



Programa de desarrollo de Ciencias Básicas (PEDECIBA)-
Biología
Sub-área Biofísica.

Tesis de maestria en Ciencias Biológicas.

Evaluación de los daños producidos por
Benzo[a]pireno y Benzo[a]antraceno y su
posible reparación y protección por ácido
clorogénico en *Saccharomyces cerevisiae*.

Lic. Verónica Sosa.¹

Orientador de Tesis: Eduardo Dellacassa²

¹Laboratorio de Radiobiología. Facultad de Medicina. UdelaR.

²Laboratorio de Biotecnología de Aromas. Facultad de
Química. UdelaR.

AGRADECIMIENTOS

A todos los compañeros del Laboratorio de Radiobiología que apoyaron incondicionalmente el trabajo realizado, en especial a Lourdes por ayudarme en la preparación de cada uno de los experimentos y ofrecerme su amistad diariamente. Y no puede faltar mi agradecimiento a Valeria Ochoa quien me ayudó estudiando conmigo y apoyándome de manera desinteresada.

Gracias a los Profesores Eduardo Dellacassa y Nelson Bracesco por encausar mi trabajo, por traspasar su experiencia y formarme durante todo el proceso de esta tesis.

A los amigos que siempre dan para adelante creyendo más en mí que yo misma, en especial gracias Simone y Vero que cerca o lejos siempre me acompañan alentando mi crecimiento.

A mi familia siempre presente, a mi padre que con 89 años sigue enseñándome que trabajar y progresar es el horizonte, a mis hermanas Carmen y Carla por mantener la casa en pie y creer que yo puedo hacer lo que me proponga.

Gracias a mi hijo Luciano por entender que los tiempos de trabajo y estudio acortan los tiempos familiares, por el orgullo que me hace sentir de ser su madre y el cariño compartido.

A un compañero de estudio con el que empecé a vislumbrar esta tesis, gracias Paul por sumarte a este tema y ayudarme cebando mate y aprendiendo conmigo.

En especial quiero agradecer a Florencia Tomassina por la dedicación y paciencia con la cual me recibió en el laboratorio de Bioquímica, por los consejos y sobre todo por la buena onda.

Y muy especialmente todo mi agradecimiento a Elia Nunes, no solo una gran maestra sino también una gran persona, y como dice ella:

SALUD, AMOR Y ARMONIA.

INDICE.

Resumen	Pág. 7
1. Introducción.	Pág. 11
1.1 Contaminación química.	Pág. 12
1.2 Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's).	Pág. 13
1.2.1 Formación de HAP's.	Pág. 16
1.2.2 Propiedades físico químicas de los HAP's.	Pág. 17
1.2.3 Los HAP's como contaminantes ambientales.	Pág. 18
1.2.4 Fuentes de exposición.	Pág. 19
1.2.5 Importancia relativa de las diferentes vías de exposición.	Pág. 21
1.2.6 Incidencia en la salud de los HAP's.	Pág. 22
1.2.7 Clasificación de la IARC para los HAP's.	Pág. 24
1.2.8 Límites de exposición aceptados.	Pág. 25
1.2.9 Metabolismo de los HAP's.	Pág. 26
1.2.9.1 Vías de señalización del receptor de hidrocarburos de arilo (AhR).	Pág. 29
1.3 Sistemas de reparación genómica.	Pág. 31
1.3.1 Reparación por escisión de nucleótidos.	Pág. 32
1.3.2 Reparación por recombinación homóloga (HR) y unión de extremos no homólogos (NHEJ)..	Pág. 39
1.3.3 Mecanismo de tolerancia al daño: reparación post-replicativa.	Pág. 41
1.4 Características generales de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Pág. 43
1.5 Polifenoles	Pág. 44
1.6 Interés en el tema de investigación.	Pág. 47
2. Hipótesis.	Pág. 49

3. Objetivos.	Pág. 49
3.1 Objetivo general.	Pág. 49
3.2 Objetivos específicos.	Pág. 49
4. Materiales y Métodos.	Pág. 51
5. Resultados.	Pág. 63
5.1 Curvas de sobrevida celular a concentraciones crecientes de Bp.	Pág. 63
5.2 Curvas de sobrevida celular a concentraciones crecientes de Ban.	Pág. 64
5.3 Fracción de sobrevida celular en tratamientos simples y combinados.	Pág. 65
5.4 Fracción de sobrevida celular en tratamientos simples y combinados en cepas de SX46 A y SX46 A rad14Δ.	Pág. 66
5.5 Frecuencia mutagénica.	Pág. 68
5.5.1 Frecuencia mutagénica a concentraciones crecientes de Bp.	Pág. 68
5.5.2 Frecuencia mutagénica a concentraciones crecientes de Ban.	Pág. 69
5.5.3 Frecuencia mutagénica en tratamientos simples y combinados.	Pág. 70
5.6 Análisis de dobles roturas de ADN.	Pág. 71
5.7 Expresión de la proteína Rad14.	Pág. 74
6. Discusión	Pág. 77
7. Conclusión.	Pág. 83
8. Perspectivas.	Pág. 85
9. Bibliografía.	Pág. 87
10. Anexos.	Pág. 104

RESUMEN.

Ciertos agentes genotóxicos tanto químicos, físicos y biológicos pueden alterar la proliferación celular, provocando retardos en el ciclo celular, lesiones letales (necrosis, apoptosis), mutagénicas y recombinogénicas. Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HAP's) son un grupo químico formado por compuestos que pueden presentar acción genotóxica. El benzo[a]pireno (Bp) y el benzo[a]antraceno (Ban) forman parte de este grupo. Estos compuestos presentan en su estructura dos o más anillos aromáticos los cuales se forman principalmente por combustión incompleta o pirolisis de la materia orgánica. A su vez su oxidación produce compuestos epoxidados que son altamente reactivos, lo que determina que sean capaces de unirse a moléculas complejas, como proteínas y ADN. Esta última característica es la responsable de la capacidad genotóxica de los HAP's. Como contaminantes, tanto en el medio ambiente como en los alimentos y en el entorno laboral, han despertado preocupación debido a que algunos de estos compuestos han sido identificados como carcinógenos, en particular el Bp.

Por otra parte, a nivel mundial existe un creciente interés en el estudio de las propiedades medicinales de muchas plantas en especial para su uso en medicina preventiva. En particular, *Ilex paraguariensis* y sus derivados (yerba mate) representan un ejemplo de este tipo de materiales. Su uso como infusión tiene un alto consumo en la región y en particular en nuestro País donde el 85% de la población mayor de 15 años consume mate.

El objetivo propuesto en este trabajo implica estudiar el efecto protector de los compuestos polifenólicos, utilizando como modelo de trabajo al ácido clorogénico

(ACI), el cual se encuentra presente en concentraciones elevadas en la infusión de yerba mate.

Para el desarrollo del trabajo, se utilizaron cepas de levaduras haploides de *Saccharomyces cerevisiae* (SC7K *lys 2-3*; SX46 A y SX46 A *rad14Δ*) como modelo eucariótico. Las poblaciones celulares en fase de crecimiento exponencial fueron expuestas a soluciones de diferentes concentraciones de Bp y Ban de manera de estudiar las curvas dosis-efecto. Se trataron las muestras con soluciones de Bp, Ban y mezcla de los dos HAP's a una concentración de 250ng/mL en presencia o ausencia de ACI, de modo de determinar luego de los tratamientos las fracciones de sobrevida y las frecuencias mutagénicas. Se analizó la probabilidad de producción de dobles rotura en el ADN utilizando la técnica de Electroforesis por Campos Transversos Alternados (TAFE) y además se estudió la modulación en la expresión de la proteína Rad14 frente a los diferentes tratamientos a través de un análisis de Western Blot. Frente a la exposición de las diferentes alícuotas del cultivo celular a concentraciones crecientes de Bp y Ban (10ng/mL-250ng/mL) se observó una disminución significativa de la fracción de sobrevida, así como un aumento significativo de la frecuencia mutagénica en función de la dosis. (Fracción de Sobrevida a 250ng/mL de Bp y Ban: $S_{(x)}=0,46\pm 0,03$; $S_{(x)}=0,47\pm 0,03$ respectivamente). Cuando se realizaron los tratamientos simples y combinados se observó un incremento significativo en la fracción de sobrevida en las muestras celulares tratadas con los HAP's en presencia de ACI en comparación con las tratadas con HAP's como único agente (Fracción de Sobrevida en presencia en tratamientos combinados: $S_{(x)Bp/ACI}=0,89\pm 0,02$; $S_{(x)Ban/ACI}=0,90\pm 0,02$). La frecuencia mutagénica inducida en presencia de ACI decreció significativamente. Cuando el análisis de fracción de sobrevida se realizó sobre una población celular deficiente en RAD14, se

observó que las muestras tratadas concomitantemente con HAP's y ACl presentaron una disminución de la letalidad celular. En el análisis de TAFE no se observó fragmentación cromosómica en las muestras tratadas con los HAP's. Cabe destacar que en las muestras tratadas con ACl como único agente no hubo diferencias significativas de fracción de sobrevivida y frecuencia mutagénicas con respecto al control, además de no presentar fragmentación cromosómica. A partir de los análisis de Western Blot se observó un aumento en la expresión de la proteína Rad14 en las muestras tratadas con Bp y con Ban como únicos agentes en comparación con la muestra control y no se encontraron diferencias significativas entre la muestra tratada con la mezcla de HAP's (Bp/Ban) en comparación con la muestra control. Adicionalmente se observó una disminución en la expresión de la proteína cuando los tratamientos utilizaron Bp y ACl combinados. Se ha demostrado que la proteína Rad14 es una metaloproteína de zinc que se une específicamente al ADN dañado y es crucial en el inicio de la vía de reparación por escisión de nucleótido (NER).

En organismos eucariotas los compuestos lipofílicos como los HAP's no pueden ser excretados a menos que se oxiden a compuestos más polares. Estas reacciones de oxidación son llevadas a cabo principalmente por la superfamilia de las monooxigenasas dependientes del citocromo P450 (CYP). Existen estudios que demuestran el papel activo de los polifenoles naturales en la modulación de la actividad catalítica de las enzimas del citocromo P450. Estos compuestos pueden alterar la actividad de CYP a través de interacciones directas con las enzimas o afectar la expresión del gen CYP.

En este trabajo los datos obtenidos del análisis de sobrevivencia y fracción mutagénica en las diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas, sumado a lo observado en el Western Blot (dado que la proteína Rad14 está vinculada con la reparación por escisión de nucleótidos), indican que existe una acción protectora del ACl frente a la acción genotóxica de los HAP's usados en este trabajo. La forma en que el ACl provoca esta protección puede estar vinculada a diferentes acciones como son una acción atrapadora de los compuestos reactivos de los HAP's, una acción inhibitoria sobre la expresión de las enzimas que metabolizan este tipo de compuestos o también alguna acción que module la expresión de los genes que codifican para las mismas enzimas. Estas presunciones pueden ser semillas de futuras investigaciones que intenten dilucidar a qué nivel o niveles actúa el ACl como agente protector.

1. INTRODUCCIÓN.

Desde la segunda mitad del siglo XX la contaminación ambiental se ha vuelto uno de los problemas más preocupantes a nivel global. Se denomina contaminación ambiental a la presencia en el ambiente de cualquier agente (físico, químico o biológico) o bien de una combinación de varios agentes en lugares, formas y concentraciones tales que sean o puedan ser nocivos para la salud, la seguridad o para el bienestar de la población, o bien, que puedan ser perjudiciales para la vida vegetal o animal, o impidan el uso normal de las propiedades y lugares de recreación y goce de los mismos (Bermúdez, 2010; WHO, 2016 a; 2016 b). Existen diferentes tipos de contaminación siendo los más importantes los que afectan a los recursos naturales básicos como son el aire, los suelos y el agua.

Los factores contaminantes pueden deberse a impurezas naturales o contaminantes generados por la acción del hombre (Bermúdez, 2010). Las fuentes que generan contaminación de origen antropogénico más importantes son las industriales (frigoríficos, mataderos y curtiembres, actividad minera y petrolera), las comerciales (envolturas y empaques), las agrícolas (agroquímicos), las domiciliarias (envases, pañales, restos de jardinería) y las fuentes móviles (gases de combustión de vehículos) (WHO, 2016 a; 2016 b). Contaminante alimentario es cualquier sustancia indeseable que se encuentre presente en el alimento en el momento del consumo, proveniente de las operaciones efectuadas en el cultivo de vegetales, cría de animales, tratamientos usados en medicina veterinaria o fitosanitaria, o como resultado de la contaminación del ambiente, o de los equipos de elaboración y/o conservación (Reglamento Bromatológico Nacional, Decreto Nº 315/994. 3ª Ed., 2004).

1.1 CONTAMINACIÓN QUÍMICA.

Como contaminantes químicos se puede entender toda sustancia orgánica e inorgánica, natural o sintética que tiene probabilidades de lesionar la salud de las personas en alguna forma o causar otro efecto negativo en el medio ambiente. Los agentes químicos pueden aparecer en todos los estados físicos (García Préchac, 2016; Thompson y Darwish, 2019).

Los contaminantes químicos pueden provocar un daño de forma inmediata o a corto plazo (intoxicación aguda), o generar una enfermedad profesional al cabo de los años (intoxicación crónica). La evaluación del riesgo para las personas expuestas a contaminantes químicos supone, además de la comparación de la concentración ambiental existente con el valor límite de exposición, la ponderación con el tiempo que dura la exposición al mismo (UIB, 2003). Existe entonces un **riesgo químico** que es aquel riesgo susceptible de ser producido por una exposición no controlada a agentes químicos la cual puede producir efectos agudos o crónicos y la aparición de enfermedades (García Préchac, 2016).

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP's) son un ejemplo de contaminantes químicos y, junto con sus derivados, están asociados al aumento en la incidencia de diversos tipos de cáncer en el hombre (Mastrangelo, 1996; Mastandrea et al., 2005). Dadas las diferentes fuentes de estos compuestos y el hecho de que algunos grupos poblacionales que residen o trabajan en ambientes directamente influenciados por estas fuentes están sometidos a un riesgo mayor, se hace necesario un monitoreo biológico de exposición a estos compuestos. Este control se puede realizar mediante la determinación de la concentración de sus metabolitos en fluidos biológicos acompañado de un efecto bioquímico resultante de su presencia en el organismo (Mastandrea et al., 2005).

1.2 HIDROCARBUROS AROMATICOS POLICICLICOS (HAP's)

Los HAP's son compuestos orgánicos formados por dos o más anillos aromáticos condensados. Los anillos pueden estar en forma recta, angulada o en racimos. La estructura condensada más sencilla, formada por sólo dos anillos aromáticos es el naftaleno (Figura 1).

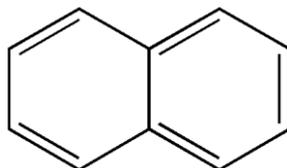


Figura 1. Naftaleno.

En general al hablar de HAP's nos referimos a los compuestos formados exclusivamente por carbono e hidrógeno. Sin embargo, existen compuestos en los que uno o varios átomos de carbono han sido substituidos por otros átomos, como nitrógeno, flúor, cloro, o grupos más complejos (Figura 2). Estos compuestos se conocen como HAP's substituídos (Agudo, 2010).

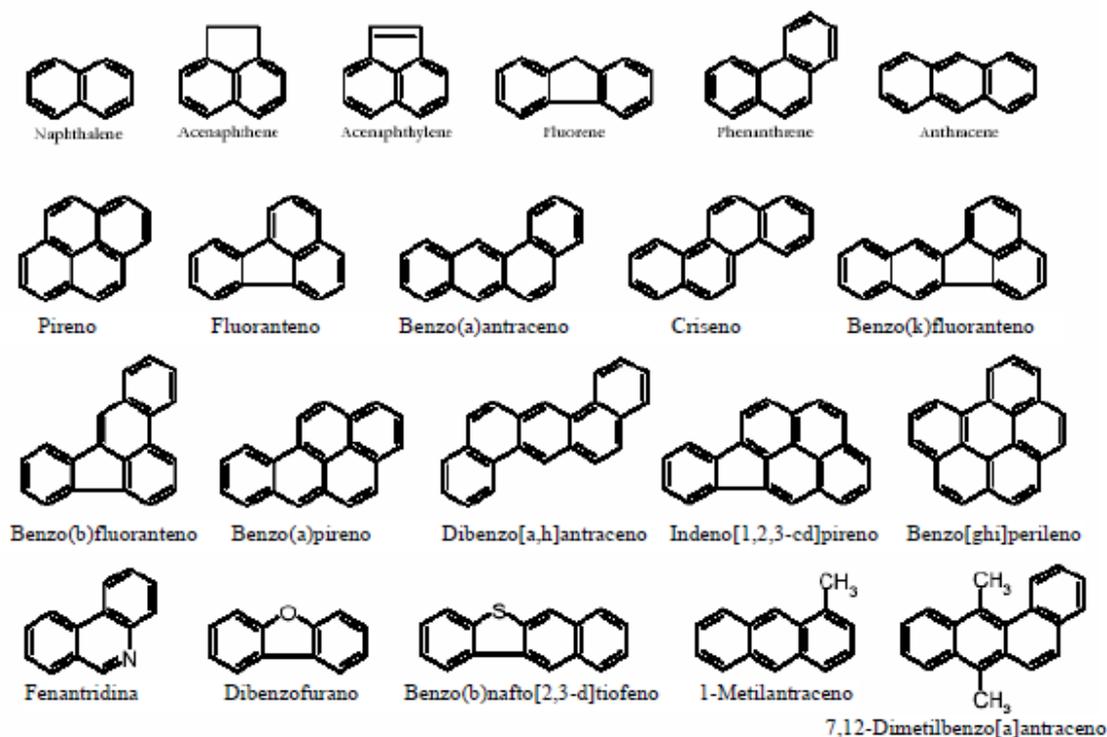


Figura 2. Estructuras de 16 HAP's considerados como prioritarios por la U.S E.P.A.^{1*} así como algunos HAP's alquilados y heterocíclicos (Lundstedt et al., 2003).

Los HAP's con mayor actividad como carcinogénicos son aquellos que presentan la denominada "bahía" (Weis et al., 1998) (Figura 3), ya que ésta proporciona un alto grado de reactividad bioquímica.

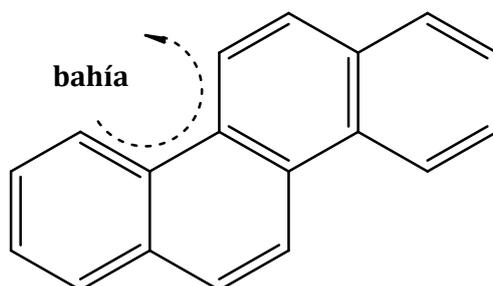


Figura 3. Sector de mayor reactividad en el criseno (Weis et al., 1998).

¹ * United States Environmental Protection Agency

El benzo[a]pireno (Bp) (Figura 4) es uno de los HAP's que posee la capacidad de desarrollar efectos mutagénicos, genotóxicos y/o carcinogénicos, y se halla presente en la mayoría de las fuentes de producción de estos compuestos (Mastandrea et al., 2005).

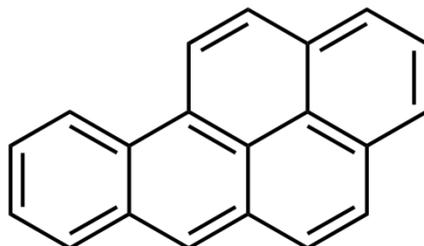


Figura 4. Benzo[a]pireno.

Las características mencionadas sumadas al tiempo de permanencia en el medio ambiente (vida media en el suelo de 162 días), hacen que este compuesto sea empleado como elemento de referencia en diferentes estudios ambientales (Stellman et al., 1998).

Es muy importante entender el comportamiento de estos compuestos para establecer dónde los podemos encontrar y proponer mecanismos que se puedan utilizar para disminuir sus concentraciones. El comportamiento de los HAP's en el medio varía en función del peso molecular de los mismos sobre todo en lo que respecta a su solubilidad en agua (en general baja en todos ellos) y, por lo tanto, a su movilidad. Las concentraciones de HAP's encontradas en suelos cercanos a un núcleo urbano o a un área industrializada son algunas veces hasta dos órdenes de magnitud superiores a las que encontramos en áreas menos desarrolladas (que proceden de incendios forestales y de contaminación atmosférica) (García, 2005).

1.2.1 FORMACIÓN DE HAP'S:

Los HAP's se forman durante la combustión incompleta de materia orgánica en general (WHO, 1998). En el proceso de combustión de la materia orgánica, ésta reacciona con el oxígeno, formándose dióxido de carbono y agua. Sin embargo, si no hay suficiente oxígeno, la combustión es incompleta; parte del combustible no reacciona completamente con el oxígeno y se forman otros subproductos tales como monóxido de carbono y HAP's. Este proceso se conoce como pirólisis (Agudo, 2010; Abdel-Shafy et al., 2016). A elevadas temperaturas, la pirólisis de compuestos orgánicos produce fragmentos de moléculas y radicales que se combinan para dar lugar a los HAP's.

