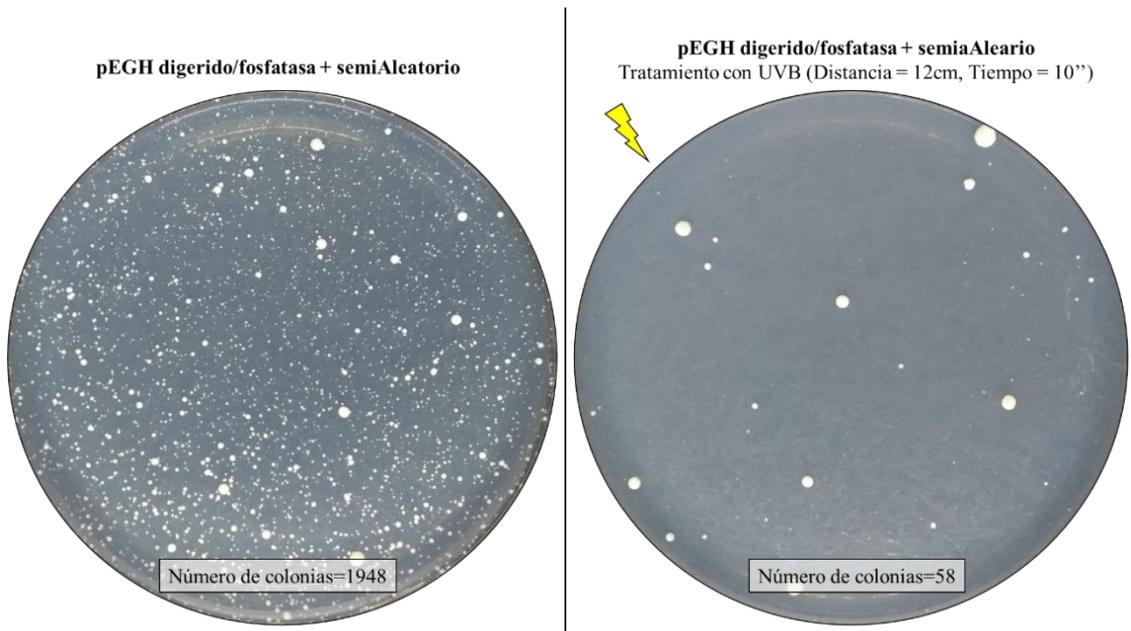


Figura 14: Transformantes de levadura obtenidos por clonaje *in vivo* del fragmento semialeatorio. Izquierda: Placa control de transformantes semialeatorios. Derecha: Placa control de transformantes semialeatorios que sobrevivieron a un tratamiento con UVB por 10 segundos a 12 centímetros.

Se observó que, cuando los transformantes obtenidos por clonaje *in vivo* fueron irradiados con UVB (12 centímetros de distancia por 10 segundos), sobrevivieron solo el 2.5% de ellos. Estas colonias fueron consideradas como posibles candidatos los cuales poseen una actividad fotoprotectora inherente al oligopéptido semialeatorio que disponen y se las replicó en medio -URA rafinosa. El número de colonias obtenido al aumentar la dosis de irradiación en 5 y

10 segundos se redujo significativamente, presentando un porcentaje de sobrevivencia de aproximadamente 0.1%. Por ello, en las repeticiones realizadas de este primer paso se continuó trabajando con los parámetros descritos anteriormente.

4.3.2 Pruebas de tamizado secuenciales por sembrado

A continuación, se procedió a realizar las pruebas de tamizaje en áreas de 4cm² y 8cm², lo que permitió seleccionar secuencialmente a los mejores candidatos, reduciendo en gran cantidad a los escogidos inicialmente (Figura 15). Los tiempos de exposición a UVB utilizados (12 y 11 segundos, respectivamente), evidenciaron diferencias en crecimiento al irradiar a los candidatos que se sembraron e incubaron por 4 horas en placas con medio YEP refinosa/galactosa. Estas variaciones no fueron claramente observadas al irradiar a los candidatos que se sembraron e incubaron por 4 horas en placas con medio YPD.

Como resultado de las pruebas anteriores se identificaron a 46 candidatos. Al estar trabajando con células que fueron inicialmente irradiadas (en el primer paso de este procedimiento de tamizaje), se decidió recuperar a la totalidad de estos plásmidos para verificar el fenotipo que posiblemente confieren en células íntegras. La razón detrás de esto radica en que la radiación UVB a la que fueron expuestas estas células puede haber generado mutaciones que inestabilicen el genoma de este candidato, lo que con el pasar del tiempo puede llegar a invalidar o exagerar el fenotipo esperado. Estudios previos han concluido que al disminuir el porcentaje de sobrevivencia de 90% a 77% en células de levadura, mediante el aumento en la dosis de UV aplicada, se incrementa la frecuencia de mutagénesis del 25% al 61% respectivamente. Por ello, si bien no se posee el dato exacto de la cantidad (en Joules/m²) de radiación UVB impuesta en este ensayo, se puede inferir que la mutagénesis generada entre los sobrevivientes es alta tomando en cuenta el porcentaje de sobrevivencia obtenido (James & Kilbey, 1977).

Luego de purificar y digerir a cada candidato seleccionado utilizando a las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III, se descartó a 4 de ellos que no presentaban el fragmento esperado (Figura 16). Debido al gran número de candidatos a analizar (Figura 17), se optó por mezclarlos y tamizarlos en conjunto. Para distinguir las diferencias entre las concentraciones que poseen, se diluyó 10 veces a cada plásmido. Es así como se calculó el volumen a utilizar para la generación de la solución conteniendo concentraciones similares de todos los plásmidos (MIX).

