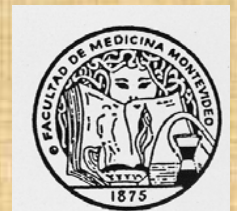


ANÁLISIS DE PROBABILIDADES DE SOBREVIVENCIA Y MUTAGÉNESIS FRENTE A AGENTES GENOTÓXICOS

MODULACIÓN POR PRODUCTOS NATURALES A NIVEL CELULAR Y MOLECULAR

Ema C. Candreva

Laboratorio de Radiobiología
Dpto. de Biofísica, Facultad de Medicina

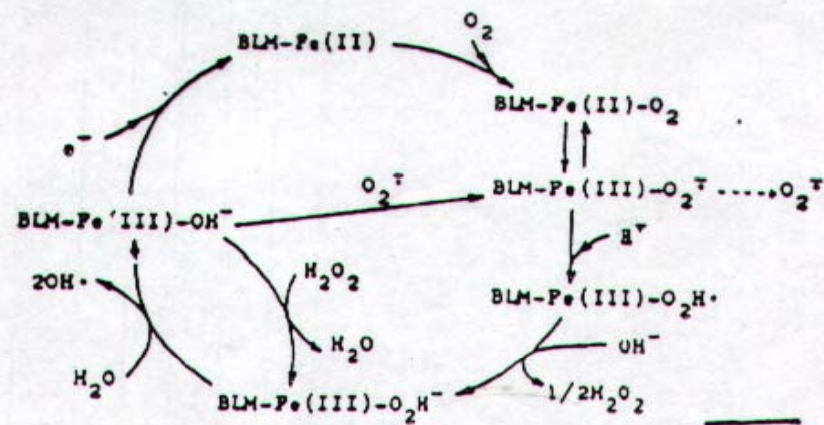
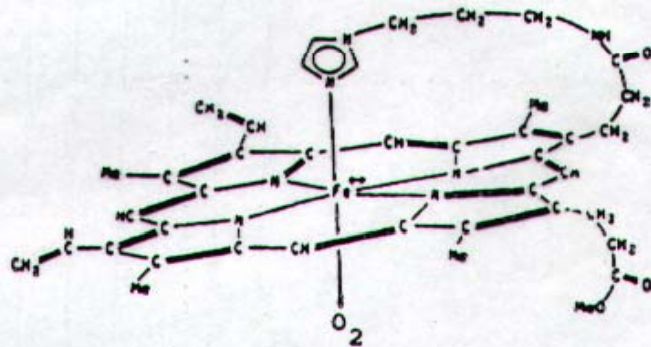
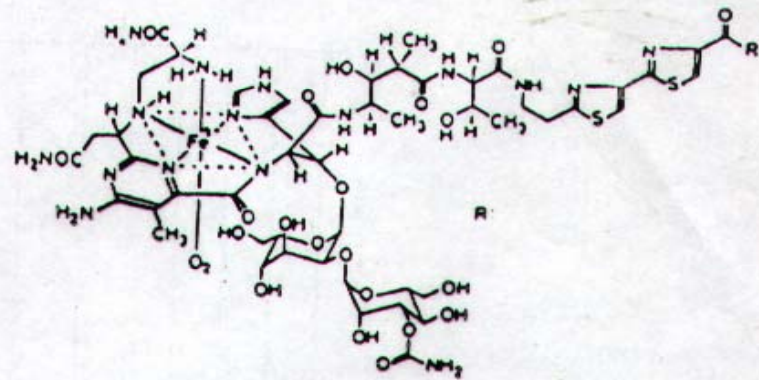


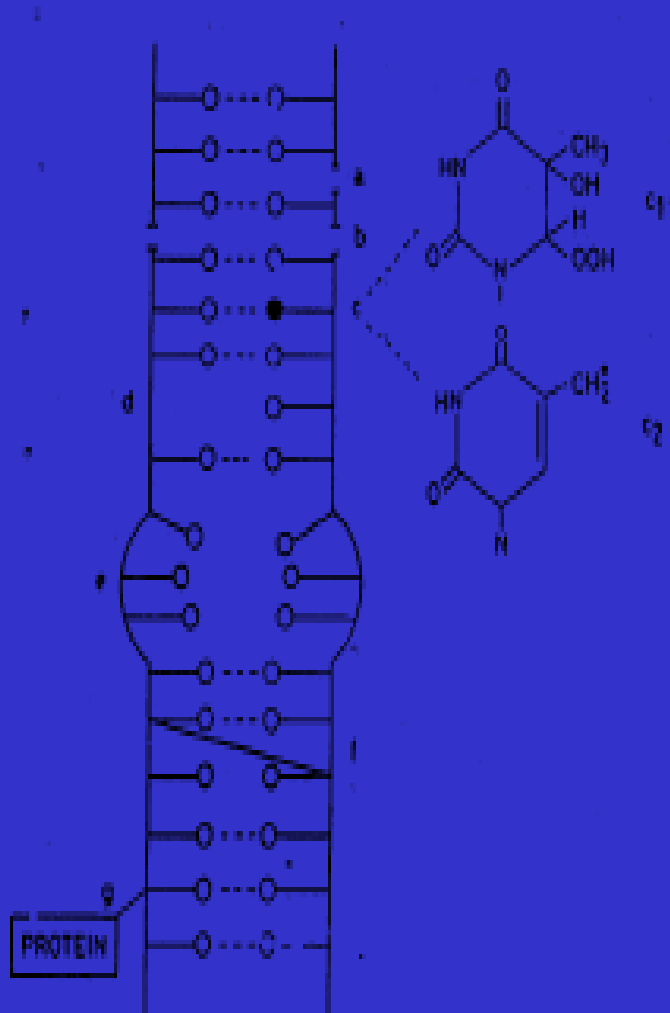
- Es conocido que tanto *agentes físicos como químicos* son capaces de *lesionar el ADN* pudiendo llevar:
 - ✓ a la muerte celular inmediata o
 - ✓ diferida (aquella que se produce después de algunas divisiones)
 - ✓ a la muerte celular programada (apoptosis)
- En ciertas circunstancias se ponen en juego mecanismos enzimáticos de reconocimiento y remoción de dichas lesiones que pueden dar lugar a la sobrevivencia celular manteniendo la *continuidad de la información genética* de generación en generación.
- La magnitud del daño o los errores producidos en estos procesos pueden dar lugar a la *sobrevivencia con mutación* y en ciertas líneas celulares a la *transformación maligna*.

