

Protección del ácido clorogénico frente a lesiones inducidas por benzo[a]pireno en *Saccharomyces cerevisiae*

Protection of chlorogenic acid against benzo[a]pyrene-induced lesions in *Saccharomyces cerevisiae*

Proteção do ácido clorogênico contra lesões induzidas por benzo[a]pireno em *Saccharomyces cerevisiae*

VERÓNICA SOSA (1), LOURDES BLANC (1), EDUARDO DELLACASSA (2), NELSON BRACESCO (1)

(1) Laboratorio de Radiobiología, Dpto. de Biofísica. Facultad de Medicina, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.
Correo electrónico: verónica_sosa@hotmail.com, louverblanc@gmail.com, nbracesco@fmed.edu.uy
ORCID: 0000-0001-8071-7308
ORCID: 0000-0002-7213-0029
ORCID: 0000-0001-5560-6200

(2) Área de Enología y Biotecnología de Fermentaciones. Dpto. Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Química, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.
Correo electrónico: edellac@fq.edu.uy
ORCID: 0000-0002-4764-4212

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue analizar el efecto del ácido clorogénico, uno de los compuestos polifenólicos con mayor concentración en la infusión de *Ilex paraguariensis*, sobre el daño celular y molecular inducido por el benzo[a]pireno.

La infusión de *Ilex paraguariensis* ("mate") es bebida por la mayoría de los habitantes de Argentina, Paraguay, sur de Brasil y Uruguay. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* (cepas SC7K lys2-3; SX46A y SX46A rad14Δ) se utilizó como modelo eucariota. Las células en crecimiento exponencial se expusieron a concentraciones crecientes de benzo[a]pireno y a tratamientos combinados con una concentración de 250 ng/mL de benzo[a]pireno y ácido clorogénico a una concentración igual a la encontrada en la infusión de yerba mate. Luego de los tratamientos se determinaron fracciones de sobrevivencia, frecuencia mutagénica y roturas de doble cadena de ADN así como la modulación en la expresión de la proteína Rad14 a través de un análisis de Western Blot. Se observó un aumento significativo en las fracciones de sobrevivencia así como una disminución en la frecuencia mutagénica después de la exposición combinada con benzo[a]pireno y ácido clorogénico en comparación con los tratamientos con benzo[a]pireno como único agente. En la cepa mutante deficiente en la proteína Rad14 se observó un aumento significativo en la sensibilidad a benzo[a]pireno en comparación con la cepa SC7K lys2-3. En los tratamientos combinados de benzo[a]pireno y ácido clorogénico se observó una importante disminución de la letalidad.

Con respecto a la determinación de roturas de doble cadena de ADN no se observó fraccionamiento cromosómico a la concentración de benzo[a]pireno utilizada en los experimentos. Los análisis de Western Blot mostraron un aumento en la expresión de la proteína Rad14 en las muestras tratadas con benzo[a]pireno como único agente en comparación con la muestra control. Adicionalmente se observó una disminución en la expresión de la proteína cuando en los tratamientos se utilizaron benzo[a]pireno y ácido clorogénico combinados. Los resultados indican que el ácido clorogénico disminuye significativamente la actividad mutagénica producida por el benzo[a]pireno, la cual no se encuentra relacionada con un incremento en la remoción de las lesiones inducidas por el sistema de reparación por escisión de nucleótidos.

Palabras clave: Benzo[a]pireno, ácido clorogénico, proteína Rad14, antimutagénico, *Saccharomyces cerevisiae*

ABSTRACT

The aim of this study was to analyze the effect of chlorogenic acid, a polyphenolic compound found at high concentrations in *Ilex paraguariensis* infusions, on cellular and molecular damage induced by benzo[a]pyrene. *Ilex paraguariensis* infusions ("mate") are consumed by most of the population in Argentina, Paraguay, southern Brazil and Uruguay. *Saccharomyces cerevisiae* yeast (SC7K lys2-3; SX46A and SX46A rad14Δ strains) were used as eukaryotic model organisms. Cells in an exponential growth phase were exposed to increasing concentrations of benzo[a]pyrene, as well as combined treatments of benzo[a]pyrene at a concentration of 250 ng/mL and chlorogenic acid at a concentration matching that which is commonly found in mate. Determinations of surviving fraction, mutagenic frequency and double strand DNA breaks induction were performed, along with the assessment of the modulation of the expression of protein Rad14 by Western Blot. A significant increase of surviving fractions and a decrease in mutagenic frequency were observed after exposure to benzo[a]pyrene plus chlorogenic acid, contrary to benzo[a]pyrene alone. A substantial increase in sensitivity to benzo[a]pyrene was observed for the Rad14 protein-deficient mutating strain when compared to the SC7K lys2-3 strain. An important decrease in lethality was observed when combined benzo[a]pyrene and chlorogenic acid treatments were applied. As for the determination of DSBs, no chromosomal fractionation was observed at the benzo[a]pyrene concentration tested in the experiments. Western Blot analysis showed an increase in the expression of protein Rad14 for samples treated with benzo[a]pyrene as a single agent when compared against the control sample. Additionally, the expression of this protein was observed to diminish when combined treatments with benzo[a]pyrene and chlorogenic acid were used. Results obtained indicate that chlorogenic acid significantly decreases the mutagenic activity of benzo[a]pyrene, which is not related to an increase in the removal of lesions induced by nucleotide excision repair system.

Key words: Benzo[a]pyrene, chlorogenic acid, protein Rad14, antimutagenics, *Saccharomyces cerevisiae*

RESUMO

O objetivo deste estudo foi analisar o efeito do ácido clorogênico, um dos compostos polifenólicos com maior concentração na infusão de *Ilex paraguariensis*, sobre o dano celular e molecular induzido pelo benzopireno.

A infusão de *Ilex paraguariensis* ("mate") é consumida pela maioria dos habitantes da Argentina, Paraguai, sul do Brasil e Uruguai. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* (cepas SC7K *lys2-3*; SX46A e SX46A *rad14Δ*) foi utilizada como modelo eucariótico. Células em crescimento exponencial foram expostas a concentrações crescentes de benzopireno e tratamentos combinados foram realizados com uma concentração de 250 ng/mL de benzo[a]pireno e ácido clorogênico, igual à encontrada na infusão de erva-mate. Após os tratamentos, foram determinadas as frações de sobrevivência, frequência mutagênica e quebras de fita dupla do DNA, bem como a modulação na expressão da proteína Rad14 por meio de análise de Western Blot. Um aumento significativo nas frações de sobrevivência, bem como uma diminuição na frequência mutagênica foram observados após a exposição combinada de benzo[a]pireno e ácido clorogênico em comparação com tratamentos de agente único de benzo[a]pireno. Um aumento significativo na sensibilidade ao benzo[a]pireno foi observado na cepa mutante deficiente em proteína Rad14 em comparação com a cepa SC7K *lys2-3*. Nos tratamentos combinados de benzo[a]pireno e ácido clorogênico, observou-se uma diminuição significativa na letalidade.

