



UNIVERSIDAD  
DE LA REPUBLICA  
URUGUAY



# “Determinación del efecto del Ácido Clorogénico en levaduras *Saccharomyes cerevisiae* expuestas a Benzopireno y Benzoantraceno”

Universidad de la República, Facultad de Medicina  
Laboratorio de Radiobiología, Dpto. de Biofísica

Autores:

**Br. Sebastián Faviere**  
**Tec. Daniel Fernández**  
**Br. Santiago Ferreira da Costa**  
**Br. Ismael Ferro**  
**Br. Kamila Fiyol**  
**Br. Ricardo Janac**

Orientador:

Mg. Nelson Bracesco  
Lic. Verónica Sosa

Ciclo de Metodología Científica II-2018. Grupo 34



## Índice

<b>Resumen.....</b>	<b>Página 4</b>
<b>Palabras clave.....</b>	<b>Página 4</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>Página 5</b>
<b>HIPOTESIS.....</b>	<b>Página 8</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>Página 8</b>
Objetivo General.....	Página 8
Objetivos específicos.....	Página 8
<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>Página 9</b>
Cepa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	<b>Página9</b>
Mantenimiento de las cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	<b>Página9</b>
Medios de cultivo.....	<b>Página 9</b>
Agentes Químico y Natural.....	<b>Página 9</b>
Crecimiento de las Poblaciones Celulares.....	<b>Página 10</b>
Tratamientos.....	<b>Página 10</b>
Curvas de sobrevivencia y análisis de la mutagénesis.....	<b>Página 10</b>
Medida de roturas dobles de ADN (DSBs) y cuantificación del daño en el ADN .....	<b>Página 11</b>
Aislamiento del ADN cromosómico.....	<b>Página 11</b>
<b>Procedimiento.....</b>	<b>Página 11</b>
Preparación del gel vertical de corrida.....	<b>Página 12</b>
Electroforesis.....	<b>Página 12</b>
Tinción, decoloración y fotografía del gel.....	<b>Página 13</b>
Análisis estadístico de los datos.....	<b>Página 13</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>Página 14</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>Página 18</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>Página 21</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>Página 22</b>
<b>Agradecimientos.....</b>	<b>Página 25</b>

## **RESUMEN**

El benzo(a)pireno (Bp) y el benzo(a)antraceno (Bap) pertenecen al grupo de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's), compuestos químicos que son producto de la combustión incompleta de materia orgánica. Los seres humanos estamos expuestos a estas sustancias a diario pudiendo entrar en contacto con estas a través de varias vías. La IARC clasifica al Bp como un carcinógeno de grupo I. La detoxificación de estas sustancias ocurre mayoritariamente en el hígado. Durante la metabolización de estos compuestos se producen formas epóxido con capacidad de formar aductos con el ADN e inducir cambios en éste. La exposición al Bp ha sido asociada a un aumento de la actividad de la enzima CP1A1, perteneciente al citocromo P450.

Estudios previos en el Lab. de Radiobiología (FMED) han demostrado que la infusión de yerba mate (*Ilex paraguayensis*) inhibe significativamente los daños producidos por Bp en cultivos de *Saccharomyces cerevisiae*. Por estos motivos nuestro objetivo es estudiar el posible efecto modulador del daño celular producido por el Bp y el Bap de uno de los polifenoles que se encuentra en mayor cantidad en la yerba mate como lo es el ácido clorogénico (AC). Se utilizó como modelo eucariótico una cepa de *Saccharomices cerevisiae* y se realizaron tratamientos simples y combinados exponiendo a las muestras celulares a Bp; Bap y AC. Se estudió la fracción de sobrevida (Sx), la frecuencia mutagénica (FM) y la presencia de dobles roturas del ADN. En los tratamientos combinados Bp/Cl; Ban/Cl y Bp/Ban/Cl se observó un aumento significativo en la frecuencia de sobrevida y disminución de la frecuencia mutagénica en comparación con las muestras que contenían Bp y/o Ban como único agente. Los resultados obtenidos muestran que puede existir un efecto modulador del AC en la metabolización del Bp y el Bap.

**Palabras clave:** Yerba mate, Acido Clorogénico, Benzopireno, Benzoantraceno, Cáncer.

## **INTRODUCCIÓN:**

Ante las crecientes tasas de incidencia y de mortalidad de las patologías oncológicas en los últimos años, gran parte de la comunidad científica ha enfocado sus estudios en la búsqueda de nuevas y mejores terapias contra el cáncer. Las patologías oncológicas se encuentran entre las 10 causas de muerte más frecuente a nivel mundial en todos los grupos etarios, teniendo una incidencia de 18,1 millones de casos nuevos y causando la muerte de 9,6 millones de personas al año (1). En Uruguay, la muerte por cáncer se encuentra en segundo lugar siendo superada únicamente por las enfermedades del sistema cardiovascular, con una incidencia de 16.000 casos nuevos al año y una mortalidad de 8.000 muertes al año (2).

En este contexto, se conoce ya desde hace muchos años la relación existente entre la exposición a hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y el desarrollo de cáncer. Los primeros estudios sobre ésta relación fueron proporcionados por los investigadores suizos Bloch y Dreifuss en 1921 al estudiar los compuestos químicos del alquitrán responsables del desarrollo del cáncer.

Los HAPs son un extenso grupo de compuestos químicos orgánicos derivados del benceno (los cuales se caracterizan por tener dos o más anillos de éste), la mayoría de ellos están conformados únicamente por carbono e hidrógeno, siendo siempre estructuras polinucleares de tipo aromático. Se forman a partir de la combustión incompleta de materia orgánica, y se encuentran ampliamente distribuidos en el medio ambiente.