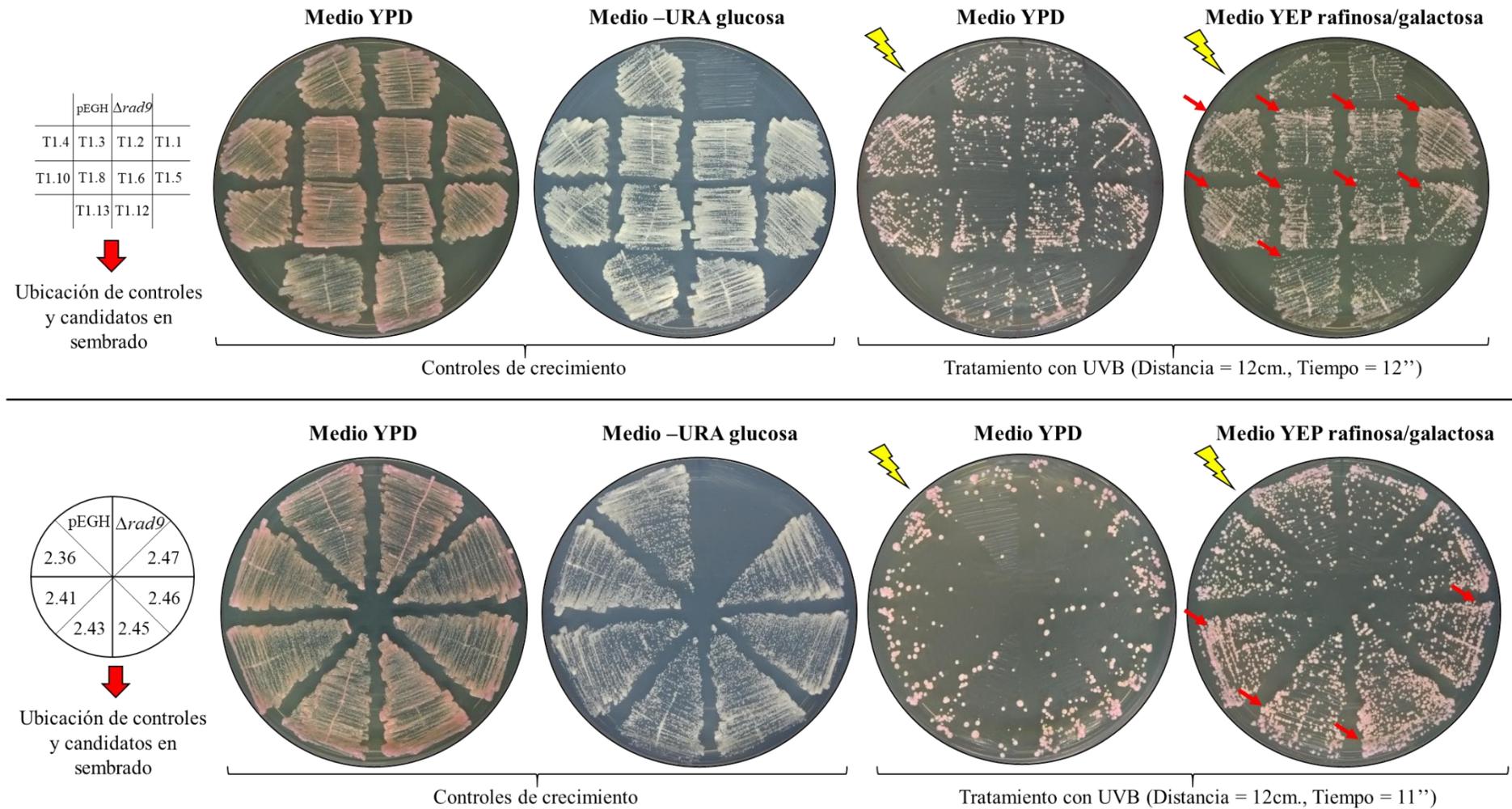


Figura 15: Representación de resultados de tamizados secuenciales realizados para la verificación de actividad fotoprotectora conferida por los plásmidos presentes en los candidatos seleccionados. Arriba: Pruebas de tamizados en dimensiones de 4cm². Abajo: Pruebas de tamizados en dimensiones de 8cm².

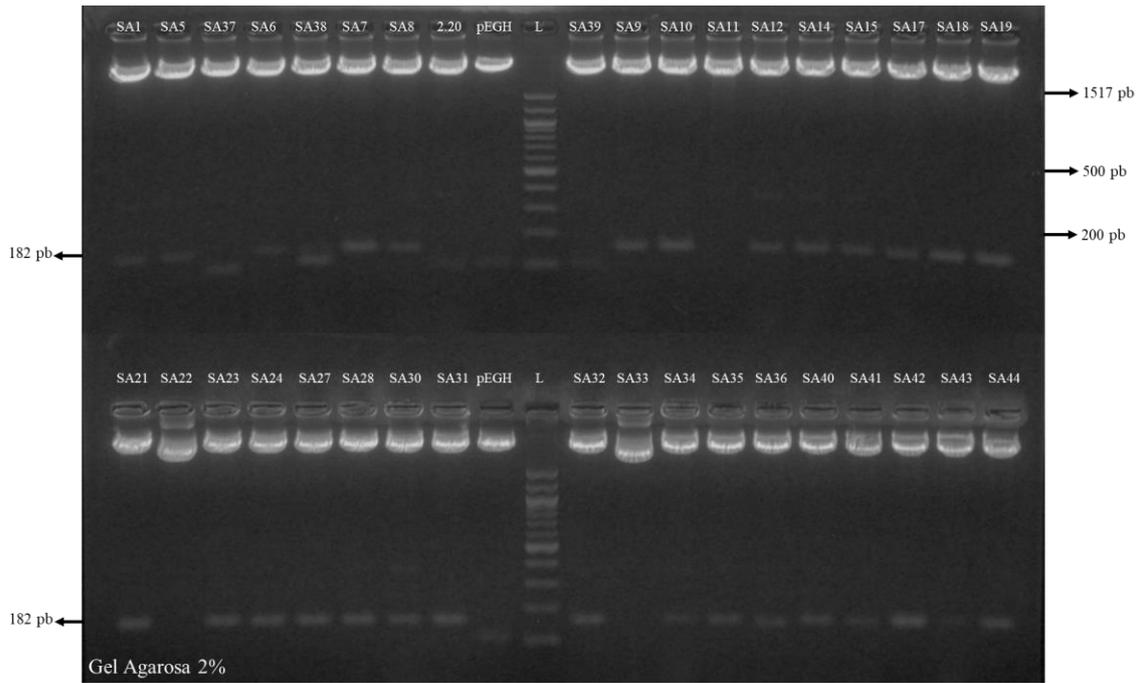


Figura 16: Análisis electroforético en gel de agarosa 2% de plásmidos purificados de los 42 candidatos seleccionados en el primer procedimiento de tamizaje y digeridos con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III. El tamaño esperado de los candidatos positivos fue de 182pb. Se utilizó como control negativo a la digestión del plásmido vacío pEGH cuyo producto esperado fue de 108pb.

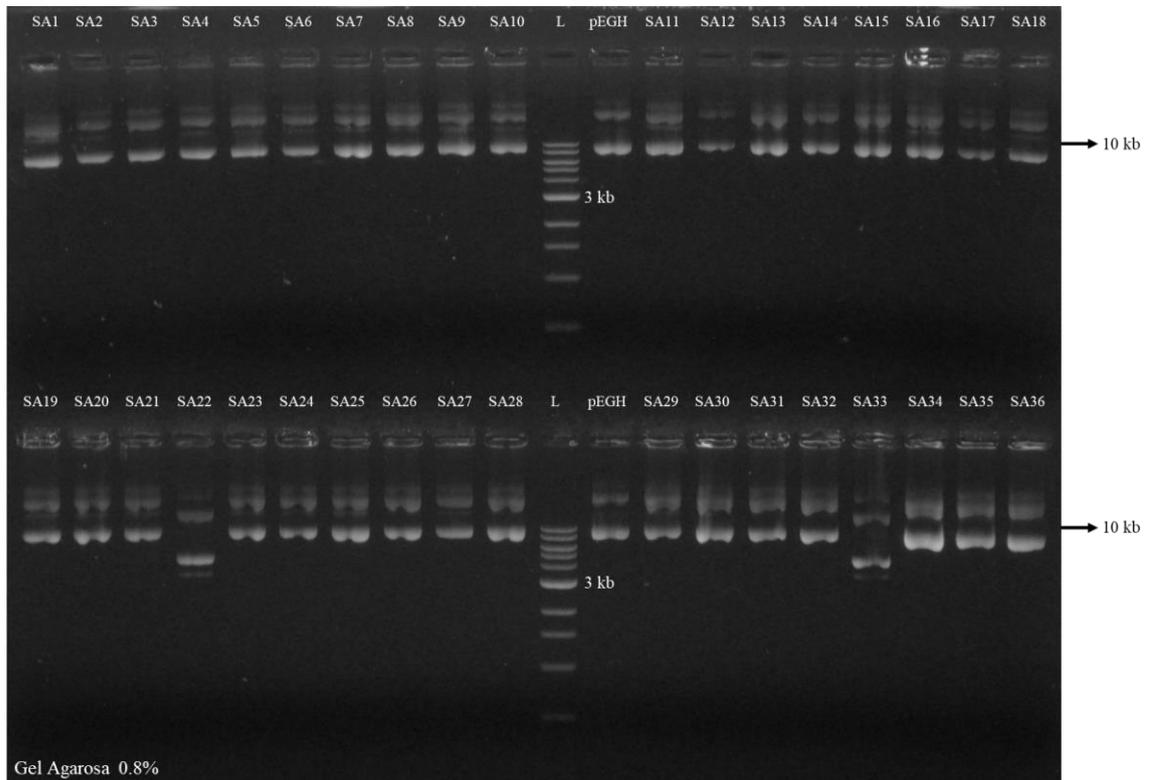


Figura 17: Análisis electroforético en gel de agarosa 0.8% de plásmidos purificados de los 42 candidatos seleccionados en el primer procedimiento de tamizaje. Se cargó 1µl de cada plásmido diluido 10 veces.

