



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS

UDELAR | fcien.edu.uy

Análisis de posibles efectos protectores de la yerba mate y sus componentes frente a agentes genotóxicos



Tesis de grado
Licenciatura en Bioquímica

Verónica Sosa CI: 3982304-1

Tutor responsable: Elia Nunes
Laboratorio de Radiobiología, departamento de Biofísica,
Facultad de Medicina- Unidad Asociada a Facultad de Ciencias-
UdelaR.

Marzo 2013.

Agradecimientos.

Agradezco a todos los integrantes del Laboratorio de Radiobiología del Departamento de Biofísica de Facultad de Medicina.

Personas que me han acompañado durante el desarrollo de este trabajo, tanto en lo académico como en lo personal.

Gracias Ana, Lourdes, Valeria, por compartir su tiempo y conocimientos conmigo, por apoyarme alentándome a seguir adelante y cerrar una etapa muy importante para mí.

Gracias a mi familia en especial a mi hijo y a los amigos que estaban más seguros que yo de que iba a terminar este trabajo. Renzo, Silvana, Ana (nuevamente), Luis, Verónica, Simone, Fernanda, Valeria..... son muchos pero gracias, muchas gracias.

Gracias al Profesor Nelson Bracesco, por enseñarme, por acompañarme y hasta por hacerme reír.

En particular muchas gracias Profesora Elia Nunes por vincularme a un tema que me resulto fascinante, por guiarme en este mundo del hacer ciencia o por lo menos intentarlo, por tu paciencia, enseñanza y valoración.

Índice.

1. Resumen	pag. IV
2. Introducción	pag. VI
2.1 Radiaciones ionizantes	pag. VII
2.1.1 Aplicaciones medicas de las radiaciones	pag. VII
2.1.2 Efectos biológicos de las radiaciones	pag. VIII
2.1.3 Especies reactivas del oxígeno (ROS)	pag. VIII
2.2 Hidrocarburos policíclicos aromáticos (PHA's)	pag. X
2.3 Mecanismos de defensa	pag. XII
2.3.1 Sistemas de reparación	pag. XIV
2.4 Productos naturales	pag. XVII
2.4.1 Generalidades sobre <i>Ilex paraguariensis</i> (Ip)	pag. XVII
2.4.1.2 Elaboración de la yerba mate	pag. XVIII
2.4.1.3 Componentes bioactivos de la yerba mate	pag. XIX
2.4.1.4 Actividad de protección celular, antioxidante y antimutagénica de Ip	pag. XXI
2.4.1.5 La ingesta de mate y la incidencia de cáncer	pag. XXII
3. Hipótesis	pag. XXIII
4. Objetivos	pag. XXIII
5. Materiales y métodos	pag. XXIV
6. Resultados	pag. XXVII
7. Discusión	pag. XXXII
8. Conclusiones	pag. XXXIV
9. Bibliografía	pag. XXXV

1. Resumen.

Ciertos agentes genotóxicos como son las radiaciones ionizantes y el benzo(a)pireno pueden alterar la proliferación celular, provocando retardos en el ciclo celular, lesiones letales (necrosis, apoptosis), mutagénicas y recombinogénicas.

Las radiaciones forman parte de la naturaleza y son imprescindibles para mantener la vida en la tierra (ej. luz solar). Sin embargo, los eventos físicos de ionización a nivel atómico y molecular (ej. en agua y biomoléculas), pueden iniciar una cadena de procesos bioquímicos dando lugar a distintos eventos biológicos observables. Las radiaciones electromagnéticas (REM), en particular las ionizantes (RI), son utilizadas en medicina con fines diagnósticos y terapéuticos (ej.: rayos X y gamma).

Por otro lado los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PHA's) son compuestos orgánicos con dos o más anillos aromáticos los cuales se forman como resultado de la pirólisis. Su oxidación produce compuestos conocidos como epóxidos que son altamente reactivos, con capacidad para unirse a moléculas complejas, como las proteínas y el ADN. Esta última característica es la responsable de la capacidad genotóxica de los PHA. Como contaminantes, tanto en el medio ambiente como en el entorno laboral, han despertado preocupación debido a que algunos compuestos han sido identificados como carcinógenos, en particular el benzo(a)pireno.

Dado que en el mundo existe un creciente interés en el estudio de las capacidades farmacológicas de muchas plantas en especial para su uso en medicina preventiva y tomando en cuenta el alto consumo de yerba mate en nuestra región es de interés en este trabajo estudiar el posible efecto protector de la yerba mate frente a los daños inducidos por estos genotóxicos.

Se utilizaron levaduras haploides *Saccharomyces cerevisiae* (SC7K *lys* 2-3) como modelo eucariótico. Las poblaciones en fase de crecimiento exponencial fueron expuestas a diferentes dosis de rayos gamma (γ) y a concentraciones variables de benzo(a)pireno en presencia o ausencia de infusión de yerba mate. Los tratamientos con rayos gamma también se realizaron en presencia o ausencia de resveratrol.

Fueron determinadas las fracciones de sobrevivencia y las frecuencias mutagénicas luego de los tratamientos.

Se observó un significativo incremento en la fracción de sobrevivencia en las muestras irradiadas con rayos gamma (γ : 200 Gy) en presencia de *Ip* y en las irradiadas en presencia de resveratrol en comparación con las irradiadas con rayos gamma como único agente. Adicionalmente la frecuencia mutagénica inducida por rayos gamma en presencia de yerba mate o resveratrol decreció significativamente.

Las muestras tratadas con benzo(a)pireno presentaron disminución de la fracción de sobrevivencia en función de la dosis. En poblaciones celulares expuestas concomitantemente a 24,5 ng/mL de benzo(a)pireno e *Ip* la frecuencia relativa de sobrevivencia $S(x)$ aumentó significativamente así como también se observó una disminución significativa de la frecuencia mutagénica inducida por el benzo(a)pireno.

Los resultados presentes indican que la infusión de yerba mate y el resveratrol poseen efectos radioprotectores en las condiciones de nuestros experimentos, que podrían explicarse por interacciones de los polifenoles aislados o en conjunto con cascadas de óxido-reducción perturbadas por RI a nivel de los compartimientos extracelular e intracelulares (ej. mitocondrias, núcleo), además de activación por cascadas de

señalización redox de puntos nodales de control del ciclo celular los que interactúan modulando la recombinación homóloga (HR) y unión de extremos no homólogos (NHEJ) que determinan la reparación genómica sobre roturas simples y dobles del ADN (ej. Mec1/Tel1/ATR, hATM.) En caso de daño oxidativo a nivel de bases actúan además los sistemas de reparación BER, MMR y Postreplicativo que pueden modularse por mecanismos redox.

En referencia al benzo(a)pireno se concluye que los componentes mutagénicos de las vías de reparación genómica que se ponen en juego frente a derivados del benzo[a]pireno se modulan con disminución de flujos en presencia de componentes de *Ip*. Estas vías mutagénicas serían fundamentalmente las escisionales (MMR y BER) y las vías de reparación postreplicativa dependientes del gen RAD6/hRAD6 (polimerasas η y ζ de síntesis translesión).

2. Introducción.

Ciertos agentes físicos y químicos pueden alterar la proliferación celular, fundamentalmente por sus efectos sobre el ADN, membranas y componentes de cascadas de transducción de señales, lo que resulta en retardos en el ciclo celular, lesiones letales (necrosis, apoptosis), mutagénicas y recombinogénicas. Algunos ejemplos de estos agentes son: radiaciones ionizantes y ultravioletas, hipertermia, radicales libres provenientes del metabolismo celular y del entorno así como el benzo(a)pireno.

En los últimos años se ha observado un incremento a nivel mundial del interés por conocer los efectos benéficos de distintos productos naturales a nivel humano.

En Uruguay y en parte de la región existen algunos usos y costumbres muy arraigados en la población, destacándose el consumo de mate. En efecto, los datos del consumo de yerba mate nos indican que en nuestro país el 85 % de la población mayor de 15 años consume mate y dicho consumo continúa incrementándose (Encuesta STEP – MSP 2007).

Uruguay posee el mayor consumo per cápita (6 – 8 kg/persona/año), Argentina le sigue con 5 kg/persona/año (Victoria et al, 1990). Se conocen efectos beneficiosos de la infusión de mate, asociados a su alto contenido en polifenoles. (Bracesco et al, 2011, Contreras et al, 2010)

Algunos estudios han sugerido un posible efecto cancerígeno de la infusión a nivel orofaríngeo (De Stefani et al, 1990; Fonseca et al, 1999). Por otra parte se ha comprobado que la infusión de yerba mate per se no es mutagénica sino que la responsable del aumento de la frecuencia mutagénica en ciertas condiciones es la hipertermia. (Candrea et al, 1993)

La yerba mate durante su elaboración, producto del secado y ahumado, puede adquirir un contenido de hidrocarburos policíclicos aromáticos (PHAs por sus siglas en inglés), algunos de los cuales (ej. benzo(a)pireno) son potencialmente cancerígenos (Kamangar et al, 2008, Friedberg et al, 1995), esta paradoja entonces hace relevante estudiar si la yerba mate o alguno de sus componentes pueden actuar como protectores de los daños producidos por los PHAs. (Sosa et al, 2010)

A su vez la continua exposición a agentes físicos como las radiaciones ionizantes provenientes tanto de fuentes naturales como artificiales provoca el interés de estudiar la posible protección de la yerba mate frente a los daños inducidos por estos agentes genotóxicos.

Los efectos a nivel celular de las radiaciones ionizantes (RI) pueden deberse a absorción directa en biomoléculas esenciales o, con mayor probabilidad, a generación de especies reactivas del oxígeno por radiólisis del agua (Nunes, Gelós, 2006, por revisión). De estos efectos pueden resultar eventos estocásticos (mutagénesis y oncogénesis) que pueden prevenirse en base a principios de radioprotección (Lillo, 2012 por revisión).

Las levaduras, en particular *Saccharomyces cerevisiae* se utilizan como modelo eucariota a nivel celular y molecular, en base a importantes homologías con otros eucariotas (ej. líneas celulares humanas) y a las ventajas desde el punto de vista experimental. (Watson et al, 1987; Friedberg et al, 1995, Candrea et al, 1993, Lillo et al, 2011).

Por este motivo, se ha considerado de gran importancia el estudio de las posibles propiedades protectoras de la yerba mate frente a agentes genotóxicos químicos y físicos, utilizando como modelo “in vivo”, poblaciones celulares haploides de *Saccharomyces cerevisiae*.

2.1. Radiaciones ionizantes.

Las radiaciones forman parte de la naturaleza y son imprescindibles para mantener la vida en la tierra (ej. luz solar). Así mismo la radiación natural de fondo ha tenido gran jerarquía en los procesos evolutivos de las diferentes especies

Se llama radiación a la propagación de energía en el espacio. Según su naturaleza las radiaciones pueden diferenciarse entre electromagnéticas y corpusculares o según si su energía es suficiente para ionizar la materia, causando la separación de electrones de átomos y moléculas, en ionizantes y no ionizantes. La fuente emisora puede ser natural o fabricada por el hombre y es fundamental tener en cuenta que en su recorrido la radiación interactúa potencialmente con elementos del medio.

Desde sus comienzos, la humanidad ha estado expuesta en un ambiente que contiene radiaciones provenientes de fuentes naturales -cósmicas y terrestres- y más recientemente con el advenimiento de la industrialización también a radiaciones de fuentes artificiales.

Las radiaciones han tenido múltiples usos a lo largo de la historia: bélicas, industriales, médicas. Los eventos físicos de ionización de los átomos de moléculas biológicas, inician una cadena de procesos bioquímicos que conducen a eventos biológicos observables. Las radiaciones electromagnéticas (REM), en particular las ionizantes (RI), son utilizadas en medicina con fines diagnósticos y terapéuticos (ej.: rayos X y gamma).

2.1.1. Aplicaciones médicas de las radiaciones

La primera causa de irradiación de sistemas biológicos son las radiaciones naturales. En relación a las provenientes de fuentes artificiales las 3/4 partes de la dosis es aportada por el radiodiagnóstico.

La radioprotección, es un área interdisciplinaria cuya finalidad es la protección de los sistemas biológicos, medioambiente y ecosistemas frente a los efectos nocivos de las radiaciones.

A nivel médico interesa en particular la protección del ser humano, especialmente de pacientes y trabajadores del área. La radioprotección puede implicar estudios y/o acciones a nivel molecular y celular así como a nivel poblacional y de sistemas.

La filosofía de la protección radiológica en relación a procedimientos médicos se ha centrado gradualmente en tres principios:

1. Justificación de las prácticas. Se debe estudiar el balance riesgo/ beneficio donde el riesgo de no hacerse un estudio radiológico necesario, es mucho mayor que el riesgo producido por la radiación y el beneficio esperado supera ampliamente dicho riesgo.
2. Optimización de la protección radiológica. Toda exposición debe ser tan baja como sea razonablemente posible tomando en cuenta condiciones técnicas, sociales y económicas. (Principio de ALARA)
3. Limitación: Fijación, para trabajadores y público, de límites de dosis a no superar por causa alguna. Implica un estricto control de calidad.

En cada país, las organizaciones gubernamentales correspondientes fijan normas específicas para los equipos radiológicos instalados. (Lillo 2012, por revisión).

2.1.2. Efectos biológicos de las radiaciones:

La absorción de la radiación ionizante tiene una primera etapa donde se da un proceso físico. En este lapso se generan las primeras excitaciones e ionizaciones atómicas y moleculares. En una segunda etapa, llamada etapa bioquímica, aparecen los daños moleculares principalmente provocados por las reacciones de oxidoreducción de los radicales libres o especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS Y RNS). Estos daños son el sustrato de enzimas de reparación y/o mecanismos de remoción de radicales libres.

Finalmente, viene la etapa biológica en la que hay daños celulares y de sistemas que alteran diferentes estructuras y funciones corporales, las principales alteraciones a nivel celular son las mutaciones, la peroxidación lipídica y la inducción de apoptosis. (Lillo 2012, por revisión).

En la generación de radicales libres es de gran importancia la interacción con el agua y la producción del radical OH, peróxidos y radical superóxido. Las probabilidades de interacción y la eficacia biológica dependen en gran parte de la magnitud LET (Transferencia Lineal de Energía) y de la tensión de oxígeno (Kiefer J, 1990; Friedberg et al, 2005 por revisión).

En relación al efecto sensibilizante del oxígeno se infiere la importancia de antioxidantes y captadores de radicales libres como radioprotectores o moduladores de los efectos del estrés oxidativo a nivel molecular y celular (Nunes, Gelos, 2006, por revisión).

