

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

ESCUELA DE POSGRADO

DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA BIOLÓGICAS



**“APLICACIONES DE LA LEVADURA *S. cerevisiae* EN
ESTUDIOS DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE
EXTRACTOS DE PLANTAS SILVESTRES Y PÉPTIDOS
ALEATORIOS”**

Presentada por:

MIKI GONZALES USCAMAYTA

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

Lima – Perú

2024

Tesis final MG sin carátula ni referencias

ORIGINALITY REPORT

18%

SIMILARITY INDEX

17%

INTERNET SOURCES

7%

PUBLICATIONS

2%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	hdl.handle.net Internet Source	3%
2	repositorio.lamolina.edu.pe Internet Source	2%
3	patents.google.com Internet Source	1%
4	www.researchgate.net Internet Source	1%
5	Miki Gonzales, Gretty K. Villena, Ana A. Kitazono. "Evaluation of the antioxidant activities of aqueous extracts from seven wild plants from the Andes using an in vivo yeast assay", Results in Chemistry, 2021 Publication	1%
6	repositorio.ucam.edu Internet Source	1%
7	es.scribd.com Internet Source	<1%
8	repositorio.unal.edu.co Internet Source	

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

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

**“APLICACIONES DE LA LEVADURA *S. cerevisiae* EN ESTUDIOS
DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE
PLANTAS SILVESTRES Y PÉPTIDOS ALEATORIOS”**

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

Presentada por:

MIKI GONZALES USCAMAYTA

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Dra. Carmen Rodriguez Best
PRESIDENTE

Ph.D. Ana Kitazono Sugahara
ASESORA

Ph.D. Gretty Villena Chávez
CO-ASESORA

Dra. Ilanit Samolski Klein
MIEMBRO

Dr. Raúl Blas Sevillano
MIEMBRO

Dra. Juana Rosa María Robles Caycho
MIEMBRO EXTERNO

DEDICATORIA

A mis padres por haber inculcado en mí buenos valores y, a mis hermanos por su constante motivación y haber confiado en mis capacidades.

AGRADECIMIENTO

A PROCENCIA, Convenio 177-2015 FONDECYT, por el apoyo económico otorgado durante mis estudios de Doctorado.

A la UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA por brindarme la oportunidad de estudiar y desarrollar mis aptitudes profesionales apropiadamente.

A mi asesora de tesis, Dra. Ana Kitazono Sugahara, por todo el esfuerzo, paciencia y su dedicación, quien con su experiencia y motivación ha logrado en mí la conclusión satisfactoria de mi tesis.

A mi co-asesora de tesis, Dra. Gretty Villena Chavez por el apoyo y guía en el desarrollo de mi tesis.

A los Docentes miembros del jurado calificador, Dra. Carmen Rodríguez Best, Dra. Ilanit Samolski Klein y Dr. Raúl Blas Sevillano quienes con sus sugerencias contribuyeron al desarrollo de esta tesis y me alentaron a culminar satisfactoriamente esta etapa.

A mi jurado, Dra. Juana Rosa María Robles Caycho por sus comentarios y sugerencias al presente trabajo.

A mis profesores, pilares fundamentales en mi formación profesional y responsables de cultivar en mí el interés por la ciencia y la investigación.

A mis compañeros del Laboratorio de Química Biológica y Bioanálisis por la motivación tanto profesional como personal durante el desarrollo de esta investigación.

A la comunidad Qhehwar del distrito de Andahuaylillas, Cusco-Perú, por su colaboración para recolección de las especies vegetales.

Son muchas las personas que forman parte de mi vida profesional a quienes debo mi gratitud por todo el apoyo brindado en todo momento.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Especies reactivas de oxígeno	3
2.2. La radiación UV y la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO).....	4
2.3. Antioxidantes.....	5
2.3.1. Antioxidantes polares.....	6
2.4. Péptidos bioactivos con propiedad antioxidante	7
2.5. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
2.5.1. Implicancias de las superóxido dismutasa en enfermedades	9
2.6. Respuesta de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a especies reactivas de oxígeno	9
2.7. Biblioteca de plásmidos que permiten la producción de péptidos	15
III. MATERIALES Y REACTIVOS.....	19
3.1. Cepas	19
3.2. Plásmido	19
3.3. Materiales de rutina	19
3.3.1. Medios de cultivo.....	19
3.3.2. Reactivos/soluciones	20
3.3.3. Reactivos de biología molecular	20
3.3.4. Equipos.....	21
3.4. Diseño de la investigación	22
PARTE I: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS DE PLANTAS SILVESTRES DE LOS ANDES DEL CUSCO	23
IV. METODOLOGÍA	24
4.1. Muestras vegetales	24
4.2. Preparación de extractos.....	24
4.3. Determinación del contenido de fenoles totales en los extractos acuosos	24
4.4. Determinación de la actividad antioxidante de los extractos acuosos mediante ensayo <i>in vitro</i>	26
4.5. Construcción del mutante de levadura <i>sod1</i>	28
4.6. Evaluación de la actividad antioxidante usando el mutante <i>sod1</i>	29
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32

5.1. Colección de las muestras y análisis taxonómico	32
5.2. Contenido de fenoles totales.....	33
5.3. Ensayos <i>in vitro</i> de capacidad antioxidante	35
5.4. Construcción y caracterización de la cepa mutante <i>sod1</i>	37
5.5. Ensayos de capacidad antioxidante <i>in vivo</i> usando la cepa <i>sod1</i>	39

PARTE II: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE TRES OLIGOPÉPTIDOS REPORTADOS COMO ANTIOXIDANTES EN HIDROLIZADOS DE PROTEÍNAS..... 44

VI. METODOLOGÍA 45

6.1. Estrategia usada para la construcción de los plásmidos para la expresión de los péptidos de interés.	45
6.2. Plásmido de expresión.....	45
6.3. Clonación de tres genes que codifican para péptidos con reportada actividad antioxidante.....	46
6.4. Construcción de una biblioteca de plásmidos que permite la producción de péptidos aleatorios.	50
6.5. Ensayo de la capacidad antioxidante de los péptidos de interés	54
6.5.1. Recuperación del ADN total y verificación de los fragmentos clonados en los transformantes seleccionados	54
6.5.2. Ensayos de resistencia a peróxido de hidrógeno de los transformantes....	55
6.6. Amplificación y recuperación de los plásmidos construidos.....	56
6.7. Verificación de la correcta construcción de los plásmidos.....	56
6.8. Confirmación de la resistencia a peróxido de hidrógeno conferida por los plásmidos construidos.....	57
6.9. Evaluación mediante ensayos <i>in vitro</i> de la capacidad antioxidante de los extractos de levadura.....	57
6.9.1. Preparación de los extractos de levadura	57
6.9.2. Cuantificación de proteínas totales en los extractos de levadura mediante el método de Bradford.....	58
6.9.3. Evaluación de la actividad antioxidante en los extractos de levadura	58
6.10. Análisis de secuenciamiento de nucleótidos de los plásmidos construidos	59

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 60

7.1. Péptidos con reportada actividad antioxidante	60
--	----

7.2. Clonación <i>in vivo</i>	60
7.3. Verificación de la correcta inserción de los insertos clonados.....	63
7.4. Ensayo de resistencia a peróxido de hidrógeno de los transformantes con los plásmidos pSCpepEc, pSCpepRp y pSCpepOa.....	64
7.5. Confirmación de la resistencia a peróxido de hidrógeno	66
7.6. Determinación de la actividad antioxidante de los extractos de levadura mediante el ensayo ABTS	69
7.7. Efecto antioxidante de péptidos que confieren resistencia a peróxido de hidrógeno en <i>S. cerevisiae</i>	71
VIII. CONCLUSIONES	74
IX. RECOMENDACIONES	75
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
XI. ANEXOS.....	88

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Ejemplos de especies reactivas de oxígeno (ERO)	3
Tabla 2: Clasificación y principales características de la radiación UV.	4
Tabla 3: Péptidos reportados con actividad antioxidante demostrada mediante ensayos <i>in vitro</i>	8
Tabla 4. Comparación de los codones generados con las estrategias NNK (NNT/G) y NNS (NNC/G) y las respectivas frecuencias de uso de codones en <i>S. cerevisiae</i>	18
Tabla 5: Identificación taxonómica de los especímenes colectados en el cerro Ccamarrara, Cusco-Perú.	32
Tabla 6: Contenido de fenoles totales en los extractos obtenidos por el método Folin-Ciocalteu.....	35
Tabla 7: Actividad antioxidante de los extractos obtenidos por el ensayo DPPH.	36
Tabla 8. Oligonucleótidos usados en la construcción y verificación de la cepa mutante <i>sod1</i>	37
Tabla 9. Secuencias de los oligonucleótidos usados para la obtención de los fragmentos que permitieron la producción de los péptidos con reportada actividad antioxidante.	47
Tabla 10: Secuencias codificantes y cebadores empleados en la generación de la biblioteca de plásmidos.	51
Tabla 11: Eficiencia de clonación para los insertos SCpepEc, SCpepRp, SCpepOa y aleatorio.	62
Tabla 12: Contenido de proteínas en los extractos de levadura analizados	69
Tabla 13: Valores de IC ₅₀ calculados para los extractos de levadura de los retransformantes.	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de la regulación de la localización del factor de transcripción Yap1.....	11
Figura 2. Efecto del peróxido de hidrógeno en la expresión génica de <i>S. cerevisiae</i>	12
Figura 3. Vías de generación de ERO y rol de Sod1 frente al estrés oxidativo en <i>S. cerevisiae</i>	14
Figura 4. Representación esquemática de la regulación del factor de transcripción Sod1 frente al estrés oxidativo en <i>S. cerevisiae</i>	15
Figura 5. Construcción de una biblioteca de péptidos aleatorios mediante clonación <i>in vivo</i> en <i>S. cerevisiae</i>	16
Figura 6. Uso de tripletes “NNK” para la disminución de la redundancia de los codones generados aleatoriamente.	17
Figura 7. Flujograma de los procedimientos seguidos para el estudio del efecto antioxidante en <i>S. cerevisiae</i> de extractos vegetales y péptidos.....	22
Figura 8. Diagrama general del ensayo de fenoles totales de los extractos acuosos mediante el método Folin-Ciocalteu.	25
Figura 9. Descripción del ensayo de actividad antioxidante de los extractos acuosos mediante el ensayo DPPH.	26
Figura 10. Proceso de eliminación del gen <i>SOD1</i> en <i>S. cerevisiae</i> por recombinación homóloga.	28
Figura 11. Representación esquemática de los ensayos que permiten diferenciar el efecto antioxidante total del intracelular de los extractos acuosos en la levadura. ..	29
Figura 12. Descripción del ensayo <i>in vivo</i> que permite comparar la actividad antioxidante total de los extractos acuosos.	30
Figura 13. Esquema del procedimiento seguido para distinguir los efectos intracelulares y extracelulares de los antioxidantes.	31
Figura 14. Imágenes de los siete especímenes recolectados en el cerro Ccamarrara, Cusco-Perú.....	33
Figura 15. Panel fotográfico de la determinación de fenoles totales de los extractos acuosos por el método Folin-Ciocalteu.	34
Figura 16. Análisis electroforético de la reacción de PCR que permitió la obtención del cassette de delección del gen <i>SOD1</i>	37
Figura 17. Obtención de la cepa mutante <i>sod1</i>	38

Figura 18. Ensayo de PCR para la verificación de la correcta inserción del cassette de delección.....	38
Figura 19. Prueba de resistencia de la cepa silvestre y <i>sod1</i> a peróxido de hidrógeno. .	39
Figura 20. Demostración del efecto antioxidante del ácido ascórbico en la cepa <i>sod1</i> mediante el ensayo de diluciones seriadas.	40
Figura 21. Efecto de los extractos acuosos en el crecimiento de <i>sod1</i>	41
Figura 22. Efectos antioxidantes intracelulares y totales del ácido ascórbico y los extractos acuosos.	42
Figura 23. Comparación de los resultados obtenidos para los ensayos de contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante de los extractos acuosos.	43
Figura 24. Clonación <i>in vivo</i> por recombinación homóloga en <i>S. cerevisiae</i>	45
Figura 25. Características del plásmido pRS416-GPD.	46
Figura 26. Generación del fragmento a clonar en <i>S. cerevisiae</i>	48
Figura 27. Estrategia para la obtención de los fragmentos a clonar mediante PCR, a partir de la plantilla principal NNK, la plantilla complementaria EXTrv y los cebadores 25dir y 30rv.	53
Figura 28. Descripción del ensayo de resistencia de los transformantes.....	55
Figura 29. Proceso seguido para la cuantificación de la capacidad antioxidante del extracto de levadura mediante el ensayo de ABTS.....	59
Figura 30. Obtención de los insertos a clonar en <i>S. cerevisiae</i>	61
Figura 31. Obtención de los insertos aleatorios a clonar en <i>S. cerevisiae</i>	61
Figura 32. Análisis electroforético de la digestión del plásmido pRS416-GPD con la enzima de restricción <i>EcoRI</i>	62
Figura 33. Verificación de la presencia de los insertos SCpepEc, SCpepRp y SCpepOa en el ADN total de los transformantes seleccionados.	63
Figura 34. Verificación de la presencia de los insertos aleatorios en el ADN total de los transformantes seleccionados.	64
Figura 35. Ensayo de resistencia a peróxido de hidrógeno conferida por los plásmidos pSCpepEc, pSCpepRp y pSCpepOa presentes en los transformantes de la cepa silvestre, <i>sod1</i> y <i>yap1</i>	65
Figura 36. Ensayo de diluciones en serie para la verificación de resistencia a peróxido de hidrógeno conferida por los plásmidos pSCpepEc, pSCpepRp y pSCpepOa para la cepa silvestre, <i>sod1</i> y <i>yap1</i>	68

Figura 37. Curva de calibración para la cuantificación de proteínas totales mediante el método de Bradford.	69
Figura 38. Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos de levadura retransformados con los plásmidos pSCpepEc, pSCpepRp y pSCpepOa.	70

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Análisis taxonómico de las especies vegetales colectadas en el cerro Ccamarrara.....	88
ANEXO 2. Curva de calibración para la cuantificación de fenoles totales.....	89
ANEXO 3. Transformación de células <i>sod1</i> para la construcción de la biblioteca de plásmidos mediante clonación <i>in vivo</i>	89
ANEXO 4. Transformantes de la cepa silvestre obtenidos para la clonación de las secuencias codificantes para los péptidos SCpepEc, SCpepRp y SCpepOa. 90	
ANEXO 5. Transformantes de la cepa <i>sod1</i> obtenidos para la clonación de las secuencias codificantes para los péptidosSCpepEc, SCpepRp y SCpepOa.	91
ANEXO 6. Transformantes de la cepa <i>yap1</i> obtenidos para la clonación de las secuencias codificantes para los péptidos SCpepEc, SCpepRp y SCpepOa.	92

RESUMEN

La importancia del estudio de los productos naturales se basa en sus múltiples propiedades bioactivas, entre ellas la capacidad antioxidante. Esta última puede ser estimada mediante ensayos *in vitro* que son ampliamente usados, y ensayos *in vivo* que son usados con menos frecuencia, debido a las dificultades de su implementación e interpretación. Por este motivo, en esta investigación se planteó el estudio de antioxidantes usando a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la cual se dividió en dos partes: la primera consistió en evaluar la actividad antioxidante de los extractos acuosos de siete plantas silvestres mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*. El ensayo *in vitro* se basó en el uso de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y el ensayo *in vivo*, en la sensibilidad del mutante de *S. cerevisiae* *sod1* hacia el peróxido de hidrógeno. Las siete plantas silvestres colectadas en el cerro Ccamarrara (4000 m.s.n.m. Cusco, Perú) fueron las siguientes: *Plantago australis*, *Baccharis latifolia*, *Ageratina sternbergiana*, *Stevia macbridei*, *Ageratina cuzcoensis*, *Calceolaria myriophylla* y *Adiantum orbignyianum*.

Los resultados obtenidos del ensayo DPPH demostraron un alto contenido de antioxidantes en las hojas secas de las plantas analizadas, con valores de capacidad antioxidante equivalente de ácido ascórbico (AAEAC) que oscilan entre 20,6 y 72,7 mg/g. Asimismo, se determinó la actividad antioxidante de los extractos acuosos en ensayos con levadura, los que además permitieron distinguir entre los efectos intracelulares y extracelulares. Estos resultados demuestran la necesidad de impulsar la investigación de actividad antioxidante en sistemas *in vivo* que complementen los ensayos *in vitro* tradicionales en extractos acuosos de plantas silvestres nativas de los Andes, debido a su importancia como fuentes de compuestos antioxidantes.

La segunda parte de esta investigación incluyó estudios *in vivo* de la capacidad antioxidante de péptidos reportados por varios autores (derivados de hidrolizados de proteínas) y péptidos aleatorios. Para ello, se clonaron en el plásmido de expresión pRS416-GPD a las secuencias que codifican para los péptidos de interés, mediante clonación *in vivo* en células de levadura. La evaluación de la actividad antioxidante de los péptidos expresados fue realizada mediante ensayos de resistencia de los transformantes al peróxido de hidrógeno. Posteriormente, los plásmidos construidos y caracterizados en la levadura fueron recuperados y amplificados en células de *Escherichia coli* lo que permitió su purificación y análisis por secuenciamiento de nucleótidos. La optimización de este protocolo de clonación y expresión fue

posteriormente aplicada para la construcción de una biblioteca de plásmidos, la que permite la generación de una gran diversidad de oligopéptidos aleatorios. Esta biblioteca podría ser eficientemente aplicada para la identificación de oligopéptidos con capacidad antioxidante y otras de interés.

Los resultados reportados en este trabajo demostraron que el uso de la levadura *S. cerevisiae* permite la eficiente caracterización y evaluación de la actividad antioxidante mediante el ensayo de resistencia al peróxido de hidrógeno. Es decir, que los estudios de antioxidantes con *S. cerevisiae* demostraron ser un método complementario para evaluar el efecto antioxidante de péptidos y extractos vegetales.

Palabras clave: actividad antioxidante, péptidos aleatorios, clonación *in vivo*, *sod1*, *yap1*.

ABSTRACT

The importance of the study of natural products is based on their multiple bioactive properties, including antioxidant capacity. The later can be estimated through *in vitro* assays that are widely used, and *in vivo* assays are used less frequently, due to the complexity of the mechanism of action. For this reason, in this investigation the study of antioxidants using *Saccharomyces cerevisiae* was proposed, which was divided into two parts: the first consisted of evaluation the antioxidant activities of the aqueous extracts of seven wild plants through *in vitro* and *in vivo* tests. The *in vitro* assay was based on the use of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), and the *in vivo* assay, on the sensitivity of yeast *sod1* mutants towards hydrogen peroxide. The seven wild plants collected in the Ccamarrara hill (4000 m.a.s.l Cusco, Peru) were the following: *Plantago australis*, *Baccharis latifolia*, *Ageratina sternbergiana*, *Stevia macbridei*, *Ageratina cuzcoensis*, *Calceolaria myriophylla* and *Adiantum orbignyanum*.

The DPPH assay revealed a high content of antioxidants in the dried leaves of all tested plants, with ascorbic acid equivalent antioxidant capacity (AAEAC) values ranging from 20.6 to 72.7 mg/g. The antioxidant activity was also demonstrated in tests with yeast cells, which advantageously allowed distinction between intracellular and extracellular effects. These *in vitro* and *in vivo* studies of antioxidant activity demonstrate the need for further investigation of native Andean wild plants as important sources of water-soluble antioxidant compounds.

The second part of this investigation included *in vivo* studies of the antioxidant capacity of reported peptides (derived from protein hydrolysates) and random peptides. To do this, the sequences coding for the peptides of interest were cloned in the pRS416-GPD expression plasmid, by *in vivo* cloning in yeast cells. The evaluation of the antioxidant activity of the expressed peptides was determined by resistance tests of the transformants to hydrogen peroxide. Subsequently, the plasmids that had been constructed and characterized in yeast were recovered and amplified in *Escherichia coli* cells, which allowed their purification and analysis by nucleotide sequencing. The optimization of this cloning and expression protocol was later applied in the construction of a plasmid library, which allows the generation of a great diversity of random oligopeptides. This library could be efficiently applied for the identification of oligopeptides with antioxidant capacity and others of interest.

The results reported in this work demonstrated that the use of *S. cerevisiae* yeast allows the efficient characterization and evaluation of antioxidant activity through the hydrogen peroxide resistance assay. Further, the antioxidant studies with *S. cerevisiae* proved to be a complementary method to evaluate the antioxidant effect of peptides and plant extracts.

Keywords: antioxidant activity, random peptides, *in vivo* cloning, *sod1*, *yap1*.

I. INTRODUCCIÓN

Los antioxidantes son compuestos capaces, a través de varios mecanismos, de eliminar los radicales libres, principalmente las especies reactivas de oxígeno (ERO). (Roohinejad et al. 2017, Eruygur et al. 2019, Shafi et al. 2019, Santos-Sánchez et al. 2019). Entre los compuestos con potencial antioxidante, están los compuestos fenólicos, los carotenoides, los péptidos, las vitaminas C y E (Pereira Nunes et al. 2012, Olugbami et al. 2015)

Las ERO como los aniones superóxido, el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo, el oxígeno singlete y los radicales peroxilo lipídicos son, normalmente, subproductos del metabolismo celular (proceso aeróbico) y las responsables del estrés oxidativo. Por otra parte, la radiación solar es otro potente generador de las ERO, específicamente en la piel cuando ésta es constantemente expuesta a la radiación UV (Dunaway et al. 2018, Kanlayavattanakul et al. 2018), la cual muchas veces da lugar al desarrollo de enfermedades como el cáncer, debido al ataque de moléculas clave como el ADN, proteínas y lípidos (Sheih et al. 2009, He et al. 2018).

Es importante destacar que según los reportes del Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología del Perú (SENAMHI), en la última década, en nuestro país se reportaron valores promedio de índice de radiación ultravioleta (IUV) de 8 durante el invierno y hasta 18 (valor extremo) durante el verano (INEI 2018, CONIDA 2018, Lozano et al. 2016). Este hecho preocupante ha conducido a la búsqueda de moléculas con potencial antioxidante, ya que actualmente son considerados como importantes agentes de fotoprotección, a través de la absorción o inhibición de radicales libres producidos por la radiación UV (Kostyuk et al. 2017, Cruces et al. 2018).

La actividad antioxidante puede ser cuantificada a través de ensayos *in vitro* (generalmente por el método de DPPH) o ensayos *in vivo* (Pereira Nunes et al. 2012). En este sentido, recientemente se ha reportado el uso del mutante de *Saccharomyces cerevisiae sod1 (sod1)* como biosensor del estrés oxidativo. El gen *SOD1* codifica para la enzima superóxido dismutasa, que funciona además como un factor de transcripción, y por esto, su eliminación confiere alta sensibilidad a un amplio rango de oxidantes. Dicho rasgo permite la identificación de antioxidantes mediante ensayos de crecimiento, convirtiendo así a la cepa *sod1* en un biosensor (Zyracka et al. 2005, Świąciło et al. 2018). De acuerdo a lo mencionado, la presente investigación tuvo como finalidad el estudio de antioxidantes usando la levadura *S. cerevisiae*, para ello el trabajo se dividió en dos partes.

La primera consiste en el estudio de antioxidantes provenientes de extractos acuosos de especies vegetales, usando a la cepa de levadura *sod1*. La segunda parte consiste en el uso de la levadura para la producción y evaluación de la actividad antioxidante de tres péptidos reportados (derivados de hidrolizados de proteínas) y la construcción de una biblioteca de plásmidos para la síntesis de péptidos aleatorios.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Especies reactivas de oxígeno

El papel del oxígeno en los organismos aeróbicos es un tanto ambivalente y problemático porque, aunque es esencial para la generación de ATP, también está presente en los enlaces químicos de moléculas que son altamente reactivas, comúnmente conocidas como especies reactivas de oxígeno (ERO), que pueden tener efectos perjudiciales sobre las macromoléculas. Las principales ERO (Tabla 1) incluyen al oxígeno singlete y las formas reducidas de oxígeno tales como el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo (Marschall y Tudzynski 2016). La producción de las ERO puede ser (i) endógena, la cual incluye aquellos productos de las reacciones de transferencia de electrones (que tiene lugar en la mitocondria, cloroplastos y peroxisomas), así como subproductos de la cadena respiratoria y de las reacciones enzimáticas, (ii) exógena, causada principalmente por la radiación solar, ozono, contaminantes ambientales (Ziech et al. 2011), etc. Es importante destacar que, cuando la generación de las ERO excede la capacidad de las células para metabolizarlas y desintoxicarlas, surge un estado de "estrés oxidativo". Bajo este escenario se inician procesos fisiopatológicos que son catastróficos para la función celular (Olson 2020), esto debido a que puede dañar a macromoléculas importantes como el ADN y promover así la inestabilidad genómica (He et al. 2018, Kong y Chandel 2020).

Tabla 1: Ejemplos de especies reactivas de oxígeno (ERO)

Especies reactivas de oxígeno	Fórmula
Superóxido	$O_2^{\bullet -}$
Anión hidroxil	$\bullet OH$
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
Peroxilo	$ROO^{\bullet -}$
Radicales alcohoxilo	RO^{\bullet}
Ozono	O_3
Oxígeno singlete	1O_2

(Fuente: Marschall y Tudzynski 2016)

2.2. La radiación UV y la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO)

La radiación UV, un potente generador de ERO, comprende tres subcategorías basadas en su longitud de onda, UVA, UVB y UVC (Tabla 2). Entre éstas, las radiaciones UVA y UVB son los biológicamente relevantes ya que los rayos UVC, considerados extremadamente dañinos, son bloqueados por la capa de ozono estratosférico, minimizando su impacto con la superficie terrestre (De Jager et al. 2017, Dunaway et al. 2018).

Tabla 2: Clasificación y principales características de la radiación UV.

Categoría	Características	Efectos positivos	Sobreexposición
UVA (320 – 400 nm)	No sufre cambios significativos al atravesar la capa de ozono.	Necesaria para la producción de vitamina D en humanos.	Bronceado, seguido de quemaduras. Endurecimiento epidérmico. Formación de cataratas.
UVB (290 – 320 nm)	Parcialmente filtrada por la capa de ozono.	Esencial para la producción de vitamina D en humanos.	Quemaduras solares. Cataratas. Inicio del proceso cancerígeno en la piel.
UVC (220 – 290 nm)	Absorbida casi completamente por la capa de ozono.	Usada como germicida.	Una exposición accidental puede causar quemaduras corneales

(Fuente: Adaptado De Jager et al. 2017)

La piel humana al ser el órgano más grande que cubre toda la superficie del cuerpo, puede estar expuesta por largos periodos a la radiación UV. La síntesis de melanina, pigmento sintetizado por los melanocitos, es estimulada por la exposición al sol, las fuentes artificiales y la inflamación, los cuales conducen a una hiperpigmentación posinflamatoria. Los melanocitos epidérmicos son, por lo tanto, susceptibles a las ERO, cuya producción es inducida a través de la exposición excesiva al sol. La inducción de las ERO por la radiación UV se puede dar bajo diferentes mecanismos como (1) la alteración de la actividad de la catalasa, mediada por la radiación UVC, que conduce a la formación de protones dispuestos a reaccionar con el oxígeno molecular para la formación de las ERO (De Jager et al. 2017); (2) la activación de la óxido nítrico sintasa de los

queratinocitos humanos para la liberación de NO y peroxinitrito, mediada por la radiación UVB (Deliconstantinos et al. 1996); (3) alteración del ciclo celular, proliferación y apoptosis a través de la activación de las vías de señalización, mediada por la radiación UVA, como el caso de las MAPK (Mitogen-activated protein kinase); y (4) el efecto de UVA sobre la proteína quinasa C, que conduce a un aumento en los niveles de las ERO y la peroxidación de lípidos tanto en fibroblastos jóvenes como envejecidos (Bossi et al. 2008).

2.3. Antioxidantes

Los antioxidantes son definidos como cualquier sustancia que elimina directamente las ERO, actúa indirectamente en el incremento de los mecanismos específicos de defensa, o inhibe la producción de ERO (Khlebnikov et al. 2007). Por estas razones, son una pieza clave para mantener la homeostasis redox durante los procesos metabólicos.

Los mecanismos de acción de los antioxidantes frente a los radicales libres, como las ERO, son muchos y consisten en (1) eliminar las especies que inician la peroxidación, (2) quelar los iones metálicos de modo que no puedan generar especies reactivas como el radical hidroxilo y así evitar las reacciones de Fenton y Haber Weiss, (3) atenuar la reactividad de radicales superóxido previniendo la formación de peróxidos, (4) romper la reacción en cadena auto-oxidativa (Brewer 2011).

En las últimas dos décadas se ha dado mucho énfasis a los antioxidantes naturales, esto se debe a una tendencia general hacia el empleo de los ingredientes naturales en los alimentos o especies vegetales. Como resultado, los antioxidantes nutritivos y no nutritivos naturales (también conocidos como fitoquímicos) se han convertido en un área importante de investigación científica. Los cambios de estilo de vida en el mundo industrializado moderno, por otra parte, han desencadenado una creciente conciencia sobre la importancia de la inclusión de antioxidantes no nutritivos en nuestra dieta (Demo et al. 1998, Shahidi y Zhong 2008, Olugbami et al. 2015).

Las plantas cuentan con una amplia gama de compuestos antioxidantes, de naturaleza polar como no polar, siendo los compuestos fenólicos los principales constituyentes, además de los tocoferoles que son eficientes antioxidantes liposolubles (Shahidi y Zhong 2015) y algunos aceites esenciales (Demo et al. 1998). Así, diferentes metabolitos como los compuestos fenólicos, los carotenoides, la vitamina D, la vitamina E y algunos péptidos han sido reportados como principales componentes con actividad antioxidante entre las especies vegetales (Olugbami et al. 2015, Rodríguez-García et al. 2019), las

cuales cuentan con una gran variedad de actividades biológicas, como la fotoprotectora (Dunaway et al. 2018), anticancerígena (Manganaris et al. 2014, Gupta et al. 2018), citoprotectora (Lin et al. 2018), antimicrobiana (Behlil et al. 2019), entre otras.

Los compuestos fenólicos pueden retrasar la invasión microbiana en algunos productos y prevenir el deterioro en otros, principalmente frutas y verduras. Esta propiedad hace que los compuestos fenólicos sean adecuados para muchas aplicaciones de conservación de alimentos, tanto para extender la vida útil como para convertirlos en alimentos funcionales (Martillanes et al. 2017). Además, los compuestos fenólicos tienen aplicaciones potenciales en cosmética, ya que son buenas alternativas para el tratamiento y prevención del envejecimiento prematuro debido a sus efectos fotoprotectores y antiinflamatorios. También se utilizan para prevenir o reducir la degradación oxidativa de los principios activos cosméticos y así evitar la oxidación del contenido graso del preparado (de Lima Cherubim et al. 2020).

Existen varios métodos ampliamente estudiados para medir las capacidades antioxidantes. Los métodos pueden evaluarse mediante pruebas *in vitro* e *in vivo*. El ensayo de radicales libres de 2,2-difenil-1-picrilhidrazina (DPPH) es uno de los más comunes debido a su simplicidad y alta eficiencia (Blois 1958, Liu et al. 2009), junto con el ensayo de capacidad antioxidante equivalente Trolox (TEAC) que emplea el radical catiónico 2,2'-Azinobis-3-etil-benzo-tiazolina-6-ácido sulfónico (ABTS), entre otros ensayos. Sin embargo, muchas veces estas estimaciones no se reflejan en situaciones *in vivo* (Shahidi y Zhong 2015, Święciło et al. 2018). Por esta razón, es una buena opción utilizar *S. cerevisiae* como organismo modelo para determinar la actividad antioxidante (Zyracka et al. 2005, Święciło et al. 2018). Así mismo, la investigación con levadura puede ser una etapa intermedia entre los estudios bioquímicos *in vitro* y los estudios en animales y humanos.

2.3.1. Antioxidantes polares

Un método común para determinar la capacidad antioxidante de los extractos de plantas es medir la capacidad antioxidante hidrófila o lipófila total del extracto. Alternativamente, se pueden extraer y caracterizar antioxidantes individuales. Por ejemplo, la vitamina C es un antioxidante soluble en agua que neutraliza los radicales libres de superóxido, peróxido de hidrógeno e hidroxilo. Asimismo, los compuestos fenólicos son hidrosolubles y excelentes antioxidantes, ya que su estructura les permite donar fácilmente átomos de hidrógeno a los radicales libres. Por el contrario, también hay ejemplos de antioxidantes

lipofílicos, como la vitamina E, los carotenoides y los compuestos fenólicos conjugados (Surh 2002, Frary et al. 2008).

Se ha informado sobre la importancia de los fenoles polares en la estabilidad de los aceites. Por ejemplo, en el caso del aceite de oliva, existe una correlación entre la estabilidad y el contenido de fenoles individuales (por ejemplo, hidroxitirosol) o totales; De manera similar, algunas agliconas de oleuropeína (compuestos no polares) fueron identificadas como agentes estabilizantes pero, su actividad no se ha investigado experimentalmente a fondo debido a su inestabilidad oxidativa o dificultades en su aislamiento (Boskou et al. 2006).

2.4. Péptidos bioactivos con propiedad antioxidante

Los péptidos bioactivos constan, usualmente, de menos de 50 residuos y tienen funciones diversas. Aunque algunos de estos péptidos son sintetizados como tal, muchos forman parte de proteínas que pueden liberarse mediante hidrólisis enzimática, fermentación, entre otros (Yang et al. 2019).

Los péptidos bioactivos tienen efectos biológicos importantes y se han destacado por su aplicación en la mejora de la salud y su uso en la producción de alimentos, medicamentos y otros productos saludables. Además, se caracterizan por tener diversas funciones fisiológicas, lo que los convierte en opciones prometedoras para la producción de compuestos terapéuticos; estas propiedades dependen del tipo, cantidad, secuencia y propiedades de sus aminoácidos (Akbarian et al. 2022).

En este sentido, recientemente se ha demostrado que algunos péptidos liberados a partir de diversas proteínas de diferentes especies como *Johnius belengerii* (Kim et al. 2007, Yang et al. 2019), *Rana pleuraden* (Yang et al. 2009), *Eleusine coracana* (Agrawal et al. 2019), muestran múltiples propiedades biológicas, como antioxidantes, anticancerígenas, entre otras (Agrawal et al. 2019, Sannasimuthu et al. 2019). Además, existe un interés creciente en el descubrimiento de péptidos antioxidantes a partir de proteínas alimentarias y su uso en alimentos funcionales y nutraceuticos en todo el mundo (Yang et al. 2019).

Los péptidos antioxidantes y antimicrobianos derivados de fuentes de proteínas naturales como la harina de nuez, el pepino de mar y la sangre de *Andrias davidianus*, son superiores a los compuestos sintéticos, ya sea en valor nutricional o seguridad y tienen, por tanto, una buena perspectiva de mercado en la industria alimentaria. Adicionalmente, se ha demostrado que los hidrolizados enzimáticos de proteínas de peces marinos son una fuente prometedora de péptidos antioxidantes y antimicrobianos (Wang et al. 2018). Al

respecto, la Tabla 3 muestra una lista de diferentes secuencias de aminoácidos de péptidos con reportada actividad antioxidante mediante ensayos *in vitro* como DPPH, ABTS, entre otros.

Tabla 3: Péptidos reportados con actividad antioxidante demostrada mediante ensayos *in vitro*.

