

## Exploración del efecto protector frente a radicales libres de derivados de la uva (*Vitis vinifera* L. Cv.Tannat) en *Saccharomyces cerevisiae*

N. BRACESCO<sup>1\*</sup>, V. A. SALVO<sup>3</sup>, S. ROCHA<sup>1</sup>, M. DELL<sup>1</sup>, F. CARRAU<sup>2</sup>, E. NUNES<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Radiobiología. Dpto. de Biofísica. Facultades de Medicina y de Ciencias. Universidad de la República. Gral. Flores 2125. CP11800. Montevideo. Uruguay; <sup>2</sup>Sección Enología, Cátedra Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Química Universidad de la República. Gral. Flores 2124. CP11800. Montevideo. Uruguay.

<sup>3</sup>Hematology and Oncology Dpt., Tulane University, New Orleans. USA.

\*Correspondencia. E-mail: nbracesco@fmed.edu.uy

### RESUMEN

Se exploró un posible efecto protector del genoma por parte de un derivado de la uva (vino Tannat). Se utilizaron poblaciones celulares haploides y diploides de *Saccharomyces cerevisiae* como modelo eucariota. Muestras celulares se expusieron a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en medio nutriente. El ADN se analizó por densitometría láser, luego de su aislamiento y separación por electroforesis con campos pulsados. Se aplicó la distribución de Poisson para la determinación de roturas dobles. El número de roturas dobles del ADN y la frecuencia mutagénica aumentaron en función de la dosis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lo que disminuyó la probabilidad de sobrevivida. La combinación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con vino Tannat aumentó significativamente la probabilidad de sobrevivida y disminuyó el número de roturas dobles. No se observó efecto mutagénico por el vino Tannat. Estos efectos pudieron simularse utilizando altas concentraciones de  $\alpha$ -tocoferol. Los resultados indican que un derivado de *Vitis vinifera* puede, en ciertas condiciones, disminuir las dobles roturas de ADN producidas por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e incrementar las probabilidades de sobrevivida celular. Los blancos involucrados podrían ser, entre otros, componentes intracelulares de las cascadas redox y/o enzimas de reparación del ADN.

**Palabras clave:** peróxido, vino Tannat, genoma, *Saccharomyces cerevisiae*

### ABSTRACT

**Analysis of a putative protection against free radicals by grape derivatives (*Vitis vinifera* L. Cv.Tannat) in *Saccharomyces cerevisiae*.** The aim of this work was to analyse a possible genome protection provided by a grape derivative (Tannat wine) in yeast cell populations exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Haploid and diploid strains of *Saccharomyces cerevisiae* were used as the eukaryotic model. Cell samples were exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in a nutrient medium. Chromosomal DNA was analysed after isolation and separation by pulsed field electrophoresis. Double strand breaks were determined by laser densitometry and application of Poisson distribution. Both haploid and diploid cells showed H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dose dependent DNA fractionation, as well as an increase of lethal -and mutation- events. Upon combination of the Tannat wine and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a significant decrease of double strand breaks was observed, in association with an increase in surviving fractions. No mutagenic effect was observed after wine exposure. Part of the observations regarding protective wine effect were simulated by exposure to high concentrations of  $\alpha$ -tocopherol. Present results indicate that a grape derivative could act as the genome protector and increase cell survival probabilities. Among others, the involved molecular targets could be components of transduction redox cascades as well as DNA repair enzymes.

**Keywords:** peroxide, Tannat wine, genome, *Saccharomyces cerevisiae*

### INTRODUCCIÓN

Ciertos tipos de agentes físicos y químicos pueden alterar la proliferación celular, fundamentalmente a causa de sus efectos sobre el ADN, sobre las membranas y sobre los componentes de cascadas de transducción de señales, lo que resulta en retardos en el ciclo celular y en lesiones letales (necrosis, apoptosis), mutagénicas y recombinogénicas (13). Algunos ejemplos de estos agentes son las radiaciones ionizantes y ultravioletas, la hipertermia y las especies reactivas del oxígeno (ROS), provenientes del metabolismo celular y del entorno. Un

ejemplo de ROS es el peróxido de hidrógeno, generador de radicales libres y productor de aberraciones cromosómicas y recombinaciones (8). Los efectos nocivos de las ROS pueden ser contrarrestados por mecanismos de óxido-reducción y/o de captura (18, 40).