Las fuentes de estos compuestos pueden ser naturales: erupciones volcánicas, incendios forestales o antropogénicas: refinerías petroleras, calefacción, utilización de vehículos con motor de combustión, elaboración de alimentos, exposiciones laborales y tabaquismo.

Cabe remarcar que otra característica de relevancia de estos compuestos es que son fotoquímicamente inestables, por lo que se degradan si se exponen a la luz. (4)

La toxicidad aguda de muchos HAPs suele ser baja, la gran relevancia tóxica que tienen estos compuestos está en los efectos a mediano y largo plazo que producen algunos de ellos. La familia de los HAPs está formada por más de 100 de estos compuestos y en la actualidad al menos 20 de ellos han demostrado estar vinculados con el desarrollo de cáncer, tanto sea por su actividad carcinogénica, mutagénica o inmunosupresora. La genotoxicidad va a depender principalmente de su estructura, y dentro de los más peligrosos sobresalen los compuestos derivados del antraceno como el benzo(a)pireno (Bap) y benzo(a)antraceno (Ban). El elevado potencial carcinógeno que poseen es debido a la existencia de una región denominada “bay” en su estructura, esta región posee propiedades electrofílicas elevadas lo que permite a estos compuestos interactuar con los enlaces covalentes. (5)

La ingestión de alimentos contaminados es la principal vía de exposición a estos compuestos

pero también puede haber exposición por inhalación e incluso por vía cutánea.

Dado su naturaleza lipofílica, característica que incrementa con el aumento de su masa molecular, los HAP's se distribuyen especialmente en el hígado donde ocurre mayormente la detoxificación de estas sustancias.

Al ser absorbidos, los HAPs se distribuyen en todo el organismo, acumulándose en mayor medida en aquellos órganos con alto contenido lipídico. Luego de incorporados son oxidados a través del sistema de oxidación de función mixta (MFO), pertenecientes al citocromo P450, que está presente mayormente en el hígado, convirtiendo a los HAPs en epóxidos y en dihidrodiolos. Son estos compuestos químicos los que constituyen la forma genotóxicamente activa de los HAPs, dado que pueden formar aductos covalentes con proteínas y ácidos nucleicos (6). Estos complejos que se forman con el ADN son los que pueden dar lugar a una mutación génica, potencialmente cancerígena para el individuo, sin dejar de lado los efectos teratogénicos que pueden producir. Por lo tanto los HAPs son promutágenos y necesitan de la activación metabólica para poder ejercer su efecto nocivo sobre el ADN. Para su eliminación a través de la orina es necesario que a la reacción de oxidación a la cual están expuestos los HAPs les siga un proceso de conjugación, lo cual los convierte en compuestos hidrosolubles. Debido a esto es que los niveles de concentración de HAPs son muy importantes, dado que por encima de cierto límite, el organismo ya no es capaz de conjugar los epóxidos y los dihidrodiolos, quedando estos libres y capaces de ejercer su efecto nocivo.

En base a esto se han buscado distintos agentes que puedan intervenir en el metabolismo de los HAPs y de esta manera disminuir su potencial cancerígeno, así mismo, también se ha dirigido esta investigación a sustancias de consumo común en la población como contra partida de la alta exposición que presentan los individuos a los HAPs en su vida cotidiana. Estudios anteriores realizados en el Laboratorio de Radiobiología (FMed, UdeLaR) han demostrado que la infusión de yerba mate inhibe de manera significativa los daños producidos por Bp en cultivos de *Saccharomyces cerevisiae*. En este trabajo se observó que uno de los posibles mecanismos protectores de la yerba mate puede estar relacionado con la disminución de la actividad de las enzimas del citocromo P450 tras la exposición a HAPs.

Los compuestos más activos detectados en el mate son los alcaloides de la purina, las metilxantinas, que consisten principalmente en cafeína (0.8-1.9%), teobromina (0.3-0.9%) y vestigios de teofilina. El procesamiento industrial puede influir en la composición química del material vegetal y, en consecuencia, la percepción del sabor y los efectos terapéuticos. Otros compuestos detectados en las hojas son nutrientes generales como las vitaminas A, BC (104 mg/100 g en hojas frescas) y la vitamina E. Los compuestos de polifenol también están presentes (7 a 14%) especialmente los ácidos cafeoilquínicos como el ácido cafeico, ácido

clorogénico (hasta un 16%, compuestos principalmente de ácido clorogénico, neoclorogénico, criptoclorogénico e isoclorogénico).

Usando levaduras como un modelo in vivo, Brascesco et al. Demostraron que uno o más componentes del mate -polifenoles y vitaminas- indujeron mecanismos de defensa celular como la protección del ADN y la reparación a nivel genómico y celular de forma similar al  $\alpha$ -tocoferol (compuesto orgánico con actividad Vitamina E).

Estudios in vivo demostraron que los componentes antioxidantes del mate, como los ácidos clorogénicos y los flavonoides, se absorben alcanzando niveles plasmáticos capaces de inhibir la auto oxidación del LDL inducido por el cobre. Demostraron además que la cafeína y el ácido clorogénico desempeñan un papel importante en la inducción de la secreción de peroxidasa.

Recientemente, en el primer estudio comparativo realizado con té verde y vino tinto (la otra bebida que contiene polifenoles más estudiada), Bixby et al. Han observado que *Ilex paraguariensis* muestra la mayor protección contra el estrés nitrosativo para las células y la mayor eficacia como el inhibidor de peroxinitrito. También se investigó la presencia de compuestos que podrían unirse a los receptores de benzodiazepinas. En base a la actividad antitumoral de varios de los polifenoles que están presentes en esta planta, se ha propuesto una actividad anticancerígena. El mate puede inhibir la proliferación de células en el cáncer oral, efecto que puede estar mediado por la inhibición de la topoisomerasa II y puede deberse a los compuestos de polifenoles y otros constituyentes biológicamente activos aún no identificados. Los niveles de polifenol en los extractos de mate son más altos que los del té verde y similares a los de los vinos tintos. Mientras esperan herramientas enfocadas de terapia antioxidante, las bebidas ricas en polifenol podrían representar un coadyuvante alternativo para el tratamiento de muchas enfermedades donde el estrés oxidativo juega un papel importante.