Com relação à determinação das quebras de fita dupla de DNA, não foi observado fracionamento cromossômico na concentração de benzo[a]pireno utilizada nos experimentos. A partir da análise de Western Blot, observou-se um aumento na expressão da proteína Rad14 nas amostras tratadas com benzo[a]pireno como agente único em relação à amostra controle. Além disso, uma diminuição na expressão da proteína foi observada quando combinados de benzo[a]pireno e ácido clorogênico foram usados nos tratamentos. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que o ácido clorogênico diminui significativamente a atividade mutagênica produzida pelo benzo[a]pireno, a qual não está relacionada a um aumento na remoção de lesões induzidas pelo sistema de reparo por excisão de nucleotídeos.

Palavras-chave: Benzo[a]pireno, ácido clorogênico, proteína Rad14, antimutagênico, *Saccharomyces cerevisiae*

INTRODUCCIÓN

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP's) constituyen un amplio grupo de compuestos químicos formados a partir de la combustión incompleta de materia orgánica. Se componen de dos o más anillos aromáticos que contienen cinco o seis átomos de carbono, siendo compuestos generalmente lipófilos e inestables fotoquímicamente. Existen más de 100 clases diferentes de HAP's y se encuentran generalmente como mezclas complejas(1, 2).

Los HAP's pueden entrar al organismo por diferentes vías: inhalatoria (humo de cigarrillo, de madera, de carbón y proveniente de aéreas industriales, gases de combustión en vehículos), digestiva (agua o alimentos), dérmica (contacto con partículas del suelo con altos niveles de HAP's, o con aceite de motor)(3, 4). El benzo[a]pireno (Bp) es el HAP más estudiado siendo clasificado por la Agencia internacional de investigación para el cáncer (IARC) como un carcinógeno del grupo I(5).

Sin tomar en cuenta a los trabajadores con exposición ocupacional, el consumo de cigarrillos y la ingestión de alimentos contaminados son la principal vía de exposición y una vez dentro del organismo se distribuyen en diversos órganos y tejidos que contienen grasa (ej.: riñones y tejido adiposo) y especialmente en el hígado(1, 4).

Un aspecto de interés para comprender la actividad biológica de los HAP's es su metabolismo(3). En organismos eucariotas los compuestos lipofílicos, tales como muchos productos naturales y compuestos sintéticos incluyendo drogas, carcinógenos y pesticidas, no pueden ser excretados a menos que se oxiden a compuestos más polares(6).

En humanos, el proceso de desintoxicación se lleva a cabo a través de un proceso de oxidación-conjugación que tiene como objetivo transformar estos compuestos para aumentar su comportamiento hidrosoluble, facilitando así la excreción urinaria. La producción de epóxidos, que son altamente reactivos, ocurre como un paso intermedio de la reacción de oxidación. Estos compuestos pueden unirse a moléculas complejas, como proteínas y ADN, generando así la genotoxicidad ligada a los HAP(7).

El proceso de detoxificación es realizado por enzimas del citocromo P450 las cuales están muy extendidas encontrándose en arqueas, bacterias y eucariotas. En *Saccharomyces cerevisiae* se ha descrito a la enzima 22-esterol desaturasa (CYP61, Erg5p) la cual además de la función de 22-desaturación durante la biosíntesis de ergosterol es también responsable de la metabolización y activación como promutágeno del Bp en ensayos de genotoxicidad(6, 8). Las lesiones producidas en el ADN por distintos agentes que perturban la estabilidad de esta

macromolécula pueden repararse con cierta probabilidad, dependiendo de factores genéticos, metabólicos y ambientales(9, 10).

Los aductos formados por la unión del derivado diol epóxido del Bp, inducen distorsión e inestabilidad en la cadena de ADN. La reparación por escisión de nucleótidos (NER) que se realiza con baja probabilidad de error es uno de los sistemas de defensa vital contra los aductos formados por los compuestos activos de los HAP's que son potencialmente carcinógenos a nivel del ADN. En *Saccharomyces cerevisiae* la proteína Rad14 (Rad14p) (43 Kda) es crucial para la vía NER ya que la inactivación del gen RAD14 elimina por completo tanto la sub-vía que reconoce el daño en el genoma de forma global (GG-NER) como la sub-vía que reconoce el daño en aquellos genes que están transcribiéndose (TC-NER)(11, 12).

Además, los resultados de Chaurasia et al. (2013) demuestran el papel de un factor de reparación del ADN, Rad14p, en la estimulación de la transcripción además de su conocida función en NER, lo que implica a Rad14p como un importante regulador de la expresión génica(13).

Pero además del sistema NER se ha observado también una actividad importante de las vías de tolerancia al daño así como que en ciertas condiciones la exposición a Bp puede generar dobles roturas en el ADN(14). Las vías de reparación que se activan frente a estas lesiones son la reparación por recombinación homóloga y la unión de extremos no homólogos(15, 16).

Si éstos no pudieran repararse podría iniciarse la primera etapa de transformación maligna que podría llevar al desarrollo de cáncer(10, 17).

Los polifenoles (PFs) constituyen uno de los grupos de metabolitos secundarios más numerosos y ubicuos de las plantas(18). El ácido hidroxicinámico más abundante en los alimentos es el ácido clorogénico, el éster de ácido cafeico con ácido quínico (ácido 5-O-cafeoilquínico)(19).

Estos compuestos están involucrados en los mecanismos de defensa de las plantas frente a agentes externos como la radiación ultravioleta y la agresión de patógenos. Así mismo constituyen una parte importante de la dieta humana, por lo que también han despertado un gran interés desde el punto de vista nutricional(20, 21).

La yerba mate (*Ilex paraguariensis*) presenta un alto contenido en PFs, que son reconocidos por su capacidad protectora a nivel celular y molecular frente a diferentes agentes genotóxicos(22, 23, 24, 25).

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 la infusión de yerba mate, siendo ésta una fuente para el consumo de ácido clorogénico entre otros

Protección del ácido clorogénico frente a lesiones inducidas por benzo[a]pireno en *Saccharomyces cerevisiae*

Sosa V, Blanc L, Dellacassa E, Bracesco N.

DOI: 10.25184/anfamed2023v10n2a2

antioxidantes(26).