2.1.3. Especies reactivas del oxígeno (ROS)

Luego de la absorción de radiación ionizante con la producción de excitaciones e ionizaciones, una cadena de eventos físicoquímicos se produce generándose radicales libres: principalmente especies reactivas del oxígeno (ROS), y también especies reactivas del nitrógeno (RNS). Debido a que las células están compuestas de por lo menos un 78% de agua, la mayoría de los efectos a nivel molecular de la radiación se realiza a través de las especies reactivas del oxígeno (productos radioquímicos del agua). (Lillo, 2012; Nunes, Gelós, 2006, por revisión).

Debido al alto potencial antioxidante probado para *Ilex paraguariensis* (Ip) es importante conocer a las especies reactivas del oxígeno y sus consecuencias sobre los organismos.

Son radicales libres aquellos átomos y moléculas que en su estructura atómica presentan por lo menos un electrón desapareados en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera diferentes grados de inestabilidad.

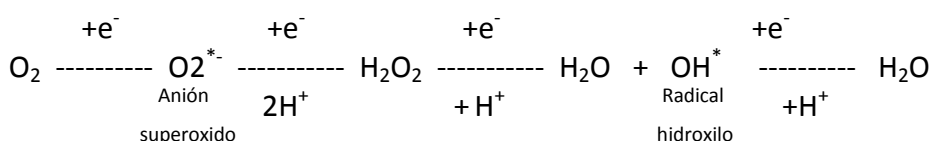
Los radicales libres se generan continuamente en el entorno (ej.: radiaciones ionizantes) y como un producto del metabolismo normal pudiendo ser inactivados por un conjunto de mecanismos (de oxidoreducción y atrapamiento). (Bracesco, 2003)

En situación fisiológica o en los casos de exposición aumentada planificada o accidental esta producción se eleva sustancialmente ingresándose al estado de estrés oxidativo.

Algunos factores que llevan a esta situación son:

- Agentes químicos: aumento de metales pesados, xenobióticos, benzo(a)pireno etc.
- Drogas antitumorales de uso médico como los radiomiméticos: Bleomicina, Adriamicina.
- Agentes físicos: radiaciones ionizantes, fracciones del espectro U.V, hiperoxia.
- Variables metabólicas: dietas hipercalóricas, dieta insuficiente en antioxidantes, diabetes, procesos inflamatorios y traumatismos, fenómenos de isquemia.

Algunas reacciones que generan y destruyen especies reactivas del O son: (Vuillaume, 1987)

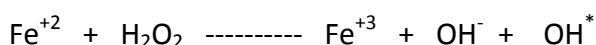
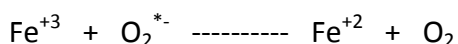


El radical hidroxilo (OH^*) es el de mayor potencia oxidante y el producto radiolítico más importante en sistemas acuosos.

La mezcla de sales ferrosas y H_2O_2 representa una reacción hidroxilante.

Toda reacción o sistema de reacciones que genere anión superóxido (O_2^{*-}) podría también producir H_2O_2 por dismutación del anión superóxido (ya sea espontáneamente o enzimáticamente catalizada).

Si el H_2O_2 se acumula en presencia de metales de transición como el hierro podrían reaccionar según el mecanismo de Haber-Weiss dando el oxidante radical hidroxilo a través de la cadena de reacciones:



El O_2 podría considerarse como un radical libre con 2 electrones no apareados pero es estable dado que los “spins” correspondientes son paralelos. (Villaume M, 1987).

Durante el metabolismo celular es reducido a agua en su mayor parte por reducciones parciales, pero pueden producirse especies reactivas del oxígeno (ROS) siendo algunos de ellos intermediarios de alta toxicidad. Una consecuencia directa de este proceso es que entre los sustratos iniciales y la generación de energía al final del proceso se forman varias moléculas con diferente grado de oxidación. Algunas de ellas pueden entregar 1 o 2 electrones al O_2 y producir intermediarios parcialmente reducidos.

Si bien el metabolismo aeróbico da gran ganancia de energía (cadena respiratoria), las especies activas del oxígeno generados por éste metabolismo pueden producir lesiones en el ADN (nuclear y mitocondrial) y en membranas (ej. mitocondrial por peroxidación de lípidos, modificaciones de proteínas integradas). Se puede producir acumulación de lesiones de tipo oxidativo en el ADN nuclear y mitocondrial en función

de la edad y hay una asociación entre estas lesiones y la incidencia de cáncer en función de la edad. (Friedberg et al, 1995).

Otras fuentes de ROS son los peroxisomas, organelos ricos en oxidasas que generan H_2O_2 , que se depura por enzimas específicas (ej. catalasas, peroxidasas).

Los leucocitos polimorfonucleares son una fuente importante de radicales cuando se activan por diversas proteínas que actúan específicamente sobre ellos (ej. complemento, interleuquinas etc.).

Como se menciono más arriba las radiaciones ionizantes también producen especies reactivas del nitrógeno (RNS) y uno de los oxidantes más potentes “in vivo” es el peroxinitrito, producto de la reacción entre el anion superoxido y el oxido nítrico que a su vez es un radical libre generado en los sistemas biológicos por la enzima óxido nítrico sintasa.

Se ha observado una alta nitración proteica tanto a nivel celular como tisular en condiciones patológicas asociadas al estrés oxidativo. La nitración de residuos críticos de tirosina conduce a la disfunción celular, impide la fosforilación de tirosinas con la consiguiente desregulación de la homeostasis celular y de la transducción de señales.

Entre los responsables de la nitración “in vivo” se destacan el peroxinitrito y las peroxidasas en presencia de nitrito y peroxido de hidrógeno. (Bracesco, 2003).

Los radicales libres tienen un rol muy importante a nivel fisiológico y patológico ej. a nivel del sistema cardiovascular, nervioso central y diferentes alternaciones metabólicas. (Hertog et al, 1993; Bisson et al, 1995).

Además se ha indicado la importancia de los radicales libres en procesos de envejecimiento y en la transformación maligna por acumulación de mutaciones y cambios irreversibles a nivel de biomoléculas (Emanuel et al, 1985; Brenan et al, 1994).

2.2. Hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH's)

Los PAH's, constituyen un amplio grupo de compuestos orgánicos con dos o más anillos aromáticos, se forman como resultado de la pirolisis especialmente durante la combustión incompleta del carbón, aceites, gases, madera, residuos domésticos, y en general sustancias de origen orgánico.

Como contaminantes, tanto en el medio ambiente como en el entorno laboral, han despertado preocupación debido a que algunos compuestos han sido identificados como carcinógenos.

En general son lipofílicos, es decir que tienden a unirse a sustancias grasas, y a disolverse en ellas, son inestables fotoquímicamente, o sea, que se degradan por la luz. Hay varios cientos de PHAs, el mejor conocido es el benzo(a)pireno. (WHO Regional Office for Europe, 2000). (Figura 1)

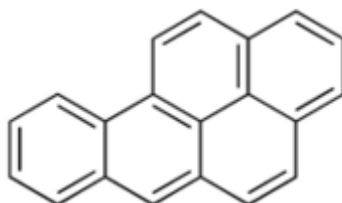


Figura 1: benzo(a)pireno

Dada la amplia distribución de materia orgánica (carbón, madera, vegetación en general, combustibles fósiles, tabaco, alimentos), así como los procesos de combustión de la misma, los PAH's son ubicuos, es decir se encuentran de forma generalizada en el medio ambiente.

Las fuentes pueden ser naturales como la erupción de un volcán o incendios forestales, o pueden ser antropogénicas las cuales dependen de la actividad humana. Entre estas actividades encontramos actividades industriales, calefacción, vehículos de motor, tabaquismo, alimentos elaborados a la parrilla etc. En base a una evaluación de riesgos, la Unión Europea regula los PAH's en las comidas basándose en los límites para los compuestos individuales. (Cano-Lerida et al, 2009).

La tasa de formación de los PAH's depende de las condiciones de la combustión. Si ésta genera mucho hollín dará lugar a mayor cantidad; en efecto el hollín de hecho está formado por moléculas de PAH's polimerizadas.

Se encuentran de forma natural en el petróleo, el carbón, depósitos de alquitrán y como productos de la utilización de combustibles, ya sean fósiles o biomasa.

La exposición humana a estos compuestos se produce sobre todo por inhalación de los PAH's presentes en el aire y la ingestión de PAH's en los alimentos, aunque es posible también su absorción por vía cutánea. Tras su absorción por el organismo se distribuyen ampliamente en todos los tejidos, especialmente en los que tienen mayor contenido graso.

Así pues es lógico que los pulmones y la piel sean los principales órganos afectados, aunque también pueden afectar al sistema digestivo y a órganos o tejidos con elevado contenido graso. Los PHA's no tienden a acumularse en el organismo, y la mayoría de ellos son eliminados a los pocos días de su absorción, principalmente por la orina y las heces.

El proceso de detoxificación tiene lugar sobre todo, aunque no exclusivamente, en el hígado. El primer paso consiste en la oxidación de los PHA's; posteriormente, al compuesto oxidado se le añade una molécula como el glutatión; este paso se conoce como conjugación. El proceso de oxidación-conjugación tiene como objeto que un compuesto que originalmente era soluble en las grasas se haga hidrosoluble y favorecer así su eliminación por la orina. Por desgracia, el paso intermedio de la oxidación produce compuestos conocidos como epóxidos que son altamente reactivos, con capacidad para unirse a moléculas complejas, como las proteínas y el ADN. Esta última característica es la responsable de la capacidad genotóxica de los PHA's. (WHO Regional Office for Europe, 2000). (Figura 2)

Las grandes hojas de la yerba mate pueden exponer a esta planta a la deposición de PAH's gaseosos o unidos a partículas. Durante la exposición de las hojas y tallos a los productos provenientes de la combustión parte del combustible se puede quemar y transformar en cenizas que se depositan sobre las hojas tratadas, pudiéndose producir una mayor acumulación de PAH's. (Kamangar et al, 2008).

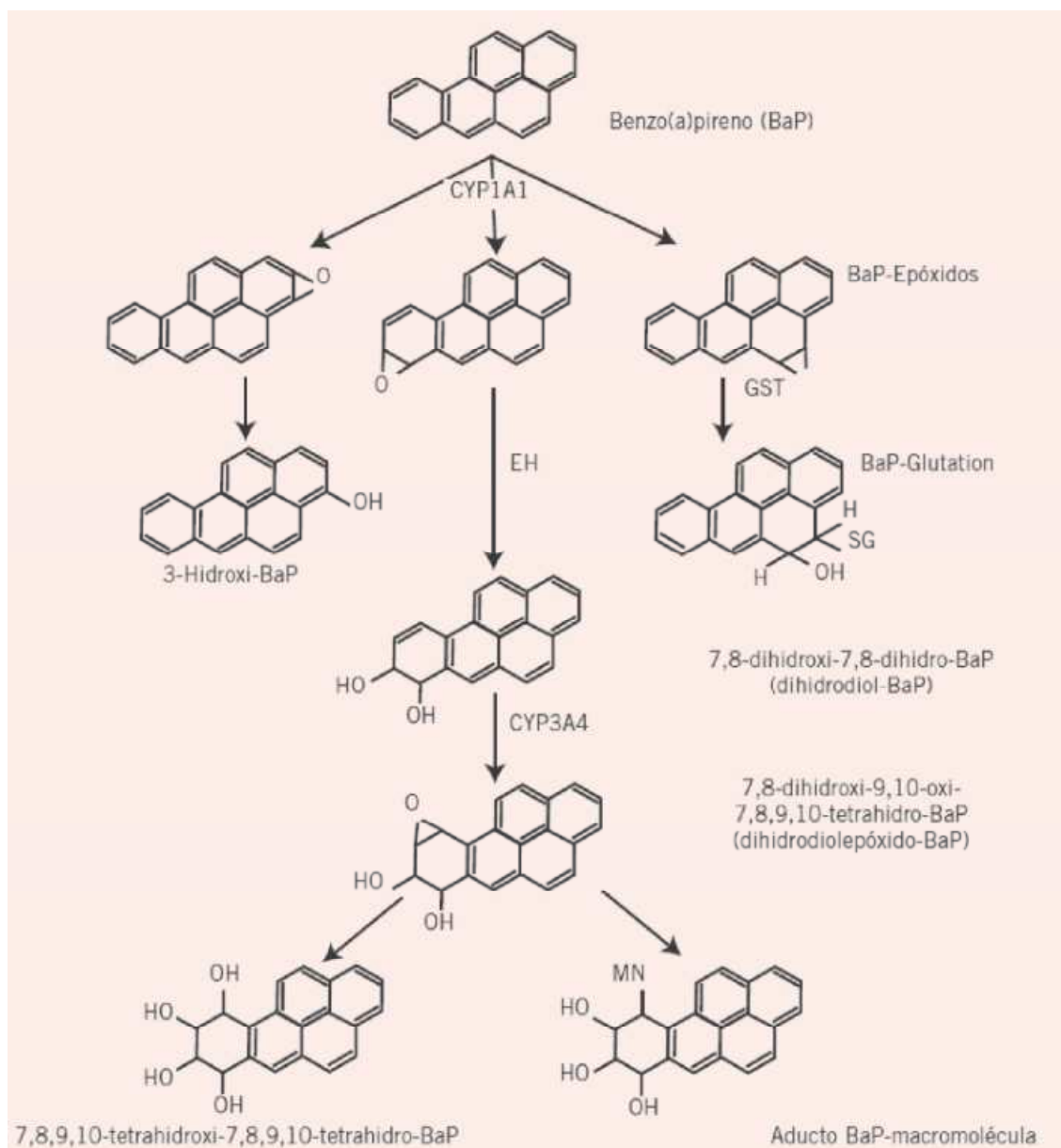


Figura 2: Metabolización del benzo(a)pireno.

(Imagen extraída de Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) Acercamiento a su problemática como riesgo laboral)

Las abreviaturas corresponden a las enzimas que catalizan las transformaciones del benzo[a]pireno en sus diferentes metabolitos: CYP1A1, CYP3A4: enzimas 1A1 y 3A4 del citocromo P450, EH: Epóxido hidrolasa, GST: Glutacion-S-Transferasa

2.3. Mecanismos de defensa.

Los mecanismos moleculares involucrados en la defensa al estrés oxidativo comprenden redes regulatorias interrelacionadas que comprenden receptores de señales, cascadas de transducción, activadores transcripcionales (Ej. secuencias STRE, ARE, HSE), enzimas como la superóxido dismutasa (Mg-SOD y Cu-Zn-SOD), catalasa y peroxidasas a las que se le agregan entre otros compuestos el glutatión, tioles y metaloproteínas capaces de procesar al radical $O_2^{\cdot -}$ y al H_2O_2 dando H_2O y O_2 .

Comprenden también compuestos antioxidantes como el α -tocoferol (vitamina E) y el ácido ascórbico. (Von Sonntag, 1987)

Los procesos de reparación del ADN también están involucrados en los mecanismos de defensa celular por contrarrestar las lesiones correspondientes una vez producidas. (Von Sonntag, 1987; Vuillaume, 1987; Friedberg et al, 1995).