Fuente	Secuencia	Ensayos <i>in vitro</i> realizados	Referencia
<i>Eleusine coracana</i>	TSSSLNMAVRGGLTR	DPPH, ABTS y radical hidroxilo	(Agrawal et al. 2019)
	STTVGLGISMRSASVR		
<i>Rana pleuraden</i>	AMRLTYNKPCLYGT	DPPH, potencial reductor de hierro	(Yang et al. 2009)
<i>Odorrana andersonii</i>	GLFSMILGVGKKTLCG LSGLW	DPPH y ABTS	(Yang et al. 2016)
<i>Arthrospira platensis</i>	GGTCVIRGCVPKKLM	DPPH	(Sannasimuthu et al. 2019)
<i>Tergillarca granosa</i>	MDLFTE	DPPH	(Yang et al. 2019)
	WPPD		
<i>Johnius belengerii</i>	ESTVPERTHPACPDFN	DPPH	(Kim et al. 2007)

(Fuente: Elaboración propia, 2023)

2.5. *Saccharomyces cerevisiae*

Es un organismo eucariota unicelular que se utiliza a menudo en diversos procesos industriales y ha demostrado ser ideal para fines de investigación, especialmente desde que el secuenciamiento completo de su genoma (que consta de 6000 genes) se puso a disposición de la comunidad científica (Goffeau et al. 1996, Gddoa Al - sahlany et al. 2020). Hoy en día, la levadura se utiliza como modelo para el estudio de procesos biológicos fundamentales y como herramienta en diversos campos como el estudio del envejecimiento, de las enfermedades neurodegenerativas, del cáncer o del mecanismo de señalización en plantas. Además, de su uso como biosensor para el estudio de antioxidantes. (Zyracka et al. 2005, Święciło et al. 2018).

Las aplicaciones de la levadura en la investigación y el desarrollo biotecnológico se han diversificado y fortalecido con las estrategias de biología sintética e ingeniería metabólica, las que permiten la creación de nuevas fábricas celulares para generar productos de valor añadido como biocombustibles, productos químicos, biomasa, etc.

Hasta la fecha, solo un puñado de estos productos se ha producido a escala comercial debido al alto costo que demanda desarrollar una factoría celular robusta. Sin embargo, la biología sintética tiene el potencial de diseñar sistemas biológicos adecuados que optimicen las rutas bioquímicas no nativas en la levadura y proporcionen un buen rendimiento de producción (Li y Borodina 2015). Por ejemplo, la producción de péptidos antibacteriales, resveratrol y sus derivados en *S. cerevisiae* (Gddoa Al-sahlany et al. 2020).

2.5.1. Implicancias de las superóxido dismutasa en enfermedades

La función principal de las superóxido dismutasa es la desintoxicación de los radicales libres de superóxido en el entorno celular. Sin embargo, estudios recientes han demostrado varias funciones, como la activación de la transcripción de genes nucleares o la actividad de proteínas de unión a ARN (Eleutherio et al. 2021). Por otro lado, se sabe que el plegamiento incorrecto y la agregación de la superóxido dismutasa 1 están asociados con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas tales como la de Parkinson, Alzheimer y la esclerosis lateral amiotrófica (Martins y English 2014). El plegamiento incorrecto de las superóxido dismutasa, y su posterior acumulación durante la senescencia celular, a menudo se asocia con daño oxidativo. Paradójicamente, su actividad dismutasa, que forma peróxido de hidrógeno como producto, puede hacer que la superóxido dismutasa 1 sea más susceptible a oxidarse que otras proteínas. Esto último, probablemente, debido a que la oxidación selectiva de los residuos de coordinación del Cu (II) lo que causa una pérdida de la actividad catalítica (Valentine et al. 2005, Martins y English 2014).

2.6. Respuesta de *Saccharomyces cerevisiae* a especies reactivas de oxígeno

Las células están continuamente expuestas a numerosos agentes exógenos y endógenos que dañan el ADN. El daño al ADN altera la replicación y la transcripción, provoca la muerte celular y puede causar mutaciones. Se estima que los efectos nocivos mediados por las ERO contribuyen a las condiciones degenerativas humanas, así como el proceso de envejecimiento. Aunque el nombre ERO se refiere a la naturaleza reactiva de los átomos, las ERO abarcan un grupo de moléculas que son muy diferentes y con funciones específicas, pero involucran reacciones con constantes de velocidad altas (Picazo y Molin 2021). Si bien se ha demostrado que la presencia de ERO es perjudicial para las células,

a su vez pueden actuar como moléculas de señalización inducidas por el estrés cuando los niveles de ERO exceden el equilibrio.

En respuesta al estrés oxidativo, las células activan tanto los procesos de reparación del ADN y los factores de transcripción. Estos factores, a su vez, regulan los niveles de expresión de las enzimas de procesamiento y captación de las ERO. Por ejemplo, el aumento de los niveles intracelulares de las ERO induce una de esas modificaciones postraduccionales del factor de transcripción Yap1, lo que conduce a la inducción de muchos genes. Para mantener la estabilidad del genoma bajo el estrés inducido por las ERO, las células han desarrollado múltiples vías para reparar o responder a la presencia de daño en el ADN. En *S. cerevisiae*, estas vías incluyen la reparación de inversión directa (DRR), la reparación por escisión de bases (BER), la reparación por escisión de nucleótidos (NER), la reparación por desajustes (MMR), la síntesis por translesión (TLS) y la recombinación (REC). Si bien algunas de estas vías median en la reparación del ADN dañado (inversión directa, BER, NER y MMR), otras funcionan para evitar el daño de modo que se tolere la lesión del ADN y pueda ocurrir la replicación (TLS y REC). Todas estas vías son individualmente importantes para la célula; pero los tipos de daño en el ADN se superponen para cada vía (Rowe et al. 2008).

El peróxido de hidrógeno es una especie reactiva de oxígeno de gran estabilidad, es bastante difusible y reactivo, por lo que debe eliminarse de las células para evitar las reacciones de Fenton y Haber-Weiss que conducen a la formación de radicales hidroxilo, altamente reactivos. Asimismo, se considera que es el principal metabolito redox activo en la detección, señalización y regulación redox y la ERO más abundante en células de mamíferos. Como molécula mensajera, el peróxido de hidrógeno se difunde a través de las células y los tejidos, iniciando efectos celulares inmediatos, como la activación de la proliferación y reclutamiento de las células inmunitarias en los tumores. Esto significa que el peróxido de hidrógeno puede transportar la señal redox desde el origen hasta el sitio de destino, por lo que a bajas concentraciones de las ERO puede actuar como un segundo mensajero involucrado en las vías de señalización y tener efectos beneficiosos. Sies y colaboradores informaron recientemente dos nuevos conceptos: el “eustrés” oxidativo (“eustress”, del griego: ‘eu’, que significa ‘bueno’, ‘bien’, ‘positivo’) para los efectos beneficiosos del peróxido de hidrógeno y el radical superóxido; y el estrés oxidativo para el daño irreversible que puede resultar de niveles más altos de peróxido de hidrógeno y radical superóxido (Sies y Jones 2020, Picazo y Molin 2021).

Por su parte, Picazo y Molin (2021) encontraron que cinco factores de transcripción se activan tras la adición de peróxido de hidrógeno a la levadura: Yap1, Skn7, Maf1, Hsf1 y Msn2/4 (Picazo y Molin 2021). Entre todos los factores de transcripción la que más resalta es Yap1, la cual se activa en condiciones de estrés oxidativo y su ausencia hace que las células sean hipersensibles a los diversos agentes oxidantes (Rodrigues-Pousada et al. 2019). La Figura 1 muestra la respuesta de la levadura al estrés oxidativo. La regulación redox de Yap1 por oxidantes, como el peróxido de hidrógeno, implica dos dominios ricos en cisteína (CRD, por sus siglas en inglés “Cysteine-rich domains”) ubicados en los extremos N y C. El desplazamiento de Yap1 entre el núcleo y el citoplasma está mediado por la exportina Crm1/Xpo1 e importado por la importina Pse1. En condiciones de estrés, Yap1 se acumula en el núcleo porque su señal de exportación nuclear (NES) está enmascarada por la formación de un enlace disulfuro intramoleculare entre las cisteínas C303 y C598, evitando el reconocimiento de Crm1 (Rodrigues-Pousada et al. 2019, Picazo y Molin 2021). En consecuencia, hay una mayor expresión de genes diana (*TRX2*, *TRR1*, *SOD1*, *SOD2*, *TSA1*, *AHP1* y *SSA1*) mediada por Yap1, tal como se muestra en la Figura 2.

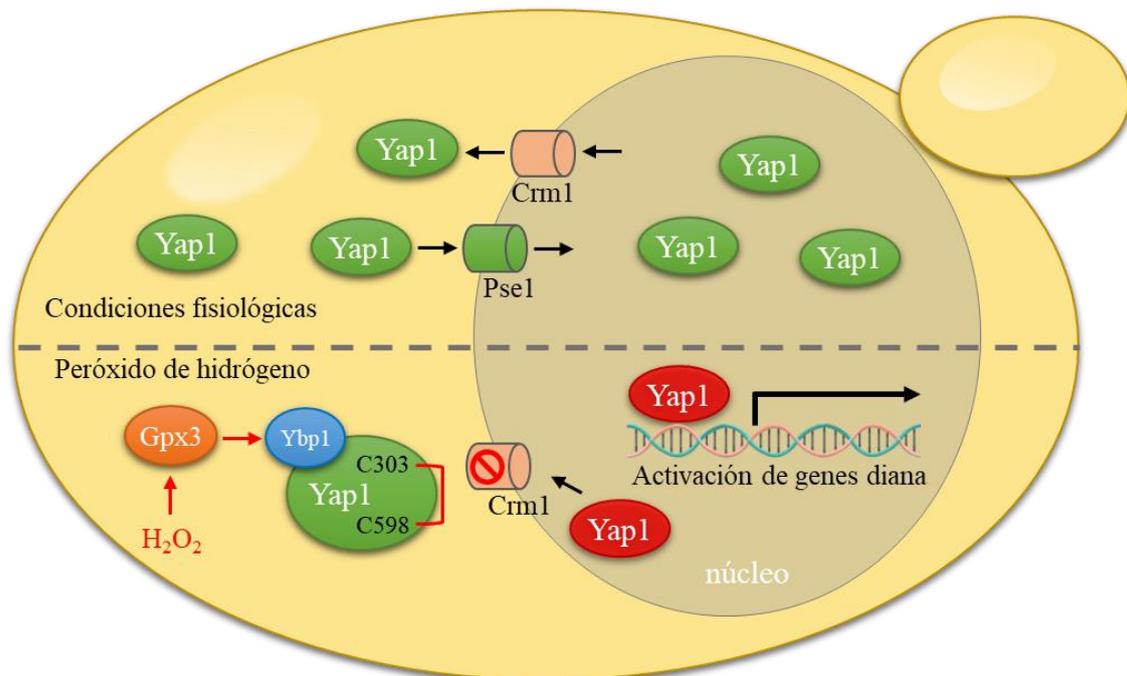


Figura 1. Representación esquemática de la regulación de la localización del factor de transcripción Yap1.

En el panel superior se representa el desplazamiento de Yap1 entre el núcleo y el citoplasma, que se produce en condiciones fisiológicas, entrando al núcleo por la importina Pse1 y saliendo del núcleo por la exportina Crm1. En el panel inferior se muestra la activación de Yap1 por peróxido de hidrógeno, que depende de las proteínas Hyr1/Gxp3/Orp1 y Ybp1. El peróxido de hidrógeno induce la formación de un enlace disulfuro entre los residuos de cisteína C303 y C598 de Yap1, impidiendo el reconocimiento de la señal de exportación nuclear (NES) por Crm1 (representado

en rojo el Yap1 activado). Así, el cambio conformacional conduce a la acumulación de Yap1 en el núcleo y a la posterior activación del gen. Fuente: *Rodrigues-Pousada et al. 2019*.

Asimismo, se ha demostrado que el peróxido de hidrógeno no oxida directamente a Yap1 sino que es Gpx3 quien actúa como sensor directo, transduciendo la señal a través de la formación de un puente disulfuro entre el residuo de cisteína C36 de Gpx3 y la cisteína C598 de Yap1 (Figura 2). Después de este evento, mediante una reorganización del puente disulfuro, Gpx3 se libera y se forma un enlace disulfuro intramolecular entre los residuos de cisteína C303 y C598 de Yap1, lo que induce un cambio conformacional que enmascara el sitio de reconocimiento del sistema de exportación nuclear, favoreciendo su acumulación en el núcleo. En algunos casos, se requiere a la proteína Skn7 junto con la proteína Yap1 para regular la expresión génica. Así mismo, el factor de transcripción de choque térmico 1, Hsf1, regula la transcripción de genes que contienen un elemento de choque térmico pentamérico (HSE) en condiciones normales. Sin embargo, cuando la levadura es expuesta al peróxido de hidrógeno, Hsf1 se une a los promotores de *CUP1*, *BTN2*, *SIS1*, *ERO1*, *SGT2* y *SSA3* para aumentar su actividad transcripcional (Folch-Mallol et al. 2004, Boissnard et al. 2009, Picazo y Molin 2021).

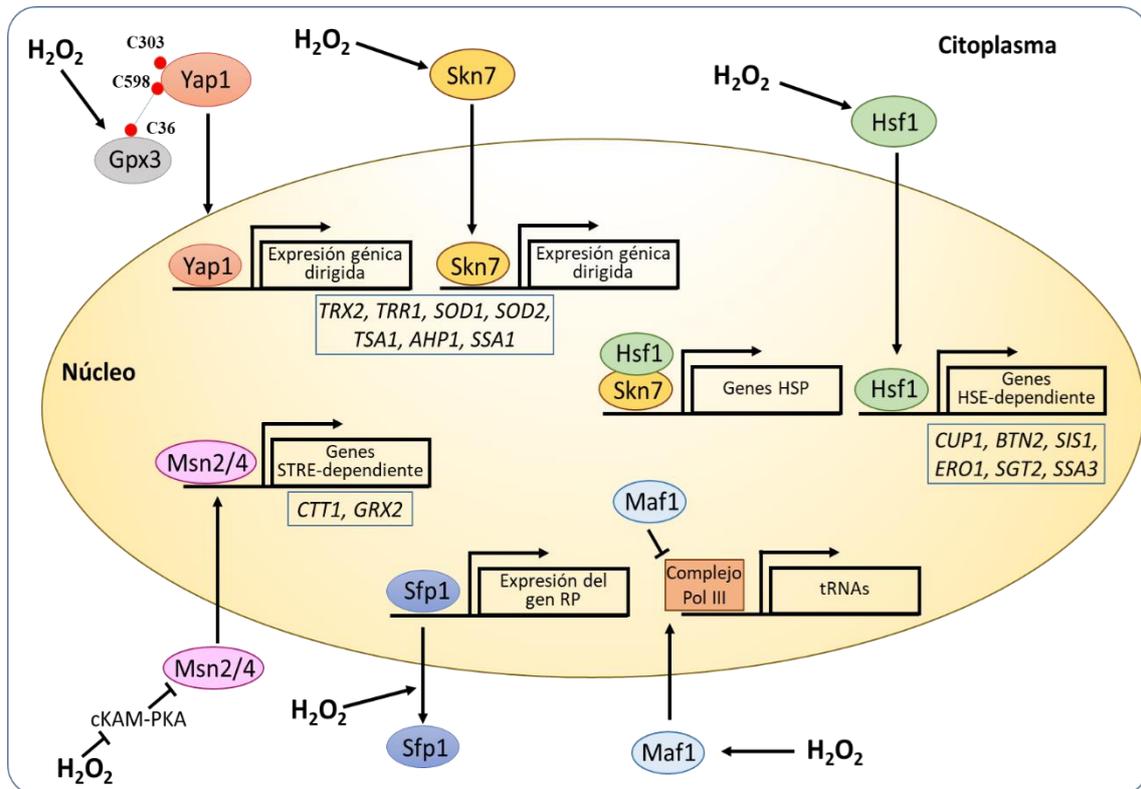


Figura 2. Efecto del peróxido de hidrógeno en la expresión génica de *S. cerevisiae*. Se representa la activación de cinco factores de transcripción en la levadura bajo un escenario de estrés oxidativo con peróxido de hidrógeno. La regulación de los genes de la respuesta antioxidante mediada por Yap1 depende de su acumulación en el núcleo. En presencia de H_2O_2 , se produce la formación de un enlace disulfuro entre un residuo de cisteína (puntos en color rojo)

C36 de Gpx3 y C598 de Yap1, el cual luego de una reorganización libera Gpx3 y forma un enlace disulfuro intramolecular en Yap1 (C598-C303), lo que impide la exportación nuclear, promoviendo la acumulación en el núcleo. Yap1 regula la expresión de varios genes diana (como *TRX2*, *TRR1*, *SOD1*, *SOD2*, *TSA1*, *AHP1* y *SSA1*) y muchas de ellas requieren de Skn7. Mientras que Msn2/4 activa la expresión de varios genes, entre ellos *CTTI*, que codifica para la catalasa. Fuente: Editado de Picazo y Molin 2021.

Los factores de transcripción Msn2/4, tras la adición de peróxido de hidrógeno, son transportados al núcleo para la activación de varios genes como *CTTI* (que codifica para la catalasa citosólica) a través de un elemento de respuesta al estrés (STRE). La detección de peróxido de hidrógeno por Msn2/4 se logra a través de una fosforilación dependiente de la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico, PKA. Al igual que Msn2/4, cuando la levadura está expuesta a peróxido de hidrógeno, Maf1 (un represor transcripcional de la ARN polimerasa III) se localiza en el núcleo controlando la disponibilidad de los ARNt. Adicionalmente, el factor de transcripción Sfp1 promueve la expresión de los genes de proteínas ribosomales (RP). En condiciones normales, Sfp1 se acumula en el núcleo y promueve la expresión de los genes RP, sin embargo, bajo condiciones de estrés oxidativo o cambios en la disponibilidad de nutrientes, Sfp1 abandona el núcleo causando una disminución en la transcripción del gen RP. En este sentido, el peróxido de hidrógeno desempeña un papel importante en diferentes etapas, desde la transcripción hasta la traducción (Boisnard et al. 2009, Sideri et al. 2010, Picazo y Molin 2021).

Por otra parte, están las enzimas superóxido dismutasa que juegan un papel crucial en la protección de las células frente a diversos tipos de estrés (Figura 3), específicamente contra las reacciones descontroladas con especies radicales basadas en el oxígeno y el nitrógeno (Campanella et al. 2000, Balamurugan et al. 2018). En *S. cerevisiae*, existen dos isoformas, una citoplasmática codificada por el gen *SOD1* y otra mitocondrial codificada por el gen *SOD2*. En general, la contribución de las superóxido dismutasa citoplasmáticas a la capacidad antioxidante total de las células es mucho mayor que la de las isoformas mitocondriales. Con base en lo anterior, la eliminación del gen *SOD1* reduce más severamente la resistencia de las células de levadura a muchos tipos diferentes de estrés que la eliminación de *SOD2*. Los ejemplos de tales factores de estrés celular incluyen el estrés por congelación y descongelación, la radiación UV, la deficiencia de zinc y la exposición a varios compuestos tóxicos. La delección de *SOD1* conduce a una mayor sensibilidad a los compuestos oxidantes en condiciones atmosféricas, por lo que estos mutantes pueden usarse como biosensores de antioxidantes derivados de plantas

(Zyracka et al. 2005, Fukai y Ushio-Fukai 2011, Świącilo et al. 2018). De la misma forma, la eliminación del gen *YAP1*, resulta en un aumento en la sensibilidad al daño oxidativo y a otros agentes tóxicos (Zhang et al. 2011).

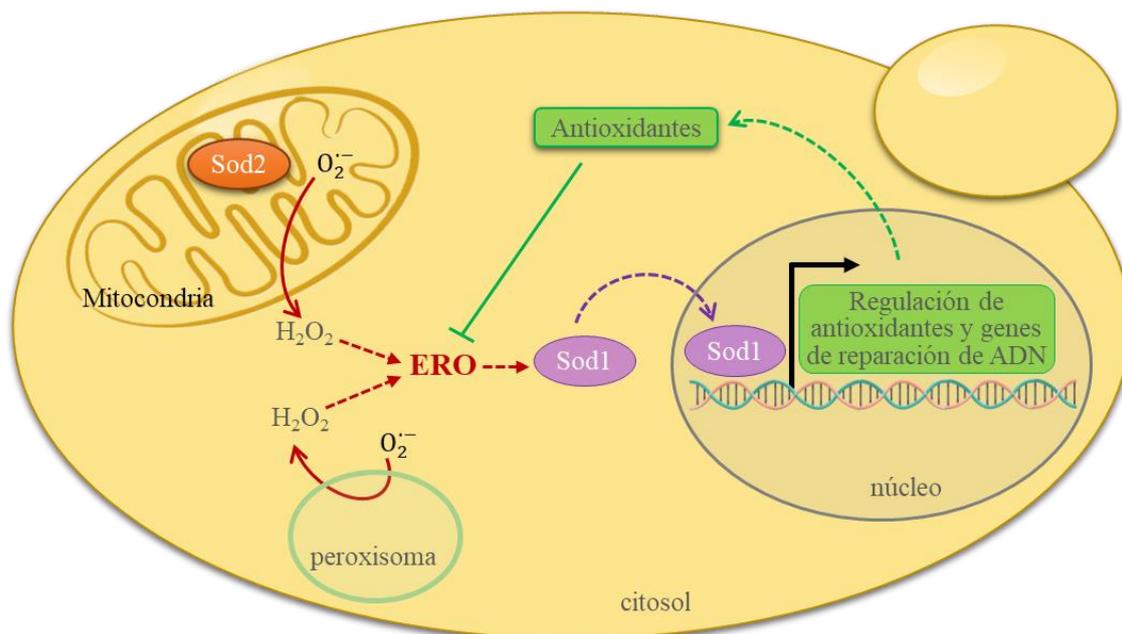


Figura 3. Vías de generación de ERO y rol de Sod1 frente al estrés oxidativo en *S. cerevisiae*. Las superóxido dismutasa son enzimas críticas que mantiene la homeostasis de ERO en diferentes compartimentos celulares. Existen dos isoformas una citoplasmática (Sod1) y mitocondrial (Sod2), las cuales son las encargadas de dismutar el radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$), generadas en la mitocondria y el peroxisoma, en peróxido de hidrógeno. Así, cuando la concentración de ERO (peróxido de hidrógeno) es alta en el citosol, la célula se encuentra frente a un estrés oxidativo. Sod1 se transporta al núcleo en respuesta al estrés oxidativo, donde actúa como factor de transcripción, induciendo la expresión de antioxidantes y genes de reparación del ADN (Cristina et al. 2021, Shu et al. 2023).

Así, de manera análoga a Yap1, la respuesta de Sod1 al estrés oxidativo en la levadura implica su enriquecimiento en el núcleo, facilitado por el aumento de los niveles de peróxido de hidrógeno (Figura 4). Esta translocación está regulada por la vía de la quinasa ATM/Mec1-Cds1/Dun1, donde la quinasa ATM, un sensor oxidativo, se activa directamente con el peróxido de hidrógeno. Tras la activación de ATM/Mec1 por el peróxido de hidrógeno, Dun1/Cds1 se une a Sod1 y lo fosforila en sitios específicos (residuos de serina S60 y S99), promoviendo su localización nuclear. Una vez ahí, Sod1 regula la expresión de genes diana, los cuales incluyen aquellos involucrados en la resistencia al estrés oxidativo (como las tioredoxina peroxidasa citoplasmática y mitocondrial Tsa2 y Prx1), la reparación de daños en el ADN y el mantenimiento de la estabilidad genómica, el estrés por replicación del ADN y la homeostasis del hierro/cobre (Tsang et al. 2014, Xu et al. 2022).

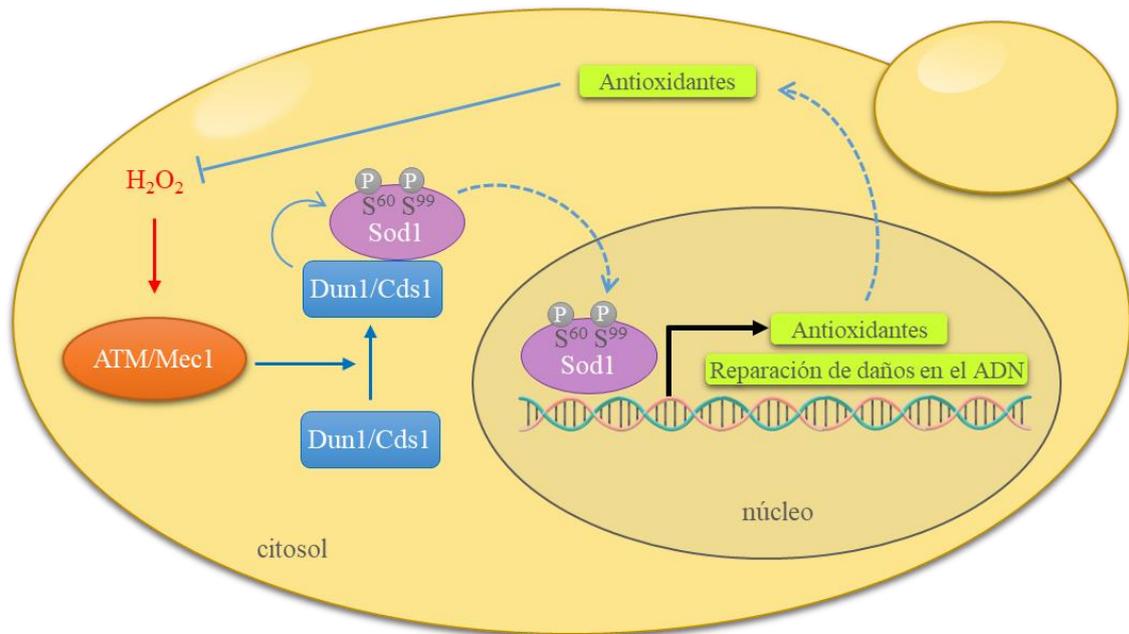


Figura 4. Representación esquemática de la regulación del factor de transcripción Sod1 frente al estrés oxidativo en *S. cerevisiae*.

Sod1, un regulador de la homeostasis redox, funciona como un factor de transcripción. Tras su activación por H_2O_2 , y su subsecuente fosforilación mediada por ATM-Cds1 facilita la migración de Sod1 hacia el núcleo. Una vez en el núcleo Sod1 se une a promotores y regula la expresión de genes implicados en las respuestas al estrés oxidativo, como antioxidantes que inhiben el efecto tóxico del H_2O_2 Fuente: editado de Tsang et al. 2014, Xu et al. 2022.

Por lo antes expuesto, la levadura y, especialmente *S. cerevisiae*, es un organismo modelo eucariota único para estudiar el estrés oxidativo y sus respuestas celulares. *S. cerevisiae* se ha convertido en una herramienta muy poderosa para descifrar la complejidad de estas respuestas biológicamente importantes, debido a que ofrece la relativa simplicidad de un organismo eucariota unicelular, que permite la combinación e integración de factores genéticos, bioquímicos y fisicoquímicos (Toledano et al. 2003).

2.7. Biblioteca de plásmidos que permiten la producción de péptidos

La construcción de bibliotecas de plásmidos aleatorios que permiten la síntesis de péptidos de diferentes secuencias es una herramienta esencial de gran utilidad debido a su amplia aplicabilidad: investigación biológica, desarrollo y producción de fármacos y cosméticos, etc. (Liu et al. 2003). En *S. cerevisiae*, este proceso puede ser completado de manera rápida y eficiente utilizando técnicas de clonación *in vivo* (Figura 5).

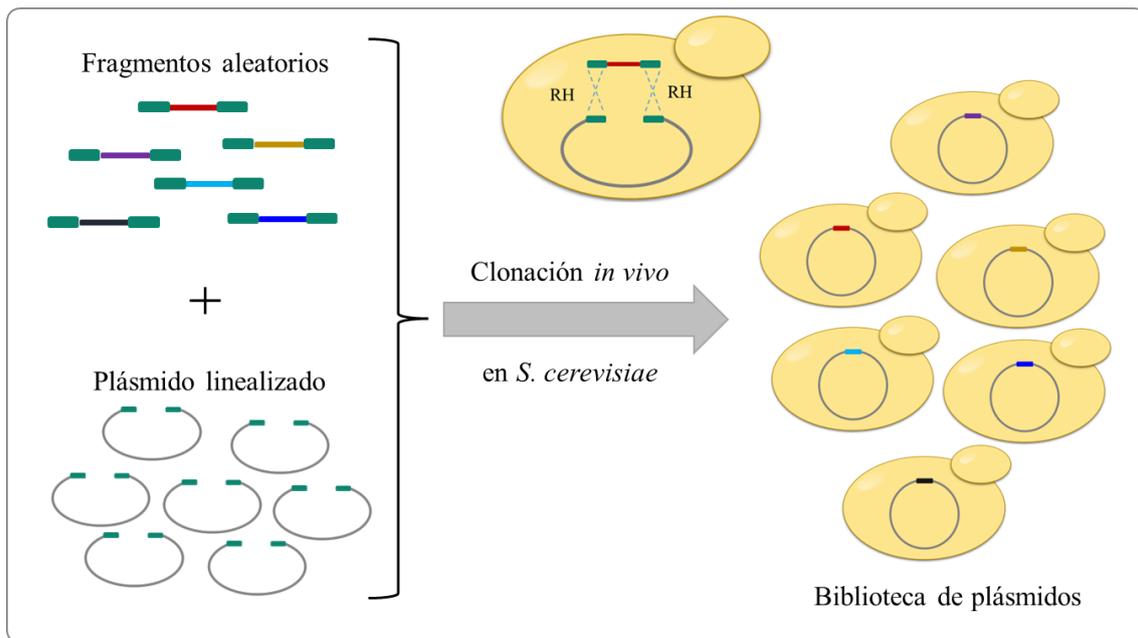


Figura 5. Construcción de una biblioteca de péptidos aleatorios mediante clonación *in vivo* en *S. cerevisiae*.

El método para la generación de la biblioteca de péptidos aleatorios consiste en la clonación de genes que codifican para péptidos aleatorios en un plásmido adecuado, mediante recombinación homóloga entre las regiones flanqueantes (regiones en verde) durante la transformación en *S. cerevisiae*. (Fuente: *Elaboración propia*, 2023)

Al mismo tiempo, el uso de métodos selectivos que involucran factores estresantes específicos, como altas concentraciones de metales, peróxido de hidrógeno y cloruro de sodio, entre otros, permite identificar genes específicos que codifican para péptidos con características de interés. El éxito de la selección dependerá de la diversidad del conjunto original de las secuencias codificantes clonadas, ya que la capacidad de identificar las mejores secuencias está directamente relacionada con el número y la diversidad de péptidos generados por la biblioteca (Bougioukou et al. 2009, Sieber et al. 2015).

Una forma de obtener péptidos aleatorios es usar codones "NNN" (N = cualquier base, A/T/G/C) en el fragmento de ADN a clonar. Sin embargo, su uso da como resultado una amplia gama de codones redundantes, hecho que dificulta el proceso de selección. Una alternativa para reducir la redundancia de codones en las bibliotecas aleatorias es la utilización de codones NNK o NNS degenerados (K = T/G y S = G/C) en lugar de codones NNN. Esta reducción es posible porque cuando se usa la estrategia NNN se generan 61 codones que codifican para los 20 aminoácidos, y tres codones de terminación; mientras que cuando se usa la estrategia NNK, se logra el mismo propósito con la generación de solo 31 codones codificantes y uno de terminación (Figura 6).

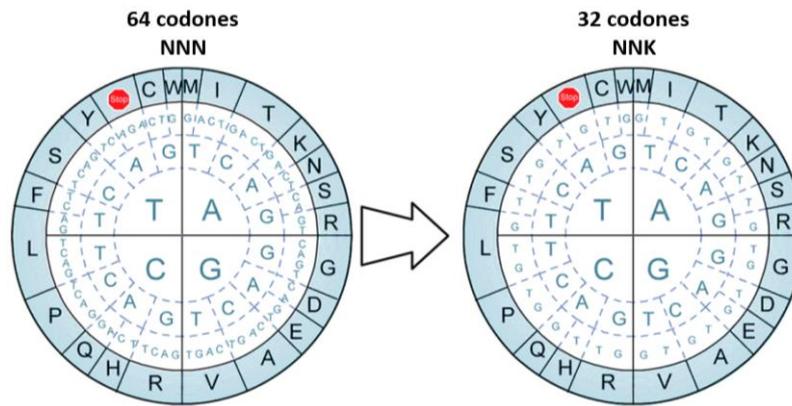


Figura 6. Uso de tripletes “NNK” para la disminución de la redundancia de los codones generados aleatoriamente.

Las figuras muestran los codones generados a partir del uso de las estrategias NNN (izquierda) y NNK (derecha), donde “N” representa a cualquiera de las bases (A, T, G, o C); y “K” a las bases T o G. En esta representación, la lectura de los codones se realiza desde el interior hacia afuera del cuadrante blanco y los aminoácidos codificados están listados en la región celeste. El hexágono rojo representa a los codones de terminación (TAA, TAG, TGA). La disminución en los niveles de redundancia se ven reflejados en el número de codones generados con cada estrategia. Por ejemplo, si analizamos a los aminoácidos fenilalanina (F) y leucina (L), estos son normalmente codificados por dos y seis codones diferentes respectivamente; mientras que por la estrategia NNK los correspondientes números de codones baja a uno y tres. Adicionalmente, la estrategia NNK permite reducir los tres codones de terminación, a uno solo, TAG. *Fuente: Kille et al. 2013.*

Con base a lo antes mencionado, al analizar la frecuencia de uso de codones de las estrategias NNK y NNS en *S. cerevisiae*, podemos apreciar que la frecuencia de uso de codones (por aminoácido codificado) para NNK es mayor que NNS. Por ejemplo, para el caso de los codones que codifican para la fenilalanina el codón TTT tiene una frecuencia de uso de 0,59 respecto a 0,41 del codón TTC (Tabla 4). En este sentido, la estrategia NNK utilizada en este trabajo de investigación se basa en una reducción significativa de la redundancia y del tamaño de la biblioteca, así como una mayor frecuencia de uso de codones para *S. cerevisiae*.

Tabla 4. Comparación de los codones generados con las estrategias NNK (NNT/G) y NNS (NNC/G) y las respectivas frecuencias de uso de codones en *S. cerevisiae*.

