

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN NUTRICIÓN**



**“BÚSQUEDA DE VARIANTES DE FERRITINA CON  
ELEVADA CAPACIDAD DE ACUMULACIÓN DE HIERRO  
EN LA LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae*”**

**Presentada por:**

**LUIS GABRIEL GUTIÉRREZ MESÍAS**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO  
MAGISTER SCIENTIAE EN NUTRICIÓN**

**Lima - Perú**

**2023**

## Document Information

|                          |  |
|--------------------------|--|
| <b>Analyzed document</b> | Tesis Maestria LUIS GUTIERREZ 01nov2022.pdf (D148478202) |
| <b>Submitted</b>         | 2022-11-02 23:33:00                                      |
| <b>Submitted by</b>      | Ana Akemi Kitazono Sugahara                              |
| <b>Submitter email</b>   | anakitazono@lamolina.edu.pe                              |
| <b>Similarity</b>        | 1%   |
| <b>Analysis address</b>  | anakitazono.unalm@analysis.arkund.com                    |

## Sources included in the report

|          |  |   |
|----------|--|---|
| <b>W</b> | URL: <a href="http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&amp;pid=S1409-14292005000100003&amp;lng=en&amp;nrm=iso&amp;tlng=es">http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&amp;pid=S1409-14292005000100003&amp;lng=en&amp;nrm=iso&amp;tlng=es</a><br>Fetched: 2022-11-02 23:33:00 |  3  |
| <b>W</b> | URL: <a href="https://solgenomics.net/data/cosii/pcr_seq_052005/1g24360F209-1g24360F.pdf">https://solgenomics.net/data/cosii/pcr_seq_052005/1g24360F209-1g24360F.pdf</a><br>Fetched: 2021-06-22 15:54:33   |  2 |

## Entire Document

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA ESCUELA DE POSGRADO MAESTRÍA EN NUTRICIÓN "BÚSQUEDA DE VARIANTES DE FERRITINA CON ELEVADA CAPACIDAD DE ACUMULACIÓN DE HIERRO EN LA LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae*" Presentado por: LUIS GABRIEL GUTIÉRREZ MESÍAS TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO MAGÍSTER SCIENTIAE EN NUTRICIÓN Lima – Perú 2022

2 DEDICATORIA A Dios, por mantener mi corazón lleno de amor, paz y perseverancia para mantenerme firme ante mis objetivos. A mi esposa Jesarella, por ser mi soporte y brindarme tu apoyo incondicional, sobre todo emocional. A mi hijo Lucas, por ser una luz de alegría en mi familia, y mantener alto mi fuente de motivación e inspiración. A mis padres Pedro y Juana, por forjarme con valores y brindarme su amor incondicional.

3 AGRADECIMIENTO A Fondecyt que financió mi tesis por medio del proyecto CONTRATO N° 188-2018- FONDECYT-BM-IADT-AV "Aplicación de estrategias biotecnológicas para la obtención de levaduras con alto contenido de hierro para la prevención y el tratamiento de la anemia". A la Dra. Ana Kitazono por permitirme formar parte del proyecto y de su grupo de investigación desde sus inicios. Por transferirme conocimientos, motivación y sobretodo consciencia a las oportunidades que nos brindan para realizar investigación. A mi esposa, por el gran apoyo emocional y sobre todo espiritual que me ha mantenido firme a nuestros objetivos. A mis padres y hermanos, por el apoyo fraternal que siempre me brindan y por los muchos momentos de alegría que pasamos en familia. A mis amigos del laboratorio Miki, Mario, Joshelin, Sandy, Alondra, Pamela y Renato por el apoyo en los ensayos. Y, por último, a la técnica de laboratorio Bélgica Pérez por su ayuda y gran consideración que tiene hacia mí.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN NUTRICIÓN**

**“BÚSQUEDA DE VARIANTES DE FERRITINA CON  
ELEVADA CAPACIDAD DE ACUMULACIÓN DE HIERRO  
EN LA LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae*”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO  
MAGISTER SCIENTIAE**

**Presentada por:**

**LUIS GABRIEL GUTIÉRREZ MESÍAS**

**Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:**

Ph.D. Víctor Guevara Carrasco  
**PRESIDENTE**

Dra.

Ana Kitazono Sugahara  
**ASESOR**

Ph.D. Carlos Gómez Bravo  
**MIEMBRO**

Ph.D. Gretty Villena Chávez  
**MIEMBRO**

Dra. Maria Elena Villanueva Espinoza  
**CO-ASESOR**

## **DEDICATORIA**

**A Dios, por mantener mi corazón  
lleno de amor, paz y  
perseverancia para mantenerme  
firme ante mis objetivos.**

**A mi esposa Jesarella, por ser mi  
soporte y brindarme tu apoyo  
incondicional, sobre todo  
emocional.**

**A mi hijo Lucas, por ser una luz  
de alegría en mi familia, y  
mantener alto mi fuente de  
motivación e inspiración.**

**A mis padres Pedro y Juana, por  
forjarme con valores y  
brindarme su amor  
incondicional.**

## **AGRADECIMIENTO**

A Fondecyt que financió mi tesis por medio del proyecto CONTRATO N° 188-2018-FONDECYT-BM-IADT-AV "Aplicación de estrategias biotecnológicas para la obtención de levaduras con alto contenido de hierro para la prevención y el tratamiento de la anemia".

A la Dra. Ana Kitazono por permitirme formar parte del proyecto y de su grupo de investigación desde sus inicios. Por transferirme conocimientos, motivación y sobretodo consciencia a las oportunidades que nos brindan para realizar investigación.

A mi co-asesora Dra. María Elena Villanueva, a mi jurado calificador el presidente Victor Guevara, Gretty Villena y Carlos Gómez por el tiempo dedicado a evaluar mi tesis y mejorarlo con sus comentarios.

A mi esposa, por el gran apoyo emocional y sobre todo espiritual que me ha mantenido firme a nuestros objetivos.

A mis padres y hermanos, por el apoyo fraternal que siempre me brindan y por los muchos momentos de alegría que pasamos en familia.

A mis amigos del laboratorio Miki, Mario, Joshelin, Sandy, Alondra, Pamela y Renato por el apoyo en los ensayos. Y, por último, a la técnica de laboratorio Bélgica Pérez por su ayuda y gran consideración que tiene hacia mí.

## ÍNDICE GENERAL

|        |  |    |
|--------|--|----|
| I.     | INTRODUCCIÓN .....   | 1  |
| II.    | REVISIÓN DE LITERATURA.....                                      | 3  |
| 2.1.   | IMPORTANCIA DEL HIERRO EN HUMANOS .....                          | 3  |
| 2.1.1. | Absorción.....   | 4  |
| 2.1.2. | Biodisponibilidad .....  | 6  |
| 2.2.   | FERRITINA.....   | 7  |
| 2.3.   | PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS EN <i>S. cerevisiae</i> ..... | 10 |
| 2.4.   | AMPLIFICACIÓN DE SECUENCIAS DE ADN .....                         | 11 |
| 2.5.   | CLONACIÓN <i>IN VIVO</i> .....                                   | 13 |
| 2.6.   | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....                            | 14 |
| 2.7.   | REGULACIÓN DEL HIERRO EN <i>S. cerevisiae</i> .....              | 14 |
| 2.7.1. | Regulación del hierro en la vacuola .....                        | 16 |
| 2.7.2. | Regulación del hierro en la mitocondria.....                     | 17 |
| 2.7.3. | Regulación del hierro en el núcleo.....                          | 19 |
| III.   | MATERIALES Y MÉTODOS .....                                       | 20 |
| 3.1.   | LUGAR .....  | 20 |
| 3.2.   | MATERIALES .....   | 20 |
| 3.2.1. | Cepas y plásmidos .....  | 20 |
| 3.2.2. | Materiales de uso rutinario .....                                | 21 |
| 3.2.3. | Medios de cultivo .....  | 21 |
| 3.2.4. | Reactivos.....   | 22 |
| 3.2.5. | Equipos .....  | 22 |
| 3.3.   | MÉTODOS .....  | 23 |
| 3.3.1. | Obtención de una ferritina híbrida soya-arveja .....             | 23 |
| 3.3.2. | Transformación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....          | 28 |

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 3.3.3. | Ensayos de resistencia a hierro .....  | 28 |
| 3.3.4. | Análisis de plásmidos .....  | 29 |
| 3.3.5. | Construcción de una biblioteca de plásmidos de variantes de ferritina en el dominio hidrofílico .....    | 30 |
| 3.3.6. | Ensayos de cuantificación de hierro.....   | 34 |
| IV.    | RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....  | 35 |
| 4.1.   | OBTENCIÓN DE FERRITINA HÍBRIDA SOYA – ARVEJA .....   | 35 |
| 4.1.1. | Variación de secuencias de la ferritina de soya.....   | 35 |
| 4.1.2. | Clonación <i>in vivo</i> .....   | 36 |
| 4.1.3. | Análisis de los transformantes que producen la variante híbrida.....                                     | 37 |
| 4.2.   | EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A HIERRO DE LA FERRITINA HÍBRIDA SOYA-ARVEJA.....                           | 38 |
| 4.2.1. | Optimización de la concentración de hierro para ensayos de resistencia .                                 | 38 |
| 4.2.2. | Evaluación de resistencia de ferritina híbrida soya-arveja .....   | 39 |
| 4.3.   | CONSTRUCCIÓN DE UNA BIBLIOTECA DE PLÁSMIDOS PARA LA GENERACION DE VARIANTES ALEATORIAS DE FERRITINA..... | 42 |
| 4.3.1. | Generación de variantes de ferritina por PCR.....  | 42 |
| 4.3.2. | Transformación de levaduras con la biblioteca de plásmidos .....   | 43 |
| 4.4.   | CUANTIFICACIÓN DE HIERRO EN LEVADURAS QUE PRODUCEN FERRITINA.....  | 43 |
| V.     | CONCLUSIONES.....  | 45 |
| VI.    | RECOMENDACIONES .....  | 46 |
| VII.   | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....   | 47 |
| VIII.  | ANEXOS .....   | 52 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 1:</b> Iniciadores utilizados para la amplificación y generación de ferritina híbrida soya-arveja..... | 27 |
| <b>Tabla 2:</b> Iniciadores utilizados para la amplificación y generación de las variantes de ferritina. ....   | 33 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1:</b> Incidencia de anemia en las regiones del Perú en niños de 6 a 35 meses de edad.....  | 4  |
| <b>Figura 2:</b> Absorción del hierro dietético. ....   | 5  |
| <b>Figura 3:</b> Árbol filogenético de varias ferritinas seleccionadas en la base de datos Uniprot.....   | 7  |
| <b>Figura 4:</b> Estructura de la ferritina de semilla de soya ( <i>Glycine max</i> ).....  | 8  |
| <b>Figura 5:</b> Almacenamiento de hierro en la ferritina. ....   | 9  |
| <b>Figura 6:</b> Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las ferritinas de soya (número de acceso AAB18928) y arveja (número de acceso CAA51786)..... | 10 |
| <b>Figura 7:</b> Reacción en cadena de la polimerasa. ....  | 12 |
| <b>Figura 8:</b> Mecanismo de clonación in vivo mediado por recombinación homóloga. ....  | 14 |
| <b>Figura 9:</b> Vías de absorción de hierro de la levadura. ....   | 15 |
| <b>Figura 10:</b> Generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) mediante la oxidación y reducción del hierro.....  | 16 |
| <b>Figura 11:</b> Tráfico citoplasmático vacuolar del hierro. ....  | 17 |
| <b>Figura 12:</b> Proteínas involucradas en el tráfico y utilización del hierro en la mitocondria en <i>S. cerevisiae</i> .....                               | 18 |
| <b>Figura 13:</b> Mecanismo de control transcripcional por Aft1 y Yap5 en condiciones de suficiencia de hierro. ....  | 19 |
| <b>Figura 14:</b> Principales características del plásmido p416GPD-FerH1.....   | 21 |
| <b>Figura 15:</b> Secuencia codificante para los aminoácidos de la ferritina de soya.....   | 24 |
| <b>Figura 16:</b> Representación de la estrategia empleada para la inclusión de los cambios deseados en la secuencia codificante de ferritina.....            | 25 |
| <b>Figura 17:</b> Mutagénesis aleatoria en el fragmento que codifica para los aminoácidos 204 a 208 de la ferritina de soya. ....                             | 31 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 18:</b> Fundamento de la estrategia seguida para la generación de secuencias codificantes aleatorias y la exclusión de codones de terminación. .... | 32 |
| <b>Figura 19:</b> Análisis electroforético de productos de PCR de los fragmentos “1” y “2”. .....   | 36 |
| <b>Figura 20:</b> Ejemplo representativo de resultados de la transformación de células de levadura. ....  | 37 |
| <b>Figura 21:</b> Análisis electroforético de plásmidos que contienen la ferritina híbrida soya-arveja. ....  | 38 |
| <b>Figura 22:</b> Optimización de los ensayos de resistencia a hierro de la ferritina nativa. ....  | 39 |
| <b>Figura 23:</b> Ensayo de resistencia a hierro de cepa que produce la ferritina híbrida. ....   | 40 |
| <b>Figura 24:</b> Ensayo de resistencia a hierro mediante diluciones en serie de cepas que producen ferritina híbrida soya-arveja. ....                       | 41 |
| <b>Figura 25:</b> Análisis electroforético de productos de PCR de los fragmentos “1” utilizando los iniciadores “b+t” y “b-t”. .....                          | 42 |

## ÍNDICE DE ANEXOS

|   |    |
|---|----|
| <b>Anexo 1:</b> Secuenciación del plásmido que contiene la ferritina híbrida soya<br>arveja con el cebador T3 y T7..... | 52 |
|---|----|

## RESUMEN

La alta incidencia de anemia en el Perú se debe en gran medida al bajo consumo de alimentos ricos en hierro, siendo los más afectados los niños menores de cinco años y las mujeres en estado de gestación. Es por tanto de suma importancia encontrar mecanismos eficientes que ayuden a prevenir y curar la anemia en nuestro país. La ferritina es una proteína multimérica que almacena miles de iones férricos en su interior y presenta alta biodisponibilidad. La presente investigación tuvo como objetivo generar variantes de ferritina que permitan la acumulación de hierro en la levadura. En primer lugar, se construyó una variante de ferritina de soya, denotada como “ferritina híbrida”, en la cual se reemplazaron cinco de sus aminoácidos (residuos número 204 a 208) por aquellos existentes en la ferritina de arveja. Adicionalmente, se construyó una biblioteca de plásmidos que permite la generación de variantes de ferritina de soya con secuencias aleatorias en el fragmento que comprende los mismos cinco aminoácidos. La construcción de la ferritina híbrida (Pro204Leu, Gln205Glu, Leu206Met, Ala207Thr y Asp208His) se completó exitosamente mediante la estrategia de clonación *in vivo*. Sin embargo, el cambio realizado posiblemente tuvo un efecto negativo en la estructura y función de la ferritina híbrida, mostrado en el bajo crecimiento de la levadura en un medio de cultivo conteniendo 10 mM de sulfato ferroso. La estrategia de construcción de una biblioteca de plásmidos para la producción de variantes de ferritina de soya con cambios aleatorios en las posiciones 204 – 208 se implementó exitosamente, abriendo así la posibilidad de continuar y ampliar su estudio.

**Palabras clave:** Anemia, ferritina de soya, levadura, clonación *in vivo*, biblioteca de plásmidos.

## ABSTRACT

The high incidence of anemia in Peru is largely due to the low consumption of iron-containing food, mostly affecting children under five years of age and pregnant women. Therefore, it is extremely important to search for efficient strategies to help prevent and cure anemia in our country. Ferritin is a multimeric protein that stores thousands of ferric ions and exhibits high bioavailability. The purpose of this research was to generate ferritin variants that cause iron accumulation in yeast. First, a soybean ferritin variant was constructed, in which five amino acids were replaced by those found in pea ferritin. Additionally, a plasmid library was built that allows the production of soybean ferritin variants with random sequences in that five amino acid domain. The replacement of amino acids 204-208 of soybean ferritin by those present in pea ferritin (Pro204Leu, Gln205Glu, Leu206Met, Ala207Thr and Asp208His) was successfully achieved, using an *in vivo* cloning strategy. However, the changes affected both the structure and function of the hybrid ferritin, which allowed only poor yeast growth in medium containing 10 mM ferrous sulfate. On the other hand, the plasmid library construction was successfully implemented, which will allow the analysis of a large number of random ferritin variants that include random changes in amino acids 204 – 208.

**Key words:** Anemia, soybean ferritin, yeast, *in vivo* cloning, plasmid library.

## I. INTRODUCCIÓN

La anemia es una condición de salud causada principalmente por la deficiencia de hierro, la misma que puede deberse a varios factores como: su bajo consumo, la forma en que se encuentra el hierro en la dieta y su interacción con otros nutrientes, además de su posible relación con diversas enfermedades. Los niños menores de cinco años y mujeres en estado de gestación presentan la mayor incidencia de anemia en el Perú. Se conocen distintos productos y estrategias que contribuyen a disminuir la anemia, pero la incidencia permanece con valores elevados y, por tal motivo, es necesario identificar nuevas alternativas para su prevención y tratamiento (Gómez *et al.* 2015).

La ferritina es una proteína de almacenamiento de hierro presente en bacterias, plantas y animales. Entre ellas, las ferritinas de origen vegetal (fitoferritinas) como las del frijol, arveja y soya se encuentran concentradas en sus semillas. La mayoría de las fitoferritinas están formadas por dos subunidades (H1 y H2), que se asocian para formar el complejo heteropolimérico con un total de 24 subunidades. La ferritina ya ensamblada es capaz de almacenar hasta 4500 átomos de hierro en su cavidad interna (Perfecto *et al.* 2018). Además, esta proteína ha sido producida heterológamente en organismos como el arroz, *Escherichia coli* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, los cuales lograron acumular y tolerar mayores niveles de hierro (De Llanos *et al.* 2016; Goto *et al.* 1999; Masuda *et al.* 2001).

La levadura *S. cerevisiae* es un organismo utilizado como hospedero para estudiar expresión de genes de otros organismos. Esto es posible porque *S. cerevisiae* cuenta con eficientes mecanismos para ensamblar fragmentos de ADN y construir plásmidos de expresión con características de interés y además, tiene la capacidad de realizar complejas modificaciones de las proteínas (Buckholz & Gleeson 1991; Kitazono 2011).