Se ha indicado la importancia de los radicales libres en procesos de envejecimiento y en la transformación maligna por acumulación de lesiones oxidativas, mutaciones y cambios irreversibles en biomoléculas (8, 12, 18). La modificación oxidativa de las lipoproteínas por radicales libres, particularmente la oxidación de las de baja densidad (LDL), sería uno de los mecanismos bási-

cos de la aterogénesis, y se ha planteado la inhibición de su oxidación y citotoxicidad por fenoles y vitaminas E y A *in vitro* (20, 33). Se ha señalado que el vino tinto es capaz de contrarrestar estas lesiones (paradoja francesa) (38). El vino tinto es, de hecho, una de las bebidas con mayor índice de polifenoles, con valores medios de 2 g/l, de los cuales 65-70% son polifenoles neutros (ej.: catequinas y epicatequinas) y 15%, aproximadamente, corresponde a quercetina y mircetina. La fracción restante estaría integrada por los ácidos gálico y cafeico, todos ellos con una potente acción antioxidante (21, 29). La variedad de uva *Vitis vinifera* Tannat, muy extendida en viñedos del Uruguay, es una de las que contiene mayor concentración de polifenoles (4, 9, 16). Trabajos recientes indican la capacidad antioxidante de estos vinos *in vitro*, en modelos de membranas celulares de cerebro de rata (10). Además, utilizando plasma humano, se observó que el vino Tannat inhibe *in vitro* la oxidación de la LDL humana producida por tres sistemas diferentes: inducción por  $\text{Cu}^{2+}$ , peroxinitrito y lipoperoxidasa (17, 21, 33). El efecto protector del vino Tannat podría darse a distintos niveles, por su capacidad de reducir o de captar las especies reactivas del oxígeno. Los radicales hidroxilo generados por la reacción de Haber-Weiss (a partir de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$  y  $\text{Fe}^{3+}$ ) podrían ser parte de un proceso general de óxido-reducción, donde el activador transcripcional Yap1 —en humanos AP (Jun-Fos)—, la tiorredoxina, el NADPH, el GSH y, en referencia a nuestro caso, derivados fenólicos contenidos en el vino Tannat, podrían actuar manteniendo cierto estado de óxido-reducción y protegiendo blancos críticos (ej.: ADN nuclear, membrana mitocondrial, enzimas de reparación) involucrados en la muerte celular y en la inestabilidad genómica por lesiones oxidativas (25, 26).

El objetivo del presente trabajo fue el análisis del daño producido por el peróxido de hidrógeno a nivel del ADN y de la inducción de eventos potencialmente letales y mutagénicos en poblaciones celulares, así como su posible disminución en presencia de vino Tannat. Se tomó como referencia comparativa el efecto del  $\alpha$ -tocoferol en similares condiciones experimentales. Se demostró que el vino Tannat disminuye la producción de roturas dobles en el ADN inducidas por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y que, paralelamente, aumenta la probabilidad de sobrevivencia en poblaciones celulares haploides y diploides. No se observó aumento de la actividad mutagénica en presencia del citado derivado de *Vitis vinifera*. Los efectos son similares a los producidos por altas concentraciones de acetato de  $\alpha$ -tocoferol.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepas de levaduras

Como modelo eucariota se utilizaron cepas de levadura haploides y diploides de *Saccharomyces cerevisiae*: tipo salvaje diploide SC6 (RAD+) e isogénica haploide SC7K (RAD+ *lys* 2) (2, 32).

### Medios de cultivo y de omisión

Se utilizaron medios de cultivo nutritivos para el estudio de la sobrevivencia (YPD, YPDA) y selectivos para mutagénesis habituales en *Saccharomyces cerevisiae*, descritos en la literatura (34). Se detallan a continuación:

Medio nutritivo líquido YPD: 1% extracto de levadura (Difco, US Biological, Cleveland, USA), 2% bactopectona (Difco, US Biological, Cleveland, USA) y 2% glucosa (Sigma, St. Louis, USA).

Medio nutritivo sólido YPDA: YPD y 2% agar (Difco, US Biological, Cleveland, USA).

Medio selectivo de omisión OM: 0,67% base nitrogenada de levadura (Difco, Cleveland, USA), 2% glucosa (Sigma, St. Louis, USA) y 2% agar (Difco, US Biological, Cleveland, USA).