		Segunda base														
		T		C		A		G								
Primera base	T	TTT (0,59)		Phe	TCT (0,26)		Ser	TAT (0,57)		Tyr	TGT (0,62)		Cys	T		
			TTC (0,41)			TCC (0,16)					TAC (0,43)			TGC (0,38)		C
		TTG (0,28)	TTG (0,28)	Leu	TCG (0,10)	TCG (0,10)	Pro	TAG (0,22)	TAG (0,22)	Stop	TGG (1,00)	TGG (1,00)	Trp	G		
	CTT (0,13)				CCT (0,31)				CAT (0,64)					CGT (0,14)		T
		CTC (0,06)	Leu		CCC (0,16)	Pro		CAC (0,36)	His		CGC (0,06)	Arg	C			
	CTG (0,11)	CTG (0,11)			CCG (0,12)		CCG (0,12)			CAG (0,31)	CAG (0,31)		Gln	CGG (0,04)	CGG (0,04)	G
		ATT (0,46)	Ile	ACT (0,34)		Thr	AAT (0,60)		Asn	AGT (0,16)		Ser		T		
		ATC (0,26)			ACC (0,21)					AAC (0,40)				AGC (0,11)		C
	ATG (1,00)	ATG (1,00)		Met Start	ACG (0,14)		ACG (0,14)			AAG (0,42)	AAG (0,42)		Lys	AGG (0,21)	AGG (0,21)	Arg
		GTT (0,39)	Val	GCT (0,37)		Ala	GAT (0,65)		Asp	GGT (0,46)		Gly		T		
		GTC (0,20)			GCC (0,22)					GAC (0,35)				GGC (0,20)		C
	G	GTG (0,19)		GTG (0,19)	GCG (0,11)		GCG (0,11)			GAG (0,30)	GAG (0,30)		Glu	GGG (0,12)	GGG (0,12)	Gly
NNK	NNS		NNK	NNS		NNK	NNS		NNK	NNS						

Los valores debajo de cada codón corresponden a la frecuencia de uso de codones por cada aminoácido codificado en *S. cerevisiae*. En este se puede apreciar que la frecuencia de uso de codones para todos los casos de la estrategia NNK es mayor que la estrategia NNS. Por ejemplo, para el caso de los codones que codifican para la valina tiene una frecuencia de uso de 0,39 para el codón GTT, respecto a 0,20 para el codón GTC. (Fuente: Elaboración propia 2023)

III. MATERIALES Y REACTIVOS

3.1. Cepas

- Cepa silvestre de *Saccharomyces cerevisiae* W303 (*MATa ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1*) (Thomas y Rothstein 1989)
- Cepa mutante de *Saccharomyces cerevisiae* *sod1* (*MATa sod1::kanMX6 ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1*)
- Cepa mutante de *Saccharomyces cerevisiae* *yap1* (*MATa yap1::kanMX6 ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1*)
- *Escherichia coli* OmniMax2-T1 (F' {*proAB*⁺ *lacI*^q *lacZ*ΔM15 *Tn10*(Tet^R) Δ(*ccdAB*)} *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80(*lacZ*)ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*) U169 *endA1 recA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA panD*)

3.2. Plásmido

- El plásmido de expresión pRS416-GPD (Mumberg et al. 1995), fue gentilmente cedido por el Departamento de Biotecnología del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos de Valencia (España) dirigido por el Dr. Sergi Puig Todolí.

3.3. Materiales de rutina

- Placas Petri de vidrio
- Micropipetas
- Puntas para micropipetas
- Palitos de dientes estériles
- Matraces
- Tubos de ensayo estériles
- Tubos de microcentrífuga
- Placas de 24 pocillos
- Placas de 96 pocillos
- Tubos de ensayo

3.3.1. Medios de cultivo

- Medio -URA (medio sintético carente de uracilo, con glucosa)
- Medio YPD (medio no selectivo para el crecimiento de levadura)

- Medio YPD + H₂O₂ (medio no selectivo para el crecimiento de levadura con peróxido de hidrógeno)
- Medio LB + ampicilina
- Caldo -URA glucosa
- Caldo YPD
- Caldo LB
- Caldo LB + ampicilina

3.3.2. Reactivos/soluciones

- 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)
- 2, 2'-Azinobis-3-etil-benzo-tiazolona-6-ácido sulfónico (ABTS)
- Acetato de amonio 7,5 y 10 M
- Acetato de litio/TE 1X
- Acetato de potasio 3 M
- Ácido ascórbico (estándar)
- Ácido gálico (estándar)
- Buffer de ruptura de levadura
- Buffer fosfato 0,1 M pH 7
- Reactivo GTE (Glucosa, Tris-EDTA)
- Buffer TBE (Tris, Borato, EDTA) 0,5X
- Buffer TE (Tris-EDTA) 0,5X
- Buffer TE (Tris-EDTA) conteniendo ARNasa
- Etanol al 90 y 96% (v/v)
- Fenol/cloroformo/alcohol isoamílico 25:24:1 (v/v)
- Reactivo Folin-Ciocalteu
- Metanol
- SDS 1%/NaOH 0,2 N

3.3.3. Reactivos de biología molecular

- ADN de esperma de salmón
- Agarosa
- Bromuro de etidio
- Buffer 10X para ADN polimerasa termoestable
- Cloruro de magnesio

- Desoxirribonucleótidos (dNTPs)
- Marcador de 100 pb ADN
- Marcador de 1 kb ADN
- Taq ADN polimerasa
- *EcoRI*

3.3.4. Equipos

- Agitadores
- Balanza analítica
- Cámaras electroforéticas y fuente de poder
- Congeladoras de -20 °C
- Ultracongeladora de -80 °C
- Equipo de baño María
- Centrífuga refrigerada
- Microcentrífuga
- Espectrofotómetro
- Incubadora
- Mezclador de vórtice
- Refrigeradora
- Sonicador
- Termociclador
- Transiluminador

3.4. Diseño de la investigación

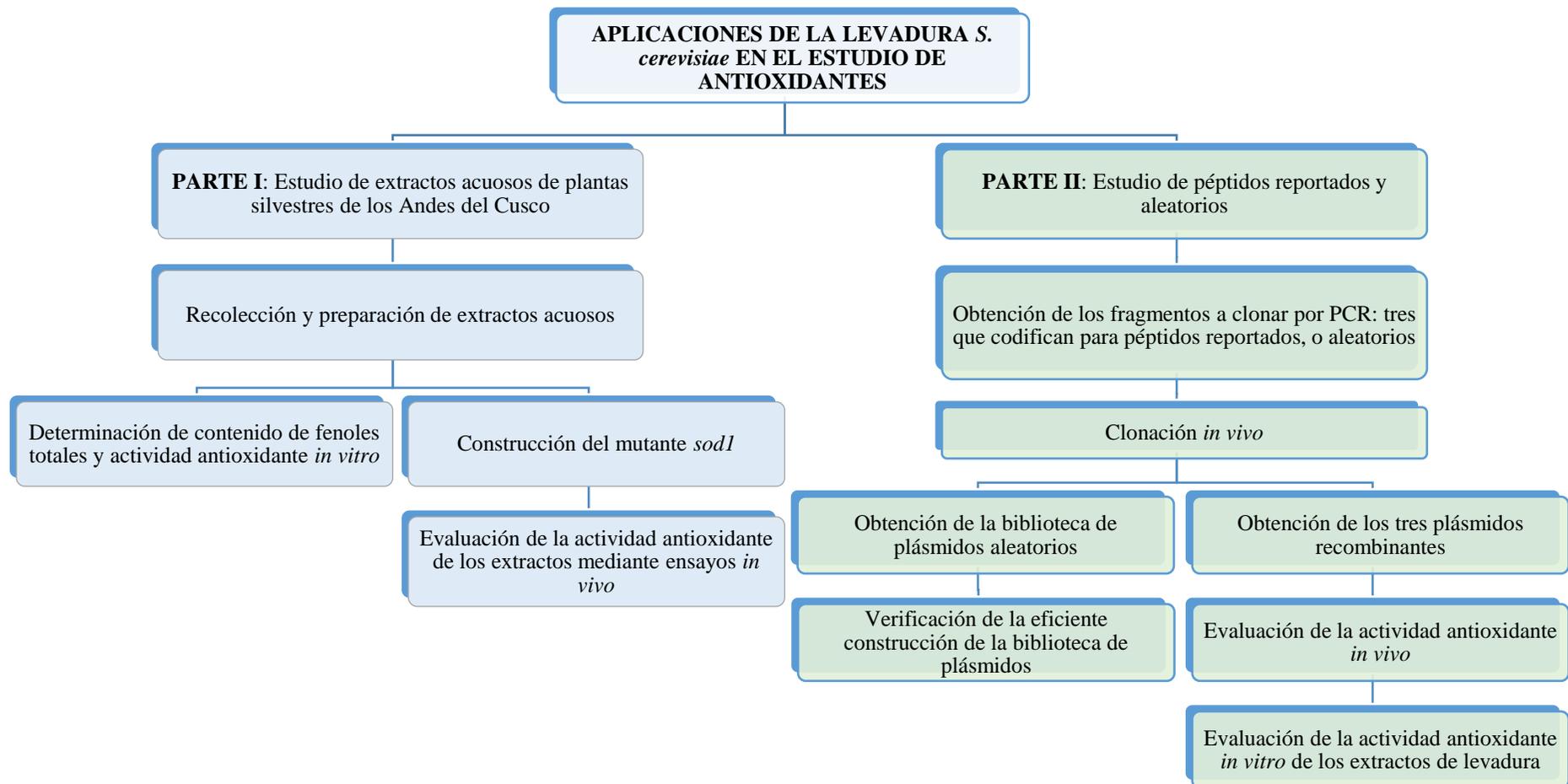


Figura 7. Flujograma de los procedimientos seguidos para el estudio del efecto antioxidante en *S. cerevisiae* de extractos vegetales y péptidos.

**PARTE I: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE
DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS DE PLANTAS SILVESTRES DE
LOS ANDES DEL CUSCO**

IV. METODOLOGÍA

De acuerdo a los objetivos planteados, esta primera parte consistió en evaluar la actividad antioxidante de los extractos acuosos de especies vegetales silvestres colectadas en los Andes cusqueños a través de ensayos *in vitro* e *in vivo*.

4.1. Muestras vegetales

Las muestras se colectaron en la montaña Ccamarrara (aproximadamente a unos 4000 m.s.n.m), localizada en el distrito de Andahuaylillas, Provincia de Quispicanchi, Departamento de Cusco, Perú, en mayo de 2018. La identificación de las muestras vegetales se realizó en el Herbario del Departamento de Biología de la Universidad Nacional Agraria La Molina (MOL), donde fueron también depositadas.

4.2. Preparación de extractos

Las hojas de las plantas se secaron a la sombra durante 14 días hasta obtener un peso constante. Después del secado, se molieron en un molino mecánico, se tamizaron para obtener partículas de hasta un milímetro y estas muestras molidas se almacenaron en recipientes de polietileno a -20 °C. La extracción se realizó mezclando dos gramos de cada muestra con 30 mL de buffer fosfato de pH 7 durante cuatro horas a 10 °C con agitación continua. Al final de la agitación, el extracto acuoso se recuperó por centrifugación, se dividió en pequeños volúmenes y se almacenó a -20 °C para su posterior estudio. Adicionalmente, se determinó el contenido de materia seca de los extractos, llevando a sequedad un determinado volumen del extracto acuoso.

4.3. Determinación del contenido de fenoles totales en los extractos acuosos

El contenido de fenoles totales se determinó por el método de Folin-Ciocalteu (Dudonné et al. 2009) tal como se muestra en la Figura 8. La curva de calibración se preparó a partir de una solución estándar de ácido gálico de 1000 mg/L, con soluciones de 10, 25, 50, 75, 100, 150 y 200 mg/L.

Para la construcción de la curva de calibración se mezcló 2000 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu (diluido 10 veces con agua destilada) con 400 µL de la solución estándar de ácido gálico (a diferentes concentraciones) y 1600 µL de Na₂CO₃ al 7%. La mezcla final se agitó ligeramente y se dejó reaccionar durante una hora a temperatura ambiente en la oscuridad; luego, se midió la absorbancia a 765 nm.

Para el análisis de los siete extractos acuosos se realizó el mismo procedimiento que para la curva de calibración, donde solo se sustituyó el volumen de la solución estándar de ácido gálico por un volumen de los extractos acuosos.

Todas las pruebas se realizaron por triplicado, y los resultados se expresaron como número de miligramos de equivalente de ácido gálico (GAE) por gramo de hojas secas, a partir de la ecuación de regresión lineal (Ecuación 1) de la curva de calibración de ácido gálico.

$$y = mx + b \quad (1)$$

Donde:

y: absorbancia; m: pendiente de la curva; x: concentración de ácido gálico en mg/mL, y b: intercepto.

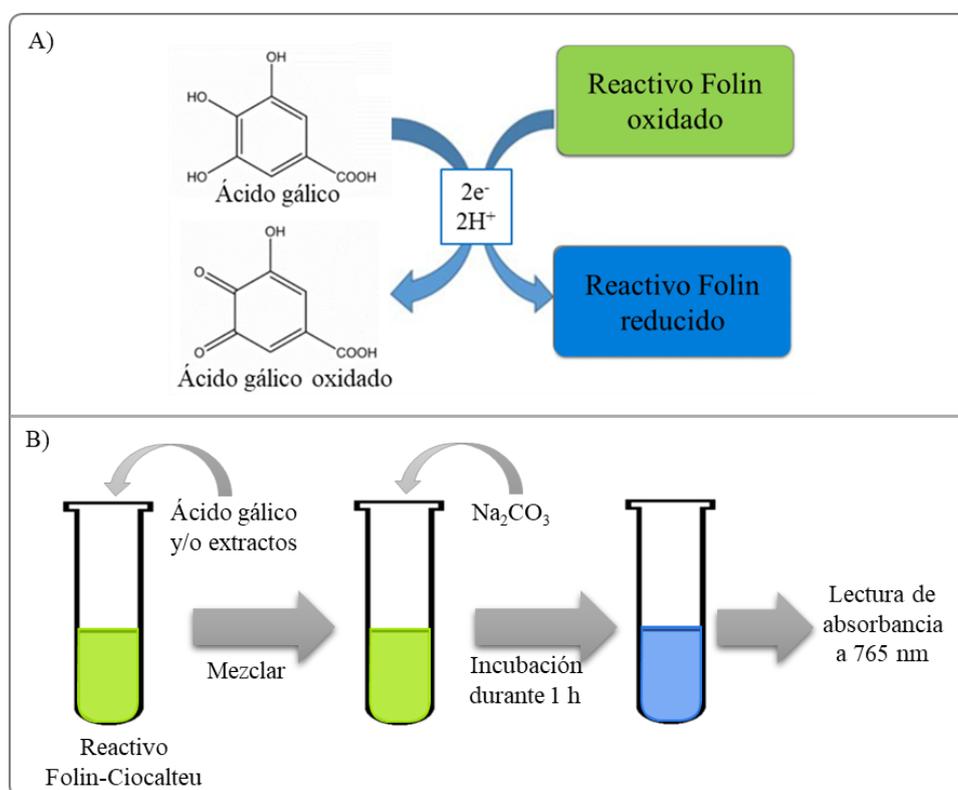


Figura 8. Diagrama general del ensayo de fenoles totales de los extractos acuosos mediante el método Folin-Ciocalteu.

En la parte superior (A) se muestra la reacción redox general entre los compuestos fenólicos y el reactivo de Folin-Ciocalteu, que consiste principalmente en molibdato de sodio y tungstato de sodio. El reactivo indicado cambia de un estado inicial (amarillo-verde) a un estado reducido (azul) debido a la acción de los compuestos fenólicos. En la parte inferior (B) se presenta un esquema general para la determinación de fenoles totales, la cual consiste en una mezcla de un volumen de reactivo de Folin-Ciocalteu con el estándar de ácido gálico o los extractos acuosos y carbonato de sodio. Finalmente, después de una hora de reacción, se determina la absorbancia de la solución coloreada a 765 nm. Fuente: *Elaboración propia, 2023*.

4.4. Determinación de la actividad antioxidante de los extractos acuosos mediante ensayo *in vitro*

La actividad antioxidante se determinó según el método propuesto por Liu *et al.* (Liu et al. 2009) con modificaciones. Se preparó una solución de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) a una concentración de 20 mg/L en metanol y una solución estándar de ácido ascórbico (AA) a una concentración de 1000 mg/L en agua destilada. Para construir la curva de calibración se tomaron volúmenes en un rango de 5 a 100 μL de la solución estándar, a los cuales se le adicionaron 3000 μL del reactivo DPPH y se diluyeron con metanol hasta un volumen final de 4000 μL ; como blanco se preparó una mezcla de 3000 μL de DPPH con 1000 μL de metanol. Las mezclas se homogeneizaron y se dejaron en la oscuridad durante dos horas, posteriormente, se procedió a la medición de la absorbancia a 515 nm (Figura 9). La calibración del equipo se realizó con una mezcla de agua: metanol (1:3), luego se midió el blanco y finalmente las reacciones con el estándar.

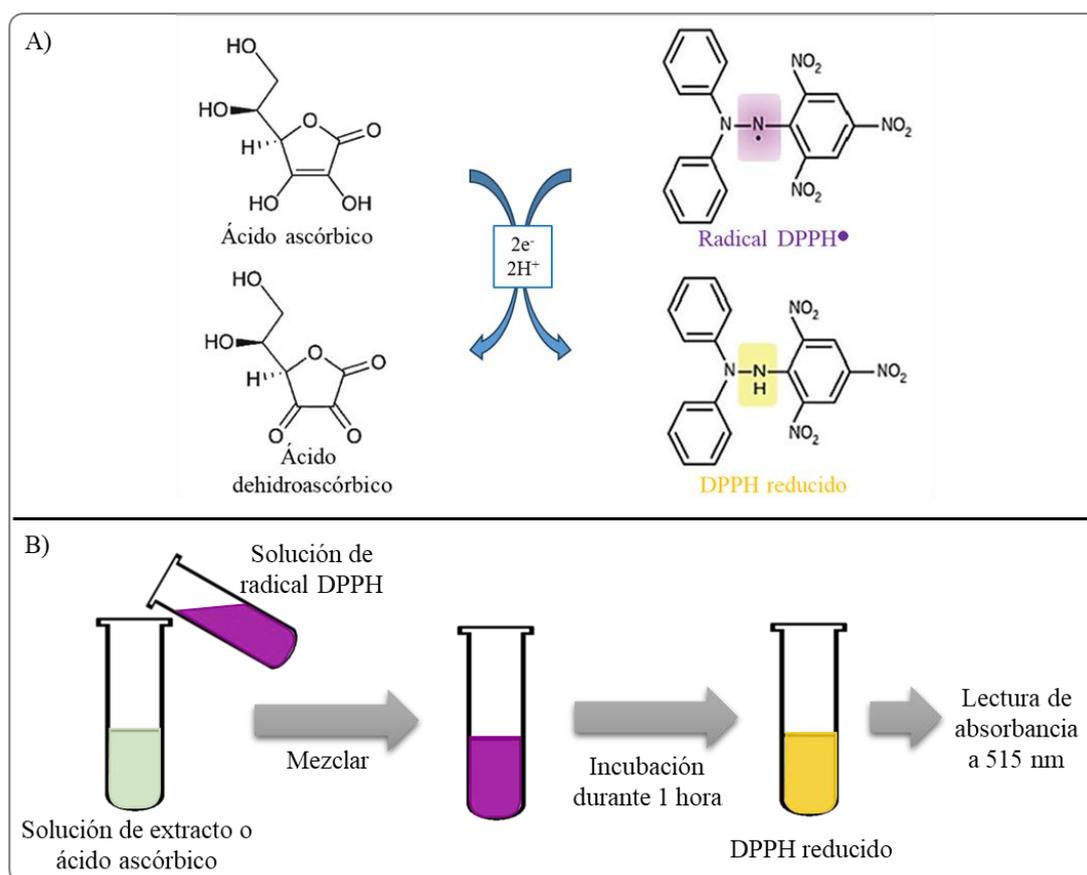


Figura 9. Descripción del ensayo de actividad antioxidante de los extractos acuosos mediante el ensayo DPPH.

La parte superior muestra la reacción redox entre los compuestos antioxidantes y el reactivo DPPH. El reactivo indicado cambia del estado inicial (lila) al estado reducido (amarillo) debido al poder reductor de los antioxidantes. La parte inferior muestra el procedimiento general para el análisis de la actividad antioxidante, que implica mezclar un volumen de solución de DPPH con un extracto o un estándar. La reacción se llevó a cabo en la oscuridad durante una hora y la absorbancia del DPPH remanente se midió a 515 nm. Fuente: *Elaboración propia, 2023.*

Para el caso de extractos acuosos de las especies vegetales se aplicaron diferentes diluciones en buffer (determinadas mediante ensayos preliminares para una óptima cuantificación): 1/4, 1/11, 1/19, 1/19, 1/15, 1/6 y 1/4 para los extractos acuosos *P.a.* (*Plantago australis*, *B.l.* (*Baccharis latifolia*), *A.s.* (*Ageratina sternbergiana*), *S.m.* (*Stevia macbridei*), *A.c.* (*Ageratina cuzcoensis*), *C.m.* (*Calceolaria myriophylla*) y *A.o.* (*Adiantum orbignyianum*), respectivamente. El procedimiento empleado para los extractos fue el mismo que para el ácido ascórbico (Figura 9).

La capacidad antioxidante puede evaluarse en función de la disminución de la absorbancia de una solución de DPPH, medida a una longitud de onda (515 nm) con un tiempo de incubación determinado. Todas las pruebas se realizaron por triplicado. El porcentaje de capacidad antioxidante se calculó según la Ecuación 2:

$$\% \text{ de capacidad antioxidante} = \frac{A_C - A_M}{A_C} \times 100 \quad (2)$$

Donde, A_C es la absorbancia del control y A_M absorbancia de la muestra o la solución estándar de ácido ascórbico.

La capacidad antioxidante también se expresó como concentración inhibitoria media máxima (IC_{50}). El IC_{50} se define como la concentración de antioxidante necesaria para reducir la absorbancia y/o la concentración de la solución control de reactivo en un 50%. El valor IC_{50} es inversamente proporcional a la actividad de reducción de radicales libres de los antioxidantes de la muestra. Esto significa que, cuanto más bajo es el valor IC_{50} , más potente es la sustancia en la reducción del radical DPPH y esto implica una mayor actividad antioxidante. Los valores de IC_{50} fueron estimados a partir de la curva de absorbancia vs la concentración de las soluciones empleadas. Para expresar la capacidad antioxidante de cada muestra en función del estándar de ácido ascórbico, también se calculó la “capacidad antioxidante equivalente de ácido ascórbico” (AAEAC), por sus siglas en inglés “ascorbic acid equivalent antioxidant capacity” (Ecuación 3), como sigue:

$$AAEAC = \frac{IC_{50} \text{ de AA } (\mu\text{g/mL})}{IC_{50} \text{ de extr. (mg/mL)}} \quad (3)$$

Donde: IC_{50} de AA: capacidad inhibitoria media para el ácido ascórbico

IC_{50} de extr.: capacidad inhibitoria media para el extracto.

Por tanto, el valor AAEAC obtenido podría interpretarse como el contenido de ácido ascórbico equivalente (μg) por mg de hojas secas. Es decir, es un valor estandarizado útil de la cantidad de antioxidantes que están presentes en una muestra, la cual permite la comparación con los resultados de otros estudios.

4.5. Construcción del mutante de levadura *sod1*

La eliminación del gen *SOD1* en la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* W303-1a (Genotipo: *MATa ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1*) se realizó mediante un proceso de recombinación homóloga (Gueldener et al. 2002) con un producto de PCR que incluye un cassette génico que confiere resistencia a los antibióticos kanamicina y G418 (denotado como kanMX, obtenido del plásmido pUG6) (ver Figura 10). Los transformantes fueron primero seleccionados en un medio suplementado con el antibiótico G418 y se procedió a la verificación de la eliminación del gen *SOD1* mediante PCR. Por último, las pruebas de sensibilidad a los oxidantes se evaluaron mediante la exposición del mutante a peróxido de hidrógeno 3 mM (dosis letal estimada en ensayos preliminares).

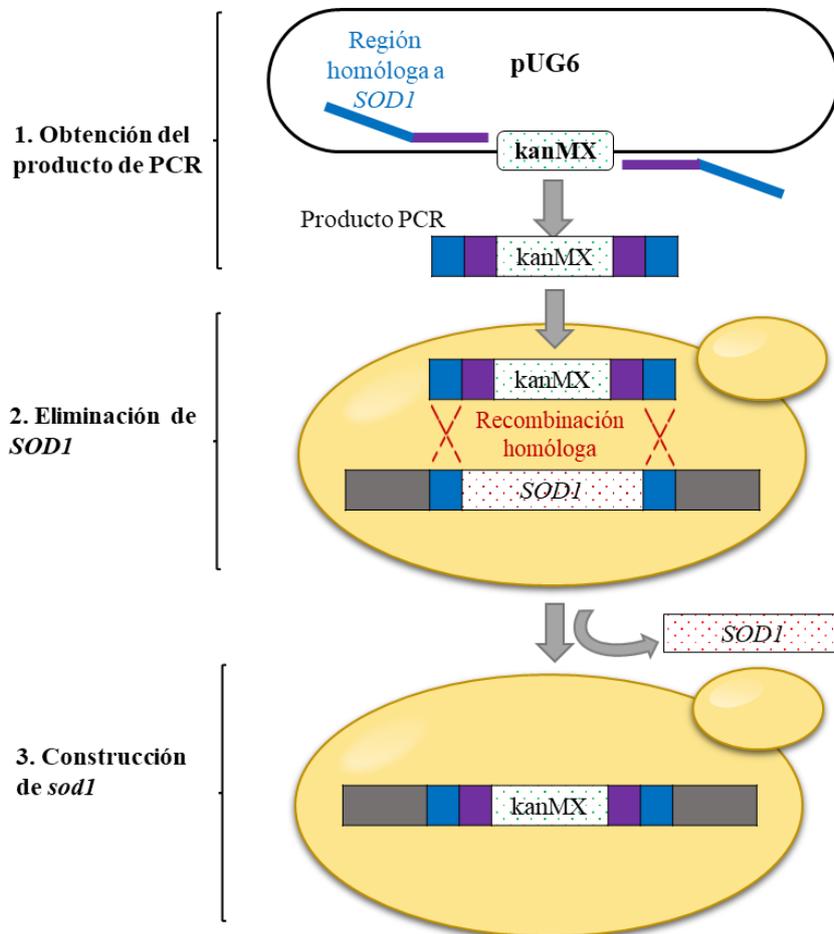


Figura 10. Proceso de eliminación del gen *SOD1* en *S. cerevisiae* por recombinación homóloga. El proceso comienza con (1) el uso del plásmido pUG6 como plantilla y los cebadores apropiados para producir un producto PCR (o cassette génico) que contiene el gen marcador kanMX. Luego, (2) el producto PCR se introduce en la levadura, donde el cassette génico reemplaza al gen *SOD1* mediante recombinación homóloga. Finalmente, (3) se obtiene el mutante de levadura *sod1* que ya no contiene el gen *SOD1*. Fuente: Elaboración propia, 2023.

4.6. Evaluación de la actividad antioxidante usando el mutante *sod1*

Los ensayos *in vivo* se realizaron usando peróxido de hidrógeno como agente oxidante, y una suspensión de células de *sod1* cultivada en caldo YPD durante 2 a 3 días bajo agitación constante a 30 °C (DO_{600nm} 1,2), la cual se diluyó 10 veces con el mismo caldo para proceder a su uso. Se diseñaron dos variaciones del ensayo (i) para evaluar la capacidad antioxidante total y (ii) distinguirlos de los efectos antioxidantes intracelulares (Figura 11).

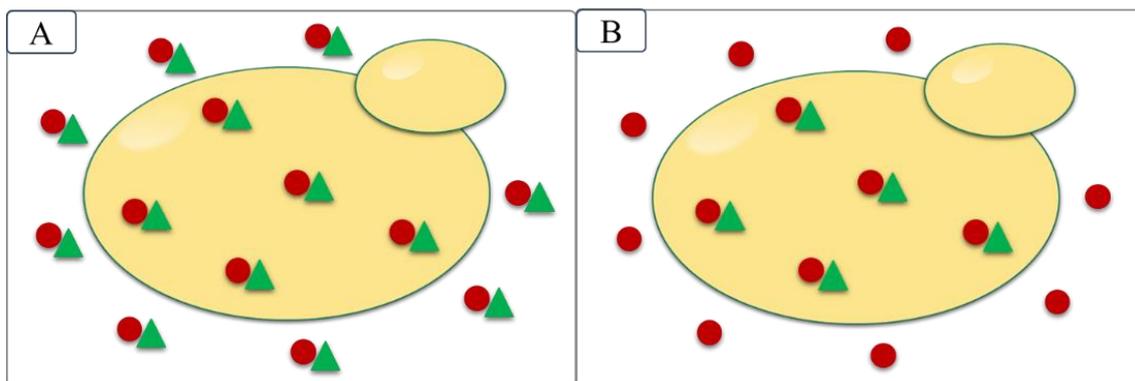


Figura 11. Representación esquemática de los ensayos que permiten diferenciar el efecto antioxidante total del intracelular de los extractos acuosos en la levadura.

En el panel A se muestra el efecto antioxidante total, cuando una célula de levadura es tratada con antioxidantes (triángulos verdes) que pueden estar tanto fuera como dentro de la célula. Por tanto, cuando se añade peróxido de hidrógeno (esferas rojas), el efecto antioxidante observado será el total, a nivel intracelular y extracelular. En el panel B se muestra el efecto antioxidante intracelular, debido a que antes de la adición del peróxido de hidrógeno se ha hecho un lavado para eliminar el antioxidante extracelular. Fuente: *Elaboración propia, 2023*.

Para analizar la capacidad antioxidante total, se sonicaron ligeramente (3 pulsos a 35% de potencia) alícuotas de 500 μ L de la suspensión de *sod1* diluida para romper los agregados, y se transfirieron a una placa de 24 pocillos, donde se trataron con 100 μ L de agua (control), ácido ascórbico (AA) o cada uno de los extractos de plantas. Las concentraciones finales de AA, estuvieron dentro del rango de 5 a 80 mM. Las suspensiones de células contenidas en las placas se homogeneizaron en un agitador rotatorio a temperatura ambiente durante dos horas. Posteriormente, parte de las suspensiones tratadas se transfirieron a una placa de 96 pocillos para obtener las diluciones 1/30, 1/90 y 1/270. Alícuotas de estas diluciones se colocaron en un medio YPD que contenía peróxido de hidrógeno 3 mM y las placas se incubaron a 30 °C durante 2 a 3 días (Figura 12).

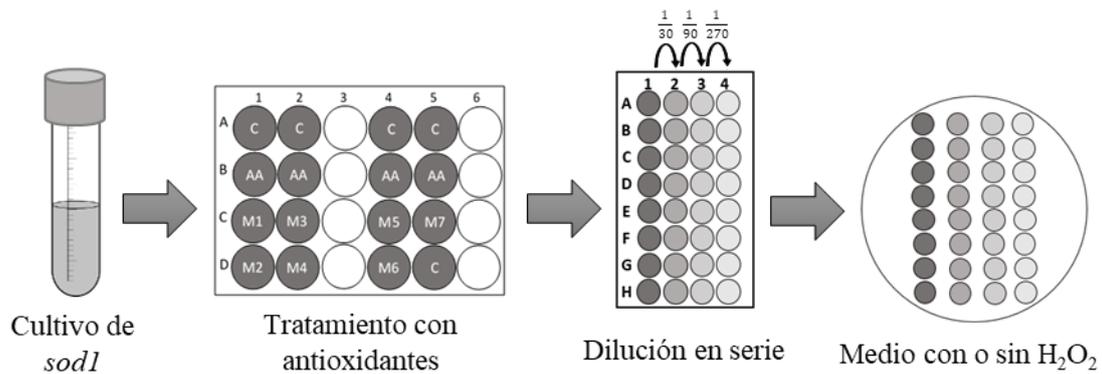


Figura 12. Descripción del ensayo *in vivo* que permite comparar la actividad antioxidante total de los extractos acuosos.

El diagrama de flujo del ensayo muestra, para cada caso, la mezcla de una alícuota de 500 μL de una suspensión de células *sod1* con agua (control negativo), ácido ascórbico (control positivo) o un extracto acuoso (muestra problema), el tratamiento se realizó durante dos horas. Doscientos microlitros de cada suspensión celular se transfirieron a una placa de 96 pocillos. Las suspensiones resultantes se diluyeron luego tres veces en serie con agua destilada. Alícuotas de todas las diluciones se colocaron en un medio YPD con o sin peróxido de hidrógeno 3 mM. Las placas se incubaron a 30 °C durante 2 a 3 días. Fuente: *Elaboración propia, 2023*.

Estos ensayos se realizaron en su primera parte de acuerdo a lo descrito anteriormente, hasta el tratamiento en agitación durante dos horas. Posteriormente, las suspensiones se dividieron en dos grupos y para el primero, las muestras fueron tratadas de manera similar para determinar la actividad antioxidante total (intracelular y extracelular). Para el segundo grupo, cada suspensión se centrifugó para recuperar a las células, se descartaron los sobrenadantes y se volvieron a resuspender las células en 1 mL de agua. El proceso se repitió una vez más y finalmente, las células lavadas se resuspendieron en suficiente cantidad de agua para producir el mismo volumen inicial. Estas suspensiones se sometieron a diluciones en serie como se indicó anteriormente. La Figura 13, resume el procedimiento seguido para distinguir entre los efectos intracelulares y extracelulares de los antioxidantes presentes en los extractos acuosos.

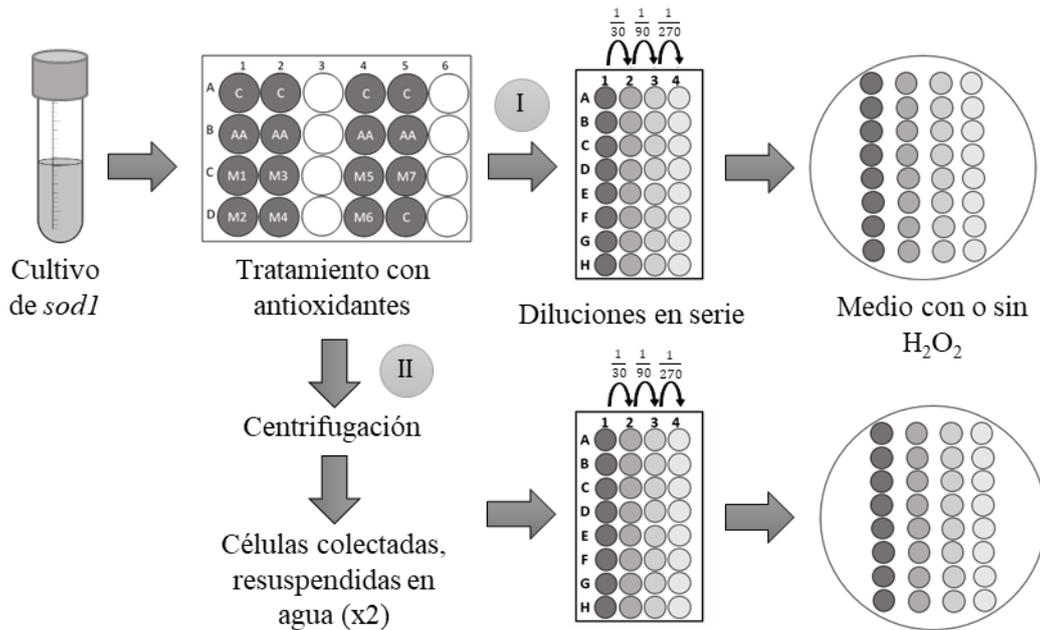


Figura 13. Esquema del procedimiento seguido para distinguir los efectos intracelulares y extracelulares de los antioxidantes.

Las células de *sod1* se mezclaron con agua (control negativo), ácido ascórbico (control positivo) o un extracto acuoso (muestra problema) durante dos horas. Posteriormente, para el tratamiento (I) las suspensiones se sometieron inmediatamente a las diluciones en serie y, para el tratamiento (II) se lavaron dos veces con agua. Las alícuotas de las diluciones en serie respectivas se colocaron sobre medio YPD con o sin peróxido de hidrógeno 3 mM. Fuente: *Elaboración propia, 2023*.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Colección de las muestras y análisis taxonómico

En el Perú como en la mayoría de países, los estudios de antioxidantes en plantas con frecuencia involucran aquellos utilizados en la medicina tradicional. Este tipo de enfoque no tiene en cuenta a las plantas silvestres de origen andino que pueden tener un contenido antioxidante significativo, debido a su capacidad de adaptación a la altura, niveles extremos de radiación UV y otros. Por lo tanto, esta investigación se enfocó en el estudio del contenido de antioxidantes de varias plantas silvestres de los Andes de Cusco-Perú. Las plantas fueron recolectadas en el cerro Ccamarrara, en un área ubicada a 4000 m.s.n.m., en mayo de 2018, un período en el que las temperaturas generalmente oscilan entre 1 y 21 °C y los índices de radiación UV alcanzan niveles que se consideran muy altos (> 10). Se seleccionaron siete plantas silvestres que exhibieron un crecimiento robusto. El análisis taxonómico mostró que, de las siete plantas seleccionadas, una pertenecía a la familia Plantaginaceae, una a Calceolariaceae, otra a Pteridaceae y cuatro a Asteraceae (Tabla 5 y ANEXO 1). Algunas de las imágenes tomadas en el momento de la recolección se muestran en la Figura 14.

