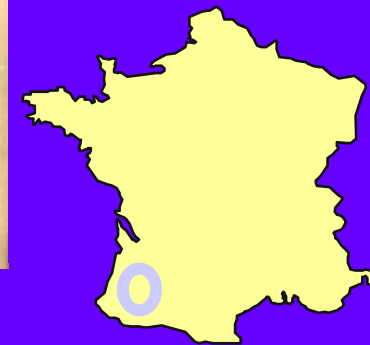


**LABORATORIO DE
RADIOBIOLOGIA
Dpto. de Biofísica
Fac. de Medicina**

Vitis vinifera L. cv Tannat

- Origen: Pirineos (Francia)
- Introducida en Uruguay por Harriague (1874).
- Mayores viñedos en : Madiran (Francia) y Uruguay.



Aromas

Gusto

Placer

Capacidad Antioxidante

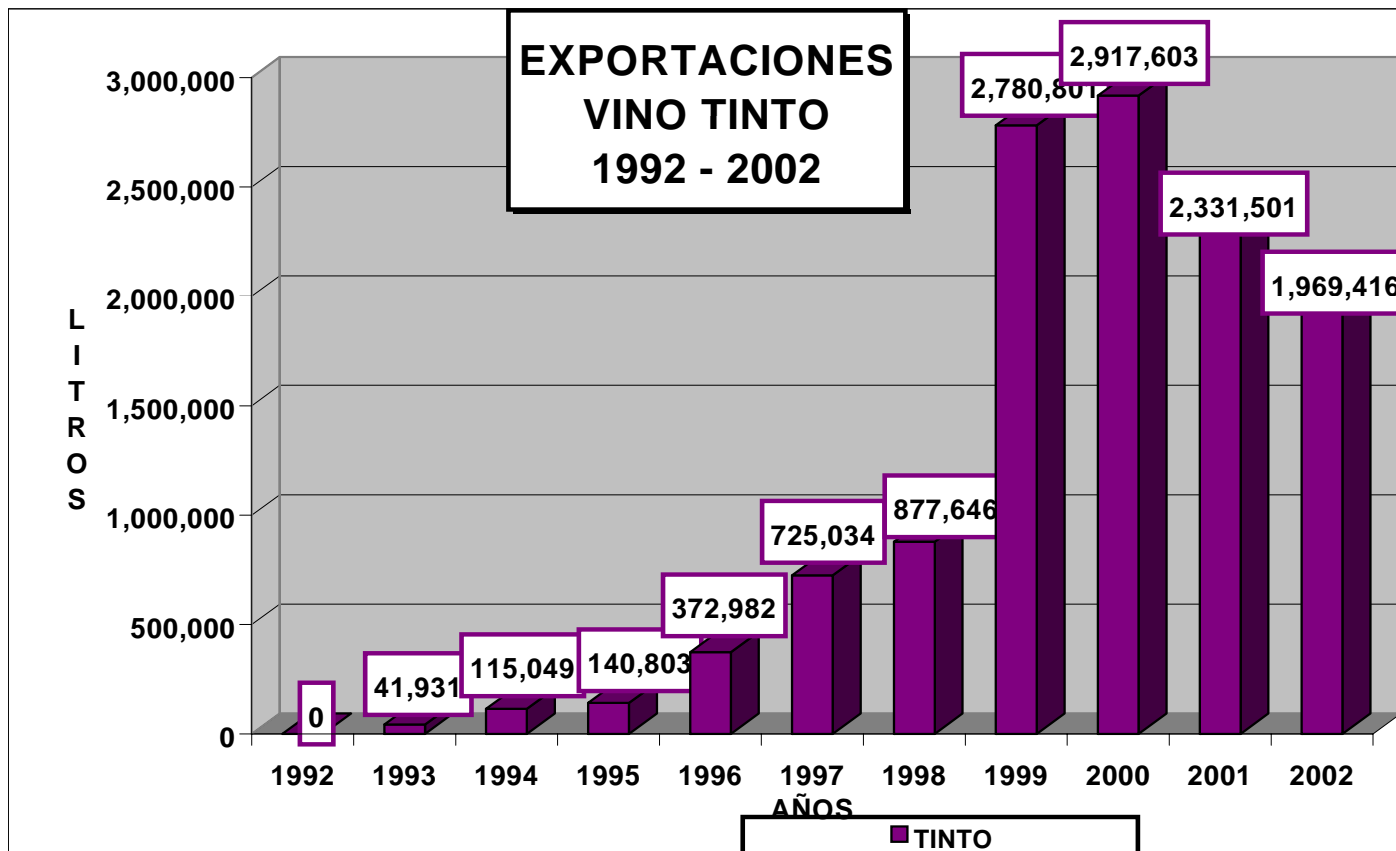
Efecto Protector

Productor de fitomedicamentos

Responsabilidad



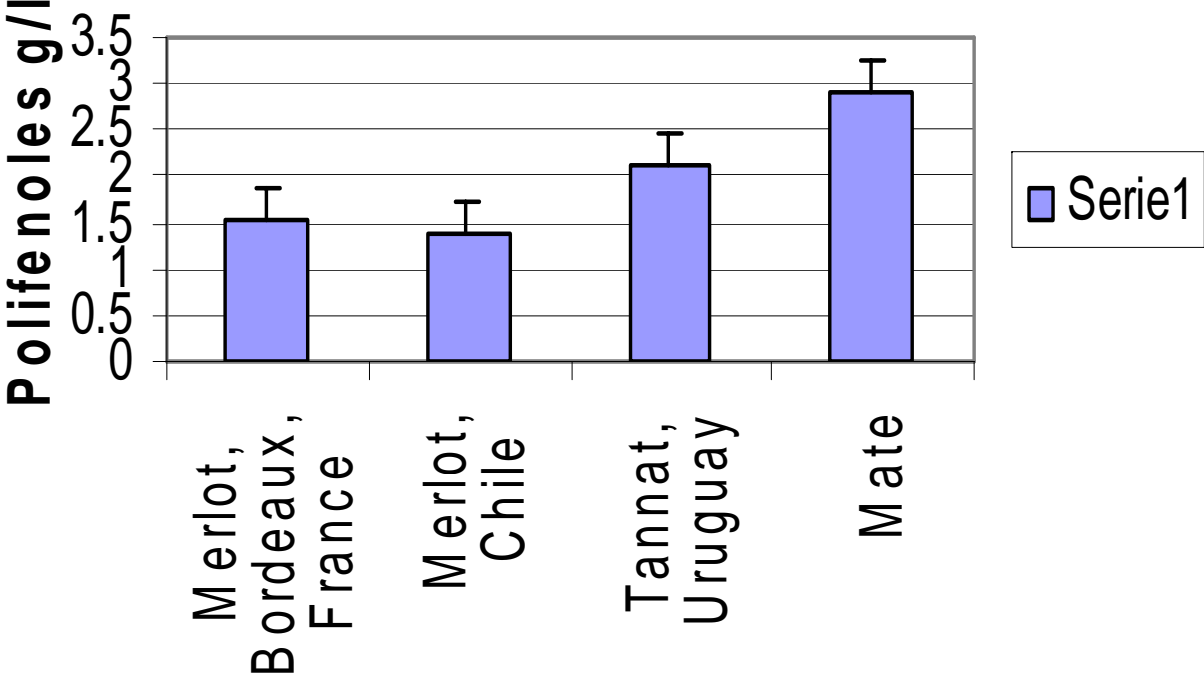
- De acuerdo a antecedentes bibliográficos podría existir un efecto protector vinculado a compuestos presentes en el vino tinto.



Proporciones de diferentes antocianinas, glucósidos acetilados y no acetilados en vinos de las variedades Tannat, Cabernet Sauvignon y Merlot (%) (González et al 2001).

	Tannat	Cabernet	Merlot
Malvidina	59.9	67.0	58.4
Petunidina	16.9	12.1	14.8
Delfinidina	10.4	8.5	9.8
Peonidina	10.1	9.6	3.4
Cianidinas	2.7	2.8	3.4
Acetatos	23.5	29.4	26.2
Cumaratos	13.0	12.2	15.0

Contenido de Polifenoles totales

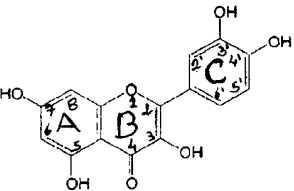
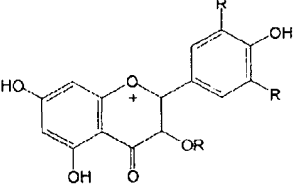
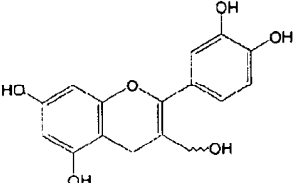
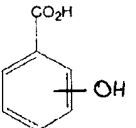
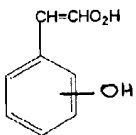
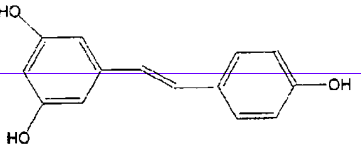


En relación a los productos naturales:

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

En general los fenoles vegetales se dividen en dos grupos, los flavonoides y los no flavonoides.

Los no-flavonoides son derivados de los ácidos benzoicos y cinámicos y sus respectivos aldehídos

General Type	General Structure	Example
Flavonoids		
Flavonols		Quercetin Myricetin Kaempferol Isorhamnetin
Anthocyanins		Cyanidin Delphinidin Petunidin Peonidin Malvidin
Flavan-3-ols		Catechin Epicatechin Epigallocatechin Procyanidins (condensed tannins)
Non-Flavonoids		
Hydroxybenzoates		Gallic acid Vanillic acid Hydrolysable Tannins
Hydroxycinnamates		<i>p</i> -Coumaric acid Caffeic acid Ferulic acid Sinapic acid
Stilbenes		<i>trans</i> -resveratrol <i>cis</i> -resveratrol <i>trans</i> -resveratrol glucoside

HIPOTESIS

- **Derivados de la uva pueden actuar como protectores frente al estrés oxidativo a nivel del ADN y de otros blancos involucrados en procesos de transducción de señales , en la progresión del ciclo celular y en la reparación del ADN, ya sea por sus efectos antioxidantes y/o por modulación de mecanismos de muerte celular y mutagénesis.**

Agentes Químicos y Naturales

Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

Se utilizó H_2O_2 1M sin estabilizantes (Drogueria Industrial Uruguay SA). Se agregó al medio de cultivo la cantidad necesaria para obtener una concentración final de H_2O_2 de 1 a 10 mM.