### Exposición a agentes

- Peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Se utilizó  $\text{H}_2\text{O}_2$  1M, sin estabilizantes. Se agregó a parte de las muestras celulares en medio de cultivo, en la cantidad necesaria para obtener una concentración final de 1-10 mM. La exposición a cada concentración se prolongó por 1,5 horas («dosis»).
- Vino tinto Cv. Tannat (Vt). Se utilizó un vino tinto Tannat de la región de Las Violetas (Departamento de Canelones, Uruguay), cosechado en 1997 y embotellado en 1999 por Bodegas Carrau. Los datos más relevantes de su composición son los siguientes: etanol, 12,9%; acidez (expresada en ácido sulfúrico), 3,7 g/l; acidez volátil, 0,33 g/l; pH, 3,6; índice de polifenoles totales (IPT) medido por espectrometría directa a 280 nm, 100; polifenoles totales, 2,1 g/l (reactivo Folin-Cicolteau,  $\lambda$ : 750 nm), utilizando la quercetina aglicona (Sigma, St. Louis, USA) como estándar (39). El vino se agregó a parte de las muestras celulares en medio de cultivo, en proporción 1/10 (p/p), durante 1,5 horas.
- Acetato de  $\alpha$ -tocoferol (T). Se utilizó Ephinal 400 UI (Roche, Basilea, Suiza); se colocó directamente a las muestras celulares en medio de cultivo, a una concentración de 4,7 mg/ml durante 1,5 horas, en presencia de Tween 80 (Nuclear, Chicago, USA) 1/1000, concentración que no afecta ningún parámetro del crecimiento celular (5, 7).

### Tratamientos

Se partió de cultivos en fase exponencial de crecimiento  $N = 2 \times 10^7$  células/ml. Parte de las muestras celulares se expusieron en medio nutriente, según lo detallado, a diferentes concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (5-10 mM), vino Tannat 1/10 (p/p) o  $\alpha$ -tocoferol (4,7 mg/ml). Los cultivos fueron también expuestos a las combinaciones  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Vt}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{T}$  durante 1,5 horas, colocando las alícuotas de Vt y T inmediatamente antes que el  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Los respectivos controles sin tratamiento se analizaron en paralelo. Luego de cada tratamiento, las muestras se lavaron y resuspendieron en agua destilada o buffer para su posterior procesamiento.

### Análisis de sobrevivencia

Luego de dilución apropiada, las muestras celulares se sembraron en medio nutriente sólido (0,2 ml/placa, 3 placas por dosis). Se estimó la probabilidad de supervivencia por la respectiva frecuencia relativa o tasa de sobrevivencia:  $S = N_s / N_0$ , donde  $N_s$  es el número total de células sobrevivientes/ml, capaces de multiplicarse en medio nutriente sólido dando lugar a colonias, y  $N_0$  es el número de células sobrevivientes/ml a la dosis 0 (número de colonias de la muestra control). Se determinaron las funciones de sobrevivencia  $S(x)$ ,  $S(x,y)$  y  $S(x,z)$ , donde  $x$  es la dosis de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $y$  es la dosis correspondiente al vino Tannat (Vt); y  $z$  es la dosis de  $\alpha$ -tocoferol (T) (19).

### Análisis de mutagénesis

Las muestras celulares en suspensión ( $N = 10^7$ /ml) fueron sembradas en placas de Petri con medio de omisión (OM) para la cepa SC7K *lys* (el ensayo se realizó por quintuplicado: 0,2 ml/

placa). Las placas se incubaron a 30 °C durante 21 días y luego se realizó el conteo de las colonias correspondientes a las revertantes *lys* → *LYS*. Se calculó la frecuencia de mutación  $M(n)$  y el rendimiento mutagénico  $Y(n)$  para cada dosis  $n$ :  $x, y, z$ , de la siguiente manera:  $M(n) = Nm_{(n)}/Ns$ ;  $Y(n) = Nm_{(n)}/No_{(n)}$ , donde  $Nm$  es el número de mutantes/ml para las dosis  $x, y, z$ , únicas o en combinación;  $Ns_{(n)}$  es el número de sobrevivientes/ml y  $No_{(n)}$  el número total de células/ml para cada dosis única o en combinación. Se calculó, además, la frecuencia espontánea de mutación en las condiciones de nuestros experimentos,  $n = 0$  (11, 19, 36).