Tabla 5: Identificación taxonómica de los especímenes colectados en el cerro Ccamarrara, Cusco-Perú.

Muestra	Especie	Familia
P.a.	<i>Plantago australis</i> Lam.	Plantaginaceae
B.l.	<i>Baccharis latifolia</i> (Ruiz & Pav) Pers.	Asteraceae
A.s.	<i>Ageratina sternbergiana</i> (DC.) R. M. King & H. Rob.	Asteraceae
S.m.	<i>Stevia macbridei</i> B. L. Rob.	Asteraceae
A.c.	<i>Ageratina cuzcoensis</i> (Hieron) R. M. King & H. Rob.	Asteraceae
C.m.	<i>Calceolaria myriophylla</i> Kraenzl.	Calceolariaceae
A.o.	<i>Adiantum orbignyianum</i> Kuhn	Pteridaceae



Figura 14. Imágenes de los siete especímenes recolectados en el cerro Ccamarrara, Cusco-Perú.

5.2. Contenido de fenoles totales

Los extractos acuosos fueron preparados como se describió en la metodología de la Sección 4.2 y las muestras fueron mantenidas en la congeladora. Para estimar la concentración de los extractos, se secó un volumen pequeño de cada uno hasta obtener un peso constante y con éste, se determinó la cantidad de contenido sólido por mililitro. A partir de estos datos, cada extracto se diluyó correspondientemente para obtener una concentración final de 1 mg de contenido sólido/mL.

El contenido de fenoles totales de los extractos acuosos se determinó por el método de Folin-Ciocalteu utilizando como estándar el ácido gálico y se expresó en mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) por gramo de materia seca (Tabla 6). En la Figura 15, se muestra el producto de la reacción del ácido gálico y los extractos acuosos con el reactivo Folin-Ciocalteu, la curva de calibración construida con el ácido gálico se muestra en el ANEXO 2. Los contenidos de fenoles totales variaron considerablemente, oscilando entre 11,9 y 62,7 mg GAE/g muestra seca. Cuatro de las siete especies de plantas mostraron niveles notables de compuestos fenólicos, donde el valor más alto se encontró en *Ageratina cuzcoensis* (62,7 mg GAE/g muestra seca), seguida de *Stevia macbridei* (39,0 mg GAE/g muestra seca), *Baccharis latifolia* (33,4 mg GAE/g muestra seca) y *Ageratina sternbergiana* (32,4 mg GAE/g muestra seca). Existe escasa información

referente al contenido de fenoles totales de los especímenes estudiados, sin embargo, los valores hallados son comparables a los reportados en plantas medicinales y/o nutricionales (0,3 a 72,3 mg GAE/g muestra seca) provenientes de los Andes peruanos (Chirinos et al. 2013). Entre los principales compuestos fenólicos reportados en la literatura, por ejemplo, se menciona que el género *Ageratina* se caracteriza por la presencia de flavonoides (principalmente flavanoles) como la 4'-dimetoxiflavanona (persicogenina) y la 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavanona (isosakuranetina) (González et al. 1982, Ramawat 2019). Así también, en *Stevia rebaudiana* se encontraron glucósido de ácido vanílico, ácido protocatequico, ácido cafeico, ácido clorogénico y ácido criptoclorogénico (Yu et al. 2017); además, el ácido gálico, la rutina y la quercetina se reportaron como los principales compuestos fenólicos en los extractos acuosos de *Baccharis trimera* (Sabir et al. 2017).

Por otra parte, para especímenes que mostraron menores contenidos de compuestos fenólicos (< 20 mg GAE/g muestra seca) se han reportado otros compuestos como los glucósidos de cafeoil feniletanoide en algunas especies de *Plantago* (Rønsted et al. 2000, Alvarez 2019); verbascoside, calceolariosides A-E, forsythoside A e isoarenarioside en especies chilenas de *Calceolaria* (Di Fabio et al. 1995) y, kaempferol y glucósidos de quercetina en algunas especies de *Adiantum* (Rastogi et al. 2018).

En función a estos reportes previos, la variedad de compuestos fenólicos es mayor en *Ageratina cuzcoensis*, *Stevia macbridei*, *Baccharis latifolia* y *Ageratina sternbergiana*, respecto a las otras especies, por lo que justificaría la correlación entre el contenido de fenoles totales estimados.

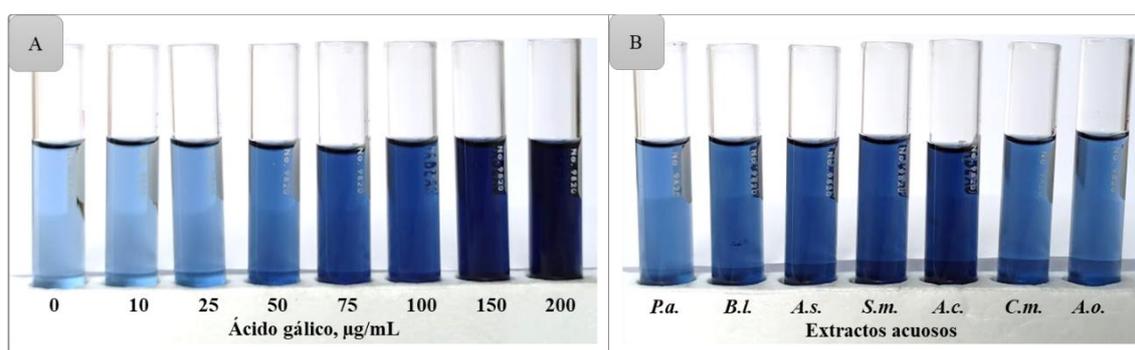


Figura 15. Panel fotográfico de la determinación de fenoles totales de los extractos acuosos por el método Folin-Ciocalteu.

En la parte superior (A) se muestra el resultado de la reacción final entre el reactivo Folin-Ciocalteu con el ácido gálico a concentraciones entre 0 y 200 µg/mL para la construcción de la curva de calibración. En (B) se puede apreciar el resultado de la reacción entre los extractos acuosos a una concentración de 1 mg/mL con el reactivo Folin-Ciocalteu (P.a.: *Plantago australis*, B.l.: *Baccharis latifolia*, A.s.: *Ageratina sternbergiana*, S.m.: *Stevia macbridei*, A.c.: *Ageratina cuzcoensis*, C.m.: *Calceolaria myriophylla*, A.o.: *Adiantum orbignyanum*).

Tabla 6: Contenido de fenoles totales en los extractos obtenidos por el método Folin-Ciocalteu.

Muestra	Contenido de fenoles (mg GAE/g peso seco)
<i>Plantago australis</i>	11,9 ± 0,2
<i>Baccharis latifolia</i>	33,4 ± 0,3
<i>Ageratina sternbergiana</i>	32,4 ± 0,3
<i>Stevia macbridei</i>	39,0 ± 0,3
<i>Ageratina cuzcoensis</i>	62,7 ± 0,4
<i>Calceolaria myriophylla</i>	16,5 ± 0,2
<i>Adiantum orbignyana</i>	17,2 ± 0,3

GAE: equivalente de ácido gálico

Además, es importante mencionar que estos valores podrían estar sobreestimados, dado que el ensayo de Folin-Ciocalteu no es específico para los compuestos fenólicos, pues podría incluir muchos interferentes, como algunos quelantes de metales, ácido ascórbico, vitamina E, ácido dehidroascórbico y azúcares reductores, lo que provoca un sesgo en la determinación (Terpinc et al. 2012, Sánchez-Rangel et al. 2013). Sin embargo, este ensayo es relevante debido a su utilidad como tamizado para la identificación de soluciones con propiedades antioxidantes. Del mismo modo, es posible que estos valores sean resultado de la interacción sinérgica o antagónica entre diferentes compuestos fenólicos (Terpinc et al. 2012), o de otros compuestos fenólicos y no fenólicos. Por este motivo, esta información será complementada con los posteriores ensayos de capacidad antioxidante *in vivo*.

5.3. Ensayos *in vitro* de capacidad antioxidante

Los extractos acuosos se sometieron al ensayo DPPH y los resultados se resumen en la Tabla 7. Como se muestra, todos los extractos mostraron diversos niveles de capacidad antioxidante. Teniendo en cuenta que los extractos se obtuvieron en condiciones similares, es relevante señalar que, entre ellos, los de *Ageratina sternbergiana* y *Stevia macbridei* mostraron los niveles más altos, con valores de IC₅₀ de 85,5 y 69,4 µg/mL, respectivamente.

Tabla 7: Actividad antioxidante de los extractos obtenidos por el ensayo DPPH.

Muestra	% inhibición	IC ₅₀ (µg/mL)	AAEAC (µg AA/mg)
<i>Plantago australis</i>	89,6	157,1 ± 0,7	45,0
<i>Baccharis latifolia</i>	81,9	107,6 ± 0,5	81,5
<i>Ageratina sternbergiana</i>	83,1	85,5 ± 0,6	90,0
<i>Stevia macbridei</i>	84,2	69,4 ± 0,3	117,2
<i>Ageratina cuzcoensis</i>	83,0	122,0 ± 1,0	78,6
<i>Calceolaria myriophylla</i>	75,7	183,7 ± 0,8	32,6
<i>Adiantum orbignyianum</i>	81,4	135,8 ± 0,5	47,0
Ácido ascórbico (estándar)	96,2	11,2 ± 0,0	--

IC₅₀, concentración necesaria para la reducción de la absorbancia de la solución control en un 50% (para los extractos, µg residuo sólido/mL). AAEAC, ascorbic acid equivalent antioxidant capacity (µg de ácido ascórbico/mg de hojas secas). AA, ácido ascórbico.

Con el objetivo de calificar mejor las capacidades antioxidantes de los extractos, se determinaron adicionalmente sus capacidades antioxidantes equivalentes de ácido ascórbico (AAEAC), correlacionando los valores IC₅₀ correspondientes con los del ácido ascórbico. Los valores AAEAC se expresaron como el número equivalente de µg de ácido ascórbico presente en un mg de las hojas secas pulverizadas (Shimamura et al. 2014, Oualcadi et al. 2020). Curiosamente, los valores de AAEAC para los especímenes estudiados están entre 32,6 y 117,2 µg AA/mg hoja seca y son superiores a los encontrados en los brotes de verdolaga (*Portulaca oleracea*, un potencial nutraceutico anticancerígeno) que oscilan entre 2,3 y 3,2 µg AA/mg hoja seca (Uddin et al. 2014). Así mismo, otros valores de AAEAC reportados en otros especímenes fueron 0,23 µg AA/mg hoja seca para las hojas de *Vitex negundo*, una planta medicinal utilizada como antiinflamatorio, analgésico y antihistamínico en India (Kumar et al. 2010); 0,3 a 11,4 µg AA/mg peso seco para tres algas marinas diferentes del sur de Asia (Chew et al. 2008), y 27,3 µg AA/mg peso seco para *Phyllanthus amarus* (Lim y Murtijaya 2007).

Tal como se menciona en la sección 5.2, el contenido de fenoles totales está sujeta a diversos factores como la presencia de interferentes, naturaleza de la estructura fenólica,

además del efecto sinérgico o no sinérgico entre éstos últimos. En este contexto, al comparar los resultados de las Tablas 6 y 7, la falta de correlación entre los contenidos de fenoles totales y las actividades antioxidantes también podría atribuirse a los tipos de compuestos fenólicos presentes en los extractos y sus respectivas propiedades químicas como su naturaleza hidrofílica, el número de grupos hidroxilo, etc. (Terpinc et al. 2012). Por ejemplo, pese a que *Ageratina cuzcoensis* tiene el mayor contenido de compuestos fenólicos (62,7 mg GAE/g muestra seca), presenta un valor bajo de AAEAC de 55,0 µg AA/mg peso seco, comparado con *Stevia macbridei* (39,0 mg GAE/g muestra seca) que tiene un valor alto de AAEAC de 72,7 µg AA/mg peso seco. Es decir, no existe evidencia de una relación directa entre el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante.

5.4. Construcción y caracterización de la cepa mutante *sod1*

La construcción del cassette génico se realizó mediante PCR usando el plásmido pUG6 como plantilla y HgchkUPRv y HgchkDWDdir como cebadores (Güldener et al. 1996), tal como se muestra en la Tabla 8. El análisis mediante electroforesis en gel de agarosa mostró la banda esperada de aproximadamente 1,7 kb (Figura 16).

Tabla 8. Oligonucleótidos usados en la construcción y verificación de la cepa mutante *sod1*.

Nombre	Secuencia
HgchkUPRv	GCGTACGAAGCTTCAGCTG
HgchkDWDdir	CAGATCCACTAGTGGCCTATGC
Sod1CHKup-539	TCTTTGGTTCTACCCTGCAC
Sod1CHKdw-508:	TGGACGAGACACTACTAGCTCC

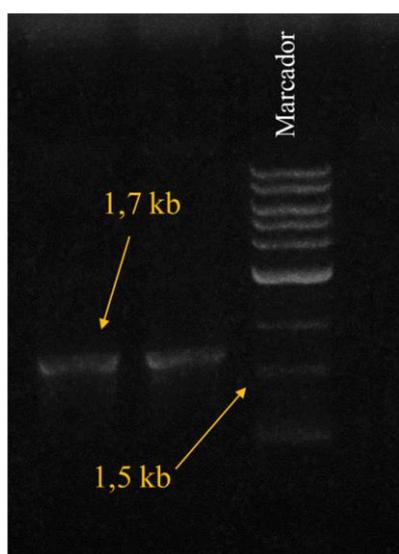


Figura 16. Análisis electroforético de la reacción de PCR que permitió la obtención del cassette de delección del gen *SOD1*.

Se usó como plantilla el plásmido pUG6 y cebadores específicos (el ensayo se realizó por duplicado). El tamaño del fragmento esperado fue de 1,7 kb. El análisis se realizó en un gel de agarosa 0,8% y se utilizó un marcador de ADN de 1 kb.

Se transformaron células de levadura con el cassette génico obtenido por PCR. Las células transformantes crecieron en placas YPD que contenían G418, lo cual demuestra una alta posibilidad del éxito de la recombinación entre el cassette génico construido y el gen objetivo (Figura 17).



Figura 17. Obtención de la cepa mutante *sod1*.

En la imagen se puede observar varias colonias pequeñas que cesaron su crecimiento por acción del antibiótico G418, mientras que las células que logran formar colonias de mayor tamaño son aquellas que lograron insertar el cassette génico kanMX, por lo que son resistentes al antibiótico.

La correcta inserción del cassette génico en los mutantes resistentes a G418 fue verificada mediante ensayos de PCR con el ADN genómico de levadura como plantilla y los cebadores S1CHKup539 (TCTTTGGTTCTACCCTGCAC, cebador específico al gen *SOD1*) y HegCHKupRV (GCGTACGAAGCTTCAGCTG, cebador específico al cassette génico). El gel electroforético evidenció la presencia de la banda esperada de 539 pb (Figura 18) corroborando así que el gen *SOD1* fue eliminado y reemplazado por el cassette.

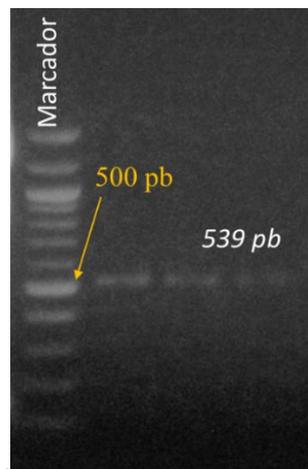


Figura 18. Ensayo de PCR para la verificación de la correcta inserción del cassette de delección. Se usó como plantilla el ADN genómico de levadura y cebadores específicos (el ensayo se realizó con tres transformantes). El tamaño del fragmento esperado fue de 539 pb. El análisis se realizó en un gel de agarosa 1,2% y se utilizó un marcador de ADN de 100 pb.

Como resultado de la delección de gen *SOD1* de la cepa silvestre (W303) se obtuvo la cepa mutante de levadura *sod1*, la cual se sometió a pruebas de resistencia en medio YPD con peróxido de hidrógeno 3 mM, como se muestra en la Figura 19.

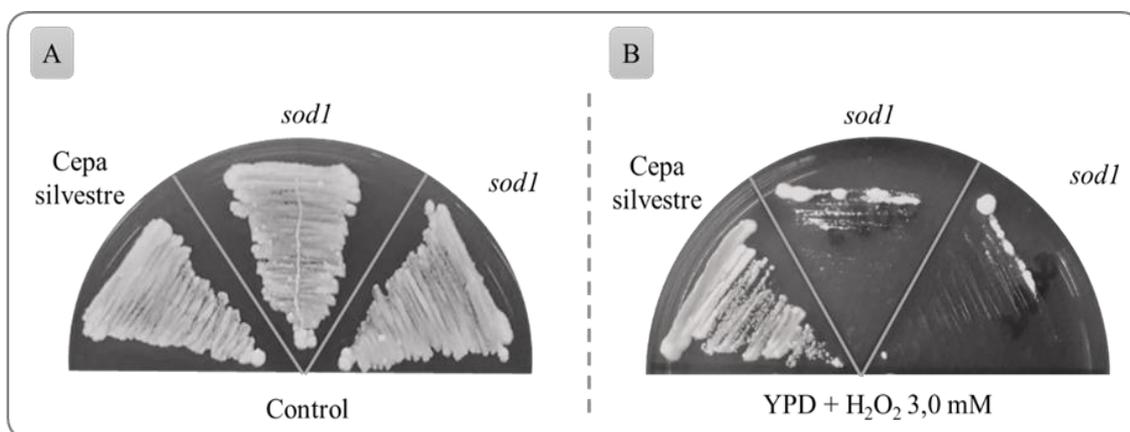


Figura 19. Prueba de resistencia de la cepa silvestre y *sod1* a peróxido de hidrógeno. La prueba se realizó mediante siembra por estriado de las células de la cepa silvestre y *sod1* en un (A) medio control y (B) medio YPD + peróxido de hidrógeno 3 mM.

En éste se puede apreciar que *sod1*, presenta sensibilidad a agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno, el cual se refleja en el crecimiento mínimo o nulo en un medio YPD dosificado con peróxido de hidrógeno. Por su parte, la cepa silvestre es capaz de crecer bajo esas condiciones de estrés oxidativo debido a que, el peróxido de hidrógeno estimula la entrada de la proteína Sod1 al núcleo y regula la expresión de genes que responden al estrés oxidativo como la tioredoxina peroxidasa Tsa2 (Xu et al. 2022).

5.5. Ensayos de capacidad antioxidante *in vivo* usando la cepa *sod1*

Para optimizar y validar el protocolo (descrito en la Figuras 12 y 13) para el estudio de la capacidad antioxidante del ácido ascórbico y los extractos acuosos, primero se analizó el efecto del ácido ascórbico sobre el crecimiento de *sod1*, en un medio que contenía peróxido de hidrógeno 3 mM (Figura 20). Alícuotas de la suspensión de células *sod1* se trataron con ácido ascórbico a diferentes concentraciones (0 a 80 mM) durante dos horas antes del tratamiento con peróxido de hidrógeno. Estos ensayos demostraron que el ácido ascórbico confiere un efecto protector dependiente de la dosis entre las concentraciones de 5 a 40 mM, con mejoras de crecimiento notables hasta la tercera dilución en serie. Sin embargo, a una concentración de 80 mM de ácido ascórbico se encontró que las células presentaban una moderada reducción en su capacidad de proliferación.

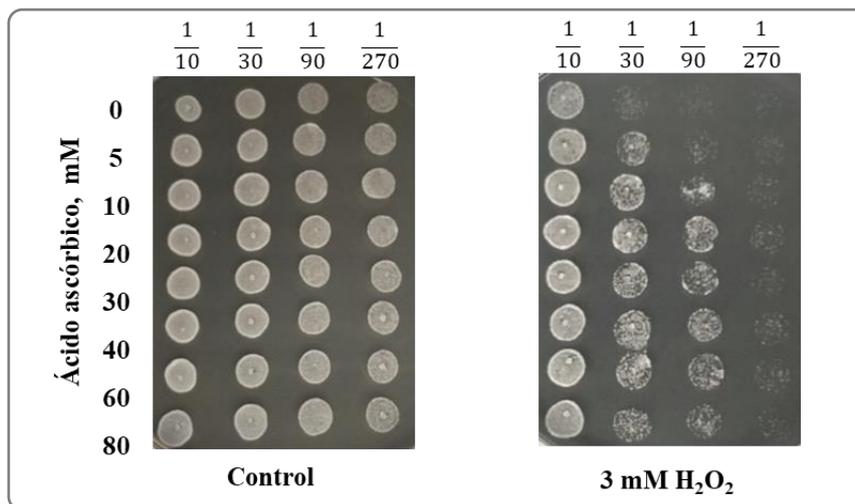


Figura 20. Demostración del efecto antioxidante del ácido ascórbico en la cepa *sod1* mediante el ensayo de diluciones seriadas.

Las imágenes muestran los resultados obtenidos del efecto antioxidante del ácido ascórbico en los cultivos de *sod1* cuando son expuestos a peróxido de hidrógeno. Las concentraciones usadas de ácido ascórbico en el ensayo de diluciones seriadas, variaron de 0 a 80 mM.

Para el caso de los extractos acuosos se usó como referencia (control positivo) el tratamiento con ácido ascórbico a 30 mM. Los resultados del efecto antioxidante de los extractos acuosos se muestran en la Figura 21. El extracto acuoso de *Plantago australis* demostró ser el más efectivo para promover el crecimiento de las células *sod1*, seguido por los de *Adiantum orbignyianum* y *Calceolaria myriophylla*. Además, se observaron efectos más débiles para los extractos de *Ageratina sternbergiana* y *Ageratina cuzcoensis* y, no se detectó ningún efecto protector para los extractos de *Baccharis latifolia* y *Stevia macbridei*.

Curiosamente, no hubo una buena correlación con los resultados obtenidos con el ensayo DPPH que se muestra en la Tabla 7, donde el extracto de *Stevia macbridei* mostró la mayor capacidad antioxidante. La falta de correlación entre los ensayos *in vivo* e *in vitro* podría explicarse de varias maneras. En un caso, el efecto protector de los extractos acuosos, que probablemente contienen una mezcla de antioxidantes polares, podría deberse a la acción única de una sustancia o la acción sinérgica de varias.

De hecho, se ha reportado que muchos antioxidantes naturales o sintéticos muestran efectos sinérgicos en su capacidad antioxidante, según lo determinado por métodos *in vitro* e *in vivo* (Święciło et al. 2018).

Por otro lado, es posible que los efectos podrían deberse a reacciones a nivel intracelular o extracelular y, exhibir cierta especificidad hacia el peróxido de hidrógeno. Por estas razones, realizar ambos ensayos puede ser ventajoso, particularmente cuando se prueban extractos de plantas de alta complejidad.

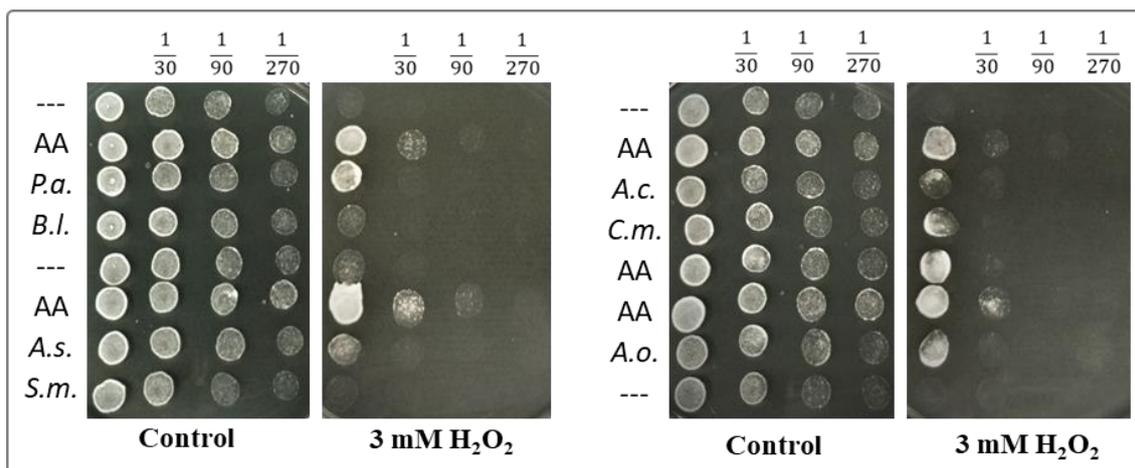


Figura 21. Efecto de los extractos acuosos en el crecimiento de *sod1*.

Las suspensiones de células fueron tratadas con agua (---), ácido ascórbico 30 mM (AA) o 100 μL de los extractos acuosos: *P.a.*: *Plantago australis*, *B.l.*: *Baccharis latifolia*, *A.s.*: *Ageratina sternbergiana*, *S.m.*: *Stevia macbridei*, *A.c.*: *Ageratina cuzcoensis*, *C.m.*: *Calceolaria myriophylla* y *A.o.*: *Adiantum orbignyanum* (en cada caso el volumen final fue de 600 μL).

Adicionalmente, los efectos protectores de los extractos observados en las células *sod1* podrían deberse a efectos intracelulares o extracelulares. En el primer escenario, los antioxidantes podrían estar actuando sobre el peróxido de hidrógeno dentro de las células o causando una respuesta que permita una mejor resistencia. En el segundo escenario, los antioxidantes estarían reaccionando directamente con el peróxido de hidrógeno presente fuera de las células y, por lo tanto, causarían una disminución en su concentración.

En este sentido, con el fin de distinguir el efecto total del intracelular, el protocolo se modificó brevemente, para incluir dos pasos de lavado después del tratamiento con antioxidantes y antes del tratamiento con peróxido de hidrógeno (ver Figura 13).

Los efectos protectores fueron más evidentes cuando las células no se lavaron después del tratamiento con antioxidantes, como se muestra en la Figura 22. Este hallazgo indica que los extractos tienen un efecto extracelular más fuerte, ya que los antioxidantes actúan directamente sobre el peróxido de hidrógeno. Sin embargo, cuando se lavaron los antioxidantes antes de la exposición a peróxido de hidrógeno, los niveles de resistencia disminuyeron, pero aún eran evidentes. Este resultado demuestra que el ensayo *in vivo* con levadura presenta, muy ventajosamente, la posibilidad de distinguir el efecto antioxidante intracelular del total.

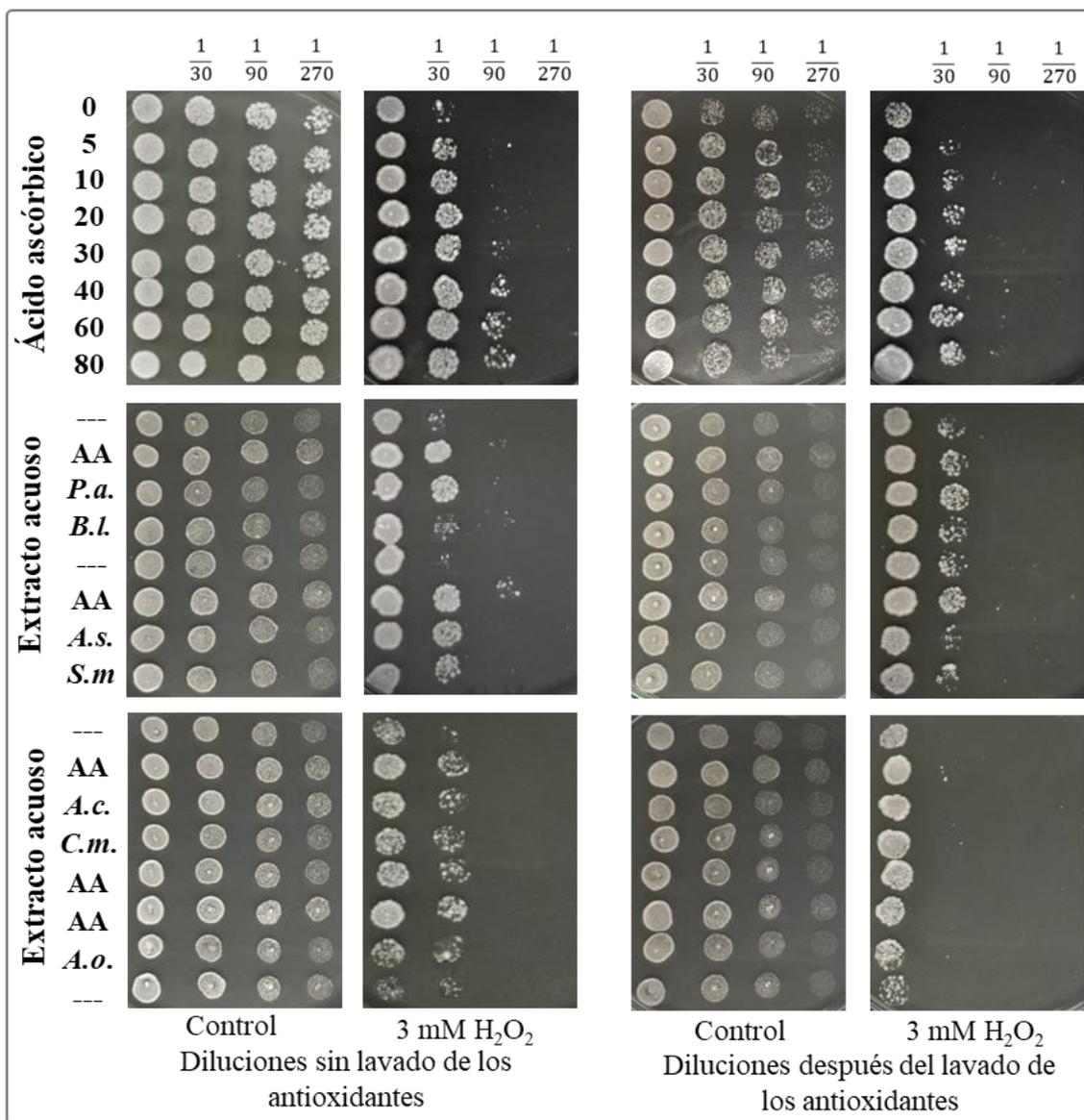


Figura 22. Efectos antioxidantes intracelulares y totales del ácido ascórbico y los extractos acuosos.

Las suspensiones de células fueron tratadas con agua (---), ácido ascórbico 30 mM (AA) o 100 μ L de los extractos acuosos: *P.a.*: *Plantago australis*, *B.l.*: *Baccharis latifolia*, *A.s.*: *Ageratina sternbergiana*, *S.m.*: *Stevia macbridei*, *A.c.*: *Ageratina cuzcoensis*, *C.m.*: *Calceolaria myriophylla*, *A.o.*: *Adiantum orbignyianum*. Para descartar la posibilidad de que los antioxidantes solo actuaran directamente sobre el peróxido de hidrógeno y no hubiera un efecto intracelular, las células se lavaron después de los tratamientos y se resuspendieron en agua. De esta manera, las células lavadas incluían solo antioxidante intracelular.

A manera de resumen de los ensayos realizados con los extractos acuosos, en la Figura 23, se muestra un compilado de los principales resultados obtenidos. En primer lugar, respecto a los resultados de los ensayos *in vitro*, se puede apreciar que todos los extractos acuosos presentan cantidades significativas de fenoles totales, así como actividad antioxidante. Sin embargo, no se observó correlación entre ambos resultados; por ejemplo, en el caso del extracto de *Ageratina cuzcoensis* pese a tener un alto contenido

de fenoles totales, no presenta una gran actividad antioxidante. Por otra parte, al analizar los resultados de la actividad antioxidante obtenidas mediante los ensayos *in vitro* (DPPH) e *in vivo* (usando levadura), también se puede apreciar una falta de correlación entre los resultados; por ejemplo, el extracto acuoso de *Stevia macbridei* posee una gran actividad antioxidante *in vitro*, pero no en el ensayo *in vivo* con levadura. En este sentido, podemos resaltar que los extractos acuosos de las siete especies vegetales estudiadas contienen cantidades considerables de compuestos con gran actividad antioxidante. Adicionalmente, respecto a los ensayos realizados se demostró que tanto los ensayos *in vitro* como *in vivo* son complementarios y por tanto, permiten evaluar la actividad antioxidante de los extractos acuosos de una manera más completa.

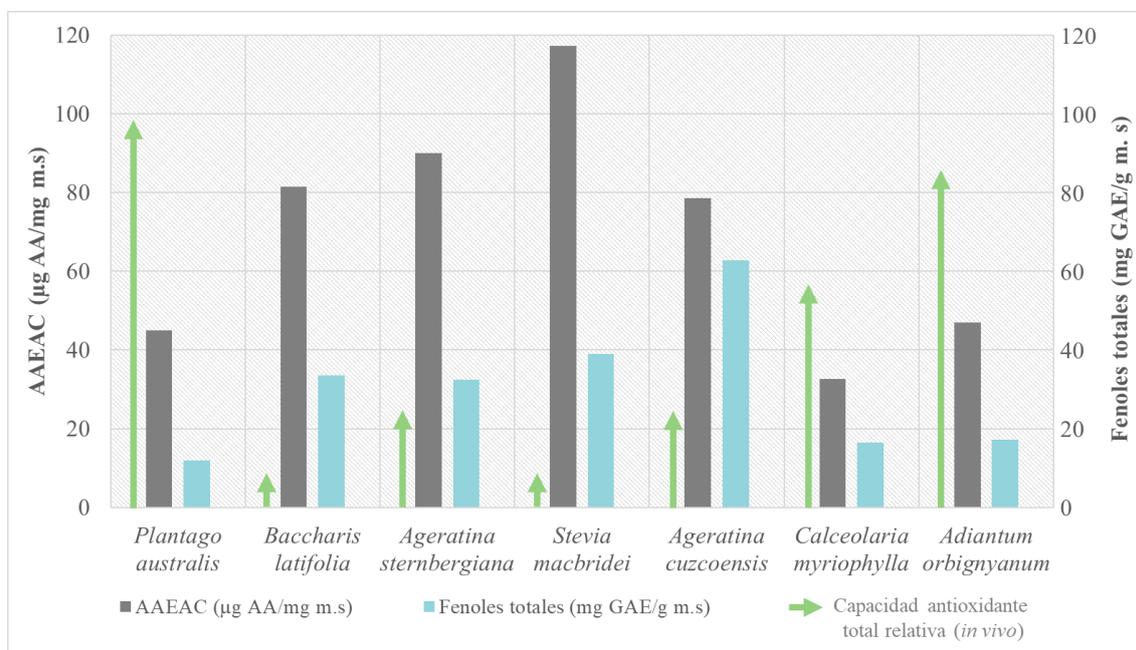


Figura 23. Comparación de los resultados obtenidos para los ensayos de contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante de los extractos acuosos.

Las barras de color gris corresponden a los resultados de capacidad antioxidante (ensayo DPPH), expresada en microgramo de ácido ascórbico por miligramo de muestra seca (AAEAC). Las barras de color celeste corresponden al contenido de fenoles totales (método de Folin-Ciocalteu) expresado en miligramo de ácido gálico por gramo de muestra seca. Las flechas en verde representan las estimaciones de la capacidad antioxidante total relativa determinada mediante ensayos *in vivo*, usando la cepa de levadura *sod1*.