Se ha demostrado que fenoles presentes en vegetales como los ácidos protocatéquico, clorogénico, tánico y el resveratrol, aplicados antes de HAP's en piel de ratón reducen significativamente su unión al ADN epidérmico y los niveles de aductos de ADN(27).

El Bp produciría un aumento en los niveles de las enzimas CYP1A1/1A2 y CYP2B en animales tratados, así como de enzimas glutatión S-transferasa y NAD(P)H: quinona oxidoreductasa-1(NQO1), mientras que el pretratamiento con compuestos fenólicos antes de la aplicación de Bp disminuye significativamente las actividades de estas enzimas(28).

Por lo tanto, resulta de interés debido a la inevitable y continua exposición en nuestra vida diaria a estos compuestos y su reconocida capacidad cancerígena evaluar si el ácido clorogénico puede tener la capacidad de proteger a las células de la acción genotóxica que puede provocar el Bp utilizando como modelo eucariótico la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

La presente investigación propone que el ácido clorogénico podría proteger células de *Saccharomyces cerevisiae* salvajes y mutantes en el sistema de reparación por escisión de nucleótidos (NER) del daño inducido por benzo[a]pireno.

MATERIALES Y MÉTODOS

CEPAS DE LEVADURA Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Las siguientes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* haploides fueron utilizadas en el presente análisis: SC7K *lys2-3*, cepa salvaje SX46A (MATa RAD *ade2 his3-532 trp1-289 ura 3-52*) y su respectiva mutante SX46A *rad14Δ* (MATa *rad14Δ::HIS3 ade2 his3-532 trp1-289 ura 3-52*)(29, 30, 31).

La cepa SC7K *lys2-3* se utilizó como biomarcador de mutagénesis además de para analizar la fracción de sobrevivida y la cepa SX46A *rad14Δ* se utilizó por estar mutada en el gen que expresa la proteína Rad14 provocando la eliminación de la vía NER. De esta forma, poder evaluar la protección del ácido clorogénico ya que esta cepa no es capaz de reparar lesiones a través de la vía NER.

Las células de levadura se cultivaron hasta la fase exponencial ($N = 1-2 \times 10^7$ células por mL) a 30°C con aireación por agitación, en medio nutritivo líquido YPD: 1% extracto de levadura (Difco, US Biological), 2% peptona (Difco, US Biological) y glucosa al 2%(Sigma)(32).

AGENTES QUÍMICOS

Solución de ácido clorogénico (ACI). Se preparó una solución madre de ACI (Sigma) a una concentración de 0,9 mg/mL (PM: 354,31g/mol). Concentración final de 90 µg/mL (10v/v) en las diferentes alícuotas de cultivo celular (valor referencia en infusión de yerba mate)(33).

Solución de Benzo[a]pireno (Bp). Se preparó una solución madre de Bp (Sigma) a una concentración de 2,5 µg/mL (PM=252,31 g/mol) y las diluciones se realizaron en agua destilada y esterilizada con el agregado de DMSO al 10 %.

Para las curvas dosis-efecto se realizaron tratamientos a diferentes concentraciones (10, 25, 50, 100, 200, 250 ng/mL), de acuerdo a observaciones previas(34).

CURVA DOSIS EFECTO PARA BP

Las alícuotas de cultivo celular en medio de enriquecimiento (YPD) se incubaron por 60 minutos a 30°C con agitación a diferentes concentraciones de Bp (10, 25, 50, 100, 200, 250 ng/mL).

Se incubaron alícuotas de cultivo celular en medio de enriquecimiento durante 60 min a 30°C con agitación adicionando Bp o ACI a una concentración final de 250 ng/mL y 90 µg/mL respectivamente.

Paralelamente, se realizaron tratamientos combinados de la misma forma que los individuales utilizando Bp y ACI a una concentración final de 250 ng/mL y 90 µg/mL respectivamente.

Inmediatamente después de los tratamientos, las suspensiones celulares se lavaron dos veces con agua destilada y se determinaron la fracción de supervivencia y la frecuencia mutagénica.

La fracción de supervivencia se determinó en función de la concentración de Bp con base en las curvas de supervivencia (**Figura 1A**) y se seleccionó una concentración de 250 ng/mL para el tratamiento combinado. La elección de la dosis de Bp para los tratamientos simples y combinados se basa en los valores de fracción de sobrevivida 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 el ACI presentara protección. Alícuotas de cultivo celular se colocaron en placas con medio nutriente sólido. YPDA: YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona y 2% de glucosa) + 2% agar (laboratorio Difco, USA) y se incubaron a 30°C durante 72 h. La fracción de sobrevivida se calculó como: $S(x,y) = N_s/N_o$, donde N_s es el número de células sobrevivientes capaces de generar clones visibles/mL; N_o es el número total de células tratadas/mL; x es la concentración de Bp e y es la concentración de ACI.

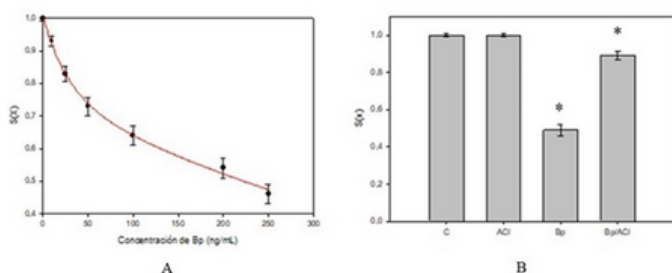


Figura 1. A, Fracción de sobrevivencia ($S(x)$) en función de concentraciones crecientes de Bp en la cepa SC7K *lys2-3* con un ajuste exponencial decreciente doble, con 4 parámetros ($y = a \cdot e^{(-b \cdot x)} + c \cdot e^{(-d \cdot x)}$). B, Diagramas de barras que muestran la fracción de sobrevivencia ($S(x)$) en los siguientes tratamientos: control, simple (ACI o Bp) y combinado (Bp/ACI) para la cepa SC7K *lys2-3*. Datos de al menos tres experimentos reproducibles (* $p \leq 0.05$).

DETERMINACIÓN DE FRECUENCIA MUTAGÉNICA

Para determinar la frecuencia mutagénica, muestras celulares de SC7K *lys2-3* se sembraron después del tratamiento en medios de omisión los cuales no contienen el aminoácido lysina (OM: 2% de dextrosa, 0,67% base nitrogenada de levadura (USBiological), 2% de agar) y se incubaron a 30°C por 21 días y se determinó el número de revertantes lys-LYS. La frecuencia mutagénica $M(x, y)$ se calculó como: $M(x, y) = Nm/Ns$; donde Nm es el número de mutantes por mL, Ns es el número de células sobrevivientes por mL, x es la concentración de Bp, e y la concentración de ACI.