- Entre los agentes conocidos de ser genotóxicos frente poblaciones celulares se encuentran:
 - ✓ las radiaciones ionizantes
 - ✓ la hipertermia
 - ✓ el UVC
 - ✓ agentes químicos como la bleomicina

Éste último es un antibiótico antitumoral que ejerce su efecto a través de la *producción de radicales libres* que determinan importantes lesiones sobre todo a nivel del ADN.

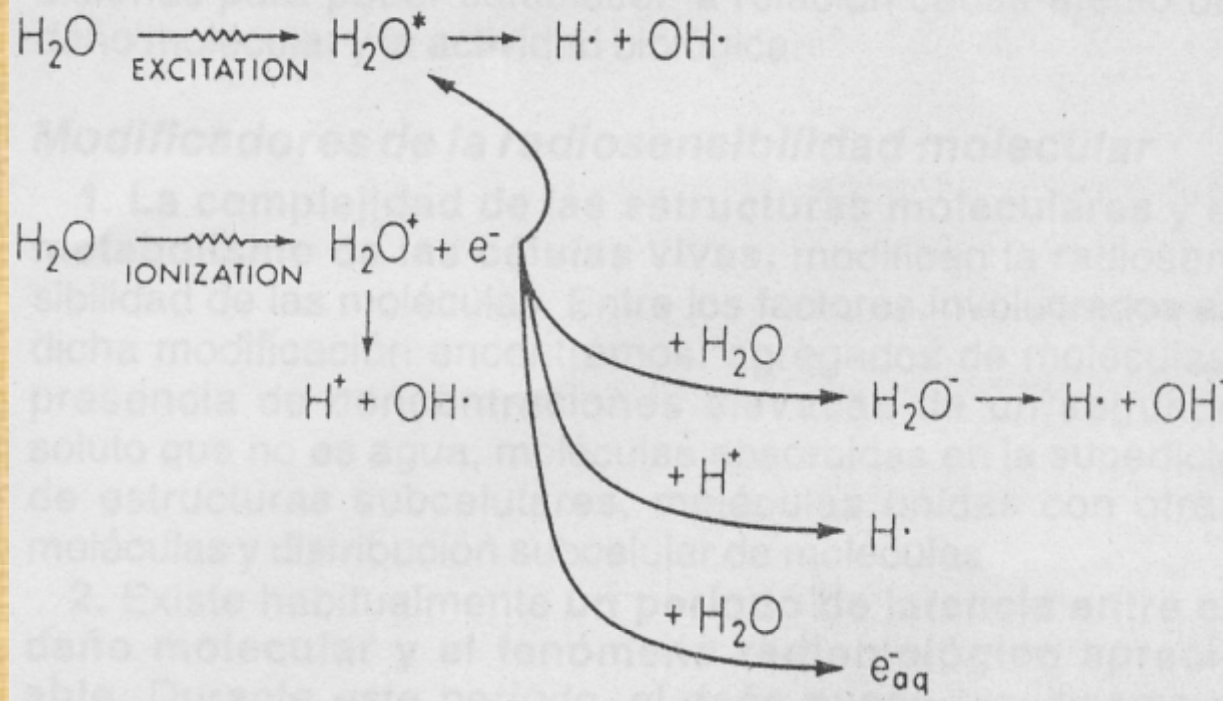
- Para estudiar la sensibilidad de las poblaciones celulares a diferentes agentes el investigador desde hace muchísimos años ha recurrido al estudio de la *respuesta celular frente a dosis crecientes* de estos.