**PARTE II: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE
DE TRES OLIGOPÉPTIDOS REPORTADOS COMO
ANTIOXIDANTES EN HIDROLIZADOS DE PROTEÍNAS**

VI. METODOLOGÍA

En la segunda parte del estudio, (i) se evaluó mediante estudios *in vivo* e *in vitro* la actividad antioxidante de tres péptidos que fueron identificados en hidrolizados de proteínas por diferentes autores. Así mismo, para permitir posteriormente la búsqueda de otros péptidos con similar capacidad, (ii) se construyó una biblioteca de plásmidos de secuencias aleatorias.

6.1. Estrategia usada para la construcción de los plásmidos para la expresión de los péptidos de interés.

La construcción de los plásmidos que permiten la expresión de los péptidos se basó en un método altamente eficiente como es la clonación *in vivo*, la cual toma ventaja de la facilidad y simplicidad de la recombinación homóloga en *S. cerevisiae*. La clonación por recombinación de levaduras permite incluso el ensamblaje de múltiples fragmentos de ADN en un plásmido adecuado, los detalles del método se muestran en la Figura 24.

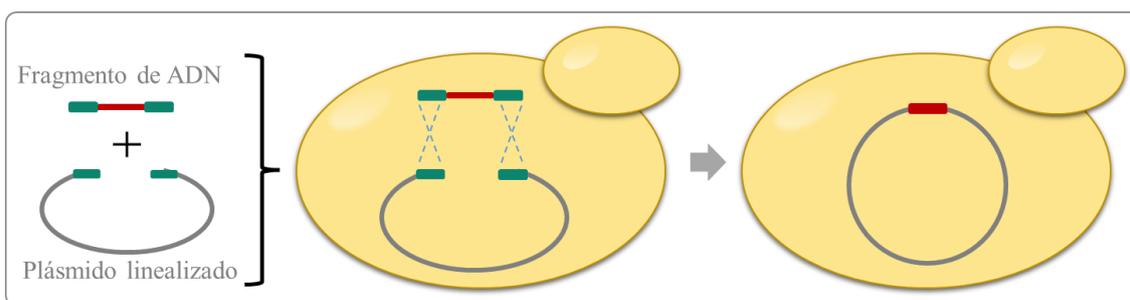


Figura 24. Clonación *in vivo* por recombinación homóloga en *S. cerevisiae*.

En la imagen se muestra los elementos necesarios (fragmento de ADN y plásmido linealizado) para la clonación *in vivo* en *S. cerevisiae* por recombinación homóloga. El proceso comienza cuando el fragmento de ADN y el plásmido linealizado ingresan dentro de levadura, donde se lleva a cabo la recombinación homóloga entre las regiones homólogas (región en verde), para finalmente dar lugar al plásmido construido, el cual contiene el fragmento de ADN de interés (región en rojo). Fuente: *Elaboración propia, 2023*.

De acuerdo a lo mostrado en la Figura 24, para la construcción de los plásmidos de expresión de los péptidos de interés son necesarios: el plásmido linealizado y los fragmentos de ADN que incluyen a los genes a expresar.

6.2. Plásmido de expresión

El plásmido de expresión usado fue pRS416-GPD, 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). Este plásmido incluye a los genes marcadores *URA3* y *Amp^R* que permiten la selección de los transformantes de levadura y *Escherichia coli* (*E.*

coli), respectivamente. Adicionalmente, consta de un secuencia de multiclonación que incluye al sitio de restricción *EcoRI*, un promotor constitutivo GPD (P_{GPD}) del gen que codifica para la enzima Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (Mumberg et al. 1995), y secuencias de los cebadores de verificación 3352FW y 3559RV, tal como se muestra en la Figura 25.

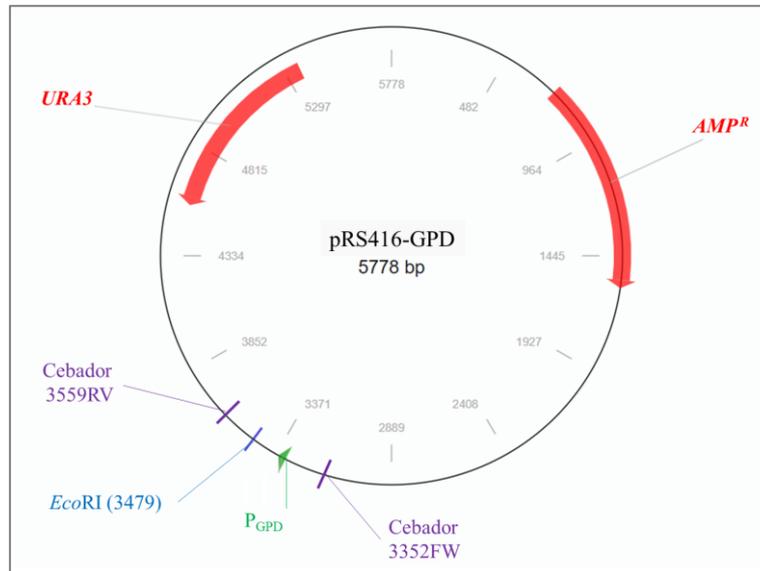


Figura 25. Características del plásmido pRS416-GPD.

El plásmido contiene, *URA3*: gen marcador que permite la selección de los transformantes de levadura en medio sintético que carece de uracilo. *AMP^R*: gen que codifica para la β -lactamasa que permite la selección de transformantes de *E. coli* en medios de cultivo con ampicilina. P_{GPD} : promotor constitutivo del gen que codifica para la enzima Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa. Sitio de clonación múltiple: contiene sitio de restricción *EcoRI*. Cebadores de verificación 3352FW y 3559RV. Fuente: Mumberg et al. 1995.

6.3. Clonación de tres genes que codifican para péptidos con reportada actividad antioxidante.

Se generaron los insertos a clonar sintetizando dos oligonucleótidos (denominados SCpepEc, SCpepRp y SCpepOa) para cada caso, uno con la secuencia codificante y el otro con la complementaria. Adicionalmente, éstos incluían en ambos extremos secuencias homólogas al sitio de clonación en el plásmido para permitir la recombinación homóloga tal como se muestra en la Tabla 9.

Obtención de los fragmentos a clonar: se realizó mezclando en un microtubo soluciones de concentración de 5 μ M de cada oligonucleótido codificante sintetizado con su fragmento complementario correspondiente, la mezcla resultante se mantuvo a 95 °C en un termobloque durante 10 minutos. Luego, se enfrió lentamente hasta temperatura ambiente (Figura 26) y la verificación de la formación del fragmento bicatenario se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2% y tinción con bromuro de etidio.

Tabla 9. Secuencias de los oligonucleótidos usados para la obtención de los fragmentos que permitieron la producción de los péptidos con reportada actividad antioxidante.

Las regiones en negro de las secuencias SCpepEcFW, SCpepRpFW y SCpepOaFW corresponden a las regiones homólogas al plásmido de expresión pRS416-GPD; las regiones de la secuencia en color azul codifican para los péptidos pepEc, pepRp y pepOa; y la región en color rojo representan a los codones de inicio y terminación. SCpepEcRV, SCpepRpRV y SCpepOaRV son los oligonucleótidos con las secuencias complementarias.

Nombre	Secuencia	Nombre del péptido
SCpepEcFW (130 bases)	GATTCTAGAACTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTC ATGACTTCTTCTTCTTTGAATATGGCTG M T S S S L N M A V TTAGAGGTGGTTTACTAGATAA GATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGTCATGTA R G G L T R *	pepEc (<i>Eleusine coracana</i>) (Agrawal et al. 2019)
SCpepEcRV (130 bases)	TACATGACTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCTTATCTAGTCAAACCACCTCTAACAGC CATATTCAAAGAAGAAGAAGTCATGAATTCCTGCAGCCCCGGGGATCCACTAGTTCTAGAATC	---
SCpepRpFW (130 bases)	ACGGATTCTAGAACTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTC ATGGCGATGAGATTGACTTATAATA M A M R L T Y N K AACCATGTTTGTATGGTACTTA AAGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGTCATGTA P C L Y G T *	pepRp (<i>Rana pleuraden</i>) (Yang et al. 2009)
SCpepRpRV (130 bases)	TACATGACTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCTTAAGTACCATACAAACATGGTTTATT ATAAGTCAATCTCATCGCCATGAATTCCTGCAGCCCCGGGGATCCACTAGTTCTAGAATCCGT	---
SCpepOaFW (130 bases)	ACTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTC ATGGGTTTGTTTTCTATGATTTTGGGTGTTGGTAAAA M G L F S M I L G V G K K AACTTTGTGTGGTTTGTCTGGTTTGTGGTA AAGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCG T L C G L S G L W *	pepOa (<i>Odorrana andersonii</i>) (Yang et al. 2016)
SCpepOaRV (130 bases)	CGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCTTACCACAAACCAGACAAACCACACAAAGTTTTTTT ACCAACACCCAAAATCATAGAAAACAAACCCATGAATTCCTGCAGCCCCGGGGATCCACTAGT	---

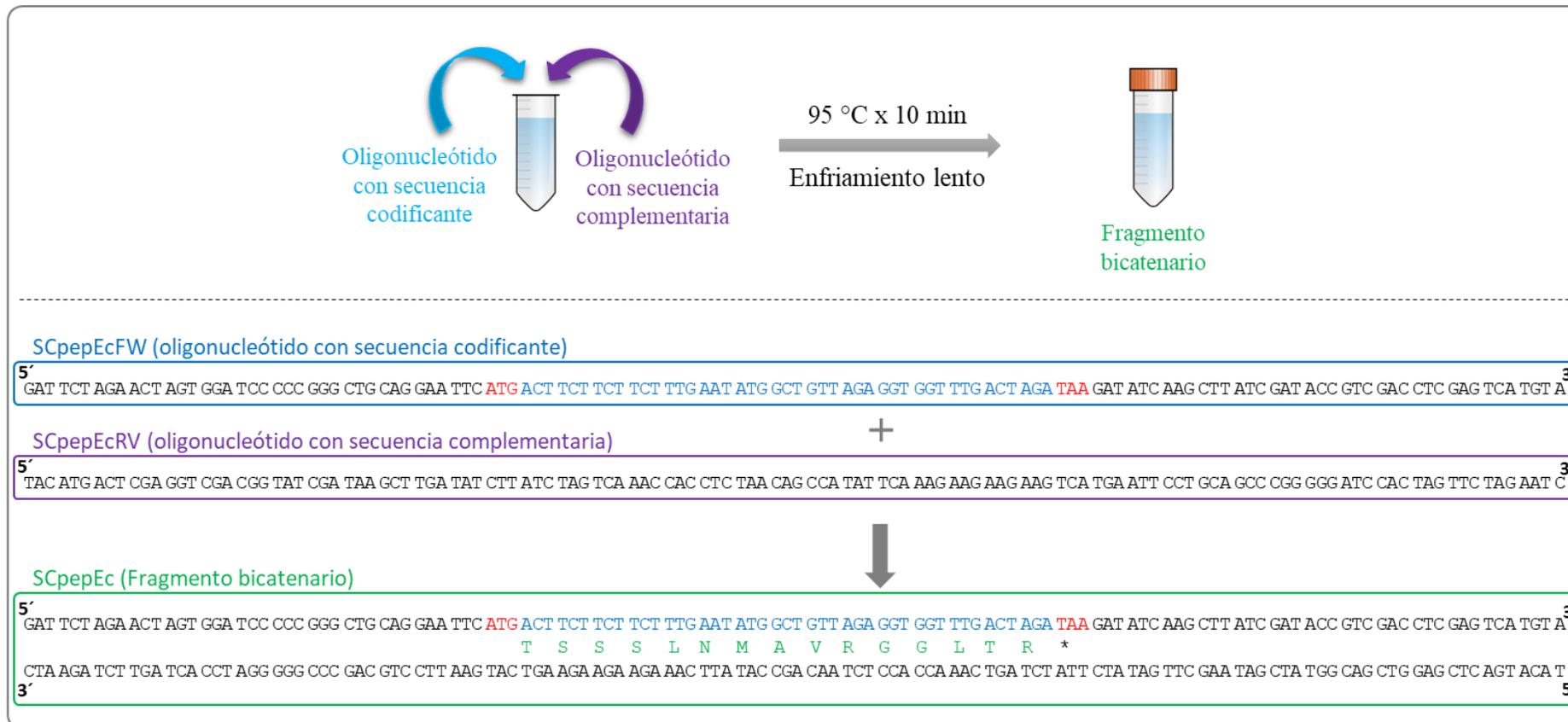


Figura 26. Generación del fragmento a clonar en *S. cerevisiae*.

En la parte superior se representa el tratamiento térmico aplicado para la obtención de los respectivos fragmentos bicatenarios a ser clonados (SCpepEc, SCpepRp y ScepOa), usando el correspondiente al péptido Ec como ejemplo. En la parte inferior, se muestra la secuencia del fragmento bicatenario, a partir de los oligonucleótidos complementarios SCpepEcFW y SCpepEcRV. En la secuencia nucleotídica para SCpepEcFW, la secuencia en negro corresponde a la región homóloga al plásmido pRS416-GPD, la secuencia en celeste son los codones que codifican para el péptido pepEc, y las secuencias en rojo representan a los codones de inicio y terminación. Adicionalmente, en el fragmento bicatenario se muestra, en color verde, el péptido pepEc codificado (TSSSLNMAVRGGLTR).
 Fuente: Elaboración propia, 2023.

Digestión del plásmido pRS416-GPD y tratamiento con fosfatasa: la digestión se realizó usando 5 µg del plásmido pRS416-GPD y 5 µL de la enzima de restricción *EcoRI* (12 U/µL) de secuencia de reconocimiento “GAATTC”. La inactivación de la enzima *EcoRI* se realizó, en primer lugar, mediante un tratamiento térmico a 65 °C durante 20 minutos y posterior adición de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico 25:24:1. Después de una agitación en el mezclador de vórtice por 1 minuto, la mezcla se centrifugó y se recuperó el sobrenadante, al cual se le agregó acetato de amonio 7,5 M y etanol al 96% (v/v) y posteriormente se mantuvo a -20 °C durante 20 minutos. El precipitado de ADN fue recuperado mediante centrifugación y después de enjuagues con alcohol 90% (v/v), se disolvió en el buffer de la fosfatasa alcalina (Antártica®, NEB) y fue tratado con 2 µL de la enzima a 37 °C por 30 minutos. Finalmente, se procedió con la inactivación de la fosfatasa mediante tratamiento térmico a 65 °C durante 20 minutos y se procedió a almacenar a -20 °C para su uso posterior.

Clonación de los fragmentos bicatenarios obtenidos en los plásmidos: se llevó a cabo en tres diferentes cepas de levadura, la cepa silvestre, *sod1* y *yap1* para la expresión de los genes que codifican para los péptidos antioxidantes pepEc, pepRp y pepOa y evaluar su efecto antioxidante.

La construcción de los plásmidos para la producción de los péptidos se realizó mediante la clonación *in vivo* en *S. cerevisiae* tal como se puede apreciar en la Figura 24 del apartado 6.1, de acuerdo con el protocolo descrito por Weissman y colaboradores (Weissman et al. 2010). Esto requiere de 170 ng del plásmido de expresión pRS416-GPD linealizado y 30 ng de cada fragmento a clonar. El proceso se inició con un cultivo de células de levadura con densidad óptica (DO_{600 nm}) menor a 0,3 y se dejó crecer hasta un DO_{600 nm} de 0,5. Las células se recuperaron por centrifugación, se resuspendieron en 5 mL de LiOAc/TE y se volvió a recuperar por centrifugación, el proceso de resuspensión en LiOAc/TE se repitió nuevamente. Luego de resuspender las células en suficiente cantidad de LiOAc/TE, una alícuota de las células se mezcló con el plásmido linealizado y el fragmento a clonar, posteriormente se adicionó 1 mL PEG 3350 (al 50% en LiOAc/TE) y se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Luego, se colocó en baño María a 42 °C durante 20 minutos. Las células se recuperaron por centrifugación, se añadió 1 mL de caldo YPD y se incubaron durante una hora, las células se colectaron por centrifugación y se resuspendieron en el medio restante (aproximadamente 100 µL). Las suspensiones resultantes se sembraron en medio -URA glucosa y finalmente las placas se incubaron a 30 °C durante 3 a 4 días.

6.4. Construcción de una biblioteca de plásmidos que permite la producción de péptidos aleatorios.

Se aplicó una estrategia basada en la obtención de codones degenerados “NNK”, donde N = A, C, G, o T y K = G o T (descrita en la Figura 6 de la Sección 2.7). Se diseñaron oligonucleótidos de 130 bases (plantilla NNK), que incluían 18 codones aleatorios NNK que podrían permitir la introducción de cualquier aminoácido o un codón de terminación. Todas estas poseen secuencias homólogas al plásmido pRS416-GPD de 45 bases (secuencia en morado, mostrado en la Tabla 10), y la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción *EcoRI* (secuencia subrayada en morado). Además de los oligonucleótidos aleatorios, se requirió un oligonucleótido de extensión EXT_{rv}, que posee un extremo con una secuencia complementaria a las plantillas NNK (secuencia en verde), y el otro extremo (secuencia en morado) secuencias homólogas al plásmido pRS416-GPD. Los cebadores 25dir y 30rv se emplearon para la amplificación de ambos fragmentos y los cebadores 3352FW y 3559RV para la verificación de la inserción correcta de la secuencia aleatoria en el plásmido. Las características de los oligonucleótidos empleados se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10: Secuencias codificantes y cebadores empleados en la generación de la biblioteca de plásmidos.

Nombre	Secuencia de nucleótidos*	Péptidos codificados	Finalidad
Plantilla aleatoria NNK (130 bases)	AAACACCAGAACTTAGTTTCGACGGATTCTAG AACTAGTGGATCCATG(NNK) ₁₈ TAAACCCGGGC TGCAGGAATTCGATATCA	Met (XXX) ₁₈	Construcción de la biblioteca aleatoria
Oligonucleótido complementario de extensión EXTrv (78 bases)	AGCGTGACATAACTAATTACATGACTCGAGGT CGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCC TGCAGCCCGGGTTA	-	Extensión de la plantilla NNK para la obtención del primer fragmento bicatenario
Cebador 25dir (25 bases)	AAACACCAGAACTTAGTTTCGACGG	-	Amplificación de los fragmentos obtenidos a partir de las plantillas NNK y EXTrv
Cebador 30rv (30 bases)	AGCGTGACATAACTAATTACATGACTCGAG	-	
Cebador 3352FW (20 bases)	AAGACGGTAGGTATTGATTG	-	Verificación de la correcta inserción de los fragmentos en el plásmido de expresión
Cebador 3559RV (20 bases)	TTCGGTTAGAGCGGATGTGG	-	pRS416-GPD

* Los codones de inicio y terminación están destacados en rojo y las secuencias codificantes en azul.

* La secuencia complementaria a las plantillas NNK está destacada en verde y la secuencia complementaria al plásmido pRS416-GPD en morado.

Posteriormente, se solicitó la síntesis de los oligonucleótidos y cebadores que figuran en las Tablas 9 y 10 (MACROGEN).

Generación de los fragmentos que codifican para los péptidos aleatorios: los fragmentos a ser clonados en el plásmido pRS416-GPD se obtuvieron mediante amplificación por PCR usando las plantillas diseñadas, de acuerdo a la Figura 27.

Para este propósito, se empleó: 0,5 μ L de las plantillas NNK y oligonucleótido complementario de extensión EXTrv a una concentración de 5 μ M, 0,5 μ L de los cebadores 25dir y 30rv a una concentración de 50 μ M, 0,25 μ L de la enzima Taq ADN polimerasa (5 U/ μ L); 2,5 μ L de buffer 10X para ADN polimerasa termoestable; 1,5 μ L de MgCl₂ 50 mM y 0,625 μ L de dNTPs 10 mM y se completó con agua hasta un volumen final de 25 μ L.

El programa de PCR usado fue (i) ciclo 1 (antes de la adición de cebadores), desnaturalización a 95 °C por 30 s, hibridación a 69 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 20 s y (ii) ciclos 2 y 3 (después de la adición de los cebadores), desnaturalización a 95 °C por 30 s, hibridación a 69 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 20 s (Chavez 2018).

La verificación del rendimiento y calidad de las reacciones de amplificación se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2% y tinción con bromuro de etidio.

Clonación *in vivo* para la construcción de la biblioteca de plásmidos para la producción de péptidos aleatorios: Se procedió de la misma manera indicada en la sección 6.3, para este caso se usaron los fragmentos de secuencia aleatoria en lugar de los fragmentos SCpepEc, SCpepRp y SCpepOa; asimismo, se empleó el plásmido pRS416-GPD linealizado. Se usaron únicamente células *sodI* para la clonación.

En adelante, los plásmidos de expresión para los péptidos pepEc, pepRp y pepOa, se denominarán pSCpepEc, pSCpepRp y pSCpepOa respectivamente.

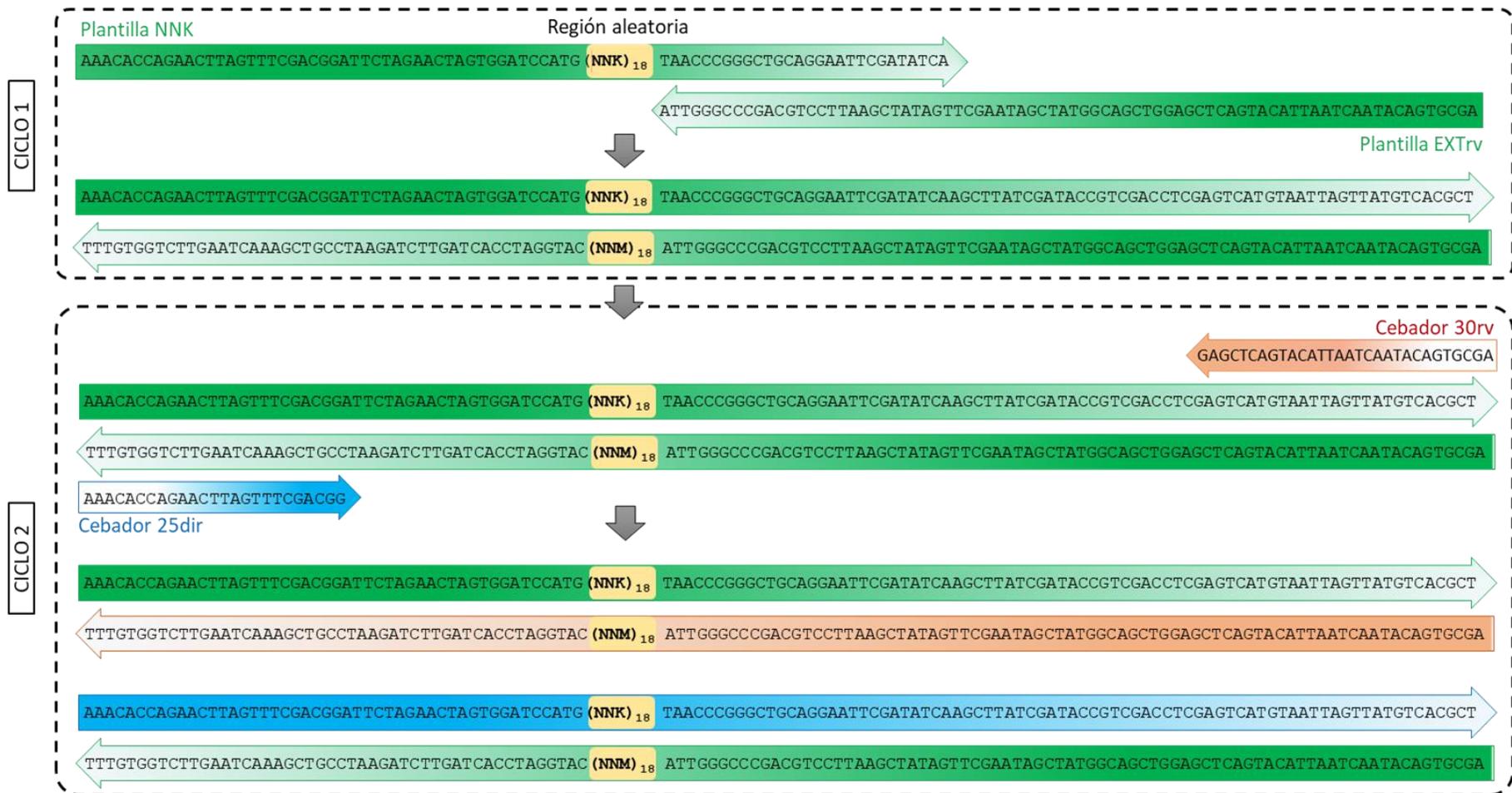


Figura 27. Estrategia para la obtención de los fragmentos a clonar mediante PCR, a partir de la plantilla principal NNK, la plantilla complementaria EXTrv y los cebadores 25dir y 30rv.

En el ciclo 1 participan las plantillas NNK y EXTrv, lo que permite formar el fragmento bicatenario a ser amplificado en los dos ciclos siguientes y que incluye la región aleatoria NNK (donde, N=A/T/C/G y K=G/T). En el segundo ciclo se amplifica el fragmento bicatenario usando los cebadores 30rv y 25dir, el cual se repite una vez más. Fuente: *Elaboración propia, 2023.*

6.5. Ensayo de la capacidad antioxidante de los péptidos de interés

Todos los transformantes obtenidos tanto para los péptidos pepEc, pepRp, pepOa, como los transformantes de la biblioteca fueron analizados para verificar la presencia de los plásmidos construidos. Para ello, las células transformantes junto con los controles positivos correspondientes se sembraron en medio –URA glucosa. Posteriormente, se seleccionaron aquellos que lograron crecer en dicho medio para realizar ensayos extracción de ADN total y la verificación de la presencia de los fragmentos en los plásmidos construidos.

6.5.1. Recuperación del ADN total y verificación de los fragmentos clonados en los transformantes seleccionados

La recuperación del ADN total se realizó a partir de los transformantes que contienen los plásmidos con los fragmentos SCpepEc, SCpepRp, SCpepOa y los fragmentos aleatorios. Para ello, los transformantes se cultivaron en caldo -URA glucosa y la biomasa se colectó por centrifugación. La extracción del ADN total (genómico y plasmídico) de los transformantes se realizó utilizando buffer de ruptura y fenol/cloroformo/alcohol isoamílico 25:24:1 con agitación vigorosa y suficiente cantidad de perlas de vidrio (Dymond 2013). Después de la centrifugación, se recuperó el sobrenadante, al cual se le agregó acetato de amonio 10 M y etanol al 96% (v/v) helado. Se colocó a -20 °C por 30 minutos, luego se centrifugó para recuperar el sedimento, lavarlo dos veces con etanol al 90% (v/v), secarlo y disolverlo en 50 µL de buffer TE.

La verificación de la presencia del fragmento en el ADN recuperado se realizó mediante amplificación por PCR. Para esto se empleó 1 µL de la solución de ADN total de levadura como plantilla, 1 µL de los cebadores 3352FW y 3559RV a una concentración de 50 µM, 0,25 µL de la enzima Taq ADN polimerasa a concentración de 5 U/µL, 2,5 µL de buffer 10X para ADN polimerasa termoestable; 0,625 µL de MgCl₂ 50 mM y 0,25 µL de dNTPs 25 mM; finalmente se llevó a un volumen final de 25 µL con agua destilada. Se utilizó el siguiente programa de PCR: desnaturalización a 95 °C por 30 s, hibridación a 69 °C por 30 s, y extensión a 72 °C por 60 s; durante 25 ciclos. La verificación de la formación de los productos con la longitud esperada se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2% y tinción con bromuro de etidio.

Confirmada la presencia de los fragmentos correspondientes se realizó una siembra por estriado en medio –URA glucosa. Para el caso de la biblioteca de péptidos aleatorios construida, los transformantes se almacenaron en glicerol a -80 °C para que puedan ser

usadas en futuras investigaciones. Por su parte, a los transformantes que contienen los fragmentos SCpepEc, SCpepRp y SCpepOa fueron sometidas a pruebas posteriores, entre ellas el ensayo de resistencia y la recuperación de los plásmidos construidos.

6.5.2. Ensayos de resistencia a peróxido de hidrógeno de los transformantes

Se realizaron dos ensayos para evaluar la actividad antioxidante de los transformantes. El primero consistió en realizar una siembra por estriado de los transformantes en medio sólido YPD dosificado con peróxido de hidrógeno con concentraciones crecientes entre 1,5 mM y 3,5 mM. El segundo ensayo consistió en realizar diluciones seriadas, para esto los transformantes se incubaron en caldo -URA glucosa a 30 °C hasta saturación (2 a 3 días), se seleccionaron entre tres a cinco colonias por transformante. Suspensiones con similar densidad celular de cada transformante fueron mezcladas y posteriormente se diluyeron 10 veces (hasta alcanzar un $DO_{600\text{ nm}}$ aproximado entre $0,45 \pm 0,050$ y $0,50 \pm 0,050$) con caldo -URA glucosa y se sonicaron para romper los agregados. Luego, se transfirieron 100 μL de cada dilución a una placa de 96 pocillos para realizar las diluciones en serie de 1/30, 1/90 y 1/270 con agua destilada. Alícuotas de estas diluciones se sembraron en medio sólido YPD que contenía peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones tal como se muestra en la Figura 28. A continuación, las placas se incubaron a 30 °C durante 1 y 2 días para evaluar el crecimiento.

Tras confirmar la resistencia de los transformantes al estrés oxidativo, se procedió a recuperar de los plásmidos construidos para su posterior caracterización.

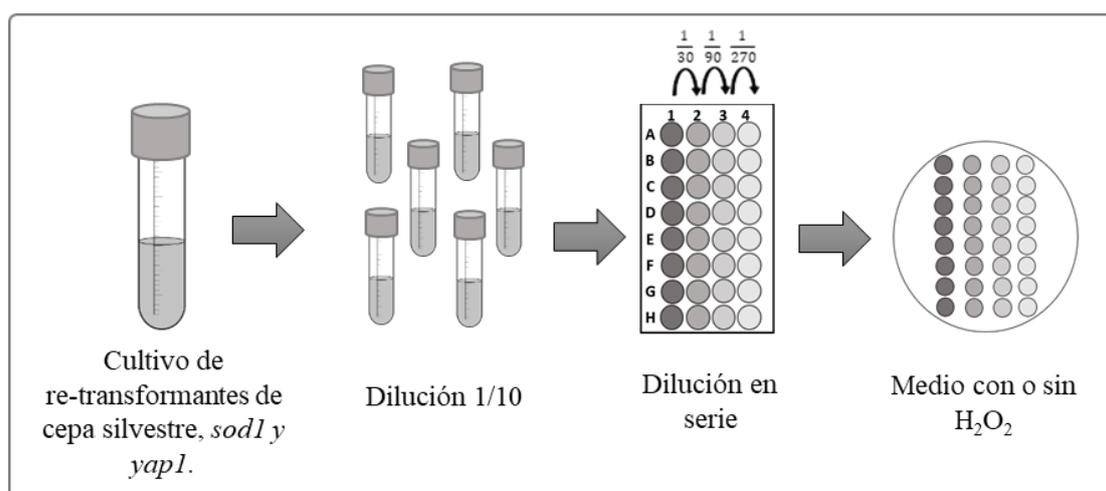


Figura 28. Descripción del ensayo de resistencia de los transformantes.

Alícuotas de 3 μL de todas las diluciones, para las tres cepas, se colocaron en medio YPD con o sin peróxido de hidrógeno entre 1,5 y 3,5 mM. Las placas se incubaron a 30 °C durante 1 a 2 días. Se usaron transformantes conteniendo plásmido vacío como control. Fuente: *Elaboración propia, 2023.*

6.6. Amplificación y recuperación de los plásmidos construidos

La recuperación de los plásmidos construidos pSCpepEc, pSCpepRp y pSCpepOa se realizó mediante la transformación de *E. coli* OmniMax 2-T1 con el ADN total extraído de los transformantes, siguiendo el protocolo de transformación por electroporación. Para la electroporación, se mezclaron 40 μL de la suspensión celular de *E. coli* con 1 μL de la solución de ADN total. La mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación de 1 mm y se sometió a un pulso eléctrico de 1800 V. Inmediatamente se añadió 1 mL de caldo LB y se transfirió a microtubos para su incubación a 37 °C durante una hora. A continuación, se sembró en placas con medio LB conteniendo ampicilina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, para la selección de los transformantes.

Para la purificación de los respectivos plásmidos, se cultivaron los transformantes en caldo LB con ampicilina durante 12 horas. Las células se recuperaron por centrifugación, la biomasa recuperada se mezcló con reactivo GTE helado y se realizaron tratamientos con soluciones de SDS/NaOH, buffer acetato 3 M y fenol/cloroformo/alcohol isoamílico 25:24:1 y se centrifugó. Después de la centrifugación de la mezcla anterior, se recuperó el sobrenadante y seguidamente se le agregó etanol al 96% (v/v) helado para precipitar el ADN (Green y Sambrook 2012). El precipitado recuperado se disolvió en buffer TE conteniendo ARNsa y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Finalmente, el análisis de los plásmidos se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y bromuro de etidio como agente de tinción. Luego de confirmar la recuperación de los plásmidos de interés, se verificó la correcta ubicación de los fragmentos correspondientes.

6.7. Verificación de la correcta construcción de los plásmidos

La presencia de los fragmentos SCpepEc, SCpepRp y SCpepOa en los plásmidos recuperados se verificó mediante amplificación por PCR. Para lo cual se empleó 1 μL de solución de plásmido purificado como plantilla, 1 μL de los cebadores 3252FW y 3579RV a una concentración de 50 μM ; 0,25 μL de la enzima Taq ADN polimerasa a concentración de 5 U/ μL ; 0,25 μL de dNTPs 10 mM; 0,625 μL de MgCl_2 50 mM; 2,5 μL de buffer 10X para ADN polimerasa y finalmente se completa con agua destilada a un volumen final de 25 μL . El programa de PCR utilizado fue el siguiente: desnaturalización a 95 °C por 30 s, hibridación a 60 °C por 30 s, extensión a 72 °C por 60 s, se realizó 25 ciclos con una desnaturalización preliminar a 95 °C por 2 min antes de cada ciclo. La verificación de la formación de los productos esperados se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2% y bromuro de etidio como agente de tinción.

Confirmada la correcta construcción y purificación de los plásmidos de interés, se procedió a re-transformar la cepa silvestre, *sod1* y *yap1* para corroborar su resistencia a peróxido de hidrógeno.

6.8. Confirmación de la resistencia a peróxido de hidrógeno conferida por los plásmidos construidos

En este caso, la cepa silvestre, *sod1* y *yap1* se re-transformaron de acuerdo al protocolo mencionado en el apartado 6.3, usando los plásmidos purificados. Para la confirmación de la resistencia a peróxido de hidrógeno, se realizaron siembras por estriado y diluciones en serie, a partir de inóculos de cada re-transformante.

Se prepararon inóculos de células de cada re-transformante durante 2 días (un $DO_{600\text{ nm}}$ de $1,800 \pm 0,050$), luego se diluyeron 10 veces ($DO_{600\text{ nm}}$ aproximado entre $0,45 \pm 0,050$ y $0,50 \pm 0,050$) con caldo YPD y se sonicó para romper los agregados. Después, alícuotas de estas diluciones se dispusieron en placas de 96 pocillos para hacer tres diluciones en serie adicionales de 1/30, 1/90 y 1/270, tal como se muestra en la Figura 28, de la sección 6.5.2. Luego, se sembró 3 μL de cada suspensión en placas de medio YPD dosificado con peróxido de hidrógeno a concentraciones 1,5 mM; 2 mM; 2,5 mM; 3 mM y 3,5 mM. Finalmente, se evaluó la resistencia a peróxido de hidrógeno mediante el crecimiento de los re-transformantes.