La composición de los productos de la pirosíntesis depende del combustible, la temperatura y el tiempo de permanencia a altas temperaturas. Los combustibles que forman HAP's son hidrocarburos, hidratos de carbono, ligninas, péptidos, entre otros (Agudo, 2010). Los HAP's se liberan de la zona de combustión en forma de vapores y, debido a sus bajas presiones de vapor, la mayoría se condensan en el acto sobre partículas de hollín o forman ellos mismos partículas muy pequeñas (WHO, 2000). Dada la liberación a la atmósfera y el hecho de ser adsorbidos por las partículas presentes en la misma, se produce una diseminación de aerosoles que contiene HAP's, los que pueden ser transportados a grandes distancias por el viento (Ellenhorn, 1997; Abdel-Shafy et al., 2016).

Además del proceso de pirolisis existen otras vías de formación de HAP's como son:

Biosíntesis: Los organismos pueden sintetizar muchas moléculas orgánicas que contienen anillos bencénicos unidos, pero muchos de estos compuestos no son verdaderos HAP's dado que tienen otros sustituyentes. El problema es que muchos

de estos compuestos pueden reducirse fácilmente para dar lugar a sus HAP's correspondientes (García, 2005).

Combustibles Fósiles: Los hidrocarburos suelen representar más del 75% en peso del petróleo. En el carbón puede haber hasta un 75 % del carbono en forma aromática y dominan los compuestos con anillos de seis carbonos. Durante la formación geológica de los carburantes fósiles, los HAP's se forman a través de diferentes procesos (García, 2005). De esta forma, en el empleo de combustibles fósiles, algunos de estos HAP's generados durante la formación del petróleo y el carbón son liberados a la atmósfera sin experimentar cambios, otros son transformados durante la reacción de combustión en otros HAP's, y por último son también liberados los HAP's que se generan como consecuencia de la propia combustión (Llamas et al., 2000).

1.2.2 PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LOS HAP's.

Los HAP's se pueden dividir en dos grupos basados en su estado físico:

- HAP's presentes en fase gaseosa
- HAP's presentes en fase sólida (partículas).

La fase o estado de un HAP se determina por su presión de vapor y la temperatura ambiente. Los compuestos con presión de vapor superior a 1×10^{-5} kPa suelen encontrarse en fase gaseosa, mientras que aquellos con presiones de vapor por debajo de 1×10^{-9} kPa se hallan exclusivamente en partículas. Se ha demostrado experimentalmente que a 25 °C, los HAP's con tres anillos aromáticos se encuentran principalmente en fase vapor, los HAP's de cuatro y cinco anillos se distribuyen entre la fase sólida y vapor mientras que los HAP's con seis y más anillos se encuentran casi exclusivamente en fase sólida (Frick et al., 1999).

Existen estudios que demuestran que los HAP's están ligados principalmente a partículas de menos de 3 μm de diámetro (García, 2005). En ausencia de deposición húmeda estas pequeñas partículas pueden permanecer en la atmósfera durante varios días siendo transportados desde una fuente puntual a distancias considerables antes de volver a la tierra directamente o con el agua de lluvia. Se ha documentado que partículas menores a 1 μm en aerosoles urbanos tienen vidas medias atmosféricas de hasta 40 días, mientras que las partículas de tamaño entre 1 y 10 μm pueden flotar en el aire durante unas 100 h (García, 2005).

Otra característica importante de los HAP's es su solubilidad en agua, que puede describirse usando el coeficiente de partición octanol-agua (K_{ow}). Dado que los HAP's poseen propiedades lipofílicas, tienden a asociarse con materia orgánica que contiene ácidos grasos y ceras tales como las membranas de las plantas y las cutículas. Los HAP's volátiles, de bajo peso molecular con menos de cuatro anillos, son solubles en agua con una baja afinidad para ser adsorbidos en partículas ($\log K_{ow} < 5$). Los HAP's con altos pesos moleculares son generalmente insolubles en agua y tienen una afinidad muy fuerte para adsorberse en las superficies de las partículas suspendidas en el aire y en el agua ($\log K_{ow} > 5$) (García, 2005).

1.2.3 LOS HAP's COMO CONTAMINANTES AMBIENTALES.

La pirólisis de la materia orgánica es un proceso muy extendido, lo que implica una amplia ocurrencia en todos los compartimentos ambientales: aire, suelos, aguas, sedimentos, tejidos biológicos, incluyendo algunos alimentos.

HAP's en el aire.

En general esta contaminación consiste en mezclas de HAP's, nunca de compuestos aislados. La composición específica de cada emisión depende de varios factores,

tales como el tipo de combustible utilizado y sus propiedades, y el tipo de tecnología utilizada para su combustión. Por otra parte, los HAP's en general se emiten unidos a otras partículas, y una vez en el aire pueden sufrir rápidamente procesos de oxidación o degradación, favorecidos por la presencia de otros contaminantes y de la radiación ultravioleta solar (Agudo, 2010).

HAP's en el agua y los suelos.

Los HAP's pueden ingresar a las aguas de superficie a través de las descargas de plantas industriales y de tratamiento de aguas residuales, pudiendo ser liberados a los suelos a partir de desechos peligrosos si estos se escapan de los contenedores de almacenamiento. En el suelo los HAP's se unen a otras partículas y algunos pueden contaminar los acuíferos. La degradación de los HAP's en el suelo y en el agua puede llevar semanas y meses y es causada principalmente por la acción de microorganismos (Agudo, 2010; Abdel-Shafy, 2016).

1.2.4 FUENTES DE EXPOSICIÓN.

Los HAP's son contaminantes ubicuos y pueden encontrarse en niveles significativos en el agua potable, en la comida y en el aire que respiramos. Aunque se han encontrado concentraciones significativas de HAP's en muchos alimentos, los niveles más altos se han encontrado en lechugas, espinacas, hojas de té y tabaco, debido a la contaminación atmosférica (Garcia, 2005; Abdel-Shafy, 2016).

Los estudios epidemiológicos muestran una correlación entre un aumento de mortalidad en humanos que desarrollan cáncer de pulmón y la exposición a las emisiones de hornos de coque, emisiones de alquitrán y humo de los cigarrillos (Vu et al., 2015). Todos los vapores anteriormente indicados contienen benzo[a]pireno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, dibenzo[a,h]antraceno y criseno, así como

otros HAP's potencialmente carcinogénicos que son promotores e iniciadores de tumores (WHO, 2000; Agudo, 2010). La contribución de las fuentes naturales, como los incendios forestales y los volcanes, es mínima comparada con las emisiones causadas por el ser humano, donde el uso de combustibles fósiles es la principal fuente de emisión de HAP's (Mastandrea et al.,2005).

Otras emisiones proceden de la combustión de residuos y madera, así como de los vertidos de petróleo crudo o refinado que, en sí mismo, contiene HAP's. Estos compuestos también están presentes en el humo del tabaco y en los alimentos a la parrilla, ahumados y fritos (Kazerouni et al., 2001). Existen datos que demuestran el daño a nivel genómico de distintos HAP's, lo que permite clasificarlos en sustancias mutagénicas, genotóxicas y/o carcinógenas, (Tabla 1) (Mastandrea et al., 2005; Phillips, 2005).

HAPs	Carcinogenicidad	Genotoxicidad	Mutagenicidad
Fenantreno	I	L	+
Antraceno	N	N	-
Pireno	N	L	+
Benzofluorenos	I	I	?
Benzo[a]antraceno	S	S	+
Benzo [e]pireno	I	L	+
Benzo[a]pireno	S	S	+
Dibenz[a]antraceno	S	S	+
Benzo[ghi]perileno	I	I	+
Dibenzopirenos	S	I	+
2-Nitronaftaleno	N	L	-
1-Nitropireno	I	S	+

(S= suficiente; I= insuficiente; N= no carcinogénico; L= limitados.).

Mutagenicidad (Test de Ames): + (positivo); - (negativo); ? (inconcluso).

Tabla 1. Datos relativos a los efectos carcinogénicos, genotóxicos y mutagénicos de algunos HAP's (Mastandrea et al., 2005).

1.2.5 IMPORTANCIA RELATIVA DE LAS DIFERENTES VÍAS DE EXPOSICIÓN.

Se produce especialmente una alta exposición a través del consumo de cigarrillos y la ingestión de ciertos alimentos (por ejemplo pescado ahumado y carnes a la parrilla de carbón vegetal) (WHO, 2000; Rather et al., 2017). La ingestión de alimentos es probable que sea una de las vías de exposición más relevante en comparación con la inhalación en un gran sector de la población general expuesta a los HAP's (Thompson and Darwish, 2019). El agua potable y el suelo son fuentes generalmente menores de estos compuestos en la dosis de ingesta diaria.

Algunos estudios realizados sobre la exposición humana al Bp, para no fumadores en países desarrollados, revelaron que el alcance y la magnitud de la exposición por la dieta son generalmente más grandes que para la inhalación (Vu et al., 2015).

Por otro lado, en los países en desarrollo donde la biomasa se utiliza generalmente para cocinar en los hogares sin combustión o con una combustión deficiente, la contribución de la exposición por inhalación al Bp sería el principal contribuyente a la exposición diaria total (Anderson et al., 2005).

A través del consumo de mate algunos autores indican la existencia de una exposición a estos compuestos, los cuales se acumularían en la yerba mate debido a una parte de su procesamiento usando madera para su secado a altas temperatura (“zapecado”)(Kamangar et al., 2008; Thea et al., 2017). A partir de los trabajos de cuantificación de HAP’s en yerba mate, ya sea en hoja o en infusión, se creó controversia por la diferencia de concentraciones encontradas (Thea et al., 2017).

1.2.6 INCIDENCIA EN LA SALUD DE LOS HAP’s.

En la actualidad la OMS (Organización Mundial de la Salud) reconoce unas 70.000 sustancias químicas con efectos cancerígenos en seres humanos, si bien se sospecha que existe un número aún mayor de sustancias cancerígenas de las que se desconoce tal condición. Resulta muy difícil determinar la relación entre la incidencia del cáncer y la exposición a una determinada sustancia, dado que en el desarrollo de estas enfermedades intervienen múltiples y muy diversos factores, sujetos a interacciones muy complejas. Además, en la mayoría de los casos, es necesaria una exposición prolongada en el tiempo a estos agentes cancerígenos que, en dosis bajas, suelen acumularse en el organismo.

Diversos organismos y agencias han establecido clasificaciones para determinar la carcinogenicidad de sustancias químicas. Actualmente la más aceptada es la clasificación de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, conocida por sus siglas en inglés IARC (International Agency for Research on Cancer). Es una agencia con sede en Lyon (Francia), dependiente de la OMS.

La clasificación de la IARC define cuatro grupos principales: (IARC, 2018)

Grupo 1: sustancias o exposiciones que son cancerígenos para el ser humano.

Grupo 2A: sustancias o exposiciones que son probables cancerígenos para el ser humano. En general se clasifican en este grupo las sustancias que son claramente cancerígenas en experimentación animal, pero para las que no hay suficiente información en los seres humanos.

Grupo 2B: sustancias que son posibles cancerígenos para el ser humano. En general se clasifican en este grupo sustancias para las que no hay suficiente información en los seres humanos, y para las que hay pruebas que indican que pueden producir cáncer en animales de experimentación, pero no se puede concluir que sean claramente cancerígenos en animales.

Grupo 3: sustancias para las que no se dispone de suficiente información sobre su capacidad carcinogénica.

Grupo 4: sustancias que probablemente no son carcinogénicas para los seres humanos.

Cuando una sustancia se clasifica en el grupo 1 significa que no hay duda sobre su potencial para producir cáncer. Deben promoverse acciones de protección de la salud y se deben establecer medidas regulatorias para prevenir la exposición a la misma.

Las sustancias clasificadas en el grupo 2A deben ser objeto de atención, y el principio de precaución sugiere actuar prácticamente como si fueran del grupo 1. De hecho, las sustancias del grupo 2A son objeto prioritario de investigación que aporte nuevas pruebas. Como la clasificación se actualiza periódicamente, no es infrecuente que algunas sustancias del grupo 2A, una vez recopilada más información sobre sus efectos, pasen al grupo 1 o bien se rebaje su clasificación al grupo 2B. Aunque es interesante conocer las sustancias del grupo 2B como potencialmente sospechosas, no se indican acciones específicas para las mismas. Una característica importante de la clasificación de la IARC es que no solo se aplica a sustancias químicas individualmente, sino a mezclas complejas de sustancias, así como a circunstancias que implican exposiciones que resulten cancerígenas, aunque no se conozca con detalle cual es la sustancia responsable del efecto.

1.2.7 CLASIFICACIÓN DE LA IARC PARA LOS HAP's (IARC, 2012).

Respecto a los HAP's individuales la última actualización de la IARC ha establecido la siguiente clasificación:

- *Cancerígeno para los seres humanos (grupo 1):* benzo[a]pireno.
- *Probablemente cancerígenos para los seres humanos (grupo 2A):* ciclopenta[c,d]pireno, dibenzo[a,h]antraceno y dibenzo[a]pirenos.
- *Posiblemente cancerígenos para los seres humanos (grupo 2B):* Benzo[j]aceantrileno, Benzo[a]antraceno, Benzo[b]fluoranteno, Benzo[j]fluoranteno, Benzo[k]fluoranteno, Benzo[c]fluoreno, Criseno, Dibenzo[a,h]pireno, Dibenzo[a,i]pireno, Indeno[1,2,3-cd]pireno, 5-Metilcriseno.

1.2.8 LÍMITES DE EXPOSICIÓN ACEPTADOS.

El largo período de latencia entre la primera exposición y la aparición de los síntomas, junto a muchos otros factores, ha hecho que el establecimiento de valores límite umbral para los HAP's en la atmósfera del lugar de trabajo sea una tarea ardua y difícil. Recién en 1967, la conferencia Americana de Higienistas Industriales del Gobierno de Estados Unidos (ACGIH) adoptó un Valor Límite Umbral (TLV) de 0,2 mg/m³ para los alquitranes de hulla volátiles, definiéndose como el peso de la fracción soluble en benceno de las partículas recogidas en un filtro (Mastandrea et al., 2005).

En 1997, la Administración sobre Salud y Seguridad Ocupacional (OSHA) de Estados Unidos estableció un Límite de Exposición Permisible (PEL) para el Bp de 0,2 mg/m³ (Mastandrea et al., 2005). El Límite de Exposición Recomendado (REL) por el Instituto Nacional de Salud y Seguridad Ocupacional (NIOSH) de Estados Unidos es de 0,1 mg/m³ (fracción extraíble en ciclohexano) (Mastandrea et al., 2005). Todos estos datos pueden observarse en la Tabla 2 extraída de un informe de la Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR por sus siglas en inglés) sobre la toxicidad de los HAP's del año 1995.

Agencia	Foco	Contenido	Comentarios
American Conference of Governmental Industrial Hygienists	Aire: lugar de trabajo	0.2 (mg/m ³ para la fracción de brea de alquitrán de hulla soluble en benceno	Sugerencia: TLV* (8-horas TWA†)
National Institute for Occupational Safety and Health	Aire: lugar de trabajo	0.1 mg/m ³ para agentes volátiles de brea de alquitrán de hulla.	Sugerencia: REL‡ (8-horas TWA)
Occupational Safety and Health Administratio	Aire: lugar de trabajo	0.2 mg/m ³ para la fracción de brea de alquitrán de hulla soluble de benceno	Regulación: (fracción soluble en benceno de compuestos volátiles de alquitrán de hulla) PEL§ (8-horas jornada laboral)
U.S. Environmental Protection Agency	Agua	0.0001 mg/L	MCL para benzo(a)antraceno
		0.0002 mg/L	MCL para benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, Criseno
		0.0003 mg/L	MCL para dibenz(a,h)antraceno
		0.0004 mg/L	MCL para indenol(1,2,3-c,d)pireno

*TLV: valor umbral límite; † TWA (time-weighted average): concentración para una jornada laboral normal de 8-horas y 40-horas semanales a la cual prácticamente todos los trabajadores están expuestos en forma repetitiva; ‡REL (recommended exposure limit): límite de exposición recomendado en el aire para compuestos volátiles de brea de alquitrán de hulla (fracción extraíble en ciclohexano) promedio de un turno de trabajo de 10 horas; §PEL (permissible exposure limit): límite legal de exposición admisible en el aire. (PEL) para los volátiles de brea de alquitrán de hulla (fracción soluble en benceno) promediado en un turno de trabajo de 8 horas; MCL: nivel máximo de contaminante.

Tabla 2. Estándares y regulaciones para los HAP's (ATSDR 1995).

En el año 2011 la Organización Mundial de la Salud publicó la cuarta edición de la guía para la calidad del agua potable donde el valor máximo sugerido para de Bp en el agua tiene un valor de 700ng/L (WHO, 2011).

1.2.9 METABOLISMO DE LOS HAP's.

Un aspecto de interés para comprender la actividad biológica de los HAP's es su metabolismo, es decir, la serie de transformaciones que sufren una vez absorbidos por el organismo (Agudo, 2010). En organismos eucariotas los compuestos lipofílicos, tales como muchos productos naturales y compuestos sintéticos incluyendo drogas, carcinógenos y pesticidas, no pueden ser excretados a menos que se oxiden a compuestos más polares. Estas reacciones de oxidación son llevadas

a cabo principalmente por la superfamilia de las monooxigenasas dependientes del citocromo P450 (Kelly et al., 1997).

El proceso de detoxificación realizado por enzimas del citocromo P450, está muy extendido encontrándose en arqueas, bacterias y eucariotas (Nelson et al., 1996). Algunos citocromos P450 (CYPs) han evolucionado para cumplir un rol en la desintoxicación, mientras que otros están involucrados en reacciones biosintéticas que conducen a la producción de esteroides, esteroides, terpenos, flavonoides, alcaloides y otros productos.

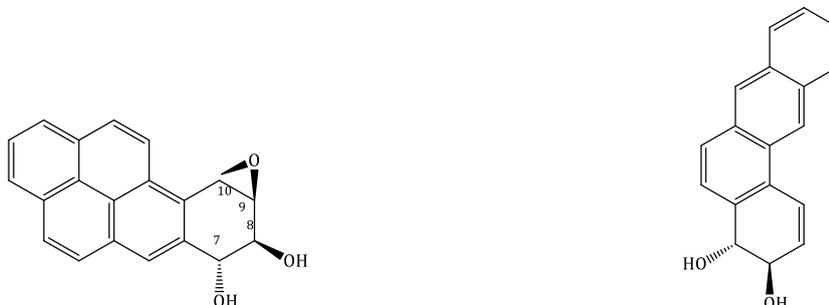
Se ha estudiado la capacidad de *Saccharomyces cerevisiae* para metabolizar promutágenos/procarcinógenos en pruebas de genotoxicidad utilizando entre otros compuestos al Bp (Kelly et al., 1997). En *Saccharomyces cerevisiae* se han descrito tres enzimas P450, la CYP51 o 14- α -lanosterol desmetilasa, la CYP56 o DIT2, enzima que participa en la producción de esporas y la CYP61 o 22-esterol desaturasa (Nelson et al., 1996). La actividad que produce la Δ^{22} -desaturación del esteroles está presente en organismos de diferentes reinos, incluyendo protozoos, algas, plantas y hongos, y confiere resistencia a estrés osmótico en organismos que contienen esteroles 22-insaturado en sus membranas.

El ergosterol es un componente importante de la membrana celular fúngica, que no solo es esencial para el crecimiento y desarrollo de las levaduras, sino que también es muy importante para su adaptación al estrés (Hu et al., 2017). A su vez se demostró que la enzima CYP61 es la enzima hidroxilasa que metaboliza y activa como promutágeno al Bp en levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Kelly et al., 1997). Este tipo de activación se produce dado que el Bp puede inhibir competitivamente a la Δ^{22} -insaturación provocando su metabolización por la enzima CYP61 dando lugar a la formación de 3-hidroxibenzo[a]pireno (3-OHBaP). El 3-OHBaP como

metabolito monohidroxilado del Bp se utiliza como biomarcador ya que está estrechamente relacionado con la entidad genotóxica (Barbeau et al., 2014). La enzima CYP61 es regulada a través de una hemoproteína llamada Dap1 la cual se une y regula positivamente al gen ERG5, gen que se expresa para la síntesis de CYP61 (Nelson et al., 1996; Kelly et al., 1997; Hughes et al. 2007). Dentro de los genes vinculados con la síntesis del ergosterol el gen ERG5 forma parte del grupo de genes no esenciales ya que su actividad no es esencial para la supervivencia de la levadura pero si es relevante para el crecimiento y desarrollo de las levaduras dado que cambia la composición de la membrana alterando así el potencial de membrana (Hu et al., 2017).

A nivel humano los HAP's se distribuyen en diversos órganos y tejidos que contienen grasa (ej.: riñones y tejido adiposo), especialmente en el hígado (Roshandel et al., 2012) y en menor proporción también se acumulan, en bazo, glándulas suprarrenales y ovarios (Mastandrea et al., 2005). El proceso de detoxificación tiene lugar, aunque no exclusivamente, a nivel hepático, por distintas vías. El primer paso consiste en la oxidación de los HAP's; posteriormente, al compuesto oxidado se le puede añadir otra molécula como el glutatión; a este paso se lo conoce como conjugación. El objetivo de este proceso de oxidación-conjugación es transformar un compuesto hidrofóbico en un compuesto hidrosoluble y favorecer así su eliminación por la orina. 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 HAP's (Weyand et al., 1986). En particular el Bp es metabolizado a benzo[a]pireno-7,8-dihydrodiol-9,10-epóxido el cual tiene la capacidad de unirse covalentemente al N₂ de la guanina. En el caso del

Ban el metabolito que presenta mayor capacidad tumorigénica es el trans-3,4-dihidroxi-3,4-dihidrobenz[a]antraceno (Wood et al., 1977; Xue y Warshawsky, 2005).