Acetato dl- α -tocoferol

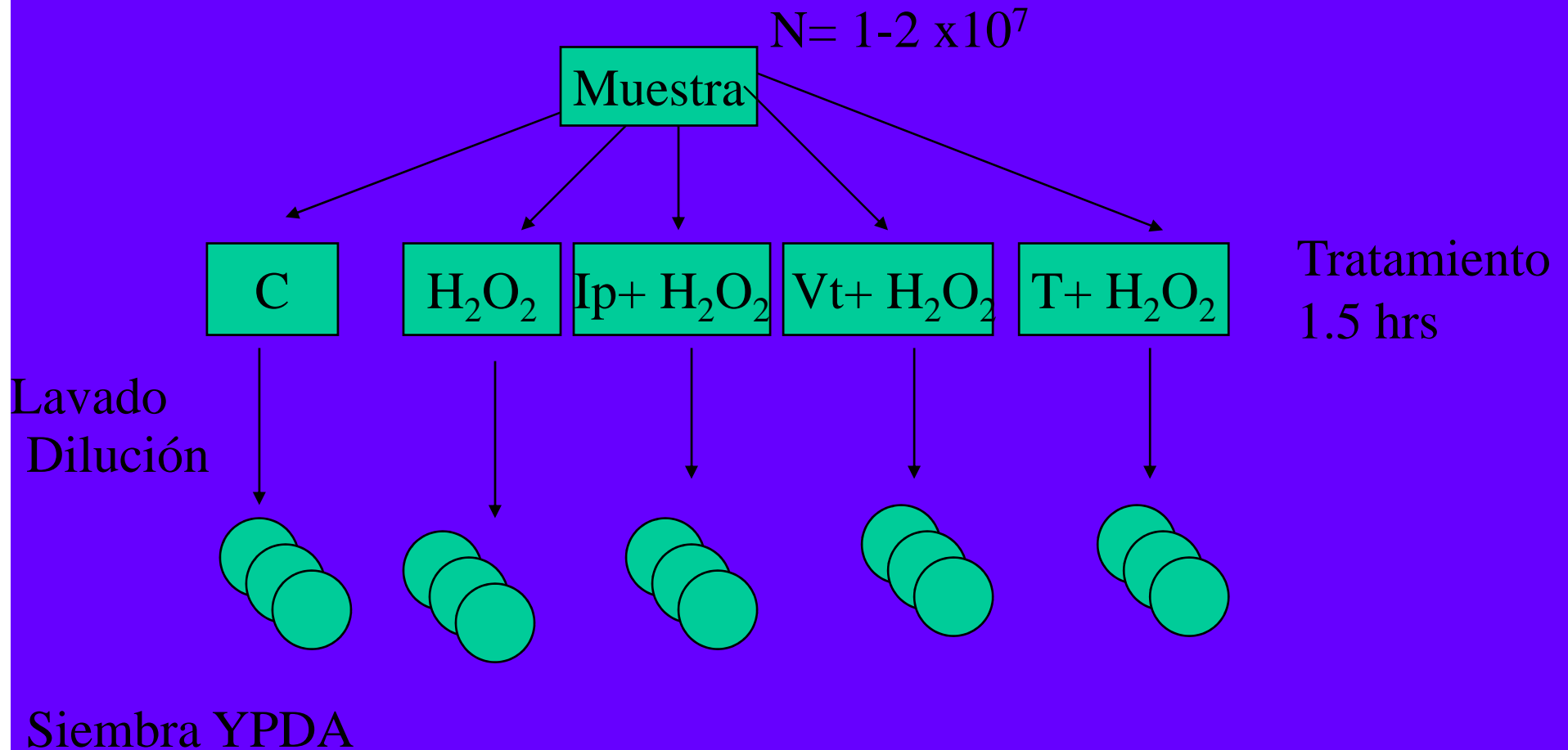
Se utilizó (Ephinal 400 UI, Roche). Se colocó directamente en el medio de cultivo llegando a una concentración (4.7 mg/ml), en presencia de Tween 80 (Nuclear Chicago) a una concentración 1:1000, concentración que no afecta ningún parámetro del crecimiento celular.

Vino tinto Cv. *Tannat*

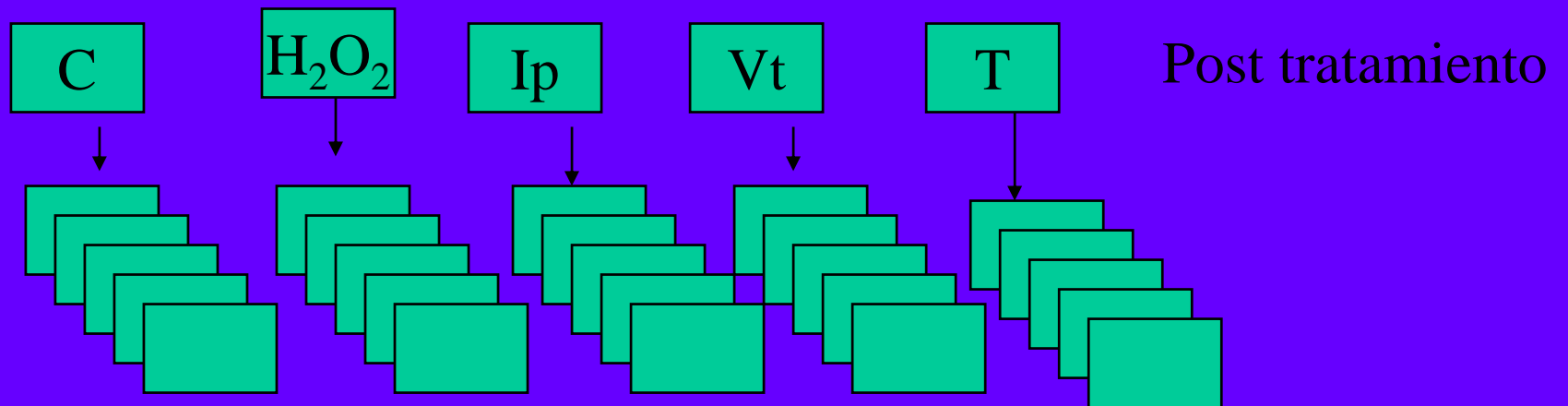
Se utilizó vino Tannat “Las Violetas”, bodega “Vinos Finos Juan Carrau”, de la región de Las Violetas en Canelones cosechado el 1997 y embotellado en el 1999. Lote L9200.

Se abrió una botella en el momento de cada experimento para evitar la oxidación del mismo (Gugliucci et al., 2001) . Se colocó inmediatamente en el cultivo a trabajar al 10%

Sobrevida



Mutagénesis



Siembra directa OM

-Curvas de sobrevivencia

-Determinación de las

DSBs en el ADN

-Análisis de la

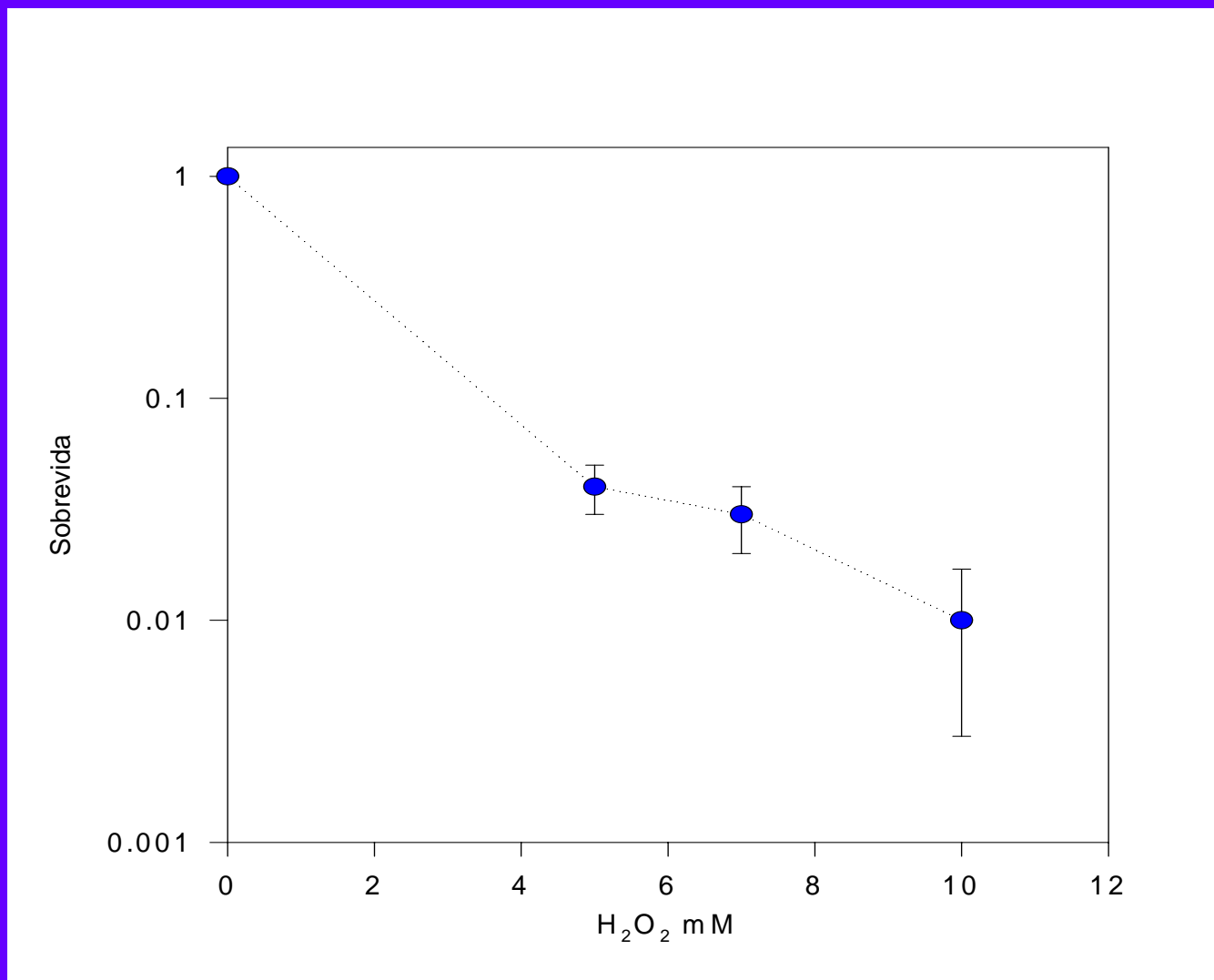
Mutagénesis

Análisis estadístico de los datos.

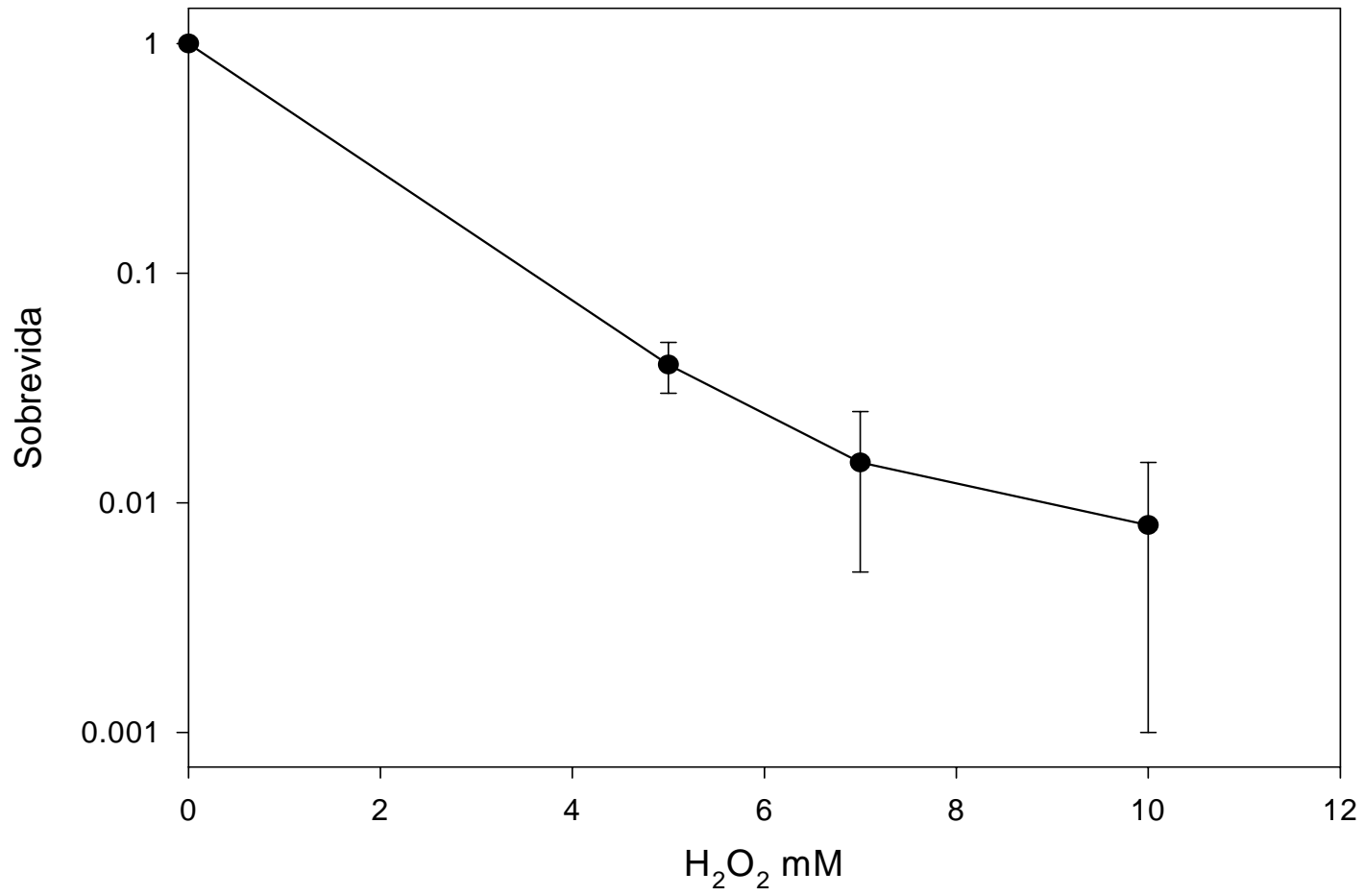
Se realizó según las distribuciones binomial y de Poisson. Los intervalos de confianza en las figuras correspondieron a $P \geq .95$