Lesiones en el ADN
 producidas por las
 radiaciones ionizantes:

- ✓ Roturas simples
- ✓ Roturas dobles
- ✓ Cambios de bases
- ✓ Roturas de puentes de hidrógeno
- ✓ Uniones entre cadenas
- ✓ Uniones del ADN a proteínas



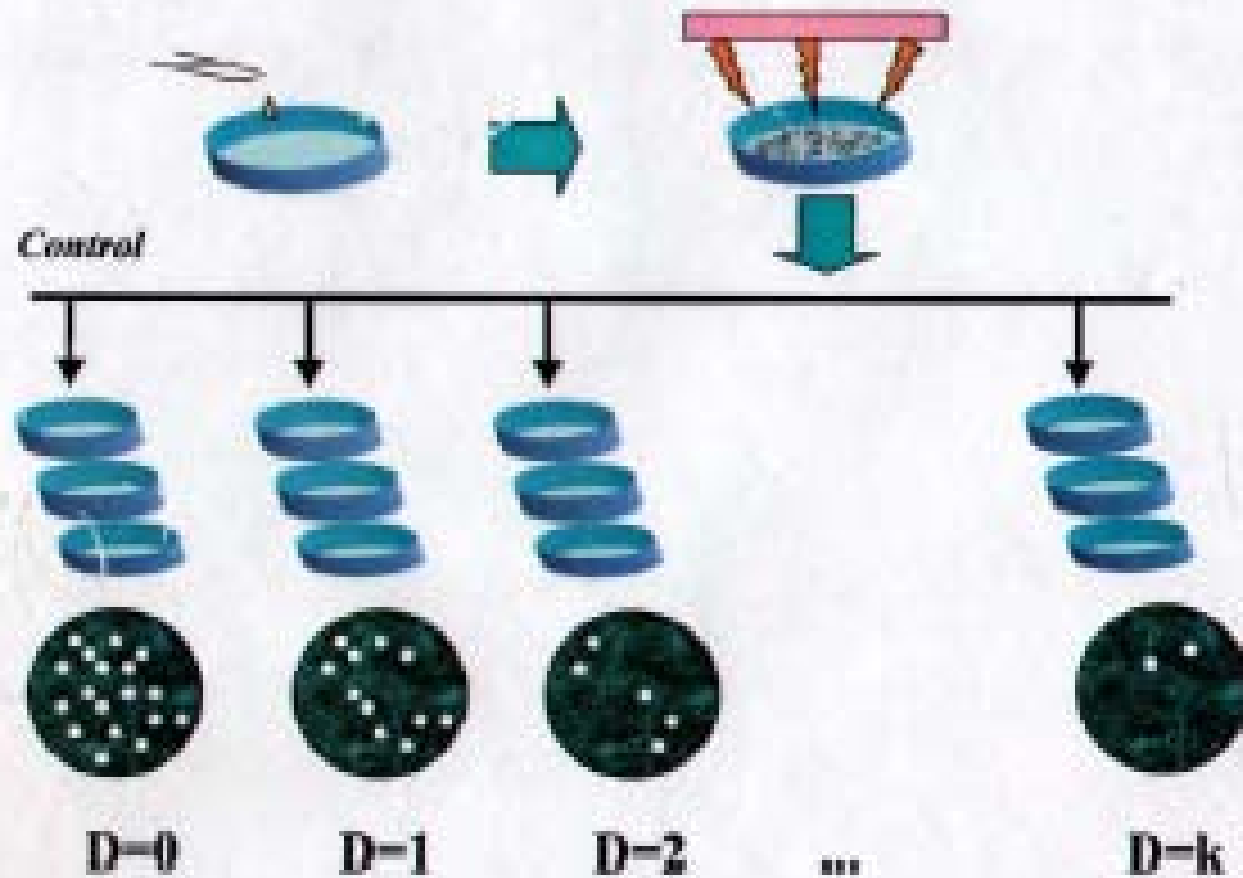
Efecto de las radiaciones ionizantes sobre la molécula de agua, ***formación de radicales libres***, especies químicas altamente reactivas que reaccionan con las moléculas orgánicas.

- Se estudian los *fenómenos de letalidad y mutagénesis* en función de la dosis del agente utilizando poblaciones celulares bien caracterizadas desde el punto de vista genético y bioquímico como es el caso de *Saccharomyces cerevisiae* (se sabe presenta altas homologías con especies superiores incluso el hombre).
- De este eucariote se han aislado:
 - ✓ mutantes de la reparación
 - ✓ genes involucrados en cascadas de transducción y transmisión de señales

los cuales a través de complejos mecanismos participan en el *procesamiento de lesiones* que se producen a nivel de distintos blancos macromoleculares (ADN el más importante).

- La utilización de mutantes ha permitido aclarar el funcionamiento de distintas *vías de reparación* algunas de las cuales con bajísima probabilidad de error permiten corregir las lesiones sin que tenga lugar el daño genético. En forma genérica los mecanismos de reparación involucrados en la aparición de mutaciones son llamados “con error” o mutagénicos.
- Una aproximación a la comprensión de la sensibilidad de las poblaciones a diferentes agentes es el estudio de la *fracción de sobrevivida (S)* en función de una dosis x determinada del agente que lesiona el ADN.
- Para determinar $S=f(x)$, luego del tratamiento se siembran las células tratadas en medio sólido (YPDA, YE 1%, Dextrosa 2%, Peptona 2%, Agar 2%). Se incuban 48h a 30°C. Se cuentan las colonias formadas y se calcula la probabilidad de sobrevivida.