Algunos genes no solo están involucrados en las respuestas al estrés oxidativo, choque térmico y osmótico sino que participan además en la reparación del ADN.

Las respuestas antioxidantes se dan endogenamente y exógenamente en sistemas heterótrofos. Dentro de las endógenas están enzimas como la superoxidodismutasa, catalasa y algunas peroxidasas, glutatión, tioles y coenzima Q. Entre las exógenas por la vía de los alimentos están la vitamina E, C y A. Además de metales como el selenio, Cu, Zn, y Mg que forman parte de la estructura molecular de las enzimas antioxidantes, también son fundamentales en el mecanismo de protección celular.

El estrés oxidativo se genera por un desbalance entre la producción de radicales libres y las defensas antioxidantes. Las cascadas de oxido-reducción pueden ser interrumpidas por los antioxidantes, transformándose así en unas de las defensas importantes para la prevención del daño asociado a éste tipo de reacciones. Según un modelo planteado por Willson en la protección sinérgica polivalente se plantea una interacción entre vitamina C y el radical vitamina E permitiendo su regeneración. (Willson, 1983). (Figura 3).

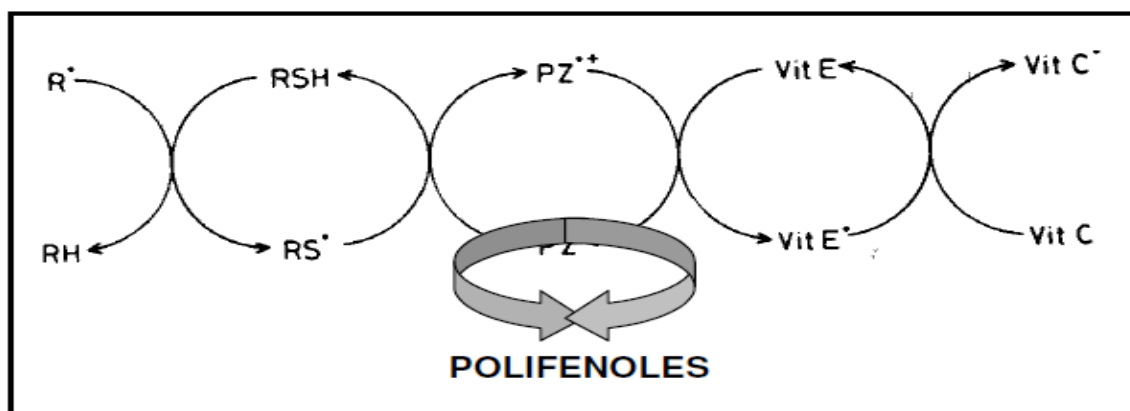
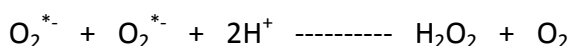


Figura 3: Modelo de Protección polivalente (Willson 1983- modificado).

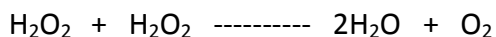
En sombreado: posibles ubicaciones de los polifenoles que actuarían interrumpiendo la cadena de oxido reducción (R.: radical; RH: R reducido, PZ: clorpromazina como ej. de intermediario).

Las enzimas que contrarrestan el estrés oxidativo en levaduras son la superóxido dismutasa (SOD) que contiene Cu/Zn localizada mayormente en el citosol codificada por el gen SOD 1 y la Mg SOD mitocondrial codificada por el gen SOD 2 (Santoro y Thiele, 1997; Jamieson, 1998).

La SOD cataliza la dismutación de superóxido a H_2O_2 y H_2O :



La catalasa hidroliza al peróxido de hidrógeno:



En *Saccharomyces cerevisiae* se conocen los genes CTA1 y CTT1 que codifican para las enzimas catalasa A, localizada en peroxisoma y catalasa T localizada en citoplasma. Son hemoproteínas tetraméricas con cuatro subunidades idénticas y con Fe^{+3} como cofactor el cual se reduce durante la catálisis a Fe^{+2} . El CTT1 es uno de los genes que también es inducido por soluciones hiperosmolares y choque térmico. (Marchler et al, 1993).

La proteína antioxidante tiol específica (peroxirredoxina) de 25 kDa, perteneciente a la familia de las tioredoxinas, es la que protege componentes celulares de los sistemas de oxidación en los que el tiol funciona como reductor. Abunda en el citosol y su rol se encontraría en la protección de las enzimas citosólicas. (Yim et al, 1994; Santoro y Thiele, 1997; Schröder y Ponting, 1998; Bryk et al, 2000).

Las metaloproteínas son proteínas de bajo peso molecular ricas en cisteína que se unen a metales por lo que tienen un importante papel en la detoxificación de metales y también protegen las células de los agentes físicos y químicos productores de radicales libres. El gen CUP1 que codifica metaloproteínas es inducido por varios tipos de estrés especialmente por el aumento de Cu y Fe.

Estas proteínas sequestran estos metales disminuyendo su disponibilidad para la generación de ROS a través de las reacciones de Fenton y Heber Weiss. (Schwarz et al, 1995; Santoro y Thiele, 1997)

En células humanas juegan un rol importante los activadores AP (Jun-Fos), p38 y $\text{NF-}\kappa\text{B}$. En levaduras el homólogo de los activadores transcripcionales AP-1 (YAP) regula la respuesta al estrés oxidativo: sus mutantes son hipersensibles al radical O_2^{*-} y al H_2O_2 . (Kullik y Storz, 1994; Hohman y Mager, 1997).

2.3.1. Sistemas de reparación.

Las lesiones producidas en el ADN por distintos agentes que perturban la estabilidad de esta macromolécula pueden repararse con cierta probabilidad, dependiendo de factores genéticos, metabólicos y ambientales.

Estos procesos de reparación se encuentran presentes en todos los organismos estudiados, virus, células de mamífero y tumorales. Esta conservación y las homologías estructurales y/o funcionales que se han constatado entre especies muy distantes, hablan de la importancia biológica de la reparación en tanto sistema de conservación de la integridad del genoma frente a las más diversas agresiones. (Ronen y Glickman, 2001).

Una vez provocado el daño, existe un importante nivel de defensa del genoma que consiste en la reparación enzimática y su interrelación con el control del ciclo celular.

Reparación por Recombinación homologa (HR) y unión de extremos no homologos (NHEJ)

En células eucariotas la reparación de roturas de doble cadena (DSBs) se reparan primordialmente por dos mecanismos: recombinación homologa y unión de extremos no homólogos (NHEJ). Las DSB directas tales como las producidas por nucleasas y

radiaciones ionizantes pueden ser reparadas por cualquiera de las dos vías. Las DSBs producidas por el colapso de la horquilla de replicación son reparadas principalmente por recombinación homóloga y postreplicativa (Shrivastav et al, 2008).

Mecanismos implicados en NHEJ:

La reparación por NHEJ consiste en la religación directa de los extremos de la DSB, actuando el grupo de genes HDF, similar a recombinación VDJ en el sistema inmune. En *Saccharomyces cerevisiae* el mecanismo se inicia con la unión del complejo Yku70/Yku80 a los extremos de la DSB protegiéndolos de la degradación. Luego el complejo MRX interviene en el procesamiento y/o permite que los extremos de la rotura no se separen el uno del otro. Finalmente, la ligasa Dnl4 junto con sus cofactores Lif1 y Nej1 sellan la DSB (Daley et al, 2005)

Mecanismos implicados en HR:

Mediante la HR la reparación de la DSB se realiza copiando la información de una secuencia de ADN homóloga intacta.

La HR se inicia con la degradación exonucleolítica de los extremos 5' que han quedado libres tras producirse la DSB para originar regiones de ADNss (ss: de cadena simple) con extremos 3'OH libres.

Esto se da por la acción conjunta del complejo MRX, Sae2, la helicasa Sgs1 y las nucleasas Dna2 y/o Exo1. (Lee et al, 2008; Zhu et al, 2008).

Luego las funciones de los grupos epistáticos de RAD52 son los responsables de los siguientes pasos. Primero Rad 52 promueve la invasión de los fragmentos de ADNss con extremos 3'OH sobre la región homóloga de ADN, la proteína Rad 59 actúa facilitando esta invasión. A continuación Rad 51 con la ayuda de Rad55, Rad57 y Rad54 cataliza el intercambio de cadenas entre las dos moléculas implicadas lo que permite cebar la síntesis de ADN usando como molde la secuencia homóloga inválida.

Luego la ruta puede seguir diferentes alternativas dependiendo del mecanismo de HR que tenga lugar. (Prado et al, 2003).

- Reasociación de cadenas dependiente de síntesis (SDSA) donde el intercambio de cadenas se revierte y la cadena recién sintetizada vuelve a aparearse con la molécula desde la que se realizó la invasión generando conversión génica.

- Reparación de cortes de doble cadena (DSBR) donde el intercambio de cadenas y la síntesis de ADN llegan hasta el segundo extremo del ADN procesado teniendo lugar la captura de éste formando dos uniones de Holliday (HJ). La resolución de estas HJ origina conversión génica que puede estar asociada a entrecruzamiento. (Prado et al, 2003).

En células haploides de *Saccharomyces cerevisiae* la reparación recombinacional homóloga es un proceso postreplicativo, mientras que en las células diploides puede ser tanto pre como postreplicativo. (Bracesco, 2003).

Reparación por escisión.

Además de las DSB las células son capaces de eliminar una gran variedad de lesiones en el ADN por medio de rutas diferentes las cuales colaboran en la estabilidad del genoma evitando la formación de daño recombinogénico ya que eliminan lesiones que podrían bloquear la replicación (Kupiec, 2000) y por otro lado previene las mutaciones asociadas a las modificaciones de las bases dañadas.

Reparación por escisión de bases (BER)

La ruta BER permite el reconocimiento específico y la escisión de una base dañada. La mayor parte del daño procesado por BER es generado por el ataque de ROS a los que son particularmente sensibles las bases. También es activo contra el daño resultante de la hidrólisis espontánea de las bases y de la acción de agentes alquilantes exógenos y endógenos.

En primer lugar las bases se eliminan por alguna de las múltiples N-glicosilasas para generar un sitio apurínico o apirimidínico (AP). Este sitio es reconocido por endonucleasas o liasas específicas de sitios AP. La principal endonucleasa AP en *Saccharomyces cerevisiae* es Apn1. El extremo 3'OH generado por la endonucleasa ceba la adición de un nucleótido (short patch) o la síntesis de un fragmento de pocos nucleótidos (long patch) seguido por un último paso de eliminación del extremo de la cadena que fue desplazada durante la síntesis y ligación de los extremos libres. (Friedberg et al, 1995).

Reparación por escisión de nucleótidos (NER).

Entre las lesiones más relevantes que NER es capaz de eliminar se encuentra las producidas por la exposición a la luz UV, así como las distorsiones que introducen grandes compuestos aromáticos policíclicos o agentes quimioterapéuticos que unen las dos cadenas de ADN entre sí.

En la etapa de reconocimiento de la lesión (dímeros) se requiere la función de un complejo enzimático formado por los genes XPG-hHR23B (RAD23). En caso de reparación acoplada a la transcripción se requiere la ARN polimerasa II y los genes CSA y CSB. El factor de transcripción TFIIH, XPA y RPA (SSB) actúa con XPB y XPD en la etapa de marcado de la lesión. En la etapa de incisión dual actúan en 5' XPF/ERCC/RAD1, RAD10. En la etapa de síntesis y unión actúan las ADN polimerasas δ y/o ϵ , PCNA (Antígeno nuclear de células proliferantes), RFC (factor de replicación) y ligasas. (Nunes, Gelós, 2006, por revisión)

Reparación de bases mal apareadas (reparación "mismatch").

El proceso más importante que genera esta lesión es el error en la replicación.

Hay similitud enzimática entre la reparación por escisión de bases y nucleótidos y la reparación de bases mal apareadas pero uno de los pasos fundamentales que las diferencia es la etapa de reconocimiento de la base incorrecta en una de las hebras que se da en procariotas por la secuencia GATC. (Friedberg et al, 1995).

En esta reparación están implicados los productos de los genes MutH, MutL, MutS.

Donde la proteína MutS reconoce el mismatch, la proteína MutH distingue ambas cadenas clivando en la región GATC y la proteína MutL coordina la actividad de Mut S y H.

Interrelación con el control del ciclo celular.

La interrelación entre lesiones oxidativas en el ADN, retardos en el ciclo y mecanismos de reparación, es uno de los problemas más actuales en áreas de la Biología Molecular, de la Radiobiología y de la Oncología Básica

El reconocimiento a nivel del ADN corresponde a complejos de enzimas con función dual de reparación y de control del ciclo celular, los que activan las cascadas de transducción que determinan la transcripción de genes específicos (regulones de

respuesta adaptativa). (Lowndes y Murguía, 2000; Bashkirov et al, 2000; Nie et al, 2000; Bracesco et al, 2007; Nunes et al, 2008).

Las lesiones en el ADN hechas en células proliferantes por radiaciones ionizantes y otros agentes oxidantes, inducen retardos en las transiciones G1/S, G2/M, en fase S y en fase M.

Estos retardos entre fases mediados directa o indirectamente por el producto de los genes supresores tumorales y homólogos permiten un aumento de la probabilidad de reparación de lesiones a nivel del ADN. (Murray y Hunt, 1993; Cavenne y White, 1995; Friedberget al, 1995; Bracesco et al, 1995; Nunes y Siede, 1996; Bracesco et al, 2002)

2.4. Productos naturales.

2.4.1. Generalidades sobre *Ilex paraguariensis*.

La **yerba mate** o **yerba** (en guaraní *ka'a*) es una planta arbustiva o arbórea originaria de Sudamérica, de cuyas hojas secas y molidas se prepara el mate, una infusión estimulante común en la gastronomía de Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay. (Giberti, 1994).

Es endémica de las cuencas del Paraná, Paraguay y Uruguay, donde crece en estado silvestre. Se cultiva además comercialmente en Argentina (Misiones y NE de Corrientes), Brasil (Paraná y Santa Catarina) y Paraguay desde el siglo XIX, dando lugar a una importante industria. Sin embargo el hábito de beber la infusión denominada mate excede a América Latina y en los últimos años se ha abierto un mercado internacional importante, sobre todo en Oriente Medio.