PRINCIPALES RESULTADOS

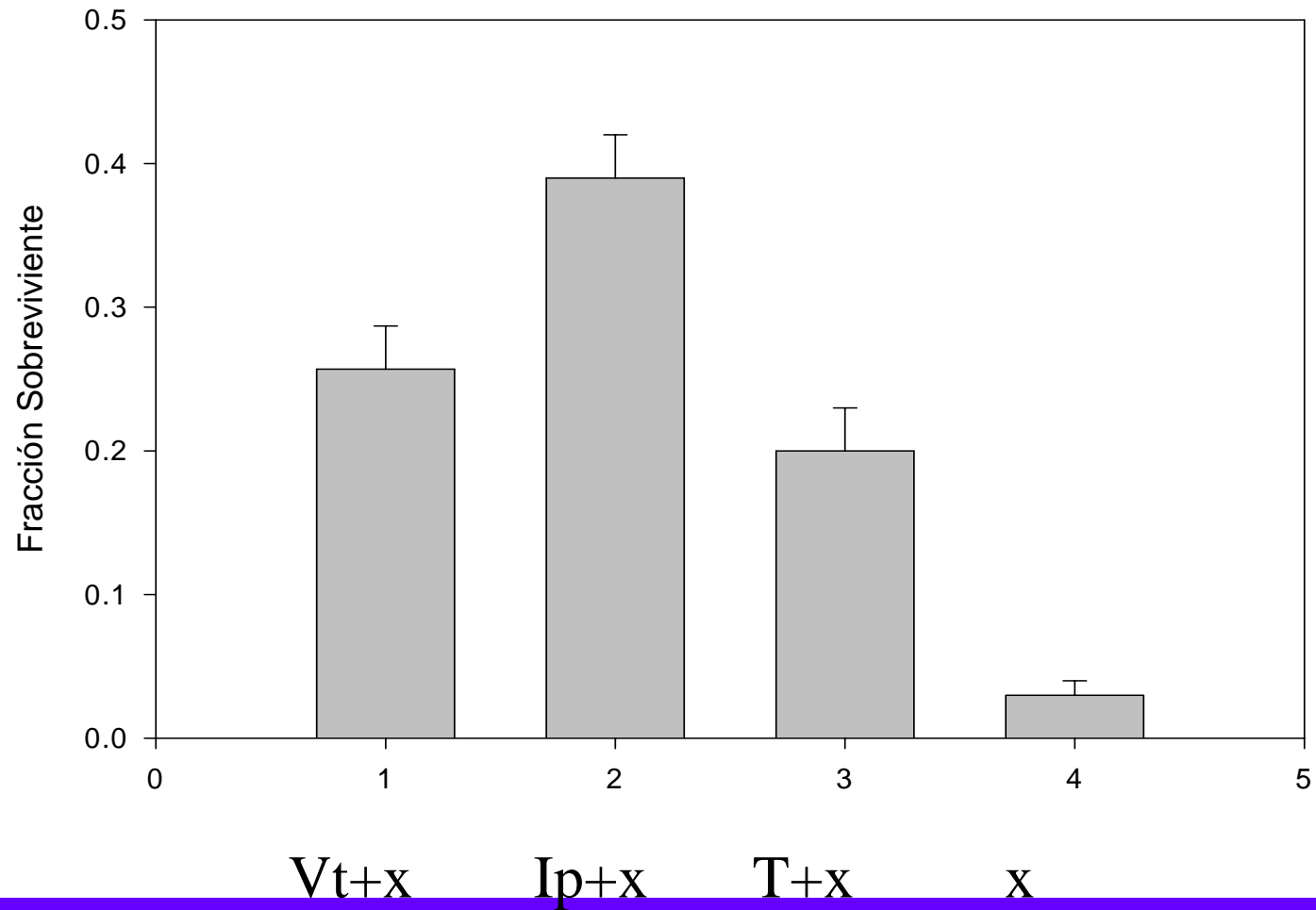
SC7 Klys



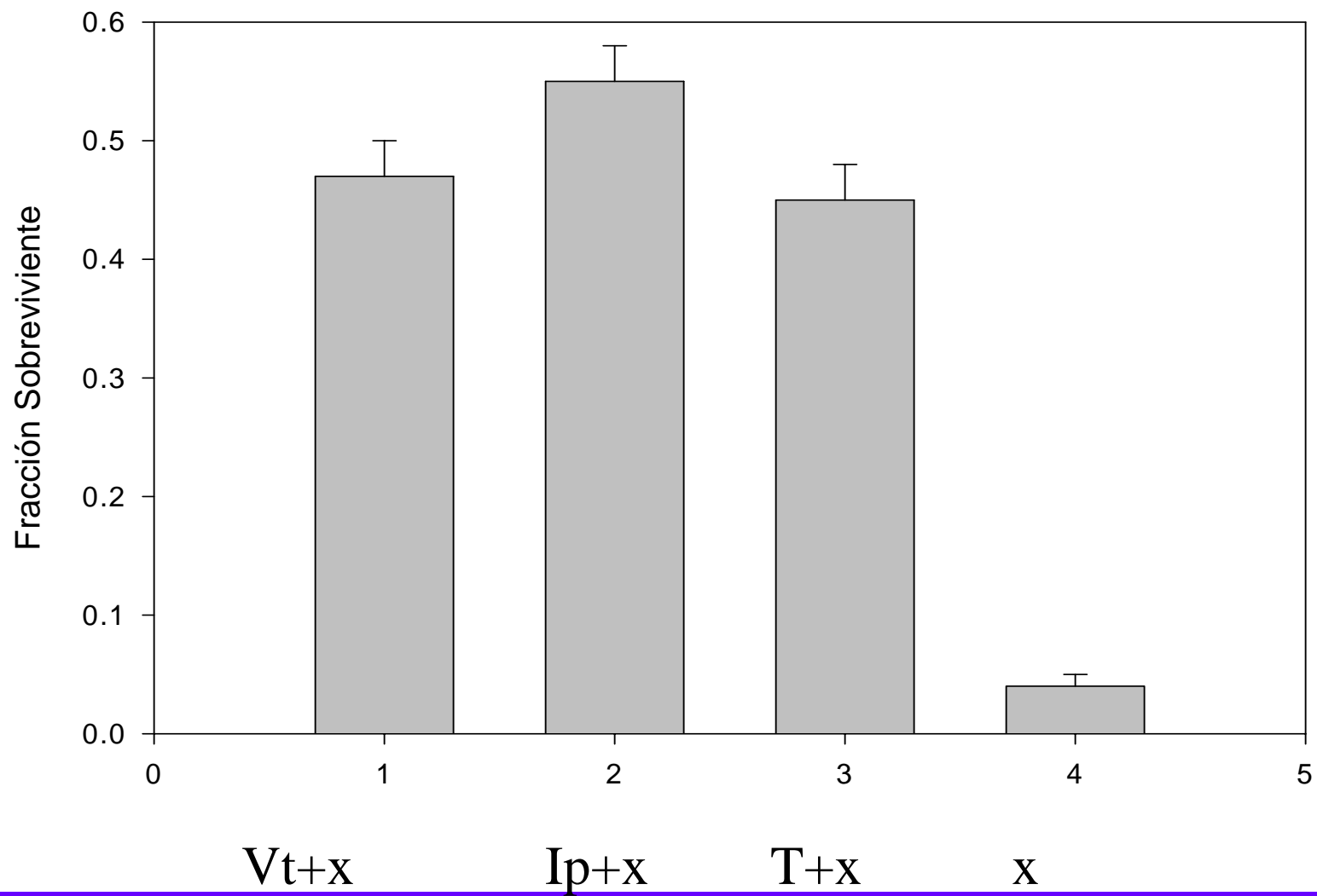
SC6



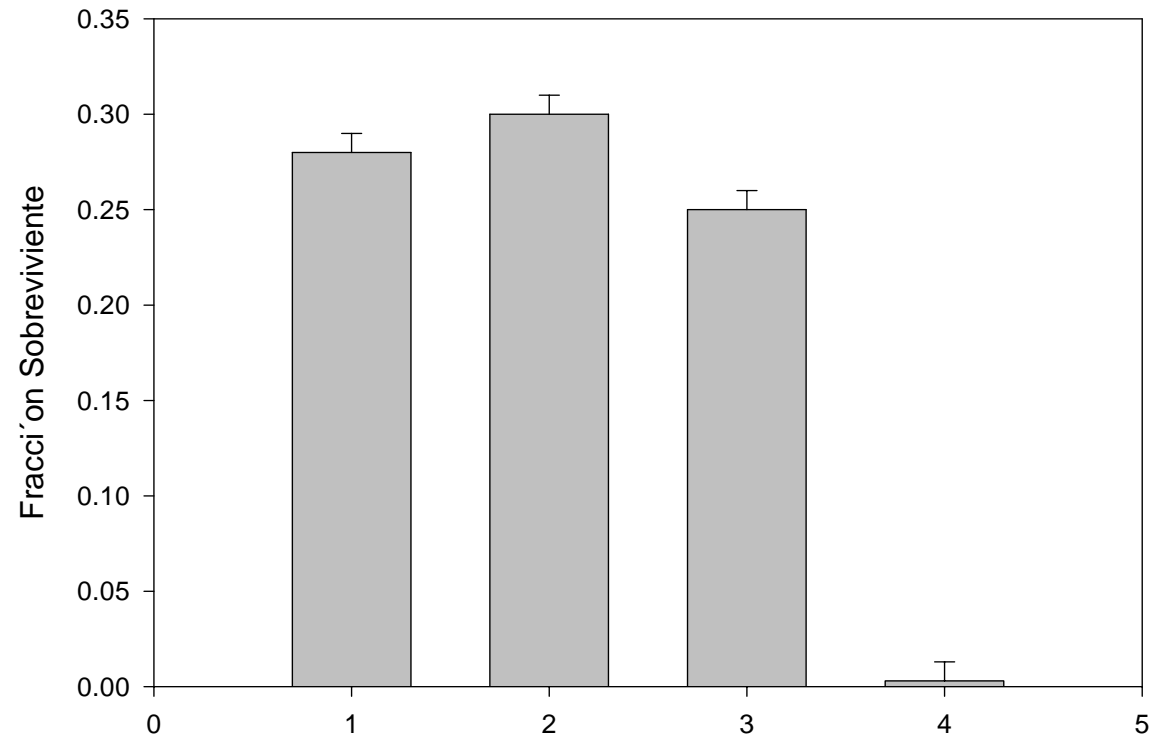
SC7 *k lys* 5 mM



SC6 5 mM

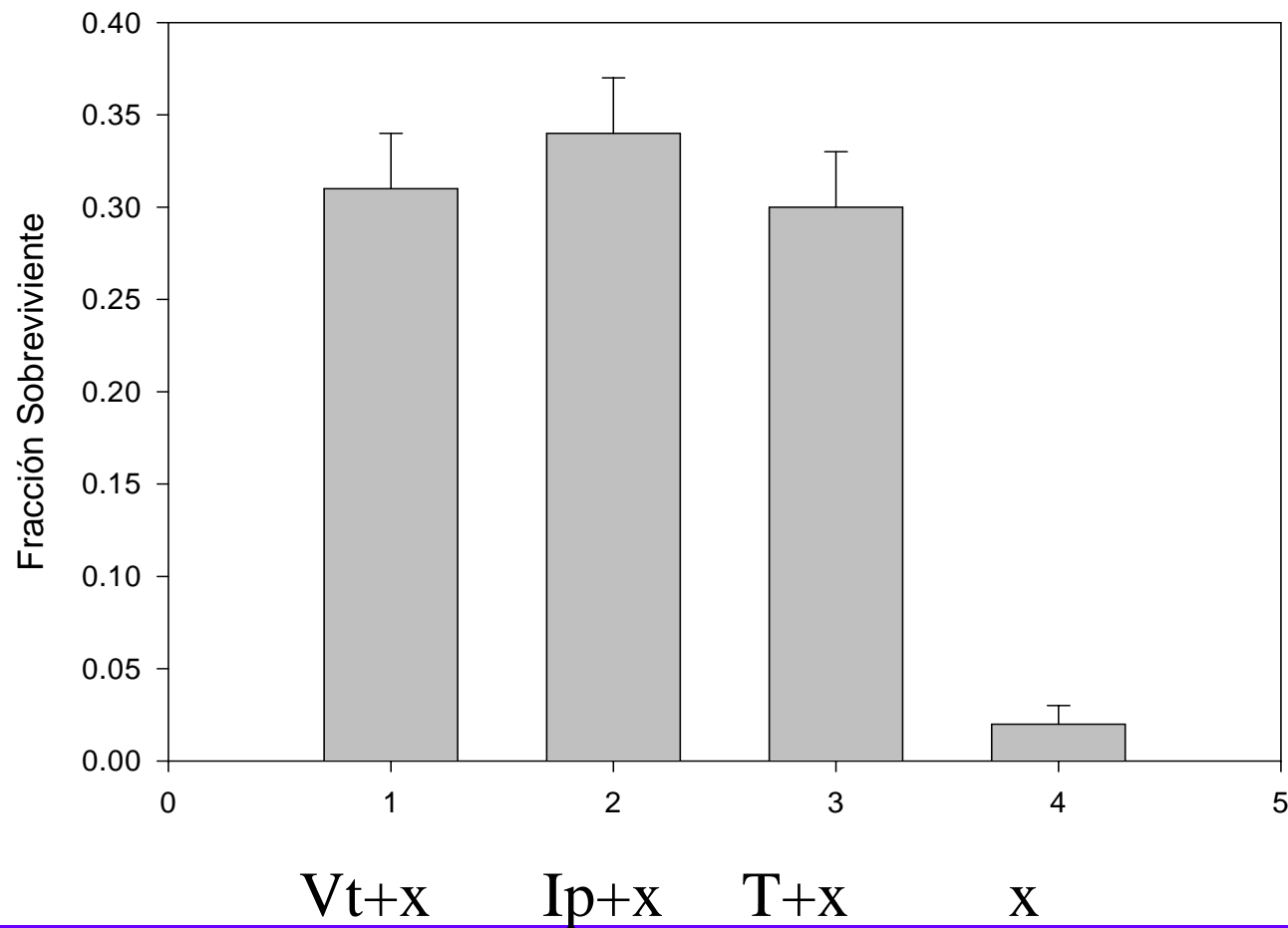


SC7 k lys 10 mM



Vt+x Ip+x T+x x

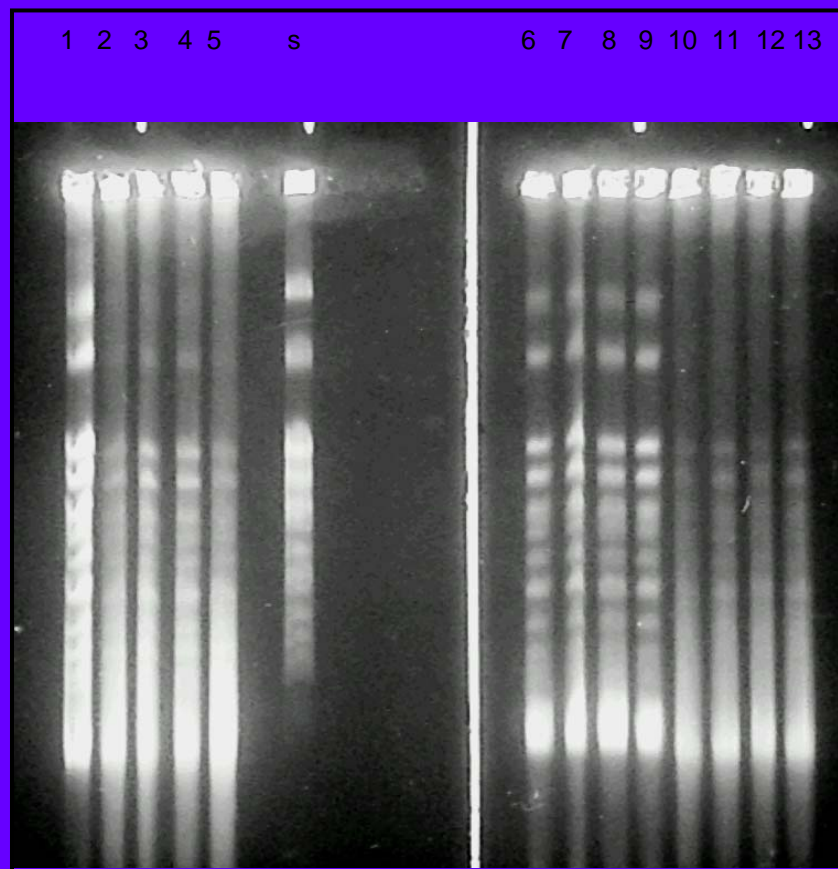
SC6 10 mM