Benzo[a]pireno-7,8-dihydrodiol-9,10- epóxido Trans-3,4-dihidroxi-3,4-dihidrobenz[a]antraceno

1.2.9.1 VIA DE SEÑALIZACIÓN DEL RECEPTOR DE HIDROCARBUROS DE ARILO (AhR).

En humanos el Bp es metabolizado mediante la vía de señalización del receptor de hidrocarburos de arilo (AhR, por sus siglas en inglés) (Vázquez-Gómez et al., 2016). Los efectos carcinogénicos del Bp pueden ser explicados, en términos generales, por dos mecanismos: la vía genómica y la vía no genómica. La primera consiste en la inducción de genes que codifican enzimas que participan en la bioactivación del Bp (Apatiga-Vega et al., 2010) y el segundo mecanismo tiene que ver con la participación del AhR en la estimulación, promoción y progresión de tumores, mediante la alteración de las vías de señalización relacionadas con la proliferación celular y del sistema inmune (Vázquez-Gómez G et al., 2016). La activación del AhR está dada por la unión de un ligando, los cuales son principalmente xenobióticos, de naturaleza hidrofóbica y con estructura plana. Pueden ser de origen natural, como el caso de los metabolitos secundarios de plantas o producto de combustiones incompletas, como es el caso de los HAP's (Vázquez-Gómez et al., 2016; Apatiga-

Vega et al., 2010). La activación del AhR se caracteriza por su translocación al núcleo y la disociación del complejo al cual está unido. Una vez en el núcleo, el AhR, formará un heterodímero con la proteína translocador nuclear del receptor de arilos (ARNT). Este heterodímero AhR/ARNT interaccionará con proteínas acetil transferasas de histonas y factores remodeladores de cromatina, lo que resulta en la unión del complejo AhR/ARNT a una secuencia de ADN consenso (GCGTGA) conocida como elemento de respuesta a xenobióticos (Vázquez-Gómez et al., 2016).

Dentro de estos genes se incluyen aquellos que codifican enzimas de la fase I del metabolismo de xenobióticos, representada por citocromos P450 (CYP450) y de la fase II la cual incluye a las glutatión-S-transferasas (GST) y las UDP glucuronil-transferasas (UGT) (Figura 5). Los genes de la fase I, regulados por el AhR/ARNT, sólo incluyen a los miembros de la familia CYP1 de los CYP450 (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1) (Vázquez-Gómez et al., 2016). Esto último concuerda con el trabajo de Keith et al. (2001) donde se expresa que las enzimas responsables de la activación metabólica de los HAP's, incluyendo el Bp, son la CYP1A1, CYP1B1 y mucho menos la CYP1A2 conjuntamente con la epóxido-hidrolasa.

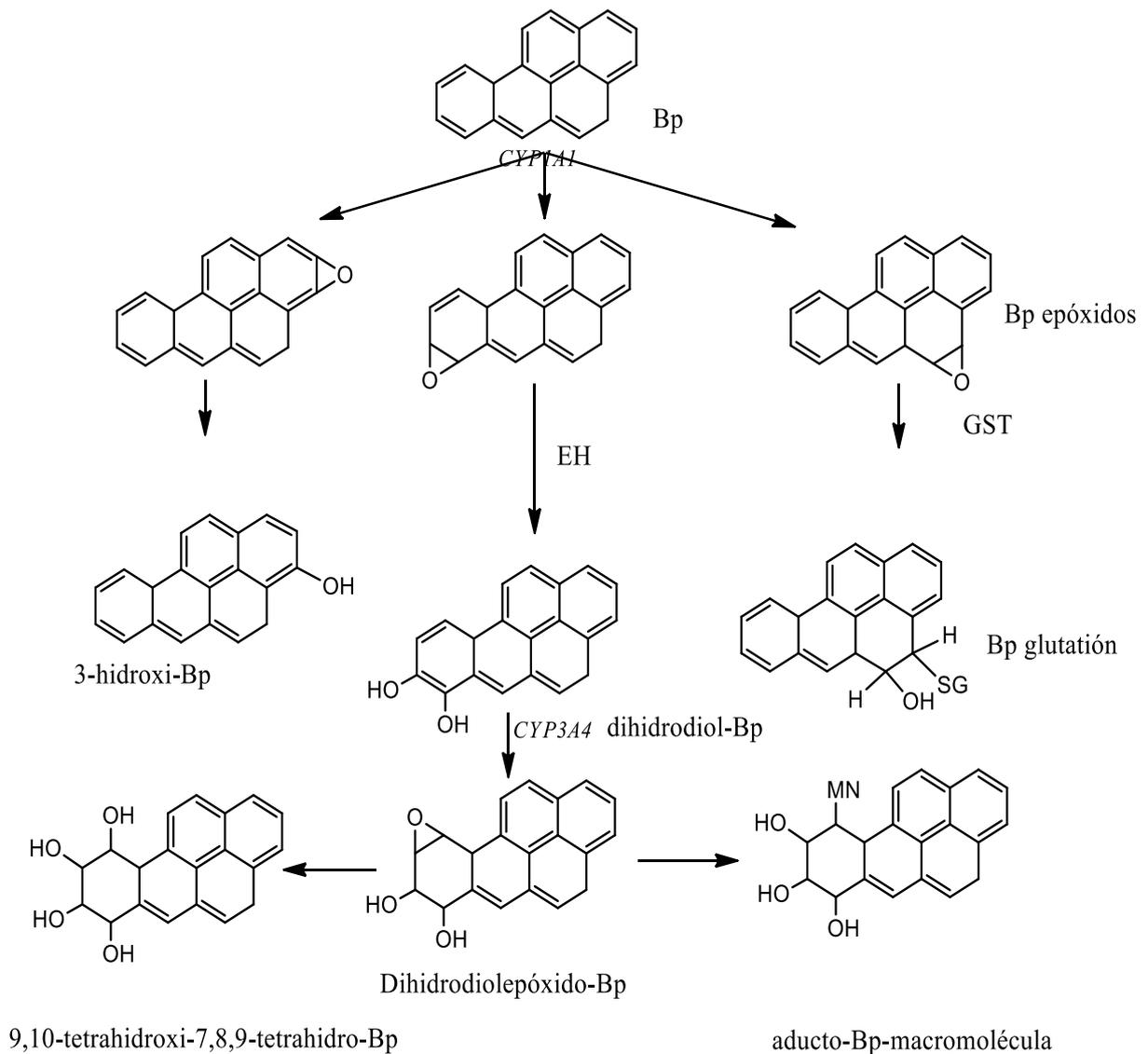


Figura 5. Representación esquemática del metabolismo del Benzo[a]pireno en humanos. EH: Epóxido hidrolasa. GST: Glutacion-S-Transferasa (Agudo A. 2010).

1.3 SISTEMAS DE REPARACIÓN GENÓMICA.

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 (Friedberg et al., 2005).

Dado lo extenso del tema nos centraremos en describir las vías de reparación que con mayor probabilidad pueden estar implicadas en procesar el tipo de daño producido por los productos metabolizados de los HAP's usados en este trabajo. La vía que predomina en la reparación de los aductos formados por estos compuestos es la reparación por escisión de nucleótidos (NER) (Hong et al. 2017) pero se ha observado también una actividad importante de las vías de tolerancia al daño (Sertic et al. 2012). Y dado que se evalúa la posibilidad de fragmentación cromosómica también detallaremos las vías de reparación que se activan en estas condiciones como son la reparación por recombinación homóloga y la unión de extremos no homólogos (Rossner et al., 2014; Tung et al., 2014).

1.3.1 REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE NUCLEÓTIDOS (NER).

La vía NER (*Nucleotide Excision Repair*) se encarga de revertir lesiones que crean distorsiones en la estructura tridimensional del ADN que interfieren con el emparejamiento de bases pudiendo afectar la replicación o la transcripción (Hong et al. 2017; Boiteux and Jinks-Robertson, 2013). Entre las lesiones más relevantes que NER es capaz de eliminar se encuentra las producidas por la exposición a la luz UV (dímero de pirimidina ciclobutano (CPD) y el fotoproducto pirimidina (6-4) pirimidona [(6-4) PP]), así como las distorsiones que introducen grandes compuestos aromáticos policíclicos o agentes quimioterápicos que unen las dos cadenas de ADN entre sí (Friedberg et al., 2005; Boiteux and Jinks-Robertson, 2013;

Gallego Sánchez, 2014; Hong et al. 2017). NER elimina también el daño oxidativo endógeno al ADN que resulta del entrecruzamiento intramolecular entre la posición C8 de purinas y la posición 5' de desoxirribosa. Finalmente, NER puede proporcionar un mecanismo alternativo para reparar sitios abásicos (AP) y bases oxidadas (Boiteux and Jinks-Robertson, 2013).

La ruta NER se puede dividir en dos sub-rutas basados en el paso de reconocimiento inicial de la lesión: genoma global NER (GG-NER) y NER acoplado a la transcripción (TC-NER). En GG-NER, las proteínas reconocen directamente una lesión y es exclusivo de esta vía el complejo que contiene las proteínas Rad7 y Rad16. Por el contrario, TC-NER se inicia cuando una lesión en la cadena transcrita bloquea la ARN polimerasa y las proteínas exclusivas de esta vía son Rad26 y la subunidad Rpb9 de la ARN polimerasa II. Después del reconocimiento de la lesión, las dos vías secundarias convergen y se realizan incisiones duales que flanquean el daño (Sertic et al. 2012; Boiteux and Jinks-Robertson, 2013).

Se han identificado seis factores NER esenciales: Rad4-Rad23, Rad14, TFIIH, Rad1-Rad10, Rad2 y la proteína de replicación A (RPA). Estos factores se ensamblan uno por uno al irse reclutando secuencialmente durante NER (Boiteux and Jinks-Robertson, 2013; Hong et al. 2017).

GG-NER

La vía GG-NER se inicia cuando un complejo trimérico formado por las proteínas Rad4-Rad23-Rad33 detecta distorsión en la hélice de ADN. La proteína Rad4 reconoce el daño a través de la detección de pares de bases termodinámicamente inestables teniendo así una amplia especificidad de sustrato y cabe señalar que la inactivación de Rad4 elimina por completo tanto GG-NER como TC-NER en

levaduras (Min and Pavletich, 2007; Boiteux and Jinks-Robertson, 2013). Sumado a este complejo esta la proteína Rad34 que tiene una homología de secuencia con Rad4 y, al igual que Rad4, interactúa con Rad23. Los datos disponibles sugieren que el papel de Rad34 durante NER está involucrado con la reparación de los genes de ADN ribosomal transcritos con ARN polimerasa I. Asociándose al complejo Rad4-Rad23-Rad33 se encuentra el complejo formado por las proteínas Rad7 y Rad16, las cuales son necesarias para la eliminación de daño en secuencias no expresadas y en cadenas no transcritas de genes activos y por lo tanto tienen un papel específico en la ruta GG-NER (Mardiros et al. 2011; Boiteux and Jinks-Robertson, 2013; Hong et al. 2017).

A través de la interacción física entre Rad4 y Rad7 se da la formación de un gran complejo de reconocimiento de lesiones con lo cual el complejo Rad7-Rad16 puede estimular la reacción de escisión de la lesión (Boiteux and Jinks-Robertson, 2013).

Para que Rad4 se reclute al lugar de la lesión el factor de unión a la secuencia de replicación autónoma 1 (Abf1) se une para formar un complejo trimérico con Rad7-Rad16 y una vez formado este nuevo complejo puede generar torsión superhelicoidal en ADN hidrolizando ATP para traslocarse en el ADN. Esto genera cambios conformacionales que facilitan la llegada de Rad4. También se ha visto que el complejo Rad7-Rad16 interactúa con el complejo Elc1-Cul3 formando una ligasa E3 Ub basada en cullina que promueve la ubiquitinación de Rad4 y de otras proteínas asociadas a la cromatina. De esta manera los complejos basados en Rad7-Rad16 tienen múltiples funciones en el reconocimiento de lesiones que incluyen la unión al daño del ADN, interactuar con Rad4-Rad23-Rad33, impulsar cambios conformacionales en el ADN y remodelar la cromatina mediante acetilación y ubiquitinación (Boiteux and Jinks-Robertson, 2013).

Una vez que el complejo por Rad4-Rad23-Rad33 se halla en la zona de la lesión se permite el reclutamiento y posicionamiento del factor de transcripción TFIIH el cual interactúa con Rad4, Rad23 y RPA siendo un componente fundamental de NER. TFIIH se compone de 10 subunidades que se pueden dividir en dos sub-complejos: un complejo central de TFIIH con siete subunidades (Rad25, Rad3, Tfb1, Tfb2, Ssl1, Tfb4 y Tfb5) y un complejo de quinasa CAK compuesto por tres subunidades (Kin28, Ccl1 y Tfb3).

La proteína Rad3 es una helicasa de ADN dependiente de ATP con actividad en sentido 5' a 3' y la proteína Rad25 también es una ATPasa con actividad helicasa de ADN, pero tiene sentido de 3' a 5' (Boiteux and Jinks-Robertson, 2013). De esta forma se desenrolla la doble hebra de ADN en las proximidades de las lesiones, generando "burbujas" donde queda demarcada la lesión (Rodríguez et al., 1998; Guzder et al., 2006).

A continuación el complejo de reconocimiento Rad4-Rad23-Rad33 se libera, y las proteínas Rad14 y RPA son reclutadas para estabilizar el complejo de pre-incisión. En este momento la presencia de la lesión en el ADN se vuelve a evaluar en un "paso de verificación" mediado por TFIIH, RPA y Rad14. En ausencia de verificación de la lesión, la reacción NER se cancela antes de que ocurra la incisión doble (Hong et al. 2017). La proteína RPA actúa uniéndose con alta afinidad al ADN monocatenario de la cadena no dañada así como también se une a Rad14 y a TFIIH, siendo una proteína indispensable durante NER. (Guzder et al. 1995b). La proteína Rad14 es una metaloproteína que contiene un dominio de dedos de zinc y se une con alta afinidad al ADN dañado por los rayos UV (Guzder et al. 1993). El gen RAD14 contiene un intrón y la proteína Rad14 contiene 371 aminoácidos con un peso molecular de 43 KD (Gary et al., 1997). Además de que Rad14 es necesaria en el reconocimiento de los sitios de

lesión también lo es para reclutar a la proteína Rad10 que junto con Rad1 son necesarias para actuar como endonucleasas (Mardiros et al., 2011). Las proteínas Rad2 y Rad1-Rad10 actúan entonces como endonucleasas específicas de la estructura del ADN y se posicionan para formar un nuevo complejo con TFIIH, RPA y Rad14. Debido a que ni Rad2 ni Rad1-Rad10 tienen especificidad por el ADN dañado, cada uno debe ser dirigido a través de interacciones con otras proteínas. Rad2 por lo tanto interactúa con TFIIH (Lafrance-Vanasse et al. 2012), y Rad1-Rad10 forma un complejo con Rad14. De esta manera Rad1 y Rad10 forman un complejo con Rad14 a través de una interacción directa entre Rad1 y Rad14 (Guzder et al. 1996). La proteína Rad2 y el complejo Rad1-Rad10 son similares en cuanto a que cortan el ADN desprendiendo un fragmento de ADN monocatenario de unos 25 a 30 nucleótidos en el cual se encuentra la lesión, pero difieren en términos de la polaridad de la cadena única que desprenden (Rodríguez et al., 1998; Friedberg et al., 2005; Conde Pérez, 2009). En *S. cerevisiae*, el heterodímero Rad1-Rad10 lleva a cabo la función de hacer una incisión de 15 a 24 nt de la lesión en el extremo 5', mientras que Rad2 realiza una incisión a 2-8 nt de la lesión en el extremo 3' (Guzder et al., 1996; Conde Pérez, 2009). A continuación, se elimina el oligonucleótido que queda entre los dos cortes y una polimerasa rellena el hueco y la nueva cadena sintetizada se sella mediante una ADN ligasa (Conde Pérez, 2009).

En las células humanas, la incisión dual y la síntesis de reparación están estrechamente coordinadas. Después de la incisión para crear un oligonucleótido que contiene la lesión, RPA y XPG (en levadura Rad2) se asocian con el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA por sus siglas en inglés) que funciona como un lugar de anclaje para diferentes proteínas y el factor de replicación C (RFC) que funciona como un cargador para los lugares de ensamblaje para formar una

plataforma para la Polimerasa δ ; el reclutamiento de la Polimerasa δ ; está asociado con la liberación de los factores NER restantes. En las células humanas, tres ADN polimerasas (Pol δ , Pol ϵ y Pol κ) están involucradas en la síntesis de reparación (Ogi et al. 2010; Lehmann 2011). En levadura, los datos sugieren que Pol δ o Pol ϵ pueden llevar a cabo la síntesis de reparación. La reacción de ligadura final es realizada por la ADN ligasa 1 la cual es el producto del gen CDC9.

TC-NER

TC-NER promueve la eliminación rápida y específica de las lesiones en la cadena que bloquean la transcripción al dirigir el aparato NER al complejo de ARN Pol II estancado (Boiteux and Jinks-Robertson, 2013; Hong et al. 2017). En células de mamífero se observó una reparación más eficiente de lesiones en secuencias expresadas y esto refleja específicamente la eliminación preferencial de lesiones de la cadena de ADN transcrita. Como se señaló anteriormente, todos los genes que son esenciales para GGNER son necesarios para TC-NER, con la excepción de RAD7 y RAD16, que son necesarios solo para reparar el NTS (Spivak, 2016).

TC-NER se activa cuando la ARN Pol II se detiene debido a la lesión y tiene dos vías secundarias: una dependiente de la proteína Rad26 y otra dependiente de la subunidad Rpd9 de la ARN Pol II. Los genes específicamente involucrados en TC-NER se identificaron por primera vez en humanos, donde su pérdida es responsable del síndrome de Cockayne (CS). Las células deficientes en CSA o CSB son muy sensibles a los rayos UV, una propiedad que permitió la clonación de los genes humanos CSA y CSB. Según la homología de secuencia con las proteínas codificadas, se identificaron los homólogos de levadura y los genes correspondientes se denominaron RAD28 y RAD26, respectivamente (Boiteux and Jinks-Robertson,

2013; Spivak, 2016). En la estructura de Rad26 se encuentran siete motivos conservados de helicasas de ADN/ARN en la subfamilia SNF2 (reguladores de la transcripción) y aunque exhibe actividad ATPasa dependiente de ADN no tiene actividad helicasa detectable. La proteína Rad28 es una proteína con secuencias de repetición WD40 sin actividad catalítica identificada y probablemente esté involucrada en interacciones de proteínas (Spivak, 2016). La proteína Rad26 está asociada con ARN Pol II durante el alargamiento transcripcional y por lo tanto, su "reclutamiento" en el sitio de la lesión resultaría del estancamiento de ARN Pol II. Se ha demostrado que la proteína Rad26 co-purifica con la proteína Def1, un factor que está involucrado en la ubiquitinación de ARN Pol II y que conduce a su degradación por el proteosoma cuando la lesión no puede eliminarse rápidamente.

El bloqueo de la ARN Pol II en una lesión estabiliza la interacción con la proteína Rad26 y el complejo estancado tiene dos resultados alternativos que dependerán de si la lesión detiene la maquinaria de transcripción de forma transitoria o permanente (Boiteux and Jinks-Robertson, 2013).

En una lesión de bloqueo moderado, se considera que Rad26 promueve un bypass y, por lo tanto, permite que continúe la transcripción. Dado que este bypass puede estar asociado con la incorporación de ribonucleótidos incorrectos en el ARNm correspondiente, puede conducir a la producción de proteínas aberrantes a través de un proceso denominado "mutagénesis transcripcional". En lesiones que bloquean fuertemente, la ARN Pol II se detiene permanentemente sin posibilidad de bypass, y se activa TC-NER (Boiteux and Jinks-Robertson, 2013).

En este caso Rad26 inicia la remodelación de la cromatina para atraer factores NER adicionales y después del procesamiento de la lesión la transcripción puede reanudarse rápidamente (Spivak, 2016).

Otra vía posible de TC-NER independiente de Rad26 esta mediada por Rpb9, que es una subunidad no esencial de la ARN Pol II. Los dobles mutantes *rpb9Δ rad26Δ* son completamente defectuosos en TC-NER. Existe un reclutamiento directo o indirecto de factores NER por la proteína Rpb9, similar al descrito para la TC-NER dependiente de Rad26 (Boiteux and Jinks-Robertson, 2013).

1.3.2 REPARACIÓN POR RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA (HR) Y UNIÓN DE EXTREMOS NO HOMÓLOGOS (NHEJ)

En células eucariotas existen dos vías canónicas de reparación de roturas de doble cadena (DSBs) (Friedberg et al., 2005; Shrivastav et al., 2008; Evdokimova et al., 2018; Yueru Sun et al., 2020):

- recombinación homóloga (HR) y
- unión de extremos no homólogos (NHEJ).

MECANISMOS IMPLICADOS EN NHEJ:

La reparación por NHEJ consiste en la religación directa de los extremos de la rotura de doble cadena (DSB), actuando el grupo de genes HJF, 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 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, Mahmoud Toulany, 2019).