Su nombre científico "*Ilex paraguariensis*" le fue otorgado por el naturalista francés Augusto De Saint Hillaire en un amplio estudio de diversas especies recolectadas en América, principalmente en Brasil. Esta denominación fue presentada en la academia de ciencias de París en 1823, desde ahí se generalizó su uso en varias publicaciones posteriores. (Dellacassa y Bandoni, 2001)

Ilex paraguariensis (*lp*) es un árbol dioico de hoja perenne, que crece hasta una altura de aproximadamente 8 metros. Las hojas son de color verde oliva y miden 8 cm de largo, alternas, coriáceas, obovadas, con márgenes dentados ligeramente crenados y ápice obtuso, además tienen una base en forma de cuña. Los pecíolos son de hasta 15 cm de largo. La etapa de floración se produce durante la temporada de primavera, produciendo pequeñas flores unisexuales que tienen cuatro pétalos blancos. En algunas especies tropicales o sub tropicales, el número de pétalos puede ser de 5, 6 o 7. (Giberti, 2001). Estas flores pueden ser agrupadas en grupos de 1 a 15 que aparecen en la axila de las hojas. Los frutos son bayas de color rojo conteniendo de 4 a 5 semillas. Este árbol crece preferentemente en regiones con baja humedad, como parte del estrato medio del bosque. (Giberti, 2001; Alonso, 1992).

Con el nombre de yerba mate se designa el producto constituido exclusivamente por las hojas desecadas, ligeramente tostadas y desmenuzadas de *lp* con fragmentos de ramas jóvenes, pecíolos y pedúnculos florales (Reglamento Bromatológico Nacional. Decreto 315/994, 1994; Resolución del Poder Ejecutivo Nº 34.059. MSP del Uruguay, 1957). Sin embargo, y aunque no está permitido por las normas y leyes de la región, suelen emplearse esporádicamente otras especies de *Ilex* que crecen en zonas

fitogeográficas próximas a *I. p.*, para la elaboración de yerba mate comercial. (Giberti, 1989).

Algunas de las otras especies *Ilex* que pueden ser utilizadas esporádicamente para elaborar el mate comercial son *Ilex affines Gardner*, *Ilex dumosa Reisseck*, *Ilex brevicuspis Reisseck*. (Gutnisky et al, 1998).

2.4.1.2. Elaboracion de la yerba mate.

Factores como el desarrollo, la edad de la planta, el momento de la cosecha, el manejo de las plantas (nativas o reforestadas), la forma de cultivo, el procesamiento y almacenamiento pueden determinar que la yerba mate presente variaciones en su calidad y características fisicoquímicas. (Dellacassa, Bandoni, 2001).

La producción de yerba mate consiste en 6 pasos, a saber: (Dellacassa, Cesio, 2007).

Cosecha: Las hojas y tallos de entre 1 y 2 años se depositan en camadas que no deben superar los 60 kg, evitando deteriorar la materia prima por aplastamiento exposición larga al sol o a la humedad.

Sapecado: Proceso de pre-secado donde las hojas verdes son expuestas a 250°C durante 30 a 90 segundos perdiéndose el 25% de la humedad. Este proceso conserva el color verde de las hojas, evitando la acción de oxidación y fermentación por parte de enzimas.

Secado: Dentro de las 24 horas desde la cosecha las hojas son expuestas a una corriente de aire caliente hasta que se alcance 3% de humedad. Este valor evitará el crecimiento de hongos en la etapa de estacionamiento.

Canchado: Se trituran los gajos y hojas de la yerba con la finalidad reducir el volumen del producto para su posterior manipulación (transporte y estacionamiento).

Estacionamiento: Puede ser natural (con duración hasta 24 meses), acelerado (30 días con inyección de aire caliente (50 a 60 °C) y húmedo (60%) o mixto (utilizando ambos esquemas de estacionamiento). Los lotes de yerba estacionada son sometidos a procesos de molienda y mezclado en las proporciones que la receta o formulación de cada marca tenga determinada.

Preparación final: La yerba es finalmente reducida a partículas más pequeñas en molinos y tamizada para eliminar el polvo y los tallos ("palos"). Luego el producto es envasado y almacenado para su posterior distribución. (Corrado, 1915; Samaniego, 1937).

2.4.1.3. Componentes bioactivos de la yerba mate.

Los reportes sobre la composición química del mate no siempre distinguen entre planta fresca, material seco, producto industrialmente procesado o las diferentes bebidas que pueden prepararse con yerba mate. Aunque no hay diferencias cualitativas significativas en la composición, hay una importante variación cuantitativa. (Filip et al, 2010).

Los principales componentes de la yerba mate pueden ser asociados en los siguientes grupos:

- **Polifenoles:**

En general están presentes en un 7 a 14% en la yerba (Filip et al, 2010), son solubles en agua, incoloros, y son responsables por el gusto astringente del mate. La cantidad de polifenoles totales en la infusión de yerba mate es de 3.4 ± 0.1 mg/mL (Menini et al, 2007).

Los fenoles comprenden una serie de metabolitos secundarios derivados de plantas las cuales contienen por lo menos un anillo benceno unido a un grupo hidroxil-fenólico.

Los niveles de polifenoles en extractos de *Ilex paraguariensis* son mayores que los encontrados en té verde y similares a los del vino tinto (Gugliucci et al, 2009 a,b).

Los extractos son especialmente ricos en ácidos clorogénicos (CGA) (Markowicz Bastos et al, 2007; Heck and de Mejia, 2007; Menini et al, 2007; De Moraes et al, 2009; Filip et al, 2010).

Los ácidos clorogénicos son una familia de ésteres formados entre ciertos ácidos trans cinámicos y ácido quínico. Estos compuestos están extensamente distribuidos como conjugados en el material de la planta. Los más comunes son ácidos: cafeico, firúlico, sinápico y p-cumárico.

Los compuestos fenólicos también se encuentran en alta concentración en café, té, manzana, girasol y arándano.

El ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA) es el único ácido clorogénico disponible comercialmente y ha sido extensamente estudiado debido a su actividad antioxidante. Los ácidos clorogénicos son atrapadores de radicales libres y metales, pueden interferir con la absorción de la glucosa y se ha demostrado que modulan la expresión génica de las enzimas antioxidantes, entre otras actividades biológicas (Clifford, 1999, 2004; Olthof et al, 2001; Jaiswal et al, 2010).

- **Alcaloides:**

Los compuestos más activos detectados en decocciones preparadas con la hoja de *I. p.* no procesada son los alcaloides purinas (metilxantinas) que consisten principalmente en cafeína (0.8-1.9%), teobromina (0.3-0.9%) y trazas de teofilina. (Filip et al, 2010; Vázquez et al, 1986). (Figura 4).

La mayor cantidad de cafeína fue detectada en hojas jóvenes mientras que en tallos y peciolos se ha informado que contienen solo un 0.5% (Bertoni et al, 1992) se ha visto entonces que la riqueza en alcaloides varía con la edad de la planta, disminuyendo con el aumento de ésta.

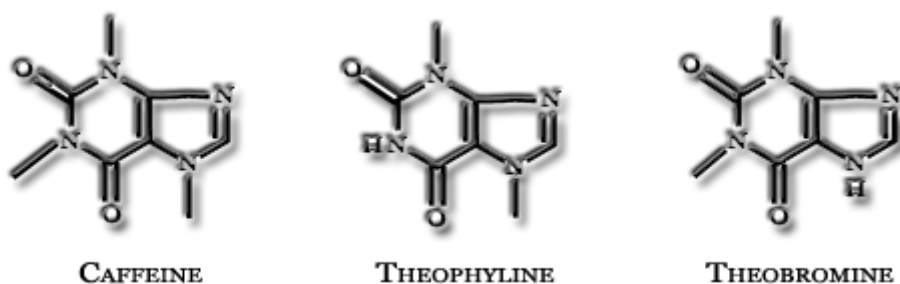


Figura 4: Principales metalxantinas componentes encontrados en *lp*.

La cafeína influye en las actividades del Sistema Nervioso Central (SNC), cardíaca, muscular y renal. Estos efectos sobre el sistema nervioso central (CNS) están confinados en los centros corticales responsables de las funciones síquicas superiores, y resultan en una buena coordinación realizada de las funciones cerebrales y consecuentemente en alta vigilancia y actividad mental. (Martindale et al, 1999).

- **Vitaminas:**

Entre las vitaminas presentes en el mate tenemos la vitamina C (ácido ascórbico: 104mg/100g de hojas frescas), la vitamina B1 (tiamina, 13% VD*), la vitamina B2 (riboflavina, 23% VD*), el ácido nicotínico, la vitamina A, vitamina E, el ácido fólico, y también derivados del ácido pantoténico. (Dewick, 1999; Bertoni et al 1992, Bracesco, 2003).

(*) Valores diarios de referencia en una dieta de 2500 calorías.

- **Componentes volátiles:**

Un total de 196 componentes volátiles fueron identificados en el aceite volátil, siendo muchos de ellos, probablemente, resultantes de la degradación térmica de los carotenoides, ácidos grasos, degradación hidrolítica, o formados por la reacción de Maillard, durante los procesos de secado y tostado.

Los 10 más importantes fueron identificados como α -ionona, β -ionona, α -terpineol, ácido octánico, geraniol, 1- octanol, nerolidol, geranilactona y eugenol así como la identificación de diferentes compuestos fenólicos donde se destacan importantes derivados cafeicos y flavonoides como la quercetina, la rutina y el kaempferol. (Kawakami, 1991; Filip et al, 2001).

- **Componentes minerales:**

Las concentraciones de minerales en vegetales no solamente son específicas para la especie, edad y tejido, sino que también dependen del ambiente. Diversos factores controlan la proporción de minerales en los vegetales, principalmente el genético.

También el contenido cambia drásticamente dependiendo de las prácticas de agricultura. El uso de fertilizantes y la calidad de la tierra tienen un importante impacto en la composición mineral de las hojas. (Vera Garcia et al, 1997; Reissmann et al, 1999).

Los compuestos encontrados en forma significativa sobre 100g de hoja fresca son **magnesio** 155.43 a 420.00 mg, **calcio** 64.89 a 116.52 mg, **hierro** 2,52 a 4.95 mg, **sodio**

14.32 a 19.09 mg, **potasio** 569.13 a 774,40 mg, **manganeso** 32.45 a 63.02mg y **zinc** 2.77 a 4.99 mg, **cobre** 0.8 a 1.2 mg. (Tenorio Sanz et al, 1991; Carducci et al, 2000).

- **Saponinas:**

La yerba mate tiene numerosas saponinas triterpénicas derivadas principalmente del ácido ursólico (metasaponinas) y en menor cantidad saponinas derivadas del ácido oleanólico representando entre el 5 a 10% de la hoja de *Ilex paraguariensis*. (Filip et al, 2010). Son sustancias glucosídicas con la propiedad de provocar, en soluciones acuosas, la formación de espumas. Debido a la reducción de la tensión superficial, presentan acción detergente y emulsificante. Son responsables por el índice de amargor y de espuma de la yerba mate. (Taketa et al, 2004).

Las saponinas tendrían actividad anti hipercolesterolémica probablemente contribuyendo a la formación de micelas entre el colesterol y las sales biliares en el intestino, formando complejos que no pueden ser absorbidos. (Coniglio et al, 1994; Filip et al, 2010).

Se sabe que en una cebadura (50 a 250 g), la cantidad de saponinas ingeridas sería capaz de complejar entre 26 a 105 mg de ácido cólico, lo que sugiere que in vivo dichas saponinas podrían formar complejos con los ácidos biliares, lo que podría determinar una disminución efectiva de las concentraciones de colesterol en sangre (Ferreira et al, 1997)

También se ha informado que las saponinas interfieren con el metabolismo del colesterol y retrasan la absorción intestinal de las grasas vía la inhibición de la actividad de la lipasa pancreática. (Dickel et al, 2007)

- **Otros componentes:**

Ácidos Orgánicos, Proteínas, Celulosa, Lignina, Clorofila, Lípidos, Carotenoides, y 15 diferentes Aminoácidos. (Bracesco, 2003)

2.4.1.4. Actividad de protección celular, antioxidante y antimutagenica de *Ip*.

Los extractos de *Ip* son potentes inhibidores de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y tienen efectos antimutagénicos.

Se demostró que el extracto de *Ip* es capaz de inhibir la oxidación “in vitro” de LDL. La inhibición de la peroxidación lipídica fue monitoreada por los dienos conjugados y por el método del ácido reactivo (TBARS) además de la modificación de LDL apoB. Esta inhibición tiene un efecto dependiente de la concentración. (Gugliucci et al, 1995).

Subsecuentemente se extendió esta observación “in vivo” demostrando que los antioxidantes en *Ip* son absorbidos a nivel intestinal en el hombre y que alcanzan niveles suficientemente altos en todas las muestras de plasma de humanos sanos inhibiendo la auto oxidación de LDL inducida por cobre como se mostró por la producción de TBARS. (Gugliucci et al, 1996).

Estos resultados fueron corroborados empleando tres sistemas de oxidación diferente (inducción por cobre, peroxinitrito y lipoxigenasa) sobre la LDL humana. (Gugliucci et al, 2002).

También se presentaron resultados que mostraron un potencial antioxidante de los extractos de *Ip*, al inhibir químicamente la oxidación de membrana sintética (liposomas), también medida por la producción de TBARS. (Filip et al, 2000).

Por otro lado se investigaron las propiedades antioxidantes de un extracto acuoso de *Ip*, en ratas, usando un sistema generador de radicales libres, observandose una inhibición en la lipoperoxidación en hígado de rata dependiente de la concentración. Adicionalmente, el extracto fue también capaz de inhibir la peroxidación inducida por el peróxido de hidrógeno en membranas celulares exhibiendo propiedades de atrapamiento de radicales rechazando al anión superóxido. (Schinella et al, 2000).

En otro trabajo se observó que el peroxinitrito y la lipoxigenasa que inducen oxidación en la LDL humana son inhibidos potentemente por los extractos de yerba mate, de forma dependiente de la dosis. (Bracesco et al, 2003).

En este mismo trabajo se evaluaron las propiedades antioxidantes de la infusión de *Ip* por medio de la inducción de roturas de doble cadena en el ADN por peróxido de hidrógeno en *Saccharomyces cerevisiae*, los resultados sugirieron que la infusión de mate disminuye, en forma dependiente de la dosis, el número de roturas de doble cadena en el ADN. (Bracesco et al, 2003).

Se estudió también la actividad quimiopreventiva de la infusión de mate evaluando la citotoxicidad y la actividad de ornitina decarboxilasa y quinona reductasa inducidas por TPA usando células Hep G2 (línea celular del tumor de hígado en humanos).

En el mismo trabajo también se analizó la actividad inhibidora de la topoisomerasa usando *Saccharomyces cerevisiae*. Los resultados presentados por los autores sugieren que la actividad citotóxica y la inhibición de la topoisomerasa II pueden contribuir a la actividad quimiopreventiva de los extractos de mate. (Ramírez et al, 2004).

Otro trabajo evaluó también la actividad quinona reductasa en mate en células de hepatoma murine Hepa1c1c7 (línea celular del tumor de hígado en ratones), no encontrándose inducción de estas enzimas al rango de concentración analizada (0.5-10.5mg/ml). (Chandra et al, 2004).