CURVAS DE SOBREVIVENCIA A LAS RADIACIONES

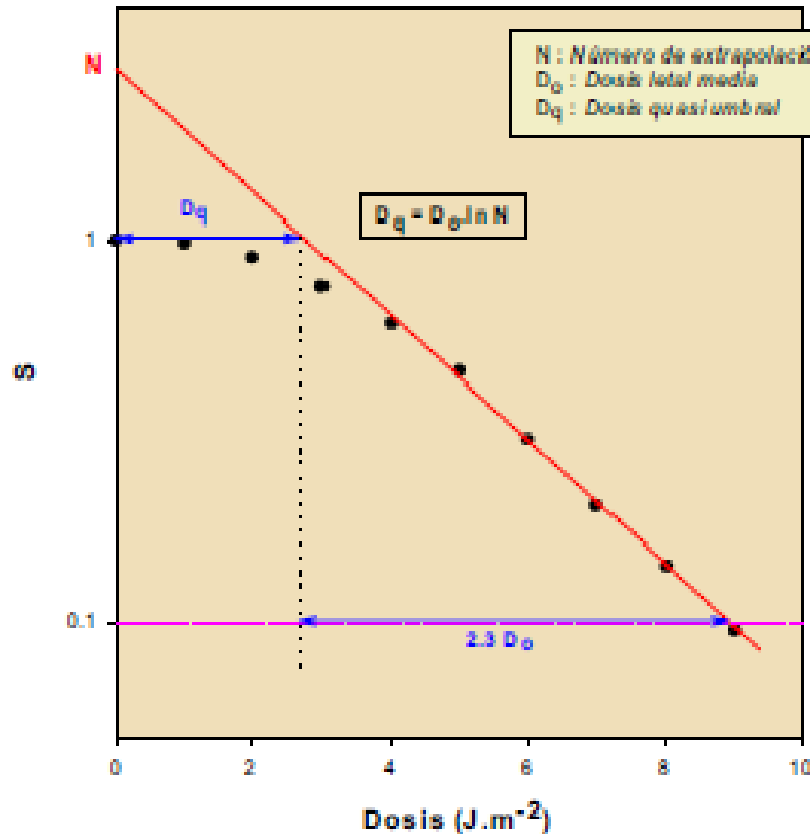


$$S = \frac{Nm}{No}$$

Nm es el n° de clonas formadas y No corresponde a n° de células sembradas luego del tratamiento.

- Una vez obtenidos los pares de datos se confecciona una tabla de valores de $S = f(x)$ y se representan en escala semilogarítmica, se calculan para cada punto los intervalos de confianza en base a la distribución binomial ($P = .95$) y se ajusta la curva correspondiente.
- Para caracterizar la sensibilidad de la población al agente utilizado se calculan los *parámetros radiobiológicos* Dq , N y Do . De acuerdo a los resultados pueden ajustarse los modelos matemáticos que mejor describan este comportamiento: exponencial, lineal cuadrático y otros.

CURVAS DE SOBREVIDA EN FUNCION DE LA DOSIS DE IRRADIACION PARA METROS



Modelo Multitarget

$$S = 1 - \left(1 - e^{-\frac{D}{D_0}} \right)^N$$

D_0 : dosis letal media. Es la dosis que corresponde a una probabilidad de supervivencia = 0.37.

D_q : dosis quasi umbral. En todo este rango la probabilidad de supervivencia es prácticamente = 1.

Representa la capacidad de reparación.

