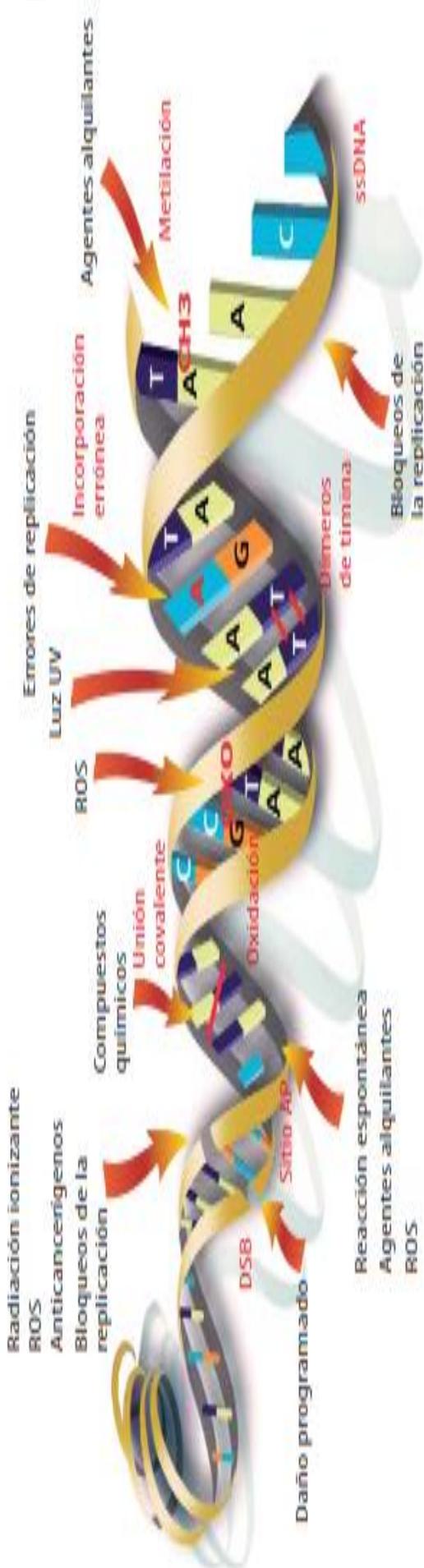


# Análisis de los efectos de la radiación ultravioleta y su modulación por yerba Mate en *Saccharomyces cerevisiae*.



Tesis de grado

Licenciatura en Bioquímica

Br. Amalia Ávila

CI: 3:393.239-7

Tutora. MSc. Verónica Sosa

Cotutora: MSc. Daniela Olsson

Laboratorio de Radiobiología,  
Unida Académica de Biofísica,

Facultad de Medicina

Diciembre 2023





### **Agradecimientos:**

A todos aquellos que participaron en mi formación académica, en especial a mi tutora Mg Verónica Sosa y cotutora Mg Daniela Olsson.

A mi familia y amigos por acompañarme incondicionalmente.



## Índice

1. Resumen.....	5
2. Introducción.....	7
3. Marco teórico.....	9
3.1 Radiación ultravioleta (RUV).....	9
3.2 Sistemas de reparación genómica.....	11
3.2.1 Reparación por escisión de bases (BER).....	12
3.2.2 Reparación por escisión de nucleótidos (NER).....	12
3.2.3 Síntesis a través de la lesión (TLS).....	14
3.2.4 Reparación de rotura de doble hebra.....	15
3.3 Productos naturales con acción protectora.....	16
3.4 Modelo Biológico.....	17
3.5 Interés en el tema de investigación.....	18
4. Hipótesis:.....	18
5. Objetivo.....	18
5.1 Objetivo general.....	18
5.2 Objetivos específicos.....	18
6. Metodología:.....	19
6.1 Cepas de <i>SC</i> .....	19
6.1.1 Mantenimiento de las cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	19
6.1.2 Medios de cultivo.....	19
6.2 Infusión de yerba mate ( <i>Ip</i> ).....	19
6.3 Radiación UV:.....	20
6.4 Crecimiento de las poblaciones celulares.....	20
6.5 Curvas de proliferación celular:.....	20
6.6 Tratamientos.....	21
6.6.1 Curva dosis efecto para UV.....	21
6.6.2 Análisis simples y combinados.....	21
6.7 Fracción de sobrevivida ( <i>Sx</i> ) y frecuencia mutagénica ( <i>FM</i> ).....	21
7. Análisis estadístico.....	22
8. Resultados:.....	23
8.1 Curvas de proliferación celular.....	23
8.2 Curva de sobrevivida celular a dosis de exposición crecientes de RUV.....	24
8.3 Fracción de sobrevivida celular en tratamientos simples y combinados.....	26
8.4 Frecuencia mutagénica a dosis de exposición crecientes de RUV.....	27
8.5 Frecuencia mutagénica en tratamientos simples y combinados.....	28
9. Discusión.....	30
10. Conclusión.....	32
11. Perspectivas.....	32
12. Bibliografía.....	34



## 1. Resumen

La luz solar es un espectro continuo de radiación electromagnética que se divide en tres espectros principales de longitud de onda: ultravioleta, visible e infrarrojo. El rango UV es el espectro más significativo de la luz solar que causa el fotoenvejecimiento y puede causar cáncer de piel. La radiación ultravioleta es un agente físico con acción genotóxica la cual afecta la proliferación celular y genera lesiones en el ADN y en este sentido es que se ha observado una asociación con el desarrollo de cáncer de piel.

Por otro lado, en las últimas décadas se ha observado un interés creciente en el estudio de sustancias naturales que puedan presentar propiedades protectoras o benéficas para el organismo. Esto es de relevancia si se toma en cuenta el alto consumo de “mate” en Uruguay, ya que el contenido de polifenoles en la yerba mate es alto. Estos compuestos han sido estudiados como protectores a nivel celular de los daños producidos por diferentes tipos de genotóxicos. Es así como, basados en la exposición continua a la radiación ultravioleta y al alto consumo de yerba mate, en este trabajo se planteó estudiar “in vivo” los efectos de la radiación ultravioleta a nivel celular y su posible modulación por la infusión de yerba mate utilizando como modelo biológico cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae* tanto salvajes como mutantes en sistemas de reparación genómica.

Los resultados mostraron que frente a la exposición a dosis de exposición crecientes de radiación ultravioleta hubo una disminución de la fracción de sobrevivida, así como un aumento de la frecuencia mutagénica para ambas cepas en estudio. Al analizar las curvas de sobrevivida se observó que a bajas dosis la cepa salvaje (*SJR751*) se comporta más resistente que la cepa triple mutante (*BER<sup>-</sup>/NER<sup>-</sup>/SML1<sup>-</sup>*), pero este comportamiento se invierte a altas dosis. Con respecto a la frecuencia mutagénica la cepa salvaje presenta mayores niveles en todo el rango de dosis de exposición utilizado. Este comportamiento podría explicarse debido a que la inhibición del gen *SML1* en la cepa triple mutante podría mejorar la actividad de reparación del ADN por parte de la proteína *Rev1* habilitando la entrada de la célula en la fase S y la acción de otros sistemas de reparación diferentes a BER y NER.

En los análisis realizados con tratamientos combinados con radiación ultravioleta e infusión de yerba mate se pudo observar una disminución significativa tanto en la letalidad celular, así como en la frecuencia mutagénica para ambas cepas siendo los factores de protección observados mayores en la cepa salvaje.



Los resultados presentados indican que la infusión de yerba mate posee efectos radioprotectores en las condiciones de los experimentos realizados. Esta acción protectora puede deberse a la interacción de los componentes polifenólicos de la yerba mate con las cascadas de oxidorreducción que pueden ser perturbadas por la radiación ultravioleta y/o por regulación y modulación de las vías de reparación genómica produciendo una disminución de los eventos mutagénicos en presencia de la infusión de yerba mate.

Palabras clave: Radiación ultravioleta, vías de reparación, yerba mate, polifenoles.



## 2. Introducción

El ADN se daña de forma espontánea por errores de replicación, cambios tautoméricos, o de manera inducida como consecuencia de diferentes agentes genotóxicos los cuales pueden ser clatogénicos o mutagénicos. Estos últimos pueden ser de origen químico, biológico o físico. (Nunes E. & Gelos U., 2006) Dentro de los agentes físicos se agrupan las radiaciones las cuales pueden ser ionizantes o no ionizantes y entre estas últimas se encuentra la radiación ultravioleta (RUV). (Hall E.J. 2012)

La luz del sol es un espectro continuo de radiación electromagnética que se divide en tres espectros principales de longitud de onda: ultravioleta, visible e infrarrojo. (Soehnge H. & Ouhtit A., 1997) El rango UV es el espectro de luz solar de mayor relevancia ya que es causa del fotoenvejecimiento y cáncer de piel. (Narayanan et al., 2010)

La RUV se subdivide en ultravioleta A [UVA (315-400 nm)], ultravioleta B [UVB (280-315 nm)] y ultravioleta C [UVC (100-280 nm)]. Aproximadamente entre el 90% y el 99% de la energía solar RUV que llega a la superficie terrestre son los rayos UVA, y sólo entre el 1 y el 10% es UVB. (Pastila R. & Leszczynski D., 2007; Miller et al., 1998)

Dicha radiación, a la cual se puede estar expuesto tanto natural como artificialmente a través de lámparas que se utilizan mayormente para broncear la piel, se identifica como carcinógeno que contribuye al desarrollo de cánceres de piel no melanoma así como melanoma maligno. (Teng Y. et al., 2021)

Como consecuencia de la transición demográfico-epidemiológica el cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo. (Perry D.M. et al., 2017; Barrios E. & Garau M., 2017) En nuestro país se registran anualmente unos 15000 casos nuevos de cáncer y más de 8000 muertes son causadas por esta enfermedad. (Barrios E. & Garau M., 2017; Barrios E. et al., 2015)

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano y la incidencia del cáncer de piel es mayor que la de todos los demás cánceres combinados. (Eleni Linos M.D. et al., 2016)

El cáncer de piel distinto al melanoma es el cáncer más frecuente, pero de acuerdo con los estándares internacionales suele excluirse de las estadísticas oficiales por las dificultades que ofrece su registro. (Barrios E. & Garau M., 2017)



El melanoma es el tipo más agresivo de cáncer de piel y en nuestro país, considerando ambos sexos, anualmente se diagnostican aproximadamente 245 casos nuevos. (Barrios E. & Garau M., 2017; Perry D.M. et al., 2017; Narayanan D.L. et al., 2010)