6.9. Evaluación mediante ensayos *in vitro* de la capacidad antioxidante de los extractos de levadura

Este ensayo tuvo como propósito confirmar la capacidad antioxidante de los péptidos producidos en los respectivos transformantes de levadura mediante ensayos *in vitro*. Para ello se prepararon los extractos proteicos, se cuantificó su contenido de proteínas y se evaluó su actividad antioxidante como se describe a continuación.

6.9.1. Preparación de los extractos de levadura

Se preparó un inóculo de los transformantes (que producen los fragmentos SCpepEc, SCpepRp o SCpepOa) en 100 mL medio -URA a 30 °C durante 24 horas. Se colectaron las células por centrifugación y se lavaron con agua dos veces. Se retiró el sobrenadante completamente y se agregó 3 mL de tampón de extracción PBS (buffer fosfato salino conteniendo 10% glicerol), se añadió suficiente cantidad de perlas de vidrio de 2 mm y 150 μL de EDTA 0,5 M y finalmente se agitó vigorosamente en un vórtex. La mezcla final se centrifugó y se recuperó el sobrenadante para su análisis posterior.

6.9.2. Cuantificación de proteínas totales en los extractos de levadura mediante el método de Bradford

La cuantificación de proteínas se realizó utilizando un kit que contiene un reactivo avanzado de proteínas 5X (Nº de cat. ADV01, Advanced Protein Assay Methods) y a partir de este se preparó una solución 2X. Para la construcción de la curva de calibración se usó albúmina de suero de bovino (BSA, por sus siglas en inglés, Bovine Serum Albumin) como estándar a una concentración 1 mg/mL. Se mezcló 1 mL de cada solución de BSA (concentraciones entre 0 y 30 µg/mL preparados en buffer PBS) con 1 mL del reactivo de ensayo avanzado de proteínas 2X, se mezcló por inversión y se dejó reposar por 2 minutos y enseguida se midió la absorbancia a 595 nm. Para el control se usó la mezcla de buffer PBS con el reactivo de proteínas. En el caso de los extractos de levadura, se tomaron alícuotas de 5 µL y se completaron con buffer PBS hasta 1 mL, estas diluciones se trataron de la misma forma que el estándar BSA.

6.9.3. Evaluación de la actividad antioxidante en los extractos de levadura

Se llevó a cabo mediante el ensayo ABTS, este consistió en la interacción del extracto de levadura con un radical libre estable, derivado de 2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (Nitha et al. 2010, Xiao et al. 2020). La producción del catión radical (ABTS^{•+}) se obtuvo a partir de la mezcla de una solución madre de ABTS 7 mM (en agua) con una solución de persulfato de amonio (concentración final de 2,45 mM), la mezcla se dejó reaccionar durante 16 horas a temperatura ambiente sin luz. La solución de radical catiónica se diluyó con PBS hasta alcanzar 0,7 de absorbancia, medida a una longitud de onda de 734 nm. Así mismo, se prepararon soluciones de extracto de levadura a diferentes concentraciones.

Para la reacción, se mezclaron 70 µL de las soluciones de extracto de levadura con 2 mL de solución del radical catiónico (Figura 29). El tiempo de reacción fue de 6 minutos y posteriormente se midió la absorbancia a 734 nm. Se usó como blanco de reactivo una mezcla del radical catiónico con buffer PBS y como estándar, ácido ascórbico.

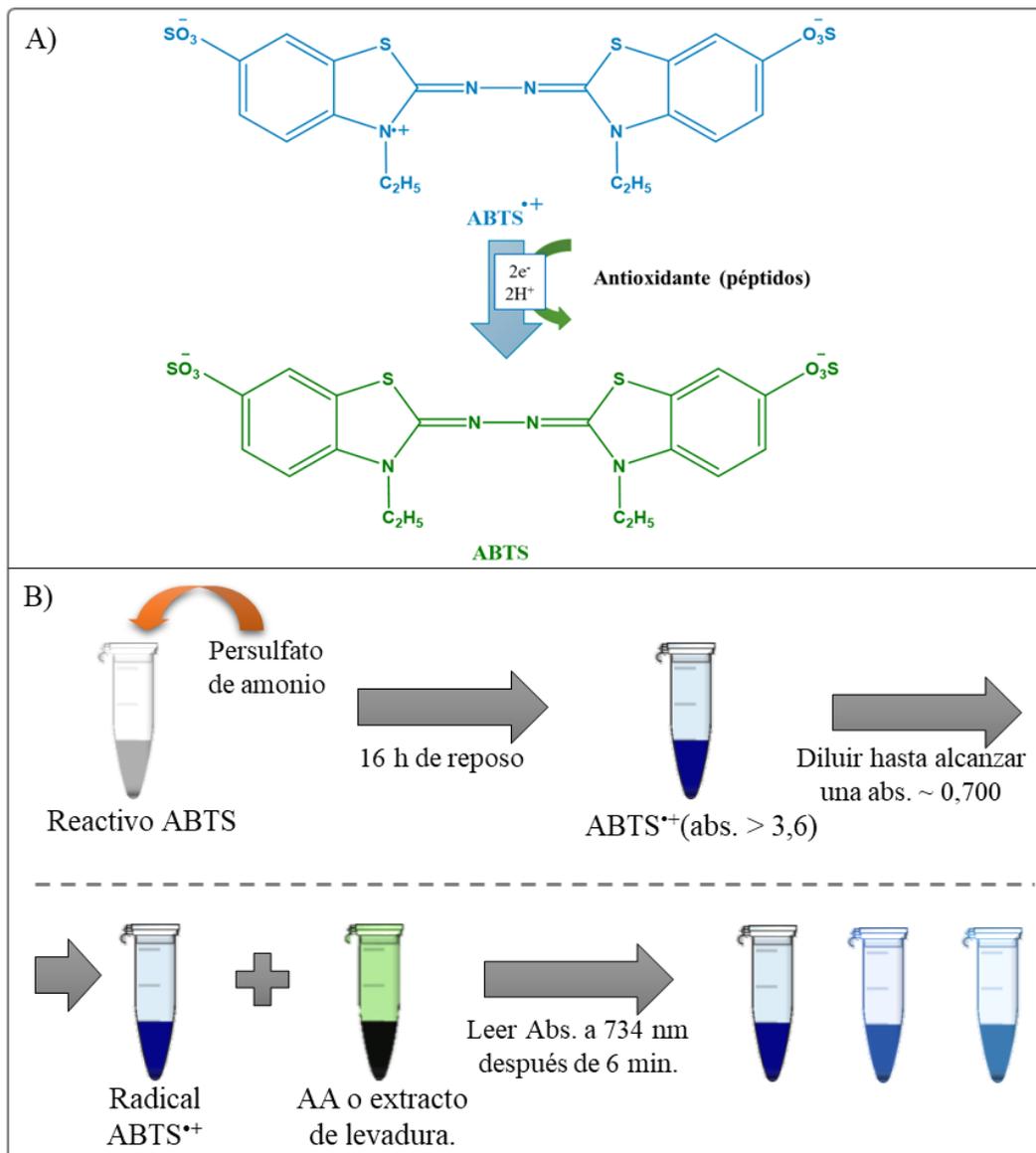


Figura 29. Proceso seguido para la cuantificación de la capacidad antioxidante del extracto de levadura mediante el ensayo de ABTS.

En la parte superior (A) se muestra el fundamento de la reacción de neutralización del radical catiónico $ABTS^{\bullet+}$ por la donación de electrones y protones por parte de los antioxidantes y/o péptidos. En la parte inferior (B) se muestra la preparación del radical catiónico $ABTS^{\bullet+}$ (complejo azul), mediante la mezcla del reactivo ABTS y persulfato de amonio, luego de 16 horas de reacción la absorbancia del radical catiónico preparado es ajustada a 0,700 aproximadamente. Posteriormente, alícuotas del radical catiónico se hacen reaccionar con el estándar ácido ascórbico (AA) para construir la curva de calibración y con los extractos de levadura. Fuente: *Elaboración propia, 2023*.

6.10. Análisis de secuenciación de nucleótidos de los plásmidos construidos

Los plásmidos construidos (que contienen los fragmentos SCpepEc, SCpepRp y SCpepOa) fueron purificados empleando el kit Zyppy Plasmid Miniprep (ZYMO RESEARCH). Para la secuenciación se usaron los cebadores p416GPD3352FW y p416GPD3579RV. La secuenciación fue llevada a cabo por Macrogen Inc., Seúl (Corea del Sur).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Péptidos con reportada actividad antioxidante

Por su extraordinaria diversidad estructural, los péptidos podrían ser una robusta fuente de compuestos antioxidantes hidrosolubles. Muchos de los péptidos antioxidantes reportados han sido identificados en estudios a partir de hidrolizados de proteínas de fuentes animales o vegetales, los que no han sido corroborados mediante estudios con péptidos recombinantes. Por otro lado, la revisión bibliográfica demostró una carencia de ensayos *in vivo* complementarios que permitan corroborar dicha propiedad. Por tanto, el uso de un sistema *in vivo*, como el caso de levadura, es una herramienta atractiva que permite no solo la producción de los péptidos, sino que también permite la evaluación de su efecto antioxidante dentro del mismo sistema. Asimismo, la levadura ofrece la posibilidad de generar bibliotecas de plásmidos que incluyen una gran diversidad de secuencias aleatorias, abriendo la posibilidad de realizar tamizados diseñados para identificar péptidos o proteínas antioxidantes no existentes de manera natural.

En este sentido, a manera de prueba de concepto, se seleccionaron tres péptidos con reportada actividad antioxidante mediante ensayos *in vitro*, como el ensayo de DPPH, ensayo ABTS y su potencial reductor de hierro. Estos péptidos se denominaron pepEc, pepRp y pepOa. Luego, se procedió a realizar la clonación para construir un plásmido de expresión que contenga la secuencia nucleotídica que codifica para los péptidos de interés, expresar dichos péptidos en la levadura y evaluar su capacidad antioxidante.

7.2. Clonación *in vivo*

Para la clonación *in vivo*, fue necesario obtener primero los fragmentos a clonar (en adelante denominado insertos), los cuales se obtuvieron por tratamiento térmico de las hebras complementarias de ADN que codifican para los péptidos pepEc, pepRp, pepOa, y se verificaron por análisis electroforético (Figura 30); de la misma manera, se procedió para los insertos aleatorios (Figura 31). Por otro lado, se requirió el plásmido pRS416-GPD linealizado (Figura 32). La transformación de células de levadura (cepa silvestre, *sod1* y *yap1*) se realizó con 170 ng de plásmido linealizado y 30 ng de inserto. El uso del plásmido digerido se debe a que éste promueve la recombinación homóloga con el inserto dentro de la levadura. De manera similar, la desfosforilación de los terminales 5' del plásmido linealizado evita su recircularización y, por consiguiente, la aparición de falsos positivos entre los transformantes.

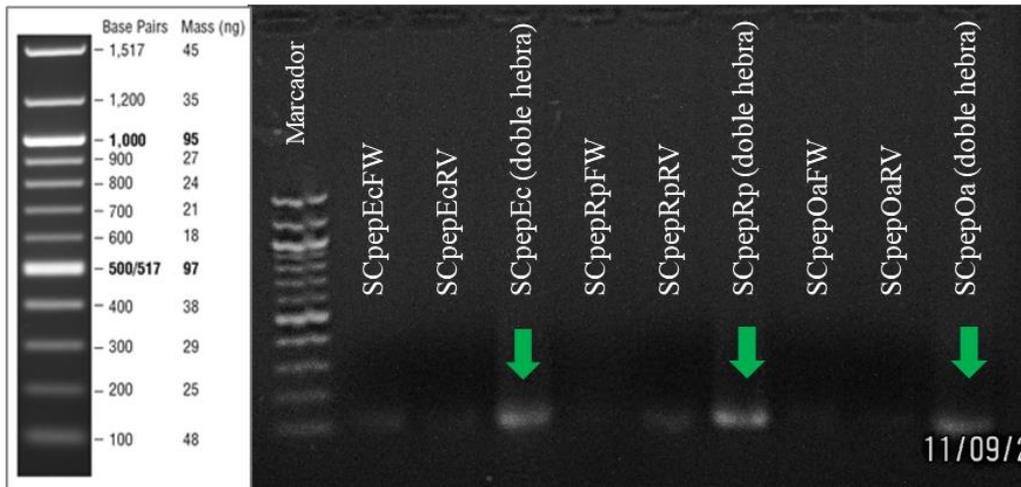


Figura 30. Obtención de los insertos a clonar en *S. cerevisiae*.

Se observa el análisis electroforético de la doble hebra obtenida (insertos a clonar SCpepEc, SCpepRp y SCpepOa) todos con un tamaño de 130 pb; el análisis se realizó en un gel de agarosa 1,2% y se utilizó un marcador de ADN de 100 pb.

Obtenidos los transformantes con los insertos SCpepEc, SCpepRp y SCpepOa y los insertos aleatorios, se determinó la eficiencia de clonación mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia de clonación} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de transformantes pRS416GPD dig/desf. + inserto}}{\mu\text{g de ADN}} - \frac{\text{N}^\circ \text{ de transformantes pRS416GPD dig/desf.}}{\mu\text{g de ADN}}$$

Donde:

- **pRS416GPD dig/desf.** es el plásmido pRS416-GPD linealizado y desfosforilado.
- **μg de ADN** es la cantidad en μg de plásmido usado.

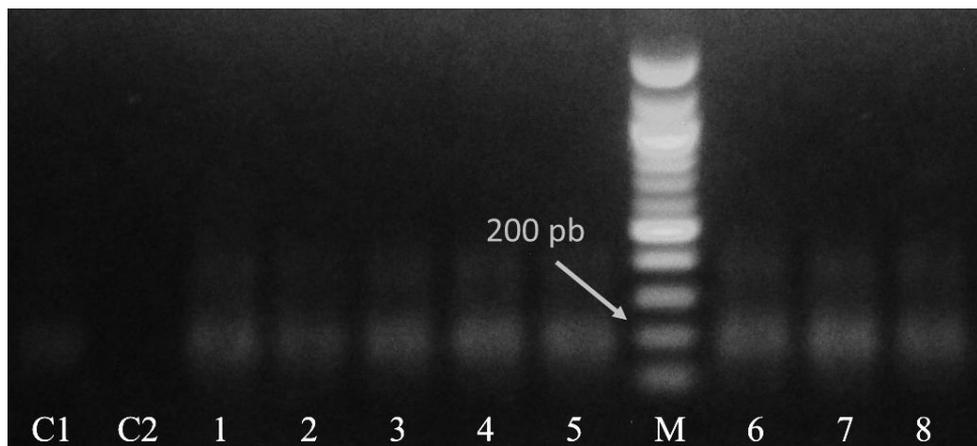


Figura 31. Obtención de los insertos aleatorios a clonar en *S. cerevisiae*.

Se observa el análisis electroforético de los insertos aleatorios que presentan las bandas de la longitud esperada de 180 pb; el análisis se realizó en un gel de agarosa 1,2% y se utilizó un marcador (M) de ADN de 100 pb. C1: control 1 (plantilla NNK + plantilla EXTrev); C2: control 2 (Plantilla NNK + cebadores 25dir y 30rv); los carriles del 1 al 8, representan el producto de reacción de la plantilla NNK, EXTrev y los cebadores (25dir y 30rev).

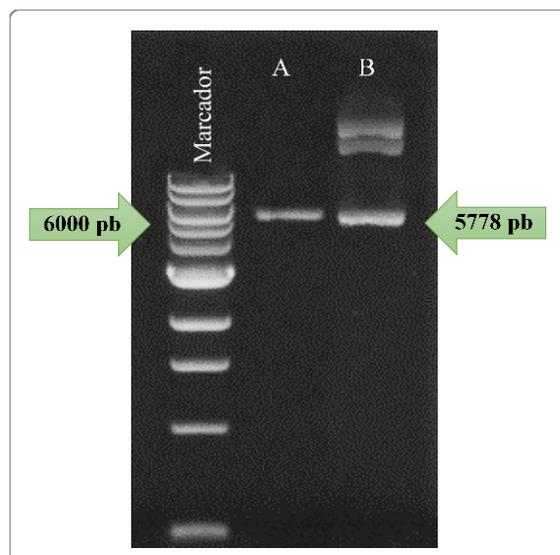


Figura 32. Análisis electroforético de la digestión del plásmido pRS416-GPD con la enzima de restricción *EcoRI*

El análisis se realizó en gel de agarosa 0,8% del (A) plásmido digerido/linealizado y como control se usó (B) plásmido sin digerir. Se utilizó un marcador de ADN de 1 kb. El tamaño esperado para el plásmido linealizado (A) es de 5778 pb.

Las eficiencias de clonación para las cepas estudiadas se muestran en la Tabla 11 y, las placas con los transformantes obtenidos de la biblioteca de plásmidos, la cepa silvestre, *sod1* y *yap1* se muestran en los ANEXOS 3, 4, 5 y 6 respectivamente. La cantidad de transformantes con plásmido recircularizado para *sod1* fue de 420 (para la biblioteca) y 182 (para la clonación con el inserto SCpepEc); mientras que para la cepa silvestre fue 193 y para *yap1* 215.

Tabla 11: Eficiencia de clonación para los insertos SCpepEc, SCpepRp, SCpepOa y aleatorio.

Insertos clonados	Número de transformantes			Eficiencia de clonación UFC/ μ g ADN		
	Cepa silvestre	<i>sod1</i>	<i>yap1</i>	Cepa silvestre	<i>sod1</i>	<i>yap1</i>
SCpepEc	4206	3148	3972	$2,36 \times 10^4$	$1,74 \times 10^4$	$2,21 \times 10^4$
SCpepRp	3804	2860	3764	$2,12 \times 10^4$	$1,58 \times 10^4$	$2,09 \times 10^4$
SCpepOa	4410	2792	4104	$2,48 \times 10^4$	$1,54 \times 10^4$	$2,29 \times 10^4$
Insertos aleatorios	--	6480	--	--	$3,56 \times 10^4$	--

*UFC: Unidades Formadoras de Colonias.

De los resultados de la Tabla 11, se puede observar que la eficiencia de clonación para la cepa silvestre fue ligeramente superior que para los mutantes *yap1* y *sod1*, con respecto a los insertos SCpepEc, SCpepRp y SCpepOa.

Respecto a la construcción de la biblioteca de plásmidos aleatorios, se realizaron 10 transformaciones, obteniendo un total de 64800 transformantes aproximadamente (ANEXO 3).

7.3. Verificación de la correcta inserción de los insertos clonados

Se seleccionaron varios transformantes para cada caso y se recuperó el ADN total de acuerdo al protocolo descrito en el apartado 6.5.1. Posteriormente se realizó la confirmación de la presencia del inserto clonado mediante amplificación por PCR: SCpepEc, SCpepRp, SCpepOa, y los insertos aleatorios. El ADN total recuperado para cada caso se utilizó como plantilla y el plásmido vacío como control negativo. La presencia del inserto se determinó mediante corrida electroforética en gel de agarosa 1,2%, dando como resultado un producto de 279 pb para SCpepEc, 276 pb para SCpepRp y 297 pb para SCpepOa (Figura 33).

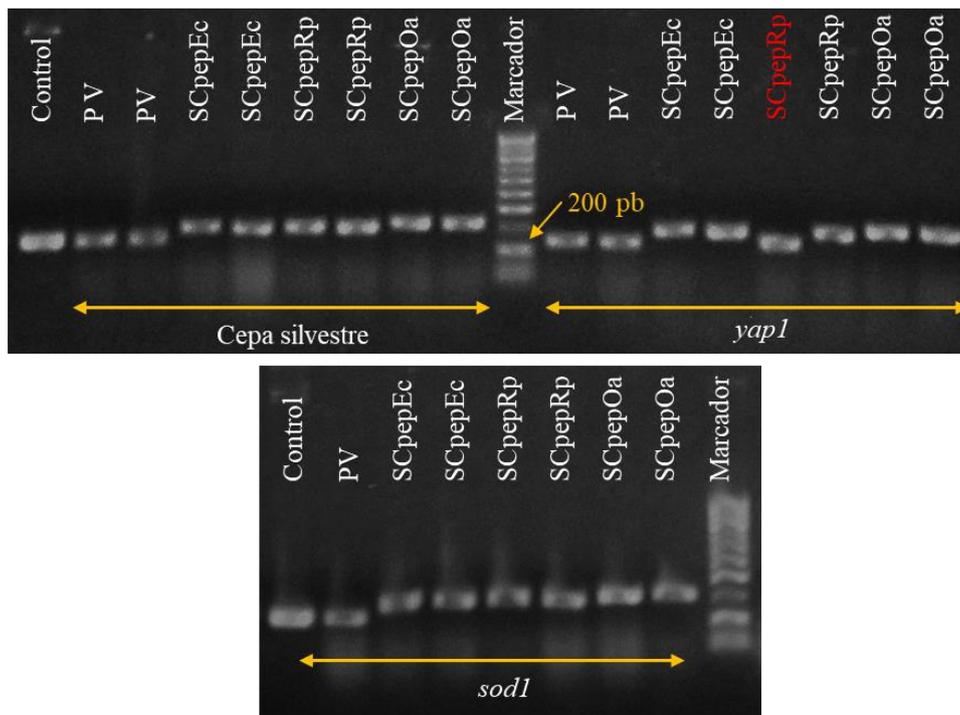


Figura 33. Verificación de la presencia de los insertos SCpepEc, SCpepRp y SCpepOa en el ADN total de los transformantes seleccionados.

La verificación de la correcta inserción del inserto clonado en el ADN, de los transformantes de la cepa silvestre, *sod1* y *yap1*, se realizó mediante amplificación por PCR y análisis electroforético en gel de agarosa 1,2%. Se utilizó como control negativo al plásmido pRS416-GPD vacío (Control). Así mismo ADN de transformantes con plásmido vacío (P V) y con los insertos SCpepEc, SCpepRp y SCpepOa. Se utilizó un marcador de ADN de 100 pb. Todos los transformantes amplificaron el producto esperado a excepción de SCpepRp (resaltado en rojo) que corresponde a *yap1*, lo cual indica que se trata de un caso de recircularización del plásmido linealizado.

Los plásmidos de interés que contienen los insertos SCpepEc, SCpepRp y SCpepOa, se denominarán plásmidos pSCpepEc, pSCpepRp y pSCpepOa respectivamente.

Respecto a la biblioteca de plásmidos aleatorios, se seleccionaron 16 transformantes al azar para la verificación de la correcta inserción de los insertos. Los resultados (Figura 34) muestran la presencia del inserto en la posición correcta para los 16 transformantes seleccionados. El tamaño amplificado para todos los transformantes fue de 288 pb, mientras que para el plásmido vacío fue de 228 pb, los cuales corresponden a los tamaños esperados.

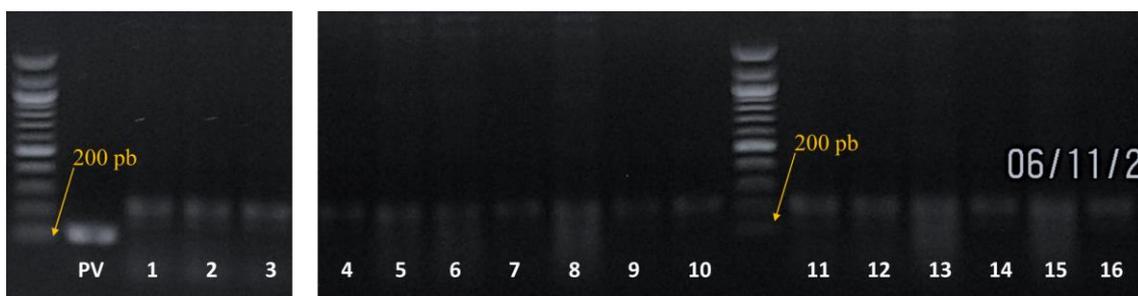


Figura 34. Verificación de la presencia de los insertos aleatorios en el ADN total de los transformantes seleccionados.

La verificación de la correcta inserción del inserto aleatorio en el ADN, de los transformantes de *sod1*, se realizó mediante amplificación por PCR y análisis electroforético en gel de agarosa 1,2%. Se utilizó como control un transformante con plásmido vacío (PV), y transformantes con plásmido con los insertos aleatorios 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16. Se utilizó un marcador de ADN de 100 pb. El tamaño esperado para el plásmido vacío es de 228 pb y para los productos que verifica los insertos aleatorios son de 288 pb. Cabe resaltar que se verificaron la presencia de los insertos aleatorios en todos los transformantes seleccionados.

Con la confirmación de la presencia de los insertos aleatorios clonados en todos los transformantes seleccionados al azar, se evidencia la alta eficiencia de la clonación *in vivo* en *S. cerevisiae*.

7.4. Ensayo de resistencia a peróxido de hidrógeno de los transformantes con los plásmidos pSCpepEc, pSCpepRp y pSCpepOa

El ensayo se realizó mediante un sembrado por estrías de los transformantes en medio YPD con peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones. La evaluación de la resistencia de los transformantes conferida por los plásmidos pSCpepEc, pSCpepRp y pSCpepOa, fue evaluada en un periodo de 1 a 2 días de incubación a 30 °C. La Figura 35 muestra los resultados obtenidos para la cepa silvestre, *sod1* y *yap1*.

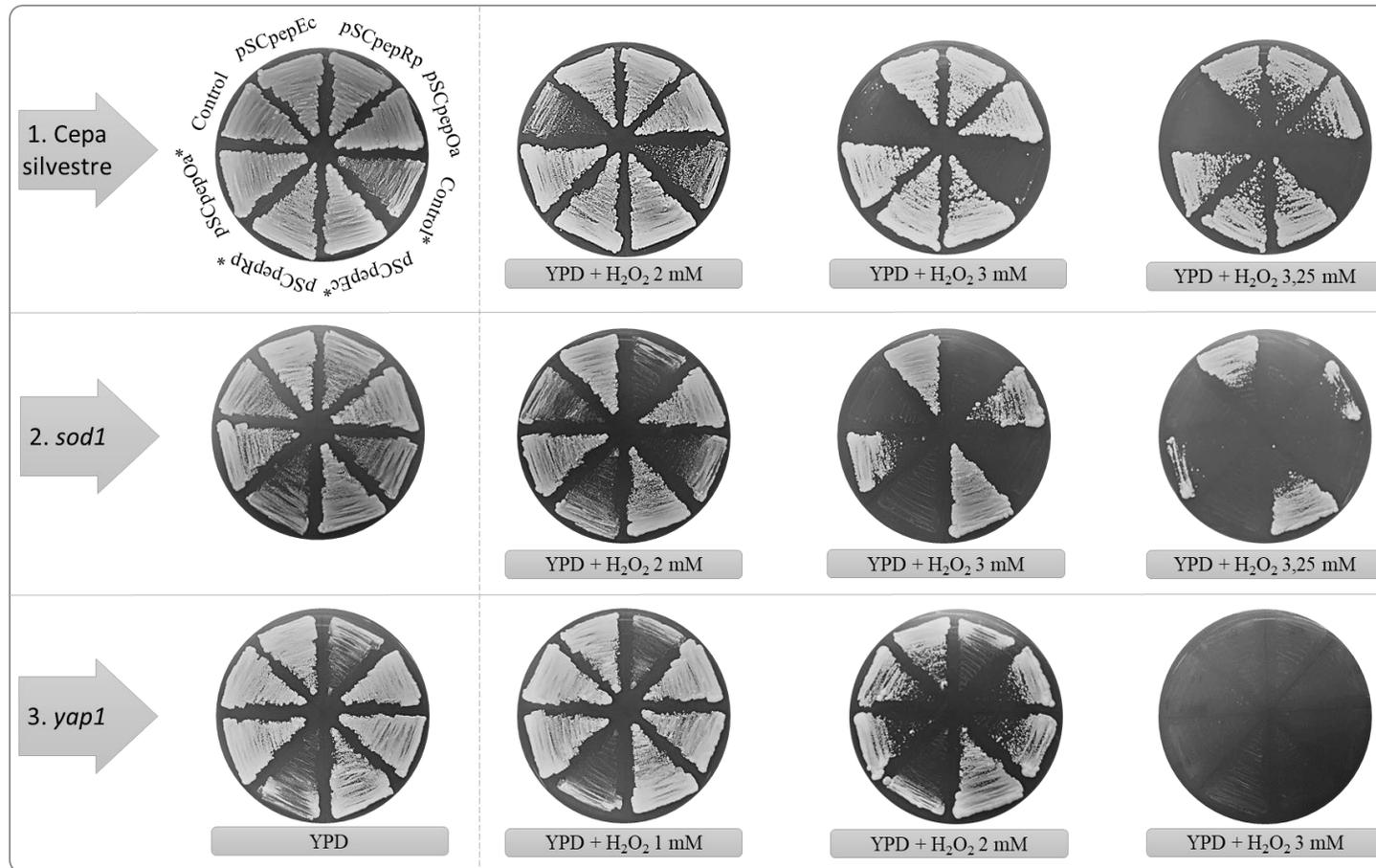


Figura 35. Ensayo de resistencia a peróxido de hidrógeno conferida por los plásmidos pSCpepEc, pSCpepRp y pSCpepOa presentes en los transformantes de la cepa silvestre, *sod1* y *yap1*.

La siembra por estriado de los transformantes de la cepa silvestre, *sod1* y *yap1* se realizó por duplicado (*). Se utilizó como control levadura transformada con plásmido pRS416-GPD vacío. La columna izquierda muestra el crecimiento de los transformantes en medio YPD; mientras que en la columna de la derecha se muestra el crecimiento de los transformantes en medio YPD dosificado con peróxido de hidrógeno a concentraciones de 2 mM, 3 mM y 3,25 mM para la cepa silvestre y *sod1*, y para *yap1* se usaron concentraciones de 1 mM, 2 mM y 3 mM.

En la imagen se puede apreciar que el efecto antioxidante de los plásmidos pSCpepEc, pSCpepRp, pSCpepOa para la cepa silvestre, se evidencia con un crecimiento de los transformantes cuando éstos son expuestos a peróxido de hidrógeno, la cual persiste conforme aumenta la concentración de este último en el medio. En contraste, los transformantes que contiene el plásmido pRS416-GPD vacío se ve afectado por la presencia del peróxido de hidrógeno desde una concentración de 2 mM, mientras que para la concentración de 3,25 mM su crecimiento es nulo.

Para el caso de los transformantes de *sodI*, los plásmidos pSCpepEc y pSCpepOa son los que confieren una mayor resistencia incluso a concentraciones de 3,25 mM de peróxido de hidrógeno. En contraste, los transformantes que contienen el plásmido pRS416-GPD vacío y pSCpepRp, se ven afectados por la presencia del peróxido de hidrógeno a una concentración de 2 mM, mientras que a una concentración de 3 y 3,25 mM su crecimiento es nulo. También se puede ver que la sensibilidad de *sodI* respecto a la cepa silvestre es mayor, puesto que, a la concentración de 3,25 mM de peróxido de hidrógeno, el crecimiento de *sodI* es menor que la cepa silvestre.

Por su parte, para los transformantes de *yapI*, el plásmido pSCpepEc es el único que confiere una resistencia a peróxido de hidrógeno ligeramente superior respecto a los otros plásmidos. Los transformantes que contienen los plásmidos pRS416-GPD vacío, pSCpepRp y pSCpepOa se ven afectados en presencia de peróxido de hidrógeno, con una diferencia mínima entre ellas. Es importante resaltar que el crecimiento de todos los transformantes de *yapI* se inhiben completamente a una concentración de peróxido de hidrógeno 3 mM, demostrando así una mayor sensibilidad respecto a *sodI* y la cepa silvestre.

Adicionalmente, para una mejor evaluación de la resistencia de los transformantes a peróxido de hidrógeno se realizó el ensayo de diluciones seriadas, donde se aprecia la misma correlación observada para el ensayo de siembra por estriado.

7.5. Confirmación de la resistencia a peróxido de hidrógeno

Después de evaluar la resistencia de los transformantes al peróxido de hidrógeno, se recuperaron los plásmidos y luego se amplificaron en *E. coli*. Posteriormente, se confirmó la presencia de los insertos (SCpepEc, SCpepRp y SCpepOa) en los plásmidos recuperados mediante amplificación por PCR. Para confirmar de la presencia de los insertos clonados, los plásmidos recuperados fueron usados como plantilla, mientras que el plásmido vacío fue usado como control negativo. La presencia del inserto se confirmó

mediante corrida electroforética en gel de agarosa al 1,2%, dando como resultado un producto de 228 pb para el control negativo, 279 pb para SCpepEc, 276 pb para SCpepRp y 297 pb para SCpepOa.

Para la confirmación de la resistencia a peróxido de hidrógeno otorgada por péptidos codificados en los plásmidos aislados y purificados, se procedió con la re-transformación de la cepa silvestre, *sod1* y *yap1* con los plásmidos previamente recuperados, pSCpepEc, pSCpepRp y pSCpepOa. A partir de los re-transformantes, se realizaron cultivos saturados en caldo –URA glucosa para ser utilizados en un ensayo de resistencia mediante diluciones seriadas. La resistencia a peróxido de hidrógeno se determinó mediante el crecimiento de los re-transformantes en medio YPD dosificado con peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones y fue evaluada a través de la comparación con un control de levadura transformada con el plásmido pRS416-GPD vacío. Así, para la cepa silvestre (Figura 36) se puede apreciar que los tres plásmidos pSCpepEc, pSCpepRp y pSCpepOa confieren resistencia.

La resistencia de los re-transformantes conferida por los plásmidos fue mayor para pSCpepEc y pSCpepRp a concentraciones de peróxido de hidrógeno de 2,5 y 3,0 mM; mientras que a una concentración superior (peróxido de hidrógeno 3,25 mM), los transformantes que contienen el plásmido pSCpepEc son los únicos que proliferan. Finalmente, el péptido pepOa expresado por el plásmido pSCpepOa, mostró un leve efecto antioxidante en comparación con el control, dicho efecto solo pudo observarse a una concentración de peróxido de hidrógeno de 2,5 mM.

Para el caso de *sod1* se observó que, los re-transformantes con los plásmidos pSCpepEc, pSCpepRp y pSCpepOa presentan una mejora en la proliferación comparado con el control (plásmido pRS416-GPD vacío) a partir de la segunda dilución para las concentraciones de peróxido de hidrógeno de 2 mM y 2,5 mM. Sin embargo, a una concentración de peróxido de hidrógeno de 3,0 mM se puede apreciar una diferencia de crecimiento más evidente a favor pSCpepRp respecto a los demás.

Respecto a *yap1*, se observó que el plásmido pSCpepRp es el único que confiere resistencia al peróxido de hidrógeno. Mientras que la proliferación para las células que contienen los plásmidos pSCpepEc y pSCpepOa es similar al control.

En adelante, los ensayos se basaron únicamente en los plásmidos pSCpepEc, pSCpepRpy pSCpepOa. Se confirmó la resistencia a peróxido de hidrógeno de los re-transformantes

de la cepa silvestre, *sod1* y *yap1*, que contienen plásmidos pSCpepEc, pSCpepRp y pSCpepOa. Y finalmente, se procedió a la evaluación de la capacidad antioxidante *in vitro* de los extractos de levadura.