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. Este mecanismo ocurre por la acción conjunta del complejo MRX, Sae2, la helicasa Sgs1 y las nucleasas Dna2 y/o Exo1 (Lee et al., 1999; Zhu et al., 2008). Luego las funciones de los grupos epistáticos de RAD52 son los responsables de los siguientes pasos. Primero Rad52 promueve la invasión de los fragmentos de ADNss con extremos 3'OH sobre la región homóloga de ADN, la proteína Rad59 actúa facilitando esta invasión. Luego Rad51 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.

A continuación, 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.

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 (Friedberg et al., 2005).

1.3.3 MECANISMOS DE TOLERANCIA AL DAÑO: REPARACIÓN POST-REPLICATIVA (PRR).

Las células poseen rutas de tolerancia al daño, mecanismos muy importantes para el mantenimiento de la integridad del genoma y la supervivencia celular frente a diferentes tipos de lesiones que bloquean el avance de las horquillas de replicación. En estas situaciones, las rutas de tolerancia permiten a las horquillas atravesar la lesión sin tener que eliminarla de la cadena molde, evitando la formación de DSBs por colapso de la horquilla, que desde el punto de vista de la estabilidad genómica puede ser preferible (Gallo et al., 2019)

Dentro de estos mecanismos se pueden distinguir dos alternativas: la vía de síntesis a través de la lesión o TLS (Trans Lesion Synthesis) y la ruta denominada “vía para evitar el daño” que también se conoce como “ruta de tolerancia al daño libre de errores” o “de cambio de molde” (template switch) (Conde Pérez, 2009). Ambas rutas se encuentran bajo el control del complejo formado por las proteínas Rad6 y Rad18, donde Rad6 tiene actividad conjugadora de ubiquitina y Rad18 es una proteína de tipo *RING finger* con actividad ubiquitín ligasa, además de tener actividad ATPasa dependiente de unión a ADNss.

COMPONENTES DE LA RUTA DE TLS.

La tolerancia al daño por la vía de TLS la llevan a cabo un conjunto especial de polimerasas conservadas evolutivamente que, a diferencia de las polimerasas

replicativas, presentan sitios catalíticos más relajados, los cuales pueden acomodar lesiones de la cadena molde sin quedar bloqueadas en el momento de catalizar la incorporación del nuevo nucleótido. No obstante, las polimerasas de TLS se caracterizan por sintetizar ADN con unas tasas de error mucho más altas que las replicativas.

En *S. cerevisiae*, el proceso de TLS lo llevan a cabo Pol η , Rev1 y Pol ζ . Al igual que las polimerasas replicativas, las polimerasas de TLS utilizan a PCNA como plataforma central al cual se unen para tener acceso al replisoma detenido en la lesión y catalizar la síntesis de ADN (Friedberg et al., 2005; Rechkoblit et al., 2017). El bypass del daño de ADN por la vía RAD6 permite que el ADN sea sintetizado a través de lesiones que de otro modo bloquearían la replicación de las ADN polimerasas (Keszenman et al., 2005). Esto no solo permite completar la replicación sino que también permite la generación de un complemento, cadena sin daños que se puede utilizar como plantilla en una subsiguiente reacción BER o NER. Aunque no es una verdadera vía de reparación, la vía RAD6 se conoce comúnmente como la vía de reparación posterior a la replicación (PRR).

LA RUTA PRR LIBRE DE ERRORES.

Esta vía se beneficia de la información no dañada y recién sintetizada de la cromátida hermana para restaurar sin mutaciones la secuencia de la cadena opuesta a la lesión. Esta ruta promueve un complicado mecanismo de reparación que depende de Rad6/Rad18 (Conde Pérez, 2009).

1.4 CARACTERISTICAS GENERALES DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*.

Los eucariotas unicelulares ofrecen muchas ventajas como modelos de investigación porque tienen genomas relativamente pequeños en comparación con otros eucariotas, una cantidad también menor de genes con disponibilidad de los respectivos mutantes y facilidades de cultivo. Las levaduras pertenecen al reino Fungi, división Ascomycetes y a la clase Hemiascomycetes (Walker, 1998; Watson, 2006).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha sido un organismo modelo de investigación desde hace más de 50 años (Fisher, 2007). Hay muchos aspectos de *Saccharomyces cerevisiae* que la hacen ideal para investigación:

-las colonias de *S. cerevisiae* crecen rápidamente en un medio simple con un tiempo de generación celular de aproximadamente 90 minutos en condiciones óptimas. (Spencer et al., 1983; Herskowitz, 1988)

-las levaduras son de fácil mantenimiento y multiplicación en el laboratorio además de existir múltiples referencias de investigación disponibles para la comparación.

-la levadura de gemación *S. cerevisiae* se ha utilizado ampliamente como modelo biológico para estudiar la reparación del ADN.

La justificación de la levadura como modelo se basa en la facilidad de manipulación genética y el alto grado de homología entre los genes de humanos y levaduras (Spencer et al., 1983; Foury, 1997)

1.5 POLIFENOLES.

Los polifenoles (PFs) (Figura 6) constituyen uno de los grupos de metabolitos secundarios más numerosos y ubicuos de las plantas (Andersen and Markham, 2006).

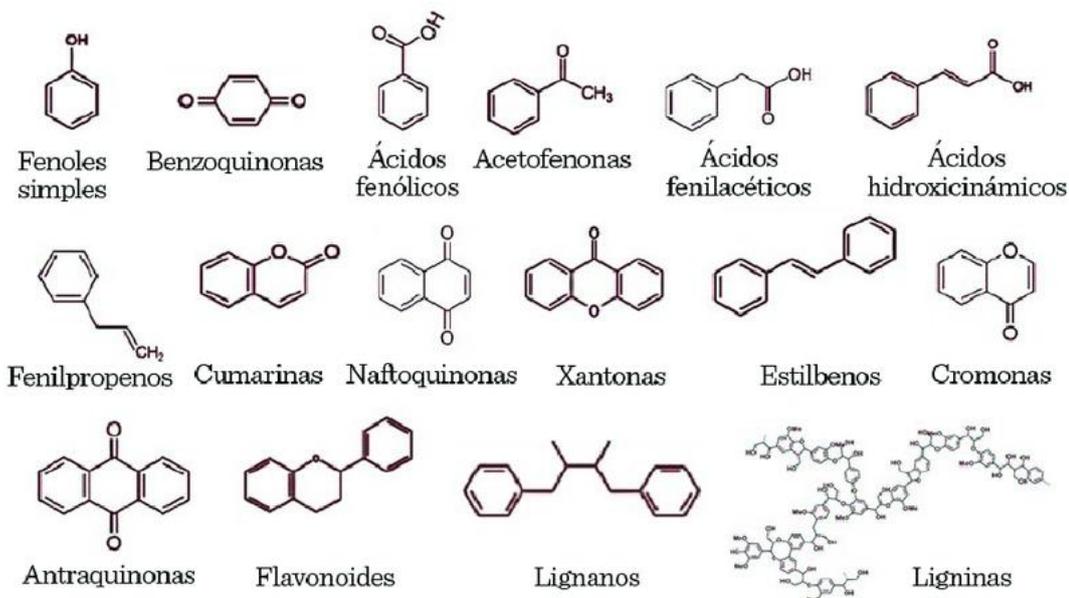


Figura 6. Estructura química básica de las principales clases de polifenoles.

Estos compuestos están involucrados en los mecanismos de defensa de las plantas frente a agentes externos como la radiación ultravioleta y la agresión de patógenos y predadores. Así mismo constituyen una parte importante de la dieta humana por su ubicuidad en los alimentos de origen vegetal, por lo que también han despertado un gran interés desde el punto de vista nutricional (Rice-Evans and Parker, 2003; Granado Serrano, 2010).

Los PFs son un conjunto heterogéneo de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura química dos o más grupos fenólicos. Comprenden una amplia variedad de moléculas que incluyen desde compuestos altamente polimerizados hasta moléculas simples con un solo anillo fenólico en su estructura,

como los fenoles y ácidos fenólicos (Andersen and Markham, 2006; Granado Serrano, 2010). Surgen del metabolismo de las plantas y constituyen un grupo con más de 8000 estructuras conocidas actualmente (Heck and Mejia, 2007; Evans, 2009). Están compuestos por varios grupos que se diferencian en su esqueleto carbonado. Dentro del grupo de los fenilpropanoides (C6-C3), se destacan los ácidos hidroxicinámicos (Figura 7) que son muy abundantes (ej. p-cumárico, cafeico, clorogénico, ferúlico, sinápico) (Ferrer Pastor, 2008; Evans, 2009).

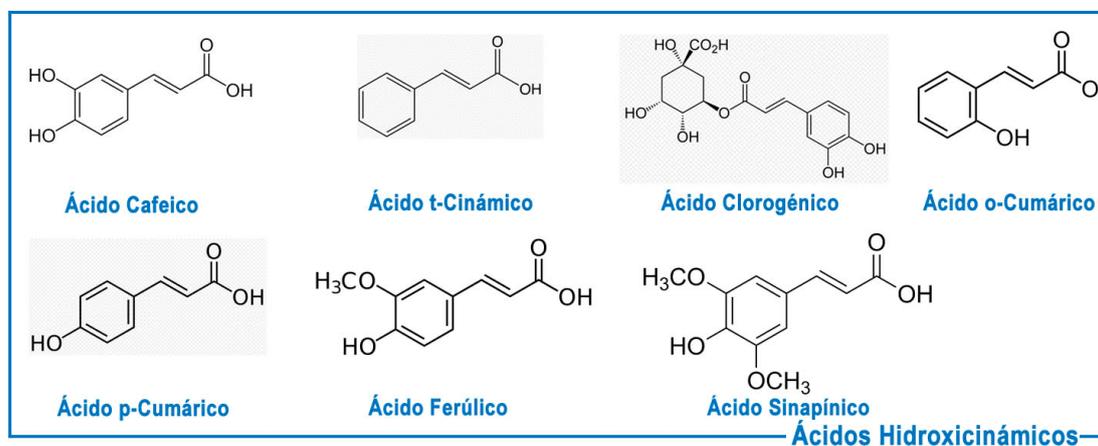


Figura 7. Ácidos Hidroxicinámicos.

El ácido hidroxicinámico más abundante en los alimentos es el ácido clorogénico, el éster de ácido cafeico con ácido quínico (ácido 5-O-cafeoilquinico) (Santos et al., 2010).

La yerba mate (*Ilex paraguariensis*) presenta un alto contenido en polifenoles, que son reconocidos por su capacidad protectora a nivel celular y molecular frente a diferentes tipos de genotóxicos (Candrea et al., 1993; Miranda et al., 2008; Filip et al., 2009; Bracesco et al., 2018). En Uruguay una encuesta realizada por el Ministerio de Salud Pública (MSP) muestra que el 85% de la población mayor de 15 años

consume por lo menos una vez por semana la infusión de yerba mate (STEP-MSP, 2007)^{2*}, siendo entonces la infusión de yerba mate una fuente para el consumo de ácido clorogénico entre otros antioxidantes.

En el contexto de este trabajo los compuestos polifenólicos son importantes dado que se ha demostrado que pueden alterar la actividad de las enzimas del citocromo P450CYP a través de interacciones directas con las enzimas o al afectar la expresión del gen CYP (Korobkova, 2015; Basheer and Kerem, 2015). Se han observado efectos inhibitorios de polifenoles en la actividad de CYP3A4 humana in vitro al producirse la formación de un enlace covalente entre el polifenol y la molécula CYP3A4 que conduce a la inactivación de la enzima.

Esta inhibición de enzimas de fase I que metabolizan xenobióticos puede estudiarse como un efecto quimiopreventivo de los polifenoles naturales (Teel and Huynh, 1998; Basheer and Kerem, 2015). Otros trabajos han demostrado que el tratamiento con polifenoles bloquea la transcripción de CYP1A1 en las células del hepatoma humano HepG2 al evitar que el receptor de hidrocarburos de arilos (Ahr) se una a las secuencias potenciadoras del promotor CYP1A1, que regulan la transcripción del gen (Mikstacka et al., 2002). Por lo tanto Ahr podría ser un objetivo potencial para los polifenoles como moduladores de la activación de los compuestos carcinógenos. Sin embargo, los resultados de este estudio indican que, especialmente para trans-resveratrol lo que se observa principalmente es una inhibición de la enzima P450 2E1 (Mikstacka et al., 2002)

² *www.msp.gub.uy

1.6 INTERES EN EL TEMA DE INVESTIGACIÓN

Szaefer y colaboradores (2004) reportan que los fenoles presentes en vegetales como los ácidos protocatéquico, clorogénico, tánico y el resveratrol, aplicados antes de HAP's en piel de ratón reducen significativamente su unión al ADN epidérmico y los niveles de aductos de ADN. Además observaron que el Bp produciría un aumento en los niveles de CYP1A1/1A2 y CYP2B en animales tratados así como de enzimas glutatión S-transferasa y NAD(P)H: quinona oxidoreductasa-1 (NQO1), mientras que el pretratamiento con compuestos fenólicos antes de la aplicación de Bp disminuye significativamente las actividades de estas enzimas (Szaefer et al., 2008). Por lo tanto, resulta de interés que, debido a la inevitable y continua exposición en nuestra vida diaria a estos compuestos y su reconocida capacidad cancerígena, se intente clarificar los mecanismos de defensa que se activan frente a la exposición con este tipo de compuestos, no como agentes aislados sino como una mezcla más compleja con posibles efectos aditivos y/o sinérgicos usando como modelo eucariótico la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

El cáncer actualmente es una de las principales causas de muerte en el mundo y en Uruguay (Barrios et al., 2017) a la vez que en Uruguay la ingesta de mate esta culturalmente muy arraigada. Por lo que parece importante evaluar si alguno de los compuestos bioactivos que se encuentra en mayor proporción en esta bebida nacional, como es el caso del ácido clorogénico, puede tener la capacidad de proteger a las células de la acción genotóxica que pueden provocar los HAP's.

2. HIPÓTESIS.

La presente investigación propone que el ácido clorogénico podría proteger células de *Saccharomyces cerevisiae* salvajes y mutantes en el sistema de reparación por escisión de nucleótidos (NER) del daño inducido por hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) tales como el Benzo[a]pireno y el Benzo[a]antraceno.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL.

Evaluación de los daños producidos por agentes genotóxicos como los HAP's y de la posible acción protectora del compuesto ácido clorogénico frente a los mismos en el modelo eucariota *Saccharomyces cerevisiae*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- 1) Determinar el efecto de Bp como único agente, y en combinación con Ban, sobre las probabilidades de sobrevida y mutagénesis en muestras celulares de *Saccharomyces cerevisiae*.
- 2) Estudiar la producción de dobles roturas en el ADN por los tratamientos con Bp como único agente y en combinación con Ban.
- 3) Analizar el efecto de la adición de ácido clorogénico frente al daño producido por los tratamientos con Bp y Ban.

4) Estudiar la expresión de la proteína Rad14 involucrada en los procesos de reparación genómica y la posible acción del ácido clorogénico.

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

Cepas haploides de *Saccharomyces cerevisiae*.

Cepa salvaje SC7K *lys2-3* (auxotróficas para lisina) (Nunes et al., 1984).

Cepa salvaje SX46 A (MATa RAD *ade2 his3-532 trp1-289 ura 3 52*) y mutante isogénica SX46 A *rad14Δ* (MATa *rad14Δ::HIS3 ade2 his3-532 trp1-289 ura 3-52*) (Prakash et al., 1993).

Mantenimiento de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* se mantuvieron 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 sobrevida (YPD, YPDA) y selectivos para mutagénesis (OM) habituales para *Saccharomyces cerevisiae* (Rose et al., 1990).

-YPD: Medio nutriente líquido: 1% de extracto de levadura (Difco, US Biological), 2% Peptona (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).

Agentes Químicos y Naturales.

Solución ácido clorogénico (ACI). Se preparó una solución de ACI (Sigma, PM: 354,31gr/mol) en agua destilada de manera de obtener una concentración final en las muestras de cultivo de 90 µg/mL (valor referencia en infusión de yerba mate, Bastos et al., 2005).

Solución de Benzo(a)pireno (Bp).

Se preparó una solución madre de Bp (Sigma) a una concentración de 2,5 µg/mL (PM=252,31 gr/mol) (2 µg/Kg es el valor permitido para alimentos ahumados, WHO, 2000). Las diluciones se realizaron en agua destilada y esterilizada con el agregado de DMSO al 10 %.

Para las curvas dosis-efecto se realizaron tratamientos a diferentes concentraciones (10, 25, 50, 100, 200, 250 ng/mL), (25 ng/mL valor de referencia en infusión de yerba mate, Kamangar et al., 2008).

Solución de Benzo(a)antraceno (Ban).

Se preparó una solución madre de Ban (Sigma) a una concentración de 2,5 µg/mL (PM= 228,3 gr/mol) las diluciones se realizaron en agua destilada y esterilizada con el agregado de DMSO al 10%.

Para las curvas dosis-efecto se realizaron tratamientos a diferentes concentraciones (10, 25, 50, 100, 200, 250 ng/mL), (16 ng/mL valor de referencia en infusión de yerba mate, Kamangar et al., 2008).

Crecimiento de las poblaciones celulares.

Se tomó una muestra de la cepa a utilizar y se realizó un primer pasaje a medio de cultivo YPD en condiciones de esterilidad y se incubó por 3 a 4 días bajo agitación continua a 30°C en un agitador orbital, alcanzándose una fase estacionaria temprana. A partir de éste primer pasaje se realizó un segundo pasaje incubándolo durante la noche a 30 °C obteniéndose un cultivo en fase exponencial de crecimiento ($N = 1 - 2 \times 10^7$ células/mL).

El conteo del número de células/mL (N) se realizó en el microscopio utilizando una cámara de Neubauer. Se realizaron dos conteos independientes por muestra y el error fue estimado en $N \pm 10\%$.

Tratamientos

En todos los tratamientos las soluciones de los compuestos químicos se agregaron en un volumen igual al 10% del volumen total del cultivo celular. Y en todos los casos el DMSO utilizado para realizar las diluciones tuvo una concentración final en las alícuotas del cultivo de 1% (Sadowska-Bartosz et al., 2013; Sei-ichi Nakamura et al. 1990)

-Curva dosis efecto para Bp y Ban:

Se incubaron por una hora las alícuotas de cultivo celular a diferentes concentraciones de Bp o Ban (10, 25, 50, 100, 200, 250 ng/mL).

-Tratamientos simples: Bp, Ban, ACl, Bp-Ban y control no tratado. Se incubó por 1 hora. Para estos tratamientos se trabajó con una concentración final de Bp y Ban de 250 ng/mL. Para el tratamiento con Bp-Ban se agregó al medio de cultivo volúmenes

iguales de las soluciones madres de ambos compuestos de forma que la concentración final de ambos en el cultivo fuera de 125 ng/mL. De esta manera se trató al cultivo con una mezcla de HAP's con una concentración final de 250 ng/mL. La solución de ACl se agregó en un volumen tal que su concentración final en el cultivo fue de 90 µg/mL.

-Tratamientos combinados: Bp y ACl, Ban y ACl, Bp-Ban y ACl. Se incubó por 1 hora. En estos tratamientos los volúmenes de las soluciones de los HAP's sumado al volumen de la solución de ACl también se agregaron de manera de no superar el 10 % del volumen de la alícuota de cultivo.

Los tratamientos de Bp/ACl y Ban/ACl se realizaron agregando un volumen tal que la concentración final de Bp y de Ban fuera de 250 ng/mL en combinación con una concentración de ACl final de 90 µg/mL.

Para la triple combinación de BP/Ban/ACl se agregó al cultivo Bp en una concentración final de 125 ng/mL y Ban en una concentración final de 125 ng/mL de manera que la concentración final de la mezcla de HAPs en el cultivo fuera la misma que la concentración final en las muestras tratadas con cada compuesto individualmente (250 mg/mL). El ACl mantuvo la misma concentración final de 90 µg/mL.

Inmediatamente después de los tratamientos simples o combinados las muestras celulares se lavaron dos veces en agua destilada. A partir de estas suspensiones celulares se procedió a las determinaciones de fracción de sobrevivida y frecuencia mutagénica.

Curvas de sobrevivencia y análisis de la mutagénesis.

Se estimaron las probabilidades de sobrevivencia en función de las concentraciones de HAP's en muestras de las poblaciones en fase exponencial. Se analizaron muestras independientes en presencia y ausencia de ACL. Para determinar la fracción de sobrevivencia, las muestras de poblaciones celulares de levaduras se sembraron en placas de Petri (200 μ L) conteniendo medio YPDA (el ensayo se realizó por triplicado).

Se analizaron las siguientes funciones (Haynes, 1988):

Fracción sobreviviente: $S(x,y,z,p) = N_s/N_o$

donde

N_s , número de células sobrevivientes, capaces de generar clones/mL;

N_o , número total de células tratadas/mL;

x, y, z , dosis de Bp, Ban, Bp-Ban (agentes que dañan el ADN);

p , dosis del modulador ACL.

Para determinar la frecuencia mutagénica, las muestras de poblaciones celulares de levaduras, cepa SC7K *lys2-3*, con una concentración de 10^8 cel/mL se sembraron en placas de Petri (200 μ L) conteniendo medio de selección OM (el ensayo se realizó por triplicado). Las placas se incubaron a 30°C durante 21 días y luego se realizó el conteo de las colonias correspondientes a las revertantes de auxotrofia a prototrofia *lys* \rightarrow *LYS* (Severgnini et al., 1991; Keszenman et al., 2000).