Ya sea para el cáncer de piel tipo melanoma como para el tipo no melanoma su incidencia está aumentando en todo el mundo en las poblaciones blancas y también en las asiáticas, observándose la existencia de un aumento en su incidencia de acuerdo con la ubicación geográfica, incluso dentro de un mismo país. (IARC, 2020)

En Uruguay según cifras publicadas por el Registro Nacional de Cáncer-Comisión Honoraria de lucha contra el Cáncer, el cáncer de piel es la neoplasia más frecuente (expresada en número de casos). En relación con la mortalidad, el cáncer de piel en general (sumados los cánceres de piel no melanoma y melanoma para ambos sexos reunidos) es responsable de más de 130 muertes por año. (Otero C. et al., 2022)

Casi todos los cánceres de piel además de estar relacionados con factores genéticos también lo están, al menos en parte, relacionados con la exposición a la RUV. (Neale R.E., 2023; Watson M. et al., 2016)

Históricamente la sobreexposición a la RUV era consecuencia de la exposición ocupacional a la radiación solar, pero en las últimas décadas ha aumentado de forma muy importante debido a actividades de ocio al aire libre y al bronceado con fines cosméticos. (D'Orazio J. et al., 2013)

La exposición a la RUV de los dispositivos de bronceado suele ser significativamente más intensa que la exposición que se recibiría al aire libre. (Watson M. et al., 2016)

Las medidas preventivas del cáncer de piel incluyen reducir la exposición a la luz ultravioleta y al sol, siendo la detección temprana un factor muy importante que reduce en gran medida la morbilidad y la mortalidad a corto y largo plazo. (Ahmed B. et al., 2020)

En los últimos 30 años se ha observado un interés creciente en el estudio de sustancias naturales que puedan presentar propiedades protectoras o benéficas para el organismo. En particular en nuestra universidad existen investigaciones sobre la capacidad protectora, en particular la capacidad antioxidante, de la yerba mate. (Bracesco N. et al., 2018)

Esto es de relevancia si se toma en cuenta el alto consumo de este producto en Uruguay, mostrando el mayor consumo anual per cápita. Según el informe de la consultora Id Retail del año 2019 los uruguayos consumen alrededor de 10 kilos de yerba mate per cápita al año. (Parlamento uruguayo, 2022) El contenido de polifenoles en la yerba mate



es alto y estos productos han sido estudiados como protectores a nivel celular de los daños producidos por diferentes tipos de genotóxicos. (Sosa V, 2020; Bracesco N. et al., 2018)

Debido a la exposición continua a la RUV ya sea natural o artificial como al alto consumo de yerba mate en nuestro país este trabajo planteó estudiar “in vivo” los efectos de la RUV a nivel celular y su posible modulación por la infusión de yerba mate (*Ip*) utilizando como modelo biológico cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae* tanto salvajes como mutantes en sistemas de reparación genómico.

### **3. Marco teórico**

#### **3.1 Radiación ultravioleta (RUV)**

Como se mencionó en la introducción la RUV es clasificada normalmente en tres clases según el rango de longitud de onda: UVC (100-280 nm), UVB (280-315 nm) y UVA (315-400 nm). La luz solar está compuesta por diferentes tipos de emisiones en las siguientes proporciones: 5,1% de UVA, 0,3% de UVB, 62,7% de luz visible y 31,9% de infrarrojos, ya que la capa de ozono filtra la radiación UVC. (Davies R.J., 1995) Por lo tanto, diferentes regiones atmosféricas absorben por completo las radiaciones UVC y hasta el 95 % de los UVB. (Piñero Piquer E., 2022; D’Orazio J. et al., 2013)

Si bien la exposición a la RUV de la luz solar o de las lámparas y camas solares aumenta el riesgo de la aparición de cáncer, la causa exacta de todos los melanomas no está claramente establecida. (Barrios E. & Garau M., 2017) El rango ultravioleta es el espectro más significativo de la luz solar que causa el fotoenvejecimiento y cáncer de piel en humanos. (Kiefer J.R., 2007; Soehnge H. et al., 1997; Davies R.J., 1995) En este sentido la inmunosupresión ultravioleta se considera el evento carcinogénico más relevante en la piel dado que dicha exposición afecta al sistema inmunológico disminuyendo las funciones de los antígenos e induciendo la producción de citocinas inmunosupresoras. (Narayanan D.L. et al., 2010; Soehnge H. et al., 1997)

A nivel molecular el daño del ADN inducido por RUV juega un papel clave en la fase de iniciación del cáncer de piel. (Mullenders L.H.F., 2018; Kiefer J.R., 2007) En casos donde la reparación de este daño es defectuosa o está ausente y las células dañadas no se eliminan por apoptosis, las lesiones en el ADN manifiestan características mutagénicas contribuyendo a la activación de protooncogénos o a la inactivación de los genes supresores de tumores. (Cadet J. & Douki T., 2018; Soehnge H. et al., 1997) La

química, la naturaleza y la cantidad de daño en el ADN dependen en gran medida de la longitud de onda de los fotones incidentes. (Cadet J. & Douki T., 2018; Hoeijmakers J.H.J., 2009; Rass K. & Reichrath J., 2008)

Los daños, en el ADN, provocados por la RUV se agrupan en daño directo, donde el haz de radiación interactúa directamente con el ADN, o daño indirecto el cual es generado como consecuencia de la interacción de la radiación con las moléculas de agua de la célula formándose como consecuencia especies reactivas del oxígeno (ROS por sus siglas en inglés). (Piñero Piquer E., 2022; D’Orazio J. et al., 2013)

En el daño directo, los principales fotoproductos generados por la radiación UVB son los dímeros de timinas contiguas [tipo ciclobutano o aductos (6-4)] (Figura 1) y, en menor medida, los dímeros de adenina y las pirimidinas fotohidratadas. Respecto a los rayos UVA, los únicos fotoproductos generados son los dímeros de tipo ciclobutano. (Piñero Piquer E., 2022; D’Orazio J. et al., 2013)

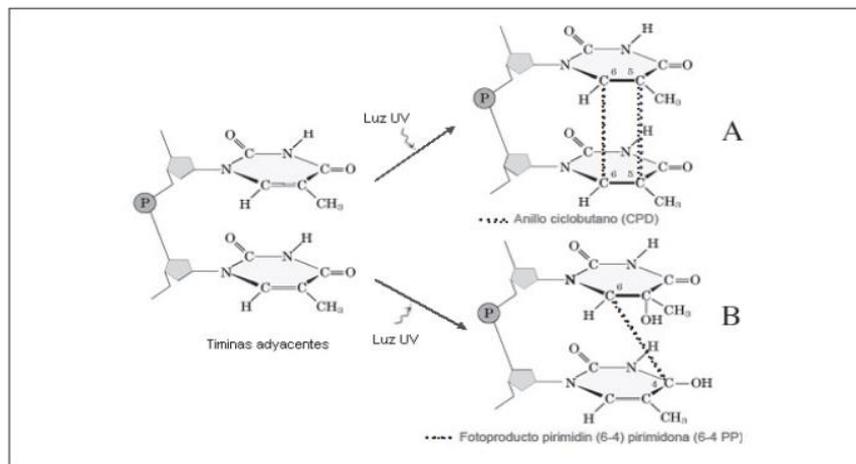


Figura 1. Formación de dímeros de timina inducido por la radiación UV. A: Dímero cis-syn ciclobutano (CPD). B: Fotoproducto pirimidin (6-4) pirimidona (6-4PP). (González-Púmariega et al. 2009)

Por su parte, los daños indirectos, se generan mediante fotosensibilización donde se da una transferencia de energía entre moléculas. Esto se genera a través de reacciones dependientes de la presencia de oxígeno molecular provocando daños de tipo oxidativo en las nucleobases, debido a la formación de ROS. (Piñero Piquer E., 2022; D’Orazio J. et al., 2013)

La principal lesión generada por ROS consiste en modificaciones de bases, las cuales son potencialmente mutagénicas. La 7,8-dihidro-8-oxoguanina (8-oxodG) (Figura 2) es

la más abundante generando una alta probabilidad de mutagénesis. (Callén Moréu E., 2004)

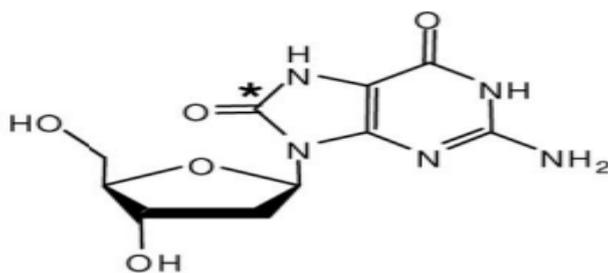


Figura 2: Estructura molecular de 7,8-dihidro-8-oxoguanina (8-oxodG) (Sang S.H., et al., 2007)

Además de provocar daños en las bases del ADN, las ROS también pueden comprometer el esqueleto del ADN causando aproximadamente 2300 roturas de una sola hebra por célula por hora en células de mamíferos. (Henner W.D et al., 1983a, 1983b; Giloni L. et al., 1981)

### 3.2 Sistemas de reparación genómica.

A nivel molecular las lesiones en el ADN afectan directamente la integridad y estabilidad genómica. (Painer & Boulton, 2013; Harper & Elledge, 2007) Dichas lesiones pueden conducir a la formación de reordenamientos cromosómicos que podrían resultar en la activación de oncogenes y/o la pérdida de supresores de tumores. (Bonassi et al., 2007) Las células responden al daño del ADN generando una red de señalización compleja denominada respuesta celular al daño (DDR), de modo de activar la reparación de ese daño, procesos asociados a la reorganización de la cromatina y detención del ciclo celular. (Bartova et al., 2019; Harper & Elledge, 2007) La probabilidad de reparación de estos daños depende de factores genéticos, metabólicos y ambientales. (Chatterjee N. & Walker G.C., 2017; Iyama T. & Wilson D.M., 2013)

Estos procesos de reparación se encuentran presentes en todos los organismos estudiados, con conservación y homologías estructurales y/o funcionales entre especies muy distintas. Todo esto muestra la importancia que tienen los sistemas de reparación para conservar la integridad genómica. (Ronen & Glickman, 2001)

En caso de que el daño en el ADN persista la célula puede activar la muerte celular programada o apoptosis, una respuesta que permite eliminar las células con una inestabilidad genómica extensa. (Chatterjee N. & Walker G.C., 2017)



Existen diferentes vías de reparación del daño, las cuales se encuentran activas en diferentes etapas del ciclo celular: reparación por escisión de bases (BER), reparación por escisión de nucleótidos (NER), recombinación homóloga (HR), unión de extremos no homólogos (NHEJ), la vía de síntesis a través de la lesión (TLS), entre otros. (Sancar A. et al., 2004; Alberts B. et al., 2002)

Por lo extenso de la temática me centrare en describir los sistemas de reparación vinculados al daño por RUV y relacionados a las mutaciones presentes en las cepas en estudio.