En otro ámbito se mostraron los efectos protectores “in vitro” de *Ip* contra la citotoxicidad inducida por peroxinitrito la cual está implicada en los mecanismos patogénicos del derrame cerebral, la isquemia del miocardio, diabetes y diabetes asociada con disfunción cardiovascular. Extracciones acuosas a partir de *Ip* presentaron la mayor inhibición observada de nitración proteica y una alta promoción de supervivencia celular, siendo mayor de 60% en diluciones de 1/1200. (Bixby et al, 2005). A su vez se demostró que las infusiones de mate pueden también actuar sobre la peroxidasa, al investigarse la actividad de los extractos acuosos de *Ip* y yerba mate comercial sobre la secreción de peroxidasa en glándulas submaxilares en ratas hembras. La cafeína y los ácidos clorogénicos presentaron un importante rol en la inducción de la secreción de peroxidasa. La peroxidasa es una enzima bucal y las infusiones podrían jugar un importante rol, en la protección contra procesos patogénicos. (Filip et al, 2007).

2.4.1.5. La ingesta de mate y la incidencia de cáncer.

Algunos estudios epidemiológicos sugieren o indican que hay una asociación entre el consumo de mate y el cáncer orofaríngeo. (Vassallo et al, 1985; De Stefani et al, 1988; Pintos et al, 1994; Sewram et al, 2003). Este efecto puede estar relacionado con la

temperatura de la infusión y no con la bebida por sí misma. En poblaciones de *Saccharomyces cerevisiae* se pudo comprobar que el efecto mutagénico depende del tiempo de exposición a la alta temperatura. (Candrea et al, 1993).

Muchos estudios en modelos de cultivos celulares, así como en animales parecen converger para mostrar un efecto anti-mutagénico y protector del ADN de los extractos de *Ip* y sus componentes. (Bracesco et al, 2003; Candrea et al, 1993; Miranda et al, 2008).

Los resultados sugieren que el mate puede proteger al ADN frente a distintos genotóxicos y mejorar la actividad de reparación genómica. Esta protección puede ser atribuida a la actividad antioxidante de los compuestos bioactivos del mate como el ácido clorogénico, la rutina, la quercetina, y a la activación de puntos nodales de las cascadas de transducción involucradas en el control del ciclo celular y en la reparación de ADN. (Bracesco et al, 2003; 2007, Nunes et al, 2008).

Por otra parte como ya se mencionó en la cadena de producción de yerba mate se produce la contaminación del mate con hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH's) que son compuestos potencialmente carcinógenos. (Leitao and Braga, 1994; Kamangar et al, 2008). Estos compuestos son hidrofóbicos y su contenido en la bebida de mate es generalmente muy bajo, pero se vuelve importante debido a las grandes cantidades que usualmente beben las personas por día. (Hsu et al, 1995; Jacques et al, 2007; Heck et al, 2008).

3. Hipótesis.

La hipótesis de trabajo supone disminución diferencial de lesiones inducidas por agentes genotóxicos como las radiaciones ionizantes y el benzo(a)pireno en presencia de la infusión de *Ip* o de sus componentes bioactivos. A nivel celular *Ip* induciría un aumento en las probabilidades de sobrevivida y un efecto antimutagénico.

4. Objetivos.

Objetivo general:

Estudiar el posible efecto protector de la yerba mate (*Ip*) y alguno de sus componentes bioactivos frente a agentes genotóxicos

Objetivos específicos:

Determinación de probabilidades de sobrevivida y mutagénesis en muestras celulares de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) bajo diferentes tratamientos, a saber:

- a) Exposición a radiación gamma (RI) en tratamientos simples o combinados: RI e infusión de yerba mate o RI con resveratrol.
- b) Incubación en presencia del compuesto benzo(a)pireno como agente único y en presencia de benzo(a)pireno e infusión de yerba mate concomitantemente.

5. Materiales y métodos.

Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Se utilizaron cepas de *Saccharomyces cerevisiae* haploides SC7K lys2-3 (auxotróficas para lisina). (Nunes et al, 1984).

Mantenimiento de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*:

Las cepas de *S. cerevisiae* se mantienen en tubos de agar inclinado conteniendo YPDA en la heladera a 4°C. (Rose et al, 1990).

Medios de cultivo

Se utilizaron medios de cultivos nutrientes para el estudio de la sobrevivencia (YPD, YPDA) y selectivos para mutagénesis (OM) habituales para *Saccharomyces cerevisiae* descritos en la literatura (Rose et al., 1990) y que se detallan a continuación.

- YPD: Medio nutriente líquido: 1% de extracto de levadura (Difco, US Biological), 2% bactopectona (Difco, US Biological) y 2% glucosa (Sigma).
- YPDA: Medio nutriente sólido: YPD + 2% agar (Difco, US Biological).
- OM: Medio de omisión: 0.67% base nitrogenada de levadura (Difco), 2% glucosa (Sigma) y 2% agar (Difco, US Biological).

Agente físico.

Radiación ionizante: Gamma: Fuente Co60: Nordion 220, Dosis absorbida: 100 y 200 Gy. Dosimetría: dosímetro de polimetilmetacrilato Harwell Amber 3042 S.)

Agentes Químicos y Naturales.

Infusión de yerba mate

Se preparó siempre con yerba "Canarias" SA, Origen Baldo Brasil. Se preparó inmediatamente antes de cada experimento, colocando 50 g de yerba en un matraz al que se le agregaron 250 ml de agua destilada a 70 ± 3 °C. Luego se filtró con papel de filtro (Watman Nº 2) y el filtrado se esterilizó por filtración con filtros de 0.45 µm.

Resveratrol.

Se preparó una solución madre de resveratrol (Resv) (PM=228,25 g/mol) a una concentración 600 µg/mL en agua destilada. La concentración final en las alícuotas de cultivo celular al ser agregado en una proporción de 10% fue de 60 µg/mL.

Suspensión de Benzo(a)pireno.

Se prepararon suspensiones madres de diferente concentración de benzo(a)pireno (PM=252,31 g/mol) en un rango entre 20 µg/L. y 245 µg/L (2 µg/Kg es el valor permitido para alimentos). (Vives et al, 2001)

Las suspensiones se realizaron en agua destilada y esterilizada con el agregado de Tween 80 al 10% de manera de aumentar la solubilidad del benzo(a)pireno en agua.

Se realizaron las diluciones necesarias para que al agregar el agente en una proporción de 10% las concentraciones finales en las diferentes alícuotas de cultivo celular fueran 2 ng/mL, 20 ng/mL, 24,5 ng/mL.

Crecimiento de las Poblaciones Celulares

Para cada experimento se tomó una muestra de la cepa a utilizar y se realizó un primer pasaje a medio de cultivo YPD en condiciones de esterilidad e incubando por 3 a 4 días bajo agitación continua a 30°C en un agitador orbital.

De esta manera la población alcanzó una fase estacionaria temprana. A partir de este primer pasaje se realizó un segundo pasaje que consiste en diluir apropiadamente en YPD una fracción del cultivo celular proveniente del primer pasaje e incubarlo durante la noche a 30 °C con agitación continua de manera de obtener un cultivo en fase exponencial de crecimiento ($N = 1 - 3 \times 10^7$ células/mL). A fin de lograr reproducibilidad, el N° inicial del segundo pasaje para cada cepa así como el tiempo de incubación necesario para alcanzar la fase exponencial de crecimiento (que depende del tiempo de generación celular TGC=1,5 hs) se determinó por el estudio de la cinética de crecimiento poblacional.

Tratamientos

Se partió de cultivos en fase exponencial de crecimiento con ($N = 1 - 2 \times 10^7$ células/mL), en ese punto los cultivos fueron divididos en varios frascos y sometidos a los tratamientos simples y sus combinaciones.

Células tratadas con rayos gamma:

- Construcción de una curva dosis efecto:

Para este tratamiento se irradió con diferentes dosis absorbidas (Da) de Rayos gamma en un rango de 0 a 200 Gy

-Tratamientos simples (un solo agente):

Rayos gamma -Dosis absorbida: 200Gy. Dosimetría: dosímetro de polimetilmetacrilato-Harwell Amber 3042 S; *Ip* (10% v/v); resveratrol 600 µg/ml (10% v/v) y respectivos controles no tratados.

-Tratamientos combinados (2 agentes):

10 min antes de la irradiación, se trataron las alícuotas de células en medio nutriente con *Ip* o resveratrol, a las concentraciones indicadas más arriba. Luego se procedió a irradiar parte de las muestras, las restantes más las no tratadas se utilizaron como controles paralelos

Células tratadas con benzo(a)pireno:

-Construcción de una curva dosis efecto:

Se incubaron por una hora las alícuotas de cultivo celular a diferentes concentraciones de benzo(a)pireno en un rango de 0 a 24,5ng/mL.

-Tratamientos simples (un solo agente): benzo(a)pireno (10% v/v), *Ip* (10% v/v) y control no tratado. Se incubaron por 1 hora.

-Tratamientos combinados (2 agentes): en estos tratamientos se agregó concomitantemente benzo(a)pireno e *Ip* (10% v/v). Se incubó por 1 hora.

Inmediatamente después de los tratamientos simples o combinados las muestras celulares fueron lavadas dos veces en agua desionizada.

A partir de estas suspensiones celulares se procedió a las determinaciones de tasas de sobrevivida y mutagénesis.

Para las curvas de dosis efecto solamente se determinó la tasa de sobrevivida como estimador de la Probabilidad de sobrevivida.

Curvas de sobrevivida y análisis de la mutagénesis

Para determinar la sobrevivida, las muestras celulares tratadas como ya se describió fueron apropiadamente diluídas de manera de obtener 200 - 400 células viables por placa de Petri y sembradas en YPDA (el ensayo se hizo por triplicado para cada una de las muestras).

Las placas fueron incubadas a 30°C durante 3 días. Se contó el número de colonias y se calculó, la sobrevivida $S(x)$ para cada tratamiento, de acuerdo a:

$S(x) = N_s(x) / N_0$, donde $N_s(x)$ es el número total de células capaces de multiplicarse y por tanto de sobrevivientes para la dosis x y N_0 es el número de células sobrevivientes (número de colonias de la muestra control). En todos los casos los valores utilizados son promedios del conteo de las tres placas.

En el estudio con benzo(a)pireno se determinaron las funciones de sobrevivida $S(x)$, $S(x,y)$, donde x es la "dosis" (concentración por tiempo de exposición) y donde y es la dosis correspondiente a la yerba mate (lp).

En el estudio con rayos gamma se determinaron las funciones de sobrevivida $S(x)$, $S(x,y)$, $S(x,z)$ donde x es la "dosis" absorbida de radiación gamma ($D=200Gy$); y , z son las "dosis" correspondientes a la infusión de yerba mate y resveratrol, de acuerdo a lo indicado más arriba. (Eckardt y Haynes 1977; Haynes, 1988).

Para determinar la mutagénesis, las muestras celulares procesadas como se describió anteriormente y sin diluir ($N= 10^7$ cels/ml) fueron sembradas a 0.2 ml de cultivo por placa de Petri conteniendo medio de selección OM para la cepa SC7K *lys* 2-3 (el ensayo se realizó por triplicado). (Keszenman et al, 2000).

Las placas se incubaron a 30°C durante 21 días y luego se realizó el conteo de las colonias correspondientes a las revertantes a la potrotrofia *lys* → *LYS*.

Se calculó la frecuencia de mutación $M(x)$ para cada dosis de x , y para los productos naturales a las dosis y , z de la siguiente manera:

$$M(x) = N_m(n) / N_s$$

Donde N_m es el número de mutantes/mL para las dosis n : x , y , z .

$N_s(n)$ es el número de sobrevivientes/ mL y para cada dosis única o en combinación. Se calculó además la frecuencia espontánea de mutación en las condiciones de nuestros experimentos dosis = 0 (Eckardt y Haynes, 1977).

Métodos estadísticos:

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó según la Distribución Binomial, se consideraron datos significativos para $p < 0.05$.

6. Resultados.

Tratamiento con radiación gamma.

En poblaciones tratadas con dosis crecientes de rayos gammas (0-100 Gy) se observó una disminución continua de la probabilidad de sobrevida en función de la dosis. (Tabla I, figura 5)

Dosis (Gy)	0	100	200
Sobrevida S(x)	$1 \pm 0,0056$	$0,36 \pm 0,03$	$0,20 \pm 0,02$

Tabla I

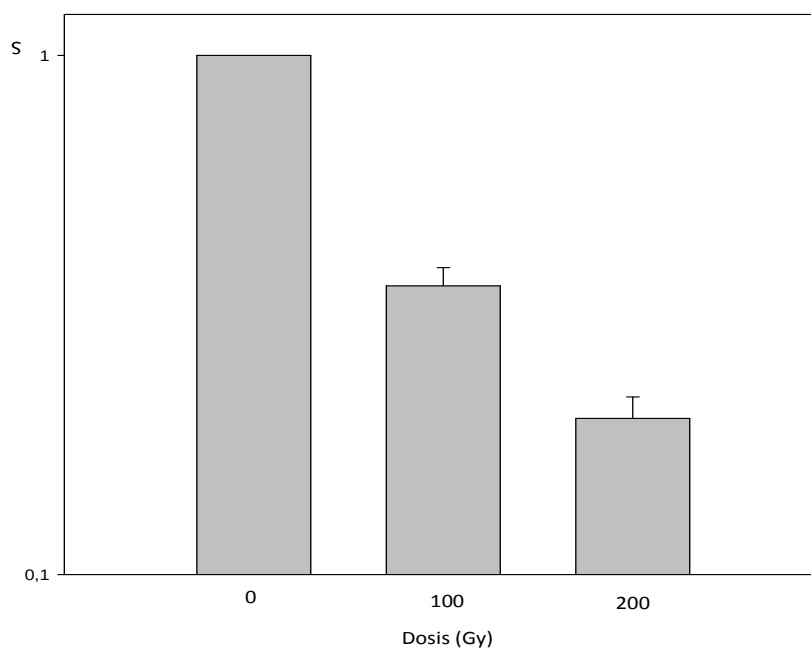


Figura 5: Fracción de sobrevida a diferentes dosis de rayos gamma

Tratamiento combinado de radiación gamma e *Ip*.