#### Aislamiento del ADN cromosómico y determinación de las roturas de doble cadena (DSB)

Las muestras celulares con aproximadamente entre  $5 \times 10^8$  y  $1 \times 10^9$  células/ml fueron lavadas con buffer fosfato salino (PBS, pH 7,4) y centrifugadas; el precipitado fue procesado inmediatamente o se guardó por un tiempo no mayor de siete días en freezer (-20 °C) hasta su procesamiento. Se analizaron los resultados correspondientes a los tratamientos con  $x$ ;  $x+y$ ;  $x+z$ ; donde  $x = 5$  mM;  $y = 10$  (p/p);  $z = 4,7$  mg/ml. El método de aislamiento del ADN cromosómico consistió en incluir cada muestra de células en un bloque de agarosa y realizar la destrucción de los componentes celulares excepto el ADN, con diferentes enzimas (litica y proteinasa K, Sigma, St. Louis, USA). La separación cromosómica se realizó mediante electroforesis por campos pulsados transversales alternantes (TAFE), utilizando el equipo GeneLine II (Beckman, Fullerton, USA). El análisis de las bandas cromosómicas se realizó por lectura del negativo fotográfico con el densitómetro láser LKB (Ultrosan XL, Pharmacia), utilizando el programa de análisis GelScan XL (versión 2.1, Pharmacia). Se cuantificaron las DSB por análisis de los correspondientes densitogramas. El cálculo del número de DSB por genoma haploide se basó en la distribución de Poisson, de acuerdo a la ecuación:  $DSB = -\ln I_x/I_0$ , donde  $I_0$  representa la integral del pico de absorbancia para el control e  $I_x$ , para la muestra tratada (1, 14, 15, 24).

## RESULTADOS

### Análisis de sobrevivida

Con el fin de analizar el efecto del  $H_2O_2$  sobre las cepas haploides y diploides *SC7K lys* y *SC6*, respectiva-

mente, se estimó la probabilidad de sobrevivida de muestras celulares aleatorias en función de la dosis. Se evidenció una disminución de la tasa de sobrevivida en las muestras tratadas en función de la concentración de  $H_2O_2$  ( $0 \leq x \leq 10$  mM) (Figura 1, A y B). Ambas curvas presentaron dos componentes de distinta sensibilidad; uno con mayor pendiente, que corresponde a las dosis relativamente bajas de  $H_2O_2$ , y un segundo componente de mayor resistencia, a dosis mayores. Este tipo de respuesta bifásica había sido observada anteriormente en las mismas cepas tratadas con otro agente químico productor de radicales libres (bleomicina) (23).

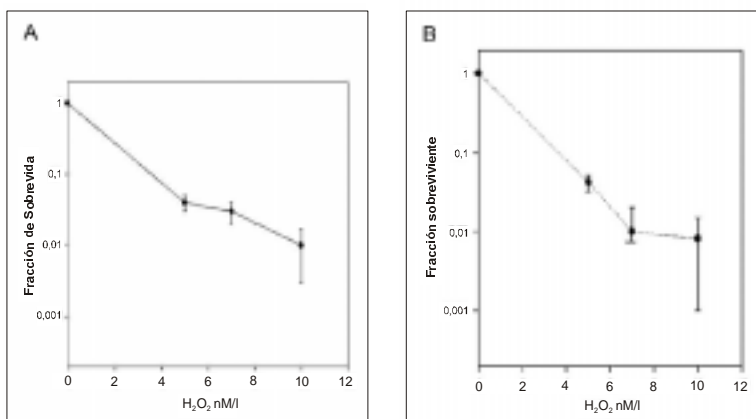
En el caso del tratamiento concomitante con  $H_2O_2$  y Vt (5 y 10 mM), la tasa de sobrevivida aumentó significativamente, y se constataron distintas magnitudes de incremento en relación con el tratamiento único descrito anteriormente, tanto en muestras haploides como diploides. En el caso de la combinación  $H_2O_2 + T$ , también se observó un incremento significativo en relación con el tratamiento único, aunque dicho incremento fue menor que el observado luego de  $H_2O_2 + Vt$ . (Figura 2, A, B, C y D).

Es de destacar que muestras de ambas poblaciones expuestas sólo al vino Tannat (Vt) en el medio de cultivo o al  $\alpha$ -tocoferol (T), a las concentraciones indicadas, presentaron tasas de sobrevivida similares a los controles no tratados ( $S = 1.0 \pm 0.07$ ).

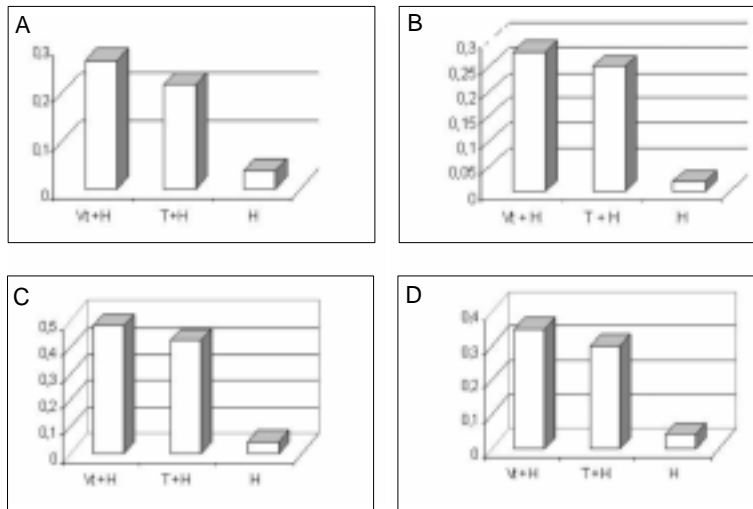
### Dobles roturas de cadena (DSB)

