



Revista Argentina de Microbiología

ISSN: 0325-7541

ram@aam.org.ar

Asociación Argentina de Microbiología
Argentina

Bracesco, N.; Salvo, V. A.; Rocha, S.; Dell, M.; Carrau, F.; Nunes, E.
Exploración del efecto protector frente a radicales libres de derivados de la uva (*Vitis vinifera L. Cv.*
Tannat) en *Saccharomyces cerevisiae*
Revista Argentina de Microbiología, vol. 39, núm. 1, marzo, 2007, pp. 4-10
Asociación Argentina de Microbiología
Buenos Aires, Argentina

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=213016792002>

- ▶ Cómo citar el artículo
- ▶ Número completo
- ▶ Más información del artículo
- ▶ Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

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

N. BRACESCO^{1*}, V. A. SALVO³, S. ROCHA¹, M. DELL¹, F. CARRAU², E. NUNES¹

¹Laboratorio de Radiobiología, Dpto. de Biofísica, Facultades de Medicina y de Ciencias, Universidad de la República. Gral. Flores 2125 (11800) Montevideo, Uruguay; ²Sección Enología, Cátedra Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Química, Universidad de la República. Gral. Flores 2124 (11800) Montevideo, Uruguay;

³Hematology 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 H₂O₂ en medio nutritivo. 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 H₂O₂, disminuyendo la probabilidad de sobrevida. La combinación de H₂O₂ con vino Tannat aumentó significativamente la probabilidad de sobrevida y disminuyó el número de roturas dobles. No se observó efecto mutagénico por el vino Tannat. Estos efectos pudieron simularse utilizando altas concentraciones de α-tocoferol. Los resultados indican que un derivado de *Vitis vinifera* puede, en ciertas condiciones, disminuir las dobles roturas de ADN producidas por el H₂O₂ e incrementar las probabilidades de sobrevida 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 H₂O₂. Haploid and diploid strains of *Saccharomyces cerevisiae* were used as eukaryotic model. Cell samples were exposed to H₂O₂ 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 H₂O₂ dose dependent DNA fractionation, as well as an increase of lethal -and mutation- events. Upon combination of the Tannat wine and H₂O₂ 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 α-tocopherol. Present results indicate that a grape derivative could act as a genome protector increasing cell survival probabilities. Among others, the involved molecular targets could be components of transduction redox cascades as well as DNA repair enzymes.

Key words: 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 quer cetina 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 Cu²⁺, 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 H₂O₂, O₂[•] y Fe³⁺) podrían ser parte de un proceso general de óxido-reducción, donde el activador transcripcional Yap1 –en humanos AP (Jun-Fos)–, la tioredoxina, el NADPH, el GSH y, en 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 α-tocoferol en similares condiciones experimentales. Se demostró que el vino Tannat disminuye la producción de roturas dobles en el ADN inducidas por el H₂O₂ y que, paralelamente, aumenta la probabilidad de sobrevida 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 α-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 sobrevida (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% bactopeptona (Difco, US Biological, Cleveland, USA) y 2% glucosa (Sigma, St. Louis, USA).

Medio nutritivo sólido YPD: 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

a) Peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Se utilizó H₂O₂ 1M, sin estabilizantes. Se agregó a parte de las muestras celulares en medio de cultivo, la cantidad necesaria para obtener una concentración final de 1-10 mM. La exposición a cada concentración se prolongó por 1,5 horas («dosis»).

b) 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, 1: 750 nm), utilizando la quer cetina aglica (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.

c) Acetato de α-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 = 2x10⁷ células/ml. Parte de las muestras celulares se expusieron en medio nutritivo, según lo detallado, a diferentes concentraciones de H₂O₂ (5-10 mM), vino Tannat 1/10 (p/p) o α-tocoferol (4,7 mg/ml). Los cultivos fueron también expuestos a las combinaciones H₂O₂ + Vt y H₂O₂ + T durante 1,5 horas, colocando las alícuotas de Vt y T inmediatamente antes que el H₂O₂. 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 sobrevida

Luego de dilución apropiada, las muestras celulares se sembraron en medio nutritivo sólido (0,2 ml /placa, 3 placas por dosis). Se estimó la probabilidad de supervivencia por la respectiva frecuencia relativa o tasa de sobrevida: S = N_s / N₀, donde N_s es el número total de células sobrevivientes/ml, capaces de multiplicarse en medio nutritivo sólido dando lugar a colonias, y N₀ es el número de células sobrevivientes/ml a la dosis 0 (número de colonias de la muestra control). Se determinaron las funciones de sobrevida S(x), S(x,y) y S(x,z), donde x es la dosis de H₂O₂, y es la dosis correspondiente al vino Tannat (Vt); y z es la dosis de α-tocoferol (T) (19).

Análisis de mutagénesis

Las muestras celulares en suspensión (N= 10⁷/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 5×10^8 y 1×10^9 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 (líticasa 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 densímetro láser LKB (Ultroscan 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 I₀ representa la integral del pico de absorbancia para el control e I_x para la muestra tratada (1, 14, 15, 24).