Por otro lado, el consumo de la levadura *S. cerevisiae* ha demostrado ser de gran importancia nutricional debido a su alto contenido de vitaminas y micronutrientes. El efecto principal que se le atribuye es el buen mantenimiento de la microbiota intestinal, además de mejorar la biodisponibilidad de minerales mediante la degradación del fitato

que secuestra minerales como el hierro en el lumen intestinal e impide que los enterocitos puedan internalizarlos (Moslehi-jenabian *et al.* 2010).

La biodisponibilidad del hierro, en algunos alimentos ricos en este micronutriente como las legumbres, se ven disminuidas cuando son sometidas a tiempos prolongados de cocción, además de las altas temperaturas. Dicho proceso de cocción afecta la estabilidad y asociación de la ferritina con el hierro, por lo tanto, el contenido de hierro consumido será en gran parte en su forma inorgánica y no en su forma más biodisponible (hemo) (Perfecto *et al.* 2018). En este sentido, se han desarrollado diversas alternativas para evitar la deficiencia de hierro y disminuir la prevalencia de anemia, entre ellas se promocionan el consumo de sangrecita, hígado, bazo, galletas y chocolates enriquecidos, y productos farmacéuticos como el sulfato ferroso y el multinutriente “Chispitas”. Sin embargo, no han causado el impacto esperado dado su alto costo o bajos niveles de aceptación. Como alternativa, este estudio propone a la levadura como un suplemento con alto contenido de hierro orgánico.

Se ha demostrado que la levadura puede producir ferritina de soya, de tal forma que tolera e incorpora gran cantidad de hierro en su interior. Sin embargo, se requiere mejorar el nivel de acumulación en la ferritina para que los niveles de hierro sean suficientes. El presente estudio tuvo como objetivo la búsqueda de variantes de ferritina de soya que al ser producidas en *S. cerevisiae* presenten elevada acumulación de hierro. Para ello se identificó una región de la secuencia de la ferritina de soya para realizar cambios dirigidos y, además, mediante la construcción de una biblioteca de plásmidos que generan variantes con cambios aleatorios en la región mencionada. Las variantes de ferritina producidas en las levaduras fueron evaluadas, caracterizadas y secuenciadas.

## **II. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1. IMPORTANCIA DEL HIERRO EN HUMANOS**

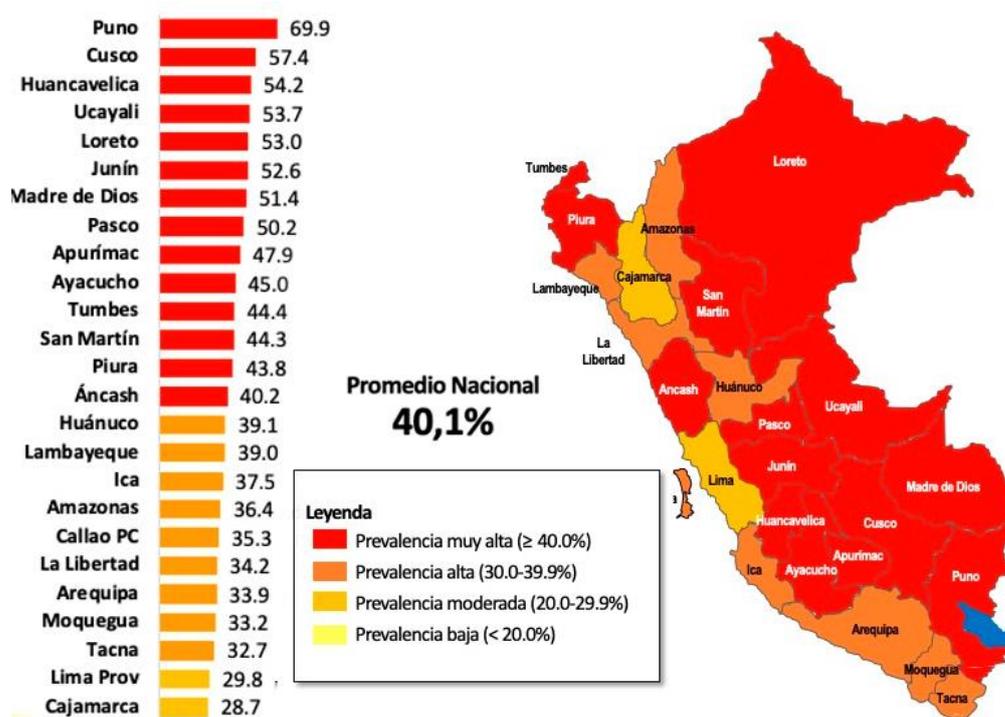
El hierro es un micronutriente muy importante y con alta demanda durante el crecimiento y desarrollo de niños y bebés. La adecuada ingesta del metal es necesaria porque estas poblaciones requieren niveles altos de hierro para procesos de aumento del volumen sanguíneo, desarrollo del cerebro y crecimiento de los tejidos. Además, son requeridos en la generación de respuestas inmunitarias clave para el óptimo desarrollo de los infantes (Armitage 2019). Hasta la fecha y a nivel mundial, se ha tratado de combatir la deficiencia de hierro en niños menores de 5 años y en mujeres gestantes implementando diversas estrategias.

En el Perú, según el Instituto Nacional de Salud (INS) y el Centro Nacional de Alimentación y Nutrición (CENAN), la prevalencia de anemia en niños menores de cinco años pasó de 47,2 por ciento en el año 2015 a 28,2 en el 2019 (INS 2020). Para el caso de mujeres gestantes los valores fueron de 24,2 y 18,5 por ciento en el 2015 y 2019, respectivamente. Estas cifras representan el promedio a nivel nacional, por lo que no refleja el estado real de ciudades alejadas de la capital, en donde existen muchos problemas nutricionales. Como se muestra en la Figura 1, los departamentos de la selva y sierra son los más afectados con una prevalencia de anemia superior al 40 por ciento.

En el 2016 el gobierno peruano elaboró el Plan Nacional para la Reducción y Control de la Anemia Materno Infantil y la Desnutrición Crónica Infantil, en el cual se indicaba que la meta para el 2021 era llegar al 19 por ciento de tasa de anemia en niños de 6 a 35 meses de edad (MINSa 2017). Sin embargo, el estudio realizado por el INEI en el 2020 (ver Figura 1) mostró que dicha meta estaba muy lejos de lograrse, ya que el promedio de prevalencia de anemia en infantes de 6 a 45 meses fue de 40,1 por ciento.

Entre las principales acciones tomadas en cuenta en el plan, está el promover la disponibilidad de productos alimentarios de origen animal ricos en hierro. El hierro de fuente animal se encuentra principalmente formando parte del grupo prostético hemo,

presente en proteínas como la hemoglobina, mioglobina, entre otras. El grupo hemo está compuesto por un ión  $Fe^{+2}$  ubicado en el centro de un anillo orgánico heterocíclico de gran tamaño denominado porfirina. La forma química del hierro en el grupo hemo permite que ingrese directamente a las células de la mucosa del intestino en forma de complejo hierro-porfirina, lo cual evita que sustancias inhibitoras afecten su absorción (González Urrutia 2005). Por otro lado, el hierro no-hemo se encuentra principalmente en alimentos de origen vegetal como componente metálico de proteínas que participan en reacciones redox (Marschner 1995).



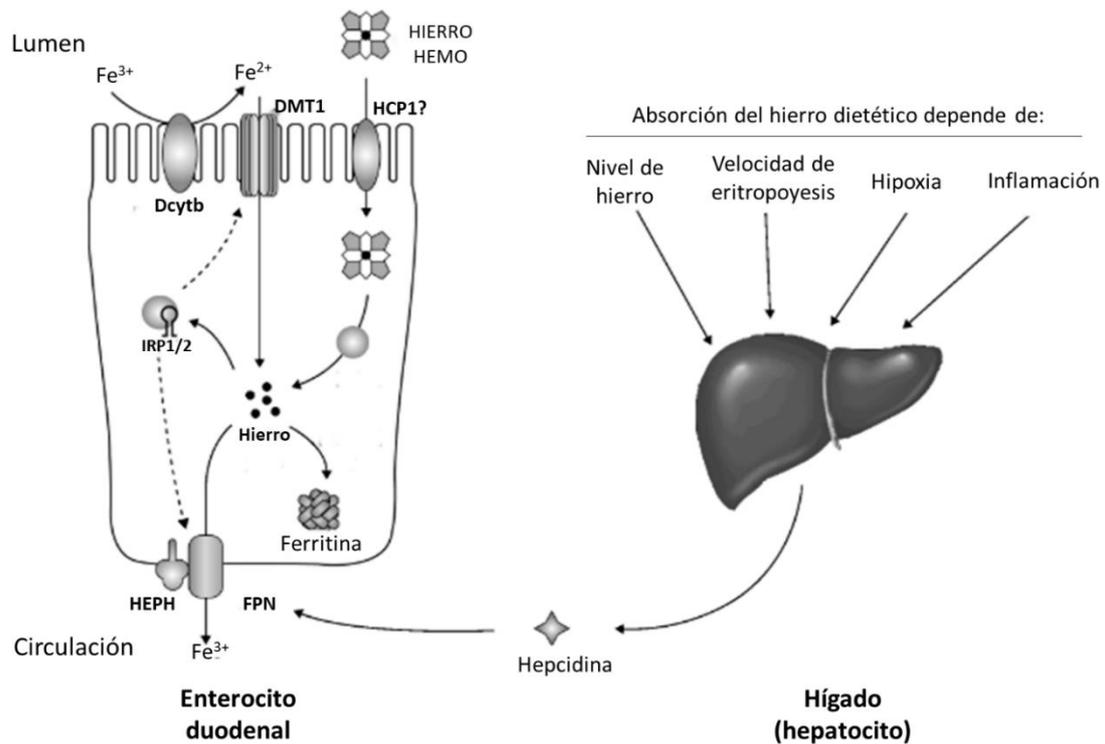
**Figura 1: Incidencia de anemia en las regiones del Perú en niños de 6 a 35 meses de edad. Es evidente la muy alta prevalencia de anemia en los departamentos de la selva y sierra del país**

*Fuente: Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI) (2020).*

### 2.1.1. Absorción

La absorción del hierro es un proceso regulado a través del epitelio del intestino delgado proximal, el cual mantiene los niveles de hierro corporal en un rango fisiológicamente definido. El hierro de naturaleza no-hemo cruza el borde del cepillo apical de los enterocitos a través del transportador de hierro ferroso DMT1 (transportador de iones

metálicos divalentes  $1$ ). La producción del transportador DMT1 es promovida a través del empalme de su ARN mensajero, que contiene un elemento sensible a hierro (IRE) con las proteínas reguladores del hierro IRP1/2. La mayor parte del hierro de la dieta se encuentra en estado férrico y debe reducirse mediante la enzima citocromo B reductasa duodenal (DCytB) (Anderson *et al.* 2009). En caso la demanda de hierro sea baja, el hierro que se encuentra en el interior de los enterocitos, secuestrado en la ferritina, será perdido cuando los enterocitos se desprendan de las vellosidades. Si la demanda es alta, el hierro atravesará la membrana basolateral a través de la proteína ferroportina (FPN) en cooperación con la ferroxidasa transmembranal hefestina, que convierte  $Fe^{2+}$  a  $Fe^{3+}$ . El hierro que sale del enterocito entra a la circulación para ser unido a la transferrina plasmática. Si no se requiere hierro de manera inmediata, éste será almacenado en el interior de las ferritinas.



**Figura 2: Absorción del hierro dietético.**

*Fuente: Anderson et al. (2009)*

De otro lado, la absorción del hierro hemo se realiza mediante la proteína portadora de hemo 1 (HCP1) y una vez internalizado, el hierro es liberado por la enzima hemo oxigenasa 1 (Qiu *et al.* 2006). Además, se ha reportado la eficiente absorción del hierro internalizado en ferritinas de arveja y soya por endocitosis mediada por la proteína clatrina, encargada de la invaginación de una porción de membrana plasmática que

requiere la subunidad  $\mu 2$  del péptido de ensamblaje 2 (AP2), en células Caco-2. La detección de ferritinas en extractos celulares Caco-2 disminuyó en tratamientos con inhibidores de endocitosis, y fueron analizados mediante transferencia Western Blot (Perfecto *et al.* 2018; San Martín *et al.* 2008).

### **2.1.2. Biodisponibilidad**

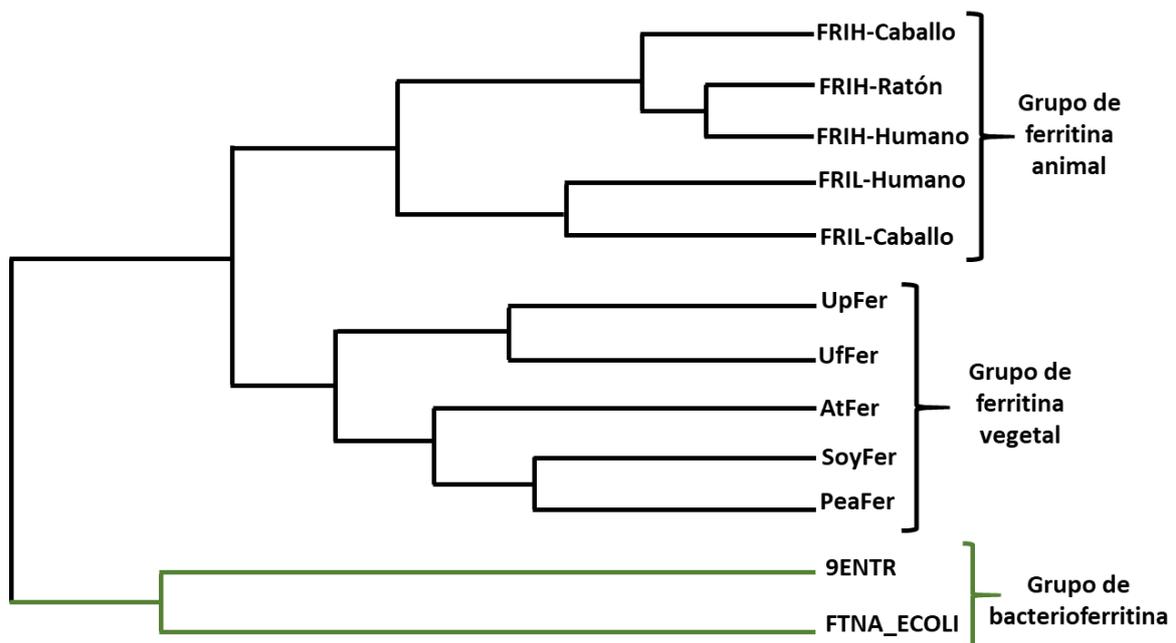
La absorción del hierro no-hemo depende de muchos factores tanto potenciadores como reductores, que ejercen su efecto cuando se consumen de manera simultánea en la dieta (Sharma 2003). Entre los compuestos que reducen la absorción se encuentran: los oxalatos, fitatos, taninos y micronutrientes como calcio y aluminio. En contraparte, la vitamina C potencia y facilita la absorción del hierro mediante la formación de complejos solubles con iones férricos para la reducción de  $Fe^{+3}$  a  $Fe^{+2}$  (González Urrutia 2005).

La absorción de hierro hemo es comparativamente elevada porque la presencia de sustancias inhibitoras prácticamente no afectan la absorción, a excepción del calcio que posiblemente compite con el hierro en la etapa final del transporte intracelular en las células de la mucosa intestinal (Hallberg *et al.* 1992). El porcentaje de absorción de hierro depende del estado fisiológico y de la reserva corporal de hierro, por lo que puede variar de 15 por ciento para personas que no necesiten hierro hasta 35 por ciento en personas en estado de crecimiento (niños y mujeres gestantes) o que se encuentren con alguna enfermedad (Martínez *et al.* 1999).

Además del hierro unido al grupo prostético hemo, como se describió en la sección anterior, se ha descrito como posible fuente al hierro unido a la proteína ferritina de leguminosas. Así, un estudio reveló que la ferritina de arveja que almacena aproximadamente  $2360 \pm 20$  átomos de hierro, es absorbida mediante endocitosis por células Caco-2 utilizadas como línea celular para estudiar la barrera epitelial intestinal (Perfecto *et al.* 2018). De la misma manera, Kalgaonkar y Lönnnerdal revelaron que la ferritina de caballo es captada por receptores de células Caco-2 para ser endocitada y macropinocitocitada (Kalgaonkar y Lönnnerdal 2009). En un estudio preliminar, se alimentaron con harina de soya a 18 mujeres con deficiencia moderada de hierro. El resultado mostró que la absorción media de hierro fue de 27 por ciento, indicando ser una buena fuente en comparación a la suplementación con sulfato ferroso (Yang k 2015).

## 2.2. FERRITINA

La ferritina es una proteína multimérica muy bien caracterizada molecularmente que sirve como un almacén de hierro, y es producida en bacterias, plantas, animales y humanos. El nivel de homología entre las ferritinas de estos organismos es muy variable. En el caso de las ferritinas de soya y arveja comparten una identidad del 89 por ciento; las fitoferritinas y la humana comparten una identidad entre 55-66 por ciento, mientras que la ferritina de *E. coli* no muestra homología con las anteriores (Ragland *et al.* 1990).