4.3.3 Transformación en cepa $\Delta rad24$ y repetición de tamizados

Se utilizó a la cepa sensible a UV $\Delta rad24$ de *Saccharomyces cerevisiae* para la transformación del MIX de candidatos en la continuación del tamizado. La proteína Rad24 funciona como un sensor inicial al daño producido por este agente exógeno. Su activación conlleva al arresto del ciclo celular e induce la expresión de genes envueltos en la reparación del daño genómico (Friedberg et al., 2006). A diferencia de la proteína Rad9, ha sido demostrado que Rad24 está también involucrada en el procesamiento de las regiones terminales en las rupturas de doble hebra y en la elección de la plantilla utilizada para la recombinación. En mutantes $\Delta rad24$ la cinética de la reparación de lesiones de doble hebra es muy prolongada, lo que trae como consecuencia a la muerte celular (Aylon & Kupiec, 2003). Al utilizar a la cepa $\Delta rad24$ durante las pruebas de clonaje *in vivo* en el laboratorio se obtuvo un muy reducido número de transformantes, comportamiento explicado por la deficiencia recombinatoria de estos mutantes. Es por ello por lo que la cepa mutante $\Delta rad24$ fue usada para la verificación de actividad fotoprotectora en candidatos previamente seleccionados y no se utilizó a en la generación de la biblioteca plasmídica. Se obtuvo una eficiencia de transformación de 1.6×10^3 colonias por μg de ADN usando a la cepa mutante $\Delta rad24$ (Figura 18).

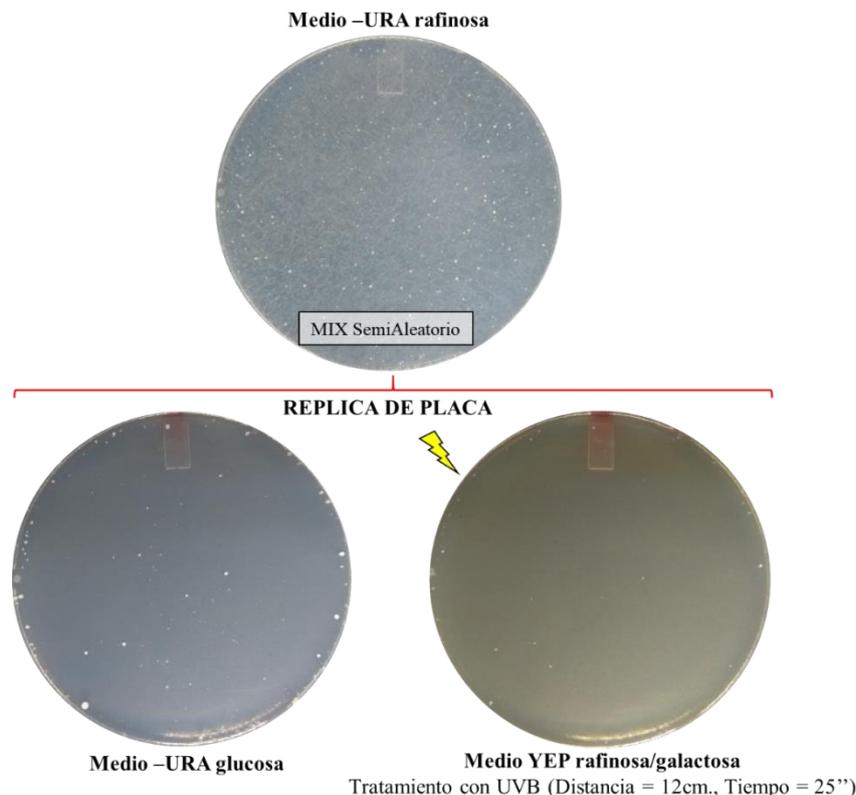


Figura 18: Transformación en cepa $\Delta rad24$ y replica de placa realizado con transformantes del MIX de candidatos en medios -URA glucosa y YEP rafinosa/galactosa.

Se buscó trabajar con células que no hayan sido expuestas a radiación UV al ser transformadas. Por lo tanto, se plaqueó directamente a la transformación del MIX en medio -URA rafinosa y se dejó incubando a las células hasta formar colonias pequeñas. Para obtener un número de aproximadamente 500 colonias por placa se procuró sembrar un volumen adecuado de cada transformación que otorgue esa cantidad. A continuación, se realizó la replica de cada una de estas placas en medio -URA glucosa y medio YEPrafinosa/galactosa, siendo el último irradiado a 12 centímetros de distancia utilizando los siguientes tiempos: 15, 20 y 25 segundos (Figura 18). Este último tiempo de exposición fue determinado como el más adecuado para las siguientes repeticiones, puesto que los otros dos aún permitían la sobrevivencia de un gran número de colonias. El número de colonias (500 aproximadamente) en la placa inicial fue adecuado para ubicar fácilmente en esta a los sobrevivientes de la placa replica irradiada. Los posteriores análisis en áreas de 4cm² y 8cm² permitió ir seleccionando entre los candidatos iniciales (Figura 15).

4.3.4 Tamizados finales por diluciones seriadas

La prueba en diluciones seriadas permitió realizar un claro y confiable análisis comparativo de la actividad fotoprotectora a radiación UV entre el gran número de candidatos aún presentes. Este ensayo fue utilizado para verificar el fenotipo deseado puesto que disminuye la incidencia de errores, los cuales pueden presentarse al momento de sembrado en las pruebas de tamizaje realizadas previamente. Es así como fueron seleccionados 14 de 31 candidatos (Figura 19). Luego de purificar los plásmidos, se optó por realizar una prueba final de resistencia a radiación UV, usándolos para retransformar $\Delta rad24$ y analizando los transformantes nuevamente por diluciones seriadas (Figura 20). Al observar el crecimiento diferencial entre candidatos retransformados en la placa YEP rafinosa/galactosa irradiada, se concluyó que los candidatos M2c21 y M3g19 presentan un fenotipo de fotoprotección claro y reproducible entre los diferentes transformantes ensayados. Además, se identificó que el candidato M3g17 también posee una fotoprotección marcada. No obstante, al analizar un transformante de este se observó que no presentaba mayor resistencia ante radiación UV. Diferentes escenarios pueden explicar esta variación entre clones de una misma transformación. En primer lugar, se debe tomar en cuenta que el plásmido pEGH posee un origen de replicación 2- μ m, proveniente del vector episomal multicopia endógeno de la levadura. La presencia de este origen 2- μ m resulta en un número de aproximadamente 10-40 copias de plásmido por célula, llegando a un valor de 60 copias/célula en cepas haploides, como la utilizada en este estudio. Por lo tanto, existe una considerable variación entre el

número de copias del mismo plásmido entre cada célula, lo que ha sido evidenciado en diferentes investigaciones (Futchert & Cox, 1984; Guthrie & Fink, 1991). Esta inestabilidad puede llegar a tener severas consecuencias segregacionales (Hohnholz, Pohlmann, & Achstetter, 2017). Una desigual repartición de plásmidos durante la división celular puede reducir significativamente el número de vectores presentes en cada célula hija y, por lo tanto, sería más propensa la pérdida de estos al incubarlas en medio no selectivo (YEP rafinosa/galactosa). Consecuentemente, esto anularía el efecto protector que poseían. Por otro lado, puede también haber aumentado el número de plásmidos durante la segregación. En la levadura existe un estricto sistema de control que garantiza la existencia de un número de plásmidos que sea suficiente para ser transmitido a las siguientes generaciones, pero que no muy elevado, evitando que comprometa el crecimiento celular (no se permite que el número de copias se incremente indefinidamente). Es por esto que, de ser el caso que exista un número elevado de copias en el clon de M3g17 (que no presenta resistencia a UV), esta podría ser la razón de su reducido crecimiento.