Las poblaciones sometidas sólo a la acción del vino (Vt), mate (Ip) o tocoferol (T) a las concentraciones indicadas, no presentaron ninguna diferencia en relación al control no tratado ($S = 1.0 \pm 0.07$).

SC7

SC6



SC7 Klys

1- C

2- X (H₂O₂ 5mM)

3- IP+X

4- Vt +X

5- T+X

S- Standard

SC6

6-C

7-Ip

8-Vt

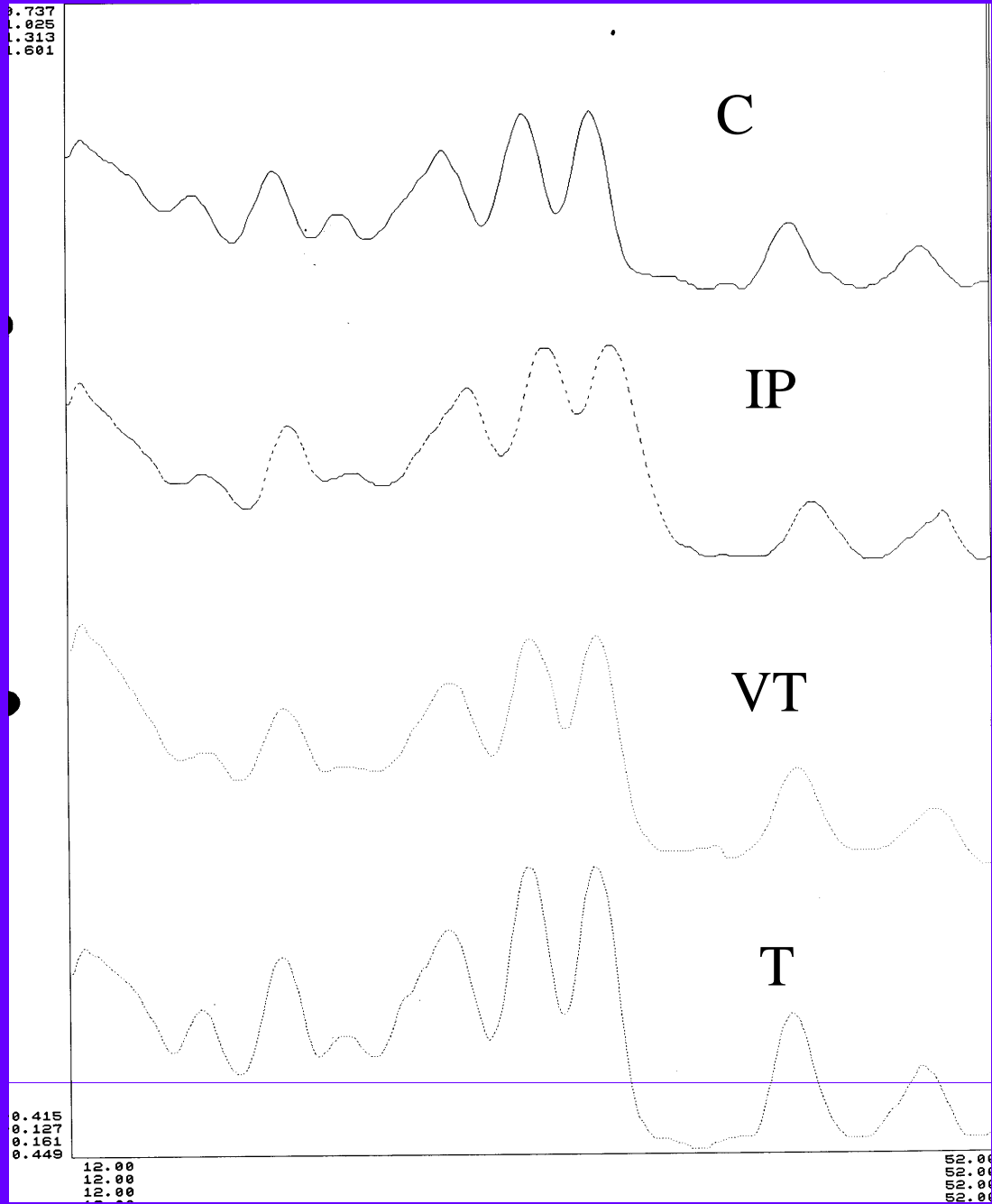
9-T

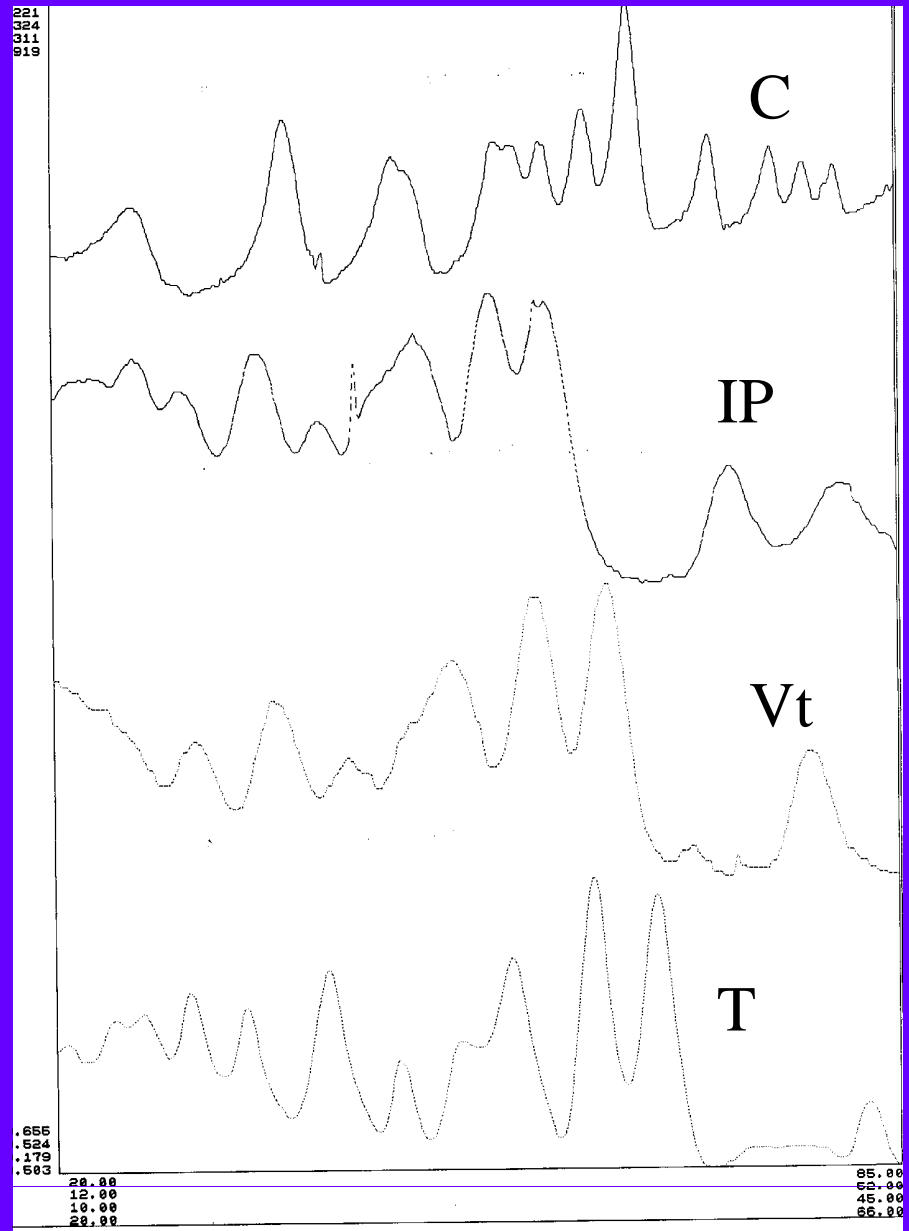
10-X (H₂O₂ 5mM)