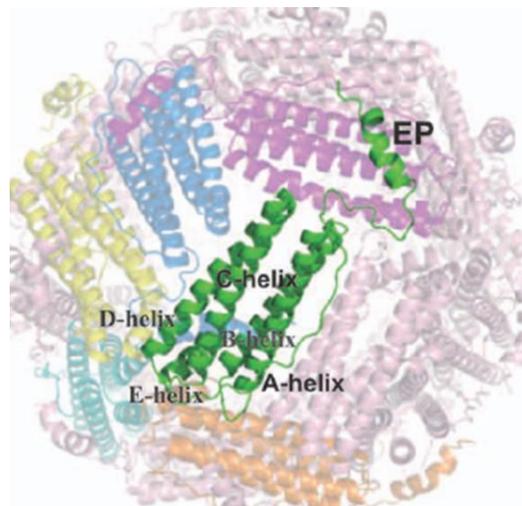


**Figura 3: Árbol filogenético de varias ferritinas seleccionadas en la base de datos Uniprot. Las barras indican distancias parentales. Las ferritinas indicadas son FRIH-Caballo, FRIH-Humana, FRIH-ratón (ferritinas de cadena pesada), FRIL humana y caballo (ferritinas de cadena ligera), UpFer (*Ulva pertuosa*), UfFer (*Ulva fascinata*), AtFer (*Arabidopsis thaliana*), SoyFer (soya), PeaFer (arveja), 9ENTR (*Enterobacter sp.*) y FTNA\_ECOLI (*E. coli*)**

*Fuente: UniProt y Edición propia (2022)*

Las fitoferritinas están compuestas por 24 subunidades polipeptídicas de 25-28 kDa. Cada subunidad está formada por cuatro hélices largas plegadas en pares (A, B, C y D) y una quinta hélice corta (E) (Zielińska 2015). Existen dos tipos de subunidades en las ferritinas de semillas de vegetales, H1 y H2, las cuales tienen 26.5 y 28 kDa respectivamente en el caso de la ferritina de soya, y se asocian sinérgicamente para formar el complejo

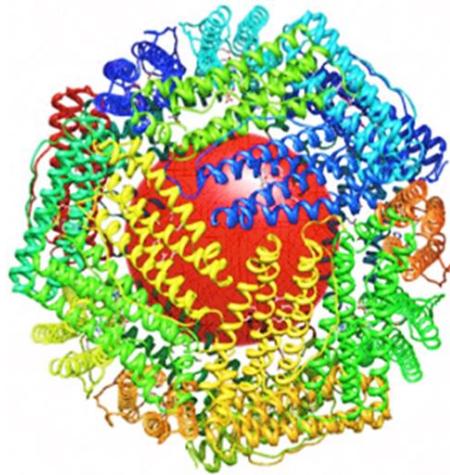
heteropolimérico con una proporción mayor para la subunidad H1 (ver Figura 4). Las dos subunidades de la ferritina de soja son codificadas por distintos genes que presentan un 82 por ciento de identidad en sus secuencias (Masuda *et al.* 2001). Cada subunidad de ferritina vegetal se sintetiza inicialmente como una proteína precursora de 32 kDa. El péptido de tránsito (PT) es responsable de la importación de la ferritina hacia los plastidios para posteriormente ser escindida (Ragland *et al.* 1990). El péptido de extensión (EP: siglas en inglés) está involucrado en proporcionar estabilidad al complejo proteico durante las interacciones con el hierro. Estudios realizados por De Llanos y colaboradores en 2016, revelaron que la producción de ferritina de soja en la levadura hizo que ésta sea más resistente a hierro y lo almacene en mayor proporción que en las células silvestres (De Llanos *et al.* 2016).



**Figura 4: Estructura de la ferritina de semilla de soja (*Glycine max*).** En la figura se muestra una ferritina madura con 24 subunidades interactuando entre sí con el péptido de tránsito escindido. En verde se resalta una de las subunidades de la ferritina compuesta por un péptido de extensión (EP) y las hélices A, B, C, D y E  
*Fuente: Masuda et al. (2010). PDB:3A68*

La estructura compleja de la ferritina forma un canal hidrofóbico que ayuda al ingreso del hierro. El canal se forma a través de la convergencia de las hélices de dos, tres o cuatro subunidades distintas, siendo la penúltima la más frecuente (representada en la Figura 5 por dos subunidades de color amarillo y una azul). Luego de pasar por el canal, el hierro es translocado a sitios conservados que conforman un centro ferroxidasa en el haz de las cuatro hélices, el cual es responsable de oxidar el  $Fe^{+2}$  para convertirlos a  $Fe^{+3}$ . El hierro

oxidado es translocado hacia el interior del complejo proteico y se une en combinaciones variables con fosfatos para cambiar la cristalinidad del mineral de la ferritina, dando lugar a ferrihidrita amorfa. Este mecanismo de almacenamiento permite alcanzar hasta 4500 iones de  $\text{Fe}^{+3}$  en el núcleo inorgánico (Yang *et al.* 2015) como se muestra en la Figura 5.



**Figura 5: Almacenamiento de hierro en la ferritina. La esfera de color rojo representa el núcleo inorgánico que almacena el hierro en forma de ferrihidrita amorfa**

*Fuente: Sánchez del Castillo et al. (2018)*

Estudios realizados por el Dr. Sergi Puig y colaboradores han demostrado la eficiente producción de las subunidades de ferritina de soja en *S. cerevisiae*. Los análisis de transferencia Western demostraron que las subunidades expresadas fueron ensambladas para formar la ferritina madura y proporcionar a la levadura una mayor capacidad para tolerar hierro (De Llanos *et al.* 2016). De otro lado, otros estudios han demostrado que la ferritina de arveja (*Pisum sativum*) acumula más del doble de hierro en comparación con la ferritina de soja. Además, se le atribuyen mejores características respecto a su estabilidad proteica en condiciones de alta temperatura y pH gástrico (Perfecto *et al.* 2018). En el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la ferritina de soja y arveja (ver Figura 6), se muestran en letras en celeste los aminoácidos que conforman las hélices de la ferritina de soja y resaltados en amarillo los residuos de actividad ferroxidasa conservados. Sin embargo, existe una región de cinco aminoácidos con alta variabilidad indicados con el rectángulo rojo de la Figura 6. Esta región se encuentra a inicios de la hélice D, e interactúa con las hélices de otras subunidades para formar el canal hidrofílico.

|        |     |   |                                   |
|--------|-----|---|-----------------------------------|
| Arveja | 1   | MALSSSKFSSFSGFSLSVPSVSGNGVQKP-CFCDLRVGE-KWGSRKFRVCATTAPLTGVIFE                                |                                   |
|        |     | MAL+ SK SSFSGFS P G+ ++ P C L K GSR RVCA+T PL+GVIFE   |                                   |
| Soya   | 1   | MALAPSKVSSFSGFSKPSVGDALKNPTCSVLSFANVKLGSRLRVC   | <u>ASTVPLSGVIFE</u><br>Péptido de |
| Arveja | 59  | PFEEVKKDYLAVPSVPLVSLARQNFADCEESVINEQINVEYNVSYVYHSMFAYFDRDNVA                                  |                                   |
|        |     | PFEEVKK LAVP+ P VSLARQN+ADECES INEQINVEYN SY YHS+FAYFDRDNVA                                   |                                   |
| Soya   | 61  | <u>PFEEVKKGELAVP</u> TAPQVSLARQNY <u>ADECES</u> AINEQINVEYN <u>ASYA</u> <u>YHSLFAYFDRDNVA</u> | extensión Hélice A                |
| Arveja | 119 | LKGF <del>AKFFKESSEERE</del> HAEKLMKYQNTRGGRVVLHPIKDVPSEFEHVEKGDALHAMELA                      |                                   |
|        |     | LKGF <del>AKFFKESSEERE</del> HAEKLMKYQNTRGGRVVLH IK+VPSEFEHVEKGDAL+AMELA                      |                                   |
| Soya   | 121 | <u>LKGF<del>AKFFKESSEERE</del>HAEKLMKYQNTRGGRVVLHAIKNVPSEFEHVEKGDALYAMELA</u>                 | Hélice B                          |
| Arveja | 179 | LSLEKLTNEKLLNVHSVAERNNDLEMTHEFIEGEYLAEQVEAIKKISEYVAQLRRVKGKGGH                                |                                   |
|        |     | LSLEKL NEKLLNVHSVA+RNND ++ FIE E+L+EQVE+IKKISEYVAQLRRVKGKGGH                                  |                                   |
| Soya   | 181 | <u>LSLEKLVNEKLLNVHSVADRNDPQLADFI</u> ESEFLSEQVESIKKISEYVAQLRRVKGKGGH                          | Hélice C Hélice D                 |
| Arveja | 239 | VWHFDQRL 247  |                                   |
|        |     | VWHFDQRL  |                                   |
| Soya   | 241 | <u>VWHFDQRL</u> 249   | Hélice E                          |

**Figura 6: Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las ferritinas de soya (número de acceso AAB18928) y arveja (número de acceso CAA51786).**

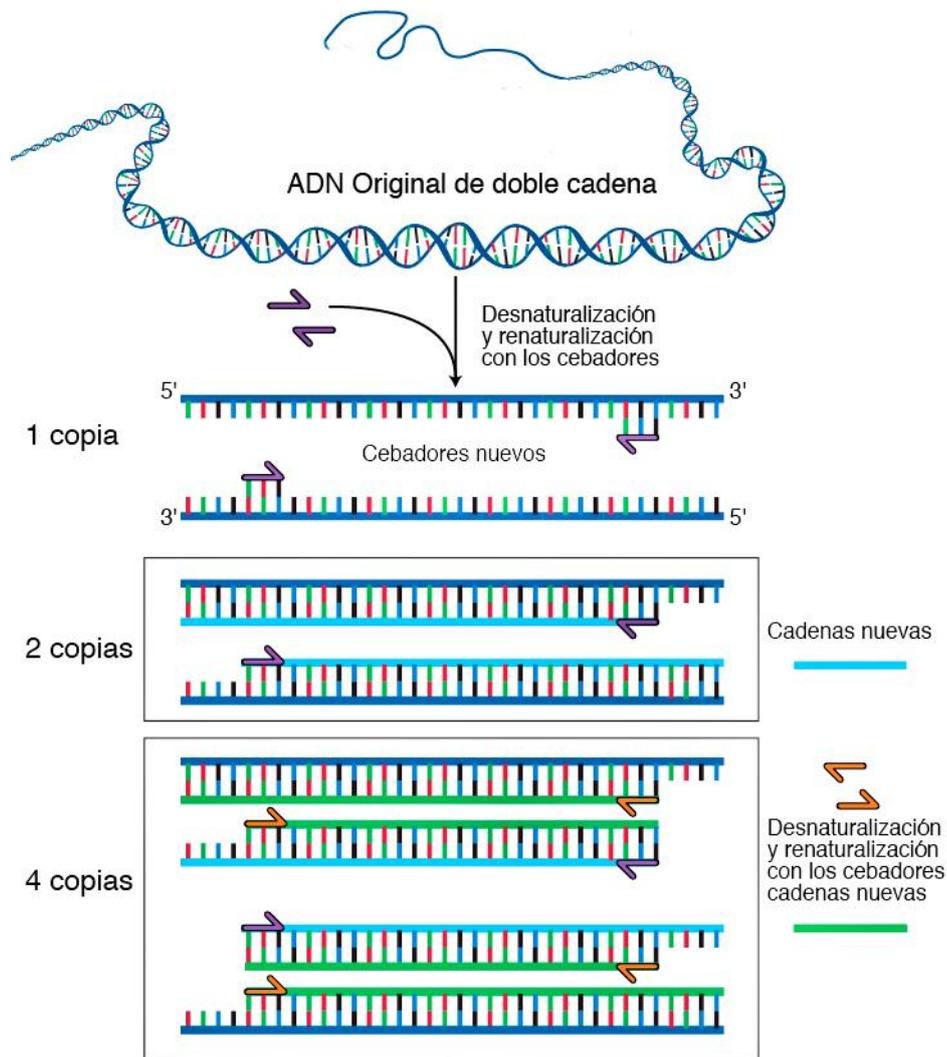
Fuente: Edición propia (2022)

### 2.3. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS EN *S. cerevisiae*

La gran cantidad de información recopilada a lo largo de los años ha ubicado a *S. cerevisiae* como un eficiente hospedero eucariota para la producción de proteínas que son producidas naturalmente por otros organismos (heterólogas). Para obtener una cepa de levadura con dicha característica, éstas deben ser transformadas con un plásmido de expresión que contiene marcadores genéticos que confieren resistencia hacia un antibiótico o restablecen la capacidad de síntesis de algún metabolito esencial, para poder seleccionar a las cepas transformantes. Para la expresión, la secuencia codificante debe ser clonada en un plásmido que incluye a un promotor proveniente de un gen de *S. cerevisiae* altamente expresado y a una secuencia de terminación, los cuales deben ser elegidos de acuerdo con la disponibilidad y a los objetivos de la investigación (Gellissen *et al.* 1992).

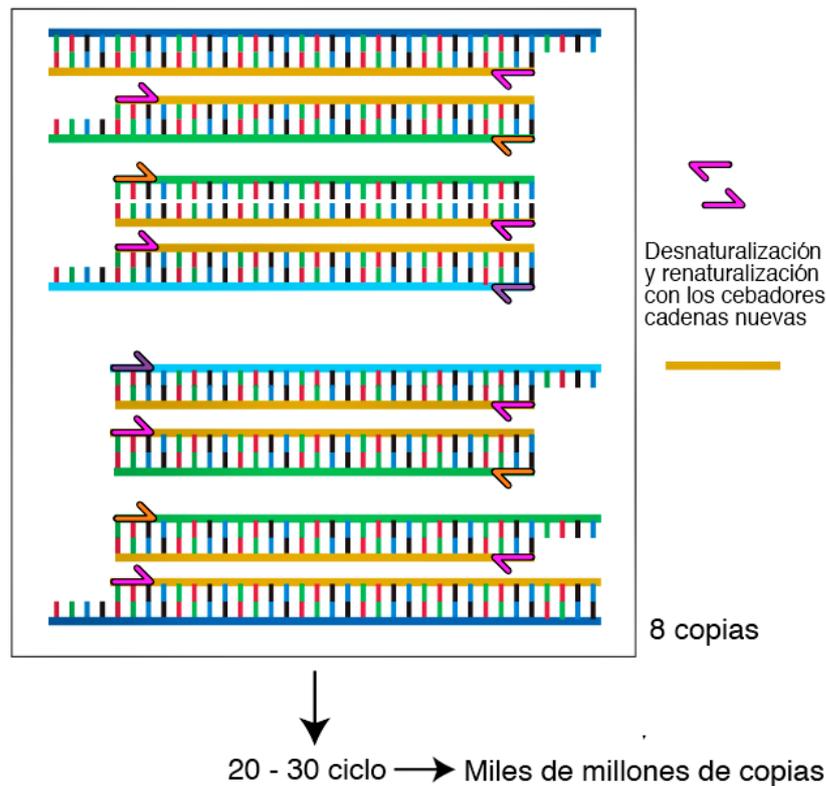
## 2.4. AMPLIFICACIÓN DE SECUENCIAS DE ADN

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una herramienta muy utilizada para poder amplificar fragmentos de ADN. Para tal propósito son necesarias secuencias cortas de ADN (iniciadores o cebadores) para seleccionar la región del ADN a amplificar, enzima ADN polimerasa termoestable, desoxirribonucleótidos (dATP, dTTP, dGTP y dCTP); y el buffer y cofactores óptimos. La técnica requiere cambios de temperatura repetidamente para la separación de las dos hebras del molde o plantilla a amplificar (desnaturalización; temperatura alta), la asociación o hibridación específica de los cebadores (renaturalización; desciende la temperatura), y la síntesis de las nuevas hebras de ADN por la ADN polimerasa.



Continúa...

...continuación



**Figura 7: Reacción en cadena de la polimerasa.**

*Fuente: National Human Genome Research Institute (NCBI)*

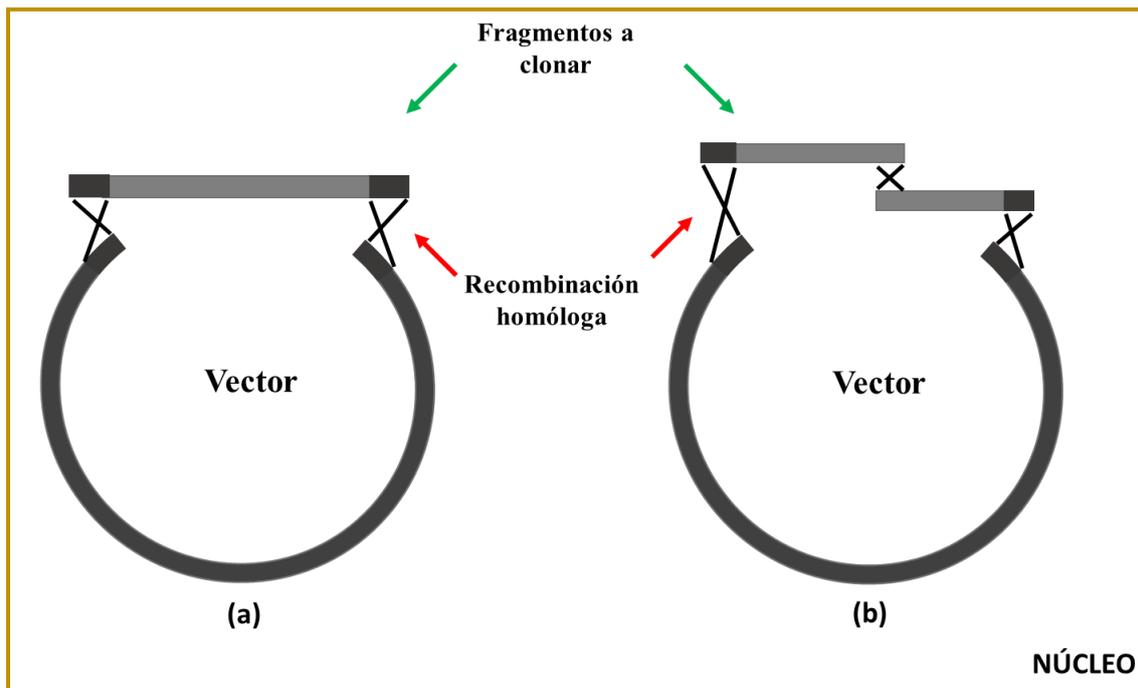
Los fragmentos amplificados o productos de PCR obtenidos, tienen múltiples utilidades, entre ellas: fusión o clonación con otros fragmentos de ADN, análisis de la secuencia de nucleótidos, y para generar variaciones de la secuencia original.

Frecuentemente se prefiere clonar fragmentos que incluyan solo las secuencias codificantes de los genes (exones) para así permitir su expresión correcta cuando se usa hospederos procariontes (*Escherichia coli*), o hacerla más eficiente para el caso de hospederos eucariotes (*S. cerevisiae*). Para lograrlo, se obtiene el ADN complementario (ADNc) correspondiente teniendo como material precursor al ARN mensajero (ARNm) procesado (libre de intrones) y usando a la transcriptasa reversa. El ADNc es procesado para eliminar el ARNm que sirvió de plantilla y generar un fragmento de doble hebra de ADN, para permitir su amplificación mediante PCR usando iniciadores específicos y generando así los fragmentos a clonar.

## 2.5. CLONACIÓN *IN VIVO*

La clonación de fragmentos de ADN es una estrategia muy utilizada para obtener un vector o plásmido para el análisis o expresión de genes. Existen dos estrategias que pueden ser aplicadas para la construcción de plásmidos, el método de clonación *in vitro* e *in vivo*. El método de clonación *in vitro* es utilizado en gran escala por su facilidad de uso. Sin embargo, el costo de adquirir los kits o las enzimas es una característica desfavorable. Este método requiere de una ligasa, un vector, productos de PCR o fragmentos a clonar, enzimas de restricción y buffers para un óptimo medio para las reacciones, posteriormente el ensamblado se introduce en un microorganismo para lograr la amplificación del plásmido. De otro lado, la clonación *in vivo* necesita que el fragmento a clonar y el vector sean introducidos en el organismo hospedero para ser ensamblados, de tal forma que la clonación y eventual expresión del gen de interés se realizan en un solo paso.