## **HIPOTESIS.**

La hipótesis de trabajo supone disminución diferencial de lesiones inducidas por el Bp, y el Bap en presencia de ácido clorogénico por disminución de la metabolización de los HAP's modulando los componentes mutagénicos de las vías de reparación que se ponen en juego frente a los metabolitos de los HAP's utilizados.

## **OBJETIVOS:**

### **Objetivo General:**

Evaluar al Ac.Clorogénico presente en la Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) como inhibidor la metabolización del Benzopireno y del Benzoantraceno actuando de esta forma como un factor protector anticancerígeno

### **Objetivos específicos:**

- Determinar el efecto de Bp como único agente y en combinación con Bap sobre las probabilidades de sobrevida y mutagénesis en muestras celulares de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*).
- Estudiar la producción de dobles roturas en el ADN por los tratamientos con Bp y Bana distintas concentraciones.
- Analizar el efecto de la adición de ácido clorogénico frente al daño producido por los tratamientos con Bp y Bap.



## **METODOLOGIA**

Para el análisis de las probabilidades de sobrevida, de mutagénesis y análisis de dobles roturas del ADN (DSBs) se utilizó el modelo poblacional *Saccharomyces cerevisiae*, de tipo salvaje. Las cepas a utilizarse se trataron en la fase de crecimiento exponencial.

### **Cepa de *Saccharomyces cerevisiae*.**

Cepas haploides salvajes SC7 Klys 2-3(10),

### **Mantenimiento de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*:**

La cepa de *S. cerevisiae* se mantiene en tubos de agar inclinado conteniendo YPDA en la heladera a 4°C. (11).

### **Medios de cultivo**

Se utilizarán medios de cultivos nutrientes para el estudio de la sobrevida (YPD, YPDA) y selectivos para mutagénesis (OM) habituales para *Saccharomyces cerevisiae* descritos en la literatura (11) y que se detallan a continuación.

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

### **Agentes Químicos y Naturales.**

#### **Solución ácido clorogénico (AC).**

Se preparó una solución madre de AC a una concentración de 0,9 mg/mL (PM: 354,31). Concentración final (10v/v) en las diferentes alícuotas de cultivo celular de 90 µg/mL. (Valor referencia en infusión de yerba mate (12)).

#### **Solución de Benzo(a)pireno.**

Se preparó una solución madre de Bp a una concentración de 250 ng/mL (PM=252,31 g/mol) (2 µg/Kg es el valor permitido para alimentos ahumados) (13). Las diluciones se realizaron en

DMSO (25 ng/mL valor de referencia en infusión de yerba mate (14))

### **Solución de Benzo(a) antraceno.**

Se preparó una solución madre de Bap a una concentración de 250 ng/mL (PM= 228,3 g/mol) las diluciones se realizaron en DMSO (16 ng/mL valor de referencia en infusión de yerba mate (14)).

### **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 e incubando por 3 a 4 días bajo agitación continua a 30°C en un agitador orbital, alcanzándose una fase estacionaria temprana. A partir de este primer pasaje se realizó un segundo pasaje incubándolo durante la noche a 30 °C y obteniéndose un cultivo en fase exponencial de crecimiento ( $N = 1 - 2 \times 10^7$  células/mL).

### **Tratamientos**

-**Tratamientos simples:** Bp (10% v/v), Bap (10% v/v), AC solución madre 0,9 mg/mL (10% v/v), Bp-Bap (10% v/v) y control no tratado. Se incubarán por 1 hora.

-**Tratamientos combinados:** Bp y AC (10% v/v), Bap y AC (10% v/v), Bp-Bap y Bp-Ban y AC (10% v/v). Se incubó por 1 hora.

Inmediatamente después de los tratamientos simples o combinados las muestras celulares se lavaron dos veces en agua estéril.

A partir de estas suspensiones celulares se procederá a las determinaciones de tasas de sobrevivencia y mutagénesis.

### **Curvas de sobrevivencia y análisis de la mutagénesis.**

Se estimaron las probabilidades de sobrevivencia a las concentraciones de HAP's mencionadas anteriormente en muestras de las poblaciones en fase exponencial. Se analizaron muestras independientes en presencia y ausencia de AC. Se analizaron las siguientes funciones:

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

Donde  $N_s$ : número de células sobrevivientes, capaces de generar clones/mL;  $N_o$ : número total de células tratadas/mL;  $x, y$ : dosis de Bp, Bap (agentes que dañan el ADN);  $p$ : dosis del modulador AC (15).

Para determinar la frecuencia y el rendimiento mutagénico, las muestras de poblaciones celulares de levaduras ( $N=10^8$  cel/mL) se sembraron en placas de Petri conteniendo medio de selección OM, cepa SC7K *lys2-3* (el ensayo se realizó por triplicado). Las placas se incubaron a 30°C durante 21 días y luego se realizará el conteo de las colonias correspondientes a las revertantes de auxotrofia a prototrofia *lys*→ *LYS* (16; 17).

Se calculó la frecuencia de mutación  $M(n)$  y el rendimiento mutagénico  $Y(n)$  para cada dosis y sus combinaciones.

Frecuencia mutagénica:  $M(x,y,p) = Nm/Ns$

Siendo  $Nm$ : número de mutantes;  $x, y$ : dosis de Bp, Bap (agentes que dañan el ADN);  $p$ : dosis del modulador AC (15).