DETERMINACIÓN DE LAS ROTURAS DE DOBLE CADENA EN EL ADN (DSBs)

Luego de ser expuestas a los tratamientos las muestras celulares se lavaron dos veces y se resuspendieron en buffer fosfato 0,5 M (pH 7,5) para una concentración de 5×10^8 células/mL. El ADN se aisló en bloques de agarosa de bajo punto de fusión tras el tratamiento enzimático (lyticasa, proteinasa K; Sigma, St Louis, MO). La separación cromosómica se llevó a cabo mediante electroforesis transversal de campo alterno (TAFE; Gene Línea II, Beckman, Fullerton, CA). Una vez terminado el tiempo de corrida el gel se colocó en el recipiente de tinción conteniendo bromuro de etidio (0,4 $\mu\text{g/mL}$) disuelto en buffer TAFE 1X durante 60 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz. Luego el gel se decoloró en buffer TAFE 1X conteniendo ribonucleasa A (1 $\mu\text{g/mL}$) (Sigma St Louis, MO) durante 3-4 h a 37°C protegido de la luz(35, 36). Posteriormente se colocó el gel en un transiluminador UV y se fotografió en forma digital. El análisis de las bandas de ADN se realizó mediante el software ImageJ (NIH, USA). En el caso de la inducción de rotura de doble cadena de ADN se observa una disminución en la intensidad de la banda correspondiente y un aumento concomitante en la fluorescencia intercalada entre bandas. La estimación de los valores medios de roturas de doble

cadena de ADN inducidas (DSB) y de las desviaciones estándar correspondientes se basaron en la distribución de Poisson como:

$$-\ln I_x / I_0,$$

donde I_x corresponde a la integral (superficie) de una determinada banda cromosómica en los densitogramas después del tratamiento e I_0 es la integral de la misma banda cromosómica en la respectiva muestra de control(35, 36, 37, 38).

ANÁLISIS POR WESTERN BLOT

Luego de realizar los tratamientos tanto simples como combinados, las muestras se centrifugaron para obtener un pellet de aproximadamente de 1×10^9 células.

La extracción de proteínas desnaturalizadas de levadura se realizó según el protocolo de Kushnirov, 2000(39).

Se realizó la electroforesis a 110 V fijo y amperaje libre durante 90 minutos y para confirmar tanto que la electroforesis se había realizado correctamente como que la concentración de proteínas en cada carril era igual se realizó la tinción con Azul de Coomassie en uno de los geles. Para asegurar que todos los carriles tuvieran la misma cantidad de proteína, luego del control con azul de Coomassie, se procedió a tomar una captura de imagen en el escáner Odyssey y usar el programa ImageJ para medir las intensidades de las bandas encontradas a nivel de peso molecular de la proteína en estudio. El gel restante se utilizó para realizar la transferencia de proteínas.

El anticuerpo primario utilizado fue Anti-Rad14 (ab43577) de Abcam (a una dilución de 1/1000) y el anticuerpo secundario utilizado fue Goat anti- Mouse IRDye® 800 CW (926-32210) de LI-COR (a una dilución de 1/15000).

Las bandas de Rad 14p fueron visualizadas usando Odyssey (LI-COR Biosciences) y se analizaron con Image Studio Lite (LI-COR Bioscience).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La distribución binomial se aplicó al cálculo de los desvíos standard y errores standard en caso de los eventos binomiales: muerte – sobrevivencia y mutación – no mutación.

La distribución de Poisson se aplicó al cálculo y análisis del N° de roturas dobles inducidas en el genoma(25).

Además 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 sobrevivencia y frecuencia mutagénica en las diferentes poblaciones estudiadas.

Y se utilizó ANOVA de una vía para la comparación de 3 medias independientes en el estudio de fracción de sobrevivencia y frecuencia mutagénica.

Para comparar las intensidades relativas de las bandas

obtenidas en el Wester Blot se calculó el intervalo de confianza utilizando la distribución de T con 2 grados de libertad.

RESULTADOS

SOBREVIDA CELULAR

Para estudiar la relación de la fracción de supervivencia en función de dosis crecientes de Bp, se alicuotó el cultivo celular de *SC7K lys2-3* y cada alícuota se incubó durante una hora con diferentes concentraciones del agente genotóxico. De esta relación dosis-efecto se seleccionó la concentración de 250 ng/mL para realizar los tratamientos combinados (Bp/ACI) así como los tratamientos simples de Bp y ACI. La alícuota de células que no recibió tratamiento sirvió como muestra de control.

La **Figura 1A** muestra la fracción sobreviviente en función de la concentración de Bp donde se puede observar que la solución a una concentración de 250 ng/mL induce una fracción de supervivencia de $0,46 \pm 0,03$ sobre la cepa *SC7K lys2-3*. También se puede observar que la relación entre la fracción de supervivencia y la dosis de Bp sigue un modelo exponencial decreciente doble con 4 parámetros

($y = a \cdot e^{(-b \cdot x)} + c \cdot e^{(-d \cdot x)}$) con un coeficiente de correlación $R = 0,99$.

La fracción superviviente de las células tratadas y sus correspondientes controles se muestran en la **Figura 1B**. Se observó un aumento estadísticamente significativo en la supervivencia celular después del tratamiento combinado (Bp/ACI), en comparación con la supervivencia observada para Bp como agente único. Tanto las muestras control como las tratadas con ACI mostraron fracciones de supervivencia similares ($1,0 \pm 0,01$).

Al mismo tiempo, se realizó el análisis de supervivencia celular frente a los tratamientos simple y combinado en una cepa de levadura deficiente en el sistema de reparación por escisión de nucleótidos.

En las cepas *SX46A* y *SX46A rad14Δ* después de la exposición a Bp, las fracciones sobrevivientes fueron $0,31 \pm 0,03$ y $0,16 \pm 0,02$ respectivamente lo cual representa una diferencia significativa (**Figura 2**). Además, ambas cepas mostraron respuestas similares al tratamiento combinado de Bp y ACI observándose un aumento significativo de la supervivencia celular en estas condiciones con respecto al tratamiento con Bp como único agente.

DETERMINACIÓN DE MUTAGÉNESIS

Para analizar el efecto diferencial de cada tratamiento sobre la mutagénesis inducida, muestras celulares de *SC7K lys2-3* se sembraron en medio de omisión y se determinó la frecuencia de mutación en función de la concentración de Bp (**Figura 3A**). A partir de estos resultados se pudo observar un aumento exponencial en la frecuencia

mutagénica en función de la concentración de Bp donde la relación entre las variables se ajustó a un modelo con 3 parámetros ($y = y_0 + a \cdot x^b$) con una correlación $R = 0,99$ coeficiente (**Figura 3A**). Los análisis de frecuencia mutagénica de las muestras con tratamientos combinados mostraron una disminución significativa en la variable de estudio en comparación con las muestras tratadas solo con Bp (**Figura 3B**).