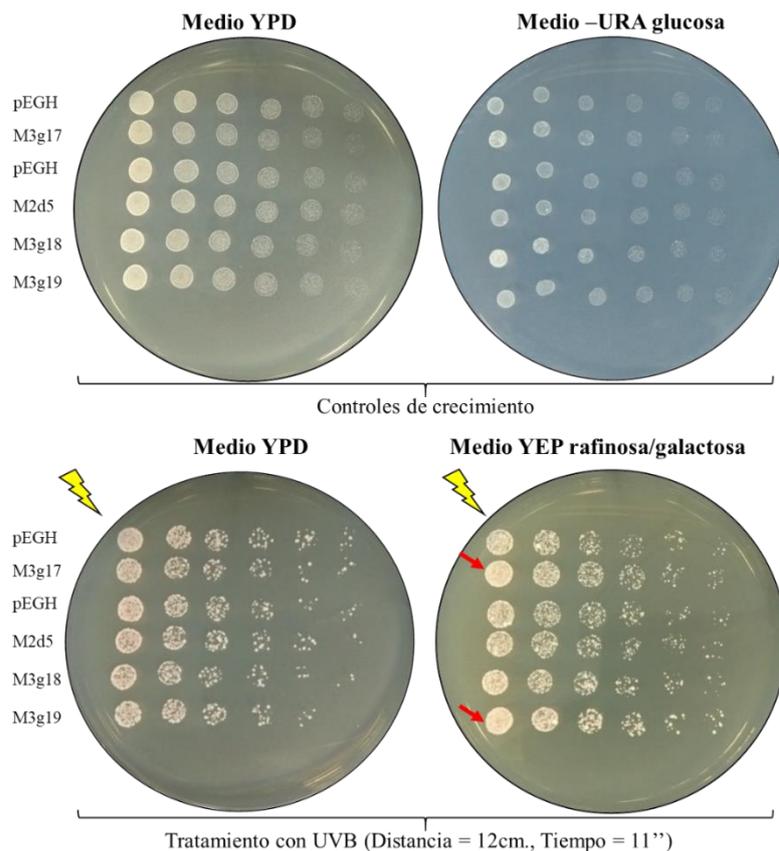


Figura 19: Prueba de diluciones seriadas para la verificación de resistencia a radiación UV de candidatos. Se seleccionaron a los que presentaron mayor crecimiento en medio YEP rafinosa/galactosa en comparación a los controles con plásmido vacío luego de ser irradiada.

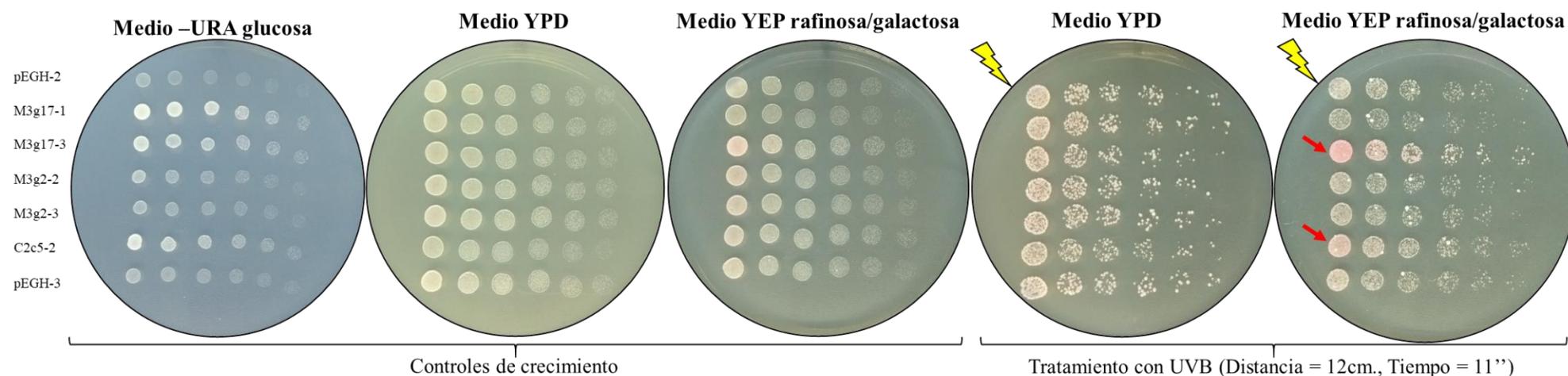
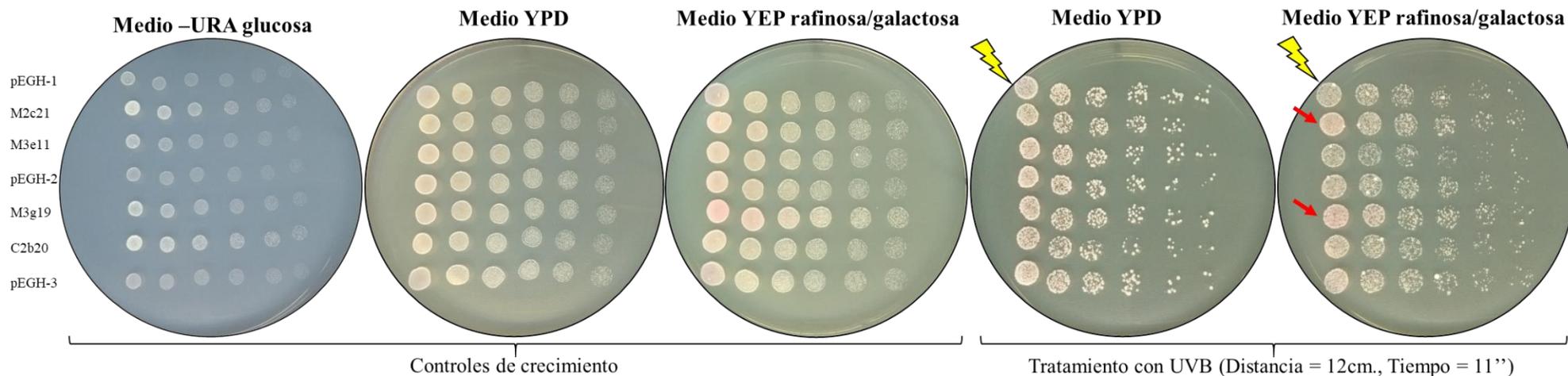


Figura 20: Prueba final en cepa $\Delta rad24$ de diluciones seriadas para la verificación final de resistencia a radiación UV de candidatos. Se seleccionaron a los 4 candidatos (M2c21, M3g19, M3g17 y C2c5) por presentar un mayor crecimiento en la placa YEP rafinosa/galactosa luego de que esta sea irradiada.

4.4 Segundo procedimiento de tamizado de transformantes.

Con la finalidad de evitar el análisis basado en células previamente irradiadas, se decidió utilizar al procedimiento de réplica de placa con los transformantes obtenidos por clonaje *in vivo* en $\Delta rad9$. El crecimiento de las colonias en medio -URA rafinosa fue muy homogéneo, lo que permitió sembrar de manera más uniforme a cada colonia el proceso de réplica (Figura 21). El tiempo de irradiación en las placas replicadas e incubadas por cuatro horas en medio YEP rafinosa/galactosa fue de 25 segundos a 12 centímetros de distancia.