### **3.2.1 Reparación por escisión de bases (BER)**

La vía BER es un sistema ubicuo que permite la reparación de lesiones en el ADN al reconocer específicamente y escindir una base dañada. Esta ruta le permite a la célula procesar los daños generados mayormente por ROS ya que las bases son muy sensibles a este tipo de compuestos. También tiene acción reparadora en aquel daño que resulta de la hidrólisis espontanea de bases y de la acción de agentes alquilantes exógenos y endógenos. (Callén Moréu E., 2004)

Este sistema de reparación se da en diversas fases, en el primer paso de esta ruta las bases son eliminadas por alguna de las múltiples enzimas N-glicosilasas generándose un sitioapurínico o apirimidínico (AP). Posteriormente este sitio generado puede ser reconocido por enzimas endonucleasas o liasas que son específicas para los sitios AP. (Friedberg et al., 1995)

En *Saccharomyces cerevisiae* la principal enzima endonucleasa AP es Apn1. Una vez que actúa la enzima endonucleasa se genera un extremo 3'OH que sirve como cebador para la adición de un nucleótido (short patch) o para la síntesis de un fragmento de pocos nucleótidos (long patch) seguido por un último paso de eliminación del extremo de la cadena que fue desplazada durante la síntesis y la ligación de los extremos libres. (Callén Moréu E., 2004; Friedberg et al., 1995)

### **3.2.2 Reparación por escisión de nucleótidos (NER)**

La vía NER es capaz de reparar lesiones voluminosas como la formación de aductos de ADN formados como consecuencia de la exposición a RUV, así como las distorsiones que introducen grandes compuestos aromáticos policíclicos o agentes quimioterapéuticos que unen las dos cadenas de ADN entre sí. (Sosa V., 2013) En humanos la deficiencia de este sistema de reparación conduce al desarrollo de diferentes



síndromes como: xeroderma pigmentosum (XP), asociado a predisposición a cáncer de piel; Síndrome de Cockayne (SC); síndrome raro de sensibilidad a la RUV; y síndrome cerebro-óculo-facio-esquelético (COFS). (Vermeulen & Fousteri, 2013; Friedberg Errol C. et al., 2005)

Dicha vía de reparación del daño se subdivide en dos: una vía de reparación global (GG-NER) y otra acoplada a transcripción (TC-NER), esta última se especializa en restaurar la transcripción inhibida por la RUV al eliminar los fotodímeros que la bloqueaban. (Mullenders L.H.F., 2018; Chatterjee N. & Walker G.C., 2017)

En *Saccharomyces cerevisiae* la vía GG-NER necesita de un complejo trimérico formado por las proteínas Rad4-Rad23-Rad33 que detecta distorsión en la hélice de ADN. (Sosa V., 2020) Una vez reconocido el daño se suma un complejo formado por las proteínas Rad7 y Rad16 que tienen un papel específico en esta ruta. (Hong M. et al., 2017) A continuación, 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. (Sosa V., 2020) Para culminar la reparación es necesaria la escisión dual y el llenado de espacios de forma coordinada previniendo formación de espacios de ADN simple cadena (ADNss) que potencialmente pueden desencadenar la señalización DDR. (Chatterjee N. & Walker G.C., 2017)

La proteína Rad2 y el heterodímero Rad1-Rad10 actúan como endonucleasas específicas de la estructura del ADN realizando una incisión de 15 a 24 nucleótidos de la lesión en el extremo 5' y a 2-8 nucleótidos de la lesión en el extremo 3' respectivamente. (Hong M. et al., 2017; Lafrance-Vanasse et al., 2012) Se elimina el oligonucleótido que queda entre ambos cortes y una polimerasa rellena el hueco, donde posteriormente una ADN ligasa lo sella. (Sosa V., 2020)

Por su parte TC-NER en humanos requiere la ARN polimerasa II y los genes CSA y CSB para la reparación del daño. El factor de transcripción TFIIH junto con la proteína expresada por el gen XPA y la proteína RPA actúan con las proteínas expresadas por los genes XPB y XPD en la etapa de marcado de la lesión. En la etapa de incisión dual actúan en 5' los productos de los genes XPF/ERCC/RAD1, RAD10. En la etapa de síntesis y unión actúan las ADN polimerasas  $\delta$  y/o  $\epsilon$ , PCNA (Antígeno nuclear de células proliferantes), RFC (factor de replicación) y ligasas. (Nunes E. & Gelos U., 2006)

En levaduras las proteínas homologas a las expresadas por los genes CSA y CSB son Rad28 y Rad26 respectivamente y es Rad26 quien se encuentra unida a la ARN



polimerasa II. El bloqueo de la ARN polimerasa II debido a la lesión estabiliza la interacción de la enzima con la proteína Rad26 y el complejo estancado puede transitar por dos caminos dependiendo si la lesión provoca una detención transitoria o permanente. (Spivak G., 2016)

En una lesión de bloqueo moderado la proteína Rad26 promueve un bypass permitiendo que continúe la transcripción que puede estar asociado con la incorporación de ribonucleótidos incorrectos en el ARNm correspondiente y pudiendo darse un proceso denominado "mutagénesis transcripcional". En lesiones que bloquean fuertemente, la ARN polimerasa II se detiene permanentemente sin posibilidad de bypass, y se activa TC-NER con la proteína Rad26 promoviendo la remodelación de la cromatina para atraer factores NER adicionales y después del procesamiento de la lesión la transcripción puede reanudarse rápidamente. (Spivak G., 2016)

### 3.2.3 Síntesis a través de la lesión (TLS)

Algunos daños pueden repararse durante la fase S del ciclo celular, mediante el mecanismo de TLS que se realiza a través de ADN polimerasas altamente conservadas denominadas polimerasas TLS. Estas polimerasas pueden replicar lesiones, del ADN, aberrantes con una fidelidad relativamente menor que las ADN polimerasas replicativas. (Sale J.E., 2013) Este mecanismo puede impulsar la mutagénesis al incorporar nucleótidos incorrectos ya que las tasas de error intrínseco son mayores para las polimerasas de TLS que para las polimerasas replicativas. Sin embargo, las polimerasas especializadas aumentan la estabilidad del genoma contribuyendo a la aptitud general y la evolución de los organismos. (Yang W. & Gao Y., 2018)

En *Saccharomyces cerevisiae*, la reparación mediante TLS lo llevan a cabo Pol $\eta$ , Rev1 y Pol $\zeta$  y la frecuencia de errores de síntesis de ADN durante la reparación a través de la lesión depende de factores tales como si la lesión es similar a la ADN polimerasa TLS particular, de las características bioquímicas de la polimerasa TLS particular y el contexto de la secuencia de ADN. (Rechkoblit O. et al., 2017; Waters L.S. & Walker G.C., 2006; Friedberg Errol C. et al., 2005; McCulloch S.D. et al., 2004; Pages & Fuchs, 2002)

Además de sus funciones tradicionales de derivación del daño del ADN siendo un mecanismo de rescate para la supervivencia de la célula, actualmente se sabe que las polimerasas TLS desempeñan un papel en otras vías celulares e intervienen en las vías



BER y NER para sintetizar ADN nuevo después del paso de escisión. (Chatterjee N. & Walker G.C., 2017)

### 3.2.4 Reparación de rotura de doble hebra (DSB)

Las roturas en el esqueleto azúcar fosfato del ADN se reparan mediante las vías de reparación de roturas de una sola hebra o las vías de reparación de roturas de doble hebra. (Iyama T. & Wilson D.M., 2013; Demple B. & Harrison L., 1994; Henner W.D. et al., 1983a)

Los daños doble hebra son altamente tóxicos y pueden ser inducidos por diferentes agentes químicos y físicos y la no reparación de estos daños está relacionada con patologías tales como el cáncer. (Jackson S.P. & Bartek J., 2009)

Existen dos vías principales para resolver las DSB: recombinación homóloga (HR) y unión de extremos no homólogos (NHEJ). La presencia de una DSB provoca modificación de la cromatina lo que desencadena una cascada de eventos que incluyen la activación de ATM, la fosforilación dirigida de  $\gamma$ H2AX, el reclutamiento de MDC1 y finalmente el reclutamiento de 53BP1 y BRCA1; todas proteínas relacionadas a la respuesta celular al daño. (Chatterjee N. & Walker G.C., 2017)

En el proceso NHEJ una ADN ligasa une los 2 extremos rotos y mediante esta unión de extremos se suelen perder nucleótidos en el sitio de reparación, ya que los extremos rotos pueden ser procesados por nucleasas antes de ser pegados. (Soriano M., 2023) Dado que en mamíferos hay mucho ADN que no codifica para proteínas sus células pueden tolerar una pequeña pérdida de secuencia, haciendo que NHEJ sea un mecanismo de reparación común. En levaduras este proceso es menos frecuente dado que no poseen ADN no codificante de forma abundante. (Soriano M., 2023)

Por su parte, el mecanismo HR es más eficiente ya que utiliza una secuencia homóloga (de cromátida hermana o cromosoma homólogo) para reparar el daño DSB. Este mecanismo implica que la cadena simple hebra generada por el daño invada la hélice hermana y se aparee con la secuencia de la hebra complementaria requiriéndose recombinasas, principalmente la proteína Rad51. Dado que esta reparación por recombinación necesita de una cromátida hermanas sólo puede ocurrir en las fases del ciclo celular en las que la cromátida hermana está disponible o sea en la fase G2. El daño DSB que ocurre en otras fases del ciclo celular será reparado normalmente por NHEJ. (Soriano M., 2023; Friedberg Errol C. et al., 2005)



### 3.3 Productos naturales con acción protectora

Los polifenoles son una gran familia de compuestos naturales que se distribuyen ampliamente en alimentos vegetales, incluidas frutas, verduras, nueces, semillas, flores y cortezas. Las fuentes de polifenoles son la cebolla (flavonoles); cacao, semillas de uva (proantocianidinas); té, manzanas y vino tinto (flavonoles y catequinas); frutas cítricas (flavanonas); bayas y cerezas (antocianidinas); y soja (isoflavonas). (Nichols J.A. & Katiyar S.K., 2010)

En nuestro país un producto altamente consumido como 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. (Bracesco N. et al., 2018; Miranda D. et al., 2008; Filip et al., 2007; Bracesco N., 2003, Bracesco N. et al., 2003; Candreva E. et al., 1993) Se ha observado una acción protectora de la infusión de yerba mate (*Ip*) sobre el genoma que podría ser provocada por una combinación de elementos que involucran los sistemas de reparación, la capacidad antioxidante y el control del ciclo celular. (Bracesco N., 2003; Bracesco N. et al., 2003)

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 mate (STEP-MSP, 2007), siendo entonces esta infusión una fuente para el consumo de ácido clorogénico entre otros antioxidantes.