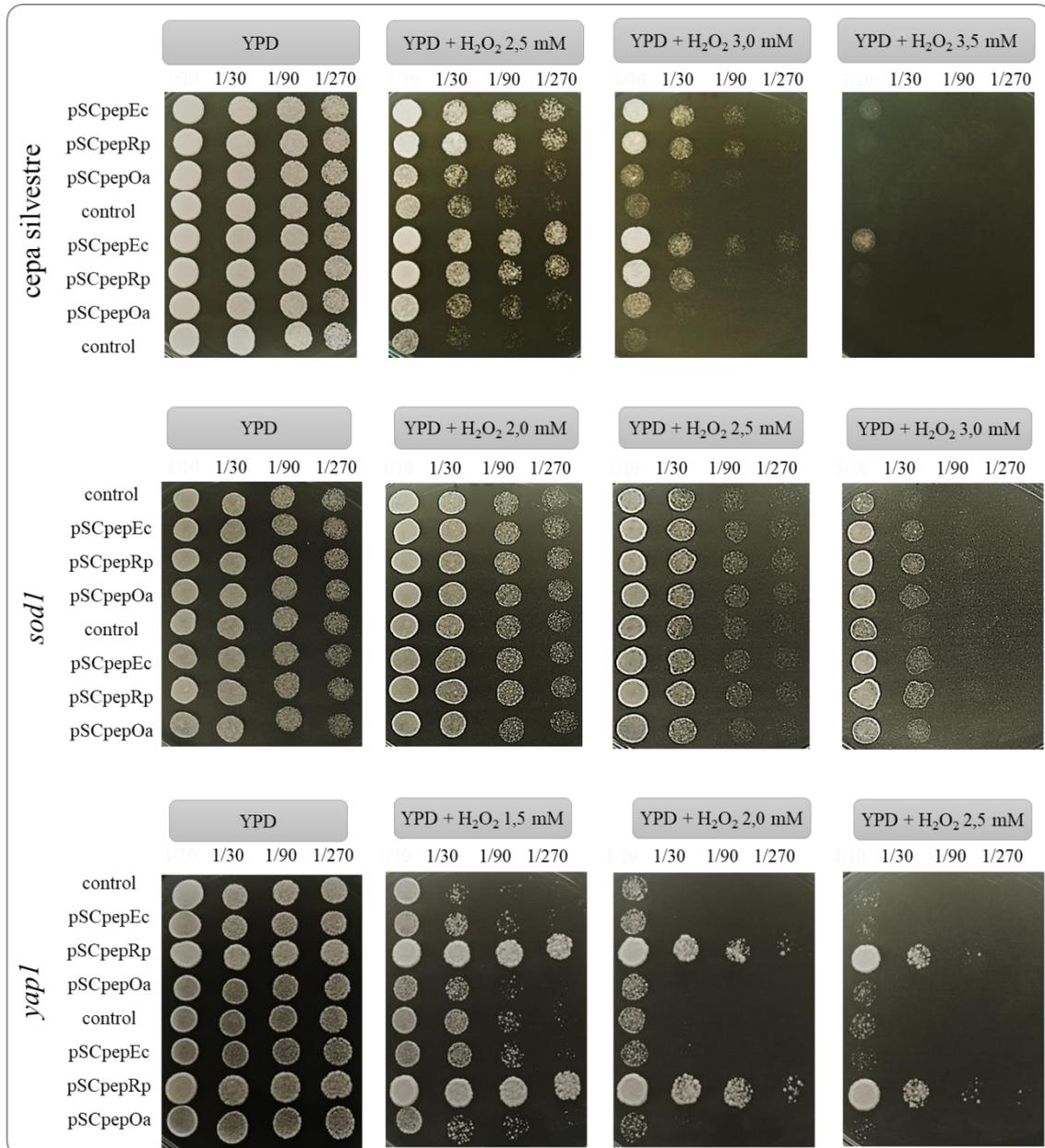


Figura 36. Ensayo de diluciones en serie para la verificación de resistencia a peróxido de hidrógeno conferida por los plásmidos pSCpepEc, pSCpepRp y pSCpepOa para la cepa silvestre, *sod1* y *yap1*.

El ensayo con células de la cepa silvestre se realizó en YPD, se utilizó como control levadura transformada con plásmido pRS416-GPD vacío. Cada muestra se sembró por duplicado, y las placas se incubaron a 30 °C durante 36 horas.

7.6. Determinación de la actividad antioxidante de los extractos de levadura mediante el ensayo ABTS

La cuantificación *in vitro* de la actividad antioxidante de los péptidos pepEc, pepRp y pepOa expresados por la levadura se realizó en los extractos de levadura obtenidas de los re-transformantes; se usaron solamente los re-transformantes de la cepa silvestre. Para la obtención del extracto de levadura se utilizó el protocolo descrito en la sección 6.9.1. Se construyó una curva de calibración con BSA (Figura 37), a partir de esta curva se cuantificó el contenido de proteínas en los extractos de levadura, los resultados de la cuantificación se muestran en la Tabla 12. Los valores del contenido de proteína en los extractos variaron entre 5,78 y 7,04 mg BSA/mL de extracto.

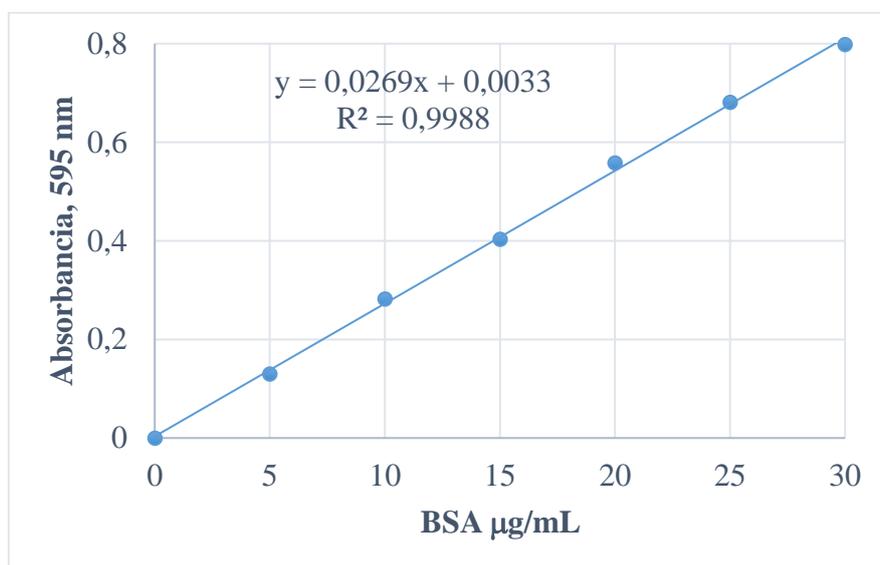


Figura 37. Curva de calibración para la cuantificación de proteínas totales mediante el método de Bradford.

La curva de calibración se realizó usando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar en un rango de concentraciones entre 0 y 30 µg/mL. Fuente: *Elaboración propia, 2023*.

Tabla 12: Contenido de proteínas en los extractos de levadura analizados

Extracto de levadura	Proteína total (mg/mL extracto)
Control (pRS416-GPD vacío)	7,04 ± 0,33
pSCpepEc	6,21 ± 0,10
pSCpepRp	5,78 ± 0,25
pSCpepOa	6,37 ± 0,25

La evaluación de la actividad antioxidante de los extractos se realizó mediante el método de ABTS. La Figura 38 muestra las curvas de capacidad antioxidante de los extractos de levadura los re-transformantes que contienen los plásmidos pSCpepEc, pSCpepRp y pSCpepOa. Entre los resultados mostrados, se puede apreciar que los péptidos de los extractos de levadura, provenientes de re-transformantes, muestran una mejora en la capacidad antioxidante a diferencia del control (extracto proveniente de re-transformantes con el plásmido pRS416-GPD vacío).

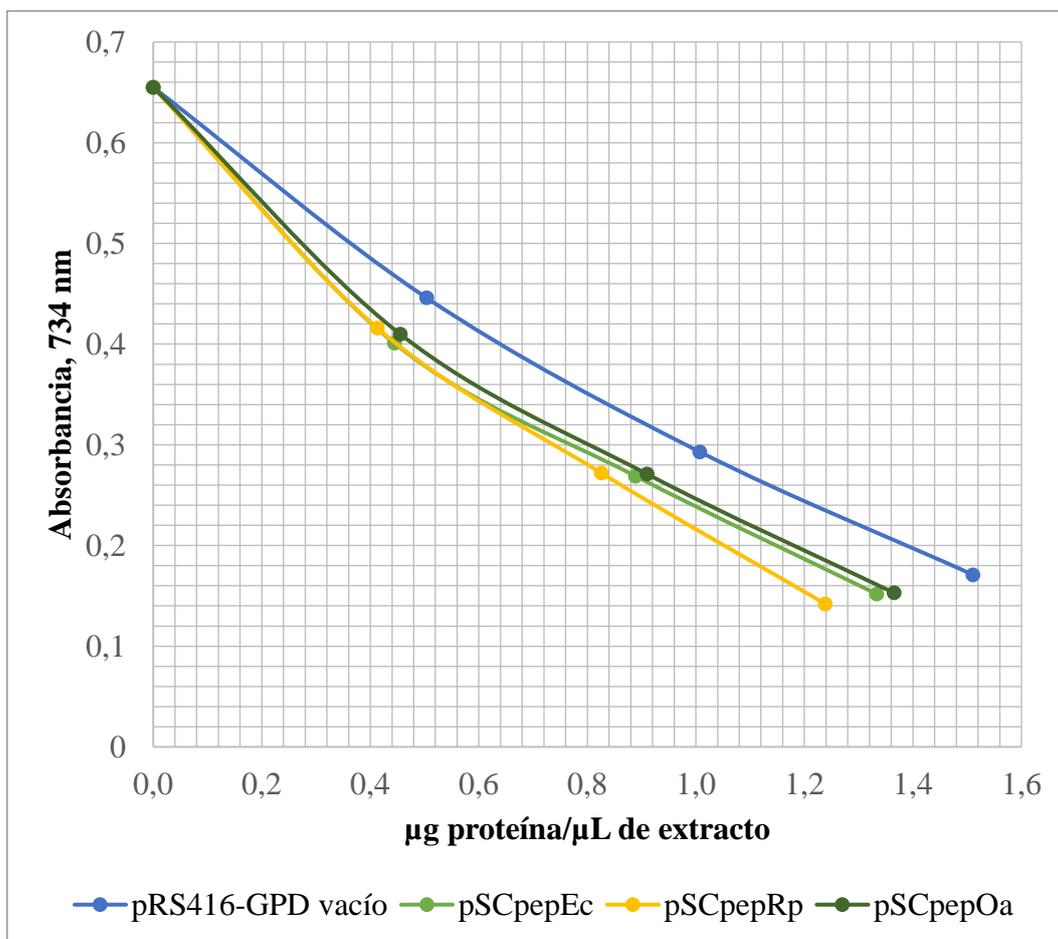


Figura 38. Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos de levadura re-transformados con los plásmidos pSCpepEc, pSCpepRp y pSCpepOa.

Fuente: Elaboración propia, 2023.

Adicionalmente, la capacidad antioxidante de los extractos de levadura se expresó en términos de concentración inhibitoria media máxima (IC₅₀), definida como la concentración de antioxidantes necesarias para reducir la absorbancia de la solución control en un 50%. Con el cálculo de este valor se pudo comparar el potencial antioxidante de los extractos provenientes de los re-transformantes con el control. Estos valores se muestran en la Tabla 13, en la que se observa que el valor de IC₅₀ para los

extractos de los re-transformantes es inferior al del control (IC₅₀ de 0,96 µg/µL). Este último valor indica que para reducir la absorbancia de una solución del radical ABTS en un 50% se requiere una concentración de extracto de levadura control de 0,96 µg/µL. Con base en esta suposición, podemos concluir que valores de IC₅₀ menores a 0,96 µg/µL, implicarán una mejor capacidad antioxidante; por lo tanto, se puede afirmar que los extractos de levadura tienen una mejor capacidad antioxidante que el control. De manera similar, se usó como estándar al ácido ascórbico, el cual alcanzó un valor de IC₅₀ de 0,19 µg/µL. Los valores obtenidos confirmaron que la síntesis de los péptidos, codificados por los plásmidos pSCpepEc, pSCpepRp y pSCpepOa, confiere propiedades antioxidantes a los re-transformantes tras su exposición a peróxido de hidrógeno.

Tabla 13: Valores de IC₅₀ calculados para los extractos de levadura de los re-transformantes.

Extracto de levadura	IC ₅₀ (µg/µL)
Control (pRS416-GPD vacío)	0,96
pSCpepEc	0,78
pSCpepRp	0,73
pSCpepOa	0,81

7.7. Efecto antioxidante de péptidos que confieren resistencia a peróxido de hidrógeno en *S. cerevisiae*

A partir de la secuenciación de los plásmidos de referencia se pudo corroborar la secuencia nucleotídica de los insertos SCpepEc, SCpepRp y SCpepOa. Esto demuestra que la técnica de clonación *in vivo* para la construcción de plásmidos tiene un gran potencial. De manera similar, se comprobó las secuencias de aminoácidos de los péptidos pepEc, pepRp y pepOa, que corresponden a los diseñados inicialmente como se puede apreciar en la Tabla 9. Los péptidos demostraron tener un potencial antioxidante, dicho efecto se evidenció en la resistencia de los re-transformantes de la cepa silvestre, *sod1* y *yap1* a peróxido de hidrógeno. La propiedad antioxidante de los péptidos está asociada con la composición de aminoácidos (Hsu et al. 2009). El péptido pepEc es abundante (dos a más aminoácidos) en Ser, Thr, Leu, Gly y Arg, mientras que pepRp es abundante en Leu, Thr, Tyr; y pepOa es abundante en Gly, Leu, Ser y Lys, de los cuales Leu es el único aminoácido hidrofóbico para los tres casos. Generalmente se considera que los péptidos compuestos por Trp, Met, His, Lys, Cys, Arg y Tyr poseen actividad antioxidante (Xu

et al. 2017, Tejpal et al. 2017, Matsui et al. 2018), debido a que las cadenas laterales de estos aminoácidos se oxidan con gran facilidad (Matsui et al. 2018). Además, se ha demostrado que los péptidos de bajo peso molecular tienen importantes propiedades antioxidantes (Wang et al. 2018).

Por lo tanto, el análisis correlativo de la presencia de aminoácidos con carácter antioxidante en los péptidos estudiados sugiere que: pepRp tiene un mejor potencial antioxidante, seguido de pepOa y finalmente pepEc, debido a que contienen 5, 4 y 3 aminoácidos con carácter antioxidante (de los siete aminoácidos con potencial antioxidante reportados) respectivamente. Sin embargo, al analizar los efectos antioxidantes de pepEc, pepRp y pepOa en los ensayos *in vivo* usados, podemos apreciar que el potencial o efecto antioxidante en las cepas estudiadas varía de la siguiente manera:

- Cepa silvestre: pepEc \geq pepRp \gg pepOa
- *sod1*: pepRp $>$ pepEc \geq pepOa
- *yap1*: pepRp \ggg pepEc / pepOa

Donde:

- \geq : Efecto antioxidante mayor o igual que
- $>$: Efecto antioxidante mayor que
- \gg : Efecto antioxidante moderadamente mayor que
- \ggg : Efecto antioxidante mucho mayor que

El potencial antioxidante *in vivo* mostrado para los tres péptidos antioxidantes (pepEc, pepRp y pepOa) son correlativos con resultados obtenidos mediante ensayos *in vitro* reportados por Agrawal et al. (2019), Yang et al. (2009) y Yang et al. (2016) respectivamente. Dichos autores, reportan que los péptidos poseen una gran capacidad antioxidante (demostrada mediante los métodos DPPH, ABTS) y capacidad reductora de hierro (III), debido a la presencia de aminoácidos aromáticos e hidrófobos en sus secuencias y a sus bajos pesos moleculares (Yang et al. 2009, 2016, Agrawal et al. 2019, Tadesse y Emire 2020).

Después de un análisis comparativo entre el potencial antioxidante de los péptidos pepEc, pepRp y pepOa, mediante la composición de aminoácidos con carácter antioxidante y los ensayos *in vivo*, se observa cierta correlación. En los tres sistemas de estudiados, cepa silvestre, *sod1* y *yap1*, el péptido pepRp presentó un buen efecto antioxidante, seguido de pepEc y pepOa (para la cepa silvestre y *sod1*). Sin embargo, para *yap1* los péptidos pepEc y pepRp no presentaron efecto antioxidante, este hecho podría estar relacionado al mecanismo de acción de los péptidos en *yap1*.

El mecanismo de acción y/o respuesta la levadura expuesta a estrés oxidativo constante, está estrechamente relacionada a la presencia de moléculas antioxidantes, entre ellas resalta el glutatión reducido (GSH), el cual está directamente involucrada en la protección contra las ERO. Por ejemplo, en condiciones de estrés, el GSH se utiliza para eliminar las ERO a través de la donación de un equivalente reductor ($H^+ + e^-$) de su grupo tiol de la cisteína a otras especies reactivas de oxígeno inestables (Han y Park 2009); otro antioxidante similar es la rivo flavina que también tiene la capacidad de eliminar los radicales libres por sí misma. Asimismo, se conoce la importancia de la rivo flavina como precursora de las coenzimas mononucleótido de flavina (FMN) y dinucleótido de flavina adenina (FAD), las cuales participan en diversas reacciones de oxidación y reducción en las células (Burgess et al. 2009). Además, la glutatión reductasa requiere FAD como cofactor junto con NADPH para la reducción del glutatión oxidado a GSH. En consecuencia, podemos inferir que la acción sinérgica y controlada entre ambos antioxidantes es en extremo imprescindible, frente a una situación de estrés (Kavitha y Chandra 2014).

La respuesta celular frente a peróxido de hidrógeno es dependiente del sistema *in vivo* en estudio, por ejemplo, en *Schizosaccharomyces pombe* se demostró que el tratamiento con peróxido de hidrógeno promueve un incremento significativo de la actividad de la catalasa en comparación a la superóxido dismutasa (Lee et al. 1995). De manera similar, en una investigación reportada por Flattery-O'Brien y colaboradores, demostraron que el tratamiento de *Saccharomyces cerevisiae* con peróxido de hidrógeno incrementó la actividad de la catalasa, mientras que un exceso de superóxido, aumentó la actividad de la superóxido dismutasa predominantemente (Flattery-O'Brien et al. 1993).

En este sentido, las levaduras tienden a establecer un mecanismo de defensa enzimático, sin embargo, dicho mecanismo (equilibrio) puede sucumbir cuando las levaduras se encuentran en un escenario de estrés oxidativo constante. Por consiguiente, la presencia de moléculas antioxidantes exógenas, como los péptidos estudiados, especialmente aquellos que contienen aminoácidos aromáticos e hidrófobos en sus secuencias son necesarios para contrarrestar el efecto dañino de los radicales libres en los diferentes niveles.

VIII. CONCLUSIONES

1. Los extractos acuosos de las siete plantas silvestres recolectadas en el cerro Ccamarrara en Cusco-Perú, fueron analizados por sus capacidades antioxidantes, utilizando métodos tanto *in vivo* como *in vitro*. Estos demostraron que los extractos acuosos de plantas silvestres de los Andes del Perú representan una buena fuente de antioxidantes.
2. El ensayo *in vivo* se basó en el mutante de levadura *sod1*, que permitió distinguir entre los efectos antioxidantes extracelulares de los intracelulares. El método *in vitro* (ensayo de DPPH) demostró un alto contenido de antioxidantes en las hojas secas de todas las plantas analizadas, con valores AAEC (capacidad antioxidante equivalente de ácido ascórbico) que van desde 32,6 a 117,2 $\mu\text{gAA}/\text{mg}$ materia seca.
3. Se construyeron los plásmidos que permitieron la síntesis de los péptidos pepEc, pepRp y pepOa con potencial antioxidante en la levadura. La cepa silvestre, *sod1* y *yap1* permitieron evaluar el efecto antioxidante de estos péptidos mediante ensayos de crecimiento en un medio dosificado con peróxido de hidrógeno.
4. La clonación *in vivo* permitió la construcción de la biblioteca de plásmidos aleatorios en *S. cerevisiae*, demostrando que la levadura es una herramienta atractiva que podrá posteriormente ser empleada para la generación de bibliotecas de plásmidos aleatorios y la identificación de péptidos antioxidantes.

IX. RECOMENDACIONES

1. Continuar con la identificación de los metabolitos secundarios de las siete plantas, para la generación de información básica para futuras investigaciones aplicadas.
2. Aislar e identificar los componentes de los extractos acuosos para conocer y entender la naturaleza y estructura de los componentes responsables de su actividad antioxidante.
3. Aplicar la biblioteca de plásmidos aleatorios en la búsqueda e identificación de péptidos antioxidantes, siguiendo la estrategia planteada para la evaluación de los péptidos pepEc, pepRp y pepOa.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrawal, H; Joshi, R; Gupta, M. 2019. Purification, identification and characterization of two novel antioxidant peptides from finger millet (*Eleusine coracana*) protein hydrolysate. Food Research International 120:697-707.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.11.028>
- Akbarian, M; Khani, A; Eghbalpour, S; Uversky, VN. 2022. Bioactive Peptides: Synthesis, Sources, Applications, and Proposed Mechanisms of Action. International Journal of Molecular Sciences 2022, Vol. 23, Page 1445 23(3):1445.
DOI: <https://doi.org/10.3390/IJMS23031445>
- Alvarez, MA. 2019. Puna: A Surrealistic Landscape in the Argentinean Highlands. Pharmacological Properties of Native Plants from Argentina:137-166. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-20198-2_6
- Balamurugan, M; Santharaman, P; Madasamy, T; Rajesh, S; Sethy, NK; Bhargava, K; Kotamraju, S; Karunakaran, C. 2018. Recent trends in electrochemical biosensors of superoxide dismutases. Biosensors and Bioelectronics 116:89-99. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.05.040>
- Behlil, F; Samiullah; Khan, N; Akbar, A; Tareen, RB; Achakazai, AKK; Ali, I; Attiq-Ur-Rehman. 2019. Phytochemical screening and antioxidant activity determination of some medicinally important plants of Balochistan. Pakistan Journal of Botany 51(2):601-608. DOI: [https://doi.org/10.30848/PJB2019-2\(14\)](https://doi.org/10.30848/PJB2019-2(14))
- Blois, MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 181(4617):1199-1200.
- Boisnard, S; Lagniel, G; Garmendia-Torres, C; Molin, M; Boy-Marcotte, E; Jacquet, M; Toledano, MB; Labarre, J; Chédin, S. 2009. H₂O₂ activates the nuclear localization of Msn2 and Maf1 through thioredoxins in *Saccharomyces cerevisiae*. Eukaryotic Cell 8(9):1429-1438. DOI: <https://doi.org/10.1128/EC.00106-09>
- Boskou, D; Tsimidou, M; Blekas, G. 2006. Polar Phenolic Compounds. Olive Oil: Chemistry and Technology: Second Edition :73-92.
DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-1-893997-88-2.50009-2>
- Bossi, O; Gartsbein, M; Leitges, M; Kuroki, T; Grossman, S; Tennenbaum, T. 2008. UV irradiation increases ROS production via PKC δ signaling in primary murine fibroblasts. Journal of Cellular Biochemistry 105(1):194-207.
DOI: <https://doi.org/10.1002/jcb.21817>

- Bougioukou, JD; Kille, S; Taglieber, A; Reetz, M. 2009. Directed Evolution of an Enantioselective Enoate-Reductase: Testing the Utility of Iterative Saturation Mutagenesis. *Advanced Synthesis & Catalysis* 351(18):3287-3305. DOI: <https://doi.org/10.1002/ADSC.200900644>
- Brewer, MS. 2011. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 10(4):221-247. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00156.x>
- Burgess, CM; Smid, EJ; van Sinderen, D. 2009. Bacterial vitamin B2, B11 and B12 overproduction: An overview. *s.l., s.e., vol.133. p. 1-7.*
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.012>
- Campanella, L; Favero, G; Persi, L; Tomassetti, M. 2000. New biosensor for superoxide radical used to evidence molecules of biomedical and pharmaceutical interest having radical scavenging properties. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 23(1):69-76.
- Chavez, GP. 2018. Construcción de una biblioteca de plásmidos para la producción de oligopéptidos de variadas secuencias en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. (Tesis de pregrado). *s.l., Universidad Nacional Agraria La Molina.*
- Chew, YL; Lim, YY; Omar, M; Khoo, KS. 2008. Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. *LWT - Food Science and Technology* 41(6):1067-1072. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.06.013>
- Chirinos, R; Pedreschi, R; Rogez, H; Larondelle, Y; Campos, D. 2013. Phenolic compound contents and antioxidant activity in plants with nutritional and/or medicinal properties from the Peruvian Andean region. *Industrial Crops and Products* 47:145-152. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2013.02.025>
- CONIDA. (2018). Reporte Semanal del 05 al 11 de marzo del 2018. Lima . Perú, s.e.
- Cristina, E; Eleutherio, A; Stfhany, R; Magalhães, S; De Araújo Brasil, A; Raphael, J; Neto, M; De, L; Paranhos, H. 2021. SOD1, more than just an antioxidant. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 697:108701.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108701>
- Cruces, E; Flores-Molina, MR; Díaz, MJ; Huovinen, P; Gómez, I. 2018. Phenolics as photoprotective mechanism against combined action of UV radiation and temperature in the red alga *Gracilaria chilensis*? *Journal of Applied Phycology* 30(2):1247-1257.

- Deliconstantinos, G; Villiotou, V; Stavrides, JC. 1996. Alterations of nitric oxide synthase and xanthine oxidase activities of human keratinocytes by ultraviolet B radiation: Potential role for peroxynitrite in skin inflammation. *Biochemical Pharmacology* 51(12):1727-1738.
DOI: [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(96\)00110-4](https://doi.org/10.1016/0006-2952(96)00110-4)
- Demo, A; Petrakis, C; Kefalas, P; Boskou, D. 1998. Nutrient antioxidants in some herbs and Mediterranean plant leaves. *Food Research International* 31(5):351-354. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(98\)00086-6](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(98)00086-6)
- Dudonné, S; Vitrac, X; Coutière, P; Woillez, M; Mérillon, J-M. 2009. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(5):1768-1774.
DOI: <https://doi.org/10.1021/jf803011r>
- Dunaway, S; Odin, R; Zhou, L; Ji, L; Zhang, Y; Kadekaro, AL. 2018. Natural antioxidants: Multiple mechanisms to protect skin from solar radiation. *Frontiers in Pharmacology* 9:1-14.
- Dymond, JS. 2013. Preparation of genomic DNA from *Saccharomyces cerevisiae*. In Lorsch, J (ed.). s.l., Academic Press, vol.529. p. 153-160.
- Eleutherio, ECA; Silva Magalhães, RS; de Araújo Brasil, A; Monteiro Neto, JR; de Holanda Paranhos, L. 2021. SOD1, more than just an antioxidant. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 697:108701.
DOI: <https://doi.org/10.1016/J.ABB.2020.108701>
- Eruygur, N; Koçyiğit, UM; Taslimi, P; Ataş, M; Tekin, M; Gülçin, İ. 2019. Screening the in vitro antioxidant, antimicrobial, anticholinesterase, antidiabetic activities of endemic *Achillea cucullata* (Asteraceae) ethanol extract. *South African Journal of Botany* 120:141-145. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2018.04.001>
- Di Fabio, A; Bruni, A; Poli, F; Garbarino, JA; Chamy, MC; Piovano, M; Nicoletti, M. 1995. The distribution of phenylpropanoid glycosides in *Chilean calceolaria* Spp. *Biochemical Systematics and Ecology* 23(2):179-182.
DOI: [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(94\)00088-X](https://doi.org/10.1016/0305-1978(94)00088-X)
- Flattery-O'Brien, J; Collinson, LP; Dawes, IW. 1993. *Saccharomyces cerevisiae* has an inducible response to menadione which differs from that to hydrogen peroxide. *Journal of General Microbiology* 139(3):501-507.
DOI: <https://doi.org/10.1099/00221287-139-3-501>

- Folch-Mallol, JL; Garay-Arroyo, A; Lledías, F; Robles, AAC. 2004. La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Revista Latinoamericana de Microbiología 46(1-2):24-46. Consultado 28 dic. 2022.
- Frery, A; Keçeli, MA; Ökmen, B; Şiğva, HÖ; Yemenicioğlu, A; Doğanlar, S. 2008. Water-soluble Antioxidant Potential of Turkish Pepper Cultivars. HortScience 43(3):631-636. DOI: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.43.3.631>
- Fukai, T; Ushio-Fukai, M. 2011. Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. Antioxidants & Redox Signaling 15(6):1583-1606.
- Gddoa Al-sahlany, ST; Altemimi, AB; Abd Al-Manhel, AJ; Niamah, AK; Lakhssassi, N; Ibrahim, SA. 2020. Purification of Bioactive Peptide with Antimicrobial Properties Produced by *Saccharomyces cerevisiae*. Foods 9(3). DOI: <https://doi.org/10.3390/foods9030324>
- Gddoa Al-sahlany, ST; Altemimi, AB; Abd Al-Manhel, AJ; Niamah, AK; Lakhssassi, N; Ibrahim, SA. 2020. Purification of Bioactive Peptide with Antimicrobial Properties Produced by *Saccharomyces cerevisiae*. Foods 9(3). DOI: <https://doi.org/10.3390/foods9030324>
- Goffeau, A; Barrell, G; Bussey, H; Davis, RW; Dujon, B; Feldmann, H; Galibert, F; Hoheisel, JD; Jacq, C; Johnston, M; Louis, EJ; Mewes, HW; Murakami, Y; Philippsen, P; Tettelin, H; Oliver, SG. 1996. Life with 6000 genes. Science 274(5287):546-567. DOI: <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.274.5287.546>
- González, AG; Fraga, BM; Hernandez, MG; García, VP. 1982. Eupatarone, A 2-acetylbenzofuran from *Eupatorium sternbergianum*. Phytochemistry 21(7):1826-1827. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(82\)85083-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(82)85083-8)
- Green, MR; Sambrook, J. 2012. Green 2012.pdf. s.l., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Gueldener, U; Heinisch, J; Koehler, GJ; Voss, D; Hegemann, JH. 2002. A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. Nucleic acids research 30(6):23. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/30.6.e23>
- Güldener, U; Heck, S; Fiedler, T; Beinhauer, J; Hegemann, JH. 1996. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. Nucleic Acids Research 24(13):2519-2524. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/24.13.2519>
- Gupta, DK; Palma, JM; Corpas, FJ. 2018. Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants. Germany, Springer. 306 p.

- Han, YH; Park, WH. 2009. The effects of N-acetyl cysteine, buthionine sulfoximine, diethyldithiocarbamate or 3-amino-1,2,4-triazole on antimycin A-treated Calu-6 lung cells in relation to cell growth, reactive oxygen species and glutathione. *Oncology Reports* 22(2):385-391. DOI: https://doi.org/10.3892/or_00000449
- He, D; Jin, R; Li, H; Liu, Q; Zhang, Z. 2018. Identification of a Novel Anticancer Oligopeptide from *Perilla frutescens* (L.) Britt. and Its Enhanced Anticancer Effect by Targeted Nanoparticles In Vitro. *International Journal of Polymer Science* 2018:1-8.
- Hsu, KC; Lu, GH; Jao, CL. 2009. Antioxidative properties of peptides prepared from tuna cooking juice hydrolysates with orientase (*Bacillus subtilis*). *Food Research International* 42(5-6):647-652.
DOI: <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2009.02.014>
- INEI. (2018). Estadísticas Ambientales. Lima. Perú, s.e.
- De Jager, TL; Cockrell, AE; Du Plessis, SS. 2017. Ultraviolet light induced generation of reactive oxygen species. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 996:15-23. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-56017-5_2
- Kanlayavattanakul, M; Lourith, N; Rai, C; Rai, C; Lourith, N. 2018. Plants and Natural Products for the Treatment of Skin Hyperpigmentation – A Review Active Ingredients for Skin Hyperpigmentation Treatment. *Planta Médica*.
- Kavitha, S; Chandra, TS. 2014. Oxidative Stress Protection and Glutathione Metabolism in Response to Hydrogen Peroxide and Menadione in Riboflavinogenic Fungus *Ashbya gossypii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 174(6):2307-2325. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1188-4>
- Khlebnikov, AI; Schepetkin, IA; Domina, NG; Kirpotina, LN; Quinn, MT. 2007. Improved quantitative structure-activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 15(4):1749-1770.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.11.037>
- Kille, S; Acevedo-Rocha, CG; Parra, LP; Zhang, ZG; Opperman, DJ; Reetz, MT; Acevedo, JP. 2013. Reducing codon redundancy and screening effort of combinatorial protein libraries created by saturation mutagenesis. *ACS Synthetic Biology* 2(2):83-92. DOI: <https://doi.org/10.1021/sb300037w>

- Kim, SY; Je, JY; Kim, SK. 2007. Purification and characterization of antioxidant peptide from hoki (*Johnius belengerii*) frame protein by gastrointestinal digestion. The Journal of Nutritional Biochemistry 18(1):31-38.
DOI: <https://doi.org/10.1016/J.JNUTBIO.2006.02.006>
- Kong, H; Chandel, NS. 2020. Reactive oxygen species and cancer. s.l., Elsevier Inc. 619-637 p. DOI: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818606-0.00030-4>
- Kostyuk, V; Potapovich, A; Albuhaydar, AR; Mayer, W; De Luca, C; Korkina, L. 2017. Natural substances for prevention of skin photoaging: screening systems in the development of sunscreen and rejuvenation cosmetics. Rejuvenation Research:1-34. DOI: 10.1089/rej.2017.1931
- Kumar, PP; Kumaravel, S; Lalitha, C. 2010. Screening of antioxidant activity, total phenolics and GC-MS study of *Vitex negundo*. African Journal of Biochemistry Research 4(7):191-195.
- Lee, J; Dawes, IW; Roe, JH. 1995. Adaptive response of *Schizosaccharomyces pombe* to hydrogen peroxide and menadione. Microbiology 141(12):3127-3132. DOI: <https://doi.org/10.1099/13500872-141-12-3127>
- Li, M; Borodina, I. 2015. Application of synthetic biology for production of chemicals in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Research 15(1). DOI: <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12213>
- Lim, YY; Murtijaya, J. 2007. Antioxidant properties of *Phyllanthus amarus* extracts as affected by different drying methods. LWT - Food Science and Technology 40(9):1664-1669. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.12.013>
- De Lima Cherubim, DJ; Buzanello Martins, CV; Oliveira Fariña, L; da Silva de Lucca, RA. 2020. Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications. Journal of Cosmetic Dermatology 19(1):33-37.
DOI: <https://doi.org/10.1111/JOCD.13093>
- Lin, KH; Shih, MC; Wang, P; Yu, YP; Lu, CP. 2018. Effect of different ethanolic concentrations on antioxidant properties and cytoprotective activities of *Platostoma palustre* Blume. Natural Product Research 32(24):2959-2963. DOI: <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1392952>
- Liu, L; Sun, Y; Laura, T; Liang, X; Ye, H; Zeng, X. 2009. Determination of polyphenolic content and antioxidant activity of kudingcha made from *Ilex kudingcha* C.J. Tseng (en línea). Food Chemistry 112(1):35-41.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.038>

- Liu, R; Enstrom, AM; Lam, KS. 2003. Combinatorial peptide library methods for immunobiology research. *Experimental Hematology* 31(1):11-30. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(02\)01008-1](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(02)01008-1)
- Lozano, LA; Rodriguez, AL; Ccoyllo, OS. (2016). Pronóstico con cobertura nacional del índice de radiación solar ultravioleta. s.l., s.e.
- Manganaris, GA; Goulas, V; Vicente, AR; Terry, LA. 2014. Berry antioxidants: small fruits providing large benefits. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94(5):825-833.
- Marschall, R; Tudzynski, P. 2016. Reactive oxygen species in development and infection processes. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 57:138-146. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2016.03.020>
- Martillanes, S; Rocha-Pimienta, J; Cabrera-Bañegil, M; Martín-Vertedor, D; Delgado-Adámez, J. 2017. Application of Phenolic Compounds for Food Preservation: Food Additive and Active Packaging. *Phenolic Compounds - Biological Activity*. DOI: <https://doi.org/10.5772/66885>
- Martins, D; English, AM. 2014. SOD1 oxidation and formation of soluble aggregates in yeast: Relevance to sporadic ALS development. *Redox Biology* 2(1):632-639. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2014.03.005>
- Matsui, R; Honda, R; Kanome, M; Hagiwara, A; Matsuda, Y; Togitani, T; Ikemoto, N; Terashima, M. 2018. Designing antioxidant peptides based on the antioxidant properties of the amino acid side-chains. *Food Chemistry* 245:750-755. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.11.119>
- Mumberg, D; Müller, R; Gene, MF-; 1995, undefined. 1995. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Elsevier* 156:119-122.
- Nitha, B; De, S; Adhikari, SK; Devasagayam, TPA; Janardhanan, KK. 2010. Pharmaceutical Biology Evaluation of free radical scavenging activity of morel mushroom, *Morchella esculenta* mycelia: A potential source of therapeutically useful antioxidants. DOI: <https://doi.org/10.3109/13880200903170789>
- Olson, KR. 2020. Reactive oxygen species or reactive sulfur species: Why we should consider the latter. *Journal of Experimental Biology* 223(4). DOI: <https://doi.org/10.1242/jeb.196352>
- Olugbami, JO; Gbadegesin, MA; Odunola, OA. 2015. In vitro free radical scavenging and antioxidant properties of ethanol extract of *Terminalia glaucescens*.