### **Medida de roturas dobles de ADN (DSBs) y cuantificación del daño en el ADN:**

La determinación de las DBs 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 cuantifican las DBs por análisis de los correspondientes densitogramas láser. Éstos procedimientos de acuerdo a (17; 18) y las soluciones utilizadas se detallan al final.

### **Aislamiento del ADN cromosómico**

Las muestras celulares conteniendo aproximadamente entre  $8 \times 10^8$  y  $1 \times 10^9$  células/ml se lavan una vez con buffer fosfato salino (PBS) (pH 7,4).

El método de aislamiento del ADN cromosómico consiste 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.

### **Procedimiento:**

Lavar las muestras celulares dos veces con buffer de fosfato de potasio 0,5 M (ph 7) re suspender en 1 ml de este buffer y pasarlas a tubos Eppendorf

1. Agregar 0,2 ml de EDTA 0,5 M (ph 9)
2. Centrifugar y re suspender en 0,6 ml EDTA 50 mM (ph 7,5)
3. Agregar 0,2 ml de Solución 1 (ver más adelante)
4. Agitar con Vortex

5. Agregar 0,8 ml Agarosa de bajo punto de fusión al 2% (preparada con EDTA 0,125 M), mantener a 42 °C
6. Repartir en bloques utilizando el molde correspondiente. Solidificar en la heladera a 4°C
7. 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 hs.
8. Descartar la solución 2
9. Agregar 2 ml de solución 3 (ver más adelante). E incubar durante la noche a 50 °C, con agitación suave.
10. Descartar la solución 3, y dializar con solución 4 (ver más adelante), durante 36 hs. Se deben realizar 8 cambios de solución a intervalos regulares.
11. Los bloques de agarosa se guardan en solución 4 a 4 °C.

### **Preparación del gel vertical de corrida**

Preparar 1,75 g de agarosa de corrida (al 1%) en 175 ml de Buffer TAFE 1X (ver más adelante) y disolver adecuadamente en el horno de microondas.

Enfriar la agarosa a 50°C y volcarla en el molde de gel hasta solidificar. Colocar los bloques contenidos de las muestras de ADN en las hendiduras y cubrirlos con agarosa de corrida. Colocar el gel en forma vertical en la cubeta con Buffer TAFE 1X.

### **Electroforesis**

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

La corrida electroforética se realiza a 12 °C durante 20 hs en 3 etapas:

1- *Etapa uno:*

- Duración de 8 hs.
- Tiempo de pulso: 1 minuto
- Corriente: 350 mA

2- *Etapa dos:*

- Duración de 6 hs.
- Tiempo de pulso: 2 minutos
- Corriente: 390 mA

3- *Etapa tres:*

- Duración de 6 hs.
- Tiempo de pulso: 3 minutos

- Corriente: 370 mA

### **Tinción, decoloración y fotografía del gel**

Una vez terminado el tiempo de corrida, se retira el gel con cuidado del equipo y se coloca 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 decolora en buffer TAFE 1X conteniendo ribonucleasa A (1 µg/ml) (Sigma) durante 3 a 4 hs a 37 °C protegido de la luz.

Posteriormente se coloca el gel en un transluminador UV y se fotografía.

<b><u>Soluciones</u></b>	
Solución 1 (Por cada muestra celular)	0,4 mg zimolasa (100.000 U) + 0,1 ml SEC buffer + 5 µl bmercaptoetanol.
Solución 2 (Por cada muestra celular)	1,8 ml EDTA 0,5 M + 20 µl Tris 1M + 30 µl de agua desionizada
Solución 3 (Por cada muestra celular)	1,8 ml EDTA 0,5 M + 20 mg N-laurilsarcosinato + 20 µl Tris-HCl 1M + 2 mg Proteinasa K
Solución 4	10 mM Tris-HCl (pH 5) + 10 mM EDTA + 1 mM PMSF (fenilmetilsulfonilfloruro)
SEC Buffer	1 M sorbitol + 10 mM ácido cítrico + 10 mM fosfato disódico + 0,1 M EDTA.
Buffer fosfato de potasio 0,5 M	0,5 M fosfato dipotásico + 0,5 M fosfato monopotásico
Buffer TAFE 20X	24,9 g Tris-base + 2,9 g EDTA + 5 ml ácido acético glacial, 1 l agua
PBS	8 g cloruro de sodio + 0,2 g cloruro de potasio + 1,44 g fosfato disódico + 0,24 g fosfato monopotásico + 1 l agua

### **Análisis estadístico de los datos**

Se realizará según las distribuciones binomial, de Poisson, los intervalos de confianza correspondieron a  $P \geq 95$

## **RESULTADOS:**

En base a la metodología planteada se obtuvo la frecuencia mutagénica de la cepa a estudiar. Estas cepas fueron expuestas al Bp y al Ban individualmente y en conjunto, además se las expuso a la solución con Cl de forma individual o en conjunto con los compuestos antes mencionados. Se valoró además el error estadístico en cada situación planteada (Tabla 1):

Variable	Frecuenciamutagénica	Error
Control	$3,71 \times 10^{-6}$	$\pm 3,85 \times 10^{-7}$
Clorogénico	$3,84 \times 10^{-6}$	$\pm 3,92 \times 10^{-7}$
Benzopireno	$9,14 \times 10^{-6}$	$\pm 6,05 \times 10^{-7}$
Benzoantraceno	$1,24 \times 10^{-5}$	$\pm 7,04 \times 10^{-7}$
Benzopireno + Benzoantraceno	$1,51 \times 10^{-5}$	$\pm 7,77 \times 10^{-7}$
Benzopireno + Clorogénico	$5,96 \times 10^{-6}$	$\pm 4,88 \times 10^{-7}$
Benzoantraceno + Clorogénico	$7,7 \times 10^{-6}$	$\pm 5,55 \times 10^{-7}$
Benzopireno + Benzoantraceno + Clorogénico	$6,67 \times 10^{-6}$	$\pm 5,17 \times 10^{-7}$

Tabla 1: Estudio de la frecuencia mutagénica de las diferentes soluciones y sus errores estadísticos

En base a los datos obtenidos se observa un aumento significativo de la frecuencia mutagénica en presencia de Bp; Ban y Bp/Ban en comparación con el tratamiento control.