11-Ip+X

12-Vt+X

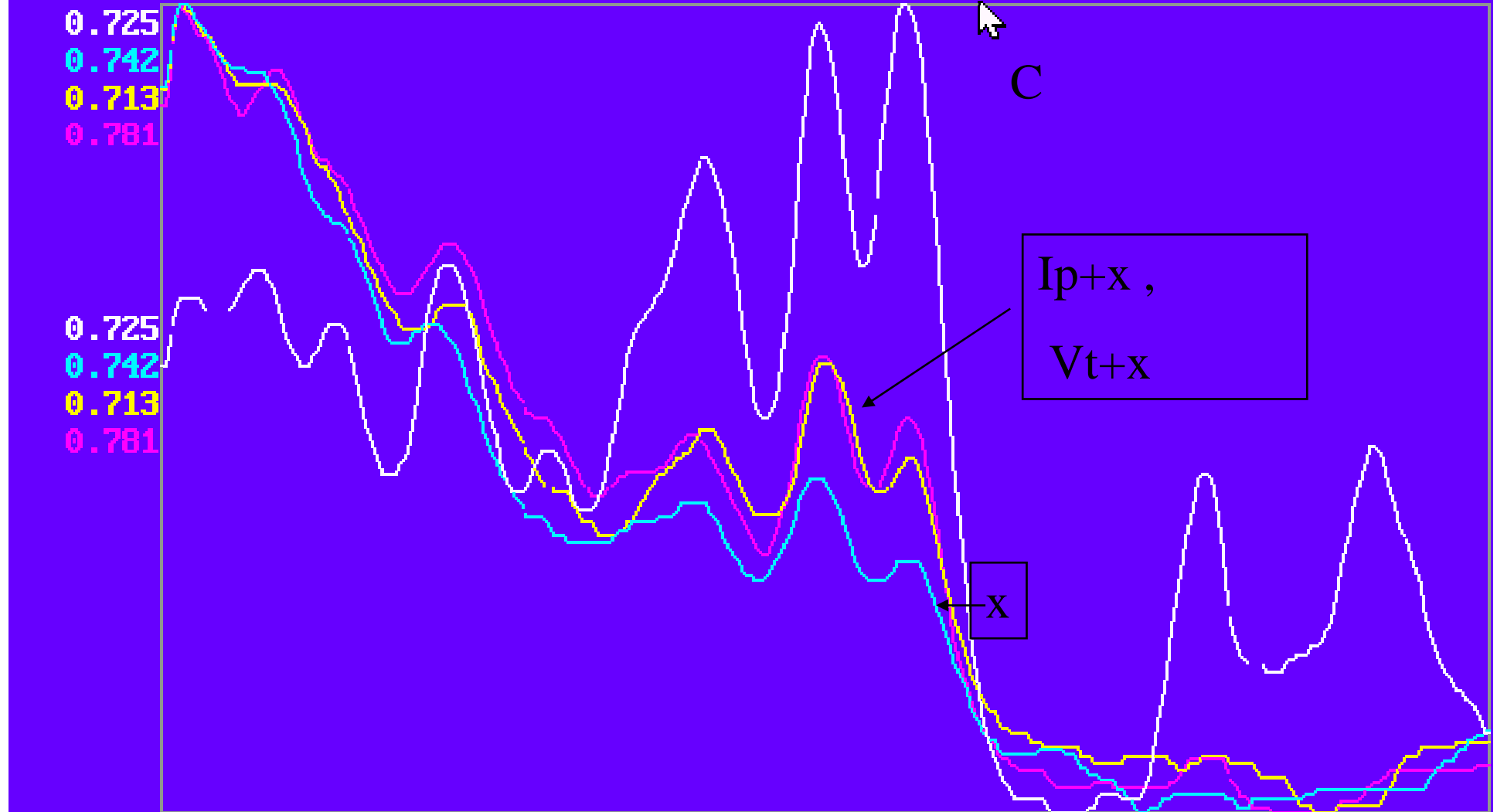
13-T+X





Main Compare

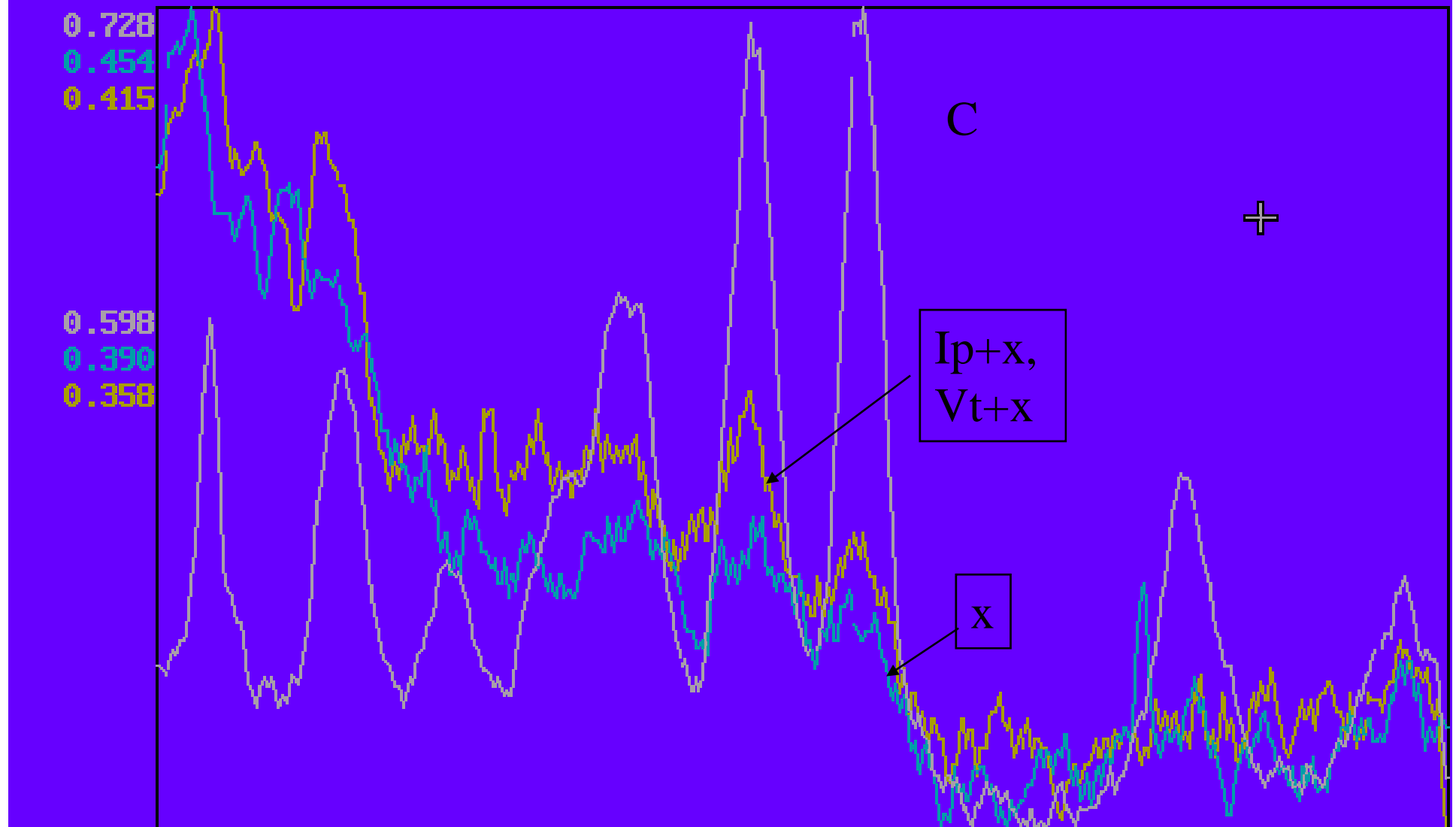
Load Zoom Move Unify sScale Initialise Split **uNsplit** Difference Print
Superimpose, i e draw all curves on top of each other.



a	0.430	12.00	hin6.d01	36.71	52.00
b	0.435	12.00	bio6.d02	36.71	52.00
c	0.435	12.00	bio6.d03	36.71	52.00
d	0.452	12.00	bio6.d04	36.71	52.00

Main Compare

Zoom Move Unify sScale Initialise Split uNsplit Difference Print
Load one or more data files.