Como puede observarse la M para el tratamiento con Bp como único agente fue de $2,32 \times 10^{-5} \pm 9,63 \times 10^{-7}$ y para el tratamiento combinado Bp y ACI fue de $1,05 \times 10^{-5} \pm 6,63 \times 10^{-7}$.

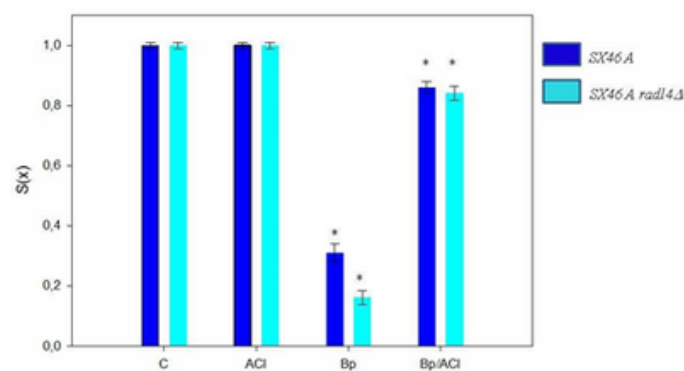


Figura 2. Fracción de supervivencia ($S(x)$) en tratamientos con (ACI o Bp) y combinado (Bp/ACI) en las cepas *SX46A* y *SX46A rad14Δ*. Datos de al menos tres experimentos reproducibles. (* $p \leq 0,05$).

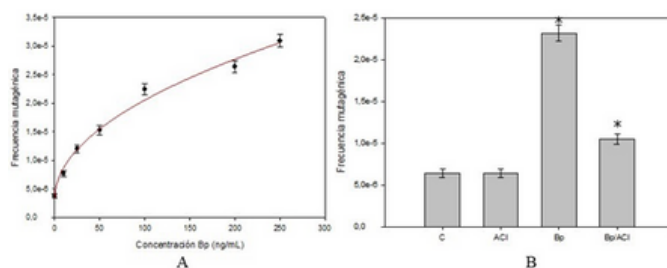


Figura 3. A, Frecuencia mutagénica en función de la concentración de Bp para la cepa *SC7K lys2-3* con ajuste a un modelo de 3 parámetros ($y = y_0 + a \cdot x^b$). **B,** Muestra el marcado efecto antimutagénico del ACI en medio nutriente durante el tratamiento combinado Bp/ACI. Datos de al menos tres experimentos reproducibles. (* $p \leq 0,05$).

DETERMINACIÓN DE DSBs

Muestras celulares tratadas en las condiciones mencionadas anteriormente y los controles respectivos fueron sometidos a electroforesis de campos pulsados y alternos (TAFE) después del aislamiento de ADN.

Se observó que en ninguna de las muestras analizadas se produjo fraccionamiento en el ADN.

Esto sugiere que, a la concentración utilizada en los experimentos (250 ng/mL), los daños que se producen en el genoma no implican la aparición de dobles roturas en la hebra de ADN. Esto puede observarse en la corrida electroforética (**Figura 4A**) y al comparar los perfiles densitográficos obtenidos para cada muestra (**Figura 4B**).

Protección del ácido clorogénico frente a lesiones inducidas por benzo[a]pireno en *Saccharomyces cerevisiae*

Sosa V, Blanc L, Dellacassa E, Bracesco N.

DOI: 10.25184/anfamed2023v10n2a2

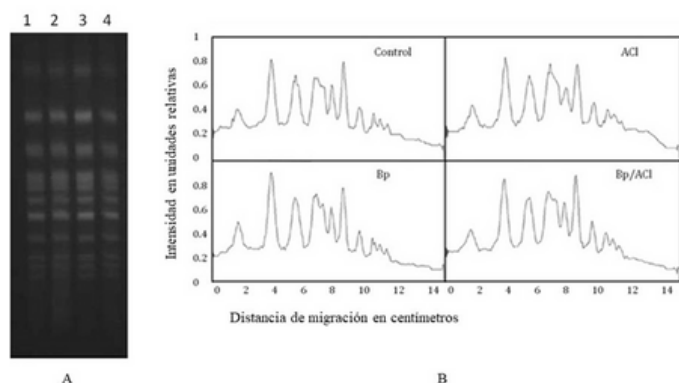


Figura 4. A, Separación cromosómica usando electroforesis en gel con campos transversos y alternos (TAFE) en las muestras de la cepa SC7K *lys2-3*. 1, Control; 2, ACI; 3, Bp; 4, Bp/ACI; B, Densitogramas.

EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA Rad14

Al realizar el análisis de Western Blot (WB) con un anticuerpo específico de Rad14 se observaron bandas muy tenues del peso molecular de la proteína en estudio en las condiciones control (**Figura 5A carril 1 y 2**).

En el carril correspondiente al tratamiento con Bp (**Figura 5A carril 3**) se observa una banda de mayor intensidad también en el peso molecular para la proteína en estudio. Éste aumento en la intensidad de la banda indica un aumento en el nivel de la proteína en estas condiciones.

En el caso del tratamiento combinado de Bp y ACI (**Figura 5A carril 4**) puede observarse una disminución en la intensidad de la banda lo cual sugiere que en estas condiciones la expresión de la proteína en estudio disminuye al compararla con el tratamiento con Bp como único agente. Acompañando al estudio cualitativo se realizó también una cuantificación de la diferencia de intensidades relativas de las bandas en cada muestra y se graficaron estos datos (**Figura 5B**).