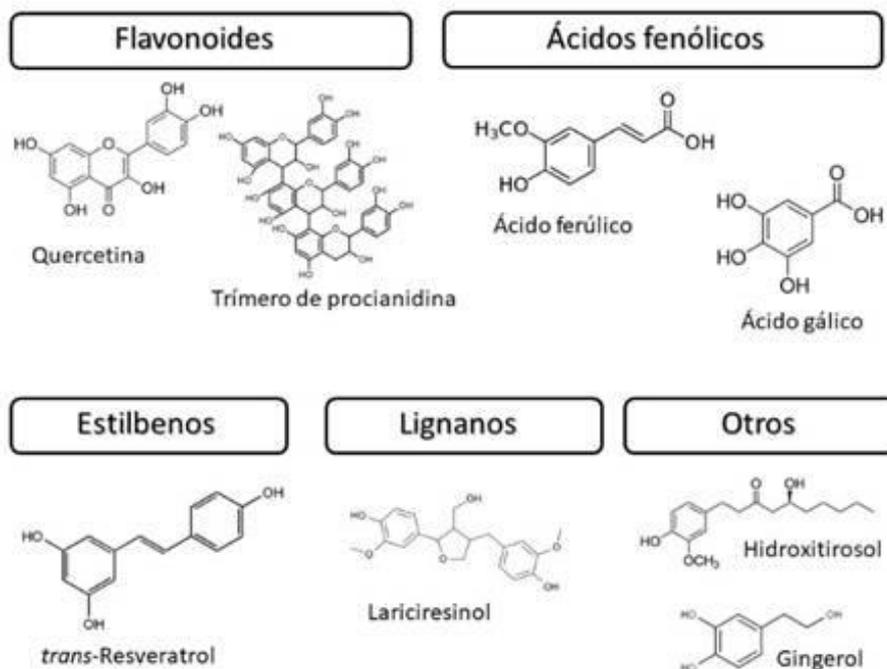


Figura 3. Estructura química de diferentes polifenoles. (Pérez-Jiménez J., 2019)

### 3.4 Modelo Biológico

Las levaduras ofrecen muchas ventajas como modelo de investigación porque tienen genomas relativamente pequeños en comparación con otros eucariotas, además de una importante biblioteca de mutantes con el mismo fondo genético que la cepa madre y facilidades de cultivo. (Fisher H., 2007; Watson J.D., 2006; Walker G.M., 1998)

Las levaduras pertenecen al reino *Fungi*, división *Ascomycetes* y a la clase *Hemiascomycetes* y dentro del género *Saccharomyces* la especie *cerevisiae* ha sido un organismo modelo de investigación desde hace más de 50 años. (Nunes E. et al., 2008; Fisher H., 2007; Watson J.D., 2006; Walker G.M., 1998) El tiempo de generación celular, o sea el tiempo que tarda la célula en atravesar todas las fases del ciclo celular hasta dividirse, es relativamente corto en *Saccharomyces cerevisiae*. Por otro lado, presenta un fácil mantenimiento y multiplicación en el laboratorio además de que existe mucha bibliografía disponible para realizar procesos comparativos. (Herskowitz I., 1988; Spencer J.F.T. et al., 1983)

Por lo tanto, la selección de la levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae* como modelo eucariote se basa en que permite estudiar la reparación del ADN dada su facilidad de manipulación genética y el alto grado de homología entre los genes humanos y de levaduras. (Lillo O. et al., 2011, Botstein D. & Fink G.R., 2011; Nunes E.



et al., 2008; Van Heyningen V., 1997; Foury, 1997; Watson J.D. et. al, 1987; Spencer J.F.T. et al., 1983)

### **3.5 Interés en el tema de investigación**

A partir de la información antedicha en cuanto a la prevalencia del cáncer de piel y a la cultura instalada de exposición a la luz solar con fines estéticos, así como al importante consumo de mate en nuestro País, resulta de interés analizar la posible modulación por *Ip* de los daños producidos por la RUV utilizando como modelo biológico cepas de *Saccharomyces cerevisiae* salvajes, así como mutantes de vías de reparación del ADN.

## **4. Hipótesis:**

La presente investigación propone que la *Ip* podría proteger células de *Saccharomyces cerevisiae* salvajes y mutantes en sistemas de reparación del daño inducido por la RUV.

## **5. Objetivos**

### **5.1 Objetivo general**

Analizar los efectos celulares de la exposición de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* salvajes y mutantes en sistemas de reparación a tratamientos simples y combinados con RUV e *Ip*.

### **5.2 Objetivos específicos**

1. Caracterizar los parámetros de la cinética de proliferación celular de las cepas de estudio.
2. Determinar las curvas de sobrevivencia y frecuencia mutagénica in vitro en función de dosis de exposición crecientes de RUV.
3. Evaluar la probabilidad de sobrevivencia y frecuencia mutagénica, en muestras celulares expuestas in vitro a:
  - a) RUV como único agente.
  - b) *Ip* como único agente (10% v/v).
  - c) tratamiento combinado con RUV e *Ip*.



## 6. Metodología

### 6.1 Cepas de SC

-Cepa *SJR751* (MAT $\alpha$  ade2-101oc his3D200 ura3DNco lys2DBgl leu2-R). (WT)

-Cepa *BER/NER/SML1* deficiente isogénica de *SJR751* (MAT $\alpha$  ade2-101 his3 $\Delta$ 200 ura3 $\Delta$ Nco lys2 $\Delta$ Bgl CAN1 ntg1 $\Delta$ ::LEU2 apn1 $\Delta$ 1::HIS3 ntg2 $\Delta$ ::hisG-URA3- hisG rad1 $\Delta$ ::hisG-URA3- hisG sml1 $\Delta$ ::Kan). (Evert B.A., 2004).

#### 6.1.1 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 M. et al., 1990)

#### 6.1.2 Medios de cultivo

Se utilizaron medios de cultivos nutrientes para el estudio de la sobrevivencia (YPD, YPDA) y selectivos para mutagénesis (OM) habituales para *Saccharomyces cerevisiae*. (Rose M 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).

### 6.2 Infusión de yerba mate (*Ip*)

La yerba que se utilizó para la preparación de la infusión de yerba mate fue de la marca comercial “Canarias”, Origen Rio Grande do Sul Brasil. Se preparó inmediatamente antes de cada experimento, colocando 50 g de yerba en un matraz al que se le agregaron 250 mL de agua destilada a 70  $\pm$  3 °C. Luego se filtró con papel (Watman N° 2) y se esterilizó por filtración con filtros de 0.45 mm. (Bracesco N. et al., 2018).



### **6.3 Radiación ultravioleta:**

Se utilizó una lámpara OSRAM Ultra Vitalux 230V.E27, 300W. Esta lámpara emite en un amplio rango de longitudes de onda con lo cual la dosis de exposición total está compuesta de UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) y UVC (100-280 nm) en una proporción de 0,51; 0,34 y 0,15 respectivamente.

Para realizar la dosimetría se utilizó el radiómetro digital modelo UVX de la marca UVP.

### **6.4 Crecimiento de las poblaciones celulares**

Se tomó una muestra de la cepa a utilizar y se realizó un primer pasaje (1p) a medio de cultivo YPD en condiciones de esterilidad y se incubó de 3 a 4 días a 30°C en un agitador orbital hasta alcanzar la fase estacionaria temprana. A partir de éste primer pasaje se realizó un segundo pasaje (2p) incubando durante la noche a 30°C obteniéndose un cultivo en fase exponencial de crecimiento ( $1-2 \times 10^6$  cel/mL para la construcción de las curvas de proliferación y  $1-2 \times 10^7$  cel/mL para los tratamientos con RUV e *Ip*).

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  $N \pm 10\%$ . (Nunes E. & Gelos U., 2006).

### **6.5 Curvas de proliferación celular:**

A partir del 2p se tomaron alícuotas representativas a diferentes tiempos y durante todo el procedimiento el cultivo se mantuvo incubado en condiciones óptimas de crecimiento. La cámara de Neubauer se cargaba con cada alícuota y se realizaba el conteo del número de células, esto continuó hasta observar que la concentración celular del cultivo no variaba en el tiempo habiendo llegado a una fase estacionaria luego de haber transcurrido por una fase de crecimiento exponencial.

Con los datos obtenidos se construyó una gráfica en escala semilogarítmica con datos de número de células/mL en las ordenadas en escala logarítmica y tiempo en las abscisas en escala lineal.

Se aplicó el modelo logístico para ajustar la curva y se obtuvieron los parámetros de proliferación celular de manera de caracterizar la cinética de crecimiento de las cepas de estudio. (Nunes E. & Gelos U., 2006).



## 6.6 Tratamientos

### 6.6.1 Curva dosis efecto para RUV

Muestras celulares de los cultivos en fase exponencial ( $1-2 \times 10^7$  cel/mL) fueron expuestas a dosis de exposición crecientes de RUV (0; 2,12; 4,24; 6,36; 8,46 KJ/m<sup>2</sup>). Estas dosis fueron obtenidas al exponer las muestras en diferentes tiempos a la RUV (0, 30, 60, 90 y 120 segundos) con una irradiancia de 7 mW/cm<sup>2</sup>.

### 6.6.2 Análisis simples y combinados

Partiendo de cultivos en fase exponencial de crecimiento se los fraccionó en diferentes frascos y se sometieron a los tratamientos simples y sus combinaciones. A continuación, se realizaron las siembras para la determinación de la sobrevivencia y frecuencia mutagénica para todos los tratamientos.

Simple: Tratamientos con RUV (4,24 KJ/m<sup>2</sup>), con *Ip* (10%v/v) por 40 minutos como únicos agentes y un control no tratado.

Tratamientos combinados: Las muestras celulares se incubaron con *Ip* 40 minutos a temperatura óptima y luego se lavaron y resuspendieron en el mismo volumen de agua fría antes de la exposición a RUV (4,24 KJ/m<sup>2</sup>).