Se observó que la exposición de las poblaciones celulares diploides al  $H_2O_2$  produjo una importante degradación del ADN (27 DSB/genoma a la dosis 5 mM). La exposición a vino Tannat solamente o a  $\alpha$ -tocoferol no produjo DSB (Figura 3, A, B y C). Similares resultados se obtuvieron utilizando la cepa haploide (datos no mostra-

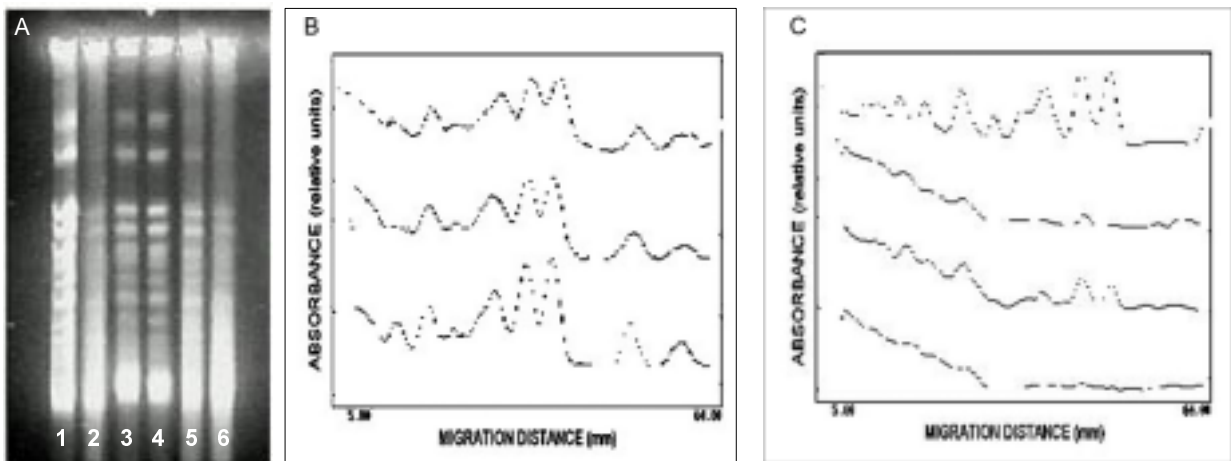
(Controlar la sigla  $H_2O_2$  ?? en la figura A)



**Figura 1.** Tasa de sobrevivida en función de la concentración de  $H_2O_2$ . Los datos representan las medias de tres experimentos independientes. Las barras de error corresponden a los intervalos de confianza binomiales ( $p \leq 0.05$ ). **A)** cepa haploide *SC7K lys*; **B)** diploide *SC6*.



**Figura 2.** Diagramas de barras correspondientes a las tasas de supervivencia de las cepas *SC7K lys* y *SC6*, luego de exposición a  $H_2O_2$  y a las combinaciones Vt +  $H_2O_2$  y T+  $H_2O_2$ . **A)** Cepa *SC7K lys*,  $H_2O_2$  5 mM, y sus combinaciones con Vt o con T; **B)** ídem panel (a) para *SC7K lys*, tratada con 10 mM  $H_2O_2$  y sus combinaciones Vt +  $H_2O_2$  y T+  $H_2O_2$ ; **C)** *SC6*, luego de exposición a 5 mM de  $H_2O_2$  y a sus combinaciones Vt +  $H_2O_2$  y T+  $H_2O_2$ ; **D)** cepa *SC6* luego de exposición a 10 mM de  $H_2O_2$  y a sus combinaciones Vt +  $H_2O_2$  y T+  $H_2O_2$ .



**Figura 3. A)** Separación del ADN cromosómico por electroforesis por campos pulsados alternados (TAFE), cepa *SC6*. De izquierda a derecha: 1. control, 2.  $H_2O_2$  (5 mM); 3. Vt; 4. T; 5. Vt +  $H_2O_2$  (5 mM); 6. T +  $H_2O_2$  (5 mM); **B)** Densitogramas láser correspondientes a *SC6* (fotografía en **A**). Absorbancia (unidades relativas) en función de la distancia de migración (unidades relativas). De arriba hacia abajo: control; Vt y T; **C)** Densitogramas correspondientes a *SC6*. De arriba hacia abajo: control,  $H_2O_2$  (5 mM), Vt +  $H_2O_2$  (5 mM), T+  $H_2O_2$  (5 mM).

dos). Consistentemente con los resultados del análisis de supervivencia en las combinaciones, el fraccionamiento del ADN producido por el  $H_2O_2$  disminuyó significativamente en presencia de vino Tannat (Figura 3, A, B, C y D; y Tabla 1). Los factores de reducción medidos por el cociente  $FR = \frac{DSB_x}{DSB_{x+y, x+z}}$  fueron, en ambos casos, de 2,3 (Tabla 1).