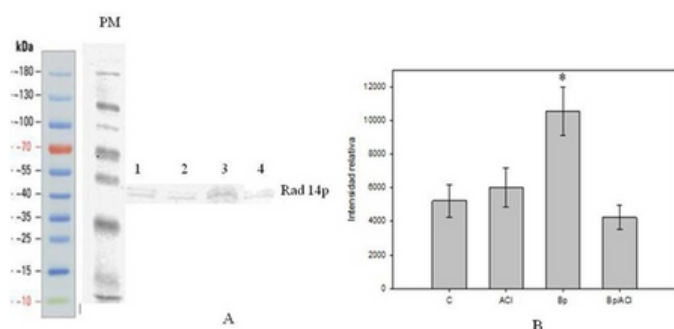


Figura 5. A, Western Blot (WB) (Anti-Rad14p) con las muestras de la cepa SC7K *lys2-3* usando los siguientes tratamientos: MW, peso molecular; 1, Control; 2, ACI; 3, Bp; 4, Bp/ACI. Se denominó Rad14 la fila que representa el peso molecular correspondiente a la proteína en estudio. B, Intensidades relativas de las bandas correspondientes a Rad 14p para cada muestra. (* $p < 0.05$)

DISCUSIÓN

A partir de los resultados obtenidos se observa que el ácido clorogénico disminuye la letalidad y la actividad mutagénica producida por Bp, lo cual no se encuentra relacionado con un incremento en la remoción de las lesiones por el sistema

NER. En el presente trabajo se observó un aumento de la letalidad celular con respecto a la curva de sobrevivencia en función de concentraciones crecientes de Bp y la relación entre las variables en estudio fue de tipo exponencial decreciente doble, con 4 parámetros ($y = a \cdot e^{-(b \cdot x)} + c \cdot e^{-(d \cdot x)}$) con un coeficiente de ajuste igual a $R = 0,99$ (**Figura 1A**).

En los análisis de sobrevivencia realizados en tratamientos simples y combinados se pudo observar una disminución significativa de la letalidad celular en los tratamientos concomitantes con Bp y ACI (**Figura 1B**).

Cuando el análisis de fracción de sobrevivencia se realizó en cultivos de una cepa deficiente en la proteína Rad14 se observó una disminución de la fracción de sobrevivencia en las muestras tratadas con Bp como único agente en comparación con la muestra control. Por otro lado, cuando el tratamiento fue en combinación con Bp y ACI se observó una disminución significativa de la letalidad (**Figura 2**).

Es importante resaltar que la fracción de sobrevivencia no se alteró significativamente en los tratamientos con ACI como único agente en comparación con la muestra control.

Cuando se realizaron estudios de frecuencia mutagénica en función de concentraciones crecientes de Bp se observó un aumento significativo ajustándose a un modelo con 3 parámetros ($y = y_0 + a \cdot x^b$) y presentando un coeficiente de ajuste de $R = 0,99$ (**Figura 3A**).

Se observó además que la frecuencia de mutación espontánea no se alteró significativamente en el tratamiento control con ACI como único agente a la concentración de trabajo.

Así mismo se observó una disminución significativa de la fracción mutagénica en los tratamientos combinados con Bp y ACI (**Figura 3B**).

Los aductos formados por los productos reactivos de los HAP's son procesados en su mayoría a través de la vía NER, la cual como se mencionó anteriormente es una vía de reparación libre de error. Por lo tanto el nivel de frecuencia mutagénica que presentan las muestras tratadas con Bp puede deberse a que otras vías de reparación propensas a error están procesando parte de las lesiones producidas.

La generación de la frecuencia mutagénica observada puede deberse a que parte de las lesiones se procesan a través de la vía de síntesis a través de la lesión (TLS por sus siglas en inglés)(40). Cuando la célula ingresa en la fase S la presencia de aductos voluminosos en el ADN inhiben las polimerasas de alta fidelidad, bloquean las horquillas de replicación que conducirían a la muerte celular y la vía TLS (dependiente de RAD6) recluta al lugar donde la replicación se estancó polimerasas de baja fidelidad(40).

Sería importante estudiar a futuro como se modulan las proteínas vinculadas a estas vías de reparación frente a la exposición a Bp.

Protección del ácido clorogénico frente a lesiones inducidas por benzo[a]pireno en *Saccharomyces cerevisiae*

Sosa V, Blanc L, Dellacassa E, Bracesco N.

DOI: 10.25184/anfamed2023v10n2a2

En cuanto al análisis del fraccionamiento cromosómico los datos muestran que a la concentración de Bp utilizada en este trabajo no se generan dobles roturas de ADN con lo cual no se pudo evaluar si el ACI presenta alguna acción protectora contra este tipo de daño (**Figura 4A y 4B**).

Esta afirmación surge del estudio de la relación entre las amplitudes de los picos así como la relación de la distancia recorrida en las abscisas para los diferentes picos. Al no existir diferencias significativas entre estas medidas se puede descartar la posibilidad de una adhesión entre los fragmentos de ADN (rearreglos) que no permitiera evidenciar la fragmentación (**Figura 4B**).

La elección de utilizar 60 minutos de incubación se debe a dos motivos, uno de ellos es la elección de trabajar dentro de un tiempo menor al tiempo de generación celular de esta cepa de levaduras. Además en experimentos previos con tiempo de incubación de 40 minutos no se observaron diferencias ni en la fracción de sobrevivida ni en la frecuencia mutagénica de las muestras tratadas con el compuesto Bp y la muestra control.

Tanto los datos obtenidos, que muestran una disminución en la letalidad celular y en la frecuencia mutagénica en presencia de ACI, así como las observaciones que muestran que no se altera la sobrevivida ni la frecuencia mutagénica espontánea en presencia de ACI como único agente, están en sintonía con el comportamiento de otros polifenoles referenciados en la bibliografía consultada (41, 42, 43, 44, 45).

Los resultados de este trabajo indican que el ACI, a una concentración igual a la encontrada en la infusión de yerba mate, tuvo un efecto protector significativo contra el daño producido por Bp en poblaciones celulares haploides de *S. cerevisiae*.

En aquellas muestras que fueron tratadas con Bp como único agente en el análisis de Western Blot, se observó un aumento en la expresión de la proteína Rad14, uno de los pasos cruciales en la activación de la vía NER (**Figura 5A y 5B**).

En las muestras que fueron tratadas concomitantemente con Bp y ACI, se observó una disminución del nivel de la proteína Rad14 lo cual indicaría que las distorsiones provocadas en el ADN por el Bp han sido inhibidas.

El ácido clorogénico disminuyó de forma significativa tanto la letalidad como la frecuencia de mutagénesis en todos los tratamientos.

El hecho que la cepa deficiente en la proteína Rad14 no mostró diferencias significativas entre todos los tratamientos en presencia de ACI, indica que la modulación de los daños producidos por el ACI no estaría vinculada con la vía de reparación NER.

Como ya hemos mencionado los HAP's provocan daño en

el ADN al ser activados a través de las reacciones de metabolización por las enzimas de citocromo P450. Los productos diol-epóxidos que se producen en estas reacciones se podrían unir covalentemente a las bases del ADN produciendo una gran distorsión espacial de la doble hebra.

En conclusión, la protección del ácido clorogénico observada en la disminución de la letalidad y la actividad mutagénica producida por Bp no se vio relacionada con un incremento en la remoción de las lesiones por el sistema NER.