RESULTADOS

Análisis de sobrevida

Con el fin de analizar el efecto del H₂O₂ sobre las cepas haploides y diploides SC7K lys y SC6, respectiva-

mente, se estimó la probabilidad de sobrevida de muestras celulares aleatorias en función de la dosis. Se evidenció una disminución de la tasa de sobrevida en las muestras tratadas en función de la concentración de H₂O₂ (0 ≤ x ≤ 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 H₂O₂, 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 H₂O₂ y Vt (5 y 10 mM), la tasa de sobrevida 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 H₂O₂ + T, también se observó un incremento significativo en relación con el tratamiento único, aunque dicho incremento fue menor que el observado luego de H₂O₂ + 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 α-tocoferol (T), a las concentraciones indicadas, presentaron tasas de sobrevida 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 H₂O₂ produjo una importante degradación del ADN (27 DSB/genoma a la dosis 5 mM). La exposición a vino Tannat solamente o a α-tocoferol no produjo DSB (Figura 3, A, B y C). Similares resultados se obtuvieron utilizando la cepa haploide (datos no mostra-

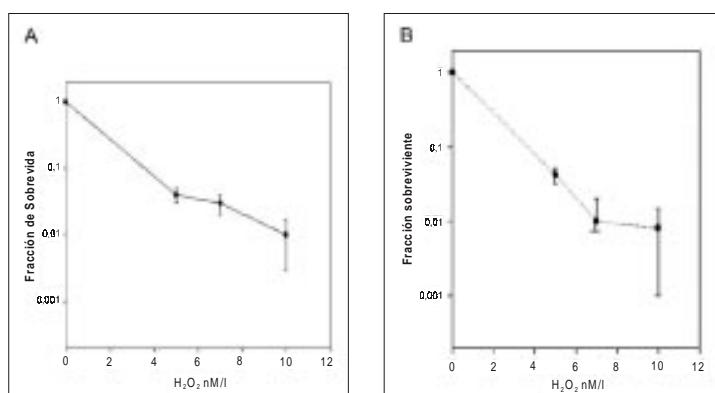


Figura 1. Tasa de sobrevida en función de la concentración de H₂O₂. Los datos representan las medias de tres experimentos independientes. Las barras de error corresponden a los intervalos de confianza binomiales ($p \leq 0,05$). A) cepa haploide SC7K lys; B) diploide SC6.

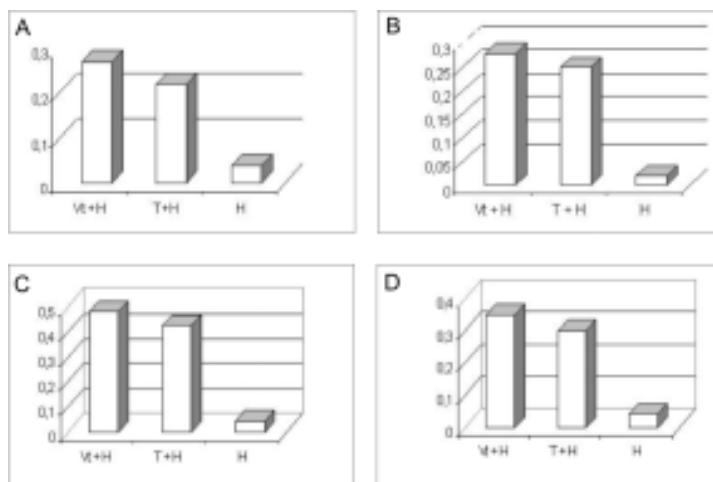


Figura 2. Diagramas de barras correspondientes a las tasas de sobrevida de las cepas *SC7 K lys* y *SC6*, luego de exposición a H_2O_2 y a las combinaciones *Vt + H₂O₂* y *T + H₂O₂*; A) Cepa *SC7K lys*, H_2O_2 5 mM, y sus combinaciones con *Vt* o con *T*; B) ídem panel (a) para *SC7K lys*, tratada con 10 mM H_2O_2 y sus combinaciones *Vt + H₂O₂* y *T + H₂O₂*; C) *SC6*, luego de exposición a 5 mM de H_2O_2 y a sus combinaciones *Vt + H₂O₂* y *T + H₂O₂*; D) cepa *SC6* luego de exposición a 10 mM de H_2O_2 y a sus combinaciones *Vt + H₂O₂* y *T + H₂O₂*.