### Mutagénesis

Se estudió la mutagénesis inducida por el  $H_2O_2$  a través del análisis de la reversión del marcador de auxotrofia a heterotrofia *lys* → *LYS* en la cepa salvaje *SC7K lys* (36). Se observó que la frecuencia de mutación inducida  $M(x)$  aumentó continuamente en función de la concentración de  $H_2O_2$  (Figura 4 A). Además, se determinó la frecuencia

mutagénica inducida por el vino Tannat agregado en el medio nutritivo a la concentración mencionada, y se observó que no existe un aumento significativo del valor correspondiente a la mutación espontánea (Figura 4 B).

## DISCUSIÓN

Nuestros hallazgos *in vivo*, referentes a la disminución significativa de las DSB inducidas por el peróxido de hidrógeno en presencia de vino Tannat y su asociación con el aumento de la sobrevivencia celular (Figuras 1-3, Tabla 1), podrían interpretarse sobre la base de dos mecanismos no excluyentes: protección de blancos críticos involucrados en las cascadas redox a nivel intracelular y estímulo de la reparación de ADN. No puede descartarse una interacción directa entre el peróxido y componentes del vino utilizado.

Con relación a la posible protección del genoma por mecanismos similares a los que actúan en presencia de tocoferol (Figuras 2 y 3), los presentes resultados son consistentes con trabajos previos de nuestro laboratorio, en los que se utilizó como agente oxidante el metilviológeno y como protector el acetato de  $\alpha$ -tocoferol (5-7, 35). También hay concordancia con observaciones *in*

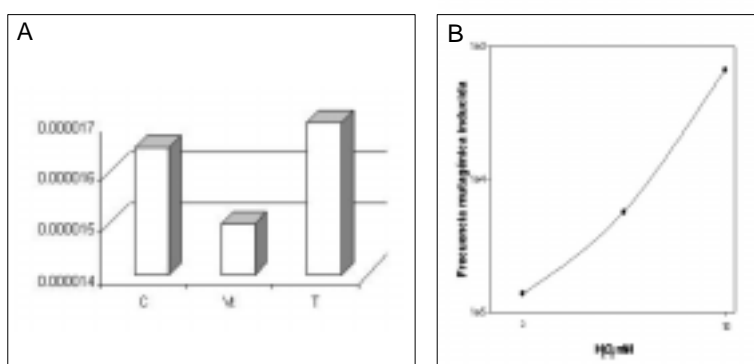
*vitro* a nivel de células hepáticas (30). En las condiciones de nuestros experimentos, también el etanol a las concentraciones presentes en el vino Tannat podría actuar como un factor de defensa celular (3). No se descarta la interacción directa entre el peróxido y el vino Tannat en distintos compartimientos, lo que disminuiría la concentración del primero. En relación con las dobles roturas de ADN (DSB) inducidas por distintos tipos de agentes físicos y químicos oxidantes, se sabe que constituyen lesiones claves en la producción de muerte celular, de aberraciones cromosómicas y de transformación maligna (24, 37). En ciertas condiciones, estas lesiones pueden ser reparadas por recombinación homóloga o heteróloga con distintas probabilidades de error (13). El procesamiento de lesiones oxidativas en bases adyacentes o mal apareadas puede resultar en DSB y requiere, entre otros, los productos de los genes de reparación escisional (13, 23, 28) y cofactores, como la nicotinamida (13). La tasa de mutación, aumentada luego de exposición de las poblaciones haploides al  $H_2O_2$  (Figura 4 A), podría depender de la expresión de la reparación posreplicativa con error, dependiente del gen RAD6 o de la recombinación heteróloga (genes HDF1 y HDF2), de acuerdo a lo observado utilizando células de mamífero o *Saccharomyces cerevisiae* expuestas a agentes oxidantes (13, 24, 28). Es importante destacar que el vino Tannat no modificó la tasa de mutación espontánea (Figura 4 B), lo que indica ausencia de inducción de lesiones mutagénicas.