Existe una diferencia significativa entre la frecuencia mutagénica observada en los tratamientos simples con Bp y Ban y la frecuencia mutagénica en el tratamiento combinados de Bp/Ban.

Se observa también que la frecuencia mutagénica en el tratamiento con AC como único agente no difiere significativamente de frecuencia espontánea de la muestra control (Tabla1, Fig 1).

En relación a las muestras expuestas a los HAPs concomitantemente con Cl se observó una disminución significativa de la frecuencia mutagénica en comparación con las muestras tratadas con los HAPs.

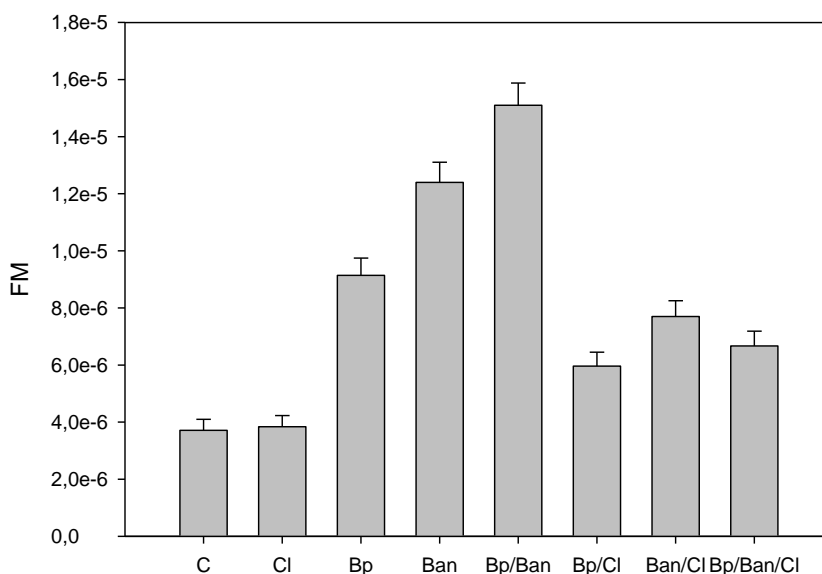


Figura 1: Frecuencia mutagénica de las cepas expuestas a los diferentes compuestos estudiados  
\* P<0,05

En relación a la fracción de sobrevida de las muestras estudiadas se observó una disminución significativa en presencia de los HAPs.

En los tratamientos combinados Bp/Cl; Ban/Cl y Bp/Ban/Cl se observó un aumento significativo en la frecuencia relativa de sobrevida.

No se observó diferencia significativa entre la sobrevida de la muestra control y la expuestas solo a Cl(Tabla 2. Fig 2).

Variable	Sobrevida	Error
Control	1	0.0056
Clorogénico	1	0.0056
Benzopireno	0,66	0.03
Benzoantraceno	0,71	0.035
Benzopireno + Benzoantraceno	0,67	0.03
Benzopireno + Clorogénico	0,91	0.02
Benzoantraceno + Clorogénico	0,92	0.02
Benzopireno + Benzoantraceno + Clorogénico	0,96	0.015

Tabla 2: Estudio de la sobrevida de las diferentes soluciones y sus errores estadísticos

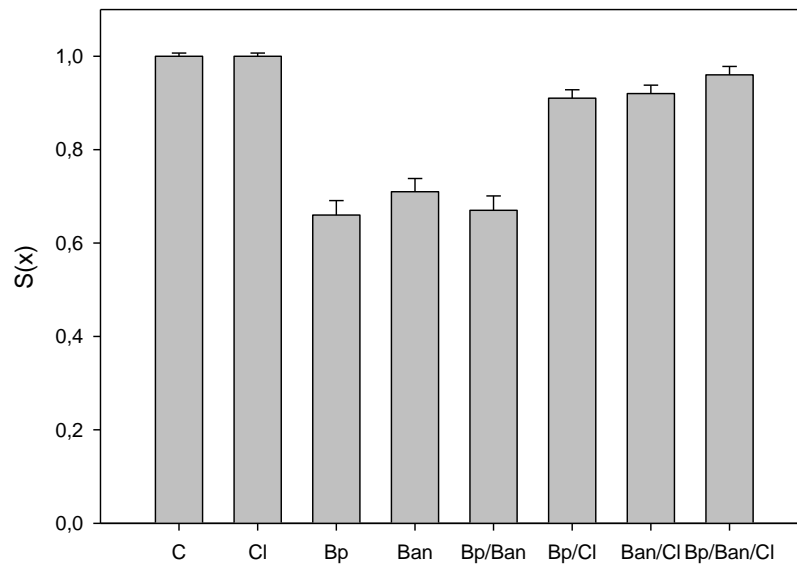


Figura 2: Sobrevida de las cepas expuestas a los diferentes compuestos estudiados. \* $P < 0,05$

Para investigar la probabilidad de inducción de dobles roturas de cadena (DSB) en el ADN se procedió a realizar electroforesis por campos pulsados alternados (TAFE) como se describe en metodología.

El perfil obtenido para la muestra control presenta los picos característicos para el modelo celular con el cual se trabajó.