La clonación *in vivo* realizada por *S. cerevisiae* es un mecanismo eficiente que utiliza la recombinación homóloga para lograr el ligamiento de un vector con uno o más fragmentos de interés que pueden ser obtenidos mediante, por ejemplo, PCR (ver Figura 8). Este mecanismo prácticamente carece de errores, implica bajos costos, y puede ser implementado en cualquier laboratorio que utilice técnicas básicas de biología molecular (Kitazono 2011). Este método requiere que el vector y los productos de PCR contengan secuencias homólogas de al menos 30 pares de bases (pb) en sus extremos para que la levadura realice una eficiente recombinación (Hua *et al.* 1997).



**Figura 8: Mecanismo de clonación *in vivo* mediado por recombinación homóloga. Este mecanismo es realizado por la maquinaria celular de la levadura dentro del núcleo, permitiendo la correcta construcción de plásmidos híbridos con uno o más insertos. (a) Clonación de un fragmento. (b) Clonación de dos fragmentos**

*Fuente: Edición propia (2022)*

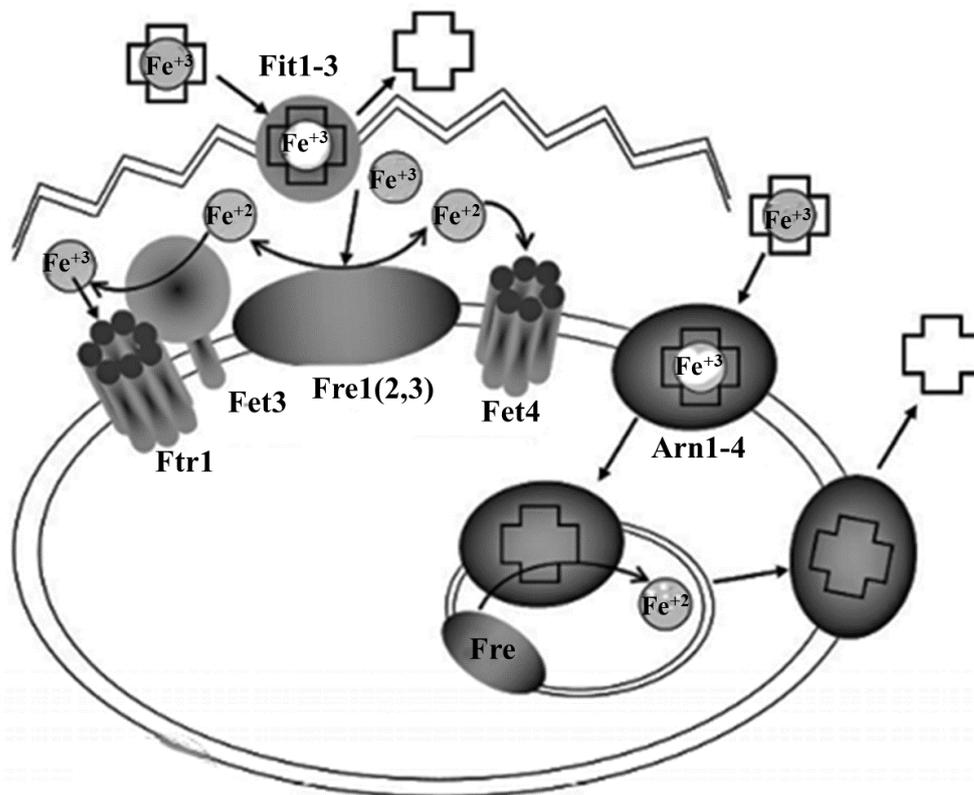
## 2.6. *Saccharomyces cerevisiae*

La levadura *S. cerevisiae* tiene propiedades muy importantes que la hacen particularmente adecuada para estudios biológicos: rápida proliferación, fácil dispersión a células individuales, aislamiento de mutantes, sistema genético bien definido y maleable y, lo más importante, un sistema de transformación de ADN altamente versátil (Sherman 2002). Esta levadura puede ser utilizada en su forma haploide y diploide, las cuales son estables genéticamente y ofrecen por tanto importantes ventajas para diversos estudios en condiciones óptimas (Goffeau *et al.* 1996).

## 2.7. REGULACIÓN DEL HIERRO EN *S. cerevisiae*.

El hierro es un oligoelemento indispensable prácticamente para todos los seres vivos, y ello se debe a que participa como cofactor de procesos centrales como: la respiración celular, ciclo de Krebs, el transporte de oxígeno, la regulación génica y la síntesis de ADN. Como se muestra en la Figura 9, en *S. cerevisiae*, la absorción de hierro se realiza

por tres mecanismos primarios: 1) Mediante sideróforos; 2) Mediante el transportador de hierro ferroso Fet4; y 3) Mediante una ferroxidasa Fet3 y el complejo permeasa Ftr1. Los tres mecanismos son dependientes de la reacción metaloreductasa (Fre) que reduce el  $\text{Fe}^{+3}$  a  $\text{Fe}^{+2}$  para permitir su ingreso al interior de la célula. Las proteínas Fit (fit1-3) están involucradas en la retención de los sideróforos-hierro y se incorporan a la pared celular mediante anclajes. La levadura produce proteínas de membrana Arn1-4 que permiten la detección y el transporte de los sideróforos (Kwok & Kosman 2005).

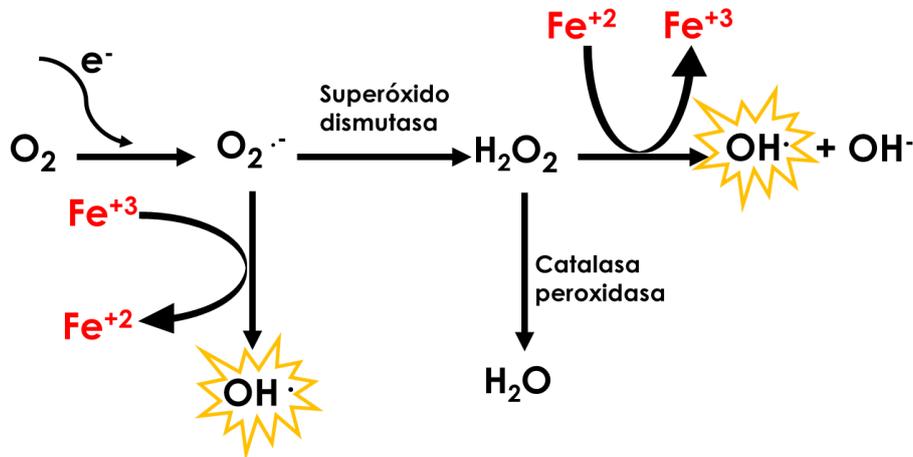


**Figura 9: Vías de absorción de hierro de la levadura. Se muestran tres vías de absorción del hierro, dos se realizan inicialmente a través de la metaloreductasa Fre1(2,3) y mediante la detección de los sideróforos por la proteína Arn1-4**

*Fuente: Kwok & Kosman (2005)*

La fracción de hierro intracelular es muy inestable y puede donar o recibir electrones generando especies reactivas de oxígeno (EROs). En la levadura, la cadena transportadora de electrones de la respiración constituye una fuente importante de generación de aniones superóxidos ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), que pueden transferir electrones a  $\text{Fe}^{+3}$  para cambiarlo a  $\text{Fe}^{+2}$  y

generar radicales hidroxilos ( $\text{OH}^\bullet$ ) (ver Figura 10). Los aniones superóxidos son reducidos principalmente por la superóxido dismutasa (SOD) para evitar daños de algunas proteínas. Sin embargo, se generan moléculas de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), una ERO menos reactiva que los superóxidos pero de gran significancia por su abundancia (Moreno Cermeño 2011).



**Figura 10: Generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) mediante la oxidación y reducción del hierro. Los radicales libres hidroxilos se muestran encerrados en estrellas amarillas, y son generados por reacciones entre los superóxidos y  $\text{Fe}^{+3}$ , y el peróxido de hidrógeno con  $\text{Fe}^{+2}$**

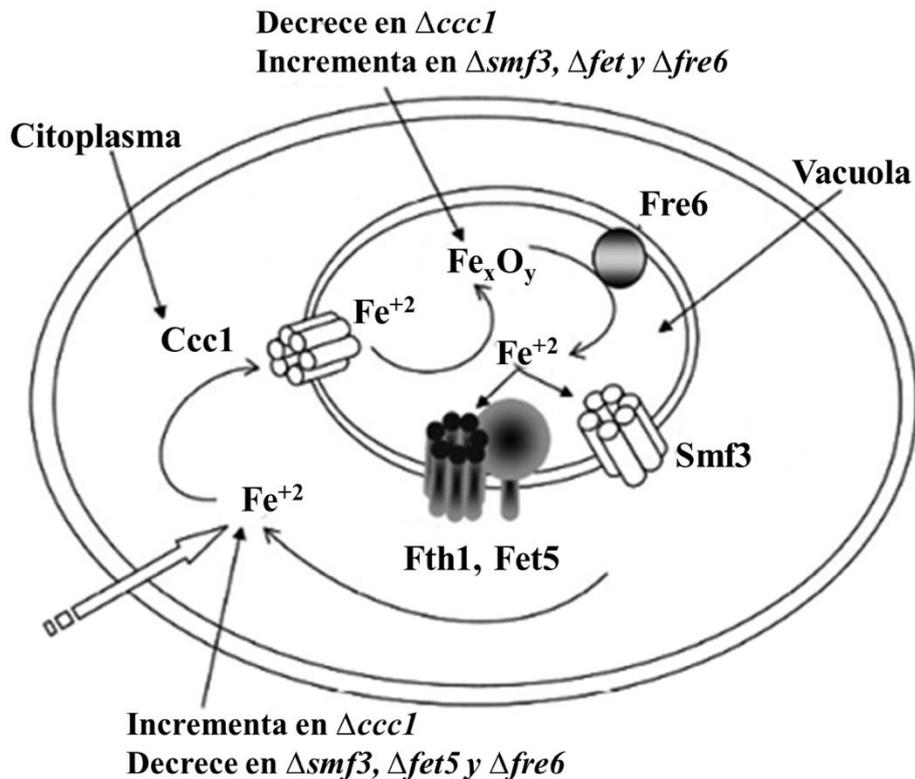
*FUENTE: Edición propia (2022)*

### 2.7.1. Regulación del hierro en la vacuola

La vacuola es un organelo fundamental en la homeostasis del hierro en la levadura, debido a su capacidad para almacenar el hierro sobrante, y exportarlo cuando se requiera para las actividades metabólicas. Existen proteínas en la vacuola que regulan la homeostasis del hierro, entre ellas se encuentran: 1) proteínas transportadoras/permeasas de hierro; 2) proteínas de bombas de protones como la ATPasa vacuolar de tipo V, que sirve para la acidificación de la vacuola; y 3) proteínas con actividad metaloreductasa, requerida para el cambio reductor de especies hidróxidos férricos, que probablemente se acumula en el ambiente ácido del lumen vacuolar (Kwok & Kosman 2005).

El tráfico del hierro en la vacuola está determinado por su importación y exportación por proteínas que se encuentran en la membrana vacuolar, tal como se muestra en la Figura 11. Entre ellas, la proteína Ccc1 se encarga de la captación del hierro y el transporte hacia

el interior de la vacuola. Por lo que una cepa de levadura que carece del gen *CCC1* contendrá una menor cantidad de hierro vacuolar en comparación con una cepa silvestre (Li *et al.* 2001). La proteína Smf3 funciona como un exportador de hierro divalente y apoya específicamente la necesidad de hierro de otros compartimentos de la célula. Además, las proteínas Fet5 y Fth1 funcionan como exportadoras de hierro con el dominio ferroxidasa de Fet5 y la capacidad permeasa de Fth1 situados dentro del lumen vacuolar (Kwok & Kosman 2005).



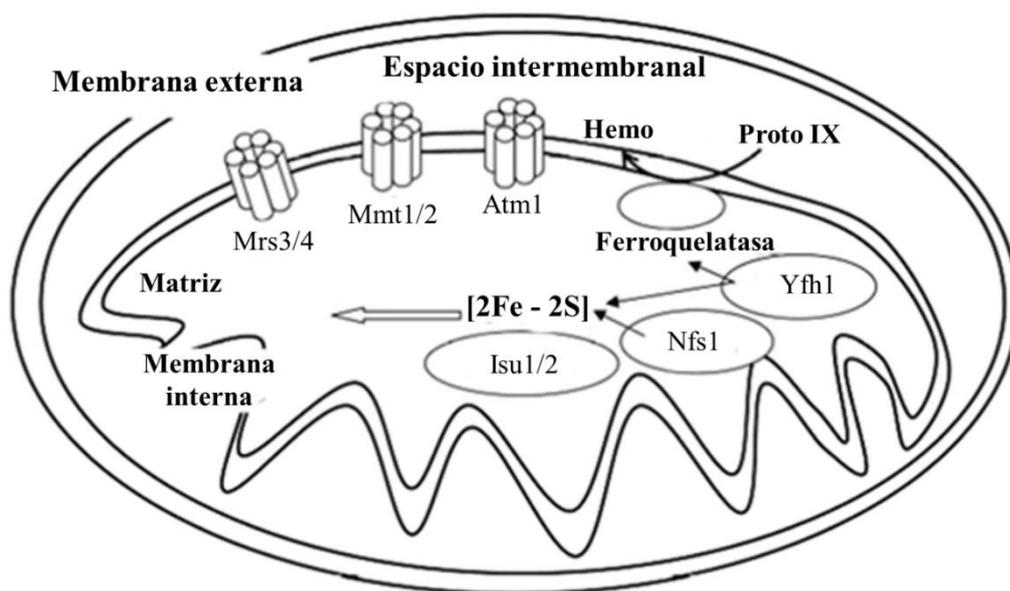
**Figura 11: Tráfico citoplasmático vacuolar del hierro. El hierro citoplasmático es transportado hacia la vacuola mediante Ccc1 y probablemente se almacena como especies  $Fe_xO_y$ . Para su exportación, Fre6 lo reduce a  $Fe^{+2}$  para que pueda ser expulsado por Smf3 y por el complejo Fth1/Fet5**

*Fuente: Kwok & Kosman (2005)*

### 2.7.2. Regulación del hierro en la mitocondria

Gran parte de la biosíntesis de los grupos hierro-azufre (Fe-S) se lleva a cabo en la mitocondria, así como el paso final de la síntesis del grupo hemo y la incorporación de hierro ferroso en la protoporfirina IX. Por esta razón, la demanda de hierro en las mitocondrias es alta. Sin embargo, el hierro libre en la matriz mitocondrial debe limitarse

debido a la posibilidad de generación de EROs por la cadena de transporte de electrones. Por tal motivo, la mitocondria requiere de controles estrictos para mantener equilibrados los niveles de hierro, tal como se muestra en la Figura 12. El gen *YFHI*, homólogo del gen *FXN* (frataxina humana), codifica para una proteína que oxida y almacena el hierro, y actúa conjuntamente con las proteínas *Isu1/2* para promover el ensamblaje de los grupos Fe-S (Ramazzotti *et al.* 2004). Además, se han identificado numerosas proteínas involucradas en la homeostasis del hierro que se dividen en dos categorías: proteínas transportadoras de hierro y proteínas involucradas en la biosíntesis de grupos Fe-S o del hemo. Las proteínas *Mmt1/2* y *Mrs3/4* se encuentran en la membrana interna de la mitocondria y tienen actividades de importación de hierro. La proteína *Atm1* es un exportador de cassette de unión a ATP (ABC) de precursores de grupos Fe-S hacia el citoplasma. Otra proteína que interviene en la biosíntesis de grupos Fe-S es *Nfs1*, encargada de eliminar el azufre de la cisteína para ligarlo al hierro (Kispal *et al.* 1999).

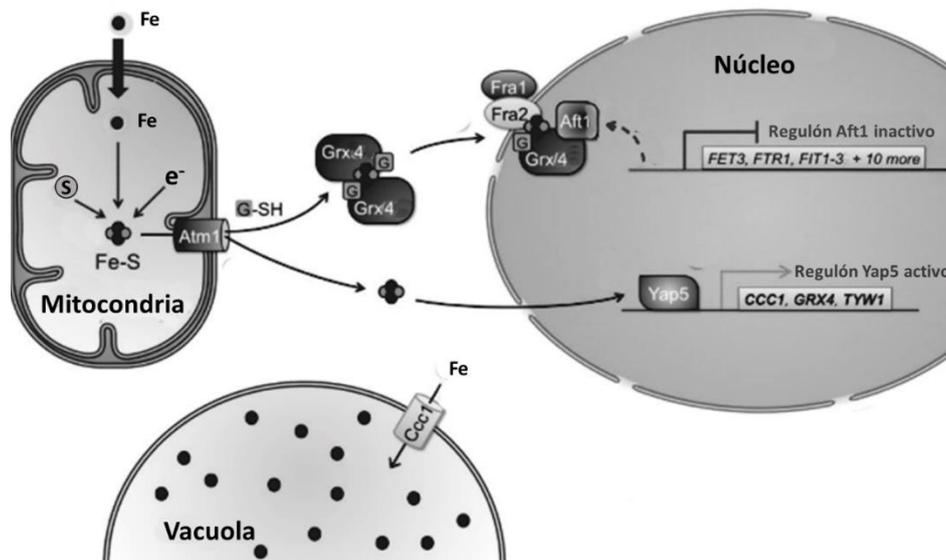


**Figura 12: Proteínas involucradas en el tráfico y utilización del hierro en la mitocondria en *S. cerevisiae*. Las proteínas de membrana interna de la mitocondria *Mrs3/4* y *Mmt1/2* se dedican a la importación del hierro y *Atm1* a la exportación. Las proteínas *Isu1/2*, *Nfs1* y *Yfh1* están implicadas en la biosíntesis de grupos Fe-S en la matriz. La protoporfirina IX que se forma en el espacio intermembranal recibe el hierro ferroso de la matriz para producir el grupo hemo**

*Fuente: Kwok & Kosman (2005)*

### 2.7.3. Regulación del hierro en el núcleo

Las interacciones en la homeostasis del hierro a nivel celular son reguladas fuertemente a nivel nuclear. La regulación se establece a nivel de la transcripción de genes que codifican para proteínas involucradas en la homeostasis del hierro, como se muestra en la Figura 13. En condiciones de deficiencia de hierro, la proteína Aft1 es un sensor para poder activar la transcripción de genes como: *FET3*, *FTR1*, *FIT1/3* y otros diez genes involucrados en la homeostasis del hierro (Outten y Albetel 2013; Yamaguchi-Iwai *et al.* 1995). Por otro lado, las altas concentraciones de hierro en la levadura son detectadas por el factor transcripcional Yap5, proteína que activa la expresión de los genes *CCC1*, *GRX4* y *TYW1*. La proteína Grx4 es una oxidoreductasa dependiente de glutatión y glutatión S-transferasa, que junto a Grx3 promueven la disociación de Aft1 de los promotores de los genes del regulón de hierro. La proteína Tyw1 promueve el secuestro de hierro como agrupaciones de Fe-S unidas a proteínas (Outten y Albetel 2013).