En poblaciones tratadas simultáneamente con *Ip* y rayos gammas así como en las tratadas simultáneamente con resveratrol y rayos gammas se observó un aumento significativo en la probabilidad de sobrevida comparada con la misma dosis de rayos gamma actuando como único agente. (Tabla II, Figura 6)

Muestra	C	<i>Ip</i>	Resv	γ	γ + <i>Ip</i>	γ +Res
(Sx)	$1.00 \pm 0,0056$	$1.07 \pm 0,0056$	$0.95 \pm 0,015$	$0.20 \pm 0,02$	$0.34 \pm 0,03$	$0.31 \pm 0,03$

Tabla II

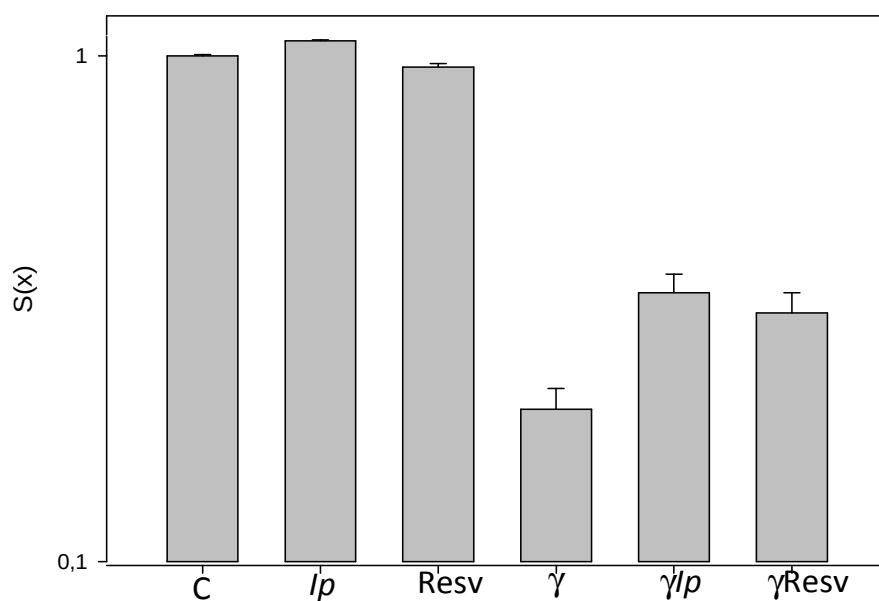


Figura 6: Fracción de supervivencia ($S(x)$) bajo tratamiento simple y combinado con lp , o Resv, γ .

Cabe mencionar que en las poblaciones expuestas solamente a los agentes naturales no se observaron diferencias significativas con respecto a las poblaciones controles no tratadas.

En relación a la frecuencia mutagénica, no se observó una variación significativa con respecto a la frecuencia de mutación espontánea en el caso de las poblaciones expuestas a los productos naturales como único agente por separado. En las poblaciones tratadas con rayos gamma como único agente se observó un aumento significativo de la probabilidad de mutagénesis.

Por otro lado en las poblaciones tratadas simultáneamente con rayos gamma e lp así como los tratados con rayos gamma y resveratrol se observó que la frecuencia mutagénica fue significativamente menor. (Tabla III, Figura 7).

Muestra	C	lp	Resv	γ	γlp	$\gamma Resv$
Frecuencia mutagenica	$7.32e-6$ $\pm 5,41e-7$	$5.81e-6$ $\pm 4,82e-7$	$9.9e-6$ $\pm 6,29e-7$	$7.04e-5$ $\pm 1,67e-6$	$4.81e-5$ $\pm 1,38e-6$	$4.35e-5$ $\pm 1,32e-6$

Tabla III

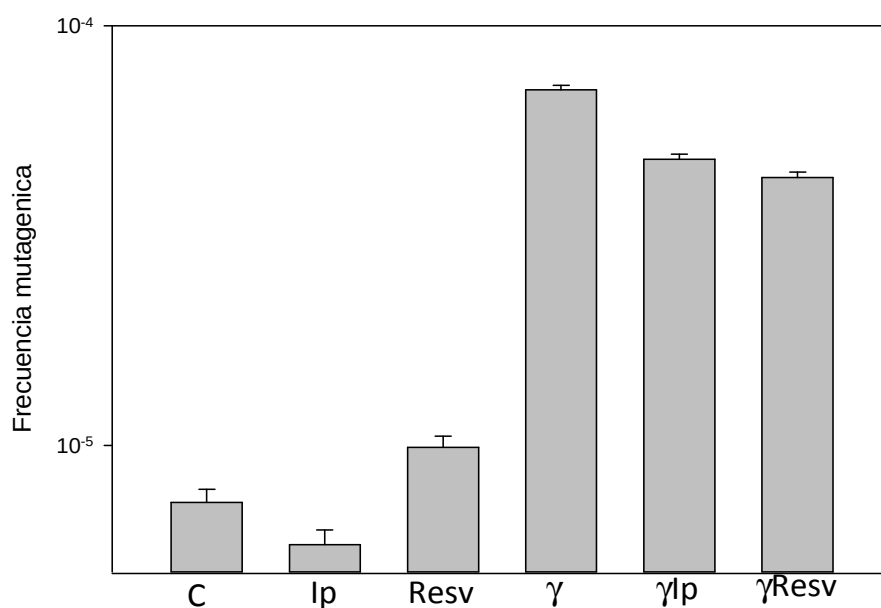


Figura 7: Frecuencia mutagénica bajo tratamientos simples y combinados.

Tratamiento con benzo(a)pireno.

En relación a la probabilidad de supervivencia se observó una disminución continua de la misma en función de la dosis creciente de benzo(a)pireno (Tabla IV, Figura 8).

Concentración (ng/mL)	0	2	20	24.5
(Sx)	1 ± 0.0056	0.58 ± 0.03	0.52 ± 0.03	0.45 ± 0.03

Tabla IV

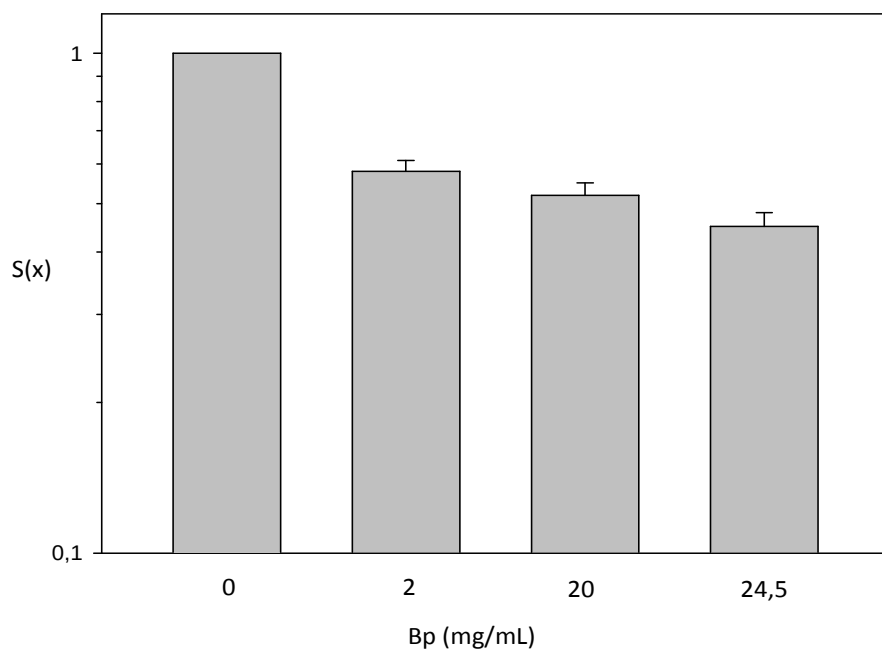


Figura 8: Fracción sobreviviente ($S(x)$) en función de concentraciones crecientes de Bp

Tratamiento con benzo(a)pireno e *Ip*.

En los tratamientos combinados con el genotóxico e *Ip* se observó un aumento significativo en la frecuencia relativa de sobrevida. (Tabla V, Figura 9)

Muestras	C	<i>Ip</i>	Bp	Bp- <i>Ip</i>
$S(x)$	1 ± 0.0056	1 ± 0.0056	0.45 ± 0.043	0.90 ± 0.02

Tabla V

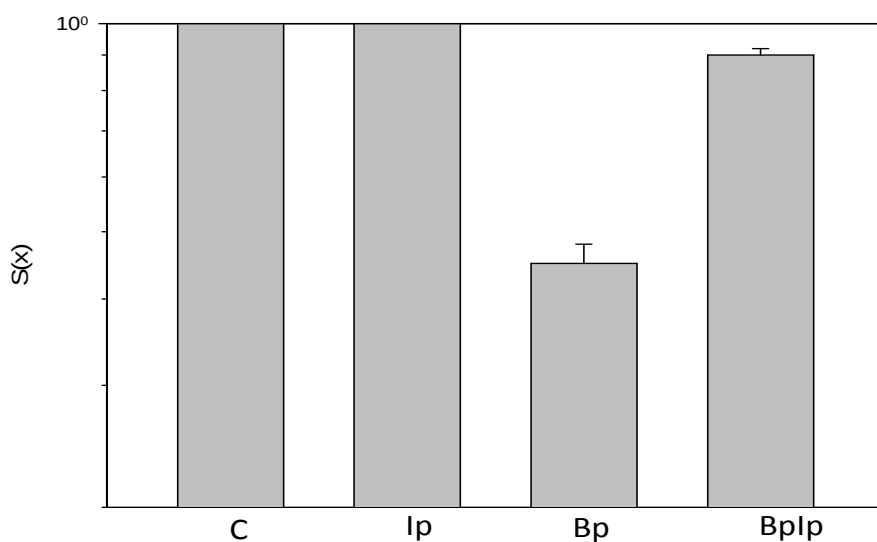


Figura 9: Fracción sobreviviente ($S(x)$) bajo tratamiento simple y combinado de *Ip* y Bp. (Bp= 24,5 ng/mL)

Puede observarse que la sobrevida frente a *lp* como tratamiento único no difiere con la del control.

En poblaciones celulares expuestas concomitantemente a 24,5 ng/mL de benzo[a]pireno e *lp* la frecuencia relativa de sobrevida $S(x)$ se multiplicó por un factor 2.

Se observó además una disminución significativa de la frecuencia mutagénica en caso de tratamiento combinado (Tabla VI, Figura 10)

Tratamiento	C	<i>lp</i>	B=24,5ng/mL	<i>lp</i> B=24,5ng/mL
Frecuencia mutagenica	$1.06e-5 \pm 6,5e-7$	$9.41e-6 \pm 6,13e-7$	$3.84e-5 \pm 1,24e-6$	$1.18e-5 \pm 6,87e-7$

Tabla VI

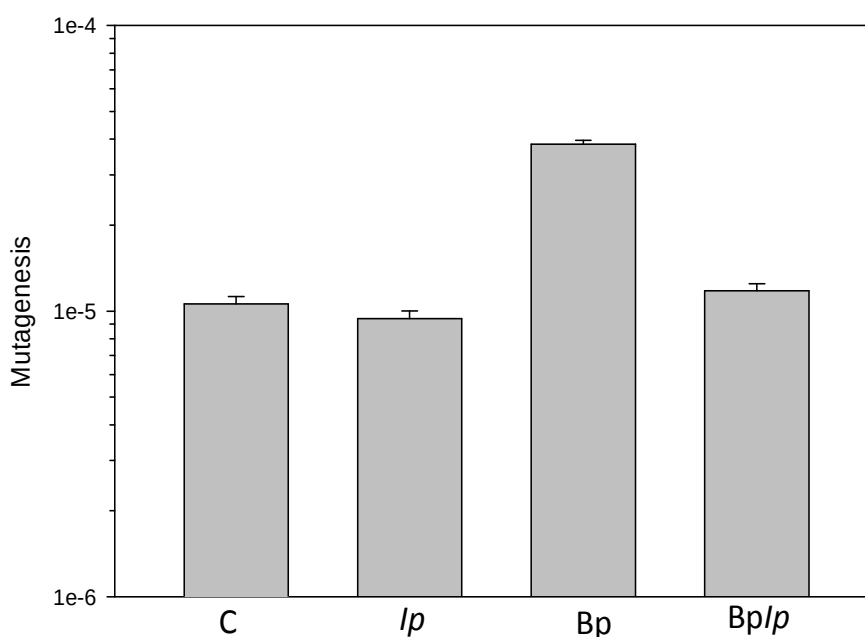


Figura 10: Frecuencia mutagenica bajo tratamiento simple y combinado de *lp* y Bp. (Bp= 24,5 ng/mL)

A la concentración de 24,5 ng/mL de benzo[a]pireno la frecuencia mutagénica disminuyó en un factor de $3,3 \pm 0,3$ en las poblaciones concomitantemente expuestas a la infusión *lp*.

7. Discusión.

Tratamiento con rayos gamma.

Los datos obtenidos indicarían la existencia de uno o más mecanismos de defensa celular ya sea por componentes de la *lp* con capacidad antioxidante de atrapamiento de radicales libres, formados en su gran mayoría al interactuar la radiación ionizante con el medio acuoso celular, o por acción indirecta sobre componentes de las vías de control del ciclo celular y reparación del ADN. (ver introducción).

Al ser el resveratrol (trans-3,4',5-trihidroxistilbeno) uno de los componentes polifenólicos de la yerba mate, sería por lo menos en parte responsable de la capacidad antioxidante de la *lp*.

El resveratrol es un polifenol sintetizado en una variedad de especies de plantas luego de retos como infecciones fúngicas o irradiación ultravioleta y ha despertado un gran interés en la comunidad científica debido al amplio espectro de sus efectos biológicos. En modelos de células de mamíferos en la etapa de formación y procesamiento del daño al ADN por radiaciones u otros genotóxicos el resveratrol protegería el genoma como un antioxidante a través de la supresión de la activación metabólica del carcinógeno, la expresión de novo de genes que codifican proteínas de desintoxicación y posiblemente incluso a través de propiedades de depuración de radicales. (Gatz et al, 2008a).

Los antioxidantes contenidos en la infusión *lp*, como el resveratrol, pueden cambiar la generación y el destino de ROS inducidos por la radiación, dependiendo de su concentración y el potencial redox de los componentes involucrados. Algunos resultados mostraron que la adición de *lp* 5 minutos antes de la irradiación sólo proporciona un efecto protector leve, lo que indica que el tiempo requerido para el transporte y la distribución intracelular de los antioxidantes juegan un papel importante en los efectos radioprotectores observados. (Bracesco et al, 2013 en revisión).

Los efectos antioxidantes, antiinflamatorios, de inducción de la apoptosis y regulación del ciclo celular han sido analizados en diferentes sistemas celulares con la participación de más de 30 blancos moleculares en múltiples vías celulares diferentes. Es así que el resveratrol inhibiría la iniciación, promoción y progresión tumoral y este hecho estaría explicado principalmente por sus propiedades en el control del ciclo celular y la inducción de apoptosis. (Gatz et al, 2008b; Curtin, 2012).