Se calculó la frecuencia de mutación $M(n)$ para cada dosis y sus combinaciones según:

Frecuencia mutagénica: $M(x,y,z,p) = N_m/N_s$

donde

Nm, número de mutantes;

x, y, z, dosis de Bp, Bap, BP-Bap (agentes que dañan el ADN);

p, dosis del modulador ACl. (Haynes, 1988; Szaefer et al., 2008; Ager y Haynes, 1988).

Determinación de las DSBs en el ADN

Inmediatamente después de los tratamientos, las muestras celulares fueron lavadas dos veces con buffer fosfatos.

La determinación de las DSBs del ADN se realizó a partir de la separación del ADN cromosómico de las muestras celulares utilizando electroforesis por campos pulsados transversos alternantes (TAFE).

Se cuantificaron las DSBs por análisis de los correspondientes densitogramas.

Estos procedimientos se realizaron de acuerdo a Baur (1990); Friedl et al. (1993) y Keszenman et al. (2000).

Aislamiento del ADN cromosómico

Las muestras celulares conteniendo aproximadamente 8×10^8 a 1×10^9 células/mL fueron lavadas una vez con buffer fosfato salino (PBS) (pH 7.4) y centrifugadas, el "pellet" fue procesado inmediatamente o se guardó en freezer a -20°C hasta su procesamiento. El método de aislamiento del ADN cromosómico consistió en incluir cada muestra de células en un bloque de agarosa y realizar la destrucción de los componentes celulares excepto el ADN, con diferentes reactivos. La principal ventaja de tratar el frágil ADN cromosómico de alto peso molecular en bloques de agarosa, es protegerlo de la rotura. El procedimiento se detalla en Anexo 1.

Preparación del gel vertical de corrida

Se preparó 1.75 gr de agarosa de corrida (al 1%) en 175 mL de buffer TAFE 1X y se disolvió adecuadamente en el horno de microondas.

Se enfrió la agarosa a 50°C y se volcó en el molde del gel hasta solidificar.

Se colocaron los bloques conteniendo las muestras de ADN en las hendiduras y se cubrieron con agarosa de corrida.

Se colocó el gel en forma vertical en la cubeta con buffer TAFE 1X.

Electroforesis

La separación cromosómica se realizó por electroforesis por campos pulsados transversales alternantes (TAFE) utilizando el equipo GeneLine II (Beckman).

La corrida electroforética se realiza a 9,5°C durante 20 hs en tres etapas:

Etapas 1: Duración 8 hs. Tiempo de pulso, 1 min. Corriente, 350 mA.

Etapas 2: Duración 6 hs. Tiempo de pulso, 2 min Corriente, 390 mA.

Etapas 3: Duración 6 hs. Tiempo de pulso, 3 min Corriente, 370 mA.

Tinción, decoloración y fotografía del gel

Una vez terminado el tiempo de corrida, se retiró con cuidado el gel del equipo y se colocó en el recipiente de tinción conteniendo bromuro de etidio (0.4 µg/mL) disuelto en buffer TAFE 1X durante 1 h a temperatura ambiente y protegido de la luz. Luego el gel se decoloró en buffer TAFE 1X conteniendo ribonucleasa A (1 µg/mL) (Sigma) durante 3 a 4 h a 37°C protegido de la luz.

Posteriormente se colocó el gel en un transiluminador UV y se fotografió en forma digital.

Análisis de la separación cromosómica y cuantificación de DSBs

El análisis de las bandas de ADN se realizó mediante el software ImageJ (NIH, EE. UU.) según Bracesco et al. (2018).

El cálculo del número de DSBs por genoma haploide se basa en la distribución de Poisson de acuerdo a la ecuación:

$$\text{DSBs} = -\ln I_x / I_0$$

Donde I_0 representa la integral del pico de Intensidad para el control e I_x para la muestra tratada (Baur, 1990; Geigl y Eckardt-Schupp, 1991).

Las soluciones utilizadas en este estudio se detallan en Anexo 2.

Análisis por Western Blot.

Extracción de proteínas desnaturalizadas de levadura (Kushnirov, 2000).

Luego de realizar los tratamientos tanto simples como combinados, las muestras se centrifugaron para obtener un pellet de aproximadamente 1×10^9 células. Se realizaron dos lavados con agua helada y se resuspendieron en 2 mL de H₂O y se añadió el mismo volumen de NaOH 0,2M. A continuación, se incubó 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó por 5 min a 5000 rpm y se removió el sobrenadante cuidadosamente para luego añadir 50µL de buffer de muestra SDS-PAGE. Se almacenó a -20°C hasta el día en que se realizó la técnica de Western Blot. Luego se transfirieron las muestras en buffer a tubos Eppendorf y se calentó la muestra a 95°C por 3 min. A continuación se centrifugó 30 seg a 13000 rpm. Se traspasó el sobrenadante a otro Eppendorf y se agregaron 6 µL de buffer de muestra al 8X para luego analizar 20 µL por SDS-PAGE/Western-Blot. Se trabajó de forma que todos los carriles estuvieran cargados con la misma cantidad de proteína. Se preparó tanto el gel separador como el gel de stacking de la forma apropiada al

tamaño de la proteína en estudio (43 KD). La composición de los geles se detalla en Anexo 3.

Se realizaron dos geles que fueron cargados con la misma cantidad de proteínas. Los geles fueron cargados con 20 μ L de muestra y se cargó 2 μ L de peso molecular (Thermo Scientific 26616). Se realizó la electroforesis a 110 V fijo y amperaje libre durante un tiempo de hora y media. Para confirmar tanto que la electroforesis se había realizado correctamente como que la concentración de proteínas en cada carril era igual se realizó la tinción con Azul Coomassie en uno de los geles. El gel restante se utilizó para realizar la transferencia de proteínas.

Transferencia (Bollag et al., 1996).

1. Se recortaron las membranas de nitrocelulosa de un tamaño adecuado a las dimensiones del gel
2. Se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (LICOR, Biosciences) "over night" a 20 Volts a 4 °C.
3. Se lavó la membrana con PBS-Tween (0.1%).
4. Se realizó la confirmación de la correcta transferencia, revelando con Rojo Ponceau.

Conjugación con anticuerpos

1. Se bloquearon las membranas con buffer de bloqueo (PBS-Tween + 5% leche descremada en polvo) y se mantuvo en agitación por 1 hora.
2. Se lavaron 2 veces 10 min c/u con PBS-Tween asegurándose de sacar toda la leche.
3. Se incubaron las membranas con el anticuerpo primario correspondiente en TBS-T toda la noche, en agitación a 4°C.

4. El anticuerpo utilizado fue Anti-Rad14 (ab43577) de Abcam y se utilizó en una dilución de 1/1000.
5. Una vez terminada la incubación con el anticuerpo primario se realizaron dos lavados con PBS-Tween de 10 min cada uno en agitación.
6. A continuación la membrana se incubó 1h en agitación con el anticuerpo secundario en PBS-Tween.
7. El anticuerpo secundario utilizado fue Goat anti- Mouse IRDye® 800 CW (926-32210) de LI-COR y se utilizó en una dilución de 1/15000.
8. Una vez terminada la incubación con el anticuerpo secundario se realizaron dos lavados con PBS-Tween de 10 min cada uno en agitación.
9. Por último se visualizaron las inmunotransferencias con Odyssey (LI-COR Biosciences) y se analizaron con Image Studio Lite (LI-COR Bioscience).

Análisis estadístico.

La distribución binomial se aplicó al cálculo de los desvíos standard y errores standard en caso de los eventos binomiales: muerte – sobrevida y mutación – no mutación.

La distribución de Poisson se aplicó al cálculo y análisis del número de roturas dobles inducidas en el genoma.

Además se utilizó el test de t de comparación de dos medias independientes para estudiar si existían diferencias significativas entre los valores promedio de fracción de sobrevida y frecuencia mutagénica en las diferentes poblaciones estudiadas.

Y se utilizó ANOVA de una vía para la comparación de 3 medias independientes en el estudio de fracción de sobrevida y frecuencia mutagénica.

Para comparar las intensidades relativas de las bandas obtenidas en el Wester Blot se calculó el intervalo de confianza utilizando la distribución de T con 2 grados de libertad.

5. RESULTADOS:

5.1 CURVA DE SOBREVIDA CELULAR A CONCENTRACIONES CRECIENTES DE

Bp

Frente a la exposición de las diferentes alícuotas del cultivo celular a concentraciones crecientes de Bp (10ng/mL-250ng/mL) se observó una disminución significativa de la fracción de supervivencia (Tabla 3, Figura 8).

Muestra	Fracción de supervivencia (Sx)	IC _{95%}
Control	1,00	±0,01
Bp(10ng/mL)	0,93	±0,02
Bp(25ng/mL)	0,83	±0,02
Bp(50ng/mL)	0,73	±0,03
Bp(100ng/mL)	0,64	±0,03
Bp(200ng/mL)	0,54	±0,03
Bp(250ng/mL)	0,46	±0,03

Tabla 3. Fracción de supervivencia en función de dosis crecientes de Bp en la cepa SC7 klys.

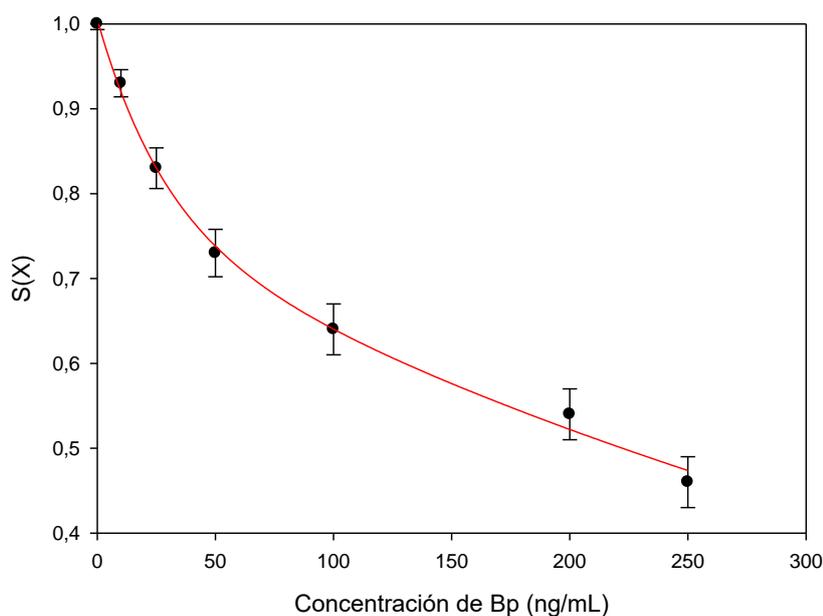


Figura 8: Fracción de sobrevivencia ($S(x)$) en función de concentraciones crecientes de Bp en la cepa SC7 klys con un ajuste exponencial decreciente doble, con 4 parámetros ($y=a.e^{(-b.x)}+c.e^{(-d.x)}$) ($p \leq 0.05$).

5.2 CURVA DE SOBREVIVENCIA CELULAR A CONCENTRACIONES CRECIENTES DE Ban.

Frente a la exposición de las diferentes alícuotas del cultivo celular a concentraciones crecientes de Ban (10ng/mL-250ng/mL) se observó una disminución significativa de la fracción de sobrevivencia (Tabla 4, Figura 9).

Muestra	Fracción de sobrevivencia (S_x)	IC _{95%}
Control	1,00	$\pm 0,01$
Ban(10ng/mL)	0,92	$\pm 0,02$
Ban(25ng/mL)	0,85	$\pm 0,02$
Ban(50ng/mL)	0,75	$\pm 0,03$
Ban(100ng/mL)	0,66	$\pm 0,03$
Ban(200ng/mL)	0,58	$\pm 0,03$
Ban(250ng/mL)	0,47	$\pm 0,03$

Tabla 4. Fracción de sobrevivencia en función de dosis crecientes de Ban en la cepa SC7 klys.

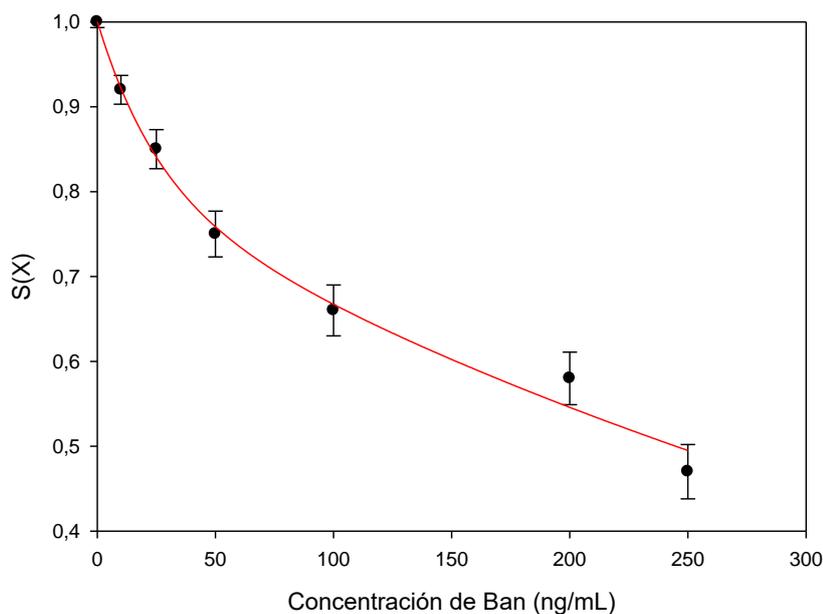


Figura 9: Fracción de supervivencia ($S_{(x)}$) en función de concentraciones crecientes de Ban en la cepa SC7 klys con un ajuste exponencial decreciente doble, con 4 parámetros ($y=a.e^{-b.x}+c.e^{-d.x}$) ($p \leq 0.05$)

5.3 FRACCION DE SOBREVIDA CELULAR EN TRATAMIENTOS SIMPLES Y COMBINADOS.

En el caso de las muestras tratadas con la mezcla de Bp y Ban no hubo diferencia significativa en la fracción de supervivencia celular con respecto a las muestras tratadas con los agentes de forma individual. A su vez, en los tratamientos concomitantes con los HAP's y con el ácido clorogénico se observó una disminución de la letalidad celular (Tabla 5, Figura 10).

Muestra	Fracción de sobrevivencia (Sx)	IC _{95%}
Control	1,00	±0,01
Ac. clorogénico (ACl)	1,00	±0,01
Bp	0,49	±0,03
Ban	0,48	±0,03
Bp/Ban	0,47	±0,03
Bp/ACl	0,89	±0,02
Ban/ACl	0,90	±0,02
Bp/Ban/ACl	0,91	±0,02

Tabla 5: Fracción de sobrevivencia en tratamientos simples con Bp, Ban y Bp/Ban y combinados con Bp/ACl, Ban/ACl y Bp/Ban/ACl en la cepa SC7 klys.

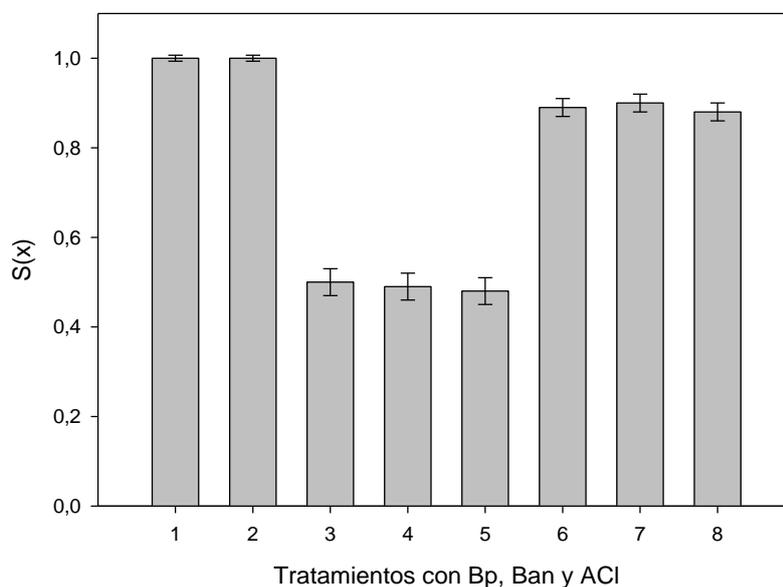


Figura 10: Diagramas de barras que muestran la fracción de sobrevivencia (Sx) en tratamientos simples y combinados.

1, Control; 2, Ácido clorogénico; 3, Bp, 4, Ban; 5, Bp/Ban; 6, Bp/ACl; 7, Ban/ACl; 8, Bp/Ban/ACl ($p \leq 0.05$)

5.4 FRACCION DE SOBREVIVENCIA CELULAR EN TRATAMIENTOS SIMPLES Y COMBINADOS EN LAS CEPAS SX46 A y SX46 A rad14Δ .

Con respecto a la fracción de sobrevivencia celular tanto la cepa salvaje para la proteína Rad14 como la cepa mutante responden al tratamiento con los HAP's con una disminución significativa. En la cepa mutante se observa una mayor letalidad que en la salvaje, aproximadamente un 50% menos de sobrevivencia celular con respecto a la

cepa salvaje. En los tratamientos concomitantes con HAP's y ACl se observó una marcada disminución de la letalidad en las dos cepas. (Tabla 6, Figura 11)

Muestra	(Sx) SX46 A	IC _{95%}	(Sx) SX46 A radl4Δ	IC _{95%}
Control	1,00	±0,01	1,00	±0,01
ACl	1,00	±0,01	1,00	±0,01
Bp	0,31	±0,03	0,16	±0,02
Ban	0,32	±0,03	0,17	±0,02
Bp/Ban	0,34	±0,03	0,17	±0,02
Bp/ACl	0,86	±0,02	0,84	±0,02
Ban/ACl	0,90	±0,02	0,91	±0,02
Bp/Ban/ACl	0,86	±0,02	0,90	±0,02

Tabla 6: Fracción de sobrevivida en tratamientos simples con Bp, Ban y Bp/Ban y combinados con Bp/ACl, Ban/ACl y Bp/Ban/ACl en cepas SX46 A y SX46 A radl4Δ.

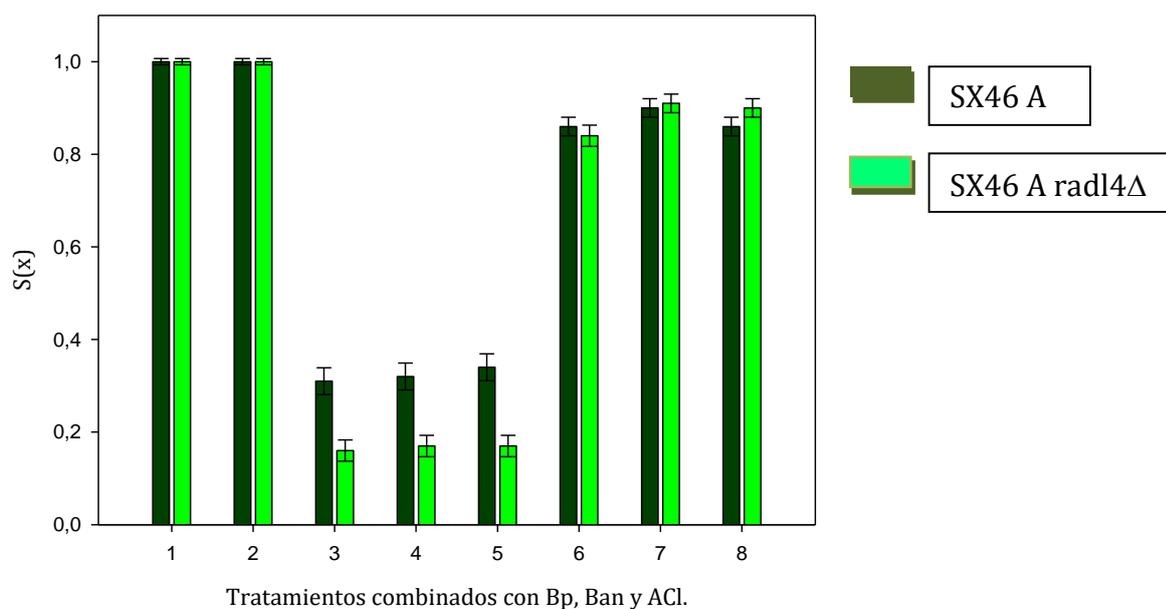


Figura 11: Diagramas de barras que muestran la fracción de sobrevivida (Sx) en tratamientos simples y combinados para las cepas SX46 A y SX46 A radl4Δ. 1, Control; 2, Ácido clorogénico; 3, Bp; 4, Ban; 5, Bp/Ban; 6, Bp/ACl; 7, Ban/ACl; 8, Bp/Ban/ACl ($p \leq 0.05$).

5.5 FRECUENCIA MUTAGENICA.

Se estudió la mutagénesis inducida por Bp y Ban a través del análisis de la reversión del marcador de auxotrofia a heterotrofia *lys* *LYS* en la cepa SC7K *lys*.

5.5.1 FRECUENCIA MUTAGÉNICA A CONCENTRACIONES CRECIENTES DE Bp

En el análisis de frecuencia mutagénica a concentraciones crecientes de Bp se observó un aumento significativo de la misma (Tabla 7, Figura 12).