**Figura 13: Mecanismo de control transcripcional por Aft1 y Yap5 en condiciones de suficiencia de hierro.**

*Fuente: Outten y Albetel (2013)*

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

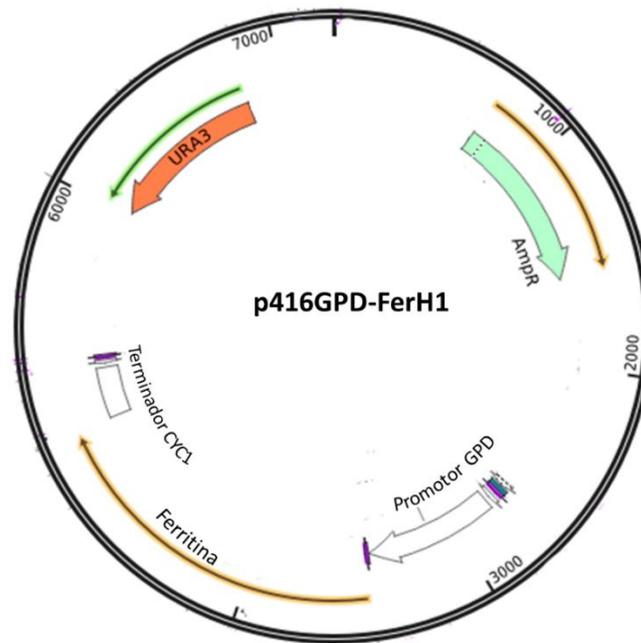
#### 3.1. LUGAR

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

#### 3.2. MATERIALES

##### 3.2.1. Cepas y plásmidos

- *Saccharomyces cerevisiae* (W303-1a) con genotipo: MATa (*leu2-3,112 his3-11,15 ura3-1 ade2-1 can1-100 trp1-1*) (Thomas y Rothstein 1989).
- *Escherichia coli* (TOP10) con genotipo: (*mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), Φ80lacZΔM15, ΔlacX74, deoR, recA1, araD139, Δ(araleu)7697, galU, galK, rpsL(StrR), endA1, nupG*).
- Plásmidos: p416GPD y p416GPD-FerH1 (Figura 14), proporcionados gentilmente por el Dr. Sergi Puig del Departamento de Biotecnología, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Paterna, Valencia – España (De Llanos *et al.* 2016). Los plásmidos constan de genes marcadores representados con flechas de color naranja y verde claro: *URA3* y *Amp<sup>R</sup>* que permiten la selección de los transformantes de levadura y *E. coli*, respectivamente. Además, consta de un sitio de multiclonación ubicado entre el promotor de expresión constitutiva (GPD) y el terminador *CYCI*. El ADNc de la ferritina de soya de la subunidad H1 clonado por De Llanos y colaboradores fue analizado en levaduras silvestres de laboratorio y una cepa que carece del gen *CCCI*.



**Figura 14: Principales características del plásmido p416GPD-FerH1. La flecha de color amarillo, muestra el ADNc de la ferritina de soja de la subunidad H1**

*Fuente: De Llanos et al. (2016)*

### 3.2.2. Materiales de uso rutinario

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

### 3.2.3. Medios de cultivo

- Agar y caldo LB (Luria Bertani): Medio de cultivo para *E. coli*
- Agar y caldo LB-Ampicilina: Medio de cultivo selectivo
- Agar y caldo -URA: Medio sintético que carece de uracilo (Ura) para la selección de transformantes de *S. cerevisiae*
- Agar y caldo YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose): Medio para el mantenimiento y propagación de levaduras

#### **3.2.4. Reactivos**

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

#### **3.2.5. Equipos**

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

### 3.3. MÉTODOS

#### 3.3.1. Obtención de una ferritina híbrida soya-arveja

Para la obtención de la ferritina híbrida se realizó una búsqueda bibliográfica de ferritinas que acumulan gran cantidad de hierro en su interior. De esta búsqueda se encontró que la ferritina de arveja presenta mejores características de acumulación de hierro que la ferritina de soya, en sus respectivas semillas. Adicionalmente, la ferritina de soya cuenta con mayor información estructural relevante, el cual facilita el estudio respecto a los cambios que fueron realizados y, además de haber sido expresada en la levadura (De Llanos *et al.* 2016). En contraste, la ferritina de arveja solo ha sido utilizada en ensayos *in vitro* para evaluar su estabilidad en ciertas condiciones ambientales y analizar su contenido de hierro (Hoppler *et al.* 2008; Perfecto *et al.* 2018). Dichas características permitieron diseñar una estrategia para la obtención de la ferritina híbrida.

#### Estrategia

En primer lugar, se realizó el alineamiento de las secuencias de la ferritina de soya y arveja. Se identificó una región de gran diversidad (rectángulo rojo de la Figura 6, sección 2.2) que, además, forma parte del canal de entrada del hierro de la ferritina. Por esta razón, se propuso investigar si el reemplazo de los residuos 204 a 208 presentes en la ferritina de soya por los de arveja podría resultar en una mejora de su capacidad quelante de hierro (Figura 15). Los residuos presentes en la ferritina de soya son PQLAD (prolina, glutamina, leucina, alanina y aspartato), mientras que los de arveja son LEMTH (leucina, glutamato, metionina, treonina e histidina).

Fragmento codificante para los aminoácidos 198 a 221 de la ferritina de soya:

```

  A D R N N D P Q L A D F I E S E F L S E Q V E S
  Ala Asp Arg Asn Asn Asp Pro Gln Leu Ala Asp Phe Ile Glu Ser Glu Phe Leu Ser Glu Gln Val Glu Ser
  TGGCAGATCGCAACAATGACCCTCAATTGGCAGACTTCATTGAAAGCGAGTTTTTGTCTGAACAGGTTGAATCAA
  ACCGCTAGCGTTGTTACTGGGAGTTAACCGTCTGAAGTAACTTTCGCTCAAAAACAGACTTGTCCAACCTAGTT

```

Reemplazo de los aminoácidos 204 a 208 para incluir los correspondientes a la ferritina de arveja:

```

  A D R N N D L E M T H F I E S E F L S E Q V E S
  Ala Asp Arg Asn Asn Asp Leu Glu Met Thr His Phe Ile Glu Ser Glu Phe Leu Ser Glu Gln Val Glu Ser
  TGGCAGATCGCAACAATGACTTGGAAATGACTCATTCATTGAAAGCGAGTTTTTGTCTGAACAGGTTGAATCAA
  ACCGCTAGCGTTGTTACTGAACCTTACTGAGTAAAGTAACTTTCGCTCAAAAACAGACTTGTCCAACCTAGTT

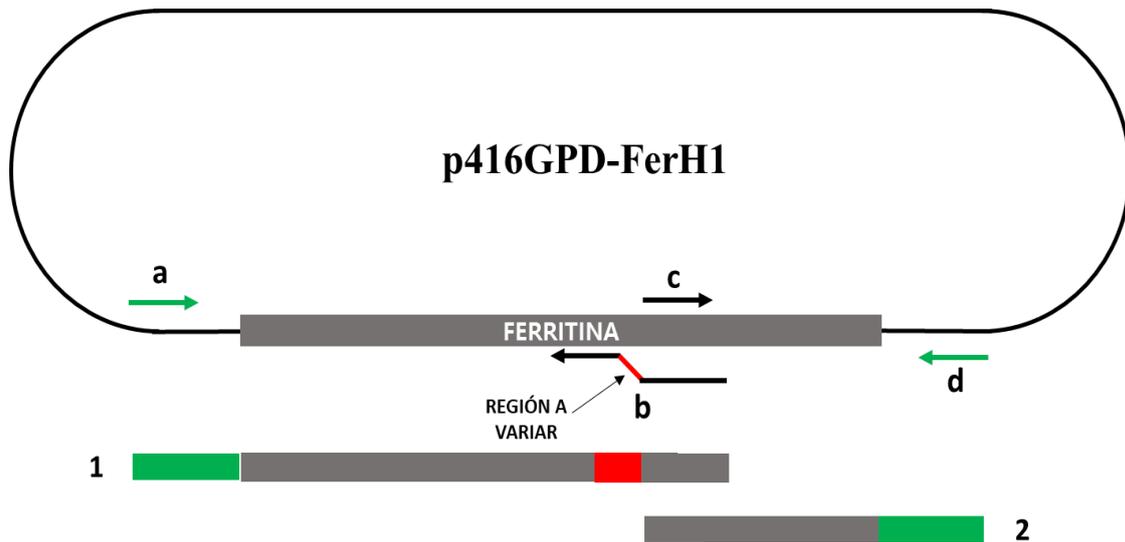
```

**Figura 15: Secuencia codificante para los aminoácidos de la ferritina de soya. La secuencia del panel superior corresponde a la ferritina de soya, en el que se muestra los codones que codifican los respectivos aminoácidos (de la posición 198 al 221) como alanina aspartato, arginina (o A D R al usar la abreviatura de una sola letra, o Ala Asp Arg al usar la de tres letras). Así mismo, incluye a la región a ser reemplazada (204 a 208, indicadas de color azul) para generar la ferritina híbrida soya-arveja. La secuencia del panel inferior muestra la inserción los aminoácidos de la ferritina de arveja (Pro204Leu Gln205Glu Leu206Met Ala207Thr Asp208His) en la secuencia de la ferritina de soya, dando lugar a la generación de la ferritina híbrida soya-arveja**

*Fuente: Edición Propia (2022)*

### **Procedimiento**

Para la obtención de la ferritina híbrida (FerSoy-Arv) se empleó la clonación *in vivo* de dos fragmentos de ADN (fragmentos “1” y “2”) en el plásmido p416GPD, siguiendo la estrategia descrita en la Figura 8b basados en estudios reportados anteriormente (Kitazono 2011). Los fragmentos “1” y “2” fueron obtenidos por PCR, usando como plantilla al plásmido p416GPD-FerH1 y los iniciadores (“a”, “b”, “c” y “d”) indicados en la Figura 16; dichos iniciadores incluyen la parte inicial y final de la secuencia del ADNc de la ferritina y secuencias comunes en sus extremos para permitir la recombinación homóloga. En la amplificación del fragmento “1”, se utilizaron los iniciadores “a” y “b”, el cual contiene una secuencia en rojo que representa secuencias que corresponden a las que se desean cambiar. Para el fragmento “2”, se utilizaron los iniciadores “c” y “d” amplificado corresponde en su totalidad a las secuencias de la ferritina de soya e incluye 40 nucleótidos homólogos al fragmento “1” para permitir la clonación de la secuencia completa en el plásmido.



**Figura 16: Representación de la estrategia empleada para la inclusión de los cambios deseados en la secuencia codificante de ferritina. Las regiones en color verde representan las secuencias del plásmido que flanquean al inserto y están presentes en los fragmentos 1 y 2 para permitir el correcto ensamblaje del plásmido mediante recombinación homóloga en la célula de *S. cerevisiae***

*Fuente: Edición propia (2022)*

- **Generación de fragmentos por PCR**

Como se describe en la Figura 16, en la obtención del Fragmento “1”, se utilizó como plantilla al plásmido p416GPD-FerH1 y los iniciadores “a” y “b” para la amplificación (ver Tabla 1). Este último (b), contiene 20 nucleótidos homólogos al plásmido para la amplificación (parte final del iniciador), 15 nucleótidos (en rojo) que corresponden a la secuencia a introducir, y 40 nucleótidos homólogos a la secuencia del Fragmento 2, que sirvieron para ensamblar los Fragmentos “1” y “2” junto con el plásmido p416GPD mediante recombinación homóloga. Para la obtención del Fragmento “2”, se utilizó el mismo plásmido como plantilla y los iniciadores “c” y “d” que contienen secuencias homólogas al fragmento 1 y al plásmido.

- **Diseño de los iniciadores**

En primer lugar, se secuenció el plásmido p416GPD-FerH1 enviado por el laboratorio del Dr. Sergi Puig, para verificar su identidad y diseñar los iniciadores mostrados en la Tabla 1.

**Tabla 1: Iniciadores utilizados para la amplificación y generación de ferritina híbrida soya-arveja.**

| NOMBRE   | SECUENCIA   | PROPÓSITO  |
|----------|---|--|
| <b>a</b> | AAACACCAGAACTTAGTTTCGACGGATTCTAGAACTA<br>GTGGATCCATGG                           | Amplificación del Fragmento “1”. El iniciador “a” empalma en una región corriente arriba al ADNc de la ferritina, mientras que el iniciador reverso “b” empalma dentro de la secuencia con las 20 últimas bases indicadas en negro. Además, en rojo se indican las 15 bases a cambiar (secuencia de ferritina de arveja) y las primeras 40 bases son homólogas a un extremo del fragmento “2” para la clonación. |
| <b>b</b> | TTGATTCAACCTGTTTCAGACAAAACTCGCTTTCAATG<br>AAATGAGTCATTTCAAAGTCATTGTTGCGATCTGCCA |  |
| <b>c</b> | TTCATTGAAAGCGAGTTTTTGTCTG   | Amplificación del Fragmento “2”. El iniciador “c” empalma dentro de la secuencia del ADNc de ferritina, mientras “d” empalma corriente abajo.  |
| <b>d</b> | AGACAACCTGAAGTCTAGGTCCCTA   |  |

*Fuente: Edición propia (2022)*

En el diseño se tuvo en cuenta la temperatura de fusión ( $T_m$ ) de los iniciadores utilizados en cada reacción de PCR, donde la  $T_m$  de “a” y “b” fueron similares, al igual que para “c” y “d”. Los iniciadores fueron sintetizados por la compañía MACROGEN INC (Seul, Corea).

- **Digestión del plásmido**

La levadura realiza la clonación *in vivo* con mayor eficiencia si el plásmido receptor, p416GPD en este caso, se encuentra linealizado. Para obtener el plásmido lineal, se usó la enzima de restricción *BamH1* que realiza un corte en el sitio de multiclonación. La reacción se realizó con un buffer estándar para la enzima según el protocolo sugerido por el proveedor. Se utilizó 1 µg del plásmido y se incubó durante 3 horas a 37 °C. Para evitar la recirculación del plásmido, se trató con fosfatasa antártica para eliminar los grupos fosfatos de los extremos 5' (Kitazono 2009).

### **3.3.2. Transformación de *Saccharomyces cerevisiae*.**

Se utilizó una suspensión de células de una cepa que carece del gen *CCCI* (cepa susceptible a hierro) en la fase exponencial de su crecimiento. Se utilizaron 150 ng de plásmido p416GPD linealizado previamente, 30 ng del fragmento “1” y 10 ng del fragmento “2”, las cantidades se proporcionaron de tal forma que no superen los 200 ng (Kitazono 2009). Las suspensiones celulares fueron tratadas con acetato de litio/TE y polietilenglicol al 50 por ciento durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación constante. Luego se aplicó un choque térmico en un baño María a 42 °C durante 20 minutos y después de recuperar el sedimento celular por centrifugación, se añadió caldo YPD, se homogenizó e incubó por una hora a temperatura ambiente. Las células tratadas fueron sembradas en medio sintético que carece de uracilo (-URA) para permitir el crecimiento y selección de los transformantes (Schiestl & Gietz 1989).

### **3.3.3. Ensayos de resistencia a hierro**

Se utilizaron levaduras transformantes que expresan la ferritina de soya nativa como control para los ensayos. Se prepararon placas con medio de cultivo -URA que contenía sulfato ferroso (a partir de una solución stock 200 mM en HCl 0,1 N) a diferentes concentraciones: 5, 8, 10, 13, 15, 17 y 20 mM, para así poder definir la concentración

letal para la cepa control. Las levaduras fueron sembradas en las distintas placas e incubadas a 30 °C durante 2 días.

### **3.3.4. Análisis de plásmidos**

#### **a. Extracción de ADN total de levaduras transformantes.**

Las suspensiones de levadura fueron tratadas con un buffer de ruptura (1,2 por ciento SDS, NaCl 100 mM, Tris 10 mM pH 8, EDTA 1 mM) y sometidas a una mezcla vigorosa con perlas de vidrio de 0,4 mm de diámetro en presencia de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), usando un agitador de vórtice (Schneegurt *et al.* 2003). El sobrenadante acuoso fue recuperado por centrifugación y luego tratado con isopropanol para la precipitación y etanol para el lavado de los ácidos nucleicos. El sedimento seco conteniendo los ácidos nucleicos totales finalmente fue disuelto en buffer TE (Tris-EDTA) (Schneegurt *et al.* 2003).

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

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

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

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

#### **c. Evaluación de la resistencia a altas concentraciones de hierro.**

Se utilizaron cultivos que estuvieron incubados en tubos con 4 mL de caldo –URA a 30 °C y agitación constante, hasta llegar a la fase estacionaria de su crecimiento. Posteriormente, se realizaron diluciones en serie de 1:3 de los cultivos en placas de 96 pocillos con agua destilada estéril. Finalmente, los cultivos diluidos se sembraron en alícuotas de 3  $\mu$ L en placas –URA que contenían sulfato ferroso 10 mM.

#### **d. Secuenciación de plásmidos**

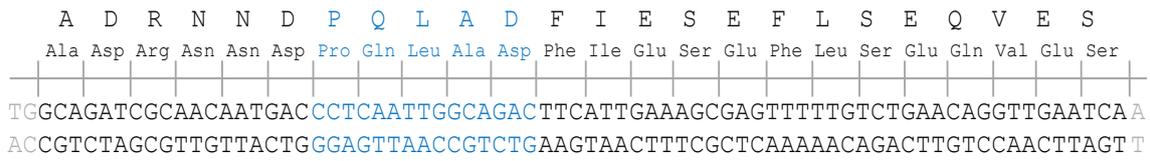
Los plásmidos de interés fueron purificados usando “Zyppy Plasmid Miniprep kit” (Zymo Research) y enviados para su secuenciamiento a la compañía MACROGEN INC.