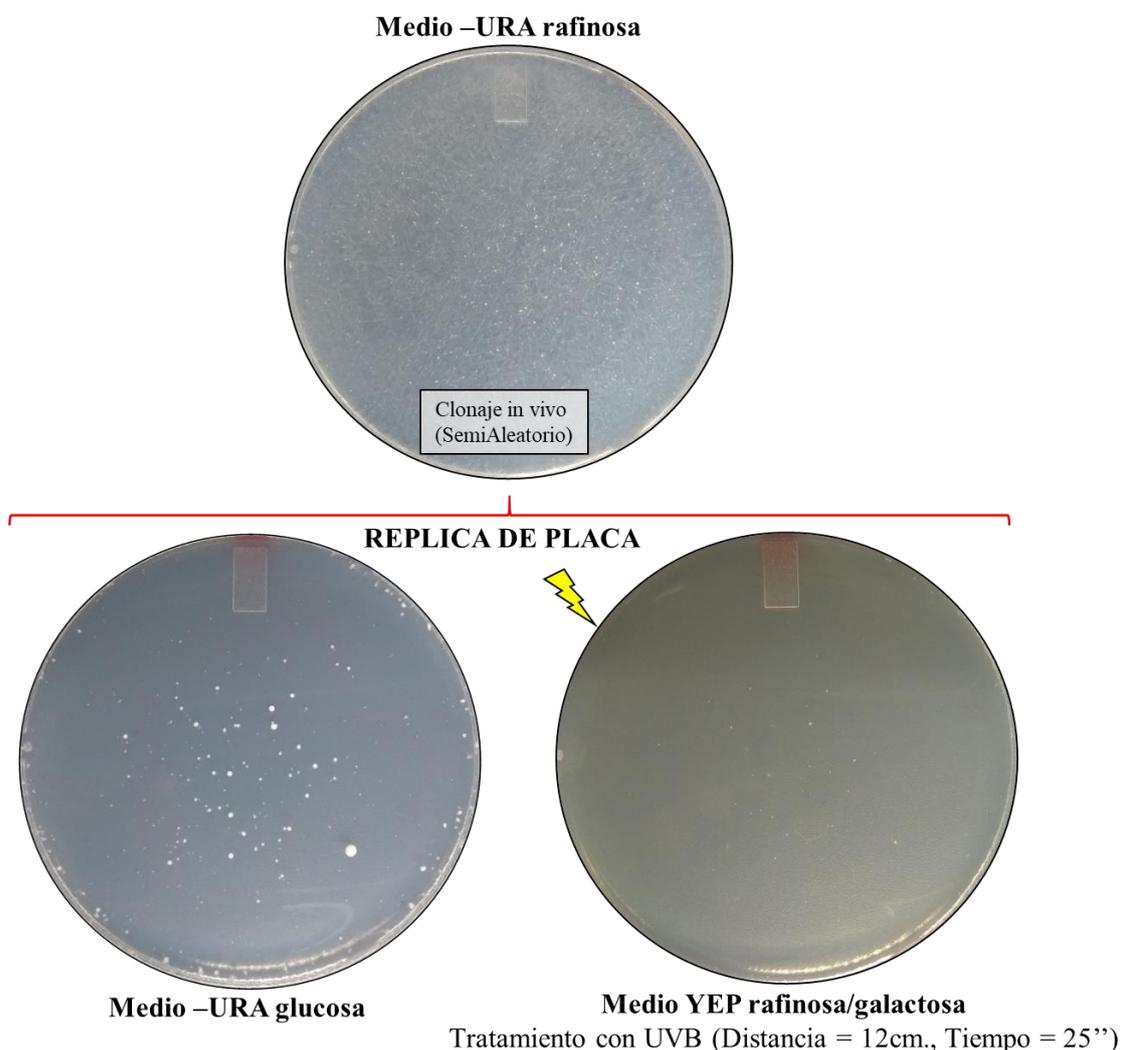


Figura 21: Replica de placa realizado con transformantes con la biblioteca plasmídica en la cepa $\Delta rad9$ para el segundo procedimiento de tamizaje.

Con los posteriores tamizados sucesivos se consiguió reducir el número de posibles candidatos con fotoprotección a 52. La prueba de diluciones seriadas realizada dio como resultado la selección de 8 (Figura 22), cuyos plásmidos fueron purificados para realizar una

segunda verificación en la cepa mutante $\Delta rad24$ (Figura 20). Finalmente, el candidato C2c5 fue el único seleccionado como resistente a radiación UV.

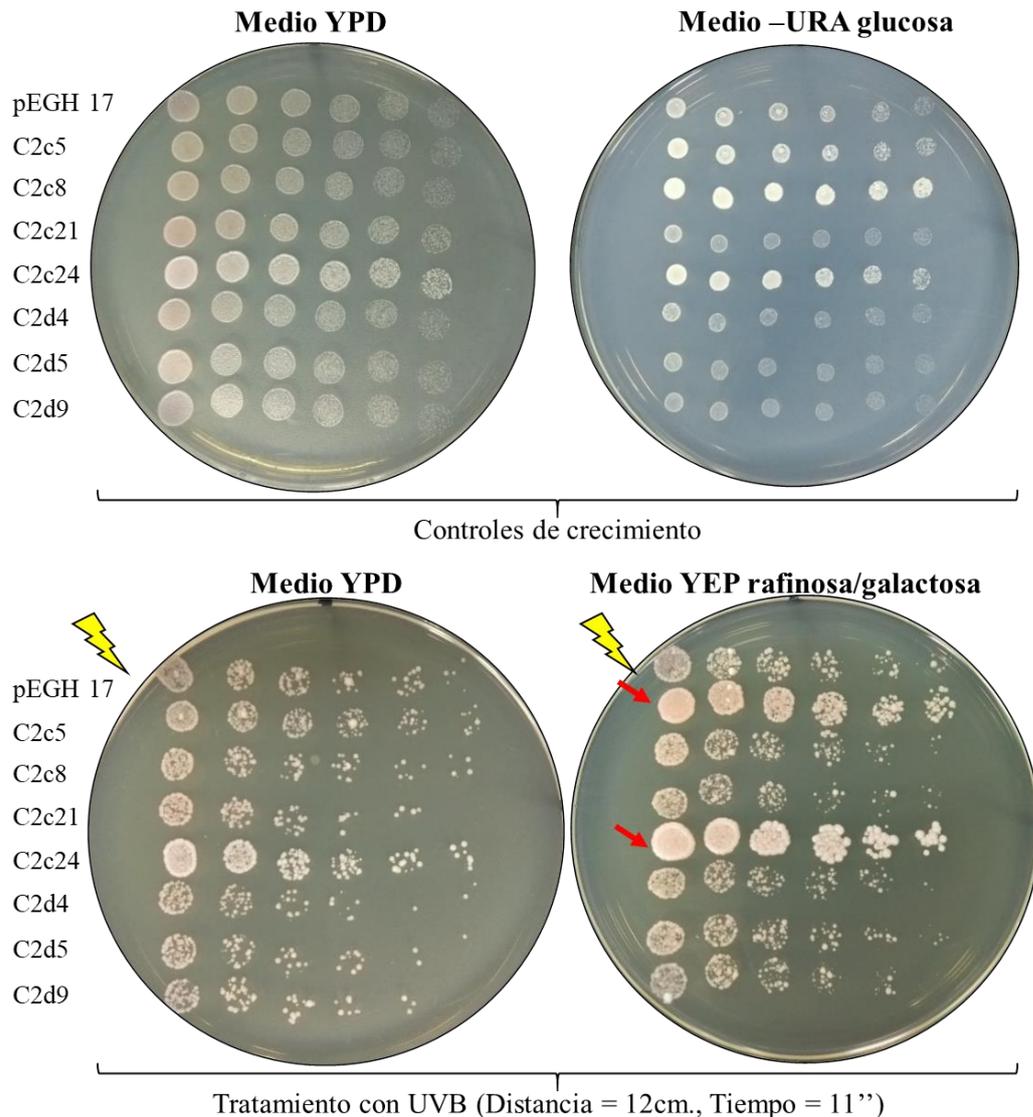


Figura 22: Prueba de diluciones seriadas para la verificación de resistencia a radiación UV de candidatos en el segundo procedimiento de tamizaje. Se seleccionaron a los que presentaron mayor crecimiento en medio YEP rafinosa/galactosa en comparación a los controles con plásmido vacío luego de ser irradiada.

4.5 Análisis de expresión génica de los oligopéptidos sintetizados

Se buscó optimizar el tratamiento de inducción para que sean requeridos pequeños volúmenes de medio sintético. Para llegar al DO_{600nm} óptimo de partida de 1, primero se realizó un cultivo a saturación en medio -URA glucosa, el cual fue diluido hasta una DO_{600nm} de 0.05 en medio -URA rafinosa. El tiempo de generación en cepas haploides de laboratorio es menor en medio rico (YPD) en comparación al medio sintético. Por ello, se determinó que es necesario incubar en agitación a $30^{\circ}C$ por 16 horas a estas diluciones para llegar a la

DO_{600nm} deseada. Reducir el tiempo requeriría partir de una dilución mayor, pero se determinó que era ventajoso emplear este tiempo y dejar a los cultivos durante una noche. Además, es importante tomar en cuenta que la expresión por parte del promotor *GALI/10* del plásmido pEGH se ve reprimida cuando el medio contiene glucosa.

En las pruebas de optimización para el análisis de expresión plasmídica a través de Western Blot se evaluó a 7 plásmidos diferentes entre los cuales se incluyó a dos de los 4 candidatos finales c2c5, M2c21, M3g17 y M3g19. Además, se tomó como control a un transformante con el plásmido pEGH vacío. Se evaluó el comportamiento de cada plásmido usando dos transformantes diferentes del mismo. En el control pEGH y los transformantes M2c21, M3e12, C3g22 y M3e11 se registró una banda muy intensa ubicada en la posición de tamaño de la proteína GST de 26kDa. Los transformantes C2b20 y C3g37 presentaron un nivel de expresión considerablemente reducido en ambos clones, ya que la banda del producto GST fusionado fue muy tenue en comparación al resto. Por otro lado, se observó una gran diferencia entre la expresión de los clones del plásmido M3g19. Uno de estos no presentó banda mientras que con el otro se obtuvo una banda intensa (Figura 23 y 24).