La forma en que el ACI provoca esta protección puede estar vinculada a diferentes acciones como son una acción atrapadora del compuesto reactivo del Bp, una acción inhibitoria sobre la expresión de las enzimas que metabolizan este tipo de compuesto o también alguna acción que module la expresión de los genes que codifican para las mismas enzimas. Estas presunciones pueden ser semillas de futuras investigaciones que intenten dilucidar a qué nivel o niveles actúa el ACI como agente protector.

El presente trabajo presenta algunas limitaciones, se debe tener en cuenta que algunos resultados son de tipo preliminar, considerándose relevante profundizar estos estudios sobre los mecanismos de interacción o de modulación que se da a través de la acción del ACI. Uno de los puntos débiles del artículo se relaciona con la metodología del análisis de proteínas. En nuestro caso no se utilizó un método bioquímico para medir las concentraciones de proteínas antes de realizar la electroforesis en el análisis por Western blot. Esto implica que aunque se hayan medido las intensidades de las bandas en el gel teñido con azul de Coomassie los resultados son de tipo cualitativo. Se proyecta profundizar en estos análisis de manera de confirmar los datos preliminares.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a PEDECIBA- UdelaR, al Dr. Wilner Martínez a la Br. Valeria Ochoa y a la Dra. Florencia Tomasina por la asistencia técnica.

Protección del ácido clorogénico frente a lesiones inducidas por benzo[a]pireno en *Saccharomyces cerevisiae*

Sosa V, Blanc L, Dellacassa E, Bracesco N.

DOI: 10.25184/anfamed2023v10n2a2

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Roshandel G, Semnani S, Malekzadeh R, Dawsey SM. Polycyclic aromatic hydrocarbons and esophageal squamous cell carcinoma. *Arch. Iran Med.* 2012;15:713-722.
- Boström, CE, Gerde P, Hanberg A, Jernström B, Johansson C, Kyrklund T, Rannug A, Törnqvist M, Victorin K, Westerholm R. Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environ. Health Perspect.* 2002;110:451-488. <https://doi.org/10.1289/ehp.110-1241197>
- Agudo A. Los HAP Acercamiento a su problemática como riesgo laboral. UGT Comisión Ejecutiva Confederal 2010. <http://www.ugt.es/saludlaboral/Hidrocarburos.pdf>, (accessed 20 October 2020)
- Diggs DL, Huderson AC, Harris KL, Myers JN, Banks LD, Rekhadevi PV, Niaz MS, Ramesh A. Polycyclic aromatic hydrocarbons and digestive tract cancers: a perspective, *J. Environ. Sci. Health C. Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* 2011;29:324-357. <https://doi.org/10.1080/10590501.2011.629974>.
- IARC. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, No. 9, Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. International Agency for Research on Cancer: Lyon, 2010.
- Kelly SL, Lamb DC, Kelly DE. Sterol 22-desaturase, cytochrome P45061, possesses activity in xenobiotic metabolism. *FEBS Lett.* 1997;412:233-235. 10.1016/S0014-5793(97)00785-0
- Weyand EH, Bevan DR, Benzo(a)pyrene disposition and metabolism in rats following intratracheal instillation. *Cancer Res.* 1986;46:5655-5661.
- Nelson DR, Koymans KT, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics.* 1996;6:1-42.
- Ronen A, Glickman BW. Human DNA repair genes. *Environ. Mol. Mutagen.* 2001;37:241-283. <https://doi.org/10.1002/em.1033>.
- Friedberg EC, Walker GC, Siede W, Wood RD, Schultz RA, Ellenberger T. DNA Repair and Mutagenesis. 2nd ed. ASM Press: Washington-DC, 2005.
- Min JH, Pavletich NP. Recognition of DNA damage by the Rad4 nucleotide excision repair protein. *Nature.* 2007;449:570-575.
- Boiteux S, Sue Jinks-Robertson S. DNA Repair Mechanisms and the Bypass of DNA Damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 2013;193:1025-1064
- Chaurasia P, Sen R, Bhaumik SR. Functional analysis of Rad14p, a DNA damage recognition factor in nucleotide excision repair, in regulation of transcription in vivo. *J Biol Chem.* 2013;288(2):793-806. doi: 10.1074/jbc.M112.413716)
- Sertic S, Pizzi S, Lazzaro F, Plevani P, Muzi-Falconi M. NER and DDR: Classical music with new instruments. *Cell Cycle.* 2012;11:668-674.
- Rossner P Jr, Rossnerova A, Beskid O, Tabashidze N, Libalova H, Uhliriva K, Topinka J, Sram RJ. Nonhomologous DNA end joining and chromosome aberrations in human embryonic lung fibroblasts treated with environmental pollutants. *Mutat Res.* 2014;763-764:28-38.
- Tung EW, Philbrook NA, Belanger CL, Ansari S, Winn LM. Benzo(a)pyrene increases DNA double strand break repair in vitro and in vivo: a possible mechanism for benzo(a)pyrene-induced toxicity. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2014;760:64-9. doi: 10.1016/j.mrgentox.2013.12.003. PMID: 24412381.
- Mu H, Geacintov NE, Min JH, Zhangand Y, Broyde S, 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, *Chem. Res. Toxicol.* 2017;30:1344-1354.1/acs.chemrestox.7b00074. 10.1021/acs.chemrestox.7b00074.
- Andersen OM, Markham KR. Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications. Taylor & Francis Group: LLC, 2006.
- Santos TB, Mitchell DA, Krieger N, Moure VR, Zanoelo EF. Experimental and modeling study of enzymatic oxidation of 5-O-caffeoylquinic acid by polyphenol oxidases. *Food Technol. Biotech.* 2010;48:548-553.
- Rice-Evans C, Parker L. Flavonoids in Health and Disease. Marcel Dekker, Inc.: NY, 2003.
- Granado Serrano AB. Estudios de los Mecanismos de Acción Molecular de Polifenoles de la Dieta en Cultivos Celulares y Animales de Experimentación. PhD Thesis, Universidad Complutense de Madrid, 2010.
- 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;53:5750-5753.
- Miranda DDC, Arcxari DP, Pedrazzoli Jr J, Carvalho P de O, Cerutti SM, Bastos DHM, Ribeiro ML. Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H2O2-induced DNA damage and DNA repair in mice. *Mutagenesis.* 2008;23:261-265. <https://doi.org/10.1093/mutage/gen011>.
- Filip R, Ferraro GE, Bandoni A, Bracesco N, Nunes E, Gugliucci A, Dellacassa E. Mate (*Ilex paraguariensis*). In: Imperato F (Ed.). Recent Advances in Phytochemistry. Research Signpost: Kerala, 2009.
- Bracesco N, Sosa V, Blanc L, Contreras V, Candrea EC, Salvo VA, Hocart S, Mechoso B, Nunes E. Analysis of radioprotection and antimutagenic effects of *Ilex paraguariensis* infusion and its component rutin, *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 2018;51:e7404. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20187404>.
- Ministerio de Salud Pública. Dirección General de la Salud División Epidemiología. 1ª Encuesta Nacional de Factores de Riesgo de Enfermedades Crónicas No Transmisibles, file://C:/Users/User/Downloads/1er_enfrecnt_2006_1.pdf. 2007. (accessed 20 October 2020)
- Szaefer H, Cichocki M, Brauze D, Baer-Dubowska W. Alteration in phase I and II enzymes activities and polycyclic aromatic hydrocarbons-DNA adduct formation by plant phenolics in mouse epidermis, *Nutr. Cancer.* 2004;48:70-78. https://doi.org/10.1207/s15327914nc4801_10.
- Szaefer H, Krajka-Kuźniak V, Baer-Dubowska W. The effect of initiating doses of benzo(a)pyrene and 7,12-dimethylbenz(a)anthracene on the expression of PAH activating enzymes and its modulation by plant phenols. *Toxicol.* 2008;251:28-34.
- Nunes E, Brum G, Candrea 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;45:693-606. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2008.07.047>.
- Prakash S, Sung P, Prakash L. DNA repair genes and proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.* 1993;27:33-70. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.27.120193.000341>.
- Siede W, Friedberg AS, Dianova I, Friedberg EC. Characterization of G, Checkpoint Control in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Following Exposure to DNA-Damaging Agents. *Genetics.* 1994;138:271-281
- Rose M, Winston F, Hieter P. Methods in Yeast Genetics. A Laboratory Course Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 1990.
- Markowicz Bastos DH, Fornari AC, de Queiroz YS, Soares RAM, Torres EAFS. The chlorogenic acid and caffeine content of yerba maté (*Ilex paraguariensis*) beverages. *Acta Farm. Bonaerense.* 2005;24:91-95.
- Kamangar F, Schantz M, Abnet C, Fagundes R, Dawsey S. High levels of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in mate drinks. *Cancer Epidem. Biomar.* 2008;17:1262-1268. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-08-0025>.
- Baur M. Analyse der Rolle von Glutathion bei der Induktion und Reparatur von Doppelstrangbrueche mit Hilfe der Pulsfeld-Gelelektrophorese in Hefe. PhD Thesis. Biology Faculty L-Maximilians University Munich Alemania, 1990
- Geigl EM, Eckardt-Schupp F. The repair of doublestrand breaks and S1 nuclease-sensitive sites can be monitored chromosome-specifically in *Saccharomyces cerevisiae* using pulsed-field gel electrophoresis. *Mol Microbiol.* 1991;5:1615-1620.
- Friedl A, Kiechle M, Fellerhoff B, Eckardt-Schupp F. Radiation-induced chromosome aberrations in *S. cerevisiae*: influence of DNA repair pathways. *Genetics.* 1998;148:975-988
- Keszenman D, Candrea E, Nunes E. Cellular and molecular effects of bleomycin are modulated by heat shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.* 2000;459:29-41
- Kushnirov Vitaly V. Rapid and reliable protein extraction from yeast.