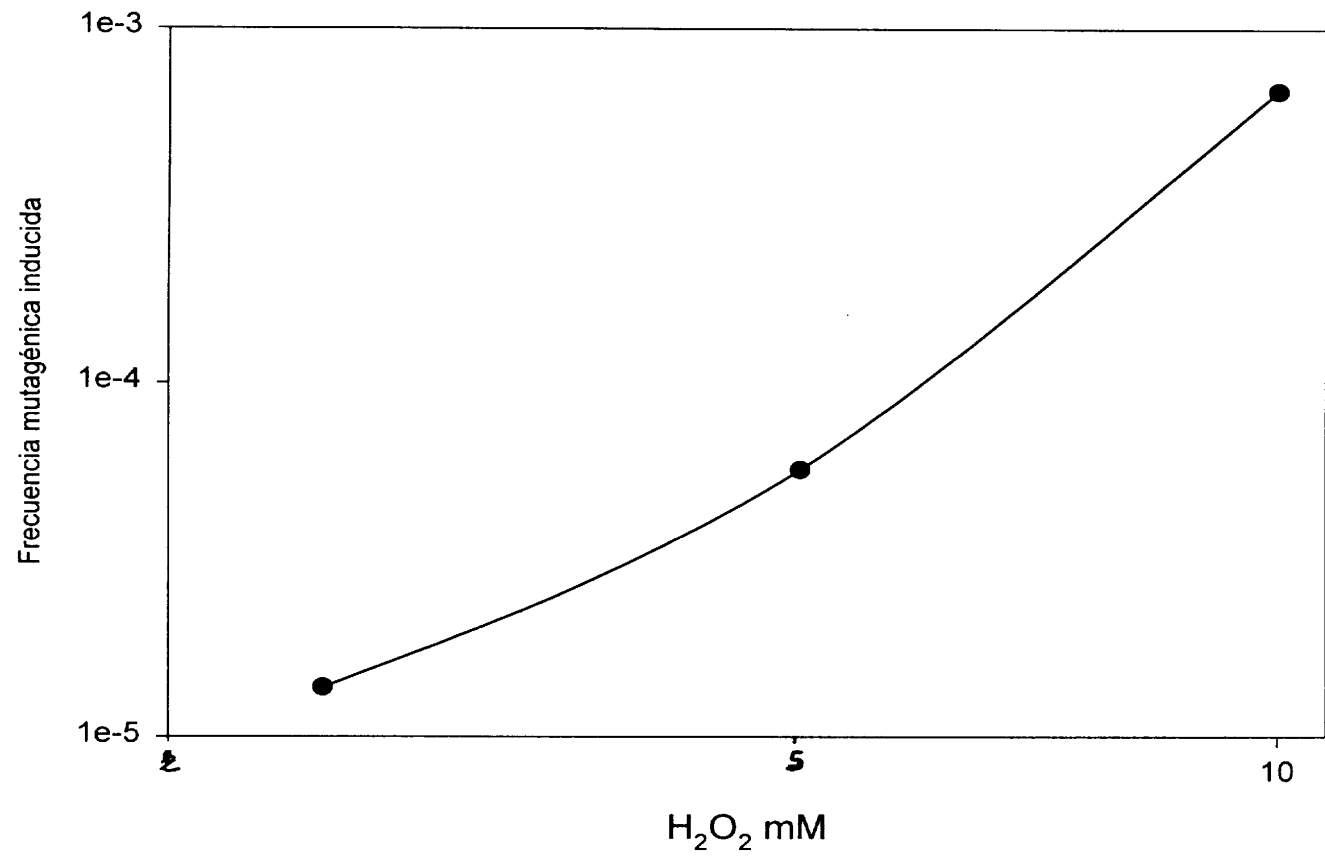


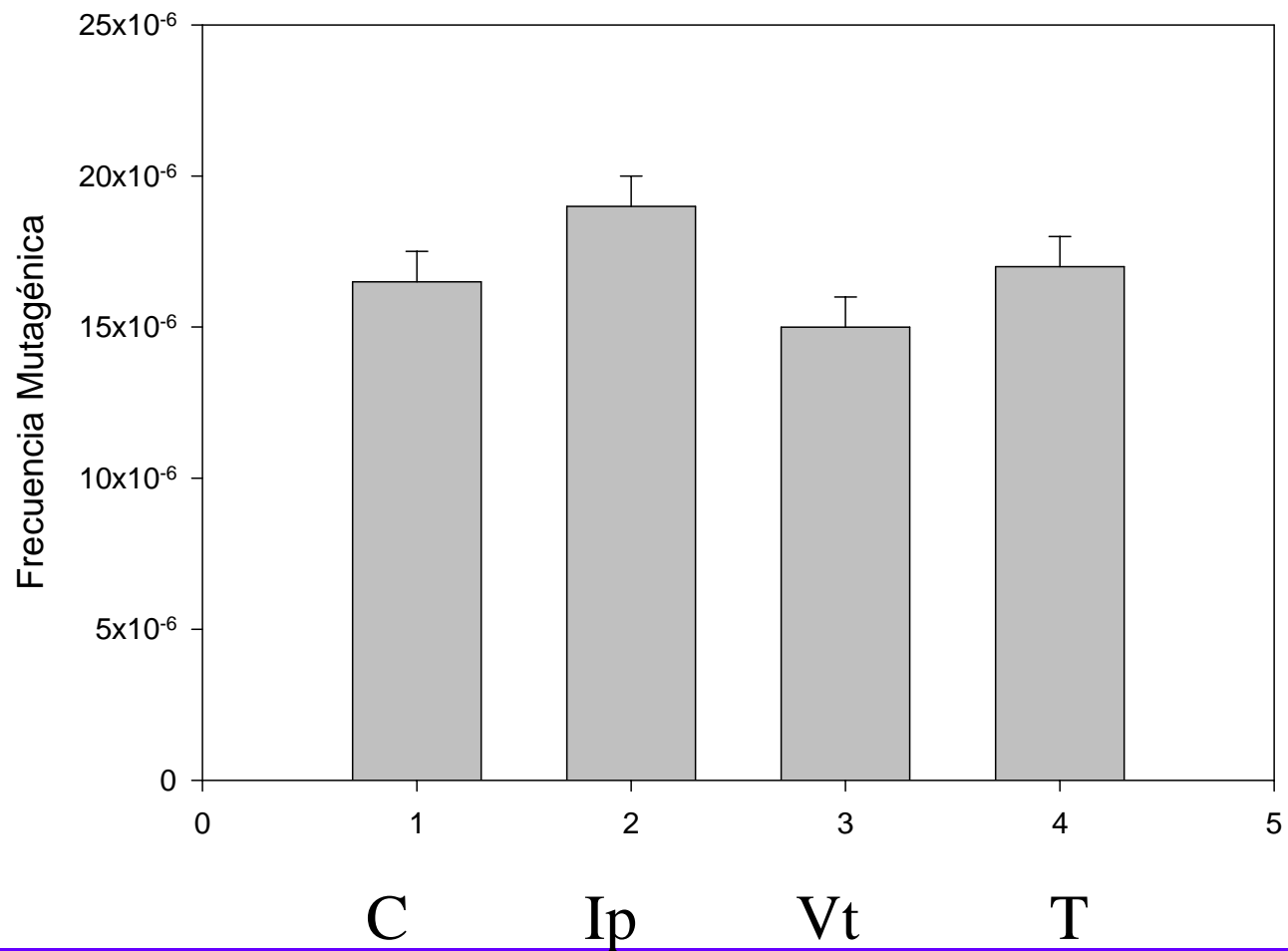
a	0.220	31.00	prueb.d01	78.03	86.00
b	0.203	31.00	prueb.d02	78.03	86.00
c	0.190	31.00	prueb.d03	78.03	86.00

Dobles roturas en cepa SC6

Tratamiento	DSB/genoma Diploide	FR
C	0	----
H₂O₂ 5mM (x)	54.0 ± 5.8	----
Vt + x	23.2 ± 2.5	2.3
lp + x	21.6 ± 2.2	2.5
T + x	23.0 ± 2.4	2.3

Se estudió la mutagénesis inducida por el H_2O_2 a través del análisis de la reversión del marcador de auxotrofia a heterotrofia *lys* \rightarrow *LYS* en la cepa salvaje SC7K *lys*.





- Se demostró protección del genoma “in vivo” frente a lesiones producidas por H₂O₂, por los productos naturales utilizados (Ip y Vt).
- Se demostró aumento de la probabilidad de sobrevida en presencia de los productos naturales en las condiciones descritas
- Estos productos no modifican significativamente la probabilidad de mutación espontánea en la población.
- Los efectos observados son comparables a los producidos por el tocoferol.

Protección – Ciclo de Willson

**interacción con cascadas de transducción
interrelación de respuestas al estrés**

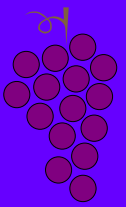
Reparación – Recombinacional

Escisional

MMR

hRAD6

LA VINIFICACION

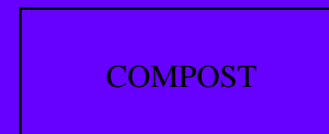
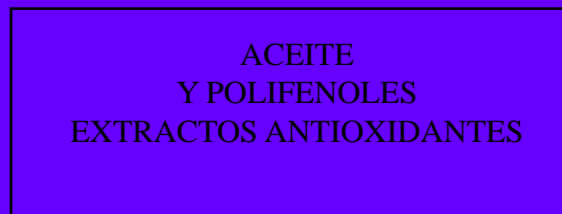
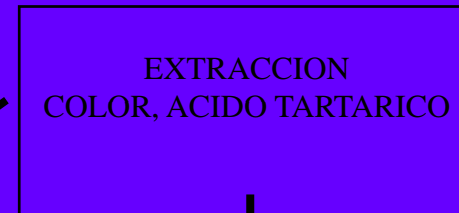


CLIMA, SUELO,
SOL, VARIEDAD
Y TECNOLOGIA

ORUJOS



VINOS
FINOS



RADIO PROTECCIÓN POR DERIVADOS DE PRODUCTOS NATURALES EN POBLACIONES CELULARES HAPLOIDES.

Bracesco N, Blanc L, Bouzas P, Candreva EC, Contreras V, Nunobis EA, Lab. de Radio Biología, Dpto. de Biofísica Facultad de Medicina. UDELA R

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se observa un incremento en el interés científico por los efectos beneficios de distintos productos naturales. Entre los más estudiados encontramos los vinos tintos, la yerba mate y diversos extractos de plantas y frutos. Existen múltiples estudios sobre la capacidad antioxidante de los vinos e incluso sobre la yerba mate, utilizando sistemas "in vitro". Sin embargo, hay pocas publicaciones sobre la capacidad protectora de estos productos naturales a nivel del ADN "in vivo" en poblaciones celulares eucariotas (Bracesco et al 2003; Bracesco et al 2007). En relación a la mutagenesis y a las probabilidades de supervivencia de poblaciones celulares, hay un antecedente en nuestro laboratorio utilizando la infusión de yerba mate (Candreva et al 1993). Estos productos naturales poseen como cualidad de poseer una alta concentración de polifenoles (resveratrol, quercetina y flavonoles), ácidos gálicos, catecol, clorogénico, todos ellos con una potente acción antioxidante (Hollenberg, 2003; López - Vélez, 2003). Se ha indicado la importancia de los radicales libres en procesos de envejecimiento y la transformación maligna, por acumulación de lesiones oxidativas a nivel genómico, mutaciones y cambios irreversibles a nivel de biomoléculas fundamentalmente en membranas (ej. mitocondrias) (Boren et al., 1994; Haller et al 1991; Emannel, 1985). Además juegan un rol muy importante en el desarrollo cardiovascular, por su acción en la regulación de la actividad enzimática y en la formación de placas ateroscleróticas (Hortig et al, 1993; Radl, 2004). Por tanto parece claro que la enfermedad cardiovascular secundaria al proceso conocido como aterosclerosis, constituye la primera causa de mortalidad e invalidez en la cuarta década de la vida.

El objetivo del presente trabajo fue el análisis del daño producido por radiación ionizante (RI) a nivel del ADN, de la inducción de eventos potenciales mutagénicos y mutagénicos en poblaciones celulares y de su posible modulación por productos naturales como el extracto de yerba mate y el vino tinto. Se sabe que la RI es un productor de ROS radical $O^{\cdot-}$, H_2O_2 , H^{\cdot} , peróxido de hidrógeno entre otros. El efecto de radiación ionizante y el peróxido de hidrógeno a nivel celular y molecular en poblaciones de Saccharomyces ha sido estudiado recientemente en nuestro laboratorio (Krauseman et al 2005; Bracesco et al 2001, 2007). La modificación oxidativa de las lipoproteínas, particularmente las lipoproteínas de baja densidad (LDL), por los radicales libres, sería uno de los mecanismos más efectivos de la aterosclerosis (Rice, Evans y Gopinathan 1995; Bracesco et al 2003; Manini et al 2007).

Materiales y Métodos

Se utilizó una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* haploide 607 K1a 2 (Nunes et al, 1984). Se estudiaron muestras poblacionales en fase exponencial. Para crecimiento: Medio YPD (2 % dextrosa, 2 % peptonas y 1% extracto de levadura) y medio YPD-A (YPD + 2% agar). Para mutagenesis (reversión a heterotrofia), se utilizó medio de omisión (O.M.) (dextrosa 2%, base mineral completa de la dextrosa 0.67%, Agar 2%) (Krause et al., 1990). Yerba mate (Ip) (Candrea Lotes 2.290307). Extracto de yerba (Ip) (10% y 10%). Se colocaron 50 gr. de yerba en 200 ml de agua destilada, 70°C, se filtró con filtro de fibra de vidrio 0.9 µm. Extracto concentrado: se colocaron 25 gr. de yerba mate en 200 ml de agua destilada a 70°C, se dejó durante 15 minutos y la infusión se concentró 100 veces utilizando rotavapor (Hochera 4000 - H. el. el. el.). Vino tinto Tanner (Vt) (Bodegas Juan Carras Las Viñetas, Dpto. Canelones, Uruguay; Lote 3003). El vino se agregó a parte de las muestras celulares en medio de cultivo al 10%. Radiaciones ionizantes: Fuente Co 60 - Nordion 220. Tasa de dosis 17 K r/h. Dosis absorbida de 0 a 200 Gy. Dosis crías: Activación de Polym etim activada (Hawell Amber 3042 S). Los productos naturales fueron agregados a los cultivos 1 hora antes de la irradiación y se mantuvieron durante la misma. Luego de terminada la irradiación las muestras fueron colocadas en hielo. Se estimaron las probabilidades de supervivencia en función de las dosis absorbidas (D); radiaciones ionizantes de muestras de las poblaciones en fase exponencial.

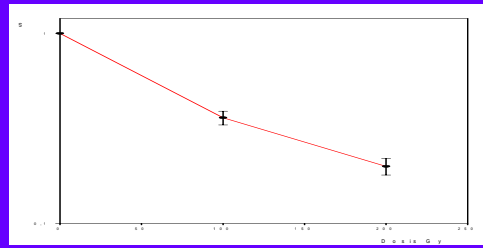


Fig. 1a.- Curva de supervivencia a las radiaciones ionizantes $S = f(D)$. $D =$ Dosis absorbida.