El nivel de expresión de un gen está influenciado por el número de copias y la estabilidad del vector utilizado (Guthrie & Fink, 1991). Esta puede ser la razón por la cual se observan diferencias en el nivel de expresión entre los distintos transformantes. Un número de copias alto (pero aún adecuado para garantizar la integridad celular), tiene el potencial de incrementar en un gran porcentaje a la expresión regulada por promotores de inducción como *GALI/10*. En cambio, el poseer un número de copias reducido puede ser la razón por la cual no se generó un nivel de proteína suficiente para ser captado por la prueba. Situaciones similares se han presentado en otras investigaciones en donde se obtuvo una distribución de niveles de expresión muy amplia utilizando un plásmido con origen de replicación 2 μ m y promotor *GAL*. Este ruido en expresión se explicó como producto de la variabilidad en número de copia por células de una misma población utilizando este tipo de vectores episomales (Pothoulakis & Ellis, 2018).

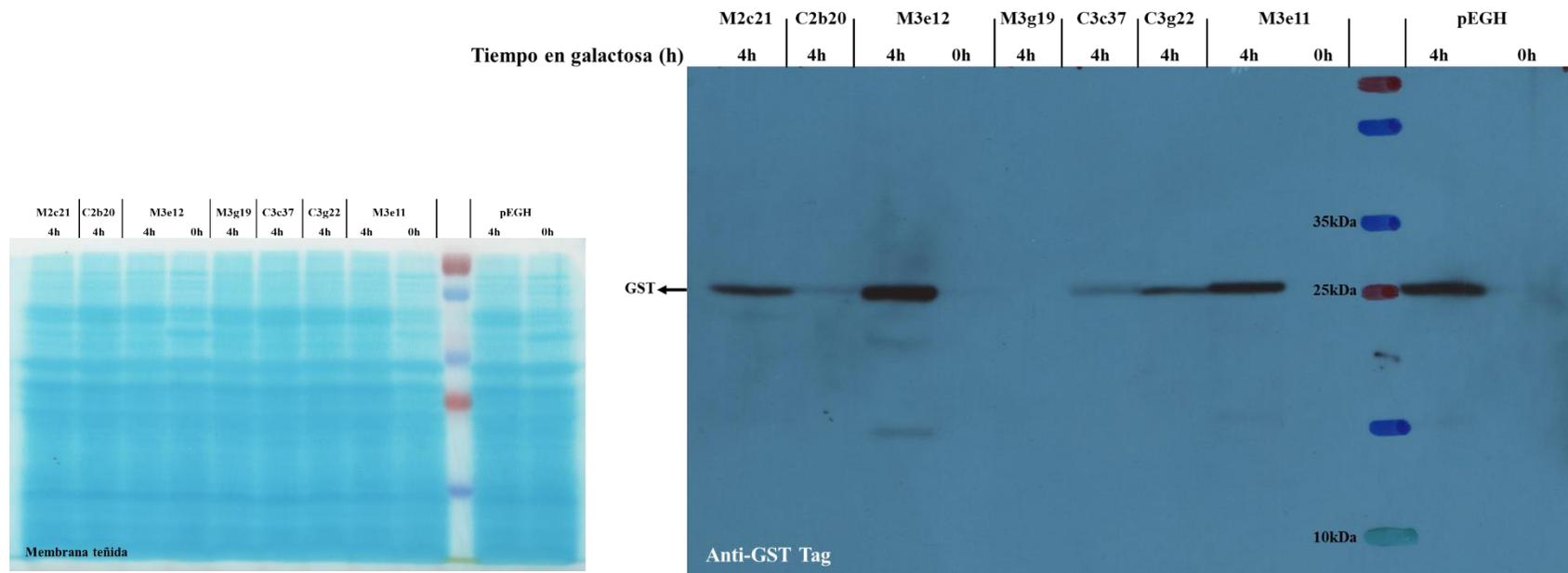


Figura 23: Resultados del Western Blot para el análisis de expresión de cada candidato. Izquierda: Proteínas totales teñidas en membrana de nitrocelulosa. Derecha: Resultados del inmunoblot con el anticuerpo Anti-GST tag (Exposición 3 minutos, Revelado 2 minutos, Fijación 2 minutos)

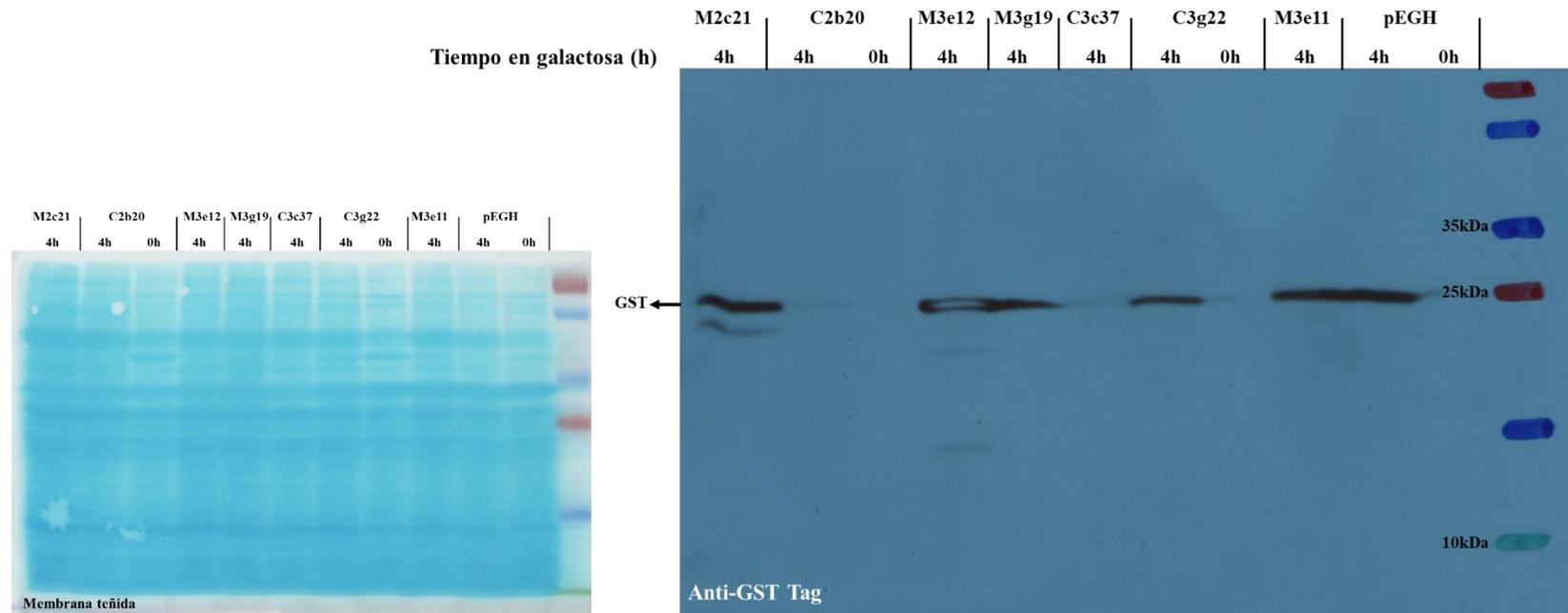


Figura 24: Resultados del Western Blot utilizando a los diferentes transformantes de cada candidato. Izquierda: Proteínas totales teñidas en membrana de nitrocelulosa. Derecha: Resultados del inmunoblot con el anticuerpo Anti-GST tag (Exposición 3 minutos, Revelado 2 minutos, Fijación 2 minutos)