Luego de realizadas las curvas dosis efecto tanto para la sobrevivencia celular como para la frecuencia mutagénica se seleccionó la dosis de 4,24 KJ/m<sup>2</sup> para realizar el análisis de las fracciones de sobrevivencia y frecuencia mutagénica en tratamientos simples y combinados. La selección de esta dosis de exposición se basa en los valores de fracción de sobrevivencia y frecuencia mutagénica obtenidos en las curvas respectivas, los cuales proporcionan un cambio sustantivo con respecto a los controles no tratados permitiendo observar cambios apreciables en el caso de que la *Ip* presentara protección.

## 6.7 Fracción de sobrevivencia (S(x)) y frecuencia mutagénica (FM)

Para determinar la fracción de sobrevivencia, las muestras celulares tratadas fueron diluidas de forma seriada de manera de obtener 200-400 células viables las cuales fueron sembradas en medio YPDA en placa de Petri (el ensayo se hizo por triplicado para cada una de las muestras).



A partir de la siembra en placas de Petri con medio YPDA incubadas a 30°C por 3 días se calculó la  $S(x)$  como:

$$S(x,p) = N_s/N_o$$

Donde  $N_s$ : número de células capaces de generar clonas/mL;  $N_o$ : número total de células tratadas/mL;  $x$ : dosis UV;  $p$ : dosis del modulador *Ip*. (Haynes R.H., 1988).

Para determinar la frecuencia mutagénica las muestras tratadas se concentraron 10 veces ( $N = 1 \times 10^8$  cels/mL) y fueron sembradas por triplicado en un volumen de 0.3 mL por placa de Petri conteniendo medio de selección OM. (Keszenman et al., 2000).

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

Se calculó la frecuencia de mutación  $M(x)$  para cada dosis “ $x$ ”, y para la infusión de yerba mate “ $p$ ” de la siguiente manera:

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

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

$N_s(n)$  es el número de sobrevivientes/ mL y para cada dosis única o en combinación. Se calculó además la frecuencia espontánea de mutación a partir del control no tratado. (Eckardt F. & Haynes R.H., 1977).

## 7. Análisis estadístico.

La distribución binomial se aplicó al cálculo de los desvíos standard y errores standard en caso de los eventos binomiales: muerte – sobrevivida y mutación – no mutación. Y 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 sobrevivida y frecuencia mutagénica en las diferentes poblaciones estudiadas. Se utilizó el software SPSS.

## 8. Resultados:

### 8.1 Curvas de proliferación celular

Los datos obtenidos de número de células en función del tiempo para las cepas en estudio se graficaron de forma semilogarítmica. La curva obtenida muestra un comportamiento sigmoide y se ajustó el modelo logístico de crecimiento poblacional con un coeficiente de determinación de  $R^2=0,99$  para las cepas WT y mutante (Figuras 4 y 5). Los parámetros que describen la cinética de proliferación celular como son la concentración máxima de células ( $N_{m\acute{a}x}$ ), el tiempo de generación celular (TGC) y el tiempo medio ( $t_{1/2}$ ) fueron calculados y se observaron diferencias entre las dos cepas. (Tabla 1)

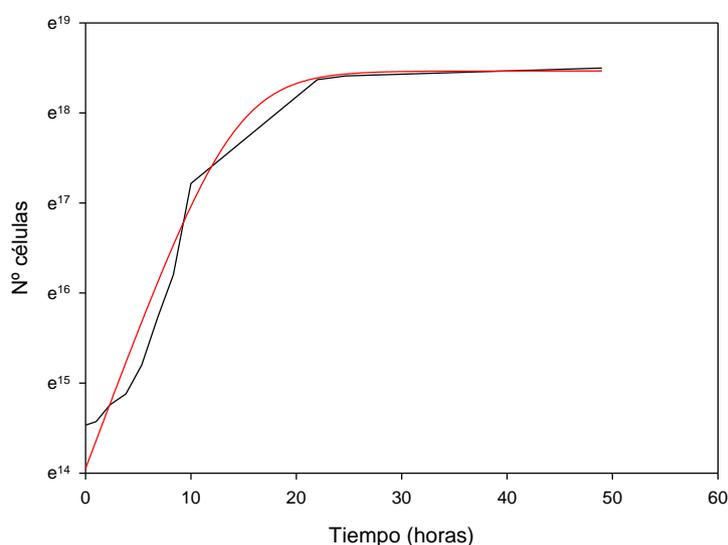


Figura 4: Curva de proliferación celular en escala semilogarítmica para la cepa salvaje *SJR751* (negro) con ajuste de modelo logístico (rojo) (coeficiente de determinación  $R^2=0,99$ )

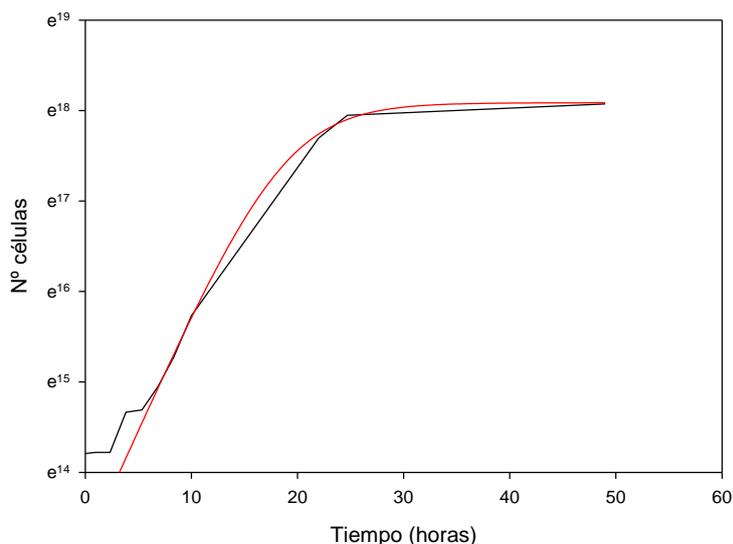


Figura 5: Curva de proliferación celular en escala semilogarítmica para la cepa triple mutante *BER<sup>-</sup>/NER<sup>-</sup>/SMLI<sup>-</sup>* (negro) con ajuste de modelo logístico (rojo) (coeficiente de determinación  $R^2=0,99$ )

Tabla1: Parámetros que caracterizan la cinética de proliferación celular para la cepa salvaje *SJR751* y la cepa triple mutante *BER<sup>-</sup>/NER<sup>-</sup>/SMLI<sup>-</sup>*.

Parámetro	Cepa <i>SJR751</i> (WT)	Cepa <i>BER<sup>-</sup>/NER<sup>-</sup>/SMLI<sup>-</sup></i>
$N_{m\acute{a}x}$	$1 \times 10^8$ cel/mL	$7 \times 10^7$ cel/mL
TGC	2 h 11´	2 h 37´
$t_{1/2}$	13 h 58´	18 h 36´

## 8.2 Curva de sobrevida celular a dosis de exposición crecientes de RUV

En las muestras expuestas a las diferentes dosis de exposición crecientes de RUV (0-8,46 KJ/m<sup>2</sup>) se observó una disminución de la fracción de sobrevida para ambas cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Esta disminución es mayor para la triple mutante *BER<sup>-</sup>/NER<sup>-</sup>/SMLI<sup>-</sup>* a dosis bajas observándose un punto de entrecruzamiento entre ambas curvas de sobrevida celular a una dosis de 5KJ/m<sup>2</sup> a partir de la cual el comportamiento de las cepas de estudio cambia a dosis mayores. Se observa entonces una menor caída en la sobrevida celular para la cepa triple mutante *BER<sup>-</sup>/NER<sup>-</sup>/SMLI<sup>-</sup>* a dosis mayores a 5KJ/m<sup>2</sup> en comparación con la cepa *SJR751* (Tabla 2, Figura 6)

Tabla 2: Fracción se sobrevivida ( $S(x)$ ) y su intervalo de confianza (IC) al 95% en función de dosis de exposición creciente de RUV para la cepa salvaje *SJR751* y la cepa triple mutante *BER<sup>-</sup>/NER<sup>-</sup>/SML1<sup>-</sup>*.

Dosis (KJ/m <sup>2</sup> )	Cepa <i>SJR751</i> (WT)		Cepa <i>BER<sup>-</sup>/NER<sup>-</sup>/SML1<sup>-</sup></i>	
	$S(x)$	IC <sub>95%</sub>	$S(x)$	IC <sub>95%</sub>
0	1,00	0,01	1,00	0,01
2,12	0,56	0,03	0,46	0,03
4,24	0,31	0,03	0,22	0,03
6,36	0,07	0,02	0,15	0,02
8,46	0,08	0,02	0,14	0,02

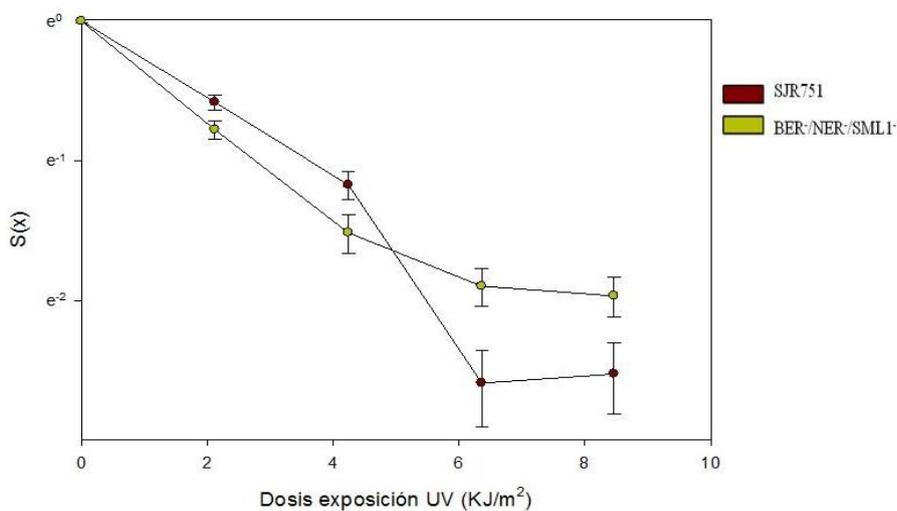


Figura 6: Fracción de sobrevivida ( $S(x)$ ) en función de dosis de exposición creciente de RUV en la cepa salvaje *SJR751* (rojo) y en la cepa triple mutante *BER<sup>-</sup>/NER<sup>-</sup>/SML1<sup>-</sup>* (verde). ( $p \leq 0.05$ ).