Muestra	Frecuencia mutagénica	IC _{95%}
Control	3,75e ⁻⁶	±3,87e ⁻⁷
Bp(10ng/mL)	7,68e ⁻⁶	±5,54e ⁻⁷
Bp(25ng/mL)	1,20e ⁻⁵	±6,90e ⁻⁷
Bp(50ng/mL)	1,53e ⁻⁵	±7,82e ⁻⁷
Bp(100ng/mL)	2,24e ⁻⁵	±9,46e ⁻⁷
Bp(200ng/mL)	2,64e ⁻⁵	±1,02e ⁻⁶
Bp(250ng/mL)	3,09e ⁻⁵	±1,11e ⁻⁶

Tabla 7: Frecuencia mutagénica en función de concentraciones crecientes de Bp en la cepa SC7 *klys*.

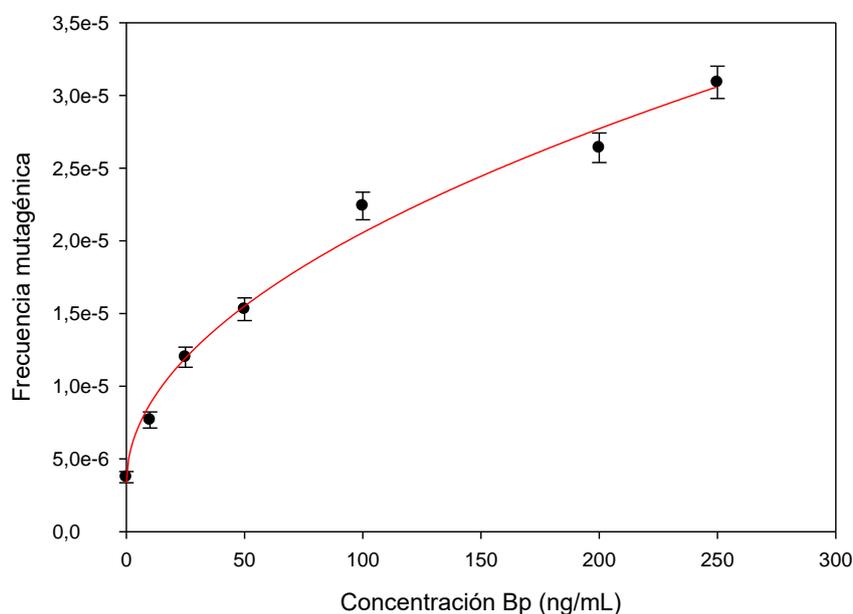


Figura 12: Frecuencia mutagénica en función de concentraciones crecientes de Bp en la cepa SC7 *klys* ajustándose a un modelo con 3 parámetros ($y=y_0+a.x^b$) ($p \leq 0.05$).

5.5.2 FRECUENCIA MUTAGÉNICA A CONCENTRACIONES CRECIENTES DE Ban.

En el análisis de la frecuencia mutagénica en función de concentraciones crecientes de Ban también se observó un aumento significativo de la misma (Tabla 8, Figura 13).

Muestra	Frecuencia mutagénica	IC _{95%}
Control	3,29e ⁻⁶	±3,62e ⁻⁷
Ban(10ng/mL)	8,32e ⁻⁶	±5,77e ⁻⁷
Ban(25ng/mL)	1,03e ⁻⁵	±6,42e ⁻⁷
Ban(50ng/mL)	1,48e ⁻⁵	±7,70e ⁻⁷
Ban(100ng/mL)	2,21e ⁻⁵	±9,40e ⁻⁷
Ban(200ng/mL)	2,95e ⁻⁵	±1,08e ⁻⁶
Ban(250ng/mL)	3,39e ⁻⁵	±1,16e ⁻⁶

Tabla 8: Frecuencia mutagénica en función de concentraciones crecientes de Ban en la cepa SC7 klys.

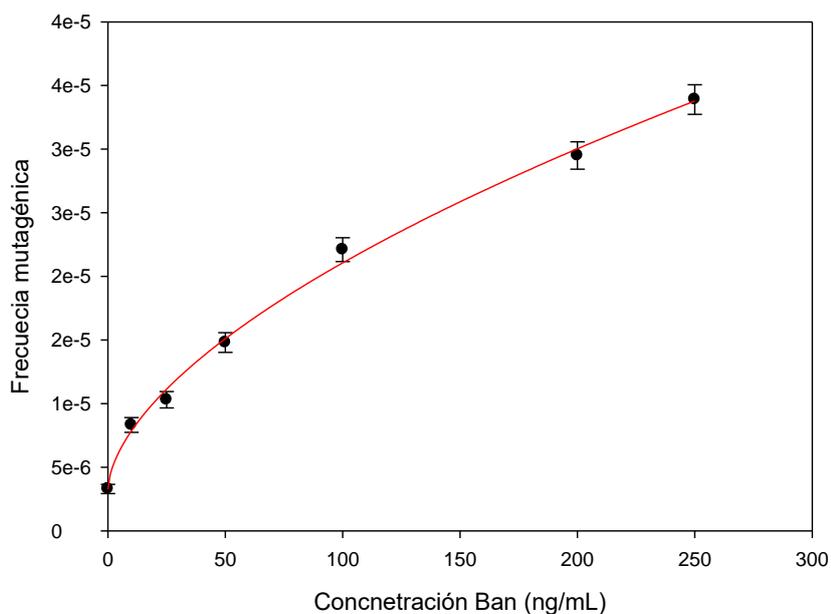


Figura 13: Frecuencia mutagénica en función de concentraciones crecientes de Ban en la cepa SC7 klys ajustándose a un modelo con 3 parámetros ($y=y_0+a.x^b$) ($p \leq 0.05$).

5.5.3 FRECUENCIA MUTAGÉNICA EN TRATAMIENTOS SIMPLES Y COMBINADOS.

Se estudió, la mutagénesis inducida por el ACl observándose que no existe un aumento significativo de la tasa de mutación espontánea. Por otro lado, en los tratamientos concomitantes con los HAP's y con el ACl se observó una disminución de la frecuencia mutagénica. (Tabla 9, Figura 14).

Muestra	Frecuencia mutagénica	IC _{95%}
Control	6,38e ⁻⁶	±5,05e ⁻⁷
Ac. clorogénico (ACl)	6,39e ⁻⁶	±5,05e ⁻⁷
Bp	2,32e ⁻⁵	±9,63e ⁻⁷
Ban	2,54e ⁻⁵	±1,00e ⁻⁶
Bp/Ban	3,02e ⁻⁵	±1,10e ⁻⁶
Bp/ACl	1,05e ⁻⁵	±6,48e ⁻⁷
Ban/ACl	1,10e ⁻⁵	±6,63e ⁻⁷
Bp/Ban/ACl	1,00e ⁻⁵	±6,32e ⁻⁷

Tabla 9: Frecuencia mutagénica en tratamientos simples con Bp, Ban y Bp/Ban y combinados con Bp/ACl, Ban/ACl y Bp/Ban/ACl en la cepa SC7 klys

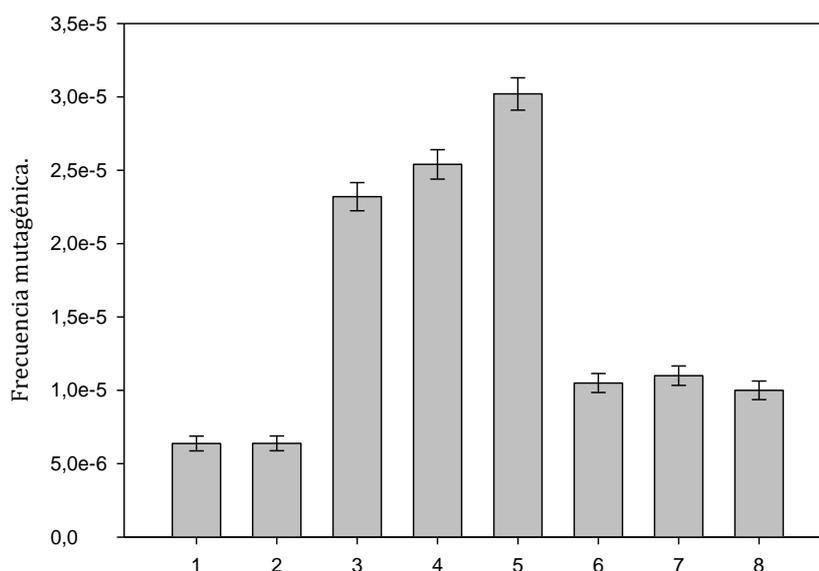


Figura 14: Diagramas de barras que muestran frecuencia mutagénica en tratamientos simples y combinados. 1, Control; 2, Ácido clorogénico; 3, Bp; 4, Ban; 5, Bp/Ban; 6, Bp/ACl; 7, Ban/ACl; 8, Bp/Ban/ACl. ($p \leq 0.05$)

5.6 ANÁLISIS DE DOBLES ROTURAS DE ADN.

Al realizar la electroforesis por campos pulsados alternados (TAFE) se observó que en ninguna de las muestras analizadas se produjo dobles roturas a nivel cromosómico.

Esto puede observarse en la corrida electroforética (Figure 15) y al comparar los perfiles densitográficos obtenidos para cada muestra (Figure 16 y 17), así como al analizar cuantitativamente las intensidades relativas correspondientes a los cromosomas de mayor tamaño (Tabla 10) (Friedl et al., 1998).

Como se mencionó en métodos se realizaron los cálculos de DSBs por genoma según la distribución de Poisson de acuerdo a la ecuación:

$$\text{DSBs} = -\ln I_x / I_0$$

Los datos obtenidos indican que a la concentración utilizada para los experimentos (250 ng/mL), los daños que se producen en el genoma no implican la aparición de dobles roturas en la hebra de ADN (Tabla 10).

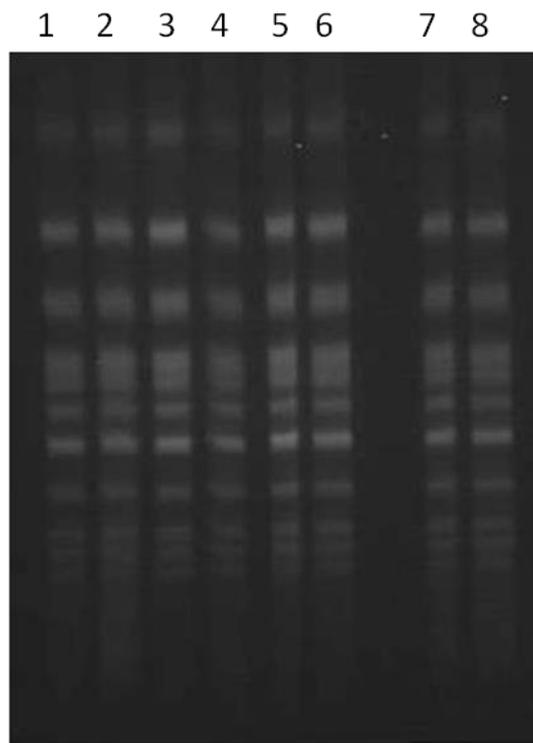


Figura 15: Separación de cromosomas realizada por electroforesis en gel por campos pulsados alternados (TAFE). 1, Control; 2, ACI; 3, Bp; 4, Ban; 5, Bp/Ban; 6, Bp/ACI; 7, Ban/ACI; 8, Bp/Ban/ACI

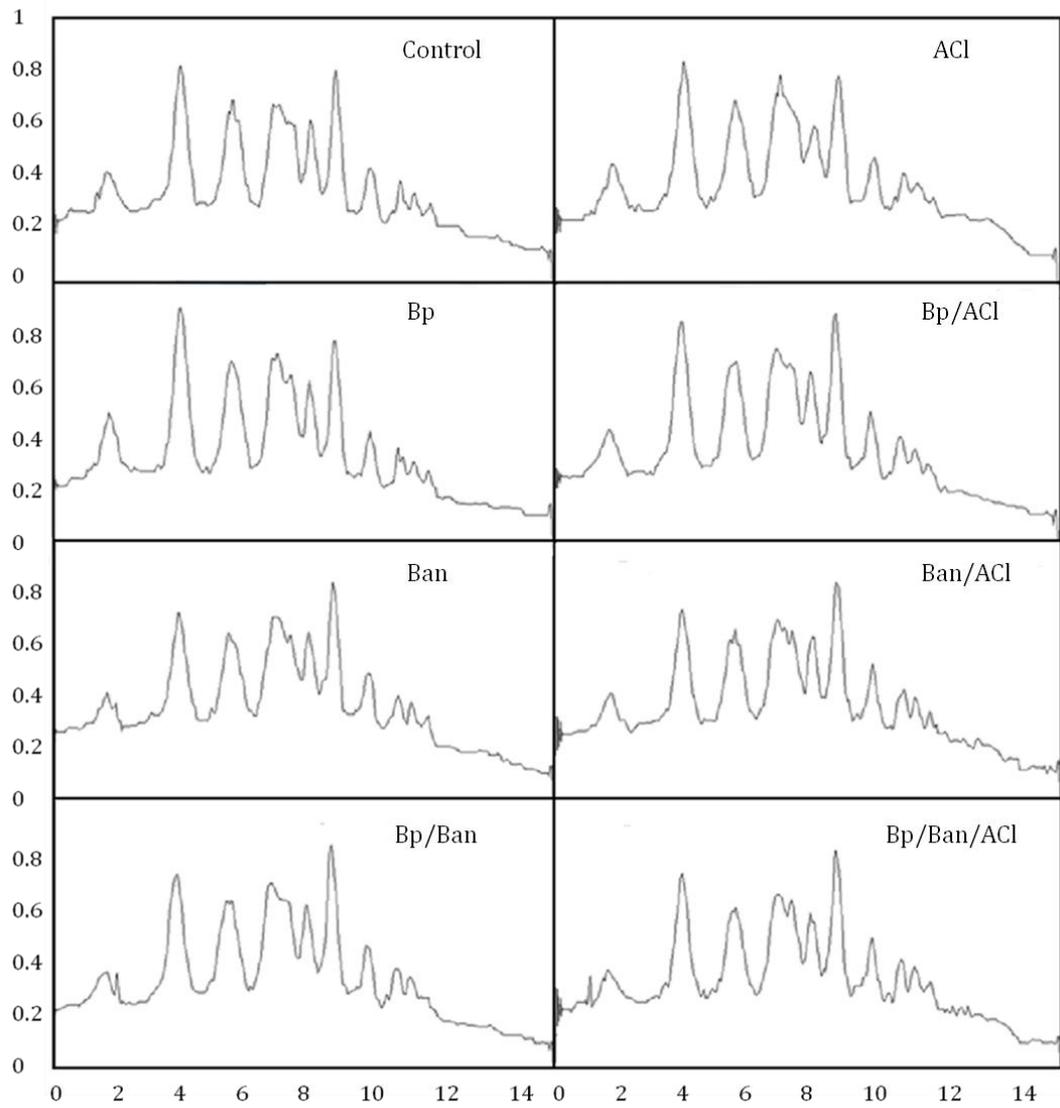


Figura 16: Densitogramas (intensidad en unidades relativas en función de la distancia de migración en centímetros).

Muestra	DSBs/genoma	IC
Control	0	
ACI	0.09	±0.30
Bp	0.16	±0.40
Ban	0.13	±0.36
Bp/Ban	0.04	±0.20
Bp/ACI	0.16	±0.40
Ban/ACI	0.25	±0.50
Bp/Ban/ACI	0.01	±0.07

Tabla 10: Dobles roturas de ADN por genoma en tratamientos en tratamientos simples con Bp, Ban y Bp/Ban y combinados con Bp/ACI, Ban/ACI y Bp/Ban/ACI en la cepa SC7 klys

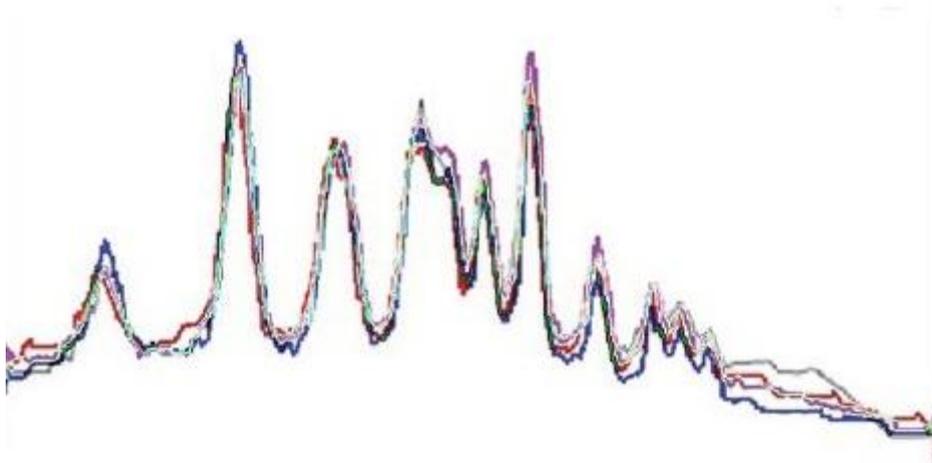


Figura 17: Superposición de los perfiles del control (Rojo), del ACI (Negro), del Bp (Azul) y de Bp/ACI (Fucsia).

5.7 EXPRESION DE LA PROTEÍNA Rad14.

La extracción de proteínas y la transferencia de proteínas se confirmaron al teñir el gel con Azul de Coomassie (Figura 18) y la membrana de transferencia con rojo Ponceau. Con esto también verificamos que la concentración de proteínas en todos los carriles fuera igual, de manera de poder definir que las diferencias observadas se deban a una modulación en la expresión de la proteína.

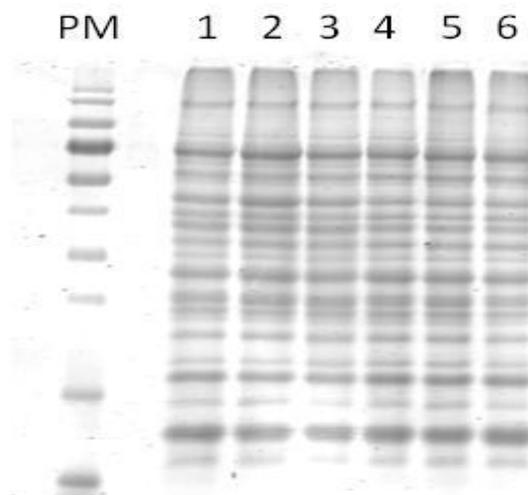


Figura 18: Gel teñido con Azul de Coomassie. 1, Control; 2, ACl; 3, Bp; 4, Ban; 5, Bp/Ban; 6, Bp/ACl

Al realizar el análisis de Western Blot (WB) con un anticuerpo específico de Rad14 se observaron bandas muy tenues del peso molecular de la proteína en estudio en las condiciones control (carril 1 y 2). En los carriles correspondientes a los tratamientos con Bp y Ban (carriles 3 y 4) se observan bandas de mayor intensidad también en el peso molecular para la proteína en estudio, este aumento en la intensidad de la banda estaría indicando que dicha proteína se sobre expresa en estas condiciones. Para el caso del tratamiento con la mezcla de HAP's (Bp/Ban) no se encontraron diferencias significativas con las muestras control lo cual estaría mostrando que en presencia de estos agentes combinados no existiría una sobre expresión de la proteína Rad 14.

En el caso del tratamiento combinado de Bp y ACl (carril 6) puede observarse una disminución en la intensidad de la banda lo cual indicaría que en estas condiciones la expresión de la proteína en estudio disminuye al compararla con los tratamientos con Bp y Ban (Figura 19).

Acompañando al estudio cualitativo se realizó también una cuantificación de la diferencia de intensidades relativas de las bandas (Figura 20).

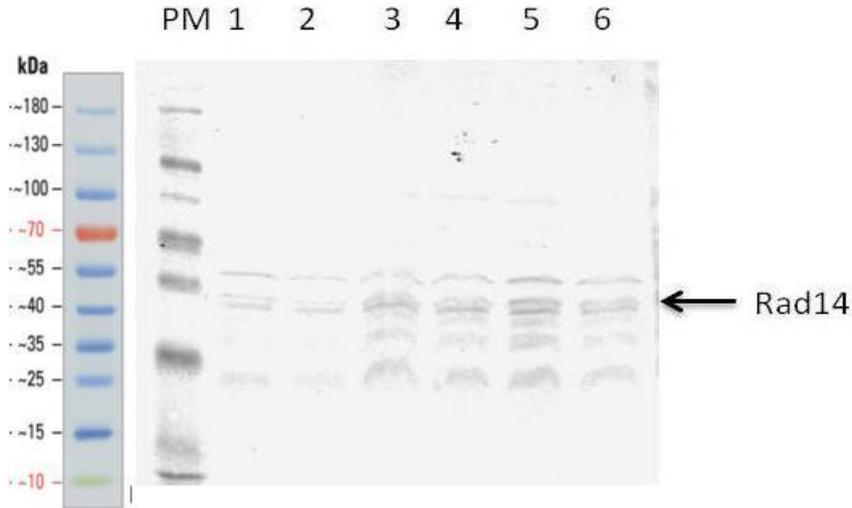


Figura 19: Análisis de WB (Anti-Rad14) en muestras de la cepa SC7 klys con tratamientos combinados: 1, Control; 2, ACI; 3, Bp; 4, Ban; 5, Bp/Ban; 6, Bp/ACI. La flecha marca la altura del peso molecular donde se observa la proteína Rad 14.