Pharmacognosy research 7(1):49-56. DOI: <https://doi.org/10.4103/0974-8490.147200>

- Oualcadi, Y; Sebban, MF; Berrekhis, F. 2020. Improvement of microwave-assisted Soxhlet extraction of bioactive compounds applied to pomegranate peels. *Journal of Food Processing and Preservation* (November 2019):1-12. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfpp.14409>
- Pereira Nunes, X; Souza Silva, F; Guedes da S. Almeida, JR; Tolentino de Lima, J; de Araújo Ribeiro, LA; Quintans Júnior, LJ; Barbosa Filho, JM. 2012. Biological Oxidations and Antioxidant Activity of Natural Products. *In Venketeshwer, R (ed.)*. s.l., InTech. p. 20.
- Picazo, C; Molin, M. 2021. Impact of Hydrogen Peroxide on Protein Synthesis in Yeast. *Antioxidants* 2021, Vol. 10, Page 952 10(6):952. DOI: <https://doi.org/10.3390/ANTIOX10060952>.
- Ramawat, KG. 2019. *An Introduction to Biodiversity and Chemotaxonomy*. s.l., s.e. p. 1-14. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-30746-2_1
- Rastogi, S; Pandey, MM; Rawat, AKS. 2018. Ethnopharmacological uses, phytochemistry and pharmacology of genus *Adiantum*: A comprehensive review. *Journal of Ethnopharmacology* 215:101-119. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2017.12.034>
- Rodrigues-Pousada, C; Devaux, F; Caetano, SM; Pimentel, C; da Silva, S; Cordeiro, AC; Amaral, C. 2019. Yeast AP-1 like transcription factors (Yap) and stress response: a current overview. *Microbial Cell* 6(6):267. DOI: <https://doi.org/10.15698/MIC2019.06.679>
- Rodríguez-García, CM; Ruiz-Ruiz, JC; Peraza-Echeverría, L; Peraza-Sánchez, SR; Torres-Tapia, LW; Pérez-Brito, D; Tapia-Tussell, R; Herrera-Chalé, FG; Segura-Campos, MR; Quijano-Ramayo, A; Ramón-Sierra, JM; Ortiz-Vázquez, E. 2019. Antioxidant, antihypertensive, anti-hyperglycemic, and antimicrobial activity of aqueous extracts from twelve native plants of the Yucatan coast. *PLOS ONE* 14(3):e0213493. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213493>
- Rønsted, N; Göbel, E; Franzyk, H; Jensen, SR; Olsen, CE. 2000. Chemotaxonomy of *Plantago*. Iridoid glucosides and caffeoyl phenylethanoid glycosides. *Phytochemistry* 55(4):337-348. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00306-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00306-X)

- Roohinejad, S; Nikmaram, N; Brahim, M; Koubaa, M; Khelfa, A; Greiner, R. 2017. Potential of Novel Technologies for Aqueous Extraction of Plant Bioactives. s.l., Elsevier. p. 399-419 DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809380-1.00016-4>
- Rowe, LA; Degtyareva, N; Doetsch, PW. 2008. DNA damage-induced reactive oxygen species (ROS) stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radical Biology and Medicine* 45(8):1167-1177. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.07.018>
- Sabir, SM; Athayde, ML; Boligon, AA; Rocha, JBT. 2017. Antioxidant activities and phenolic profile of *Baccharis trimera*, a commonly used medicinal plant from Brazil. *South African Journal of Botany* 113:318-323. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2017.09.010>
- Sánchez-Rangel, JC; Benavides, J; Heredia, JB; Cisneros-Zevallos, L; Jacobo-Velázquez, DA. 2013. The Folin-Ciocalteu assay revisited: Improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods* 5(21):5990-5999. DOI: <https://doi.org/10.1039/C3AY41125G>
- Sannasimuthu, A; Kumaresan, V; Anilkumar, S; Pasupuleti, M; Ganesh, MR; Mala, K; Paray, BA; Al-Sadoon, MK; Albeshr, MF; Arockiaraj, J. 2019. Design and characterization of a novel *Arthrospira platensis* glutathione oxido-reductase-derived antioxidant peptide GM15 and its potent anti-cancer activity via caspase-9 mediated apoptosis in oral cancer cells. *Free Radical Biology and Medicine* 135:198-209. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2019.03.006>
- Santos-Sánchez, NF; Salas-Coronado, R; Villanueva-Cañongo, C; Hernández-Carlos, B. 2019. Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism. s.l., IntechOpen. DOI: <https://doi.org/10.5772/intechopen.85270>
- Shafi, S; Ansari, HR; Bahitham, W; Aouabdi, S. 2019. The Impact of Natural Antioxidants on the Regenerative Potential of Vascular Cells. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 6:9. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcvm.2019.00028>
- Shahidi, F; Zhong, Y. 2008. Bioactive peptides. *Journal of AOAC International* 91(4):914-931.
- Shahidi, F; Zhong, Y. 2015. Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods* 18:757-781.
- Sheih, IC; Wu, TK; Fang, TJ. 2009. Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems. *Bioresource Technology* 100(13):3419-3425.

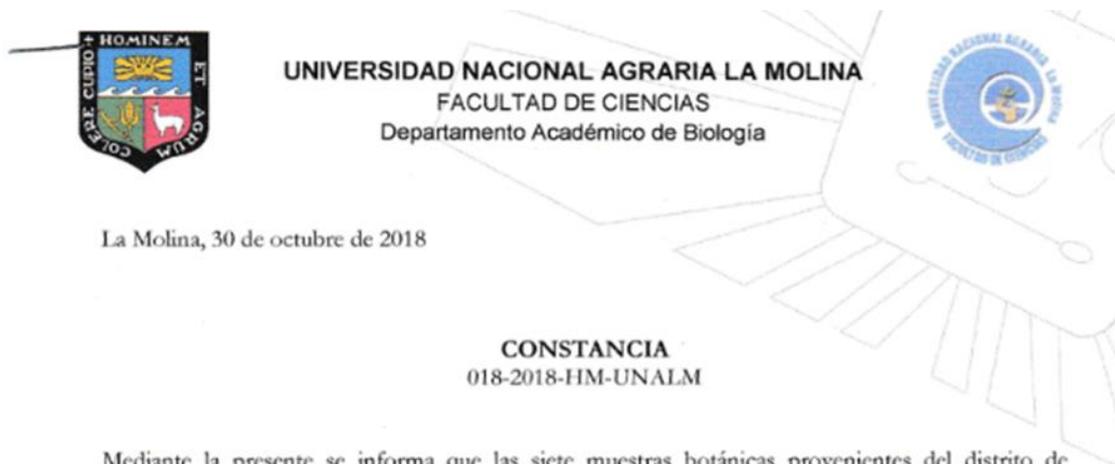
- Shimamura, T; Sumikura, Y; Yamazaki, T; Tada, A; Kashiwagi, T; Ishikawa, H; Matsui, T; Sugimoto, N; Akiyama, H; Ukeda, H. 2014. Applicability of the DPPH assay for evaluating the antioxidant capacity of food additives - inter-laboratory evaluation study. *Analytical Sciences* 30(7):717-721.
DOI: <https://doi.org/10.2116/analsci.30.717>
- Shu, P; Liang, H; Zhang, J; Lin, Y; Chen, W; Zhang, D. 2023. Reactive oxygen species formation and its effect on CD4+ T cell-mediated inflammation. *Frontiers in Immunology* 14:1199233.
DOI: <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2023.1199233/BIBTEX>
- Sideri, TC; Stojanovski, K; Tuite, MF; Grant, CM. 2010. Ribosome-associated peroxiredoxins suppress oxidative stress-induced de novo formation of the [PSI+] prion in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(14):6394-6399.
- Sieber, T; Hare, E; Hofmann, H; Trepel, M. 2015. Biomathematical Description of Synthetic Peptide Libraries. *PLOS ONE* 10(6):e0129200. DOI: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0129200>
- Sies, H; Jones, DP. 2020. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2020 21:7 21(7):363-383. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>
- Surh, YJ. 2002. Anti-tumor promoting potential of selected spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities: a short review. *Food and Chemical Toxicology* 40(8):1091-1097. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00037-6](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00037-6)
- Święciło, A; Rybczyńska-Tkaczyk, K; Najda, A; Krzepińko, A; Prażak, R; Zawiślak, G. 2018. Application of growth tests employing a Δ sod1 mutant of *Saccharomyces cerevisiae* to study the antioxidant activity of berry fruit extracts. *LWT - Food Science and Technology* 94:96-102
- Tadesse, SA; Emire, SA. 2020. Production and processing of antioxidant bioactive peptides: A driving force for the functional food market. *Heliyon* 6(8). DOI: <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2020.E04765>
- Tejpal, CS; Vijayagopal, P; Elavarasan, K; Linga Prabu, D; Lekshmi, RGK; Asha, KK; Anandan, R; Chatterjee, NS; Mathew, S. 2017. Antioxidant, functional properties and amino acid composition of pepsin-derived protein hydrolysates from whole

- tilapia waste as influenced by pre-processing ice storage. *Journal of Food Science and Technology* 54(13):4257. DOI: <https://doi.org/10.1007/S13197-017-2897-9>
- Terpinč, P; Čeh, B; Ulrih, NP; Abramovič, H. 2012. Studies of the correlation between antioxidant properties and the total phenolic content of different oil cake extracts. *Industrial Crops and Products* 39(1):210-217.
DOI: <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2012.02.023>.
- Thomas, BJ; Rothstein, R. 1989. Elevated Recombination Rates in Transcriptionally Active DNA. *Cell* 56:619-630.
- Toledano, MB; Delaunay, A; Biteau, B; Spector, D; Azevedo, D. 2003. Oxidative stress responses in yeast. s.l., Springer, Berlin, Heidelberg. p. 241-303 DOI: https://doi.org/10.1007/3-540-45611-2_6
- Tsang, CK wan; Liu, Y; Thomas, J; Zhang, Y; Zheng, XFS. 2014. Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance. *Nature communications* 5:3446. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms4446>
- Uddin, MK; Juraimi, AS; Hossain, MS; Nahar, MAU; Ali, ME; Rahman, MM. 2014. Purslane weed (*Portulaca oleracea*): A prospective plant source of nutrition, omega-3 fatty acid, and antioxidant attributes. *The Scientific World Journal* 2014. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/951019>
- Valentine, JS; Doucette, PA; Zittin Potter, S. 2005. Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis. *Annual Review of Biochemistry* 74(1):563-593. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161647>.
- Wang, L; Sun, J; Ding, S; Qi, B. 2018. Isolation and identification of novel antioxidant and antimicrobial oligopeptides from enzymatically hydrolyzed anchovy fish meal. *Process Biochemistry* 74:148-155.
DOI: <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2018.08.021>
- Weissman, J; Guthrie, C; Fink, G. 2010. Guide to yeast genetics: functional genomics, proteomics, and other systems analysis.
- Xiao, F; Xu, T; Lu, B; Liu, R. 2020. Guidelines for antioxidant assays for food components. *Food Frontiers* 1(1):60-69. DOI: <https://doi.org/10.1002/FFT2.10>
- Xu, J; Su, X; Burley, SK; Zheng, XFS. 2022. Nuclear SOD1 in Growth Control, Oxidative Stress Response, Amyotrophic Lateral Sclerosis, and Cancer. *Antioxidants* 2022, Vol. 11, Page 427 11(2):427.
DOI: <https://doi.org/10.3390/ANTIOX11020427>.

- Xu, N; Chen, G; Liu, H. 2017. Antioxidative Categorization of Twenty Amino Acids Based on Experimental Evaluation. *Molecules: A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry* 22(12).
DOI: <https://doi.org/10.3390/MOLECULES22122066>.
- Yang, H; Wang, X; Liu, X; Wu, J; Liu, C; Gong, W; Zhao, Z; Hong, J; Lin, D; Wang, Y; Lai, R. 2009. Antioxidant peptidomics reveals novel skin antioxidant system. *Molecular and Cellular Proteomics* 8(3):571-583.
DOI: <https://doi.org/10.1074/mcp.M800297-MCP200>.
- Yang, X; Wang, Y; Zhang, Y; Lee, WH; Zhang, Y. 2016. Rich diversity and potency of skin antioxidant peptides revealed a novel molecular basis for high-altitude adaptation of amphibians. *Scientific Reports* 6:1-11.
DOI: <https://doi.org/10.1038/srep19866>.
- Yang, XR; Qiu, YT; Zhao, YQ; Chi, CF; Wang, B. 2019. Purification and Characterization of Antioxidant Peptides Derived from Protein Hydrolysate of the Marine Bivalve Mollusk *Tergillarca granosa*. *Marine Drugs* 2019, Vol. 17, Page 251 17(5):251. DOI: <https://doi.org/10.3390/MD17050251>
- Yu, H; Yang, G; Sato, M; Yamaguchi, T; Nakano, T; Xi, Y. 2017. Antioxidant activities of aqueous extract from *Stevia rebaudiana* stem waste to inhibit fish oil oxidation and identification of its phenolic compounds. *Food Chemistry* 232:379-386. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.04.004>
- Zhang, M; Zhang, C; Li, J; Hanna, M; Zhang, X; Dai, H; Xiao, W. 2011. Inactivation of YAP1 enhances sensitivity of the yeast RNR3-lacZ genotoxicity testing system to a broad range of DNA-damaging agents. *Toxicological Sciences* 120(2):310-321.
DOI: <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq391>
- Ziech, D; Franco, R; Pappa, A; Panayiotidis, MI. 2011. Reactive Oxygen Species (ROS) - Induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 711(1-2):167-173. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.02.015>
- Zyracka, E; Zadrąg, R; Koziół, S; Krzepińko, A; Bartosz, G; Biliński, T. 2005. Yeast as a biosensor for antioxidants: Simple growth tests employing a *Saccharomyces cerevisiae* mutant defective in superoxide dismutase. *Acta Biochimica Polonica* 52(3):679-684.

XI. ANEXOS

ANEXO 1. Análisis taxonómico de las especies vegetales colectadas en el cerro Ccamarrara.



La Molina, 30 de octubre de 2018

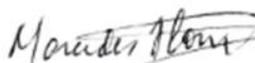
CONSTANCIA
018-2018-HM-UNALM

Mediante la presente se informa que las siete muestras botánicas provenientes del distrito de Andahuaylillas (departamento del Cusco, provincia de Quispicanchis), remitidas por el Sr. Miki Gonzales Uscamayta, estudiante del programa de Doctorado en Ciencias e Ingeniería Biológicas y asesorado por la Dra. Ana Kitazono Sugahara con el proyecto de investigación «Identificación y Estudio de Compuestos Antioxidantes y Fotoprotectores en Extractos de Plantas Usando una Cepa de Levadura como Biosensor», han sido estudiadas en el Herbario del Departamento de Biología de la Universidad Nacional Agraria La Molina (MOL) para su determinación taxonómica. El examen y reconocimiento de los caracteres morfológicos de orden cualitativo y cuantitativo en tales especímenes permiten concluir que corresponden a las siguientes especies:

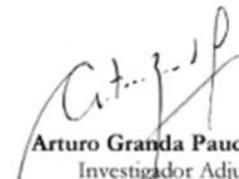
MUESTRA	ESPECIE	FAMILIA
1	<i>Plantago australis</i> Lam.	Plantaginaceae
2	<i>Baccharis latifolia</i> (Ruiz & Pav.) Pers.	Asteraceae
3	<i>Ageratina sternbergiana</i> (DC.) R. M. King & H. Rob.	Asteraceae
4	<i>Stevia macbridei</i> B. L. Rob.	Asteraceae
5	<i>Ageratina cuzcoensis</i> (Hieron.) R. M. King & H. Rob.	Asteraceae
6	<i>Calceolaria myriophylla</i> Kraenzl.	Calceolariaceae
7	<i>Adiantum orbignyianum</i> Kuhn	Pteridaceae

La clasificación taxonómica de las especies según el sistema APG IV (Angiosperm Phylogeny Group, 2016) se adjunta en hojas aparte.

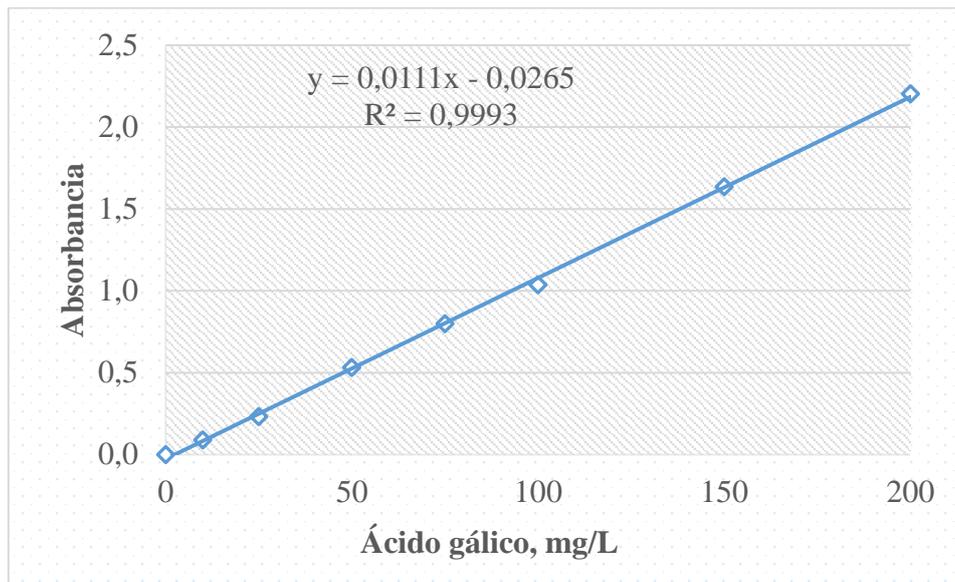
Atentamente,


Mercedes Flores Pimentel
Jefe
Herbario del Dpto. de Biología (MOL)
Facultad de Ciencias
Universidad Nacional Agraria La Molina



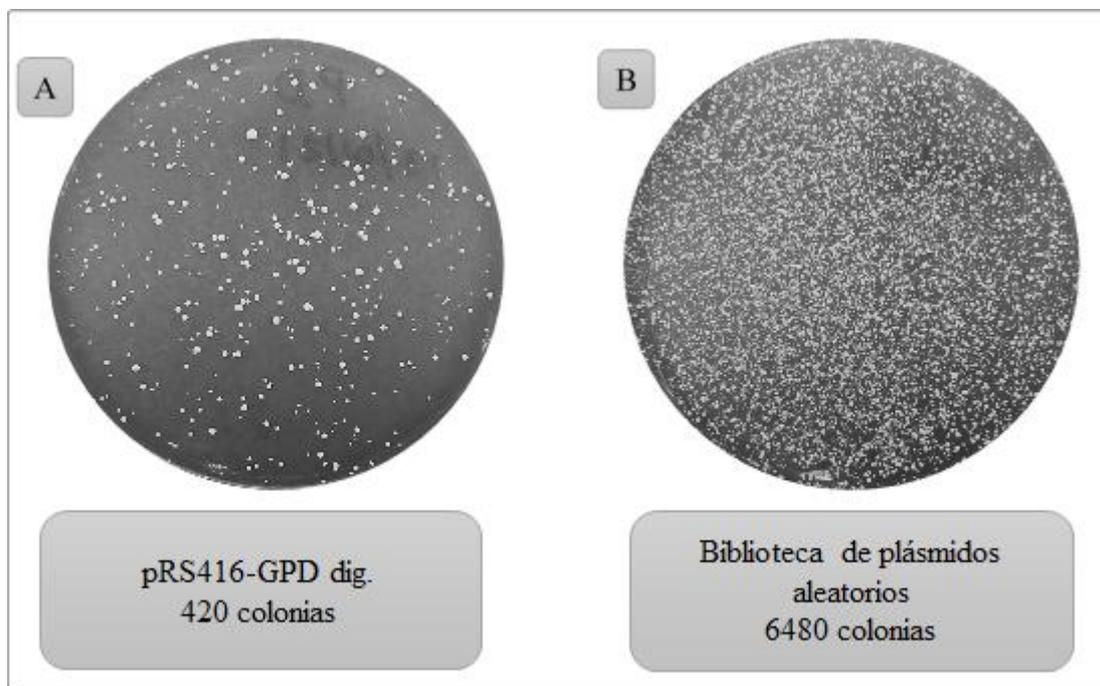

Arturo Granda Paucar
Investigador Adjunto
Herbario del Dpto. de Biología (MOL)
Facultad de Ciencias
Universidad Nacional Agraria La Molina

ANEXO 2. Curva de calibración para la cuantificación de fenoles totales



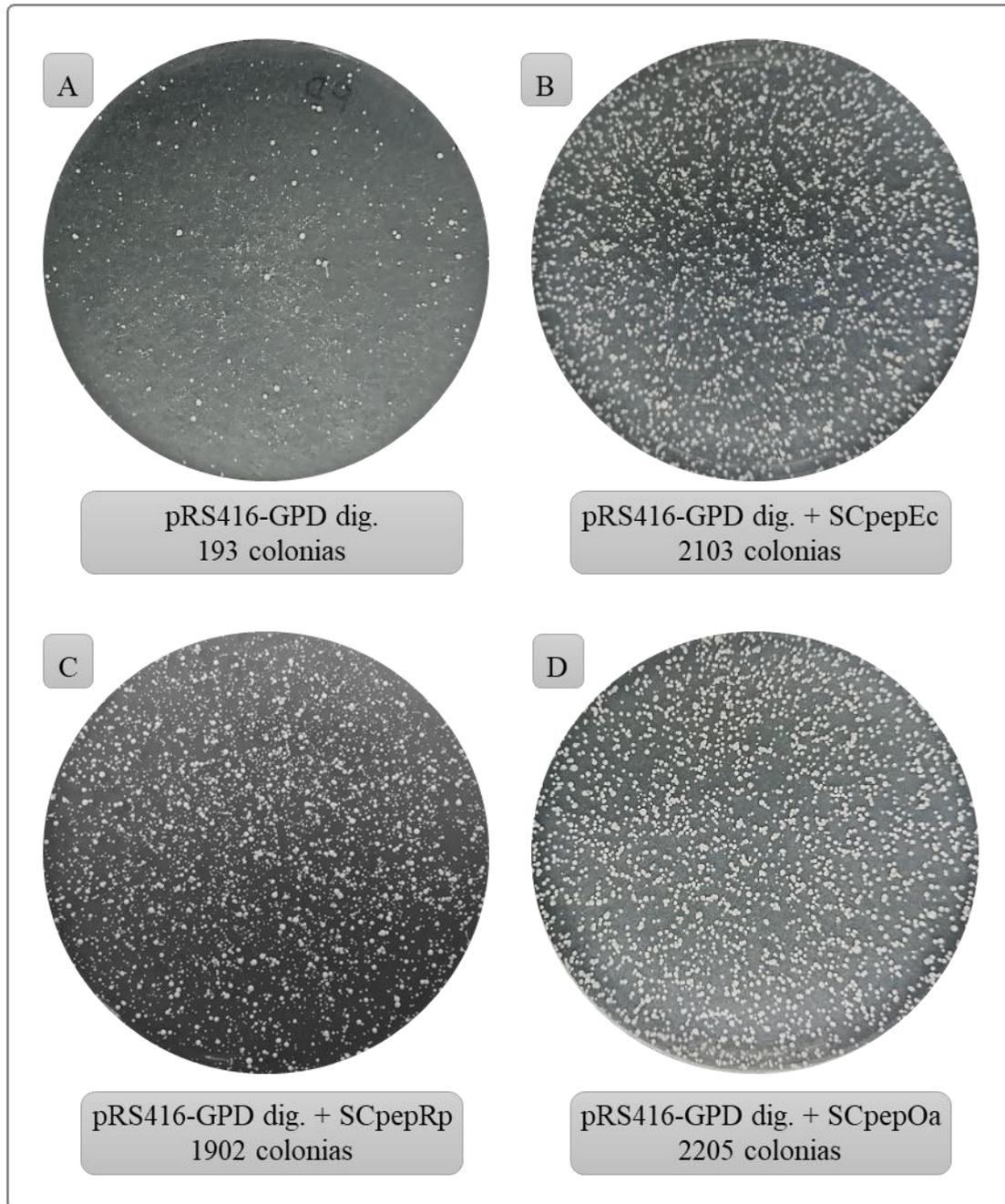
Se construyó la curva de calibración usando como estándar el ácido gálico a concentraciones entre 0 y 200 mg/L. A partir de esta curva se cuantificó el contenido de fenoles totales en los extractos acuosos.

ANEXO 3. Transformación de células *sodI* para la construcción de la biblioteca de plásmidos mediante clonación *in vivo*.



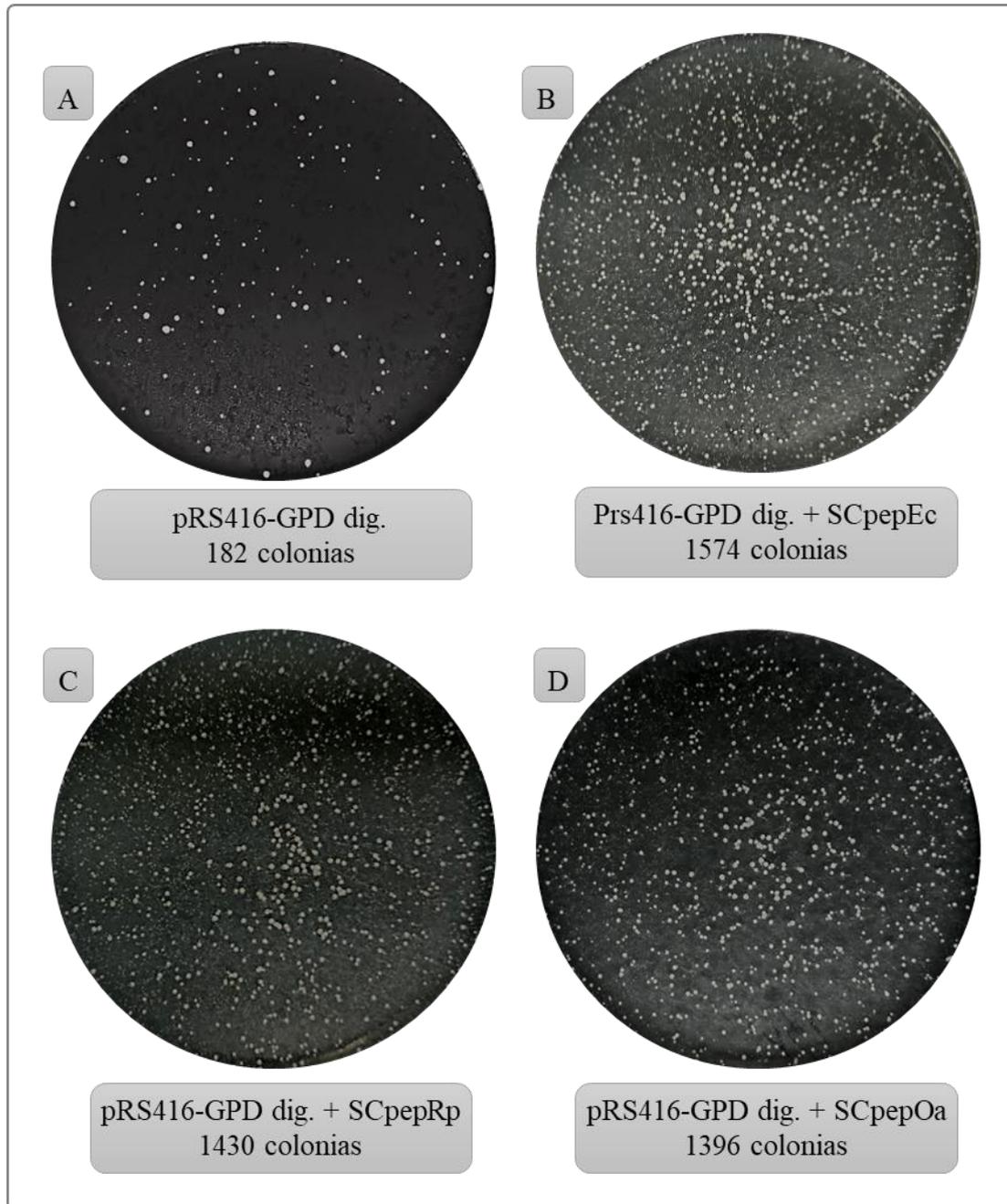
En la imagen se muestran las colonias transformantes en medio -URA glucosa. Se transformaron células de *sodI* solo con el plásmido pRS416-GPD linealizado (A), o el plásmido pRS416-GPD linealizado con los insertos aleatorios (B).

ANEXO 4. Transformantes de la cepa silvestre obtenidos para la clonación de las secuencias codificantes para los péptidos SCpepEc, SCpepRp y SCpepOa.



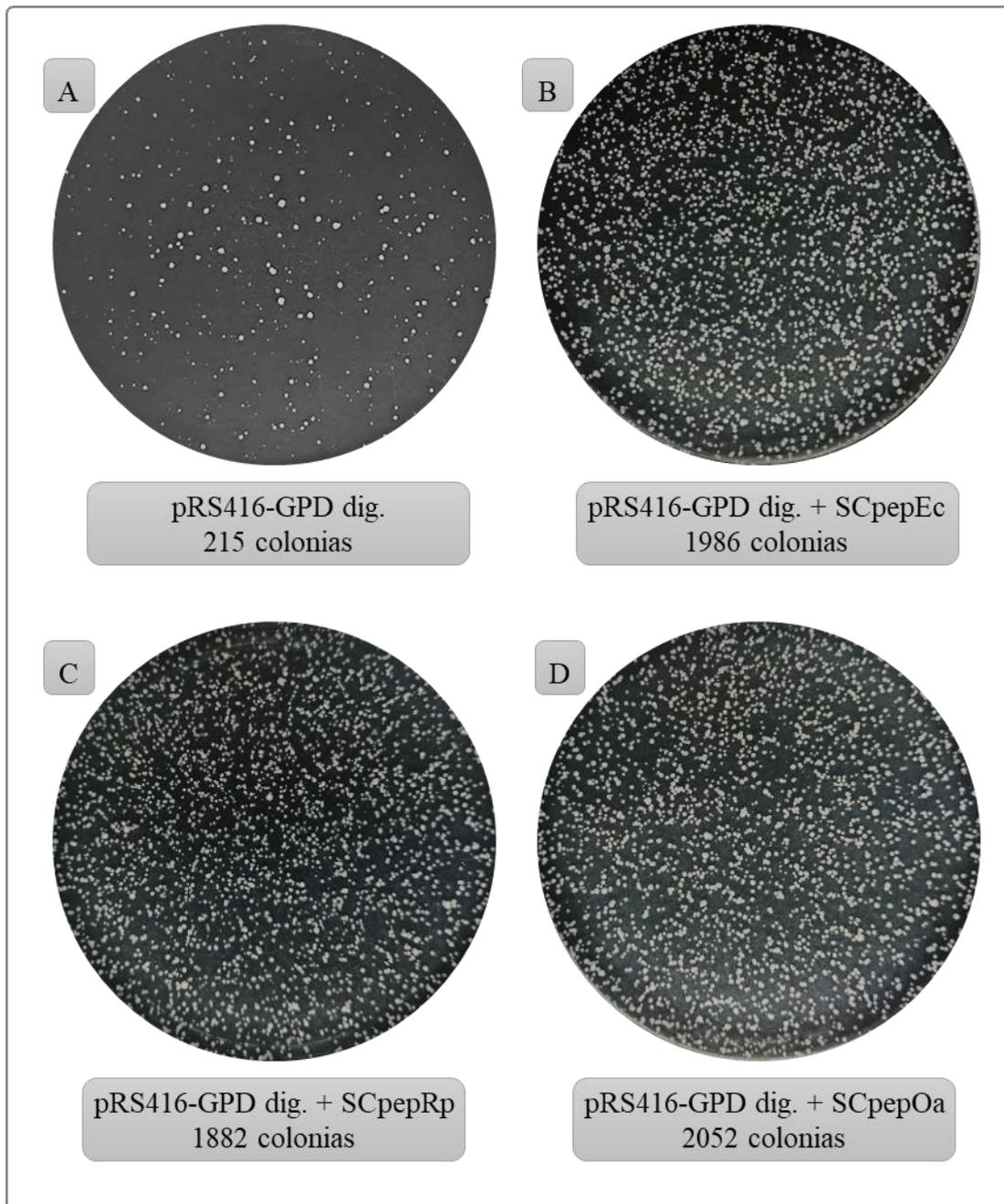
En la imagen se muestran las células transformadas de la cepa silvestre con: solo con el plásmido pRS416-GPD linealizado (A), y por otra parte el plásmido pRS416-GPD linealizado con los insertos SCpepEc (B), SCpepRp (C) y SCpepOa (D). Todos fueron sembrados en medio -URA glucosa, para el plásmido linealizado (A) se sembró toda la suspensión, mientras que para los restantes solo la mitad.

ANEXO 5. Transformantes de la cepa *sod1* obtenidos para la clonación de las secuencias codificantes para los péptidos SCpepEc, SCpepRp y SCpepOa.



Se transformó células de *sod1* con: solo el plásmido pRS416-GPD linealizado (A), y por otra parte el plásmido pRS416-GPD linealizado con los insertos SCpepEc (B), SCpepRp (C) y SCpepOa (D). Todos fueron sembrados en medio -URA glucosa, para el plásmido linealizado (A) se sembró toda la suspensión, mientras que para los restantes solo la mitad.

ANEXO 6. Transformantes de la cepa *yap1* obtenidos para la clonación de las secuencias codificantes para los péptidos SCpepEc, SCpepRp y SCpepOa.



En la imagen se muestra, la transformación de células de *yap1* con: solo el plásmido pRS416-GPD linealizado (A), y por otra parte el plásmido pRS416-GPD linealizado con los insertos SCpepEc (B), SCpepRp (C) y SCpepOa (D). Todos fueron sembrados en medio -URA glucosa, para el plásmido linealizado (A) se sembró toda la suspensión, mientras que para los restantes solo la mitad.