Se ha sugerido que el resveratrol inhibe tanto la recombinación homóloga (HR) como la unión de extremos no homólogos (NHEJ) independientemente de sus funciones reguladoras del crecimiento celular y la apoptosis. Se ha propuesto que la activación de ATM y / o ATR es un efecto central de la acción del resveratrol. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio utilizando mutantes en el punto nodal ATR / MEC1 indican que distintos tipos de antioxidantes activarían funciones de control del ciclo y reparación genómica sin errores. (Bracesco et al, 2013). La represión de las vías de recombinación propensas a errores podría explicar, al menos parcialmente los efectos quimiopreventivos de este componente natural de la planta en modelos de cáncer de origen animal. (Gatz et al, 2008 a,b). Estos autores indican la producción de roturas de ADN dependientes de resveratrol en presencia de iones Cu (II) y la inhibición de las ADN polimerasas alfa y delta, lo que ha producido controversias

sobre el papel de RV, la rutina y otros antioxidantes como compuestos protectores (Gatz et al, 2008a). En este sentido sería importante comparar y /o reproducir las condiciones de esos hallazgos controlando las concentraciones utilizadas y los potenciales redox involucrados en cada sistema.

Los presentes resultados en conjunto con datos proporcionados por la bibliografía permiten plantear la existencia de uno o más componentes de *Ip*, como el resveratrol, los que actuarían solos o interactuando con otras moléculas contrarrestando los efectos potencialmente letales y mutagénicos de los rayos gamma por distintos mecanismos de defensa antioxidante y activación de vías de control del ciclo celular y reparación de ADN.

Tratamientos con benzopireno.

De acuerdo a la hipótesis se encontró una disminución de la frecuencia mutagénica de las poblaciones expuestas a ambos tratamientos frente a las expuestas solo a benzo(a)pireno.

Los aductos formados por la unión del derivado diol epóxido del benzo(a)pireno, inducen distorsión e inestabilidad en la cadena de ADN. La reparación por escisión de nucleótidos (NER) que se realiza con baja probabilidad de error es uno de los sistemas de defensa vital contra los aductos carcinógeno-ADN. Si éstos no pudieran repararse podría iniciarse la primera etapa de transformación maligna que podría llevar al desarrollo de cáncer. (Kropachev K. et al, 2009).

Los datos obtenidos sugieren que la infusión de *Ip* estaría actuando evitando la metabolización intracelular del Bp y/o regulando algún punto en la vía de reparación escisional (NER).

Algunos autores indican que a nivel humano la exposición al Bp incrementa la actividad de CP1A1, (como se explico anteriormente) enzima del citocromo P450, que participa en la metabolización del Bp y la expresión de la proteína XPA implicada en la reparación NER. (Wei et al, 2009). Estos datos nos darían la pauta de que la infusión de *Ip* estaría actuando a nivel de los complejos sensores o transductores del daño en el ADN provocado por el Bp.

Otros autores mencionan el hecho que el bloqueo de la progresión de la ADN polimerasa de alta fidelidad por encontrarse con la lesión se continúa con el remplazo de la polimerasa replicativa por una o más polimerasas bypass de translesión (síntesis a través de la lesión: TLS). Esta es una vía de reparación que tiene alta probabilidad de reclutar una ADN polimerasa de baja fidelidad, vía postreplicativa RAD6 dependiente. (Keszenman et al, 2005). Este sería uno de los mecanismo por el cual se introducen mutaciones en el genoma por la exposición al Bp. (Jia L et al, 2008).

También es conocido que el bloqueo producido por los agentes químicos que se unen al ADN puede provocar el colapso de la horquilla de replicación creando así rotura en las dos cadenas. En levaduras haploides este tipo de daño implicaría su procesamiento principalmente a través de unión de extremos no homologos NHEJ. (Shrivastav et al, 2007).

En resumen las alteraciones a nivel genómico producidos por Bp pueden deberse a una falla en la reparación escisional NER (sin error), a un procesamiento post replicativo

dependiente de RAD6 a través de TLS y a un procesamiento de posibles roturas doble de cadena por el mecanismo propenso a error de NHEJ. (Blanc et al, 2011).

8. Conclusiones.

Radiación gamma:

Presentes resultados indican que la infusión de yerba mate y el resveratrol poseen efectos radioprotectores en las condiciones de nuestros experimentos.

Esta radioprotección por parte de los compuestos estudiados, podría explicarse por interacciones de los polifenoles aislados o en conjunto con cascadas de óxido-reducción perturbadas por RI a nivel de los compartimientos extracelular e intracelulares (ej. mitocondrias, núcleo), además de activación por cascadas de señalización redox de puntos nodales de control del ciclo celular los que interactúan modulando HR y NHEJ que determinan la reparación genómica sobre roturas simples y dobles del ADN (ej. Mec1/Tel1/ATR,hATM). (Bracesco et al, 2007; Nunes et al, 2008, Genestra, 2007; Curtin, 2012; Bracesco et al, 2013 por revisión; Gatz et al, 2008 a,b). En caso de daño oxidativo a nivel de bases actúan además los sistemas de reparación BER, MMR y Postreplicativo que pueden modularse por mecanismos redox. (Curtin, 2012).

Benzo(a)pireno:

Se concluye que los componentes mutagénicos de las vías de reparación genómica que se ponen en juego frente a derivados del benzo[a]pireno se modulan con disminución de flujos en presencia de componentes de *Ip*. Estas vías mutagénicas son fundamentalmente las escisionales (BER, MMR) y las vías de reparación postreplicativa dependientes del gen RAD6/hRAD6 (polimerasas η y ζ de síntesis translesión). (Keszenman et al, 2005; Curtin, 2012).

Si falla la vía NER (sin error) podrían procesarse los daños a través de otras vías mutagénicas como son NHEJ y las postreplicativas sujetas a error dependientes de RAD 6.

9. Bibliografía.

- Alonso E., Bassagoda M. J., Ferreira F. Yuyos. Uso racional de las plantas medicinales. Ed. Fin de Siglo, Montevideo. (1992).
- Agudo A. Los Hidrocarburos Aromaticos Policiclicos (HAP) Acercamiento a su problemática como riesgo laboral. Instituto Catalán de Oncología. Secretaría de Salud Laboral y Medio Ambiente MCA-UGT Federación de Industria. (2009).
- Bashkirov V, King JS, Bashkirova E, Schmuckli- Maurer J and Heyer WD. DNA repair protein Rad55 is a terminal substrate of DNA damage checkpoints. Mol Cell Biol. 4393-4404. (2000).
- Bertoni, M H., Prat Kircun, S.D., Kanzig, R.G., and Cattaneo, Y.P. Hojas frescas de Ilex paraguariensis S. Hill. III. An. Asoc Quím. Argent., 80: 493-501. (1992).
- Bisson L, Butzke CH, and Ebeler S. The role of moderate ethanol consumption in health and human nutrition. American Journal of Enology and Viticulture. 46: 449- 462. (1995).
- Bixby M, Spieler L, Menini T, Gugliucci A. Ilex paraguariensis extracts are potent inhibitors of nitrosative stress: a comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity. Life Sci. 77: 345. (2005).
- Blanc L, Cladera M, Brando MV, Gutierrez M, Benedetto L, Falconi A, Torterolo P, Migliaro E, Sánchez A.G , Sosa V, Contreras V, Candreva E.C, Nunes E, Bracesco N. Yerba mate investigación en Uruguay. Relación entre academia e industria. Congreso Sudamericano de Yerba Mate. Misiones Arg. (2011).
- Bracesco N, Buccino J, Nunes E. Interferencia entre reacciones oxidativas y el alfa-tocoferol en la proliferación y progresión del ciclo celular. Congreso Ibero Latinoamericano de Biología Celular México pp O10. (1995).
- Bracesco N, Candreva E, Dell M, Keszenman D, Sánchez A, Soria S, Siede W, Nunes E. Reparación de ADN y control del ciclo celular: efectos de los genes chk1 y rad 17 sobre la estabilidad geonómica. [pdf] P9 Congreso de la SUBBM Fac. de Ciencias URUGUAY. (2002).
- Bracesco N. Exploración del efecto protector frente a radicales libres de los derivados de la uva (*Vitis vinifera* Cv.Tannat) y de la infusión de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) en *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de Maestría en Biotecnología. (2003).
- Bracesco N, Dell M, Rocha A, Behtash S, Menini T, Gugliucci A, Nunes E. Antioxidant activity of a botanical extract preparation of Ilex paraguariensis, prevention of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* and human low-density lipoprotein oxidation. Journal of Alternative and Complementary Medicine. 9: 379. (2003).
- Bracesco N, Candreva EC, Keszenman D, Sanchez AG, Soria S, Dell M, Nunes E. Roles of *Saccharomyces cerevisiae* RAD17 and CHK1 check point genes in the repair of double-strand breaks in cycling. Radiat Environ Biophys. 46(4): 401-7. (2007).
- Bracesco N, Sanchez A.G, Contreras V, Menini T, Gugliucci A. Recent advances on Ilex paraguariensis research: Minireview. Journal of Ethnopharmacology. 136: 378– 384. (2011).

- Bracesco N, Blanc L, Candreva EC, Contreras V, Hocart SJ, Ferder L, Salvo VA, Sanchez AG, Sosa V, Nunes E. Protection against ionizing radiation by *Ilex paraguariensis* infusion and its polyphenolic component rutin in cell populations of *Saccharomyces cerevisiae*. (2013 en revisión).
- Brenan RJ, Swoboda BEP, Schiestl RH. Oxidative mutagens induce intrachromosomal recombination in yeast. *Mutat Res.* 308:159 – 167. (1994).
- Bryk R, Griffin P, Nathan C. Peroxynitritereductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature.* 407:211 – 215. (2000).
- Candreva E, Keszenman DJ, Barrios E, Gelós U, Nunes E. Mutagenicity induced by hyperthermia, hot mate infusion and hot caffeine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cancer Res* 53:5750- 5753. (1993).
- Cano-Lerida, L., Rose, M. and Walton, P. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, in *Bioactive Compounds in Foods* (eds J. Gilbert and H. Z. Şenyuva), Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK. doi: 10.1002/9781444302288.ch14. (2009).
- Carducci CN, Dabas PC, Muse JO. Determination of inorganic cations by capillary ion electrophoresis in *Ilex paraguariensis* (St. H.), a plant used to prepare tea in South America. *Journal of AOAC International.* 83(5):1167-73. (2000).
- Cavenee WK, White RL. The Genetic Basis of Cancer. *Sci Am.* 272: 72-79. (1995).
- Chandra S, De Mejia Gonzalez E. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. **J Agric Food Chem.** 52(11):3583-9. (2004).
- Coniglio RI, Castillo S, Dahinten E, Doubnia MI, Vázquez LA. Factores de riesgo para aterosclerosis. Comparación de dos ciudades argentinas *Medicina (Buenos Aires).* 54: 117. (1994).
- Contreras V, Sosa V, Blanc L, Bracesco N, Candreva E, Nunes E. Radioprotección del vino Tannat, la yerba mate, resveratrol y ácido tánico en poblaciones celulares de *Saccharomyces cerevisiae*. XIII Jornadas de la sociedad uruguaya de biociencias. (2010).
- Corrado A. J. Contribución al Estudio de la Yerba Mate. *Inst. Facultad de Ciencias Médicas de Buenos Aires* 20: 1-56. (1915).
- Curtin NJ. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nature Rev. Cancer.* 12: 801-817. (2012).
- Daley J M, Palmboos P L, Wu D, Wilson T E. Nonhomologous end joining in yeast. *Annu. Rev. Genet.* 39: 431-51. (2005).
- De Moraes EC, Stefanuto A, Klein GA, Boaventura BC, de Andrade F, Wazlawik E, Di Pietro PF, Maraschin M, da Silva EL. Consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry;* 57(18):8316-24. doi: 10.1021/jf901660g. (2009).
- De Stefani E, Correa P, Oreggia F, Deneo-Pellegrini H, Fernandez G, Zavala D, Carzoglio J, Leiva J, Fonham E, Rivero. Black tobacco, wine and mate in oropharyngeal cancer. A case-control study from Uruguay. *Revue d'Epidemiologie et Sante Publique* 36, 389–394. (1988).
- De Stefani E, Munoz N, Estevez J, Vasallo A, Vitoria C, Teuchmann S. Hot drinking, alcohol, tobacco, diet and esophageal cancer in Uruguay. *Cancer Res.*, 50: 426-431. (1990).

- Dellacassa E, Bandoni AL. El mate (*Ilexparaguariensis* St. Hill., Aquifoliaceae). *Revista de Fitoterapia*. 1 (4): 269-278. (2001).
- Dellacassa E, Cesio V, Vázquez A, Echeverry S, Soule S, Ferreira F, Heinzen H. Yerba mate. Historia, uso y propiedades. *Revista de la Asociación de Química y Farmacia del Uruguay*. 51: 16-20. (2007).
- Dewick PM. *Medicinal Natural Products: a Biosynthetic Approach*, John Wiley & Sons, New York. (1999).
- Dickel ML, Rates SM, Ritter MR. Plants popularly used for losing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*. 109: 60–71. (2007).
- Eckardt F, Haynes RH. Kinetics of mutation induction by ultraviolet light in excision-deficient yeast. *Genetics*. 85: 225-247. (1977).
- Emanuel NM. Kinetics and free-radical mechanisms of ageing and carcinogenesis . En: Likhachev A, Anisimov V, Montesano R. Ed: Age- related factors in carcinogenesis IARC pp. 127-150. (1985).
- Ferreira F, Vázquez A, Güntner C, Moyna,P. Inhibition of the passive diffusion of cholic acid by the *Ilex paraguariensis* St. Hil. Saponins. *Phytother. Res*. 11: 79-81. (1997).
- Filip R, Giberti G, Acevedo C, Ferraro G. Estudio fitoquímico y farmacológico de *Ilex theezans* C. Martius ex Reisseck. *Dominguezia*. 16: 47-53. (2000).
- Filip R, Lopez P, Giberti G, Coussio J, Ferraro G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. *Fitoterapia*. 72: 774-778. (2001).
- Filip R, Turner S, Ferraro G, Anesini C. Effect of *Ilex* extracts and isolated compounds on peroxidase secretion of rat submandibular glands. *Food Chem. Toxicol*. 45:649. (2007).
- Filip R, Ferraro GE, Bandoni AL, Bracesco N, Nunes E, Gugliucci A, Dellacassa E. Mate (*Ilex paraguariensis*). In: Filippo Imperatto (Org.). *Recent Advances in Phytochemistry*. (Ed.) 2, Kerala (India), Filippo Imperatto, v. 1, p. 113–131, ISBN: 978813080309. (2010).
- Fonseca C.A, Otto S.S, Paumgarten F.J, Leitao A.C. Non toxic, mutagenic, and clastogenic activities of Mate-Chimarrao (*Ilex paraguariensis*). *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*. 19: 333-46. (1999).
- Friedberg EC, Walker GC, Siede W. *DNA Repair and Mutagenesis* . ASM Press. (1995). Friedberg EC, Walker GC, Siede W, Wood RD, Schultz RA, Ellenberger T. *DNA Repair and Mutagenesis*. ASM Press. (2005 por revisión).
- Gatz SA, Wiesmüller L. (a). Take a break--resveratrol in action on DNA. *Carcinogenesis* Volume: 29: Issue: 2, Pages: 321-332. (2008).
- Gatz SA, Keimling M, Baumann C, Dörk T, Debatin KM, Fulda S, Wiesmüller L. (b). Resveratrol modulates DNA double-strand break repair pathways in an ATM/ATR-p53- and -Nbs1-dependent manner. *Carcinogenesis*. 29(3):519-27. (2008).
- Genestra M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cellular Signalling*. 19: 1807–1819. (2007).
- Giberti G. Los parientes silvestres de la yerba mate y el problema de su adulteración *Dominguezia*.7:1-22. (1989).
- Giberti G. Neglected Crops: 1492 from a Different Perspective. En: Hernando Bermejo JE y León J. (Eds.) *Plant Production and Protection* Nº 26, pp 245-252. Roma: FAO. (1994).