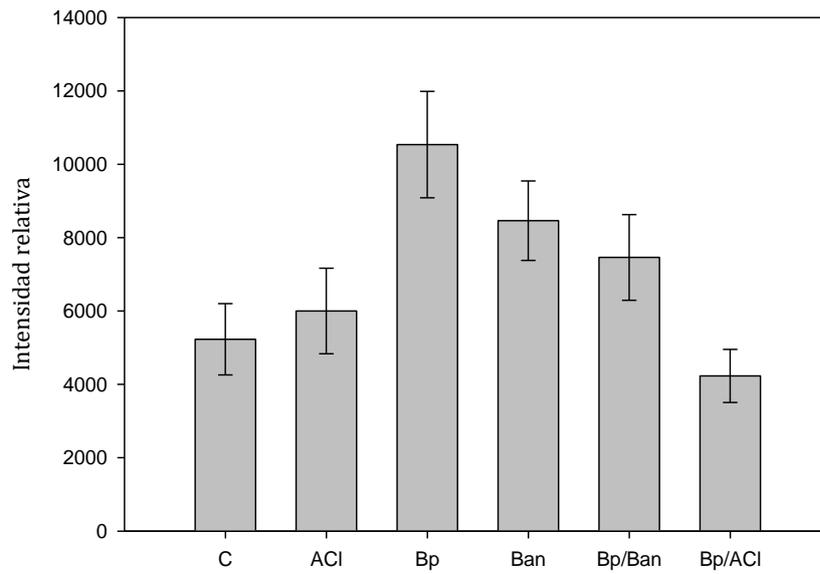


Figura 20: Intensidades Relativas de la banda correspondiente a Rad14 del WB en cada muestra. 1, Control; 2, ACI; 3, Bp; 4, Ban; 5, Bp/Ban; 6, Bp/ACI ($p \leq 0.05$).

6. DISCUSIÓN.

En el presente trabajo se observó un aumento de la letalidad celular con respecto a las curvas de sobrevivencia en función de concentraciones crecientes de Bp y Ban.

La relación entre las variables en estudio fue de tipo exponencial decreciente doble, con 4 parámetros ($y=a.e^{(-b.x)}+c.e^{(-d.x)}$) con un coeficiente de ajuste igual a $R=0,99$ tanto para el tratamiento con Bp como para el tratamiento con Ban (Figuras 8 y 9 respectivamente). Al analizar las fracciones de sobrevivencia celular para concentraciones iguales de Bp y Ban y tomando en cuenta los intervalos de confianza binomiales así como la comparación a través del test de t no se observan diferencias significativas entre la capacidad de letalidad de los dos genotóxicos. En los análisis de sobrevivencia realizados en tratamientos simples y combinados se pudo observar una disminución significativa de la letalidad celular en los tratamientos concomitantes con HAP's y ACl (Figura 10).

Cuando el análisis de fracción de sobrevivencia se realizó en cultivos de una cepa deficiente en la proteína Rad14 se observó una disminución de la fracción de sobrevivencia en las muestras tratadas con HAP's como único agente en comparación con la muestra control. Por otro lado, cuando el tratamiento fue en combinación con HAP's y ACl se observó una disminución significativa de la letalidad (Figura 11). Es importante resaltar que la fracción de sobrevivencia no se alteró significativamente en los tratamientos con ACl como único agente en comparación con la muestra control. Cuando se realizaron estudios de frecuencia mutagénica en función de concentraciones crecientes de Bp y Ban en la cepa haploide SC7 klys se observó un aumento significativo ajustándose a un modelo con 3 parámetros ($y=y_0+a.x^b$) y presentando un coeficiente de ajuste de $R= 0,99$ tanto para los tratamientos con Bp

como para los tratamientos con Ban (Figura 12 y 13 respectivamente). En los tratamientos combinados al comparar el nivel de frecuencia mutagénica entre los tratamientos con los HAP's como único agente (Bp vs Ban vs Bp/Ban) se observa que la muestra tratada con Bp/Ban presenta una mayor frecuencia mutagénica. Se observó además que la frecuencia de mutación espontánea no se alteró significativamente en el tratamiento control con ACl como único agente a la concentración de trabajo. Así mismo se observó una disminución significativa de la fracción mutagénica en los tratamientos combinados con HAP's y ACl (Figura 14).

Los aductos formados por los productos reactivos de los HAP's son procesados en su mayoría a través de la vía NER, la cual como se mencionó anteriormente es una vía de reparación libre de error. Por lo tanto el nivel de frecuencia mutagénica que presentan las muestras tratadas con los agentes mutagénicos puede deberse a que otras vías de reparación propensas a error están procesando parte de las lesiones producidas. La generación de la frecuencia mutagénica observada puede basarse en que parte de las lesiones se procese a través de la vía TLS (Prakasha Gowda et al. 2017). Cuando la célula ingresa en la fase S la presencia de aductos voluminosos en el ADN inhiben las polimerasas de alta fidelidad, bloquean las horquillas de replicación que conducirían a la muerte celular y la vía TLS (dependiente de RAD6) recluta al lugar donde la replicación se estancó polimerasas de baja fidelidad (Prakasha Gowda A. S. et al. 2017). Sería importante estudiar a futuro como se modulan las proteínas vinculada a estas vías de reparación frente a la exposición de HAP's.

En cuanto al análisis del fraccionamiento cromosómico los datos muestran que a la concentración de los HAP's utilizada en este trabajo no se generan dobles roturas de ADN con lo cual no se pudo evaluar si el ACl presenta alguna acción protectora

contra este tipo de daño. Esta afirmación surge del estudio de la relación entre las amplitudes de los picos así como la relación de la distancia recorrida en las abscisas para los diferentes picos. Al no existir diferencias significativas entre estas medidas se puede descartar la posibilidad de una adhesión entre los fragmentos de ADN (“pegoteo”) que no permitiera evidenciar la fragmentación (Figura 16, tabla 10).

Un punto a evaluar en este estudio es el tiempo de incubación utilizado para el tratamiento con los agentes. Al ser una incubación de una hora existe la posibilidad de que las dobles roturas se produzcan y sean reparadas eficientemente durante el tiempo de incubación a la concentración utilizada en los experimentos. Existen trabajos anteriores no publicados realizados en el laboratorio de Radiobiología de Facultad de Medicina de la UdelaR que utilizaron un tiempo de incubación de 40 minutos dando resultados donde no se observaban diferencias ni en la fracción de sobrevivida ni en la frecuencia mutagénica de las muestras tratadas con el compuesto Bp y la muestra control. Las levaduras que se reproducen por gemación presentan una diferencia en la duración de la fase G1 entre la célula hija y la célula madre. Las células hijas tienen una fase G1 de mayor duración si la comparamos con la duración del resto de las fases mientras que la duración de la fase G1 en las células madres es aproximadamente igual al resto de las fases (Morgan, 2007; Brauer et al. 2008; Blank et al. 2018) eso implica que muchos de los individuos que conforman el cultivo celular durante la hora de incubación se encontraran transitando por esta fase. En levaduras haploides la reparación de dobles roturas en la fase pre-replicativa se realiza a través de la Unión de Extremos no Homólogos la cual como se explicó en la introducción es una vía de reparación propensa a error (Bracesco et al., 2003). Esto implicaría que en los trabajos con incubación de 40 minutos si hubiera habido DSBs reparadas debería de verse una cierta frecuencia mutagénica mayor a la frecuencia

de base dada en el control. Tomando en cuenta estos datos preliminares y que existe un tiempo en el cual se debe producir la inducción de las enzimas que serán las responsables de la metabolización de estos compuestos el tiempo de incubación seleccionado para la realización de los experimentos debía ser mayor a los 40 minutos usados inicialmente.

Para poder discernir la probabilidad de que las dobles roturas no puedan ser observadas debido al tiempo de incubación donde pueda darse la reparación de las mismas sería conveniente realizar la técnica de TAFE a diferentes tiempos de incubación. Otro tema importante en el análisis de las DSBs es el tiempo transcurrido entre la finalización de la incubación y el almacenamiento de las muestras en el freezer. En todos los casos el tiempo transcurrido no supero las 2 h mientras se realizaban las siembras de sobrevida y mutagénesis y en ese tiempo las células se mantuvieron en agua a temperatura ambiente. Existen trabajos donde se pudo ver que la probabilidad de reparación en células mantenidas en medio sin nutrientes (liquid holding) presenta un retardo significativamente mayor a 2h (Nunes, 1968; Giannattasio et al., 2004; Nunes et al., 2008).

Tanto los datos obtenidos, que muestran una disminución en la letalidad celular y en la frecuencia mutagénica en presencia de ACl, así como las observaciones que muestran que no se altera la sobrevida ni la frecuencia mutagénica espontánea en presencia de ACl como único agente, están en sintonía con el comportamiento de otros polifenoles referenciados en la bibliografía consultada (Vyas et al.; 2007; Baumeister et al., 2008; Malhotra et al., 2012; Bracesco, 2003; Bracesco et al., 2003). Los resultados de este trabajo indican que el ACl, a una concentración igual a la encontrada en la infusión de yerba mate, tuvo un efecto protector significativo

contra el daño producido por los HAP's en poblaciones celulares haploides de *S. cerevisiae*.

En aquellas muestras que fueron tratadas con Bp y Ban como únicos agentes en el análisis de Western Blot, se observó un aumento en la expresión de la proteína Rad14, uno de los pasos cruciales en la activación de la vía NER. Para el caso del tratamiento con la mezcla de HAP's (Bp/Ban) no se encontraron diferencias significativas con las muestras control lo cual estaría mostrando que en presencia de estos agentes combinados no existiría una sobre expresión de la proteína Rad 14. En las muestras que fueron tratadas con HAP's y ACl, se observó una disminución de la expresión de la proteína Rad14 lo cual indicaría que las distorsiones provocadas en el ADN por los HAP's han sido inhibidas (Figura 19 y 20).

Si se toma en conjunto los datos obtenidos de frecuencia mutagénica y el resultado en el Western blot para aquellas muestras tratadas con la combinación de Bp/Ban se podría pensar que en la reparación de las lesiones producidas por la mezcla de estos compuestos se activan vías muagénicas por sobre vías libres de error. La distorsión que provocan estos compuestos combinados en la hélice de ADN puede no ser reconocida correctamente por la proteína Rad 4 y por lo tanto la proteína Rad 14 no sería reclutada hacia el lugar de la lesión, no dándose en este caso una modulación positiva de su expresión. De esta manera la vía que podría estar procesando estos daños sería la vía TLS. Como ya hemos mencionado los HAP's provocan daño en el ADN al ser activados a través de las reacciones de metabolización por las enzimas de citocromo P450. Los productos diol-epóxidos que se producen en estas reacciones se podrían unir covalentemente a las bases del ADN produciendo una gran distorsión espacial de la doble hebra.

7. CONCLUSIÓN

El ácido clorogénico disminuye la actividad mutagénica producida por los HAP's, la cual no se encuentra relacionada con un incremento en la remoción de las lesiones inducidas por el sistema NER

8. PERSPECTIVAS.

Dado que los resultados obtenidos en este trabajo indican que el ACl presenta capacidad protectora frente a los daños inducidos por HAP's usando *S. cerevisiae* como modelo eucariótico sería importante realizar estudios donde se intente clarificar cual es el mecanismo de interacción o de modulación que se da a través de la acción del ACl.

Dado la existencia de trabajos donde se indica que existe una acción quimioprotectora de ciertos compuestos fitoquímicos asociada a mecanismos tales como: a) inhibición de la activación metabólica de ciertos genotóxicos b) prevención de la interacción de los metabolitos reactivos con el ADN celular, c) potenciación de la desintoxicación de metabolitos reactivos (Bertram et al., 1987; Teel y Huynh, 1998; Mikstacka et al., 2002).

Es posible plantear a futuro, estudios como:

- La modulación de la expresión de las enzimas de metabolización del citocromo P450 en presencia de ACl.
- La cinética enzimática de la metabolización de los HAP's en presencia y ausencia de ACl.
- Capacidad del ACl como atrapador de especies reactivas como la formas diol-epóxido de los HAP's.
- Posible inhibición por el ACl de la actividad de las enzimas del citocromo P450 responsables de metabolizar estos compuestos.
- Modulación de la expresión de las proteínas vinculas con la vía de reparación TLS en presencia de los HAP's combinados.

9. BIBLIOGRAFÍA.

Abdel-Shafy H.I.; Mansour Mona S.M. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egypt J Petrol*, 25: 107-123. (2016).

Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR). Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Atlanta, GA, US. (1995).

Ager D.D., Haynes R.H. Quantitative aspects of the interactive killing effects between X rays and other mutagens in microorganisms. *Radiat Res.*; 115: 124-140. (1988).

Agudo A. Los HAP's. Acercamiento a su problemática como riesgo laboral [monografía en Internet]*. España: UGT Comisión Ejecutiva Confederal. Dirección electrónica:
<http://www.ugt.es/saludlaboral/Hidrocarburos.pdf>. (2010).

Andersen O.M., Markham K.R. Flavonoids. Chemistry, biochemistry and applications. By Taylor & Francis Group, LLC. (2006).

Anderson K.E., Kadlubar F.F., Kulldorff M., Harnack L., Gross M., Lang N.P., Barber C., Rothman N., Sinha R. Dietary intake of heterocyclic amines and benzo[a]pyrene: associations with pancreatic cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 14:2261–2265. (2005).

Apatiga-Vega E., Rivera-Rosales R.M., Calderon-Ezquerro M.C., Arenas-Huertero F. Expresión de los genes de la vía del aril-hidrocarburo (ahr) en pulmones de habitantes fumadores y no fumadores de México. *Inv. Univ. Multidisciplinaria*, 9: 77-84. (2010).

- Barbeau D.**, Persoons R., Marques M., Herve C., Laffitte-Rigaud G., Maitre A. Relevance of urinary 3 hydroxybenzo(a)pyrene and 1-hydroxypyrene to assess exposure to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures in metallurgy workers. *Ann Occup Hyg*, 58: 579-590. (2014).
- Barrios E.**, Garau M. Cáncer: magnitud del problema en el mundo y en Uruguay, aspectos epidemiológicos. *AnFaMed*, 4: 9-47. (2017).
- Basheer L.** and Kerem Z. Interactions between CYP3A4 and dietary polyphenols. *Oxid Med Cell Longev*. 854015. (2015).
- Bastos D.H.**, Fornari A.C., Queiroz Y.S., Soares R.A., Torres. The chlorogenic acid and caffeine content of yerba maté (*Ilex paraguariensis*) beverages. *Acta Farm Bonaerense*, 24: 91-95. (2005).
- Baumeister P.**, Reiter M., Zieger S., Matthias C., Harréus U. [DNA-protective potential of polyphenols in human mucosa cell cultures]. *HNO*. 56(8):795-8. doi: 10.1007/s00106-008-1671-8. (2008).
- Baur M.** Analyse der Rolle von Glutathion bei der Induktion und Reparatur von Doppelstrangbrueche mit Hilfe der Pulsfeld-Gelelektrophorese in Hefe. PhD Thesis. Biology Faculty L-Maximilians University Munich Alemania. (1990)
- Bermudez M.** Contaminación y turismo sostenible. CETD SA. (2010).
- Bertram J.S.**, Kolonel L.N., Meyskens F.L. Rationale and Strategies for Chemoprevention of Cancer in Humans. *CANCER RESEARCH* 47. 3012-3031. (1987).
- Blank H.M.**, Callahan M., Pistikopoulos I., Polymenis A., and Polymenis M. Scaling of G1 Duration with Population Doubling Time by a Cyclin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*.210(3): 895–906. (2018).

- Bollag D.M.**, Rozycki M.D., Edelstein SJ. Protein Methods. 2nd Edition. ISBN: 978-0-471-11837-4. (1996).
- Boiteux S.** and Sue Jinks-Robertson S. DNA Repair Mechanisms and the Bypass of DNA Damage in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, Vol. 193, 1025–1064 April 2013. (2013).
- 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. UdelaR. (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. J Altern Complem Med, 9: 379-387. (2003).
- Bracesco N.**, Sosa V., Blanc L., Contreras V., Candreva E.C., Salvo V.A., Hocart S., Mechoso B. and Nunes E. Analysis of radioprotection and antimutagenic effects of *Ilex paraguariensis* infusion and its component rutin. Brazilian J Med Biol Res, 51: e7404. (2018).
- Brauer M. J.**, Huttenhower C., Airoidi E. M., Rosenstein R., Matese J. C. Coordination of growth rate, cell cycle, stress response, and metabolic activity in yeast. Mol. Biol. Cell 19: 352–367. (2008).
- Candreva E.**, Keszenman D.J., 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).

- Carnicero E.** Función meiótica de la proteína Ddc2 de *Saccharomyces cerevisiae*. TESIS DOCTORAL. Departamento de Microbiología y Genética Instituto de Biología Funcional y Genómica (USAL/CSIC). (2013).
- Conde Pérez F.M.** Estudio de la función de Dot1 en la respuesta celular al daño en el DNA en *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis Doctorado. Universidad de Salamanca. Departamento de Microbiología y Genética Instituto de Microbiología Bioquímica. (2009).
- Daley J.M.,** Palmboos P.L., Wu D., Wilson T.E. Nonhomologous end joining in yeast. *Ann Rev Genet*, 39: 431-51. (2005).
- Ellenhorn M.J.** Polycyclic aromatic hydrocarbons. In: Ellenhorn MJ, Schonwald S, Ordog G, Wasserberger J. Baltimore (Eds.). *Ellenhorn's medical toxicology: diagnosis and treatment of human poisoning*. 2nd edition. Baltimore: Williams & Williams, 1420-1447. (1997).
- Evdokimova V. N.,** Manoj Gandhi, Alyaksandr V. Nikitski, Christopher J. Bakkenist, and Yuri E. Nikiforov. Nuclear myosin/actin-motored contact between homologous chromosomes is initiated by ATM kinase and homology-directed repair proteins at double-strand DNA breaks to suppress chromosome rearrangements. *Oncotarget*. 2; 9(17): 13612–13622. (2018).
- Evans W.C.** Phenols and phenolic glycosides. In: Trease and Evans pharmacognosy. Elsevier Limited, 219-260. (2009).
- Ferrer Pastor P.** Efectos anticancerosos de polifenoles naturales: pterostilbeno y quercetina. Universitat de València. Servei de Publicacions. (2008).
- Filip R.,** Ferraro G.E., Bandoni A., Bracesco N., Nunes E., Gugliucci A., Dellacassa E. Mate (*Ilex paraguariensis*). F. Imperato (Ed.). *Recent Advances in Phytochemistry*. Research Signpost. Kerala, India, 113-132. (2009).

- Fisher H.** Benzo(a)pyrene induced mutagenesis of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cantaurus*, 15: 11-13. (2007).
- Frick C.M.,** Farrell R.E., Germida J.J. Assessment of phytoremediation as an in-situ technique for cleaning oil-contaminated sites. Petroleum Technology Alliance of Canada (PTAC). Calgary, AB. (1999).
- Friedberg E.C.,** Walker G.C., Siede W., Wood R.D., Schultz R.A., Ellenberger T. DNA repair and mutagenesis. ASM Press. (2005).
- Friedl A.,** Beisker W., Hahn K., Eckardt- Schupp F. Application of pulsed field gel electrophoresis to determine gamma ray-induced double strand breaks in yeast chromosomal molecules. *Int J Radiat Biol* 63:173 – 181. (1993).
- Friedl A.,** Markus K., Fellerhoff B., Eckardt-Schupp. Radiation-induced Chromosome Aberrations in *Saccharomyces cerevisiae*. Influence of DNA Repair Pathways. *Genetics* 148:975-988. (1998).
- Foury F.** Human genetic diseases: a cross-talk between man and yeast. *Gene*, 195:1-10. (1997).
- Gallego Sánchez A.** Caracterización de nuevos reguladores de los mecanismos de tolerancia al daño en el DNA en *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis Doctorado. Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer. Centro de Investigación del Cáncer. Universidad de Salamanca. (2014).
- Gallo D.,** Kim T., Szakal B., Saayman X., Narula A., Park Y., Branzei D., Zhang Z., Brown G.W. Rad5 Recruits Error-Prone DNA Polymerases for Mutagenic Repair of ssDNA Gaps on Undamaged Templates. *Mol Cell*. 7;73(5):900-914.e9. doi: 10.1016/j.molcel.2019.01.001. (2019).
- García M.J.** Los hidrocarburos policíclicos aromáticos asociados a combustibles fósiles. Caracterización, análisis y remediación. Tesis de Doctorado.

Departamento de Ingeniería Química y Combustibles. Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Minas, Universidad Politécnica de Madrid. Madrid, España. (2005).

García Préchac F. Centro de Investigación, Gestión y Consultoría Ambiental. Identificación de riesgos ambientales. (2016).

Gary W.J., Reed S.H., Waters R. Characterization of the *rad14-2* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*: implications for the recognition of UV photoproducts by the Rad14 protein. *Yeast*, 13: 31-36. (1997).

Geigl E.M., Eckardt-Schupp F. The repair of doublestrand breaks and S1 nuclease-sensitive sites can be monitored chromosome-specifically in *Saccharomyces cerevisiae* using pulsed-field gel electrophoresis. *Mol Microbiol* 5: 1615-1620. (1991).

Giannattasio M., Lazzaro F., Longhese M.P., Plevani P., Muzi-Falconi M. Physical and functional interactions between nucleotide excision repair and DNA damage checkpoint. *EMBO J*, 23: 429-438. (2004).

Giannattasio M., Lazzaro F., Siede W., Nunes E. Plevani P., Muzi-Falconi M. DNA decay and limited Rad53 activation after liquid holding of UV-treated nucleotide excision repair deficient *S. cerevisiae* cells. *DNA Repair* 3 1591-1599. (2004).