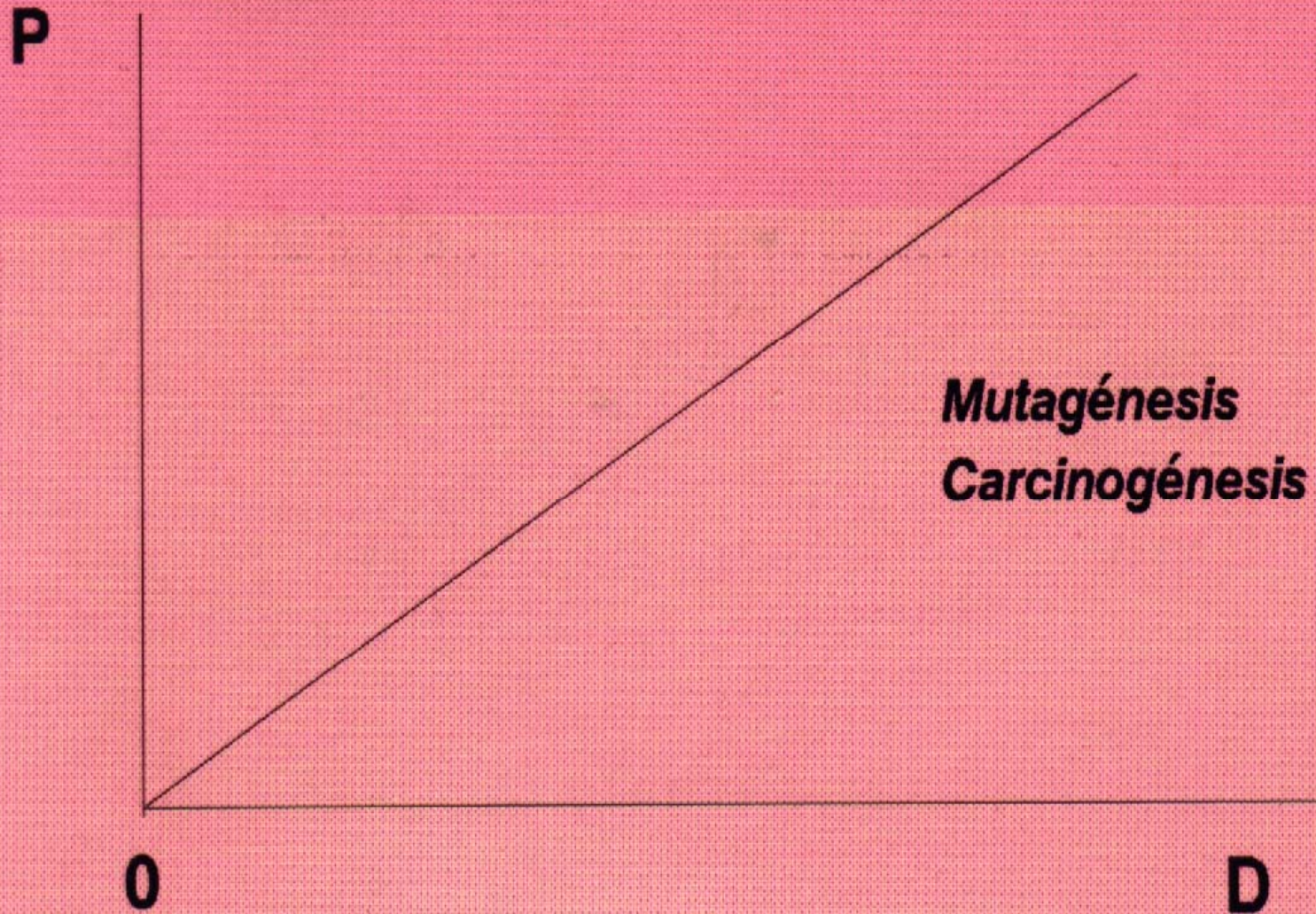
N : nº de extrapolación.

- Para *estudiar la mutagénesis* se utiliza una población de *Saccharomyces cerevisiae* (cepa auxotrófica SC7k lys) con la cual puede estudiarse la reversión a la prototrofia para lisina como expresión de la mutación luego de los tratamientos.
- En este caso muestras de la población tratada se sembraran en medio solido de omisión (OM, YNB 0.67%, 1% dextrosa, 2% agar). Se incuban durante 15 días a 30°C. Se cuentan las revertantes y se calculara luego Pm e Y en f(x), se buscan los intervalos de confianza, se hacen las representaciones gráficas y el ajuste de las curvas obtenidas.

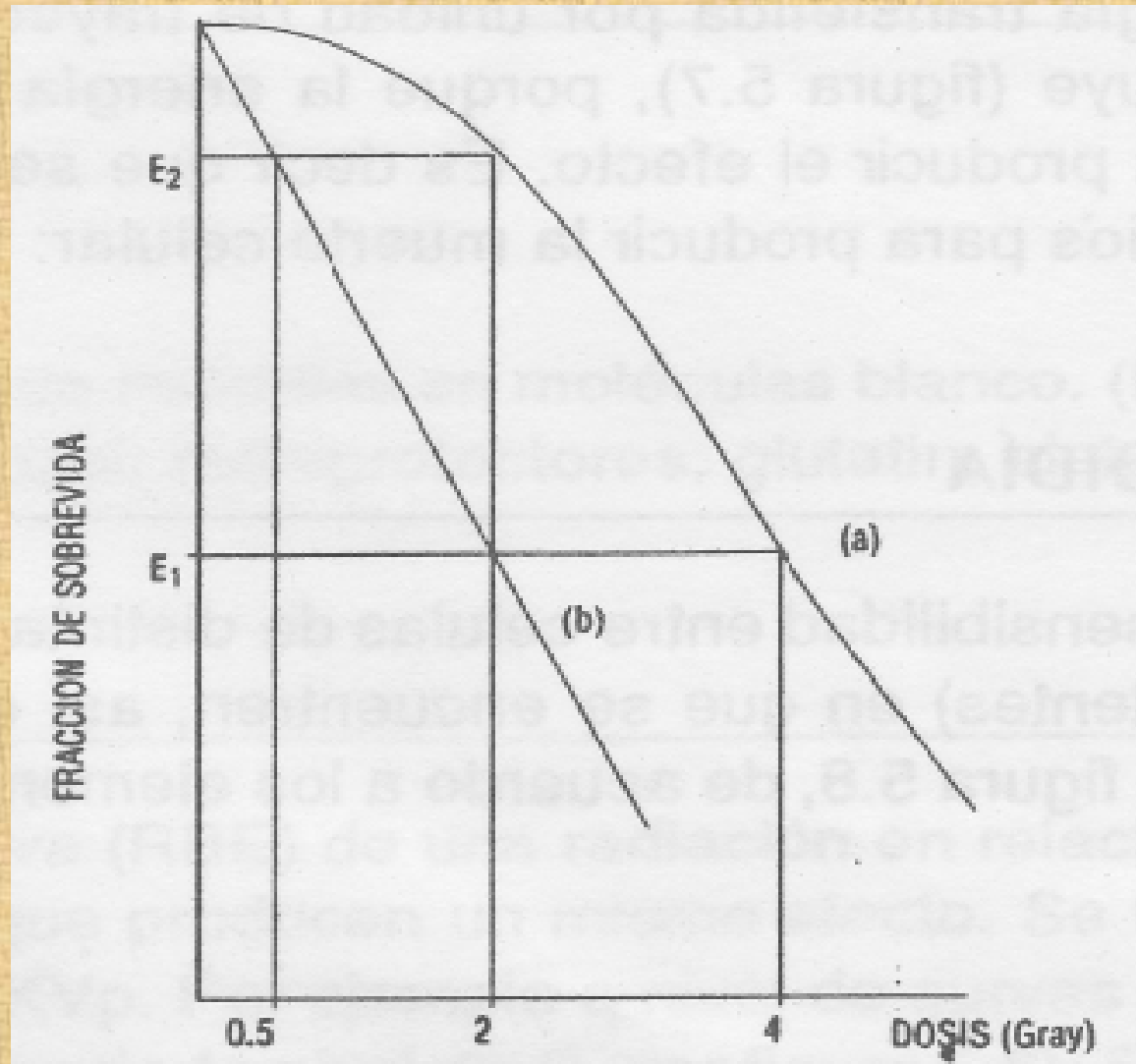
$$Y = \frac{\text{n}^\circ \text{ revertantes}}{\text{n}^\circ \text{ células sembradas}}$$