- Giberti G. Diferentes aspectos del género *Ilex* (Aquifoliaceae). Corología, Arquitectura floral. Posición sistemática, PhD Thesis, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Buenos Aires. (2001).
- Gugliucci A, Stahl AJ. Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. *Biochem Mol Biol Int* 35: 47–56. (1995).
- Gugliucci A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: induction of decreased oxidability of human LDL in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 224: 338 - 344. (1996).
- Gugliucci A, Bracesco N, Dell M, Rocha A, Menini T, Nunes E. Antioxidant properties of *Ilex paraguariensis*: in vitro inhibition of peroxide induced human LDL oxidation and of DNA double strand breaks induction in *Saccharomyces cerevisiae*. International Scientific Conference on Complementary, Alternative and Integrative Medicine Research. Boston MA USA. (2002).
- Gugliucci A, Bastos DH. (a). Chlorogenic acid protects paraoxonase 1 activity in high density lipoprotein from inactivation caused by physiological concentrations of hypochlorite. *Fitoterapia* 80, 138–142. (2009).
- Gugliucci A, Bastos DH, Schulze J, Souza MF. (b). Caffeic and chlorogenic acids in *Ilex paraguariensis* extracts are the main inhibitors of AGE generation by methylglyoxal in model proteins. *Fitoterapia* 80, 339–344. (2009).
- Gutnisky A, Giberti G, del Pero M.A. Efecto de la yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) sobre la eritropoyesis y la absorción intestinal del hierro en la rata. 1998, *Acta Farm. Bonaerense*. 17:97-104. (1998).
- Haynes RH. Formal, empirical and mechanistic equations in cellular radiation biology. En: *Quantitative Mathematical Models in Radiation Biology*. Kiefer Ed pp 181-189 Springer – Verlag, Heidelberg Berlin. (1988).
- Heck CI, de Mejia EG. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *Journal of Food Science*. 72(9):R138-51. (2007).
- Heck CI, Schmalko M, Gonzalez de Mejia E. Effect of growing and drying conditions on the phenolic composition of mate teas (*Ilex paraguariensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 8394–8403. (2008).
- Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen study. *Lancet North Am Ed* 342: 1007 -1011. (1993).
- Hohmann S, Mager WH. Ed. *Yeast Stress Responses*. Springer. (1997).
- Hsu C, Leo P, Shastry D, Meggs W, Weisman R, Hoffman R. Anticholinergic poisoning associated with herbal tea. *Archives of Internal Medicine*. 155: 2245–2248. (1995).
- Jacques RA, Krause LC, Freitas Ldos S, Dariva C, Oliveira JV, Caramão EB. Influence of drying methods and agronomic variables on the chemical composition of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil) obtained from high-pressure CO₂ extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 10081–10085. (2007).
- Jaiswal R, Sovdat T, Vivan F, Kuhnert N. Profiling and characterization by LC–MS(n) of the chlorogenic acids and hydroxycinnamoylshikimate esters in mate (*Ilex paraguariensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 12;58(9):5471-84. doi: 10.1021/jf904537z. (2010).
- Jamieson DJ. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 1511 – 1527. (1998).

- Jia L, Geacintov NE, Broyde S. The N-clasp of human DNA polymerase kappa promotes blockage or error-free bypass of adenine- or guanine-benzo[a]pyrenyl lesions. *Nucleic Acids Res.* 36(20):6571-84. (2008)
- Kiefer Jürgen. *Biological Radiation Effects*. Springer-Verlag, Berlin. (1990).
- Kamangar F, Schantz M, Abnet C, Fagundes R, Dawsey S. High Levels of Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Mate Drinks. *Cancer Epidemiology Biomarkers.* 17(5). 1262. (2008).
- Kawakami M, Kobayashi A. Volatile constituents of green mate and roasted mate. *J Agric Food Chem.* 39:1275. (1991).
- Keszenman D, Candreva C, Nunes E. Cellular and molecular effects of bleomycin are modulated by heat shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res.* 459: 29 – 41. (2000).
- Keszenman DJ, Candrev EC, Sánchez AG, Nunes E. RAD6 gene is involved in heat shock induction of bleomycin resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Environ Mol Mutagen.* 45(1):36-43. (2005).
- Kropachev K, Kolbanovskii M, Cai Y, Rodríguez F, Kolbanovskii A, Liu Y, Zhang L, Amin S, Patel D, Broyde S, Geacintov NE. The sequence dependence of human nucleotide excision repair efficiencies of benzo[a]pyrene-derived DNA lesions: insights into the structural factors that favor dual incisions. *J Mol Biol.* 13;386(5):1193-203. (2009).
- Kullik I, Storz G. Transcriptional regulators of the oxidative stress response in prokaryotes and eukaryotes. *Redox Rep* 1:23-29. (1994).
- Kupiec, M. Damage-induced recombination in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.* 451: 91-105. (2000).
- Lee S E, Paques F, Sylvan J, Haber J E. Role of yeast SIR genes and mating type in directing DNA double-strand breaks to homologous and non-homologous repair paths. *Curr. Biol.* 9: 767-70. (1999).
- Leitao AC, Braga RS. Mutagenic and genotoxic effects of mate (*Ilex paraguariensis*) in prokaryotic organisms. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 27: 1517–1525. (1994).
- Lillo O. *Biofísica de Radiaciones ionizantes. Aplicaciones médicas.* Oficina del libro FEFMUR. (2012).
- Lillo O, Bracesco N, Nunes E. Lethal and mutagenic interactions between γ -rays, cisplatin and etoposide at the cellular and molecular levels. *Int J Radiat Biol.* 87(2):222-30. doi: 10.3109/09553002.2010.518207. (2011).
- Lowndes N F, Murguía J R. Sensing and responding to DNA damage. *Curr Opin Genet Dev* 10:17-25. (2000).
- Marchler G, Schüller C, Adam G, Ruis H. A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *EMBO J* 12: 1997-2003. (1993).
- Markowicz Bastos, de Oliveira, Teixeira Matsumoto, de Oliveira Carvalho, Lima Ribeiro. Yerba mate: pharmacological properties, research and biotechnology. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology* 1:37–46. (2007).
- Martindale 32th Ed. *The Complete Drug Reference*. Kathleen Parfitt. Pharmaceutical Press, London. (1999).
- Menini T, Heck C, Schulze J, de Mejia E, Gugliucci A. Protective action of *Ilex paraguariensis* extract against free radical inactivation of paraoxonase-1 in high-density lipoprotein. *Planta Medica* 73, 1141–1147. (2007).

- Miranda D, Arçari D, Pedrazzoli Jr J, de O. Carvalho P, Cerutti S, Bastos D, Ribeiro M. Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H₂O₂-induced DNA damage and DNA repair in mice. *Mutagenesis*. 23: 261–265. (2008).
- Murray A, Hunt T. The cell cycle, an introduction. W.H. Freeman & Co New York. (1993).
- Nie Y, Li H, Bula CM and Liu X. Stimulation of p53. DNA binding by c-Abl requires the p53 C terminus and tetramerization. *Mol Cell Biol*. 20 3:741-748. (2000).
- Nunes E, Brum G, Candreva EC, Schenberg – Frascino AC. Common repair pathways acting upon UV and X-ray induced damage in diploid cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Radiat Biol*. 45: 593- 606. (1984).
- Nunes E, Siede W. Hypertermia and oxidative damage-induced G1 arrest in yeast *Saccharomyces cerevisiae* is independent of the *RAD9* gene controlling the cell cycle arrest response to DNA damage. *Radiat Environ Biophys*. 35: 55-57. (1996).
- Nunes E, Gelós U. Proliferación celular y su perturbación; aspectos cuantitativos y moleculares. Oficina del libro AEM. (2006).
- Nunes E, Candreva E, Bracesco N, Sanchez A, Dell M. HDF1 and RAD17 genes are involved in DN double-strand break repair in stationary phase *Saccharomyces cerevisiae*. *Journl Biol Phys*. 34(1-2): 63-71. Doi: 10.1007/S10867-008-9105-0. (2008).
- Olthof MR, Hollman PC, Katan MB. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *Journal of Nutrition* 131(1): 66–71. (2001).
- Ordenanza 445. Resolución del Poder Ejecutivo Nº 34.059. Ministerio de Salud Pública del Uruguay. (1957).
- Pintos J, Franco EL, Oliveira BV, Kowalski LP, Curado MP, Dewar R. Mate, coffee, and tea consumption and risk of cancers of the upper aerodigestive tract in southern Brazil. *Epidemiology*. 5: 583–590. (1994).
- Prado F, Cortes-Ledesma F, Huertas P, Aguilera A. Mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet*. 42, 185. (2003).
- Ramirez-Mares MV, Chandra S, Gonzalez de Mejia E, In vitro chemopreventive activity of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts and selected polyphenols. *Mutation Research*. 554: 53–65. (2004).
- Reglamento Bromatológico Nacional. Decreto 315/994. Montevideo: IMPO. (1994).
- Reissmann CB, Radomski MI, De Quadros RMB. Chemical composition of *Ilex paraguariensis* St. Hil. Under different management conditions in seven localities of Paraná State Braz. *Arch. BioL. Techn*. 42: 187-194. (1999).
- Ronen, Glickman .Human DNA repair genes. *Environ Mol Mutagen*. 37:241-283. (2001).
- Rose M, Winston, F, Hieter P. Methods in yeast genetics. A laboratory course manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New. York U.S.A. (1990).
- Samaniego C. *Ilex paraguayensis*. Yerba Mate “caa”. Imprenta Nacional de Asunción. (1937).
- Santoro N, Thiele DJ. Oxidative Stress Responses in the yeast. En: Hohmann S, Mager WH Eds. *Yeast Stress Responses*. Springer. pp 171-212. (1997).
- Sewram V, De Stefani E, Brennan P, Boffetta P. Mate consumption and the risk of squamous cell esophageal cancer in Uruguay. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 12: 508–513. (2003).

- Schinella GR, Troiani G, Davila V, de Buschiazzi PM, Tournier HA. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. Biochem Biophys Res Comm. 269: 357-360. (2000).
- Schröder E, Ponting CH. Evidence that peroxiredoxins are novel members of the thioredoxin fold superfamily. Protein Science. 7: 2465-2468. (1998).
- Schwarz MA, Lazo JC, Yalowich WP, Whitmore A, Bergonia HA, Tzeng E, Billiar TR, Robbins PD, Jack R, Lancaster J, Pitt BR. Metallothionein protects against the cytotoxic and DNA-damaging effects of nitric oxide. Proc Natl Acad Sci USA 92: 4452-4456. (1995).
- Shrivastav M, De Haro L, Nickoloff JA. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. Cell Research. 18:134–147. doi: 10.1038/cr.2007.111. (2008)
- Sosa V, Contreras V, Bracesco N, Candreva E, Nunes E. Disminución del efecto mutagénico del benzo[a]pireno por componentes de la infusión de *Ilex paraguariensis*. XIII Jornadas de la sociedad uruguaya de biociencias. (2010).
- Taketa ATC, Breitmaier E, Schenkel EP. Triterpenoids from Brazilian *Ilex* species and their in vitro antitrypanosomal activity. Journal of Natural Products 67, 1697–1700. (2004).
- Tenorio Sanz MD, Torija Isasa ME. Mineral elements in mate herb (*Ilex paraguariensis* St. H.). Archivos Latinoamericanos de Nutricion 41: 441– 454. (1991).
- Vazquez A, Moyna P. Studies on Mate Drinking. Journal Ethnopharmacol 18:267-272. (1986).
- Vera Garcia R, Basualdo I, Peralta I, de Herebia M, Caballero S. Minerals content of Paraguayan yerba mate *Ilex paraguayensis*, S.H. Arch Latinoam Nutr 35(1):77 – 80. (1997).
- Vassallo A, Pelayo Correa, de Stéfani E, Cendán M, Zavala D, Chen V, Carzoglio J, Deneo-Pellegrini H. Esophageal cancer in Uruguay, a case–control study. Journal of the National Cancer Institute. 75: 1005–1009. (1985).
- Victora CG, Munoz N, Horta BL, Ramos EO. Patterns of mate drinking in a Brazilian city. Cancer Res. 15; 50(22): 7112-5. (1990).
- Villaume M. Reduced oxygen species, mutation, induction and cancer initiation. Mutat Res. 186: 43-72. (1987).
- Vives I, Grimalt JO, Guitart R. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos y la salud humana. Apuntes de Ciencia y Tecnología.3:45-51. (2001).
- Von Sonntag C. The Chemical Basis of Radiation Biology. Taylor and Francis. (1987).
- Watson JD, Hopkins H, Roberts JW, Steitz JA, Weiner AM. Molecular Biology of the gene. The Benjamín/Cummings Publishing Company, Inc. California USA. (1987).
- Wei W, Zhang C, Liu AL, Xie SH, Chen XM, Lu WQ. PCB126 enhanced the genotoxicity of BaP in HepG2 cells by modulating metabolic enzyme and DNA repair activities. Toxicology letter. 10;189(2):91-5. (2009).
- WHO Regional Office for Europe. Polynuclear aromatic hydrocarbons (PAH). In: Air quality guidelines for Europe. Chapter 5.9. Copenhagen. (2000).
- Willson RI. Free radical protection: Why vitamin E not C, α - carotene or glutathione? En: Ciba Foundation Symposium 101 Pitman London. pp 19-37. (1983).
- Yim MB, Chae HZ, Rhee SG, Chock PB, Stadtman ER. On the protective mechanism of the thiol-specific antioxidant enzyme against the oxidative damage of biomacromolecules. J Biol Chem 269:1621-1626. (1994).

- Zhu Z, Chun, W H, Shim E Y, Lee S E, Ira G. Sgs1 helicase and two nucleases Dna2 and Exo1 resect DNA double-strand break ends. Cell. 134: 981-94. (2008).