Granado Serrano A.B. Estudios de los mecanismos de acción molecular de polifenoles de la dieta en cultivos celulares y animales de experimentación. Tesis Doctorado. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Biología. Dpto. Bioquímica y Biología Molecular I. (2010).

Guzder S., Sung P., Prakash L., Prakash S. Yeast DNA repair gene RAD14 encodes a zinc metalloprotein with aYnity for ultraviolet-damaged DNA. *Proceedings of*

the National Academy of Sciences of the United States of America. 90. 5433-7. 10.1073/pnas.90.12.5433. (1993).

Guzder S.N., Bailly V., Sung P., Prakash L. and Prakash S. Yeast DNA Repair Protein RAD23 Promotes Complex Formation between Transcription Factor TFIIH and DNA Damage Recognition Factor RAD1. *The Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.270.15. (1995b).

Guzder S.N., Sung .P, Prakash .L, Prakash S. Nucleotide excision repair in yeast is mediated by sequential assembly of repair factors and not by a pre-assembled repairosome. *J Biol Chem*, 271: 8903-8910. (1996).

Guzder S.N., Sommers C.H., Prakash L., Prakash S. Complex formation with damage recognition protein Rad14 is essential for *Saccharomyces cerevisiae* Rad1-Rad10 nuclease to perform its function in nucleotide excision repair in vivo. *Mol Cel Biol*, 26, 1135–1141. (2006).

Haynes R.H. Formal, Empirical and mechanistic equations in cellular radiation biology. In: Kiefer J. (eds) *Quantitative mathematical models in radiation biology*. Springer, Berlin, Heidelberg, 181-189. (1988).

Heck C.I., de Mejia E.G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *J Food Sci*, 72:R138-51. (2007).

Herskowitz I. Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev*, 52: 536-553. (1988).

Hong Mu, Nicholas E. Geacintov, Jung-Hyun Min, Yingkai Zhang and Suse Broyde. Nucleotide Excision Repair Lesion-Recognition Protein Rad4 Captures a Pre-Flipped Partner Base in a Benzo[a]pyrene-Derived DNA Lesion: How

Structure Impacts the Binding Pathway. Chemical Research in thecnology.

DOI: 10.1021/acs.chemrestox.7b00074. (2017).

Hu Z., He B., Ma L., Sun Y., Niu Y., Zeng B. Recent Advances in Ergosterol Biosynthesis and Regulation Mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. Indian J Microbiol. 57:270-277. (2017).

Hughes A.L., Powell D.W., Bard M., Eckstein J., Barbuch R., Link A.J., Espenshade P.J. Dap1/PGRMC1 binds and regulates cytochrome P450 enzymes. Cell Metab. 5(2):143-9. (2007).

IARC. Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. Volumen 92. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. WHO. (2010).

IARC. Chemical agents and related occupations. Volume 100 F. A review of human carcinogens. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. WHO. (2012).

IARC. Benzene. Volume 120. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. WHO. (2018).

Kamangar F., Schantz M., Abnet C., Fagundes R., Dawsey S. High levels of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in mate drinks. Cancer Epidem Biomar, 17: 1262-1268. (2008).

Kazerouni N., Sinha R., Hsu C.H., Greemberg, Rothman N. Analysis of 200 food items for benzo[a]pyrene and estimation of its intake in an epidemiologic study. Food Chem Toxicol, 39:423-436. (2001).

Keith B., Adelman D., Simon M. Targeted mutation of the murine arylhydrocarbon receptor nuclear translocator 2 (Arnt 2) gene reveals partial redundancy with Arnt. Proc Nath Acad Sci USA, 98: 6692-6697. (2001).

- Kelly S.L.,** Lamb D.C., Kelly D.E. Sterol 22-desaturase, cytochrome P45061, possesses activity in xenobiotic. *FEBS Lett*, 412: 233-235. (1997).
- 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 D.,** Candreva E.C., Sánchez A.G., Nunes E. RAD6 gene is involved in heat shock induction of bleomycin resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Environ Mol Mutagen*. 45(1):36-43. (2005).
- Korobkova E.A.** Effect of natural polyphenols on CYP metabolism: implications for diseases. *Chem Res Toxicol*, 28:1359-90. (2015).
- Kupiec M.** Damage-induced recombination in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res*, 451: 91-105. (2000).
- Kushnirov Vitaly V.** Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast*, 16: 857-860. (2000).
- Lafrance-Vanasse J.,** Arseneault G., Cappadocia L., Chen H.T., Legault P., Omichinski J.G. Structural and functional characterization of interactions involving the Tfb1 subunit of TFIID and the NER factor Rad2. *Nucleic Acids Res*. 40(12):5739-50. doi: 10.1093/nar/gks194. (2012).
- 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: 767-770. (1999).
- Lehmann A.R.** Ubiquitin-family modifications in the replication of DNA damage. Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. doi:10.1016/j.febslet.2011.06.005. (2001)

- Llamas J.F.**, García M.J., Fernández C. Comportamiento y caracterización de contaminantes orgánicos en suelos. Propuesta para un sistema de apoyo a la toma de decisiones (DSS) en la gestión de terrenos abandonados. Reunión científico-técnica sobre contaminación de suelo y subsuelo por productos orgánicos: aspectos legales y técnicos. Oviedo, España. (2000).
- Lundstedt S.**, Haglund P., Oberg L. Degradation and formation of polycyclic aromatic compounds during bioslurry treatment of an aged gasworks soil. *Environ Toxicol Chem*, 22:1413-20. (2003).
- Mahmoud Toulany.** Targeting DNA Double-Strand Break Repair Pathways to Improve Radiotherapy Response. *Genes*, 10, 25; doi:10.3390/genes10010025. (2019).
- Majka J.**, Niedziela-Majka A., Burgers P.M.J. The checkpoint clamp activates Mec1 kinase during initiation of the DNA damage checkpoint. *Molec Cell*, 24: 891-901. (2006).
- Malhotra A.**, Nair P., Dhawan D. K. Premature Mitochondrial Senescence and Related Ultrastructural Changes during Lung Carcinogenesis Modulation by Curcumin and Resveratrol. *Journal Ultrastructural Pathology*. Volume 36. (2012)
- Mardiros A.**, Benoun J.M., Haughton R., Baxter K., Kelson E.P., and Fischhaber P. L., Rad10-YFP focus induction in response to UV depends on *RAD14* in yeast. *Acta Histochem*; 113(4): 409–415. doi:10.1016/j.acthis.2010.03.005 (2011)
- Mastandrea C.**, Chichizola C., Ludueña B., Sánchez H., Álvarez H., Gutiérrez A. Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos. *Acta Bioquím Clín Latinoam*, 39: 27-36. (2005).

- Mastrangelo G.**, Fadda E., Marzia V. Polycyclic aromatic hydrocarbons and cancer in man. *Environ Health Perspect.*, 104, 1166-1170. (1996).
- Mikstacka R.**, Dutkiewicz Z., Sobiak S., Baer-Dubowska W. Effect of natural phenols on the catalytic activity of cytochrome P450 2E1. *Acta Biochim Pol*, 49: 917–925. (2002).
- Min, J. H.**, and Pavletich, N. P. Recognition of DNA damage by the Rad4 nucleotide excision repair protein. *Nature* 449, 570–575. (2007).
- Miranda D.**, Arcari D., Pedrazzoli Jr. J., de OCarvalho 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).
- Morgan D. O.** Control of cell proliferation and growth, pp. 221 in *The Cell Cycle*. New Science Press Ltd, London. (2007).
- Nelson D.R.**, Koymans L., Kamataki T., Stegeman J.J., Feyereisen R., Waxman D.J., Waterman M.R., Gotoh O., Coon M.J., Estabrook R.W., Gunsalus I.C., Nebert D.W. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, 6:1-42. (1996).
- Nunes Langguth E.** Erholungsvorgänge in haploiden Hefezellen nach Röntgenbestrahlung. *Biophysik* 5,32-41, (1968).
- Nunes E.**, Brum G., Candreva E.C., Schenberg – Frascino A.C. 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.**, Gelós U. Proliferación celular y su perturbación. Aspectos cuantitativos y moleculares. FEFMUR. (2006).
- Nunes E.**, Candreva E., Bracesco N., Sánchez A., Dell M. HDF1 and RAD17 Genes are Involved in DNA Double-strand Break Repair in Stationary Phase

Saccharomyces cerevisiae. J Biol Phys 34:63–71 DOI 10.1007/s10867-008-9105-0. (2008)

Ogi T., Limsirichaiku S. Overmeer R., Volker M., Takenaka K., Cloney R., Nakazawa Y., Niimi A., Miki Y., Jaspers N., Mullenders L., Phillips D.H. Macromolecular adducts as biomarkers of human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. The carcinogenic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons. Imperial College Press, London, 137-169. (2005).

Prado F., Cortes-Ledesma F., Huertas P., Aguilera A. Mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. Curr Genet, 42: 185-198. (2003).

Prakash S., Sung P., Prakash L. DNA repair genes and proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet*, 27: 33-70. (1993).

Prakasha Gowda A. S., Krzeminski J., Amin S., Suo Z., and Spratt T. Mutagenic Replication of *N*2-Deoxyguanosine Benzo[*a*]pyrene Adducts by *Escherichia coli* DNA Polymerase I and *Sulfolobus solfataricus* DNA Polymerase IV. Chem Res Toxicol. 30(5): 1168–1176. doi:10.1021/acs.chemrestox.6b00466. (2017).

Rather I.A., Koh W.Y., Paek W.K. and Lim J. The Sources of Chemical Contaminants in Food and Their Health Implications. Front. Pharmacol. 8:830. doi: 10.3389/fphar.2017.00830. (2017).

Rechkoblit O., Kolbanovskiy A., Landes H., Geacintov N.E., Aggarwal AK. Mechanism of error-free replication across benzo[*a*]pyrene stereoisomers by Rev1 DNA polymerase. Nature Commun, 8: 965. (2017).

Reglamento Bromatológico Nacional, Decreto N° 315/994. Ed. 3. (2004).

Rice-Evans C., Parker L. Flavonoids in health and disease. Marcel Dekker, Inc., NY. (2003).

- Rodriguez K.**, Talamantez J., Huang W., Reed S.H., Wang Z., Chen L., Feaver W.J., Friedberg E.C., Tomkinson A.E. Affinity purification and partial characterization of a yeast multiprotein complex for nucleotide excision repair using histidine-tagged Rad14 protein. *J Biol Chem*, 273: 34180-34189. (1998).
- Ronen A.**, Glickman B.W. 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*. New York U.S.A, Cold Spring Harbor Laboratory Press. (1990).
- Roshandel G.**, Semnani S., Malekzadeh R., Dawsey S.M. Polycyclic aromatic hydrocarbons and esophageal squamous cell carcinoma. *Arch Iran Med*, 15: 713-722. (2012).
- Rossner P. Jr.**, Rossnerova A., Beskid O., Tabashidze N., Libalova H., Uhlirova K., Topinka J., Sram R.J. Nonhomologous DNA end joining and chromosome aberrations in human embryonic lung fibroblasts treated with environmental pollutants. *Mutat Res*. 763-764:28-38. (2014).
- Sadowska-Bartosz I.**, Paćka A., Mołan M. & Bartosz G. Dimethyl sulfoxide induces oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. (2013).
- Santos T.B.**, Mitchell D.A., Krieger N., Moure V.R., Zanoelo E.F. Experimental and modeling study of enzymatic oxidation of 5-o-caffeoylquinic acid by polyphenol oxidases. *Food Technol Biotech*, 48: 548-553. (2010).
- Sei-ichi Nakamura**, Yoshimitsu Oda, Masahiro Ugawa. Induction of umu gene expression in *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 by dimethyl sulfoxide (DMSO) Volume 229, Issue 1, Pages 11-15. (1990).

- Sertic S.**, Pizzi S., Lazzaro F., Plevani P. Muzi-Falconi M. NER and DDR: Classical music with new instruments, *Cell Cycle*, 11: 668-674. (2012).
- Severgnini A.**, Lillo O., Nunes E. Analysis of bleomycin-induced mutagenic function related to the PSO4 (=XS9) gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Environ Mol Mutagen*, 18: 102-106. (1991).
- Shrivastav M.**, De Haro L., Nickoloff J.A. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res*, 18: 134–147. (2008).
- Spencer J.F.T.**, Spencer D.M., Smith A. *Yeast Genetics. Fundamental and Applied Aspects*. Springer New York. DOI 10.1007/978-1-4612-5491-1. (1983).
- Spivak G.** Transcription-Coupled Repair: an update *Arch Toxicol*. 90(11): 2583–2594. (2016).
- Stellman J.M.**, McCan M. Hidrocarburos poliaromáticos. En: *Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo*. 3ª edición. Madrid: Organización Internacional del Trabajo. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales – Subdirección General de Publicaciones. 310-319. (1998).
- Szaefer H.**, Cichocki, M, Brauze, D, Baer-Dubowska, W. Alteration in phase I and II enzymes activities and polycyclic aromatic hydrocarbons-DNA adduct formation by plant phenolics in mouse epidermis. *Nutr Cancer*. 48: 70–78. (2004).
- Szaefer H.**, Krajka-Kuźniak V, Baer-Dubowska W. The effect of initiating doses of benzo[a]pyrene and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene on the expression of PAH activating enzymes and its modulation by plant phenols. *Toxicology*, 251: 28-34. (2008).
- Teel R.W.**, Huynh H. Modulation by phytochemicals of cytochrome P450-linked enzyme activity. *Cancer Lett*, 133:135-141. (1998).

- Thea A.E.**, Ferreira D., Brumovsky L.A., Schmalko M.E. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) traditional infusions (mate and tereré). *Food Control* 60. 215e220. (2016).
- Thea A.E.**, Ferreira D., Brumovsky L.A., Schmalko M.E. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) durante las diferentes etapas de procesamiento de la yerba mate (*I. paraguariensis* St. Hil.). VII Congresso Sul-Americano da Erva-Mate III Simpósio Internacional de Erva-Mate e Saúde I Feira de Tecnologia na Indústria Ervateira. (2017).
- Thompson L.A.**, Darwish W.D. Environmental chemical contaminants in food: review of a global problem. *J Toxic* Volume 2019: article ID 2345283. (2019).
- Tung EW**, Philbrook NA, Belanger CL, Ansari S, Winn LM. Benzo[a]pyrene increases DNA double strand break repair in vitro and in vivo: a possible mechanism for benzo[a]pyrene-induced toxicity. (2014).
- Universitat de les Illes Balears (UIB)**. Prevención de riesgos laborales Rev.:1.1. (2003).
- Vázquez-Gómez G.**, Rubio-Lightbourn J., Espinosa-Aguirre J.J. Mecanismos de acción del receptor de hidrocarburos de arilos en el metabolismo del benzo[a]pireno y el desarrollo de tumores. D.R. © TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas. 19: 54-67. (2016).
- Vu A.T.**, Taylor K.M., Holman M.R., Ding Y.S., Hearn B., Watson C.H. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the mainstream smoke of popular U.S. cigarettes. *Chem Res Toxicol*. 28: 1616-1626. (2015).

- Vyas S.**, Sharma M., Sharma P.D., Singh T.V. Design, semisynthesis, and evaluation of O-acyl derivatives of (-)-epigallocatechin-3-gallate as antitumor agents. *Jul* 25; 55(15):6319-24. Epub. (2007).
- Walker G.M.** Yeast Physiology and Biotechnology Wiley. (1998).
- Watson J.D.** Biología Molecular de Gen. Editorial Médica Panamericana. (2006).
- Weis L.M.**, Rummel A.M., Masten S.J., Trosko J.E., Uphan B.L. Bay or baylike regions of polycyclic aromatic hydrocarbons were potent inhibitors of gap junctional intercellular communication. *Environ Health Persp*, 106, 17-22. (1998).
- Weyand E.H.**, Bevan D.R. Benzo(a)pyrene disposition and metabolism in rats following intratracheal instillation. *Cancer Res*, 46: 5655–5661. (1986).
- Wood A.**, Levin W., Chang R.L., Lehr R.E., Schaefer-Ridder M., Karle J.M., Jerina D.M., Conney A.H. Tumorigenicity of five dihydrodiols of benz[a]anthracene on mouse skin: Exceptional activity of benz[a]anthracene 3,4-dihydrodiol. *Proc Nat Acad Sci USA*. 74: 3176-3179. (1977).
- World Health Organization.** Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons IPCS. International Programme on Chemical Safety. World Health Organization, Geneva, Switzerland. (1998).
- World Health Organization.** Regional Office for Europe. Polynuclear aromatic hydrocarbons (PAH). In: Air quality guidelines for Europe. Chapter 5.9. Copenhagen. (2000).
- World Health Organization.** Guidelines for drinking water quality (fourth ed.). Geneva, Switzerland. (2011).
- World Health Organization.** Ambient air pollution: A global assessment of exposure and burden of disease. (2016a).

- World Health Organization.** Preventing disease through healthy environments. A global assessment of the burden of disease from environmental risks. A Prüss-Ustün, J Wolf, C Corvalán, R Bos and M Neira. (2016 b).
- Xue W.,** Warshawsky D. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicol Appl Pharmacol*, 206:73-93. (2005).
- Yueru Sun,** Thomas J., McCorvie, Luke A. Yates, Xiaodong Zhang. Structural basis of homologous recombination *Cellular and Molecular Life Sciences*.77:3-18 <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03365-1>. (2020)
- 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: 981-994. (2008).

10. ANEXOS.

ANEXO 1.

PROCEDIMIENTO AISLAMIENTO DE ADN

- 1) Lavar las muestras celulares dos veces con buffer de fosfato de potasio 0.5 M (pH 7), resuspender en 0.5 mL de este buffer y pasarlas a tubos Eppendorf.
- 2) Agregar 0.1 mL de EDTA 0.5 M (pH 9)
- 3) Centrifugar y resuspender en 0.3 mL EDTA 50 mM (pH 7.5).
- 4) Agregar 0.1 mL de solución 1 (ver más adelante).
- 5) Agitar con Vortex.
- 6) Agregar 0.4 mL de agarosa de bajo punto de fusión al 2% (preparada con EDTA 0.125 M), mantener a 42°C.
- 7) Repartir en bloques utilizando el molde correspondiente. Solidificar en la heladera a 4°C.
- 8) Colocar los bloques en tubos de vidrio y agregar 1.8 mL de solución 2 (ver más adelante). Incubar los bloques a 37°C durante 1 h.
- 9) Descartar la solución 2.
- 10) Agregar 2 mL de solución 3 (ver más adelante) e incubar durante la noche a 50°C con agitación suave.
- 11) Descartar la solución 3 y dializar con solución 4 (ver más adelante) durante 36 hs. Se deben realizar por lo menos 8 cambios de solución 4 a intervalos regulares.
- 12) Los bloques de agarosa se guardan en solución 4 a 4°C.

ANEXO 2.

SOLUCIONES TAFE

- SOLUCION 1 (por cada muestra celular):

1,33 mg zimolasa (60.000U)

0.2 ml SEC buffer

10 µl beta mercaptoetanol.

- SOLUCION 2 (por cada muestra celular):

1.8 ml EDTA 0.5 M

20 µl Tris 1M

30 µl agua.

- SOLUCION 3 (por cada muestra celular):

1.8 ml

EDTA 0.5 M

20 mg N-laurilsarcosinato

20 µl Tris-HCl 1 M

2 mg Proteinasa K.

- SOLUCION 4:

Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) (PM: 157,6 g/mol)

EDTA 10 mM

PMSF (fenilmetilsulfonil fluoruro) 1 mM (PM: 174,2 g/mol)

- SEC BUFFER:

Sorbitol 1 M (PM: 182,2 g/mol)

Citrato monohidrato 10 mM (PM: 210,14 g/mol)

Fosfato disódico 10 mM (PM: 142 g/mol)

EDTA 0.1 M (PM: 292,2 g/mol)

- BUFFER FOSFATO DE POTASIO 0.5 M: 0.5 M

Fosfato dipotásico 0.5 M (PM: 174,2 g/mol)

Fosfato monopotásico 0.5 M (PM: 136,1 g/mol)

- BUFFER TAFE 20X:

Tris-base 24,9 g

EDTA 2,9 g

Ácido acético glacial 5 mL

Agua destilada

- SOLUCIÓN PBS: (Para un litro)

Cloruro de sodio 8 g

Cloruro de potasio 0.2 g

Fosfato disódico 1,44 g

Fosfato monopotásico 0.24 g

Agua.

ANEXO 3.

BUFFER Y GELES DEL WESTERN BLOT.

BUFFER DE MUESTRA (1x)
0,06 M Tris-HCl pH 6,8
4% β -mercaptoethanol
5% glycerol
2% SDS
0,0025% bromophenol blue

GEL SEPARADOR	1 gel
H ₂ O	1,6 mL
Acrilamida 30%	2 mL
Tris 1.5M pH=8.8	1.3mL
SDS 10%	0,05 mL
PSA 10%	0,05 mL
TEMED	0,002 mL
TOTAL	5 ml

GEL STACKING	1 gel
H ₂ O	0,68 mL
Acrilamida 30%	0,17 mL
Tris 1.5 M pH=6.8	0,13 mL
SDS 10%	0,01 mL
PSA 10%	0,01 mL
TEMED	1 μ l

Todos los productos fueron de Sigma y el agua utilizada para la preparación de las soluciones fue desionizada.