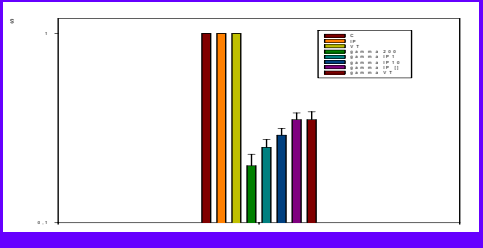


Fig. 1b.- Modificación de la tasa de supervivencia por los compuestos naturales utilizados.

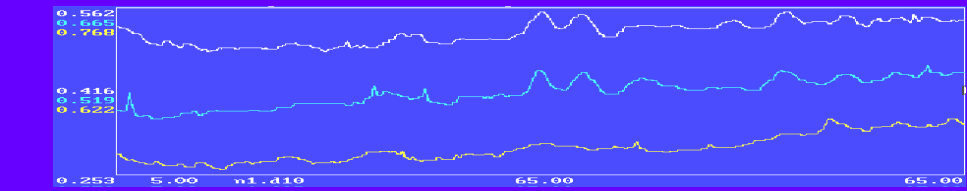


Fig. 2.- Denitogramas láser correspondientes al ADN cromosómico. De arriba-abajo: Ip + Vt + Vt, D = 100 Gy.

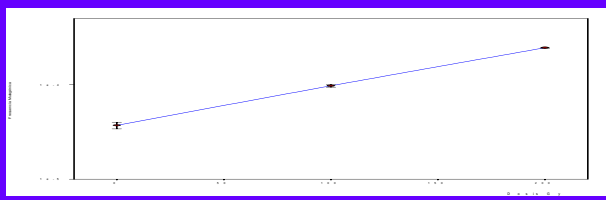


Fig. 3.- Frecuencia mutagénica en función de la dosis absorbida.

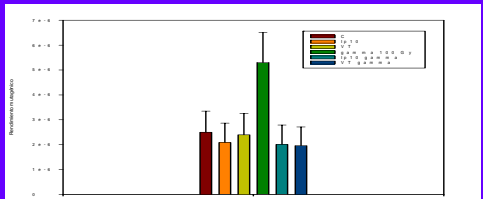


Fig. 4a.- Rendimiento mutagénico en distintas condiciones. Los productos naturales disminuyen la probabilidad de mutación inducida por radiación y (D = 100 Gy) a los niveles de mutación espontánea.

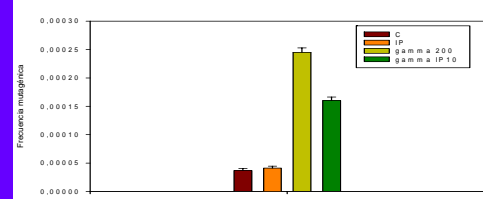
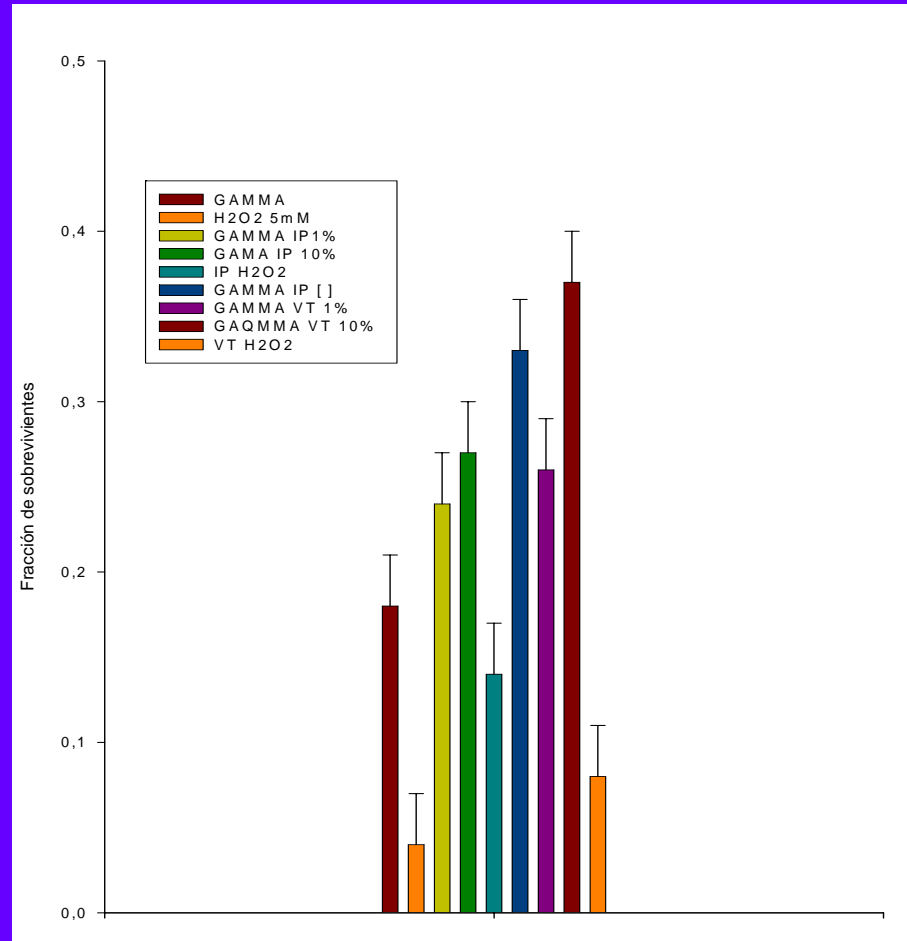


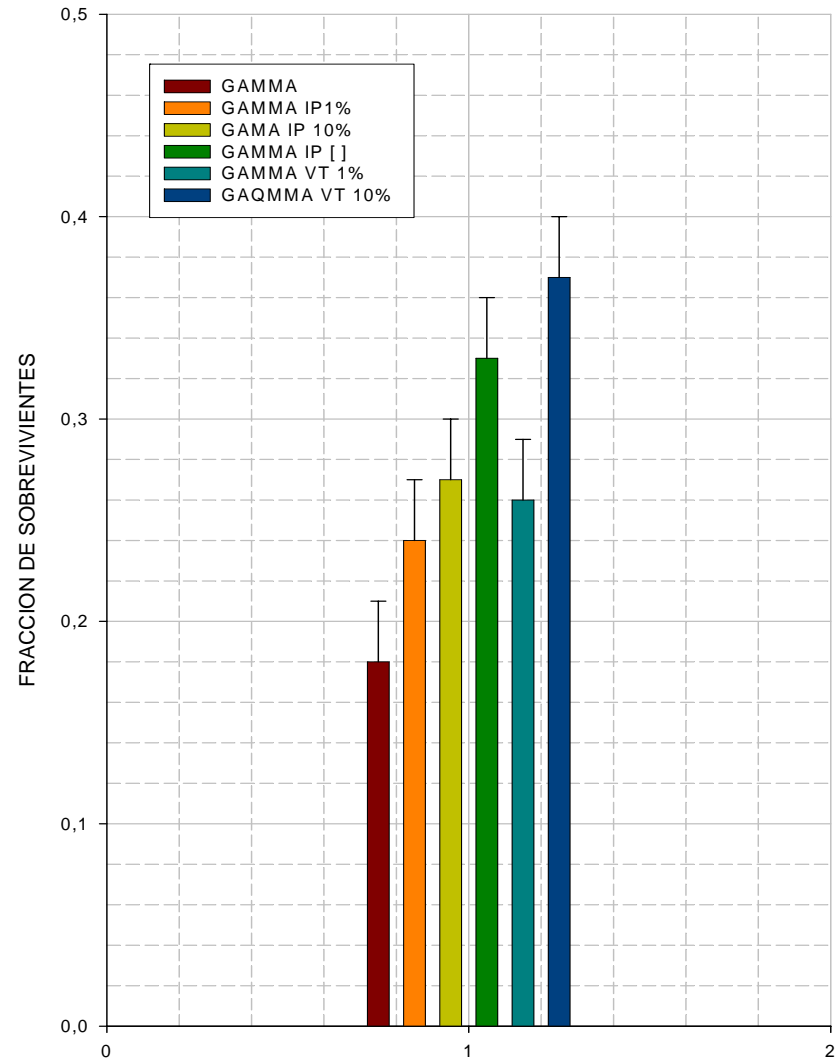
Fig. 4b.- Frecuencia mutagénica en distintas condiciones (el máximo corresponde a radiación).

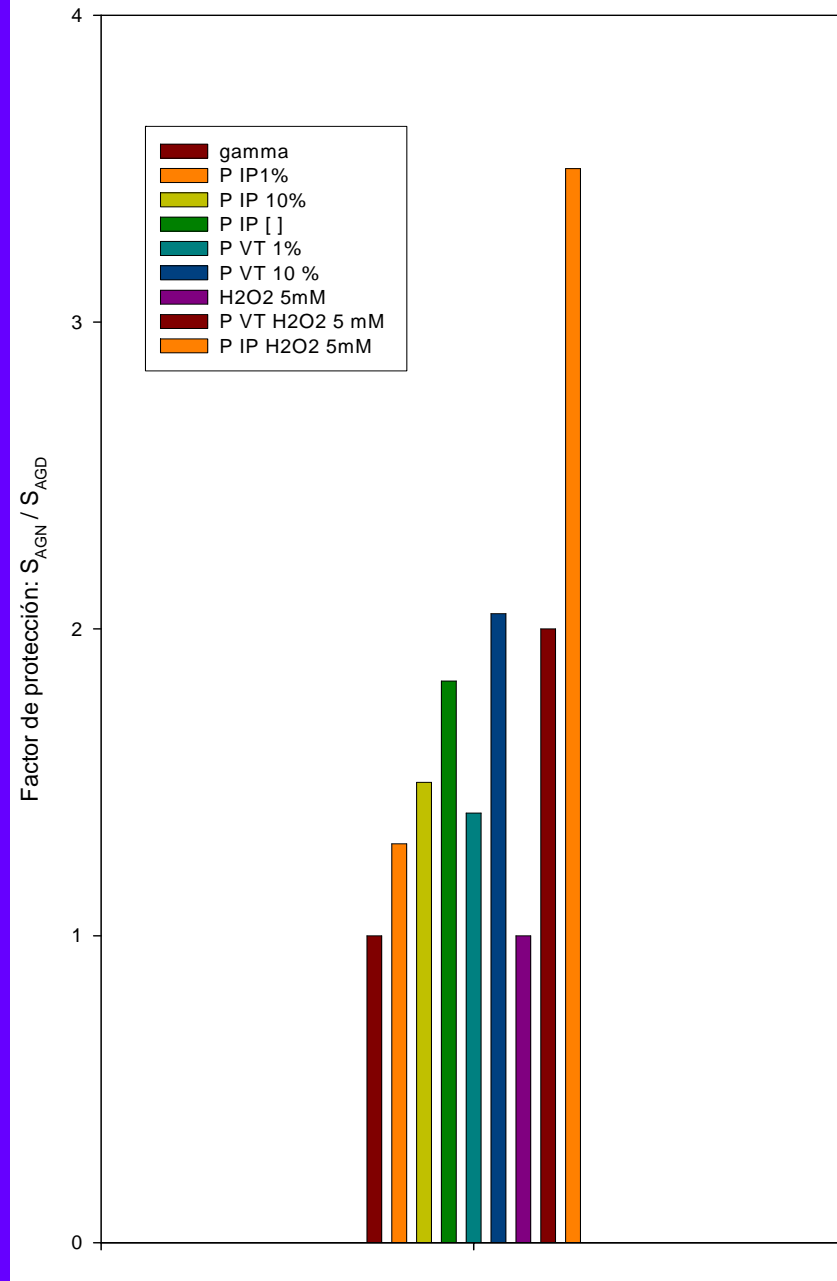
Se analizaron muestras independientes en presencia y ausencia de los extractos y vino tinto. Se analizaron las funciones: fracción sobreviviente: $S(x,y) = Ns/N0$ donde $Ns =$ número de células sobrevivientes, capaces de germinación/ml; $N0 =$ número total de células irradiadas/ml; $x =$ dosis absorbidas de radiaciones; $y =$ dosis de los moduladores y/o protectores (Haynes, 1984). Para determinar la frecuencia y el rendimiento mutagénico, las muestras de poblaciones celulares de levadura ($N = 10^7$ /ml) se sembraron en placas de Petri conteniendo medio de selección M (el ensayo se realizó por quintuplicado). Las placas se incubaron a 30°C durante 21 días y luego se realizó el conteo de las colonias correspondientes a las reversiones de autorrofia a prototrofia 10^{-6} = 1/75 (Nevozhina et al., 1991; Krauseman et al., 2006). Se calculó la frecuencia de mutación $M(x)$ y el rendimiento mutagénico $Y(x)$ para cada dosis y sus combinaciones. $M(x,y) = N_m/N0$ Rendimiento mutagénico; $Y(x,y) = N_m/N0$ que daña el ADN (Haynes, 1988); $x =$ dosis de los moduladores. La medida de roturas dobles de ADN (DSB) se realizó utilizando electroforesis en gel de agarosa, con un protocolo inverso, alternado, y lectura con densitometría láser. Se compararon las integrales de los perfiles de ADN controles y tratados y se realizó el cálculo aplicando la distribución de Poisson (Bauer, Krauseman, 2006; Bracesco et al 2007). El análisis estadístico de los datos se realizó según las distribuciones binomial de Poisson, y pruebas no paramétricas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