### **3.3.5. Construcción de una biblioteca de plásmidos de variantes de ferritina en el dominio hidrofílico**

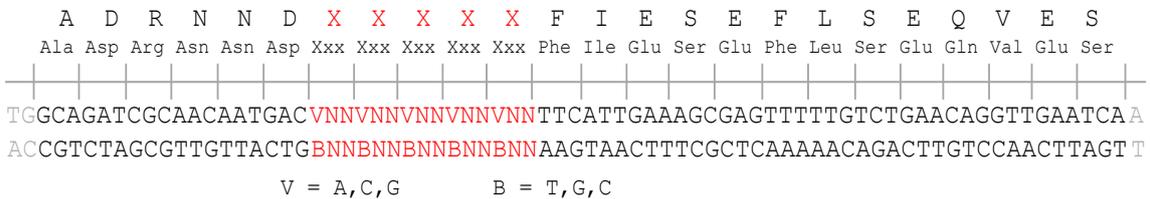
La biblioteca de plásmidos construida permitió la introducción de cambios en la región identificada como la más divergente entre las secuencias de la ferritina de soya y arveja, descrita en la sección 3.3.1. (Figura 17). A diferencia de la estrategia descrita en dicha sección en la que se generó un solo tipo de variante, la construcción de la biblioteca de plásmidos permite la generación de millones de variantes de ferritina con distintas secuencias, como se muestra en la Figura 17.

Para la construcción, se realizó un proceso similar a la obtención de la ferritina híbrida soya-arveja, con la diferencia que en esta metodología se utilizaron iniciadores “**b-t**” y “**b+t**” (ver Tabla 2), en lugar del iniciador “**b**” (Tabla 1). Para la obtención de fragmentos “**1**” se utilizaron los iniciadores “**a**” y “**b-t**” o “**b+t**”. Los iniciadores “**b-t**” y “**b+t**” se diferencian de “**b**” en los 15 nucleótidos en rojo y cumplen similar función como iniciadores “reversos”, permitiendo la obtención de los fragmentos “**1**”. Ambos iniciadores incluyen nucleótidos aleatorios en las dos últimas bases de cada codón (\*NN), permitiendo así la generación de codones aleatorios.

Fragmento codificante para los aminoácidos 198 a 221 de la ferritina de soya:



Reemplazo de los aminoácidos 204 a 208 para incluir aminoácidos aleatorios:



**Figura 17: Mutagénesis aleatoria en el fragmento que codifica para los aminoácidos 204 a 208 de la ferritina de soya. Se muestran posibles codones que representan aminoácidos con abreviaturas de una o tres letras. La letra V representa los nucleótidos A, C o G en la base en cada codón , para evitar codones de terminación**

*Fuente: Edición propia (2022)*

En el caso del iniciador “b-t” se logra excluir a la base timina en la primera posición de cada codón para evitar la generación de codones de terminación (TAA, TAG y TGA; ver Figura 18), mientras que en el caso del iniciador “b+t” sí se permite su inclusión. La inclusión de los codones de terminación causaría el prematuro término de la síntesis del respectivo polipéptido, produciendo variantes de ferritina con secuencias más cortas. Sin embargo, el uso del iniciador “b-t” evita la inclusión de los codones de los aminoácidos cisteína (TGT, TGC), triptófano (TGG), tirosina (TAT, TAC) y fenilalanina (TTT, TTC). Por esta razón, se requirió usar adicionalmente el iniciador “b+t” para permitir la inclusión de estos codones. La generación de dos tipos de fragmentos “1” permitió contar con todas las posibles secuencias codificantes para la eventual inclusión de todos los posibles 20 aminoácidos en cada posición, y asegurar una limitada presencia de codones de terminación.

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

**Figura 18: Fundamento de la estrategia seguida para la generación de secuencias codificantes aleatorias y la exclusión de codones de terminación.**

*Fuente: Edición propia (2022)*

En la figura 18 se muestra el código genético, que especifica la relación entre cada triplete de desoxirribonucleótidos (codón) y la inclusión de un aminoácido particular o la terminación de la síntesis, durante la síntesis de polipéptidos por los ribosomas. En esta representación, para cada triplete o codón, la primera base está determinada por las letras T, C, A y G ubicadas en la primera columna; la segunda base, por las letras de la primera fila; y la tercera base, por las letras de la última columna. Los codones de terminación e iniciación se indican sombreados en rojo y verde, respectivamente. La zona sombreada de amarillo incluye a los codones que tienen como primera base a la timina y, por tanto, éstos no serían generados cuando se usa el iniciador “b-t” causando así la exclusión de los correspondientes aminoácidos

Luego de generar millones de fragmentos “1” con las diferentes estrategias, estas se introdujeron en levaduras para permitir la construcción de la biblioteca de plásmidos. Para tal fin, se utilizaron 150 ng de plásmido p416GPD linealizado, 30 ng del fragmento “1” y 10 ng del fragmento “2”. Para el fragmento “1”, se usó una mezcla de los productos de PCR obtenidos usando los iniciadores “b-t” y “b+t” en una proporción aproximada de 29:1. La baja proporción de fragmentos “1” construidos por el iniciador “b+t” tuvo como finalidad disminuir la incidencia de codones de terminación.

**Tabla 2: Iniciadores utilizados para la amplificación y generación de las variantes de ferritina.**

| NOMBRE     | SECUENCIAS   | PROPÓSITO  |
|------------|--|--|
| <b>b-t</b> | TTGATTCAACCTGTTTCAGACAAAACTCGCTTTCAATG<br>AANNBNNBNNBNNBNNBGTTCATTGTTGCGATCTGCCA | Iniciador reverso para la obtención de fragmentos “1”. Las últimas 20 y los primeros 40 bases tienen la misma función que en el iniciador “b”. La letra N en rojo representa a los nucleótidos A, T, G y C, mientras que la letra B a los nucleótidos T, G y C.  |
| <b>b+t</b> | TTGATTCAACCTGTTTCAGACAAAACTCGCTTTCAATG<br>AANNANNANNANNANNAGTTCATTGTTGCGATCTGCCA | Iniciador reverso para la obtención de fragmentos “1”. Se diferencia de “b-t” en la inclusión de la base “A” en cada triplete aleatorio, de tal manera que dan lugar a la inclusión de timina como primera base de cada codón del ADN codificante permitiendo la generación de codones para los aminoácidos fenilalanina, tirosina, cisteína, triptófano y de terminación. |

*Fuente: Edición propia (2022)*

### **3.3.6. Ensayos de cuantificación de hierro**

Se utilizaron muestras de levaduras que fueron cultivadas en caldo –URA que contenía 2 mM sulfato ferroso. La cuantificación fue realizada por la empresa Sociedad de Asesoramiento Técnico S.A.C. (SAT). Según lo reportado, la cuantificación se realizó mediante espectrometría de absorción atómica basada en la norma NOM 117-SSA1 (1994).

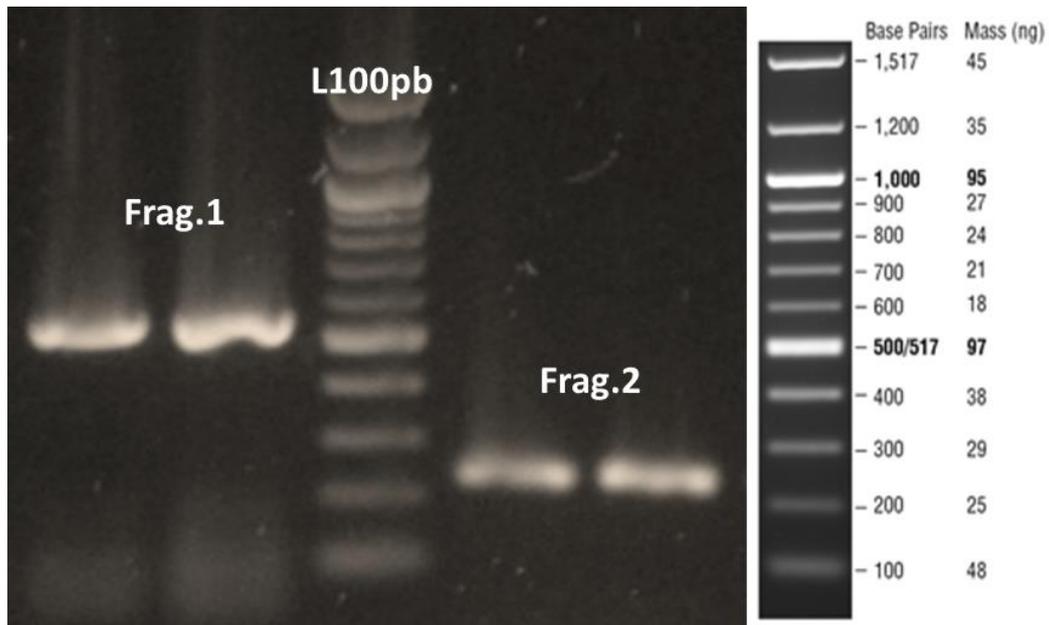
## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. OBTENCIÓN DE FERRITINA HÍBRIDA SOYA – ARVEJA

#### 4.1.1. Variación de secuencias de la ferritina de soya

La ferritina de soya comparada con otras fitoferritinas cuenta con mayor información estructural relevante, por lo que es posible realizar un análisis detallado acerca de sus dominios y las funciones que desempeñan (Masuda *et al.* 2010). En este contexto, la alineación de las secuencias aminoacídicas de las ferritinas de soya y arveja (ver Figura 6), mostró que las zonas de actividad ferroxidasa se mantenían conservadas, y también se encontró una zona de variabilidad conformada por cinco aminoácidos (204 a 208) que forman parte del canal hidrofílico encargado de la entrada del hierro.

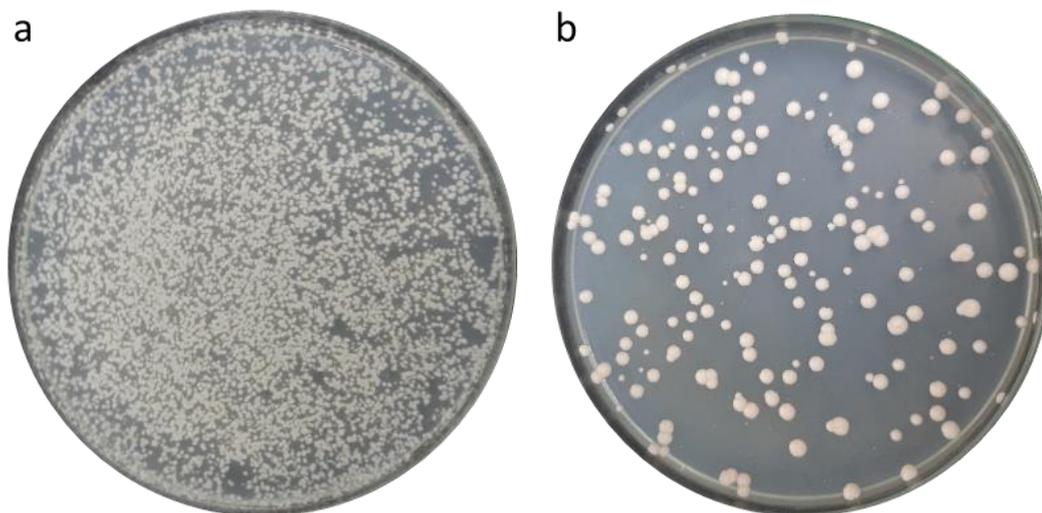
Luego de encontrar una zona de alta variabilidad conformada por cinco aminoácidos (204 a 208), se procedió con la generación de fragmentos que contienen los cambios para que la levadura los pueda clonar. La amplificación de los fragmentos “1” y “2” fue confirmada mediante análisis electroforético en gel de agarosa al 1,0 por ciento. La estimación se infiere por comparación con el marcador “L100pb” que muestra tamaños conocidos en las diferentes bandas. Como se muestra en la Figura 19, el fragmento “1” tiene una longitud aproximada de 560 pb, y el fragmento “2” una longitud de 240 pb, los cuales son los tamaños esperados. La utilización de iniciadores o cebadores de tamaño considerable (75 pb como es el caso de esta investigación) para realizar cambios dirigidos en una secuencia de ADN, es una de las herramientas más importantes en biología molecular con gran efectividad en muchas investigaciones, por lo que se necesita un diseño sin errores de los iniciadores de tal forma que puedan superponerse a la cadena molde (Zhang *et al.* 2021).



**Figura 19: Análisis electroforético de productos de PCR de los fragmentos “1” y “2”. Alícuotas de dos reacciones de PCR por cada fragmento fueron analizadas en un gel electroforético que contenía 1,0 por ciento de agarosa. A la derecha se muestra las características del marcador “L100pb”**

#### 4.1.2. Clonación *in vivo*

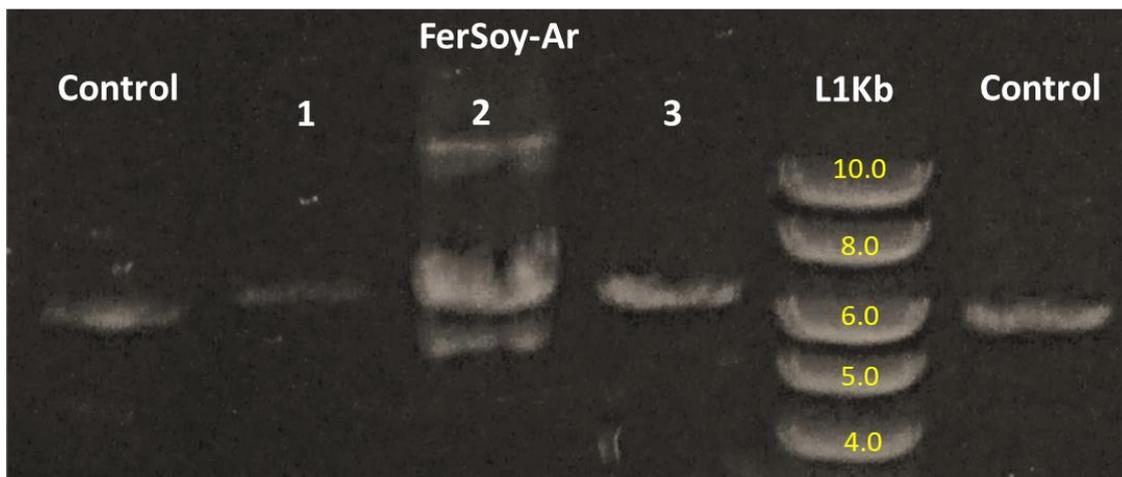
La Figura 20 muestra resultados representativos de ensayos de transformación. En promedio se obtuvo una eficiencia de transformación de  $4.1 \times 10^4$  UFC/ $\mu$ g de ADN para las células que fueron tratadas con el plásmido lineal y los fragmentos 1 y 2 (panel a), y  $0.4 \times 10^4$  UFC/ $\mu$ g de ADN para las que recibieron solo el plásmido p416GPD linealizado (control). Se ha reportado que el método de transformación que utiliza acetato litio es de aproximadamente  $5 \times 10^6$  -  $1 \times 10^7$ / $\mu$ g de ADN plasmídico en cepas silvestres de laboratorio (Gietz y Woods 2002). La cepa utilizada carente del gen *CCCI* se encuentra condicionada a tener dificultades en su homeostasis, sobre todo su aumento a la sensibilidad a metales (Chen & Kaplan 2000), por lo que posiblemente la cepa presentará problemas de recuperación al finalizar la transformación. Sin embargo, la eficiencia para la clonación *in vivo* es elevada en comparación al control (p416GPD), ya que solo la presencia de los fragmentos 1 y 2 en las mezclas de transformación permitió el ensamblaje correcto del plásmido. De esta manera se pudo estimar que más del 90 % de las colonias obtenidas expresaban la ferritina híbrida soya-arveja.



**Figura 20: Ejemplo representativo de resultados de la transformación de células de levadura. Las mezclas de transformación fueron esparcidas en medio selectivo que carece de uracilo, para evitar el crecimiento de las células que no recibieron el plásmido o no lograron recircularizarlo. Panel “a”: células transformadas con el plásmido linealizado y los fragmentos 1 y 2, y que probablemente expresan la variante de ferritina soya-arveja. Panel b: células transformadas únicamente con el plásmido linealizado**

#### **4.1.3. Análisis de los transformantes que producen la variante híbrida**

Para verificar la correcta clonación de los productos de PCR, se seleccionaron al azar tres colonias transformantes de la Figura 20a. Los plásmidos extraídos y amplificados de las colonias seleccionadas se digirieron con la enzima de restricción *Bam*H1. Como se muestra en la Figura 21, el gel electroforético que contiene 0,8 por ciento de agarosa mostró que las colonias “1” y “3” contenían una sola banda y con un tamaño aproximado de 6500 pb, mayor al plásmido p416GPD digerido “control” (5778 pb). En la colonia “2” aparentemente la digestión fue parcial, por la presencia de otras bandas que posiblemente son distintos plegamientos del plásmido circular. En el gel electroforético se utilizó el marcador “L1Kb” que contiene diez fragmentos de ADN de extremos que varían de 500 pb a 10 kilobases (Kb) para verificar los tamaños de los productos digeridos.