### 8.3 Fracción de sobrevivencia celular en tratamientos simples y combinados

En los análisis de sobrevivencia realizados en tratamientos simples y combinados se pudo observar una disminución de la letalidad celular en los tratamientos combinados con RUV e *Ip* para ambas cepas de estudio. La disminución de la letalidad en los tratamientos combinados para la cepa salvaje *SJR751* se dio en un factor de 1,8 y en el caso de la cepa triple mutante *BER<sup>-</sup>/NER<sup>-</sup>/SMLI<sup>-</sup>* el factor de protección fue de 1,6 aproximadamente. Es importante resaltar que la fracción de sobrevivencia no se alteró en los tratamientos con *Ip* como único agente en comparación con la muestra control. (Tabla3, Figura 7)

Tabla 3: Fracción de sobrevivencia ( $S(x)$ ) y su intervalo de confianza (IC) al 95% en los tratamientos simples y combinados para las cepas *SJR751* y *BER<sup>-</sup>/NER<sup>-</sup>/SMLI<sup>-</sup>*. C: control, *Ip*: infusión de yerba mate, RUV: radiación ultravioleta RUV/*Ip*: radiación ultravioleta e infusión de yerba mate.

Muestra	Cepa <i>SJR751</i> (WT)		Cepa <i>BER<sup>-</sup>/NER<sup>-</sup>/SMLI<sup>-</sup></i>	
	$S(x)$	IC <sub>95%</sub>	$S(x)$	IC <sub>95%</sub>
C	1,00	0,01	1,00	0,01
<i>Ip</i>	1,00	0,01	1,00	0,01
RUV	0,31	0,03	0,22	0,03
RUV/ <i>Ip</i>	0,56	0,03	0,37	0,03

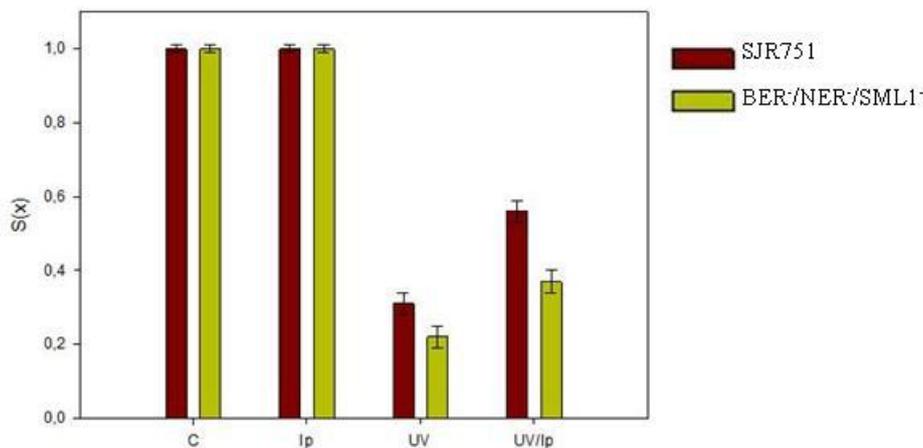


Figura 7: Diagramas de barras que muestran la fracción de supervivencia ( $S(x)$ ) en tratamientos simples y combinados para las cepas *SJR751* (rojo) y *BER-/NER-/SML1-* (verde). *C*: control, *Ip*: infusión de yerba mate, *UV*: radiación ultravioleta *UV/Ip*: radiación ultravioleta e infusión de yerba mate. ( $p \leq 0.05$ ).

#### 8.4 Frecuencia mutagénica a dosis de exposición crecientes de RUV

Se estudió la mutagénesis inducida por la radiación ultravioleta a través del estudio de la reversión del marcador de auxotrofia a heterotrofia *lys*  $\rightarrow$  *LYS* en las cepas de estudio.

En el análisis de frecuencia mutagénica a dosis de exposición crecientes de RUV se observó un aumento de esta tanto para la cepa *SJR751* como para la triple mutante *BER-/NER-/SML1-*.

Al comparar los resultados obtenidos de frecuencia mutagénica para cada dosis entre las cepas se pudo observar que la cepa *SJR751* presenta mayor frecuencia mutagénica y esta diferencia se hace más pronunciada a dosis mayores ( $>5\text{KJ/m}^2$ ). (Tabla 4, Figura 8)

Tabla 4: Frecuencia mutagénica (FM) y su intervalo de confianza (IC) al 95% en función de dosis de exposición crecientes de RUV para la cepa salvaje *SJR751* y la cepa triple mutante *BER<sup>-</sup>/NER<sup>-</sup>/SMLI<sup>-</sup>*.

Dosis (KJ/m <sup>2</sup> )	Cepa <i>SJR751</i> (WT)		Cepa <i>BER<sup>-</sup>/NER<sup>-</sup>/SMLI<sup>-</sup></i>	
	FM	IC <sub>95%</sub>	FM	IC <sub>95%</sub>
0	2,10e-05	9,16e-7	1,89e-05	8,69e-7
2,12	2,11e-04	2,90e-6	6,99e-05	1,67e-6
4,24	2,51e-04	3,17e-6	1,49e-04	2,44e-6
6,36	9,94e-04	6,30e-6	1,94e-04	2,78e-6
8,46	1,34e-03	7,16e-6	2,55e-04	3,19e-6

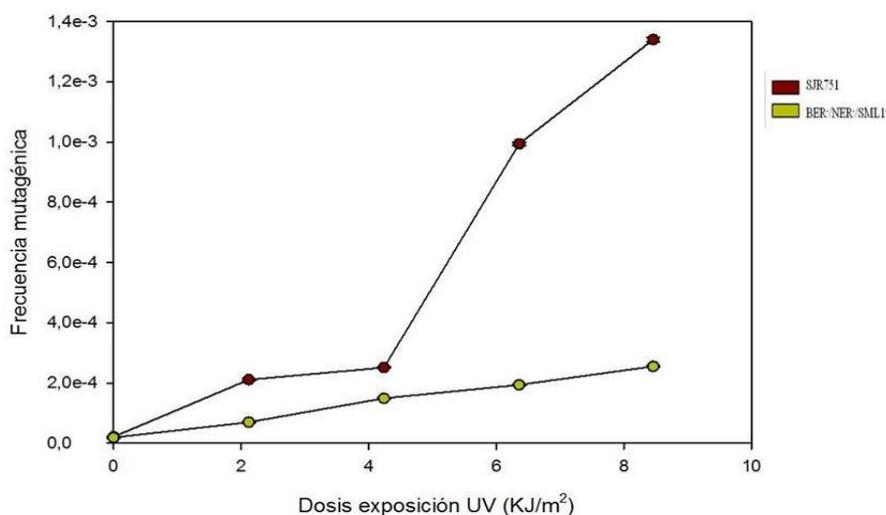


Figura 8: Frecuencia mutagénica (FM) en función de dosis de exposición crecientes de RUV en la cepa *SJR751* (rojo) y en la cepa *BER<sup>-</sup>/NER<sup>-</sup>/SMLI<sup>-</sup>* (verde). ( $p \leq 0,05$ ).

### 8.5 Frecuencia mutagénica en tratamientos simples y combinados

Con relación a la frecuencia mutagénica, se observó en las poblaciones celulares de ambas cepas tratadas con *Ip* como único agente una menor frecuencia mutagénica que en las muestras control, pero esta variación no era significativa. Con respecto a las muestras tratadas con RUV como único agente se observó un aumento de la frecuencia

mutagénica siendo menor este aumento para la cepa triple mutante *BER<sup>-</sup>/NER<sup>-</sup>/SMLI<sup>-</sup>* lo cual se corresponde con los datos obtenidos en las curvas de frecuencia mutagénica en función de dosis de exposición crecientes de RUV.

Por su parte, los tratamientos combinados con RUV e *Ip* mostraron una disminución de la frecuencia mutagénica en ambas cepas de estudio, siendo mayor esta disminución para la cepa *SJR751* (factor de protección de 9,7) que para la cepa triple mutante *BER<sup>-</sup>/NER<sup>-</sup>/SMLI<sup>-</sup>* (factor de protección 2,5). (Tabla 5, Figura 9).

Tabla 5: Frecuencia mutagénica (FM) y su intervalo de confianza (IC) al 95% en los tratamientos simples y combinados para las cepas *SJR751* y *BER<sup>-</sup>/NER<sup>-</sup>/SMLI<sup>-</sup>*. C: control, *Ip*: infusión de yerba mate, RUV: radiación ultravioleta RUV/*Ip*: radiación ultravioleta e infusión de yerba mate.

Muestra	Cepa <i>SJR751</i> (WT)		Cepa <i>BER<sup>-</sup>/NER<sup>-</sup>/SMLI<sup>-</sup></i>	
	FM	IC <sub>95%</sub>	FM	IC <sub>95%</sub>
C	2,10e-05	9,16e-7	1,89e-05	8,69e-7
<i>Ip</i>	1,12e-05	6,69e-7	1,03e-05	6,42e-7
RUV	2,04e-04	2,85e-6	1,49e-04	2,44e-6
RUV/ <i>Ip</i>	3,45e-05	1,17e-6	5,87e-05	1,53e-6

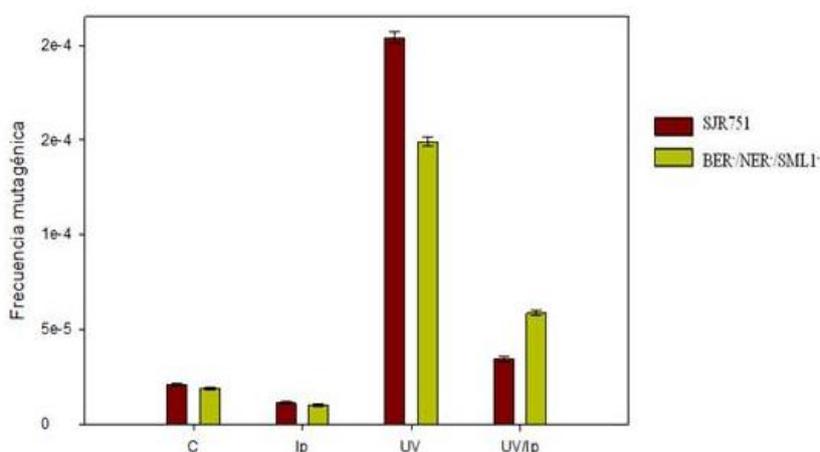


Figura 9: Diagramas de barras que muestran frecuencia mutagénica (FM) en tratamientos simples y combinados para la cepa *SJR751* (rojo) y *BER<sup>-</sup>/NER<sup>-</sup>/SMLI<sup>-</sup>* (verde). C: control, *Ip*: infusión de yerba mate, UV: radiación ultravioleta UV/*Ip*: radiación ultravioleta e infusión de yerba mate. ( $p \leq 0.05$ ).