4.6 Análisis de secuenciamiento de nucleótidos de los plásmidos seleccionados

El resultado del secuenciamiento de los plásmidos seleccionados M3g17, M2c21 y C2c5 demostró la presencia del aminoácido Tirosina (Y) en las posiciones esperadas (Figura 25). Cabe resaltar que la razón por la cual este aminoácido fue incorporado dentro de la secuencia del oligopéptido es su capacidad de absorber en la región ultravioleta. Esta característica se debe a la excitación generada en su anillo aromático, producto de transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ (Antosiewicz & Shugar, 2016). La absorción en el rango de 230 a 300nm que poseen las proteínas es mayormente debido a que en su secuencia incluyen a los aminoácidos aromáticos triptófano (W), tirosina (Y) y fenilalanina, o a enlaces disulfuro generados por cisteínas. Es por ello que se puede calcular el coeficiente de absorción ϵ de una proteína solo tomando en cuenta el número de W, Y y enlaces disulfuro que posee y reemplazando estos valores en una fórmula (Schmid, 2001). A partir de esta información se infiere que un oligopéptido cuya secuencia incluya únicamente a estos aminoácidos poseería la máxima capacidad de absorción en comparación a otros de secuencia variada. Sin embargo, experimentalmente esto no fue cierto puesto que ensayos previos realizados en el laboratorio demostraron que expresar a un oligopéptido conformado solo por W y Y no provee fotoprotección alguna a células de levadura transformantes.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	STOP
M3g17 →	cct P	tta L	tct S	tac Y	ttc F	tgg W	ttg L	tat Y	tat Y	gag E	taa -	tac Y	cag Q	taa -	ttt F	tat Y	tgt C	tac Y	taa -
M2c21 →	ctt L	gtg V	gta V	tat Y	ttt F	acg T	cac H	tat Y	cag Q	taa -	ata I	tat Y	aac N	gtt V	cct P	tat Y	tgg W	tat Y	taa -
C2c5 →	cat H	ttg L	cca P	tac Y	ata I	agt S	gca A	tat Y	ggt G	ttc F	gtg V	tac Y	gaa E	gta V	gca A	tat Y	tgt C	tat Y	taa -
Secuencia de plantilla SAdir →	cnn	nnn	nnn	tay	nnn	nnn	nnn	tay	nnn	nnn	nnn	tay	nnn	nnn	nnn	tay	tgk	tay	taa

Figura 25: Comparación entre de los 18 aminoácidos codificados por los plásmidos seleccionados.

Este estudio ha demostrado que también es importante la presencia de otros aminoácidos no aromáticos para que un oligopéptido otorgue resistencia a radiación UV. En teoría se espera que proteínas monoméricas o péptidos que no incluyan en su secuencia aminoácidos aromáticos, puentes disulfuro o grupos prostéticos activos, permanezcan ópticamente silenciosas a longitudes de onda mayores a 250nm. No obstante, investigadores han descubierto que péptidos con estas características, y cuya composición incluye aminoácidos con carga, presentan una considerable absorción en rangos mayores a 250nm. Los grupos

amino(NH₃⁺)/carboxilato(COO⁻) en las cadenas laterales de lisina y ácido glutámico de estos péptidos, actúan como aceptores y donadores de electrones en una transferencia (Prasad et al., 2017).

Entre las secuencias de los oligopéptidos seleccionados se identifica la presencia de algunos aminoácidos con carga, cuya interacción con aminoácidos de tirosina u otros puede otorgarles esta propiedad fotoprotectora. Si bien dos de los seleccionados poseen codones STOP que interrumpen su secuencia, puede que la expresión de solo esa porción del péptido sea suficiente.

Resaltando algunas características de cada candidato observamos que justo los dos más cortos (M3g17 y M2c21) presentan al aminoácido fenilalanina en la misma ubicación. M3g17 tiene dos tirosinas sucesivas, un triptófano y al aminoácido con carga positiva arginina. M2c21 tiene una histidina, de carga positiva, al lado de tirosina. Por último, el candidato C2c5, cuya secuencia si está completa, tiene un ácido glutámico (carga negativa) al lado de una tirosina, una fenilalanina, una histidina (carga positiva) y una cisteína.

V. CONCLUSIONES

- Se completaron dos tamizados genéticos que permitieron la selección de cuatro plásmidos con secuencias que codifican para oligopéptidos con probable actividad fotoprotectora.
- El análisis de secuenciación de los plásmidos seleccionados permitió deducir las secuencias correspondientes de aminoácidos
- El alineamiento de las secuencias de aminoácidos permitió identificar la presencia de residuos de tirosina en las posiciones esperadas, y residuos de aminoácidos con carga como histidina (+), arginina (+) y ácido glutámico (-)
- El análisis por Western blot permitió verificar la síntesis de las proteínas recombinantes.

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar ensayos adicionales con los candidatos seleccionados para comprobar la potencial actividad fotoprotectora que brindan, en los cuales se utilice plásmidos de expresión que permitan la secreción de estos oligopéptidos recombinantes al medio extracelular o su anclaje en la superficie celular.
- Purificar a los oligopéptidos y realizar ensayos espectrofotométricos para comprobar sus respectivos espectros de absorción.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Albayrak, S. (2011). Construction and Screening of Custom Peptide Libraries Derived. Tesis PhD. Michigan, Estados Unidos, The Univeristy of Michigan. 129p.
- Antosiewicz, J. M., & Shugar, D. (2016). UV–Vis spectroscopy of tyrosine side-groups in studies of protein structure. Part 2: selected applications. *Biophysical Reviews*, 8(2), 163–177. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0197-7>
- Aylon, Y., & Kupiec, M. (2003). The Checkpoint Protein Rad24 of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in processing double-strand break end and in recombination partner choice. *Molecular and Cellular Biology*, 23(18), 6585–6596. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.18.6585>
- Barnett, J. A. (1998). A history of research on yeasts 1: Work by Chemists and Biologists 1789-1850. *Yeast*, 21(14), 1141–1193.
- Barreto, K., Aparicio, A., Bharathikumar, V. M., DeCoteau, J. F., & Geyer, C. R. (2012). Yeast two-hybrid screening of cyclic peptide libraries using a combination of random and PI-deconvolution pooling strategies. *Protein Engineering Design and Selection*, 25(9), 453–464. <https://doi.org/10.1093/protein/gzs029>
- Berkner, L., & Marshall, L. (1964). The History of Oxygenic Concentration in the Earth's Atmosphere. *Discussions of the Faraday Society*, 37, 122–141.
- Blumthaler, M., Ambach, W., & Ellinger, R. (1997). Increase in solar UV radiation with altitude. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 39, 130–134.
- Chirinos, R., Ochoa, K., Aguilar-Galvez, A., Carpentier, S., Pedreschi, R., & Campos, D. (2018). Obtaining of peptides with in vitro antioxidant and angiotensin I converting enzyme inhibitory activities from cañihua protein (*Chenopodium pallidicaule* Aellen). *Journal of Cereal Science*. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.07.004>

- Cogliano, V. J., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., El Ghissassi, F., ... & Wild, C. P. (2011). Preventable exposures associated with human cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, *103*(24), 1827–1839. <https://doi.org/10.1093/jnci/djr483>
- Downs, C. A., Kramarsky-Winter, E., Segal, R., Fauth, J., Knutson, S., Bronstein, O., ... & Loya, Y. (2016). Toxicopathological Effects of the Sunscreen UV Filter, Oxybenzone (Benzophenone-3), on Coral Planulae and Cultured Primary Cells and Its Environmental Contamination in Hawaii and the U.S. Virgin Islands. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *70*(2), 265–288. <https://doi.org/10.1007/s00244-015-0227-7>
- EC, Redaccion. (2019). Liga Contra el Cáncer inicia campaña de despistajes contra el cáncer de piel. Consultado June 2, 2019, from El Comercio website: <https://elcomercio.pe/tecnologia/ciencias/salud-liga-cancer-inicia-campana-despistajes-cancer-piel-noticia-593886>
- EC, Redacción. (2019). Verano 2019: inician campaña de despistaje contra el cáncer de piel. Consultado June 2, 2019, from El Comercio website: <https://elcomercio.pe/lima/sucesos/verano-2019-inician-campana-despistaje-cancer-piel-noticia-nndc-593603>
- Engelsen, O. (2010). The relationship between ultraviolet radiation exposure and vitamin D status. *Nutrients*, *2*(5), 482–495. <https://doi.org/10.3390/nu2050482>
- FDA. (2018). Code of Federal Regulations Title 21. Retrieved May 30, 2019, from Food and Drug Administration website: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=352.10>
- Flick, J. S., & Johnston, M. (1992). Two System of Glucose Repression of the GAL1 Promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *130*(2), 295–304.
- Forsburg, S. L. (2001). The art and design of genetic screens: Yeast. *Nature Reviews Genetics*, *2*(9), 659–668.
- Friedberg, E. C., Walker, G. C., Siede, W., Wood, R. D., Schultz, R. A., & Ellenburger, T. (2006a). DNA repair and mutagenesis. In *ASM Press*. <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000232588.61871.ff>
- Friedberg, E. C., Walker, G. C., Siede, W., Wood, R. D., Schultz, R. A., & Ellenburger, T.