**Figura 21: Análisis electroforético de plásmidos que contienen la ferritina híbrida soya-arveja. El análisis electroforético se realizó en gel de agarosa al 0,8 por ciento. Control: plásmido p416GPD digerido que muestra un tamaño cercano a 6,0 Kb, según el marcador L1Kb. FerSoy-Ar (1, 2 y 3): plásmidos digeridos de las colonias escogidas al azar, que muestran un tamaño superior a 6,0 Kb. L1Kb: marcador de 1 Kb**

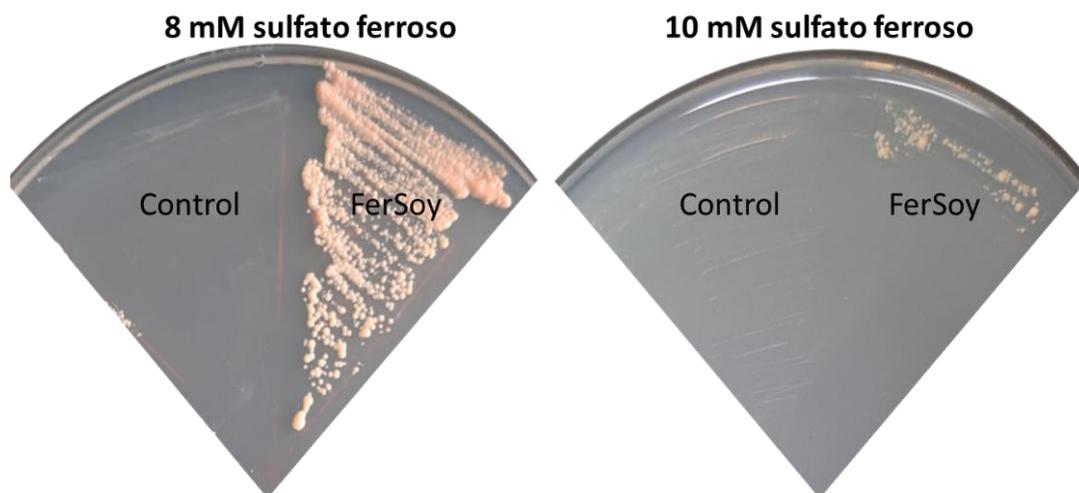
La secuenciación realizada por MACROGEN INC confirmó que los cambios realizados en los 15 nucleótidos se realizaron con éxito en los plásmidos de las tres colonias escogidas al azar (ANEXO 1). Este análisis demostró un 100 % de eficiencia en la estrategia de clonación *in vivo* aplicada, con la totalidad de las secuencias esperadas. Kitazono (2011), reportó una eficiencia de 54 por ciento de una correcta clonación evaluados en el fenotipo de transformantes de *E. coli*, dicho reporte fue resultado del análisis de miles de transformantes, mientras que en el presente estudio se evaluaron solo tres colonias al azar de los miles de transformantes obtenidos.

## **4.2. EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A HIERRO DE LA FERRITINA HÍBRIDA SOYA-ARVEJA**

### **4.2.1. Optimización de la concentración de hierro para ensayos de resistencia**

Los ensayos se realizaron con el fin de encontrar una concentración de hierro en los medios de cultivo que dificulte el crecimiento de cepas de levadura que producen ferritina de soya nativa (FerSoy). Bajo este criterio se obtendría una concentración límite en el

cual, las variantes de ferritina generadas debieran tolerar o tener un mejor crecimiento respecto a las cepas FerSoy. En los ensayos a diferentes concentraciones de sulfato ferroso, se demostró que en medio –URA conteniendo sulfato ferroso 10 mM las cepas FerSoy mostraban solo un crecimiento moderado. Como se muestra en la Figura 22, la placa –URA que contiene sulfato ferroso 8 mM no es una concentración letal para la cepa FerSoy, debido a que tiene un crecimiento uniforme en toda el área de siembra. En placas –URA que contiene sulfato ferroso 12 mM (no mostrado) las cepas no mostraban ningún tipo de crecimiento. De Llanos y colaboradores (2016) reportaron que la cepa de levadura BY4741 (carente de *CCCI*) que produce ferritina de soya (subunidad H1) no crece a partir de 8 mM de sulfato de amonio y hierro (II), mostrando resultados similares a pesar que las cepas y los químicos utilizados no son de la misma naturaleza.

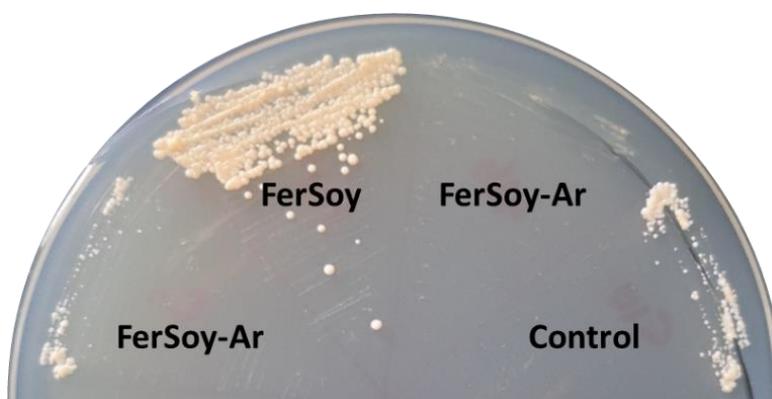


**Figura 22: Optimización de los ensayos de resistencia a hierro de la ferritina nativa.** En la figura se puede apreciar las siembras de las cepas que producen ferritina de soya nativa (FerSoy), y transformantes con el plásmido p416GPD (Control) en placas –URA dosificadas con sulfato ferroso. La cepa FerSoy mostró un buen crecimiento a una concentración de sulfato ferroso 8 mM, mientras que a 10 mM el crecimiento es mínimo. La cepa control no mostró crecimiento a ambas concentraciones. Las placas fueron incubadas durante 4 días a 30 °C

#### 4.2.2. Evaluación de resistencia de ferritina híbrida soya-arveja

Luego de identificar la concentración óptima de sulfato ferroso para realizar los ensayos, los transformantes de ferritina híbrida (FerSoy-Ar) se sometieron a ensayos de

crecimiento en placas -URA dosificadas con sulfato ferroso 10 mM. Las cepas que producen la ferritina híbrida mostraron un crecimiento similar al control (p416GPD). El ensayo mostrado en la Figura 23 es una muestra representativa de tres repeticiones realizadas con diferentes colonias de transformantes.



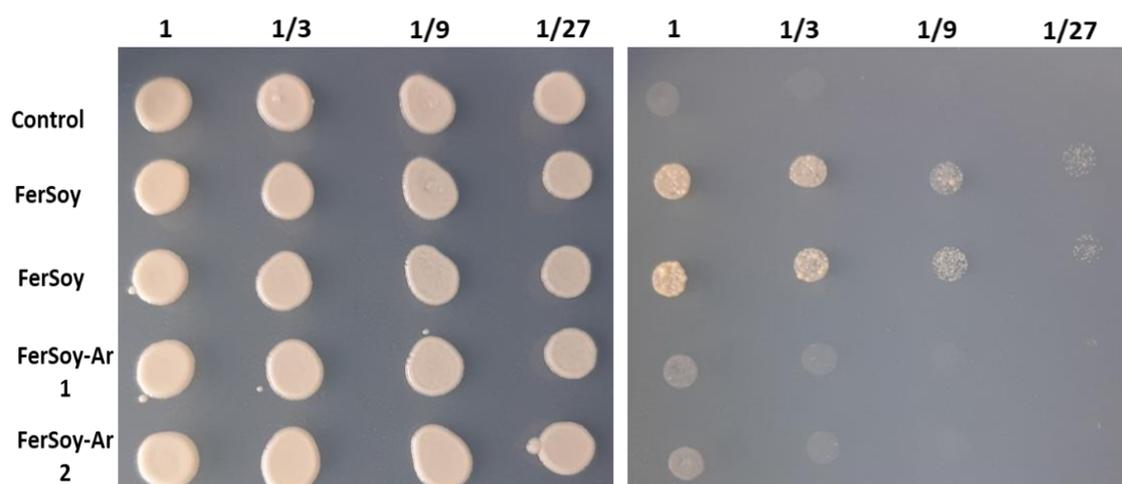
**Figura 23: Ensayo de resistencia a hierro de cepa que produce la ferritina híbrida. Se muestra la mitad de una placa -URA que contiene sulfato ferroso 10 mM, con siembras de cepas control (p416GPD), FerSoy-Ar (ferritina híbrida) y FerSoy (ferritina nativa de soya). La cepa FerSoy-Ar mostró un crecimiento muy similar a la cepa control, mientras que la cepa FerSoy tuvo un ligero crecimiento. Las placas fueron incubadas durante 4 días a 30 °C**

Los ensayos mediante diluciones en serie se realizaron con el fin de obtener una mejor resolución del crecimiento de las cepas en evaluación. Los cultivos de las diferentes cepas fueron tratados con ultrasonido antes de sus diluciones, para poder separar los agregados celulares. Como se muestra en la Figura 24, el crecimiento de las cepas que producen la ferritina híbrida es similar a la cepa control, mientras la cepa FerSoy mostró un mejor crecimiento.

Estos resultados demuestran que el reemplazo de los aminoácidos 204 – 208 de la ferritina de soya por los presentes en la ferritina de arveja (Pro204Leu Gln205Glu Leu206Met Ala207Thr Asp208His) tuvieron un efecto negativo en su estructura y función. En la alineación de las secuencias aminoacídicas de las ferritinas de soya y arveja mostradas en la Figura 6 se mostraban otros aminoácidos cercanos a la zona de variación que diferían entre las ferritinas. Estos aminoácidos se encuentran en una zona en la cual el hierro se

traslada hacia los sitios de actividad ferroxidasa (Masuda *et al.* 2015), por lo que es posible que el traslado del metal no se realice correctamente.

Se ha reportado que las subunidades de la ferritina se ensamblan en el interior de la levadura exitosamente, permitiendo una mayor acumulación y tolerancia a hierro (De Llanos *et al.* 2016; Kim *et al.* 2003). Sin embargo, debido a los resultados de resistencia con la ferritina híbrida, es necesario comprobar si el cambio realizado en la secuencia afectó en el ensamblado de las subunidades.



**Figura 24: Ensayo de resistencia a hierro mediante diluciones en serie de cepas que producen ferritina híbrida soya-arveja. El ensayo se realizó en placas que contenían sulfato ferroso 10 mM y fueron incubadas durante 4 días. La cepa FerSoy mostró un mejor crecimiento que la cepa FerSoy-Ar**

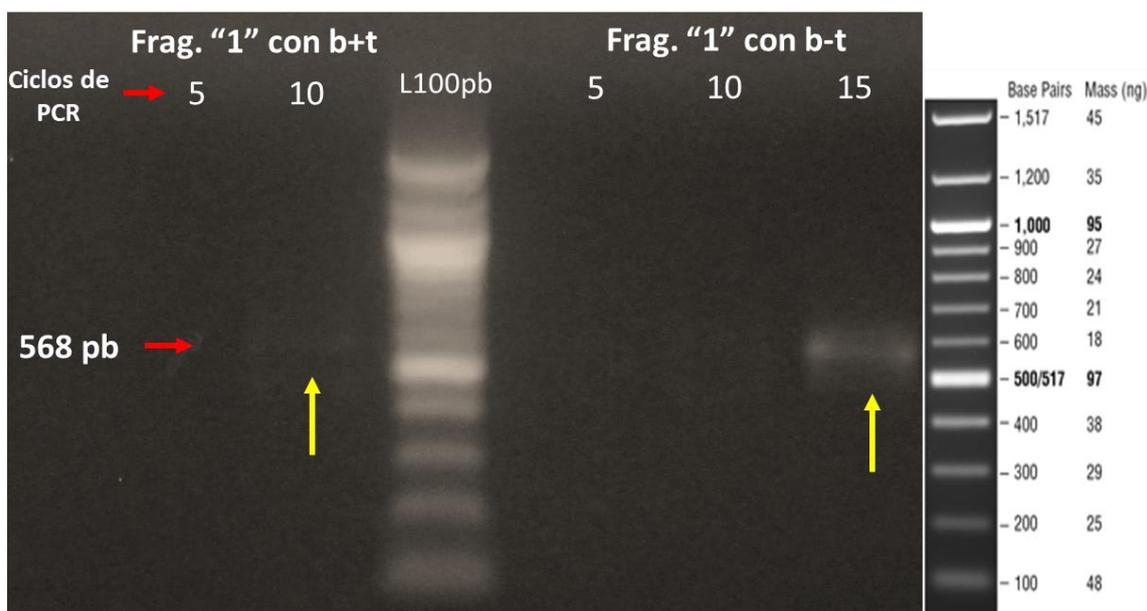
El sorprendente efecto negativo del reemplazo de las secuencias de los aminoácidos 204-208 de la ferritina de soya demostró además que esta región es clave para conferir resistencia a hierro y, por tanto, podría tener una función clave en la capacidad de acumulación del metal. Sería por tanto plausible que esta región requiera cambios específicos en algunos o todos esos aminoácidos, que no corresponden a los introducidos al generar la variante híbrida Soy-Ar. Para estudiar esta posibilidad, se planteó la necesidad de construir una biblioteca de plásmidos que permita la inclusión de aminoácidos aleatorios en las posiciones 204 – 208, que podría posteriormente ser usada en la búsqueda de variantes que permiten una mayor acumulación de hierro.

### 4.3. CONSTRUCCIÓN DE UNA BIBLIOTECA DE PLÁSMIDOS PARA LA GENERACION DE VARIANTES ALEATORIAS DE FERRITINA.

La biblioteca de plásmidos construida permite la inclusión de aminoácidos aleatorios en cada una de las cinco posiciones (204 a 208), lo que podría dar lugar por tanto a la síntesis de 3,2 millones ( $20^5$ ) de variantes de ferritina posibles.

#### 4.3.1. Generación de variantes de ferritina por PCR

Como se describió en las Figuras 17 y 18 y la Tabla 2, para la generación de la biblioteca de plásmidos se usaron dos diferentes tipos de fragmentos “1”, uno construido con el iniciador “b-t” y el otro con “b+t”. Debido a la enorme diversidad de secuencias en los iniciadores, se esperaba una baja eficiencia en las amplificaciones por PCR y por tanto fue necesario optimizarlas, tomando como principal factor el número de ciclos. Se realizaron ensayos con amplificaciones que incluían 5, 10 o 15 ciclos, determinándose que el número óptimo de ciclos fue de 10 para las amplificaciones con el iniciador “b+t”, y de 15 ciclos para “b-t”.



**Figura 25:** Análisis electroforético de productos de PCR de los fragmentos “1” utilizando los iniciadores “b+t” y “b-t”. En la parte izquierda se muestran amplificaciones del Frag. “1” utilizando el iniciador “b+t” que posiblemente incluyan codones de terminación, y Frag. “1” con el iniciador “b-t” que evita su inclusión. Se utilizó un gel electroforético al 1,0 por ciento de agarosa. L100pb:

**marcador de 100 pb. La longitud de todos los productos de PCR fue de 568. Las bandas señaladas con las flechas en amarillo corresponden a las reacciones que permitieron una óptima producción del fragmento**

#### **4.3.2. Transformación de levaduras con la biblioteca de plásmidos**

Luego de realizar las combinaciones de los fragmentos “1” construidos por los iniciadores “a”, “b-t” y “b+t”, se prepararon alícuotas con concentraciones adecuadas para cada reacción de transformación. Se utilizaron 150 ng del plásmido p416GPD linealizado, 10 ng del fragmento “2”, un aproximado de 29 ng del fragmento “1” obtenido con el iniciador “b-t” y 1 ng del correspondiente a “b+t”. Para verificar la eficiencia de la transformación y clonación *in vivo*, se realizaron un total de seis reacciones de transformación, obteniéndose una eficiencia promedio de transformación de  $3.1 \times 10^4$  UFC/ $\mu$ g de ADN de los cuales existen transformantes que contienen solo el plásmido. En una tesis realizada por Chávez en el 2018, el cual utilizó la misma cepa de levadura y un plásmido de mayor tamaño, obtuvo una eficiencia de clonación de 50 a 86 por ciento a partir de fragmentos que generaban una biblioteca de plásmidos, resultados similares de Joska y sus colaboradores (2014). En base a los resultados obtenidos y a la alta eficiencia de clonación *in vivo* de la levadura, la biblioteca construida bajo las condiciones usadas podrá posteriormente ser aplicada para la identificación de variantes de ferritina que confieren aumentada resistencia a hierro.

#### **4.4. CUANTIFICACIÓN DE HIERRO EN LEVADURAS QUE PRODUCEN FERRITINA**

Con el propósito de establecer si las condiciones de cultivo y tratamiento usadas podrían dar lugar a la acumulación de hierro en los transformantes de levadura, se realizaron los ensayos con levaduras que producen la ferritina de soya y a una cepa control transformada únicamente con el plásmido p416GPD, obteniéndose 341.6 y 166.7 mg/kg, respectivamente.

Es interesante destacar que el contenido de hierro de la levadura de cerveza comercial obtenida sin suplementación de hierro es de 98 mg/kg, según las Tablas Peruanas de Composición de los Alimentos (MINSA 2017b). Por tanto, es posible inferir que la inclusión de sales de hierro en el medio de cultivo permite un aumento en su contenido celular, aún en células que no producen la ferritina (cepa control). Asimismo, estos

resultados demuestran que la producción de ferritina en la levadura puede generar un aumento considerable en los niveles de acumulación de hierro. Sin embargo, para su aplicación como suplemento nutricional de hierro, se considera que los niveles óptimos en la levadura deberían superar los 2000 mg/kg. Para lograrlo, será necesario encontrar variantes de ferritina con mejorada capacidad de acumulación de hierro o implementar alguna otra estrategia basada en otros quelantes o cambios en las condiciones de cultivo y suplementación de hierro.

## V. CONCLUSIONES

La construcción de una variante híbrida soya-arveja de ferritina no elevó la capacidad de acumulación de hierro en la levadura, demostrándose en los ensayos de resistencia a hierro. Sin embargo, se identificó que la región cambiada es de gran importancia para la ferritina para poder iniciar la interacción con el hierro. Además, la estrategia de clonación *in vivo* en *Saccharomyces cerevisiae* permitió la eficiente construcción del plásmido para la producción de la ferritina híbrida, con cambios en las posiciones 204 a 208 (Pro204Leu Gln205Glu Leu206Met Ala207Thr Asp208His) corroborados por secuenciación. En adición, se implementó exitosamente una estrategia para la construcción de una biblioteca de plásmidos para la producción de variantes de ferritina de soya con cambios aleatorios en las posiciones 204 – 208.

## **VI. RECOMENDACIONES**

1. Continuar con el tamizado de la biblioteca de plásmidos que contienen las variantes de ferritina que confieren mayor resistencia a hierro, aplicando el protocolo optimizado para la construcción de la biblioteca.
2. Implementar estrategias alternas para la identificación de cepas de levadura con alto contenido de hierro.
3. En caso se obtenga una cepa de levadura que acumule gran porcentaje de hierro, realizar ensayos de biodisponibilidad en animales menores.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, G. J., Frazer, D. M., & McLaren, G. D. 2009. Iron absorption and metabolism. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e32831ef1f7>.
- Armitage, A. E. 2019. The Importance of Iron Status for Young Children in Low- and Middle-Income Countries : *A Narrative Review. Id*, 1–31.
- Buckholz, R. G., & Gleeson, M. A. G. 1991. Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. *Bio/Technology*, 9(11), 1067–1072. <https://doi.org/10.1038/nbt1191-1067>.
- Chávez Untiveros, G. P. 2018. Construcción de una biblioteca de plásmidos para la producción de oligopéptidos de variadas secuencias en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. UNALM.
- Chen, O. S., & Kaplan, J. 2000. *CCCI* suppresses mitochondrial damage in the yeast model of Friedreich’s ataxia by limiting mitochondrial iron accumulation. *Journal of Biological Chemistry*, 275(11), 7626–7632. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.11.7626>.
- De Llanos, R., Martínez-Garay, C. A., Fita-Torró, J., Romero, A. M., Martínez-Pastor, M. T., & Puig, S. 2016. Soybean Ferritin Expression in *Saccharomyces cerevisiae* Modulates. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(10), 3052–3060. <https://doi.org/10.1128/AEM.00305-16>.Editor.
- Gellissen, G., Melber, K., Janowicz, Z. A., Dahlems, U. M., Weydemann, U., Piontek, M., Strasser, A. W., & Hollenberg, C. P. 1992. Heterologous protein production in yeast. *Antonie Van Leeuwenhoek* 62: 79–93. <https://doi.org/10.1007/BF00584464>.
- Gietz, R. D., & Woods, R. A. 2002. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in Enzymology*, 350(2001), 87–96. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)50957-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(02)50957-5).
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., & Oliver, S. G. 1996. Life with 6000

Genes. *Science*, 274, 546–567. <https://doi.org/jyu>.