$$P_m = Y \cdot S(x)$$

Efectos Estocásticos

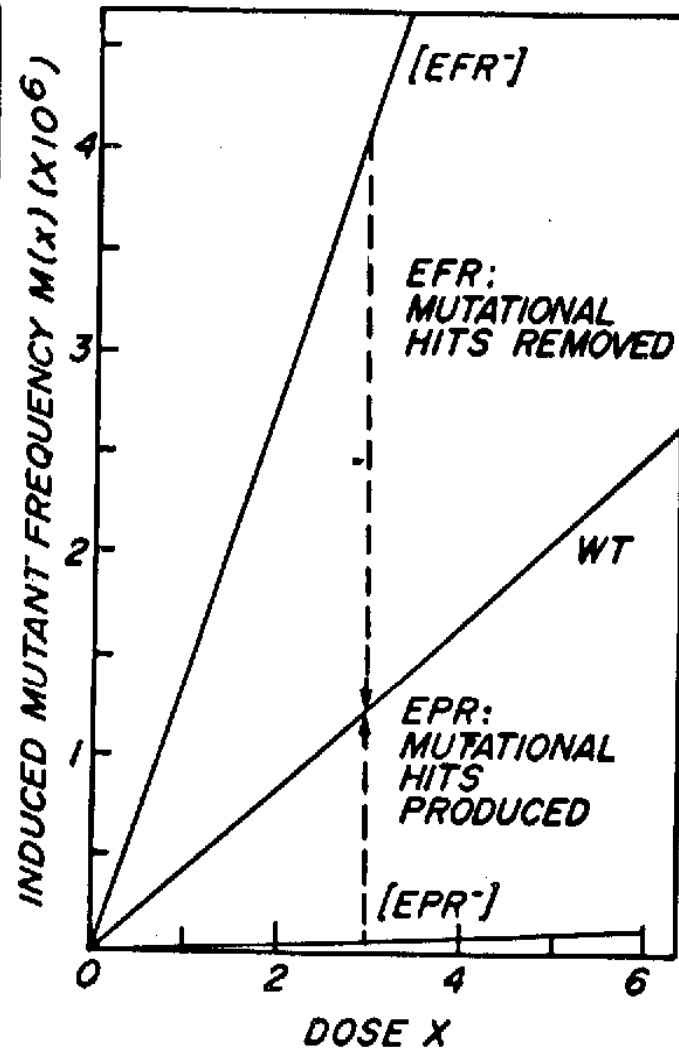
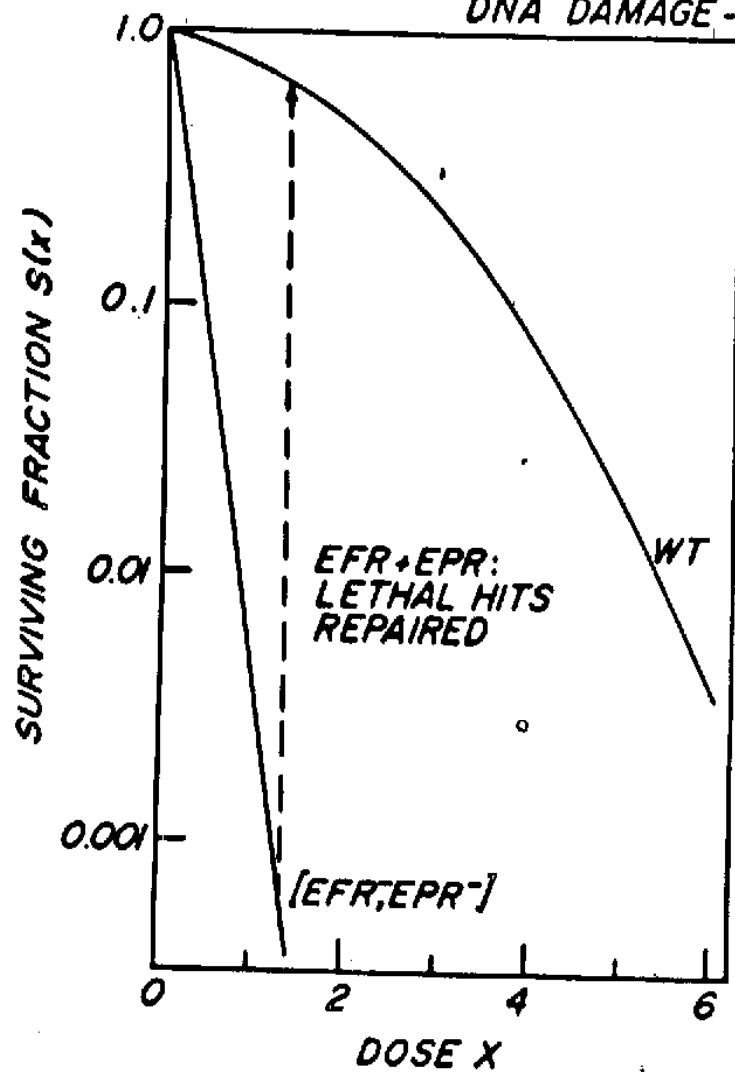