## 9. Discusión

Los resultados obtenidos indicarían la existencia de uno o más mecanismos de defensa celular ya sea por componentes de la *Ip* con capacidad antioxidante de atrapamiento de especies reactivas que podrían formarse por la exposición a la RUV como acción indirecta del daño sobre el ADN o por acción sobre componentes de las vías de control del ciclo celular y reparación del ADN. (Sajadimajd S. et al., 2020, Bracesco et al., 2018)

Los antioxidantes contenidos en *Ip*, pueden cambiar la generación y el destino de las ROS inducidas por la radiación, dependiendo de su concentración y el potencial redox de los componentes involucrados.

Resulta de gran interés analizar el comportamiento de las cepas estudiadas con respecto a las curvas dosis efecto tanto para sobrevivencia celular como para mutagénesis. Esto permitiría vislumbrar la importancia de las vías de reparación afectadas y la relevancia que pueden tener para modular la letalidad y poder mutagénico de la RUV en estos organismos.

La cepa triple mutante presenta inhibidas las vías de reparación escisionales de base y de nucleótidos, así como también la expresión de la proteína Sml1.

Con respecto a la inhibición del gen SML1 se sabe que la proteína expresada por este gen, la proteína Sml1, es capaz de interactuar físicamente con la proteína Rev1 la cual está relacionada con la reparación del daño por medio de la vía de síntesis a través de la lesión. Este mecanismo de reparación implica realizar un bypass de la lesión durante la fase de replicación del ADN e involucra la acción de polimerasas específicas de este tipo de reparación, siendo en levaduras un ejemplo importante de estas polimerasas la Rev1. (Yao R. et al., 2020, Anderson B.L. et al., 2010)

Se ha observado que Sml1 es una proteína inhibidora de la enzima ribonucleótido reductasa de *Saccharomyces cerevisiae*. La concentración de dicha proteína a lo largo del ciclo celular fluctúa, siendo los más bajos durante la fase S. Además, se ha visto que Sml1 participa en el daño y la reparación del ADN siendo fosforilada y posteriormente degradada, mecanismo regulado por las proteínas quinasas Mec1 y Rad53. Es así como ciertos estudios han identificado a Sml1 como un factor en la inhibición de la fosforilación de Rev1 lo cual llevaría a una vía TLS defectuosa. (Yao R. et al, 2020; Anderson B.L., 2010)



Esta información recogida de la bibliografía podría explicar el comportamiento de las cepas en cuanto a los valores observados de la fracción de sobrevivida y la frecuencia mutagénica en función de la dosis de RUV.

Al analizar las curvas de sobrevivida se observa que a bajas dosis la cepa salvaje se comporta más resistente que la cepa triple mutante invirtiéndose esto a altas dosis. Este comportamiento podría explicarse a través de la asociación de altas dosis con la acumulación de daño en la cepa salvaje, lo que implicaría múltiples cortes a lo largo de la hebra de ADN provocando la generación de dobles roturas. Dichos cortes serían consecuencia de la acción de los sistemas de reparación escisionales, en especial de nucleótidos. Es conocido que este tipo de lesiones son las más difíciles de procesar y conllevan una mayor probabilidad de letalidad celular. (Mullenders L.H.F., 2018; Iyama T. & Wilson D.M., 2013)

Dado que la cepa triple mutante no puede reparar las lesiones a través de las vías escisionales y tiene a su vez inhibida la expresión de la proteína Sml1, la célula podría transcurrir hacia la fase S. En este contexto las condiciones serían favorables para que la reparación de las lesiones se diera a partir de vías alternativas de reparación como la síntesis a través de la lesión conllevando una menor probabilidad de letalidad celular. (Yao R. et al., 2020; Anderson B.L. et al., 2010)

Por otra parte, en las curvas de frecuencia mutagénica en función de las dosis de exposición de RUV se observó que la cepa salvaje tiene una mayor frecuencia mutagénica a lo largo de todo el rango de dosis de exposición en comparación con la cepa triple mutante.

Esta diferencia observada puede estar relacionada con la probabilidad de reparación propensa a error. En el caso de la cepa salvaje el posible aumento de la generación de dobles roturas de ADN puede estar activando la reparación por unión de extremos no homólogos el cual como se mencionó anteriormente es un sistema propenso a error. (Mullenders L.H.F., 2018; Iyama T. & Wilson D.M., 2013; Anderson B.L. et al., 2010)

Para la cepa triple mutante al tener la posibilidad de transcurrir hacia la fase S y activar otros tipos de sistemas de reparación aumentaría la probabilidad de que las dobles roturas generadas sean reparadas en la fase G2 a través del sistema de reparación recombinacional homóloga el cual es un sistema libre de error disminuyendo así la probabilidad de mutagénesis. (Mullenders L.H.F., 2018; Iyama T. & Wilson D.M., 2013)



Sería interesante en futuros trabajos explorar la probabilidad de generación de dobles roturas utilizando técnicas que permitan cuantificar esta lesión en diferentes cepas y en distintas condiciones.

También sería de interés analizar a qué nivel específicamente estarían actuando los componentes aislados de la *Ip* proporcionando protección, así como realizar los experimentos combinados con RUV e *Ip* a diferentes dosis de exposición. La dosis elegida para este trabajo se encuentra en el rango de dosis donde la cepa salvaje se muestra menos sensible en cuanto a la letalidad que su contraparte mutante. Si se comparan los factores de protección observados entre ambas cepas en presencia de pretratamiento con *Ip* se evidencia (tanto en fracción de sobrevivida como en frecuencia mutagénica) una mayor protección para la cepa salvaje.

Estos resultados indicarían que la acción de los compuestos bioactivos de *Ip* estarían modulando los sistemas de reparación involucrados en el procesamiento del daño generado, antes que actuar como antioxidante evitando la formación del daño en sí. (Bracesco N. et al., 2018; Miranda D. et al., 2008; Filip et al., 2007; Bracesco N., 2003, Bracesco N. et al., 2003; Candreva E. et al., 1993)

## 10. Conclusión

Los resultados presentados aquí indican que la infusión de yerba mate posee efectos radioprotectores en las condiciones de los experimentos realizados.

Esta acción protectora puede deberse a la interacción de los componentes polifenólicos de la yerba mate con las cascadas de oxidorreducción que pueden ser perturbadas por la RUV y/o por regulación y modulación de las vías de reparación genómica produciendo una disminución de los eventos mutagénicos en presencia de *Ip*.

## 11. Perspectiva

Al indicar los resultados obtenidos en este trabajo que la *Ip* presenta capacidad protectora frente a los daños inducidos por la RUV usando cepas de *Saccharomyces cerevisiae* salvajes y mutantes en las vías de reparación genómica 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 de *Ip*.

Es posible plantear a futuro, estudios celulares y moleculares como:



- Analizar las fracciones de sobrevivencia y frecuencias mutagénicas en muestras celulares tratadas en combinación con *Ip* y dosis de exposición de RUV mayores a la utilizada en este trabajo en los tratamientos combinados, de forma de estudiar la zona donde la cepa triple mutante se comportó menos sensible que la salvaje.
- Estudiar la generación de dobles roturas en el ADN debido a la exposición a la RUV en las diferentes cepas y su posible modulación por la presencia de *Ip*.
- Cuantificar las especies reactivas del oxígeno que se generan en muestras celulares tratadas con RUV y observar si estas disminuyen en presencia de *Ip*.
- Realizar estudios del daño en el ADN mediante el ensayo cometa sobre las muestras celulares en sus diferentes tratamientos para estudiar los diferentes tipos de daños generados por la RUV.



## 12. Bibliografía:

**Ahmed B**, Qadir MI, Ghafoor S. Malignant Melanoma: Skin Cancer-Diagnosis, Prevention, and Treatment. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* (2020)

**Alberts, B.**, Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. DNA repair. En *Molecular biology of the cell* (4ta ed.). Nueva York, NY: Garland Science. (2002)

**Andreson BL**, Gupta A, Georgieva BP y Rothstein R. The ribonucleotide reductase inhibitor, Sml1, is sequentially phosphorylated, ubiquitylated and degraded in response to DNA damage. *Nucleic Acids Res.* (2010)

**Barrios E** & Garau M. Cáncer: magnitud del problema en el mundo y en Uruguay, aspectos epidemiológicos. *Anales de la Facultad de Medicina.* (2017)

**Barrios E**, Musetti C, Alonso R. y Garau M. V. Atlas de mortalidad por cáncer en el Uruguay 2009-2013. Montevideo: Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer. (2015)

**Botstein D.** & Fink GR. *Yeast: An Experimental Organism for 21st Century Biology.* Genetics. (2011)

**Bracesco N**, Sosa V, Blanc L, Contreras V, Candreva EC, Salvo VA, Hocart S, Mechoso B, Nunes E. Analysis of radioprotection and antimutagenic effects of *Ilex paraguariensis* infusion and its component rutin. *Braz J Med Biol Res.* (2018)

**Bracesco N**, Dell M, Rocha A, Behtash S, Menini T, Gugliucci A, Nunes E. Antioxidant activity of a botanical extract preparation of *Ilex paraguariensis*, prevention of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* and human low-density lipoprotein oxidation. *Journal of Alternative and Complementary Medicine.* (2003).