En conjunto, estos resultados y los datos proporcionados por la bibliografía nos permiten plantear la existencia en el vino Tannat utilizado de uno o más componentes capaces de contrarrestar o impedir en forma directa o indirecta la acción del peróxido de hidrógeno; es decir, la inducción de lesiones a nivel del ADN (DSB), así como los efectos potencialmente letales y mutagénicos. Con alta probabilidad, estos componentes son polifenoles, como el resveratrol, la rutina o la quercetina, y vitaminas, como la nicotinamida (13, 24, 40). Un estudio

**Tabla 1.** Determinación de roturas dobles de ADN (DSB) y factores de reducción correspondientes a distintos tratamientos.

Tratamiento	DSB/genoma	FR
Control	0	—
$H_2O_2$ (x)	$27,0 \pm 2,5$	—
Vt + x	$11,5 \pm 1,2$	$2,3 \pm 0,3$
T + x	$11,5 \pm 1,4$	$2,3 \pm 0,3$

x = 5mM; Vt= 1/10 (p/p); T= 4,7 mg/ml  
FR: Factor de reducción



**Figura 4.** Frecuencia mutagénica en cepa *SC7K lys*. **A)** Tasa espontánea y luego de tratamiento con Vt y T; **B)** Frecuencia mutagénica en función de la dosis de  $H_2O_2$ .

del efecto de cada fracción contenida en el vino Tannat sobre los observables analizados en este trabajo podría precisar con detalle la especificidad y la actividad de cada componente involucrado. Sin embargo, no se puede descartar un efecto global sinérgico del conjunto o de más de uno de los componentes naturales en juego (trabajo en preparación).