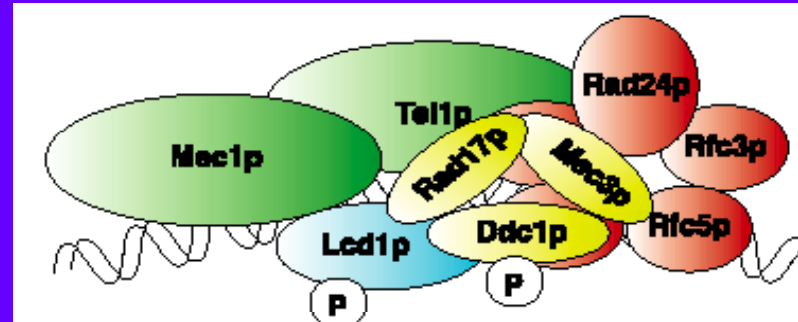
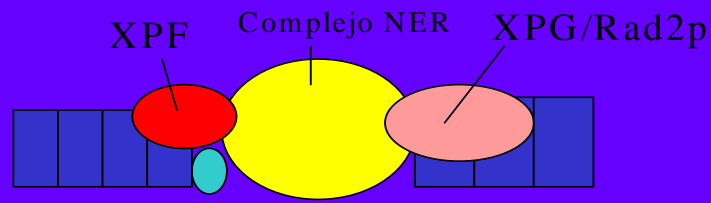
Se demostró "in vivo" una disminución de la supervivencia de las células por la radiación gamma en presencia de los paraguiteros y de vino tinto. Tasa de supervivencia de vino tinto Tanner al 10%. Esta disminución de roturas de doble cadena a nivel del ADN se acompañó con un aumento significativo de la probabilidad de supervivencia celular (Fig. 1a y 2). Los máximos se corresponden a la supervivencia a Vt y al concentrado de Ip (Fig. 1b). No se observó modificación de la tasa de mutación espontánea en presencia de Ip o Vt (Fig. 4a), indicando ausencia de inducción de lesiones en las poblaciones celulares en las condiciones experimentales. Los productos naturales utilizados disminuyeron la probabilidad de mutación (M) inducida por la radiación gamma (Fig. 3) a los niveles de mutación espontánea (Fig. 4b). Esta disminución de la frecuencia mutagénica (M) en presencia de Ip (Fig. 4b). Estos resultados pueden interpretarse en base a dos mecanismos no excluyentes: protección de blancos críticos y por la inducción de una vía de reparación con baja tasa de error. Es conocido que las dobles roturas de ADN (DSB), inducidas por distintos tipos de agentes físicos y químicos, constituyen lesiones claves en la producción de muerte celular, aberraciones cromosómicas y transformación maligna. En ciertas condiciones estas lesiones pueden ser reparadas por recombinación homóloga o heteróloga (NHEJ), con distintas probabilidades de error. Tanto el efecto protector del Ip como del Vt podría darse a distintos niveles, por la capacidad de alguno de sus componentes (compuestos fenólicos) de reducir o captar las especies reactivas de oxígeno, de inhibir la transcripción y el $sp1$ (en humanos AP (Jun, Fos), ATR, SREB, de la familia de GSH, y el $sp1$, catalasa y NADPH) que en conjunto con compuestos presentes en los productos naturales podrían estar actuando protegiendo blancos críticos (ej. ADN nuclear, membrana mitocondrial, enzimas de reparación involucradas en la recombinación y en la inestabilidad genómica por lesiones oxidativas). Entre los compuestos protectores son, con alta probabilidad, fenoles, tales como el ácido clorogénico, resveratrol, quercetina, catequina, como la nicotianamida, actuando a nivel del ADN y de otros blancos, ya sea por sus efectos antioxidantes, de captación de radicales y/o por modulación de mecanismos en red de muerte celular, reparación de ADN y otros (Mansouri et al 2007; Friedberg et al 2006; González et al., 1995).







Rad1p, Rad10p



RAD9 / BRCA1

Cafeína

APC - CULL

CHK1/hCHK1

MEC1/ATR

POL2, DPB11
RFC5, DRC, etc.

freno G2/M

PDS1

CDC5

RAD53/hCHK2-p53

inducción de la reparación del ADN

inducción de DDR

freno en M, previene la salida de mitosis

CDC28

CDC28

SWI6

freno en G1

Pol α -primasa

freno en S

Trabajos anteriores del laboratorio muestran

que la infusión de mate disminuye la mutagénesis inducida

por cafeína e hipertermia. (Candrea et al., 1993)

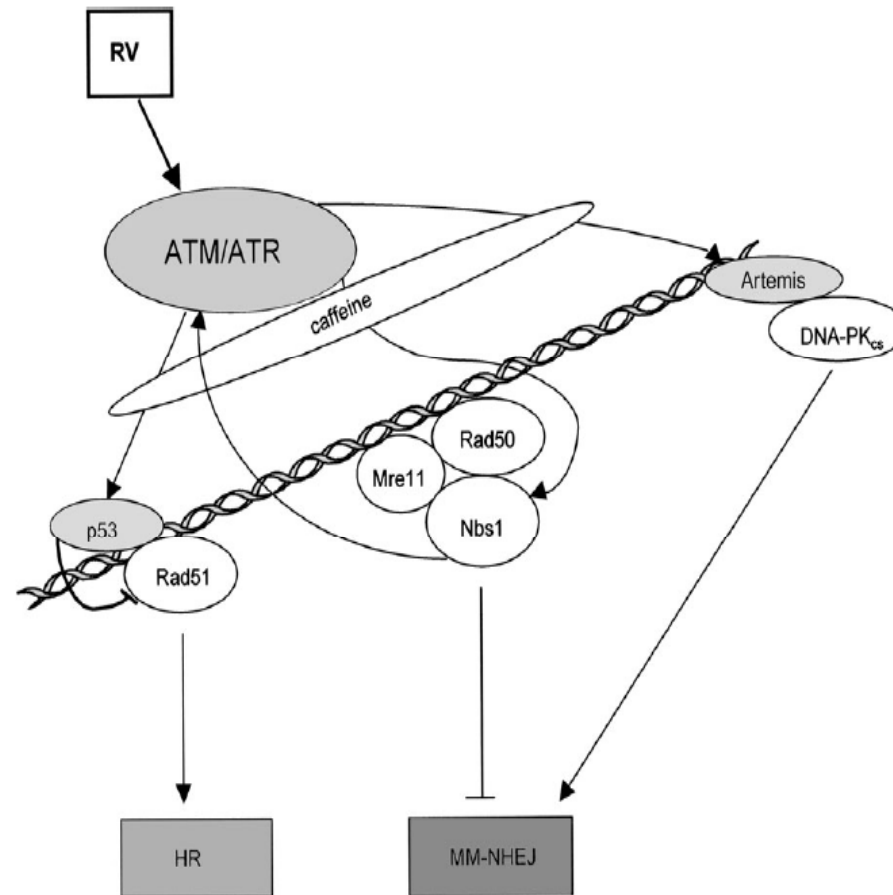


Fig. 6. Model of RV-induced mechanisms leading to inhibition of DSB repair. RV activates ATM and/or ATR via an unknown mechanism. ATM/ATR-mediated phosphorylation of downstream targets including p53 and Nbs1 takes part in DNA repair regulation (including both HR and NHEJ). p53 inhibits HR via inhibition of Rad51 activity (12–14); Nbs1 represses MM-NHEJ possibly via the MRN complex or activation of alternative surveillance proteins that favour HR (40). Activated Artemis stimulates MM-NHEJ activity in concert with DNA-PK_{cs} (31). Caffeine inhibits ATM/ATR downstream activities. Arrow, stimulation; bar, inhibition.



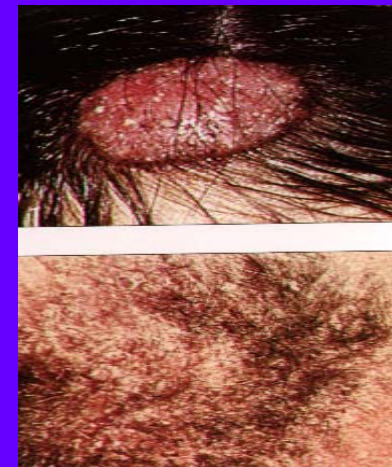
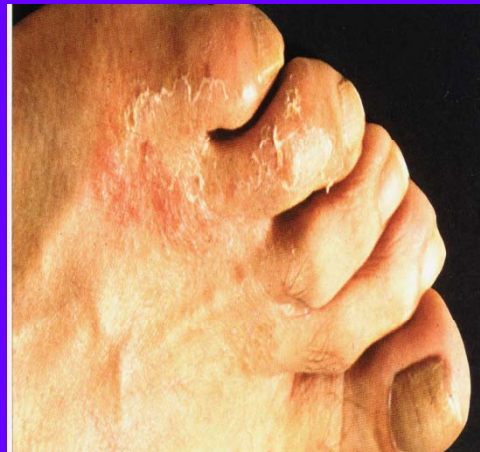
NUEVO ANTIMICOTICO DE USO MEDICO Y AGROINDUSTRIAL

Dpto. de Biofísica
FACULTAD DE MEDICINA
MONTEVIDEO - URUGUAY

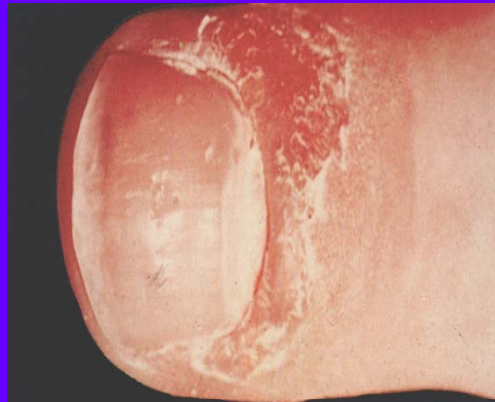
***Autores: Nelson Bracesco ,
Virgilio A. Salvo, Elia Nunes,
Francisco Carrau***



*Se observan micosis
frecuentes a nivel humano:
“Pie de atleta” y “Tiña”.*



Candidiasis en distintas localizaciones



En el laboratorio se cultivaron los hongos que dan lugar a las enfermedades que se muestran en la Fig. 1. Colocando el antimicótico elaborado a partir de cultivos de la cepa KU1 (Fig.2) en los círculos negros, se obtiene la muerte del hongo, quedando las placas transparentes en torno a esos círculos. Los hongos crecidos sin tratamiento se ven en color blanco. Izquierda: Cultivo de *Candida albicans*. Derecha: Cultivo de *Tricophyton mentagrophytes*. El antimicótico no se puso en cuatro de los círculos (derecha)