- Gómez Guizado, G., Barboza del Carpio, J., Munares García, O., Tarqui Mamani, C., & Cosser Gamarra, C. 2015. Vigilancia del estado nutricional en niños y gestantes – I semestre 2015. *Boletín Instituto Nacional de Salud*, 21, 147–154.
- González Urrutia, R. 2005. Biodisponibilidad del hierro. *Revista Costarricense de Salud Pública*, 14(26), 6–12. [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1409-14292005000100003&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-14292005000100003&lng=en&nrm=iso&tlng=es).
- Goto, F., Yoshihara, T., Shigemoto, N., Toki, S., & Takaiwa, F. 1999. Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. *Nature Biotechnology*, 17(3), 282–286. <https://doi.org/10.1038/7029>.
- Hallberg, L., Rossander-Hulthén, L., Brune, M., & Gleerup, A. 1992. Inhibición por calcio 1993.pdf. *British Journal of Nutrition*, 69, 533–540.
- Hoppler, M., Schönbächler, A., Meile, L., Hurrell, R. F., & Walczyk, T. 2008. Ferritin-Iron Is Released during Boiling and In Vitro Gastric Digestion. *The Journal of Nutrition*, 138(5), 878–884. <https://doi.org/10.1093/jn/138.5.878>.
- Hua, S. Bing, Qiu, M., Chan, E., Zhu, L., & Luo, Y. 1997. Minimum length of sequence homology required for in vivo cloning by homologous recombination in yeast. *Plasmid*, 38(2), 91–96. <https://doi.org/10.1006/plas.1997.1305>.
- INS. 2020. Situación actual de anemia en el país. <https://anemia.ins.gob.pe/situacion-actual-en-el-pais>.
- Joska, T. M., Mashruwala, A., Boyd, J. M., & Belden, W. J. 2014. A universal cloning method based on yeast homologous recombination that is simple, efficient, and versatile Tammy. *Physiology & Behavior*, 100(1), 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.11.013.A>.
- Kalgaonkar, S., & Lönnerdal, B. 2009. Receptor-mediated uptake of ferritin-bound iron by human intestinal Caco-2 cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 20(4), 304–311. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2008.04.003>.
- Kim, H. J., Kim, H. M., Kim, J. H., Ryu, K. S., Park, S. M., Jahng, K. Y., Yang, M. S., & Kim, D. H. 2003. Expression of heteropolymeric ferritin improves iron storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 1999–2005. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.1999-2005.2003>.
- Kispal, G., Csere, P., Prohl, C., & Lill, R. 1999. The mitochondrial proteins

Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe / S proteins. *The EMBO Journal* 18(14), 3981–3989.

- Kitazono, A. A. 2009. Improved gap-repair cloning method that uses oligonucleotides to target cognate sequences. *Yeast*, 26(July), 497–505. <https://doi.org/10.1002/yea>.
- Kitazono, A. A. 2011. Optimized protocols and plasmids for *in vivo* cloning in yeast. *Gene*, 484(1–2), 86–89. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.06.006>
- Kwok, E., & Kosman, D. 2005. Iron in yeast: Mechanisms involved in homeostasis. 14(July). <https://doi.org/10.1007/4735>.
- Li, L., Chen, O. S., Ward, D. M. V., & Kaplan, J. 2001. *CCCI* Is a Transporter That Mediates Vacuolar Iron Storage in Yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 276(31), 29515–29519. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103944200>.
- Marschner, H. 1995. Functions of Mineral Nutrients: IV Micronutrients J ©. *ACADEMIC PRESS*, 313–404.
- Martínez, C., Ros, G., Periago, M. J., & López, G. 1999. Biodisponibilidad del hierro de los alimentos. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 49(2), 106–113.
- Masuda, T., Goto, F., & Yoshihara, T. 2001. A Novel Plant Ferritin Subunit from Soybean That is Related to a Mechanism in Iron Release. *Journal of Biological Chemistry*, 276(22), 19575–19579. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011399200>.
- Masuda, T., Goto, F., Yoshihara, T., & Mikami, B. 2010. Crystal structure of plant ferritin reveals a novel metal binding site that functions as a transit site for metal transfer in ferritin. *Journal of Biological Chemistry*, 285(6), 4049–4059. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.059790>.
- Masuda, T., Yamamoto, A., & Toyohara, H. 2015. The iron content and ferritin contribution in fresh, dried, and toasted nori, *Pyropia yezoensis*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 79(1), 74–81. <https://doi.org/10.1080/09168451.2014.968087>.
- MINSA. 2017a. Plan Nacional para la reducción y control de la anemia materna Infantil y la Desnutrición Crónica Infantil en el Perú: 2017-2021. <http://www.minsa.gob.pe/>.
- MINSA. 2017b. Tablas de composición de alimentos de Perú. In *Repositorio.Ins.Gob.Pe* (10ma ed., Issue 56). <https://repositorio.ins.gob.pe/xmlui/bitstream/handle/INS/1034/tablas-peruanas->

QR.pdf?sequence=3&isAllowed=y.

- Moreno Cermeño, A. J. 2011. Papel *YFHI* en la homeostasis del hierro y su relación con el estrés oxidativo en *Saccharomyces cerevisiae*. UNIVERSITAT DE LLEIDA.
- Moslehi-jenabian, S., Pedersen, L. L., y Jespersen, L. 2010. Beneficial Effects of Probiotic and Food Borne Yeasts on Human Health. *Nutrients* 2. 449–473. <https://doi.org/10.3390/nu2040449>.
- Outten, C. E., & Albetel, A.-N. 2013. Iron Sensing and Regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: Ironing Out the Mechanistic Details. *Curr Opin Microbiol.*, 23(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>.
- Perfecto, A., Rodriguez-Ramiro, I., Rodriguez-Celma, J., Sharp, P., Balk, J., & Fairweather-Tait, S. 2018. Pea ferritin stability under gastric pH conditions determines the mechanism of iron uptake in Caco-2 cells. *Journal of Nutrition*, 148(8), 1229–1235. <https://doi.org/10.1093/jn/nxy096>.
- Qiu, A., Jansen, M., Sakaris, A., Min, S. H., Chattopadhyay, S., Tsai, E., Sandoval, C., Zhao, R., Akabas, M. H., & Goldman, I. D. 2006. Identification of an Intestinal Folate Transporter and the Molecular Basis for Hereditary Folate Malabsorption. *Cell*, 127(5), 917–928. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.041>.
- Ragland, M., Briat, J. F., Gagnon, J., Laulhere, J. P., Massenet, O., & Theil, E. C. 1990. Evidence for conservation of ferritin sequences among plants and animals and for a transit peptide in soybean. *Journal of Biological Chemistry*, 265(30), 18339–18344. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)44757-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)44757-0).
- Ramazzotti, A., Vanmansart, V., & Foury, Ñ. 2004. Mitochondrial functional interactions between frataxin and Isu1p , the iron-sulfur cluster scaffold protein , in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 557 (1-3), 215–220. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01498-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01498-4).
- San Martín, C., Garri, C., Pizarro, F., Walter, T., Theil, E., & Núñez, M. 2008. NIH Public Access. *The Journal of Nutrition*, 23(1), 1–7.
- Sánchez del Castillo, M. J., Gálvez, N. (dir. tes. ., & Dominguez Vera, J. M. (dir. tes. . 2018. Iones metálicos en la neuroquímica de ferritina y frataxina. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=150434&orden=0&info=link%0A> <https://dialnet.unirioja.es/servlet/exttes?codigo=150434>.
- Schiestl, R. H., & Gietz, D. R. 1989. High efficiency transformation of intact yeast

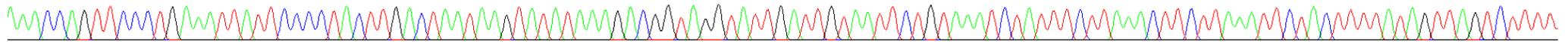
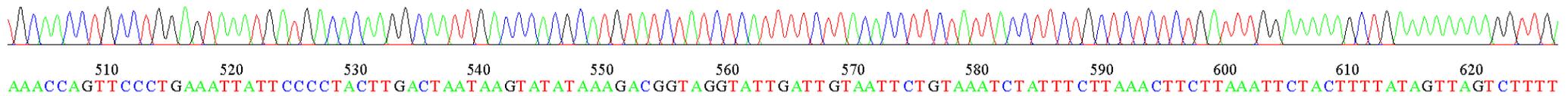
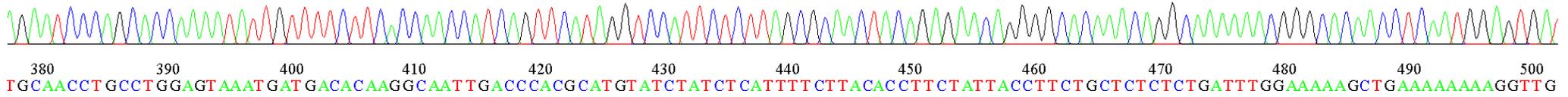
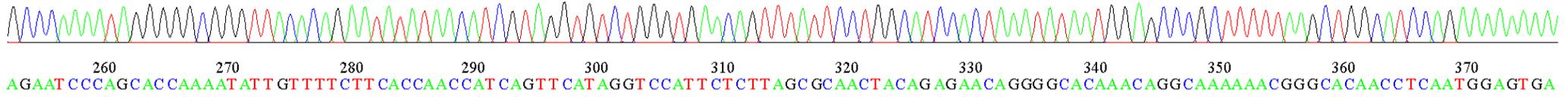
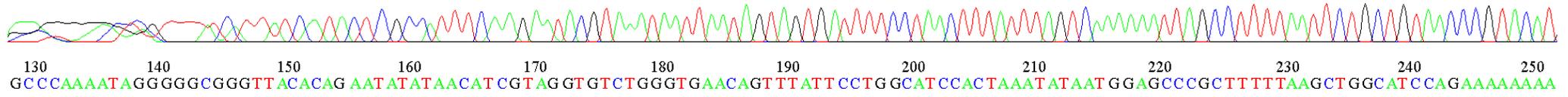
cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Current Genetics*, 16(5–6), 339–346. <https://doi.org/10.1007/BF00340712>.

- Schneegurt, M. a, Dore, S. Y., & Kulpa, C. F. 2003. Direct extraction of DNA from soils for studies in microbial ecology. *Current Issues in Molecular Biology*, 5(1), 1–8.
- Sharma, K. 2003. Improving bioavailability of iron in Indian diets through food-based approaches for the control of iron deficiency anaemia. *Food Nutrition and Agriculture*, 51–61. <ftp://ftp.fao.org/docrep./fao/005/y8346m/y8346m06.pdf>.
- Sherman, F. 2002. Getting Started with Yeast - Contents. *Methods in Enzymology*, 350(2002), 3–41. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)50954-X](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(02)50954-X).
- Yamaguchi-Iwai, Y., Dancis, A., & Klausner, R. D. 1995. *AFT1*: a mediator of iron regulated transcriptional control in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, 14(6), 1231–1239. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb07106.x>.
- Yang, R., Zhou, Z., Sun, G., Gao, Y., & Xu, J. 2015. Ferritin, a novel vehicle for iron supplementation and food nutritional factors encapsulation. *Trends in Food Science and Technology*, 44(2), 189–200. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.04.005>.
- Zhang, K., Yin, X., Shi, K., Zhang, S., Wang, J., Zhao, S., Deng, H., Zhang, C., Wu, Z., Li, Y., Zhou, X., & Deng, W. 2021. A high-efficiency method for site-directed mutagenesis of large plasmids based on large DNA fragment amplification and recombinational ligation. *Scientific Reports*, 11(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89884-z>.
- Zielińska, M. 2015. Plant Ferritin—A Source of Iron to Prevent Its Deficiency. 1184–1201. <https://doi.org/10.3390/nu7021184>.

## **VIII. ANEXOS**

**Anexo 1.** Secuenciación del plásmido que contiene la ferritina híbrida soya-arveja con el cebador T3 y T7, enviada por Macrogen.

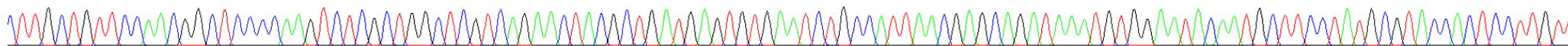
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120  
GAA GGG AAG TAG G TTATCAT TAT CAT ACT C GCCATTTCAA GAATACGTAAATAATTAATAGTAGTGATTTTCCTAACTTTATTTAGTCAAAAAATTAGCCTTTTAATTTCTGCTGTAACCCGTACAT



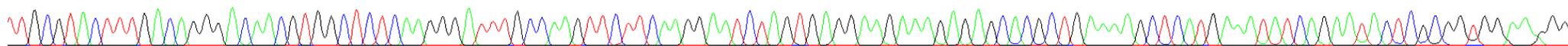
630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740  
TTTTAGTTTTAAAAACACCAAGAACTTAGTTTTCGACGGATCTAGAACTAGTGGATCCATGGCCTCAACGGTGCCTCTCTCAGGGGTGATATTCGAAACCCTTCGAGGAGGTTAAGAAAGGGTGAA



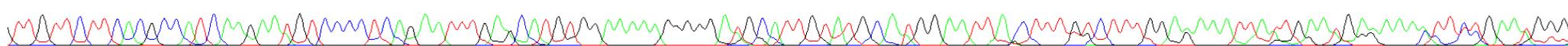
750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860 870  
CTTGCTGTTCCAACGGCTCCCAAGTCTCGCTGGCTCGTCAGAACTACGCTGATGAGTGTGAATCTGCCATTAACGAGCAGATAAATGTGGAAATACAATGCTTCCTATGCGTACCACCTCCTTGT



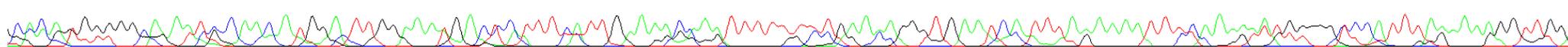
880 890 900 910 920 930 940 950 960 970 980 990  
TTGCGTACTTTGACAGGGACAACGTGGCTCTCAAGGGATTTGCCAAGTTCTTCAAGGAATCTAGTGAGGAAGAAAAGAGAGCACGCTGAAAAGCTCATGAAATATCAGAATACTCGCGGTGGAA GGG



1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120  
TTGTTCTTCACGCCATCAA GAATGTCCCTCAGAAATTTGAGCATGTGGAAAAAGGGGATGCAATTGTATGCAA GGAA TTA CCTTTGTCTTTGGAGAAATTAATGAATGAGAAAA TTTCTGAATGGG



1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200 1210 1220 1230 1240  
CACGTGTGGGCAGAA TCCAACATGGACTTGGAAAA GACTCTTTTCAATTGAA GCAAA TTTTGTCTGAACAGGGTGAATCA TTTAGAAAA TTTCAAAGAATGGGGCCCA TTTAGAAAAAGGTTGG





File: FH1-Ar1\_T7.ab1

Run Ended: 2021/1/18 19:50:25

Signal G:1330 A:1838 C:2345 T:2404

Sample: FH1-Ar1\_T7

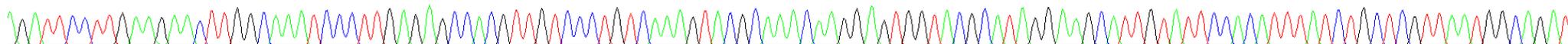
Lane: 4

Base spacing: 16.103899

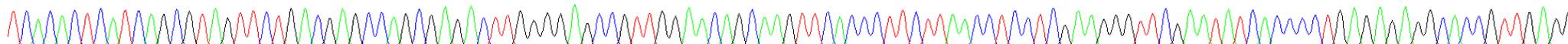
1345 bases in 16230 scans

Page 2 of 2

630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740 750  
AGATTCCTTGAAGAACTTGGCAAATCCCTTGAGAGCCACGTTGTCCCTGTCAAAGTACGCAACAAGGAGTGGTACGCATAGGAAGCATTGTATTCCACATTTATCTGCTCGTTAATGGCAGAT



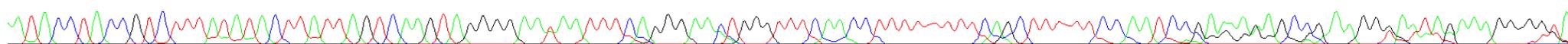
760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860 870  
TCACACTCATCAGCGTAGTTCTGACGAGCCAGCGAGACTTGGGGAGCCGTTGGAA CAGCAAGTTCAACCTTCTTAACCTCCTCGAA GGGTTT CGAATATCACCCCTGAGAGAGGCACCGTTGAGG



880 890 900 910 920 930 940 950 960 970 980 990  
CCATGGATCCACTAGTTCTAGATCCGTCGAAACTAAGTTCTTGGTGTAAAACTAAAAAAGACTAACTATAAAAAGTAGAATTTAAGAAAGTTTAA GAAATAGATTTACAGAATTACAATC



1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110  
AATACCTACCCTTTATATAC TTATTAGTCAAGTAGGGGAATAAATTTCA GGGAACTGGGTTTCAACCTTTT TTTTCAGCTT TTTCC AATCCGAGAGAGCCGAA GGG AATAGAAAAGG GGT A



1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200 1210 1220 1230 1240  
GAAAAATGAGAAAGAAATACATGCGGGGGTCAATTG CCTTGTGGGCATCATTT ATTCCAGGCAAGGTGGATCACTCCCCTTGAGAG TGGGGCCCGGTTTTTTGCC GGTTTGGGCCCCCGGTT C