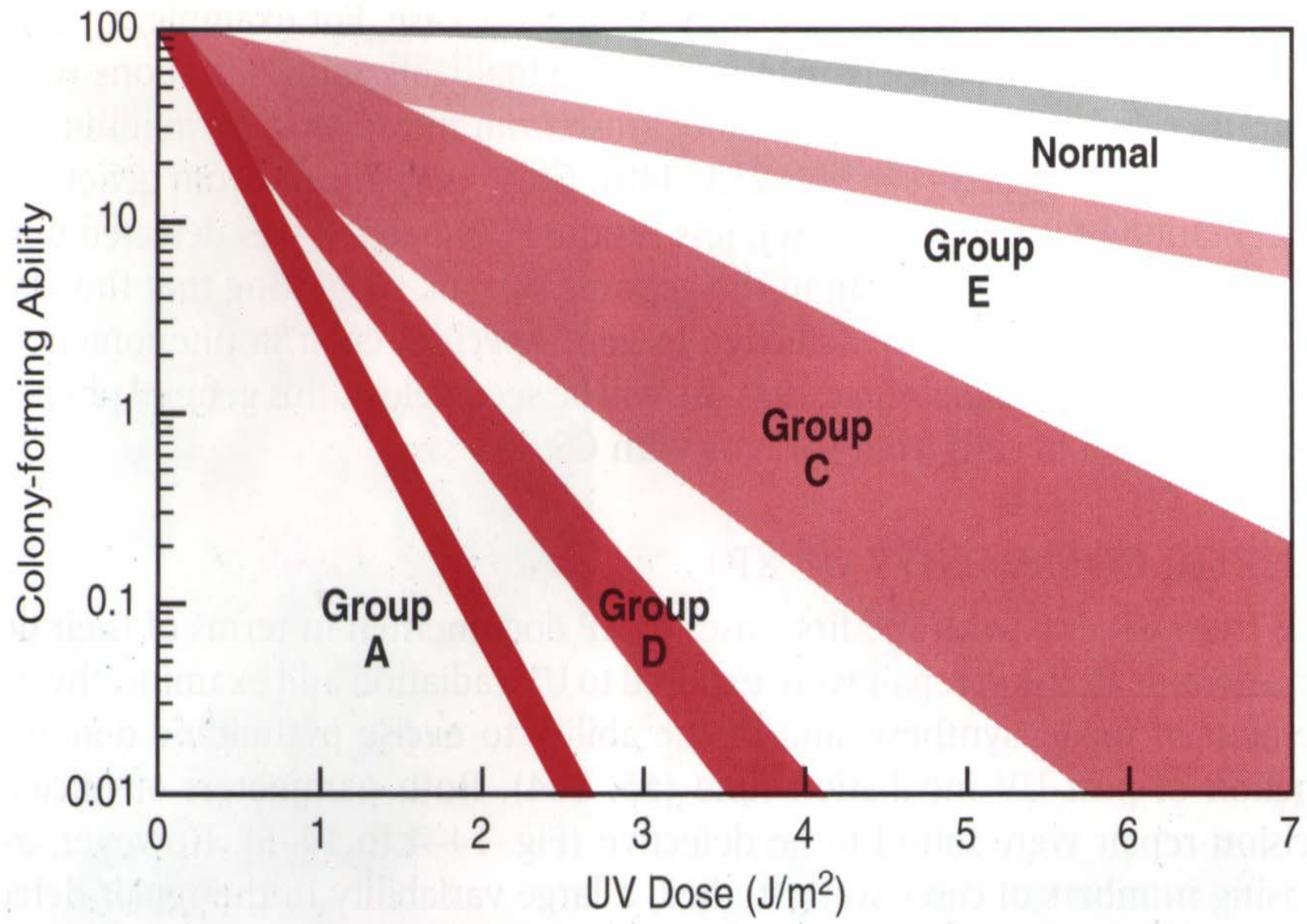
- El desarrollo de los conocimientos acerca del efecto de los especies reactivas del oxígeno (ROS) sobre las *moléculas biológicas* ha llevado a la búsqueda de *productos naturales* que pudieran proteger del efecto nocivo de estas sustancias, que se producen:
 - ✓ continuamente en el organismo (habiendo un balance entre estos, sustancias reductoras y enzimas de la defensa antioxidante que declinan en el envejecimiento)
 - ✓ por efecto de las radiaciones ionizantes, y
 - ✓ por efecto de fármacos radiomiméticos empleados en terapia tumoral.
- Es así que se le ha dado gran importancia a los efectos protectores de los productos naturales como es el caso del *vinho tannat*, de hecho ya hay muchos trabajos que describen la protección que este producto confiere frente a agentes genotóxicos como el H_2O_2 y otros.