Protección del ácido clorogénico frente a lesiones inducidas por benzo[a]pireno en *Saccharomyces cerevisiae*

Sosa V, Blanc L, Dellacassa E, Bracesco N.

DOI: 10.25184/anfamed2023v10n2a2

Yeast. 2000;16:857-860. [https://doi.org/10.1002/1097-0061\(20000630\)16:9<857::AID-YEA561>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1097-0061(20000630)16:9<857::AID-YEA561>3.0.CO;2-B).

40. Prakasha Gowda AS, Krzeminski J, Amin S, Suo Z, Spratt T. Mutagenic replication of n2-deoxyguanosine benzo(a)pyrene adducts by Escherichia coli DNA polymerase I and Sulfolobus solfataricus DNA polymerase IV, Chem. Res. Toxicol. 2017;30:1168-1176.

<https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.6b00466>.

41. Bracesco N. Exploración del Efecto Protector Frente a Radicales Libres de los Derivados de la Uva (Vitis vinifera Cv.Tannat) y de la Infusión de Yerba Mate (Ilex paraguariensis) en Saccharomyces cerevisiae, MSc Thesis, Universidad de la República, 2003.

42. Vyas S, Sharma M, Sharma PD, Singh TV. Design, semisynthesis, and evaluation of O-acyl derivatives of (-)-epigallocatechin-3-gallate as antitumor agents. J. Agric. Food Chem. 2007;55:6319-6324. <https://doi.org/10.1021/jf070519f>.

43. Baumeister P, Reiter M, Zieger S, Matthias C, Harréus U. DNA-protective potential of polyphenols in human mucosa cell cultures. HNO. 2008;56:795-798. <https://doi.org/10.1007/s00106-008-1671-8>.

44. Malhotra A, Nair P, Dhawan DK. Premature mitochondrial senescence and related ultrastructural changes during lung carcinogenesis modulation by curcumin and resveratrol, Ultrastruct. Pathol. 2012; 36: 179-184. <https://doi.org/10.3109/01913123.2011.652765>.

45. 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, J. Altern. Complem. Med. 2003;9:379-387. <https://doi.org/10.1089/10755530>

Nota de los autores: Los autores declaran que los resultados presentados en este artículo corresponden parcialmente a investigaciones realizadas durante la tesis de maestría en Ciencias Biológicas opción Biofísica, PEDECIBA, de la MSc. Veronica Sosa "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", aprobada en el año 2020 y publicada en la Biblioteca de Facultad de Ciencias de la UdelaR en el año 2022.

Nota del editor: El editor responsable por la aprobación del presente artículo es Gabriela Algorta.

Nota de contribución autorial: Verónica Sosa: Concepción y diseño del estudio, realización de los experimentos, análisis e interpretación de los resultados, análisis estadísticos de los datos, elaboración de un borrador del manuscrito, escritura del manuscrito. ORCID: 0000-0001-8071-7308. E-mail: veronica_sosa@hotmail.com.

Lourdes Blanc: Concepción y diseño del estudio. ORCID 0000-0002-7213-0029. E-mail: louverblanc@gmail.com.

Eduardo Dellacassa: Análisis e interpretación de los datos o resultados, elaboración de un borrador del manuscrito, escritura del manuscrito. ORCID 0000-0002-4764-4212. E-mail: edellac@fq.edu.uy.

Nelson Bracesco: Concepción y diseño del estudio, elaboración de un borrador del manuscrito, supervisión del trabajo. ORCID 0000-0001-5560-6200. E-mail: nbracesco@fmed.edu.uy