Se observó que la exposición de las poblaciones celulares a las diferentes concentraciones de Bp y Ban produjo un importante fraccionamiento del ADN (Fig. 3)



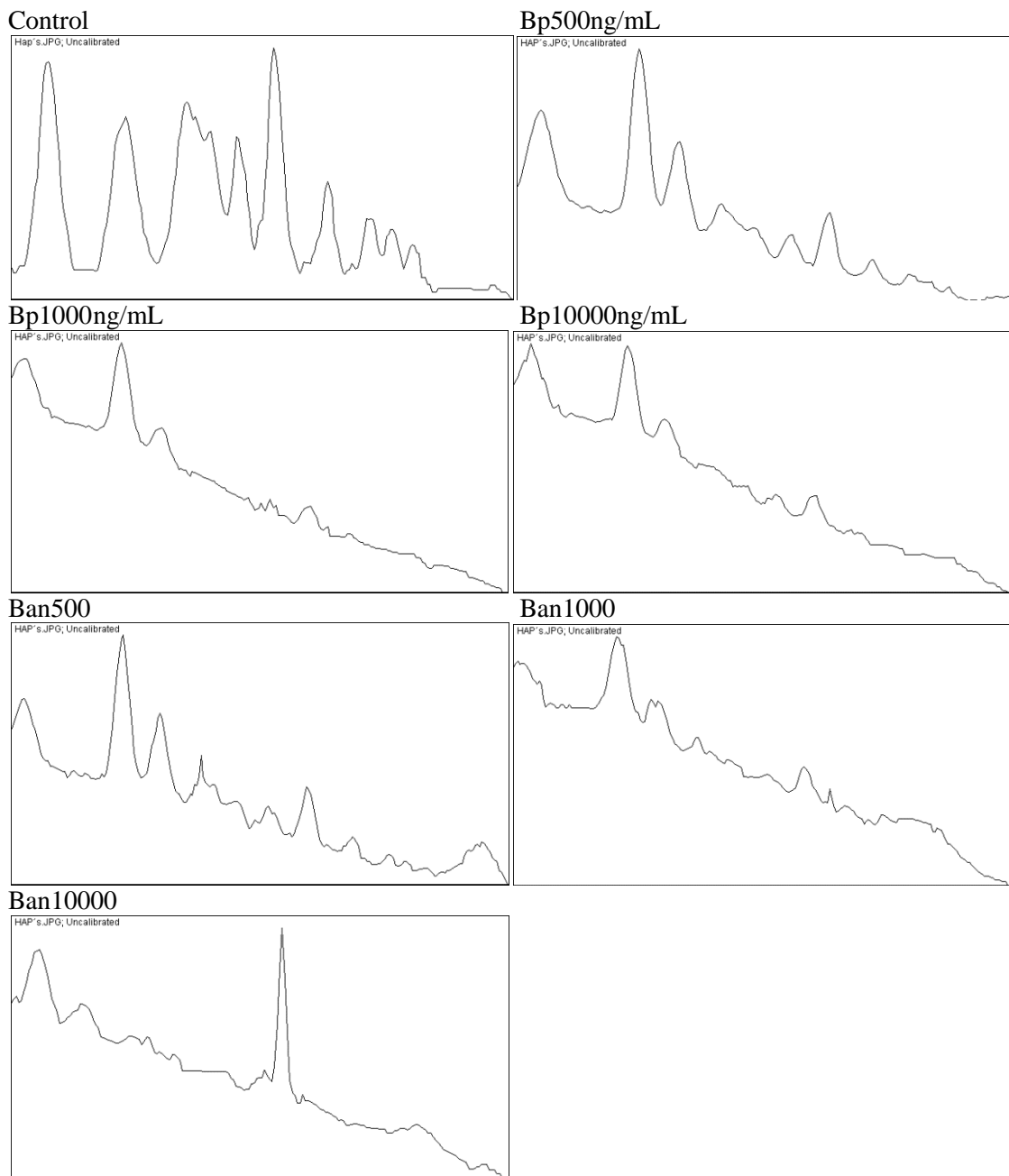


Figura 3: Densitogramas correspondiente a las muestras tratadas con diferentes concentraciones de Bp y Ban (absorbancia en unidades relativas en función de la distancia de migración en unidades relativas)

## **DISCUSIÓN:**

Los HAPs inducen la actividad de enzimas pertenecientes al citocromo p450 las cuales están vinculadas a su metabolización. Esta metabolización implica procesos de oxidación y conjugación. Los epóxidos producidos en el paso intermedio de la oxidación de los HAPs son altamente reactivos, y poseen la capacidad de unirse a moléculas complejas como proteínas y ADN, explicando su capacidad genotóxica.

Las lesiones producidas en el ADN pueden ser reparadas por distintas vías con cierta probabilidad, dependiendo de diversos factores, tanto ambientales, como genéticos y metabólicos. Sin éstos mecanismos podría iniciarse la primera etapa de transformación maligna que podría llevar al desarrollo de cáncer. (19).

La reparación por escisión de nucleótidos (NER) que se realiza con baja probabilidad de error es uno de los sistemas de defensa vital contra los aductos carcinógeno-ADN.

Los aductos formados por la unión del derivado del epóxido del Bp y del Ban, inducen distorsión e inestabilidad en la cadena de ADN.

Algunos autores indican que a nivel humano la exposición al Bp incrementa la actividad de CP1A1, enzima del citocromo P450, y la expresión de la proteína XPA implicada en la reparación NER. (20).

Otros autores mencionan el hecho que el bloqueo de la progresión de la ADN polimerasa de alta fidelidad por encontrarse con la lesión se continúa con el remplazo de la polimerasa replicativa por una o más polimerasas bypass de translesion (síntesis a través de la lesión: TLS). Esta es una vía de reparación que tiene alta probabilidad de reclutar una ADN polimerasa de baja fidelidad, vía postreplicativa RAD6 dependiente. (21). Este sería uno de los mecanismo por el cual se introducen mutaciones en el genoma por la exposición al Bp. (22).