- Es necesario proseguir los estudios para clarificar acerca de cuáles son los *componentes* de este producto natural que estarían en la base del *efecto protector*.
- Esto motiva el estudio de componentes del vino por ejemplo *polifenoles*, como modificadores de la sensibilidad de las poblaciones celulares a los efectos letales y mutagénicos de agentes genotóxicos y a través de estos estudios aclarar luego los mecanismos involucrados en esta posible protección.
- Esto implica estudios de sobrevida y mutagénesis a por lo menos dos agentes actuando solos y combinados.

DNA DAMAGE-REPAIR HYPOTHESIS





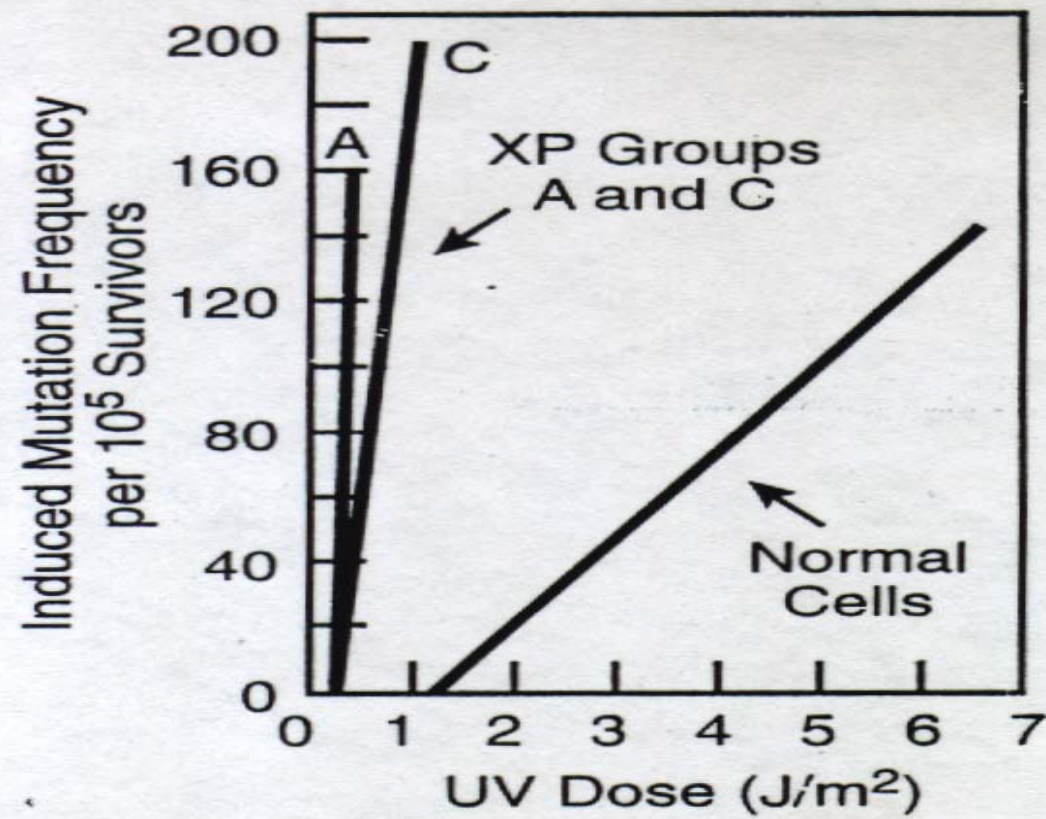


Figure 14-3 XP cells (genetic complementation groups A and C are shown) have an increased frequency of mutations at various genetic loci (such as the locus for azaguanine resistance) when exposed to DNA-damaging agents such as UV radiation. (Adapted from Friedberg [102] with permission.)