## BIBLIOGRAFÍA

- Baur M. Analyse der Rolle von Glutathion bei der Induktion und Reparatur von Doppelstrangbrueche mit Hilfe der Pulsfeld-Gelelektrophorese in Hefe. PhD Thesis, Ludwig Maximilian University, Munich, Alemania, 1990.
- Benathen A, Beam CA. The genetic control of X-ray resistance in budding yeast cells. *Radiat Res* 1977; 69: 99-116.
- Bisson L, Butzke CH, and Ebeler S. The role of moderate ethanol consumption in health and human nutrition. *Am J Enol Vitic* 1995; 46: 449-62.
- Boido E, Lloret A, Medina K, Farina L, Carrau F, Versini G, et al. Aroma composition of *Vitis vinifera* Cv. Tannat: the typical red wine from Uruguay. *J Agric Food Chem* 2003; 18: 5408-13.
- Bracesco N, Salvo V A, Nunes E. Paraquat - induced DNA damage is counteracted by alpha - tocopherol. XII th International Biophysics Congress, B2-13. *Progr Biophys Mol Biol* 1996; 65 Suppl.1: 83.
- Bracesco N, Nunes E. Possible protective effect of red wine on DNA double strand breaks and lethal events induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and paraquat. International Symposium on Recent Trends in Biomedical Research, 1999, Abstract, p 2, Bhabha Atomic Research Centre, India.
- Bracesco N. Exploración del efecto protector frente a radicales libres de derivados de la uva (*Vitis vinifera* Tannat) y de la infusión de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) en *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de Maestría en Biotecnología. Facultad de Ciencias, UDELAR, Uruguay, 2003.
- Brenan RJ, Swoboda BEP, Schiestl RH. Oxidative mutagens induce intrachromosomal recombination in yeast. *Mutat Res* 1994; 308: 159 -67.
- Carrau F. The emergence of a new Uruguayan wine industry. *Journal of Wine Research* 1997; 8: 179-85.
- Echeverry C, Blasina F, Arredondo F, Ferreira M, Abin-Carriquiry JA, Vasquez L, et al. Cytprotection by neutral fraction of Tannat red wine against oxidative stress-induced cell death. *J Agric Food Chem* 2004; 24: 7395-9.
- Eckardt F, Haynes RH. Kinetics of mutation induction by ultraviolet light in excision-deficient yeast. *Genetics* 1977; 85: 225-47.
- Emanuel NM. Kinetics and free-radical mechanisms of ageing and carcinogenesis. En: Likhachev A, Anisimov V and Montesano R, editors. Age-related factors in carcinogenesis, Lyon, IARC, 1985; p. 127-50.
- Friedberg EC, Walker GC, Siede W. DNA repair and mutagenesis. Washington, D.C., ASM Press, 1995.
- Friedl A, Beisker W, Hahn K, Eckardt-Schupp F. Application of pulsed field gel electrophoresis to determine gamma ray-induced double strand breaks in yeast chromosomal molecules. *Int J Radiat Biol* 1993; 63: 173-81.
- Geigl EM, Eckardt-Schupp F. The repair of double-strand breaks and S1 nuclease-sensitive sites can be monitored chromosome-specifically in *Saccharomyces cerevisiae* using pulsed-field gel electrophoresis. *Mol Microbiol* 1991; 5: 1615-20.
- González-Neves G, Charamelo D, Balado J, Barreiro L, Bochicchio R, Gatto G, et al. Phenolic potential of Tannat, Cabernet-Sauvignon and Merlot grapes and their correspondence with wine composition. *Anal Chim Acta* 2004; 1: 191-6.
- Gugliucci A, Carrau F, Menini T, Gioia O, Lugano C, Boido E, et al. Efecto de diferentes tipos de vinificación en el potencial de inhibición *in vitro* de la oxidación de las LDL humanas de vinos Tannat. VIII Congreso Latinoamericano de Vitivinicultura y Enología, 2001, Resumen CD, Montevideo, Uruguay.
- Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species: its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett* 1991; 281: 9-19.
- Haynes RH. Formal, empirical and mechanistic equations in cellular radiation biology. En: Kiefer J, editor. *Quantitative Mathematical Models in Radiation Biology*. Heidelberg Berlin, Springer Verlag, 1988, p. 181-9.
- Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen study. *The Lancet* 1993; 342: 1007-11.
- Hollenberg NK. Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. *Curr Hypertens Rep* 2003; 4: 287-8.
- Jamieson DJ. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 1998; 14: 1511-27.
- Keszenman D, Salvo VA, Nunes E. Effects of Bleomycin on growth kinetics and survival of *Saccharomyces cerevisiae*: a model of repair pathways. *J Bacteriol* 1992; 174: 3125-32.
- Keszenman DJ, Candreva EC, Sánchez AG, Nunes E. *RAD6* gene is involved in heat shock induction of bleomycin resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Environ Mol Mutagen* 2005; 45: 36-43.
- Kuge S, Jones N. *YAP1* dependent activation of *TRX2* is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *EMBO J* 1994; 13: 655-64.
- Kuge S, Arita M, Murayama A, Maeta K, Izawa S, Inoue Y, et al. Regulation of the yeast Yap1p nuclear export signal is mediated by redox signal-induced reversible disulfide bond-formation. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 6139-50.
- Kullik I, Storz G. Transcriptional regulators of the oxidative stress response in prokaryotes and eukaryotes. *Redox Report* 1994; 1: 23-9.
- Li X, Moses RE. The beta-lactamase motif in Snm1 is required for repair of DNA double-strand breaks caused by interstrand cross-links in *S. cerevisiae*. *DNA Repair* 2003; 1: 121-9.
- López-Vélez M, Martínez-Martínez F, Del Valle-Ribes C. The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2003; 3: 233-44.
- Manach C, Texier O, Morand C, Crespy V, Régéat F, Demigne C, et al. Comparison of bioavailability of quercetin and catechin in rats. *Free Radic Biol Med* 1999; 11: 1259-66.
- Mosca S, Cingolani H. Protección de la función miocárdica post isquemia por el vino Cabernet-Sauvignon argentino. *Medicina (Bs As)* 2000; 60: 609-12.
- Nunes E, Brum G, Candreva EC, Schenberg-Frascino AC. Common repair pathways acting upon UV and X-ray induced damage in diploid cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Radiat Biol* 1984; 45: 593-606.
- Rice-Evans CA, Gopinathan V. Oxygen toxicity, free radicals and antioxidants in human disease: biochemical implications in atherosclerosis and the problems of premature neonates. *Essays Biochem* 1995; 29: 39-63.
- 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.
- Salvo VA, Bracesco N, Buccino J, Nunes E. Accumulation

- of lethal events and DNA double strand breaks during continuous exposure of stationary yeast cell populations to paraquat and its modification by alpha- tocopherol. XII th International Biophysics Congress, B2-15. Progr Biophys Mol Biol 1996; 65 Suppl.1: 83.
36. Severgnini A, Lillo O, Nunes E. Analysis of bleomycin-induced mutagenic function related to the *PSO4* (=XS9) gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Environ Mol Mutagen 1991; 18: 102-6.
  37. Shin DS, Chahwan C, Huffman J, Tainer J. Structure and function of the double-strand break repair machinery. DNA Repair 2004; 3: 863-73.
  38. Vinson JA, Proch J, Bose P. Determination of quantity and quality of polyphenol antioxidants in foods and beverages. Methods Enzymol 2001; 335: 103-14.
  39. Visioli F. Antioxidants in Mediterranean diets. World Rev Nutr Diet 2000; 87: 43-55.
  40. Von Sonntag C. The Chemical Basis of Radiation Biology. Taylor & Francis, editors, London - New York Philadelphia, 1987.

Recibido: 25/07/05 – Aceptado: 14/08/06