También hay trabajos que aseguran que el bloqueo producido por los agentes químicos que se unen al ADN puede provocar el colapso de la horquilla de replicación creando así rotura en las dos cadenas. En levaduras haploides este tipo de daño implicaría su procesamiento principalmente a través de unión de extremos no homólogos NHEJ. (23).

En resumen las alteraciones a nivel genómico producidos por Bp y Ban pueden deberse a una falla en la reparación escisional NER (sin error), a un procesamiento post posreplicativo dependiente de RAD6 a través de TLS y a un procesamiento de posibles roturas doble de cadena por el mecanismo propenso a error de NHEJ. (24).

Los resultados obtenidos muestran que tanto el Bp como el Ban disminuyen la sobrevivencia de forma significativa a través de los mecanismos previamente analizados. La combinación de ambos compuestos no produjo un cambio significativo en la sobrevivencia (ver gráfica 1).

Por otra parte, la presencia de Bp y Ban producen un aumento significativo en lo que respecta a la frecuencia mutagénica (ver gráfica 2). Cabe destacar la presencia de un probable sinergismo en la frecuencia mutagénica, en la combinación de ambos productos. Habría que realizar más experimentos a futuro para corroborar que existe cierta sinergia en la acción de éstos dos componentes.

El ácido clorogénico es un polifenol que si bien posee propiedades antioxidantes en este caso disminuye la frecuencia mutagénica y aumenta la sobrevivencia no actuando sobre radicales libres sino interviniendo sobre la metabolización de los HAPs y/o modulando las vías de reparación del ADN.

Uno de los mecanismos protectores de la yerba mate puede estar relacionado a su alto contenido en polifenoles los cuales tienen efectos antioxidantes. Además se ha demostrado que la aplicación de polifenoles que se encuentran en vegetales previo a la exposición a HAPs en piel de ratón, reducen su unión al ADN epidérmico y la formación de aductos. También disminuirían la actividad de las enzimas del citocromo P450 tras la exposición a HAP's. El ácido clorogénico es uno de los que se encuentra en mayor parte en esta.

Basándose en los resultados obtenidos en las condiciones experimentales anteriormente descritas, el ácido clorogénico estaría actuando a nivel de los complejos sensores o transductores del daño en el ADN provocado por los HAPs. Esto se evidencia con el aumento de la fracción de sobrevivencia en las muestras de cultivo celular tratadas concomitantemente con el genotóxico y el ácido clorogénico (ver gráfica 1).

Por otra parte también, se produjo una disminución de la frecuencia mutagénica en las muestras con tratamientos combinados de genotóxico y ácido clorogénico en comparación con las muestras tratadas con Bp y/o Ban como únicos agentes.

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

En el TAFE (figura 3) se observa un corrimiento del perfil con respecto al control lo cual significa que existieron dobles roturas del ADN. Estos datos se correlacionan con los datos obtenidos de la frecuencia mutagénica.

Los datos indicarían que el aumento de la frecuencia mutagénica por la acción del Bp y el Ban podría estar ligado a fallas resultantes de la acción de las enzimas endonucleasas de la vía NER cuando hay un gran número de aductos formados en la hebra de ADN. Esto podría provocar la formación de dobles roturas del ADN.

Estas dobles roturas se procesarían a través de un sistema de reparación propenso a error como

es la Unión de Extremos no Homólogo (NHEJ).

Con respecto a los perfiles de TAFEE determinados por la presencia de Bp en las muestras de cultivo celular se observa un corrimiento significativo con respecto al control. Sin embargo a concentraciones de 1000 y 10000 no se observan diferencias significativas.

Este hecho puede deberse a que este tipo de compuestos utilizan transportadores que son saturables explicando el porqué de la similitud entre los perfiles al aumentar la concentración de Bp. Una situación similar ocurre con el Ban..

## **CONCLUSIONES.**

A partir de los datos obtenidos, se concluye que los componentes mutagénicos de las vías de reparación genómica que se ponen en juego frente a derivados del benzo[a]pireno y benzoantraceno se modulan con disminución de flujos en presencia del ácido clorogénico.

Estas vías mutagénicas son fundamentalmente las escisionales (BER, MMR) y las vías de reparación postreplicativa dependientes del gen RAD6/hRAD6 (polimerasas eta y zeta de síntesis translesión). (21; 25). Si falla la vía NER (sin error) podrían procesarse los daños a través de otras vías mutagénicas como son NHEJ y las posreplicativas sujetas a error dependientes de RAD6.

Tomando en cuenta la asociación que existe entre los HAP's y distintos tipos de cáncer y los resultados obtenidos en este estudio y en estudios previos consideramos relevante continuar investigando la interacción entre estos compuestos para comprender mejor la acción del ácido clorogénico y otros polifenoles como factor protector frente a esta enfermedad y las vías a través de las cuales estos actúan.