- (2006b). *DNA Repair and Mutagenesis*.
- Futchert, A. B., & Cox, B. S. (1984). Copy Number and the Stability of 2-gtm Circle-Based Artificial Plasmids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology* (Vol. 157).
- Ghazipura, M., Mcgowan, R., Arslan, A., & Hossain, T. (2017). Exposure to Benzophenone-3 and Reproductive Toxicity : A Systematic Review of Human and Animal Studies Exposure to benzophenone-3 and reproductive toxicity : A systematic review of human and animal studies. *Reproductive Toxicology*, 73, 175–183. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.08.015>
- Guthrie, C., & Fink, G. R. (1991). *Guide to yeast genetics and molecular biology*. Academic Press.
- Hohnholz, R., Pohlmann, K. J., & Achstetter, T. (2017). Impact of plasmid architecture on stability and yEGFP3 reporter gene expression in a set of isomeric multicopy vectors in yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8558-0>
- IARC. (2009). *Solar and Ultraviolet Radiation. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. Retrieved from <http://monographs.iarc.fr>
- INEI. (2014). *Características socioeconómicas del productos agropecuario en el Perú. IV Censo Nacional Agropecuario 2012*. Recuperado de: https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitales/Est/Lib1177/libro.pdf
- James, A. P., & Kilbey, B. J. (1977). The timing of uv mutagenesis in yeast. A pedigree analysis of induced recessive mutation. *Genetics*, 87(2), 237–248.
- Lloyd-Williams, P., Albericio, F., & Giralt, E. (1997). *Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins*. Retrieved from <https://books.google.com.pe/books?id=J1dNC1KAVysC&pg=PA237&dq=peptide+library&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiqqKTrpsLiAhVJrIkKHeSGBR4Q6AEIWD4H#v=onepage&q=peptide library&f=false>
- Lodyga, M., Polan, A., Skotarczak, K., Mazur, M., & Adamski, Z. (2015). Photoprotection : facts and controversies. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 19, 98–112.

- Lucas, R., McMichael, T., Smith, W., Armstrong, B., Prüss-Üstün, A., Zeeb, H., ... Repacholi, M. (2006). *Solar Ultraviolet Radiation. Global burden of disease from solar ultraviolet radiation*. Retrieved from https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43505/9241594403_eng.pdf?sequence=1
- Merino, R; García, S; Gutierrez, L; Kitazono, A. (2018). Comprobación de los efectos de bloqueadores solares comerciales usando ensayos basados en la sobrevivencia de células de levadura a irradiación uv. *Revista de la Sociedad Química del Perú*. 84(3), 386–397.
- Mitchell, D. A., Marshall, T. K., & Deschenes, R. J. (1993). Vectors for the inducible overexpression of glutathione S-transferase fusion proteins in yeast. *Yeast*, 9(7), 715–722. <https://doi.org/10.1002/yea.320090705>
- Moulite, M. (2018). Hawaii bans sunscreens that harm coral reefs. Retrieved May 30, 2019, from CNN website: <https://edition.cnn.com/2018/07/03/health/hawaii-sunscreen-ban/index.html>
- Nguyen-Huu, T. D., Gupta, C., Ma, B., Ott, W., Josić, K., & Bennett, M. R. (2015). Timing and Variability of Galactose Metabolic Gene Activation Depend on the Rate of Environmental Change. *PLoS Computational Biology*. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004399>
- Oldenburg, K., Vo, K., Michaelis, S., & Paddon, C. (1997). Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction in vivo in yeast. *Nucleic Acids Research*, 25(2), 1–2. Retrieved from sftp://cerca@192.168.2.5/home/cerca/Desktop/data/laptop_files/info/biologia/protein_protein_interactions/Y2H/OldenburgKR_PaddorC_1997_recomb-med_pcr-directed.pdf%5Cnpapers2://publication/uuid/3F7126AF-DF4C-43A4-B1F9-786DDE154CF2
- 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 of the United States of America*, 78(10), 6354–6358. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.10.6354>
- Ostergad, S., Olsson, L., & Nielsen, J. (2000). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(1), 34–50.

- Pierce, D., & Wendland, B. (2016). Sequence of the yeast protein expression plasmid pEGH(KT). *Yeast*, 25(3), 289–313. <https://doi.org/10.1007/s11065-015-9294-9>.Functional
- Pothoulakis, G., & Ellis, T. (2018). Construction of hybrid regulated mother-specific yeast promoters for inducible differential gene expression. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194588>
- Prasad, S., Mandal, I., Singh, S., Paul, A., Mandal, B., Venkatramani, R., & Swaminathan, R. (2017). Near UV-Visible electronic absorption originating from charged amino acids in a monomeric protein. *Chemical Science*. <https://doi.org/10.1039/c7sc00880e>
- Ramos, W., & Rolando, D. (2013). *Análisis de la situación del cáncer en el Perú 2013 Dirección General de Epidemiología*. Retrieved from <http://www.dge.gob.pe>
- Rojas, A. (2018). Alerta: estas son las ciudades del país con mayor radiación ultravioleta. Retrieved June 2, 2019, from El Comercio website: <https://elcomercio.pe/peru/alerta-son-ciudades-pais-mayor-radiacion-ultravioleta-noticia-492249?foto=2>
- Schalka, S., & Manoel, V. (2011). Sun protection factor: meaning and controversies. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 86(3), 507–515.
- Schmid, F. X. (2001). Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry. In *Encyclopedia of Life Sciences* (pp. 1–4). Retrieved from www.els.net
- Schmitt, J., Seidler, A., Diepgen, T. L., & Bauer, A. (2011). Occupational ultraviolet light exposure increases the risk for the development of cutaneous squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *British Journal of Dermatology*, 164(2), 291–307. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2010.10118.x>
- Senamhi. (2018). SENAMHI: se incrementan niveles de radiación ultravioleta. Retrieved June 2, 2019, from Senamhi website: <https://www.senamhi.gob.pe/?&p=prensa&n=783>
- Sherman, F. (2002). Getting started with yeast. *Methods in Enzymology*, 350, 3–41. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)50954-X](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(02)50954-X)
- Sivamani, R. K., Ghiya, M., & Maibach, H. I. (2010). Shedding Light on Sunscreens and Their Labels. *American Journal of Preventive Medicine*, 38(6), 679–681.

<https://doi.org/10.1016/j.amepre.2010.02.009>

- Sordo, C., & Gutiérrez, C. (2013). Cáncer de piel y radiación solar: experiencia peruana en la prevención y detección temprana del cáncer de piel y melanoma. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 30(1). Retrieved from http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342013000100021
- Thomas, B. J., & Rothstein, R. (1989). Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell*, 56(4), 619–630. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90584-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90584-9)
- Trummer, C., Pandis, M., Verheyen, N., Grübler, M. R., Gaksch, M., Obermayer-Pietsch, B., ...& Schwetz, V. (2016). Beneficial effects of UV-radiation: Vitamin D and beyond. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(10), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijerph13101028>
- Weinert, T., & Hartwell, L. (1988). The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, 241, 317-322. <http://doi.org/10.1126/science.3291120>
- West, R. W., Chen, S. M., Putz, H., Butler, G., & Banerjee, M. (1987). GAL1-GAL10 divergent promoter region of *Saccharomyces cerevisiae* contains negative control elements in addition to functionally separate and possibly overlapping upstream activating sequences. *Genes & Development*, 1(10), 1118–1131. <https://doi.org/10.1101/gad.1.10.1118>