**Bracesco N.** Exploración del efecto protector frente a radicales libres de los derivados de la uva (*Vitis vinífera* Cv. Tannat) y de la infusión de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) en *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de Maestría en Biotecnología. Montevideo. (2003)



**Cadet J. & Douki T.** Formation of UV-induced DNA damage contributing to skin cancer development. *Photochemical and Photobiological Sciences* 17 Royal Society of Chemistry. (2018)

**Callén Moréu, E.** Genética y biología molecular de la anemia de Fanconi. Tesis doctoral Departament de Genètica i de Microbiologia. Universitat Autònoma de Barcelona (2004)

**Candrea E, Keszenman DJ, Barrios E, Gelós U, Nunes E.** Mutagenicity induced by hyperthermia, hot mate infusion and hot caffeine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cancer Res.* (1993)

**Chatterjee N & Walker GC.** Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen.* (2017)

**Davies RJ.** Royal Irish Academy Medal Lecture. Ultraviolet radiation damage in DNA. *Biochem Soc Trans.* (1995)

**Demple B & Harrison L.** Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annu Rev Biochem.* (1994)

**D'Orazio J, Jarrett S, Amaro-Ortiz A, Scott T.** UV radiation and the skin. *Int J Mol Sci.* (2013)

**Eckardt F & Haynes RH.** Kinetics of mutation induction by ultraviolet light in excision deficient yeast. *Genetics.* (1977)

**Eleni Linos MD, Chren M.M., Stijacic Cenzer I. y Covinsky K.E.** Skin cancer in US elderly adults: does life expectancy play a role in treatment decisions? *J. Am. Geriatr. Soc.* (2016)



**Evert BA**, Salmon TB, Song B, Jingjing L, Siede W, Doetsch PW. Spontaneous DNA Damage in *Saccharomyces cerevisiae* Elicits Phenotypic Properties Similar to Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry*. (2004)

**Filip R**, Turner S, Ferraro G, Anesini C. Effect of Ilex extracts and isolated compounds on peroxidase secretion of rat submandibular glands. *Food Chem. Toxicol.* (2007)

**Fisher H**. Benzo(a)pyrene induced mutagenesis of *Saccharomyces cerevisiae*. Cantaurus, (2007)

**Friedberg Errol C**, Siede Wolfram, Wood Richard D, Schultz Roger A, Ellenberger Tom. DNA Repair and Mutagenesis. (2005)

**Friedberg E. C.**, Walker G. C., and Siede W. Molecular Pathologies: DNA Repair and Mutagenesis. ASM Press, Washington, DC, (1995).

**Foury F**. Human genetic diseases: a cross-talk between man and yeast. *Gene*. (1997)

**Giloni L**, Takeshita M, Johnson F, Iden C, Grollman AP. Bleomycin-induced strand-scission of DNA. Mechanism of deoxyribose cleavage. *J Biol Chem*. (1981)

**González-Púmariega, M.**, Tamayo, M. V., & Sánchez-Lamar, Á. La radiación ultravioleta. Su efecto dañino y consecuencias para la salud humana. *Theoria*, (2009)

**Hall, Eric J**. Radiobiology for the radiologist / Eric J. Hall, Amato J. Giaccia. 7th ed (2012)

**Haynes RH**. Formal, empirical and mechanistic equations in cellular radiation biology. En: *Quantitative Mathematical Models in Radiation Biology*. Berlin: Kiefer Ed; (1988).

**Henner WD**, Grunberg SM, Haseltine WA. Enzyme action at 3' termini of ionizing radiation-induced DNA strand breaks. *J Biol Chem*. (1983 a)



**Henner WD**, Rodriguez LO, Hecht SM, Haseltine WA. gamma Ray induced deoxyribonucleic acid strand breaks. 3' Glycolate termini. *J Biol Chem.* (1983 b)

**Herskowitz I.** Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol* (1988).

**Hoeijmakers JHJ.** DNA Damage, Aging, and Cancer. *New England Journal of Medicine.* (2009)

**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 technology.* (2017)

**IARC.** (International Agency for Research on Cancer). Organización mundial de la salud. *World Cancer Research.* (2020)

**Iyama T**, Wilson DM. 3rd. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair (Amst).* (2013)

**Jackson SP & Bartek J.** The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature.* (2009)

**Keszenman D**, Candreva C, Nunes E. Cellular and molecular effects of bleomycin are modulated by heat shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res.* (2000)

**Kiefer JR.** In: *Effects of Ultraviolet Radiation on DNA.* Günter Obe V, editor. Berlin; New York: Springer; (2007)

**Lafrance-Vanasse J**, Williams GJ, Tainer JA. Envisioning the dynamics and flexibility of Mre11-Rad50-Nbs1 complex to decipher its roles in DNA replication and repair. *Prog Biophys Mol Biol.* (2015)



**Lillo O**, Bracesco N, Nunes E. Lethal and mutagenic interactions between  $\gamma$ -rays, cisplatin and etoposide at the cellular and molecular levels. *Int J Radiat Biol.* (2011)

**McCulloch SD**, Kokoska RJ, Kunkel TA. Efficiency, fidelity and enzymatic switching during translesion DNA synthesis. *Cell Cycle.* (2004)

**Miller SA** & Hamilton SL, Wester UG, et al. An analysis of UVA emissions from sunlamps and the potential importance for melanoma. *Photochem Photobiol* (1998)

**Miranda D**, Arçari D, Pedrazzoli Jr J, de O. Carvalho P, Cerutti S, Bastos D, Ribeiro M. Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage and DNA repair in mice. *Mutagenesis.* (2008).

**Mullenders LHF**. Solar UV damage to cellular DNA: from mechanisms to biological effects. *Photochem Photobiol Sci.* (2018)

**Narayanan DL**, Saladi RN, Fox JL. Ultraviolet radiation and skin cancer. *Int J Dermatol.* (2010).

**Neale, R.E., Lucas, R.M., Byrne, S.N.** The effects of exposure to solar radiation on human health. *Photochem Photobiol Sci* (2023).

**Nichols JA**, Katiyar SK. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Arch Dermatol Res.* (2010)

**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.* 2008 Apr;34(1-2):63-71. doi: 10.1007/s10867-008-9105-0. Epub Aug 13. PMID: 19669493; PMCID: PMC2577742. (2008)

**Nunes E** & Gelos U. Proliferación celular y su perturbación: aspectos cuantitativos y moleculares. Montevideo: OFICINA DEL LIBRO-FEFMUR (2006)



**Otero, Camila**, Sellanes, Sofía, Dufrechou, Lídice, Nicoletti, Sofía, & Larre Borges, Alejandra. Prevención de Cáncer de Piel en el Hospital de Clínicas: ¿Qué sabe el personal de salud? *Anales de la Facultad de Medicina*. (2022)

**Pages V & Fuchs RP**. How DNA lesions are turned into mutations within cells? *Oncogene*. (2002)

**Parlamento del Uruguay**. Cámara de representantes. Noticias. Plantación de yerba mate. (2022)

**Pastila R & Leszczynski D**. Ultraviolet-A radiation induces changes in cyclin G gene expression in mouse melanoma B16-F1 cells. *Cancer Cell Int* (2007)

**Pérez-Jiménez J**. Polifenoles de la dieta y enfermedades cardiometabólicas. ANALES RANM [Internet]. Real Academia Nacional de Medicina de España; An RANM. (2019)

**Perry DM**, Barton V, Alberg AJ. Epidemiology of Keratinocyte Carcinoma. *Curr Dermatol Rep* 6 Current Medicine Group (2017).

**Piñero Piquer, E**. DNA photorepair by model systems Universitat Politècnica de València. (2022).

**Rass K**, Reichrath J. UV Damage and DNA Repair in Malignant Melanoma and Nonmelanoma Skin Cancer. In: *Sunlight, Vitamin D and Skin Cancer*. New York, NY: Springer New York, (2008)

**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*. (2017).

**Ronen A.** & Glickman BW. Human DNA repair genes. *Environ Mol Mutagen*. (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).



**Sajadimajd S**, Bahramsoltani R, Iranpanah A, Kumar Patra J, Das G, Gouda S, Rahimi R, Rezaeiamiri E, Cao H, Giampieri F, Battino M, Tundis R, Campos MG, Farzaei MH, Xiao J. Advances on Natural Polyphenols as Anticancer Agents for Skin Cancer. *Pharmacol Res.* (2020)

**Sale J.E.** Translesion DNA synthesis and mutagenesis in eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* (2013)

**Sancar A**, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kaçmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem.* (2004)

**Sang Soo Hah**, Janna M. Mundt, Hyung M. Kim, Rhoda A. Sumbad, Kenneth W. Turteltaub, and Paul T. Measurement of 7,8-dihydro-8-oxo-2-deoxyguanosine metabolism in MCF-7 cells at low concentrations using accelerator mass spectrometry. *Henderson PNAS.* (2007)

**Soehnge H**, Ouhtit A, Ananthaswamy ON. Mechanisms of induction of skin cancer by UV radiation. (1997).

**Soriano María.** Nueva función de la ruta de la proteína quinasa C en el mantenimiento de la integridad genómica. Tesis Doctoral. Departament de Bioquímica i Biologia Molecular. Universitat de València. (2023).

**Sosa V.** Análisis de posibles efectos protectores del a yerba mate y sus componentes frente a agentes genotóxicos. Tesis de licenciatura en Bioquímica. Facultad de ciencias Udelar. (2013).

**Sosa V.** 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*. Tesis de Maestría. Laboratorio de Radiobiología. Facultad de Medicina. Udelar. (2020).

**Spencer J.F.T.**, Spencer D.M., Smith A. Yeast Genetics. Fundamental and Applied Aspects. Springer New York. (1983).



**Spivak G.** Transcription-Coupled Repair: an update Arch Toxicol. (2016).

**STPE-MSP.** Encuesta sobre salud, Uruguay (2007).

**Teng Y, Yu Y, Li S, Huang Y, Xu D, Tao X and Fan Y** Ultraviolet Radiation and Basal Cell Carcinoma: An Environmental Perspective. Front. Public Health. (2021)

**Van Heyningen V.** Model organisms illuminate human genetics and disease. Molecular Medicine. (1997)

**Vermeulen W, Fousteri M.** Mammalian transcription-coupled excision repair. Cold Spring Harb Perspect Biol. (2013)

**Walker G.M.** Yeast Physiology and Biotechnology Wiley. (1998)

**Waters L.S. & Walker GC.** The critical mutagenic translesion DNA polymerase Rev1 is highly expressed during G (2)/M phase rather than S phase. Proc Natl Acad Sci U S A. (2006)

**Watson J.D., Hopkins H, Roberts JW, Steitz JA, Weiner AM.** Molecular Biology of the gene. California USA: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc; (1987)

**Watson J.D.** Biología Molecular de Gen. Editorial Médica Panamericana. (2006)

**Watson M, Holman DM, Maguire-Eisen M.** Ultraviolet Radiation Exposure and Its Impact on Skin Cancer Risk. Semin Oncol Nurs. (2016)

**Yang W, Gao Y.** Translesion and Repair DNA Polymerases: Diverse Structure and Mechanism. Annu Rev Biochem. (2018)

**Yao R, Zhou P, Wu C, Liu L, Wu J.** Sml1 inhibits the DNA repair activity of Rev1 in *Saccharomyces cerevisiae* during oxidative stress. Appl Environ Microbiol (2020)