## **Bibliografía:**

1. Cancer IA for R on. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Alcohol Consum Ethyl Carbamate. 2010;96.
2. Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer. Situación Epidemiológica del Uruguay en relación al Cáncer. 2018;1–61.
3. Mastandrea C, Chichizola C, Ludueña B, Héctor S, Álvarez H, Gutiérrez A. Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos. Acta bioquímica Clínica Latinoam [Internet]. 2005;39(1):27–36. Available from: <http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S0325-29572005000100006&..>
4. Vives Í, Grimalt JO, Guitart R. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos y la salud humana. ApuntCienc y Tecnol [Internet]. 2001;3:45–7. Available from: <http://www.higieneocupacional.com.br/download/hidrocarburos-vives.pdf>
5. Sosa V. Evaluación de los daños producidos por Benzopireno y Benzoantraceno y de su posible reparación y protección por ácido clorogenico en *saccharomycescerevisiae*. Montevideo; 2016.
6. Sevgi K, Tepe B, Sarikurkcü C. Antioxidant and DNA damage protection potentials of selected phenolic acids. Food Chem Toxicol [Internet]. 2015;77:12–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2014.12.006>
7. Filip R, Ferraro GE, Bandoni AL, Bracesco N, Nunes E, Gugliucci A, et al. *Ilexparaguariensis* ). 2009;661(2).
8. Kitts DD, Wijewickreme AN. Effect of dietary caffeic and chlorogenic acids on in vivo xenobiotic enzyme systems. Plant Foods Hum Nutr. 1994;45(3):287–98.
9. Bhattacharyya S, Majhi S, Saha BP, Mukherjee PK. Chlorogenic acid-phospholipid complex improve protection against UVA induced oxidative stress. J PhotochemPhotobiol B Biol [Internet]. 2014;130:293–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.11.020>
- 10- Nunes E, Brum G, Candreva EC, Schenberg – Frascino AC. Common repair pathways acting upon UV and X-ray induced damage in diploid cells of *Saccharomyces cerevisiae*. Int J Radiat Biol. 45: 593- 606. (1984).
- 11- Rose M, Winston, F, Hieter P. Methods in yeast genetics. A laboratory course manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New. York U.S.A. (1990).
- 12- Bastos DHM, Fornari AC, Queiroz YS, Soares RAM, Torres EAFS (2005) The chlorogenic acid and caffeine content of yerba maté (*Ilex paraguariensis*) beverages. Acta FarmaceuticaBonaerense 24

- 13- WHO Regional Office for Europe. Polynuclear aromatic hydrocarbons (PAH). In: Air quality guidelines for Europe. Chapter 5.9. Copenhagen. (2000).
- 14- Kamangar F, Schantz M, Abnet C, Fagundes R, Dawsey S. High Levels of Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Mate Drinks. *Cancer Epidemiology Biomarkers*. 17(5). 1262. (2008).
- 15- Haynes RH. Formal, empirical and mechanistic equations in cellular radiation biology. En: *Quantitative Mathematical Models in Radiation Biology*. Kiefer Ed pp 181-189 Springer – Verlag, Heidelberg Berlin. (1988).
- 16- Severgnini A, Lillo O, Nunes E. Analysis of bleomycin- induced mutagenic function related to the PSO4 (5XS9) gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Environ Mol Mutagen* 1991;18:102–106.
- 17- 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).
- 18- Bauer, T. W., Tubbs, R. R., Edinger, M. G., Suit, P. F., Gephardt, G. N., & Levin, H. S. (1990). A prospective comparison of DNA quantitation by image and flow cytometry. *American Journal of Clinical Pathology*, 93(3), 322–326. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2155525>
- 19- Kropachev K, Kolbanovskii M, Cai Y, Rodríguez F, Kolbanovskii A, Liu Y, Zhang L, Amin S, Patel D, Broyde S, Geacintov NE. The sequence dependence of human nucleotide excision repair efficiencies of benzo[a]pyrene-derived DNA lesions: insights into the structural factors that favor dual incisions. *J Mol Biol*. 13;386(5):1193-203. (2009).
- 20- Wei W, Zhang C, Liu AL, Xie SH, Chen XM, Lu WQ. PCB126 enhanced the genotoxicity of BaP in HepG2 cells by modulating metabolic enzyme and DNA repair activities. *Toxicology letter*. 10;189(2):91-5. (2009).
- 21- Keszenman DJ, Candrev EC, Sánchez AG, Nunes E. RAD6 gene is involved in heat shock induction of bleomycin resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Environ Mol Mutagen*. 45(1):36-43. (2005).
- 22- Jia L, Geacintov NE, Broyde S. The N-clasp of human DNA polymerase kappa promotes blockage or error-free bypass of adenine- or guanine-benzo[a]pyrenyl lesions. *NucleicAcids Res*. 36(20):6571-84. (2008)
- 23- Shrivastav M, De Haro L, Nickoloff JA. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *CellResearch*.18:134–147. doi: 10.1038/cr.2007.111. (2008)
- 24- Blanc L, Cladera M, Brando MV, Gutierrez M, Benedetto L, Falconi A, Torterolo P, Migliaro E, Sánchez A.G , Sosa V, Contreras V, Candreva E.C, Nunes E, Bracesco N.

Yerba mate investigación en Uruguay. Relación entre academia e industria. Congreso Sudamericano de Yerba Mate. Misiones Arg. (2011).

25- Curtin NJ. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nature Rev. Cancer.* 12: 801-817. (2012).



## **AGRADECIMIENTOS:**

Nos gustaría agradecer en primera instancia a nuestra orientadora, la Asist. Lic. Verónica Sosa, que con gran entusiasmo y calidez nos recibió desde el primer día y nos brindó las herramientas necesarias para poder introducirnos en el mundo de la investigación y compartiendo con nosotros todo su conocimiento, queremos reconocer su gran trabajo a lo largo del presente año, estando presente en todo momento para nosotros, siendo una pieza clave para que este trabajo sea posible. Agradecemos también a nuestro co-orientador, el Prof. Adj. Mg. Nelson Bracesco por su apoyo continuo a lo largo de todo el trabajo, y a todo Departamento de Biofísica, sobre todo a los integrantes del laboratorio de radiobiología quienes cordialmente nos abrieron las puertas para poder realizar allí nuestro trabajo. Por último nos gustaría agradecer a Silvina Bartesaghi, quien siempre estuvo presente para responder cualquiera de nuestras dudas sobre las cuestiones metodológicas del trabajo.