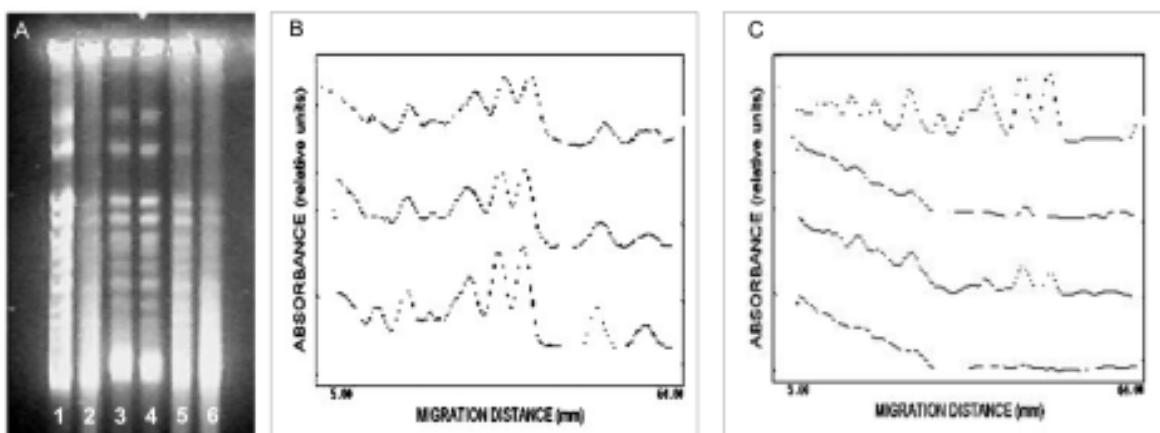


Figura 3. A) Separación del ADN cromosómico realizada por electroforesis por campos pulsados alternados (TAFE). De izquierda a derecha: Cepa *SC6*: 1. Control, 2. H_2O_2 (5 mM); 3. *Vt*; 4. *T*; 5. *Vt + H₂O₂* (5 mM); 6. *T + H₂O₂* (5 mM). B) Densitogramas láser correspondientes a *SC6* (fotografía en A). Absorbancia (unidades relativas) en función de la distancia de migración (unidades relativas). De arriba hacia abajo: control; *Vt*; *T*; C) Densitogramas correspondientes a *SC6*. De arriba hacia abajo: Control, *T + H₂O₂* (5 mM), *Vt + H₂O₂* (5 mM), H_2O_2 (5 mM).

dos). Consistentemente con los resultados del análisis de sobrevida 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 Tabla1). Los factores de reducción medidos por el cociente $\text{FR} = \text{DSB}_{x}/\text{DSB}_{x+y, x+z}$, 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 B). 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 A).

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 sobrevida 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 metil-viologeno y como protector el acetato de *a*-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 B), podría depender de la expresión de la reparación postreplicativa 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 A), 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 querctetina, y

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

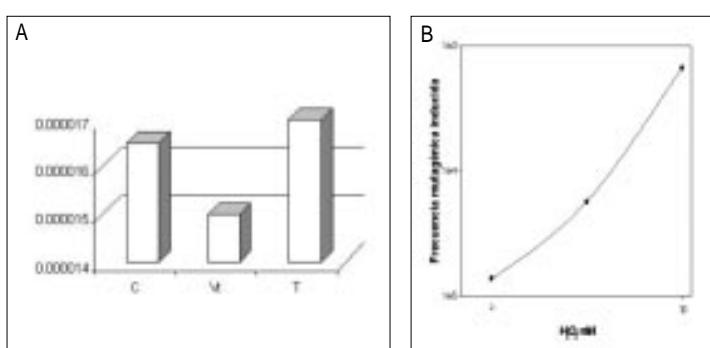


Figura 4. Frecuencia mutagénica en cepa SC7K lys. A) Tasa espontánea y luego de tratamiento con Vt y T; B) Frecuencia mutagénica en función de la dosis de H_2O_2 .

vitaminas, como la nicotinamida (29-31, 33). Un estudio 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

1. Baur M. Analyse der Rolle von Glutathion bei der Induktion und Reparatur von Doppelstrangbrüche mit Hilfe der Pulsfeld-Gelektrophorese in Hefe. PhD Thesis, Ludwig Maximilian University, Munich, Alemania, 1990.
2. Benathen A, Beam CA. The genetic control of X-ray resistance in budding yeast cells. Radiat Res 1977; 69: 99-116.
3. Bisson L, Butzke CH, Ebeler S. The role of moderate ethanol consumption in health and human nutrition. Am J Enol Vitic 1995; 46: 449-62.
4. 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.
5. Brancesco N, Salvo VA, 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.
6. Brancesco N, Nunes E. Possible protective effect of red wine on DNA double strand breaks and lethal events induced by H₂O₂ and paraquat. International Symposium on Recent Trends in Biomedical Research, 1999, Abstract, p 2, Bhabha Atomic Research Centre, India.
7. Brancesco 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.
8. Brennan RJ, Swoboda BEP, Schiestl RH. Oxidative mutagens induce intrachromosomal recombination in yeast. Mutat Res 1994; 308: 159-67.
9. Carrau F. The emergence of a new Uruguayan wine industry. J Wine Res 1997; 8: 179-85.
10. Echeverry C, Blasina F, Arredondo F, Ferreira M, Abin-Carriquiry JA, Vasquez L, et al. Cytoprotection by neutral fraction of Tannat red wine against oxidative stress-induced cell death. J Agric Food Chem 2004; 24: 7395-9.
11. Eckardt F, Haynes RH. Kinetics of mutation induction by ultraviolet light in excision-deficient yeast. Genetics 1977; 85: 225-47.
12. Emanuel NM. Kinetics and free-radical mechanisms of ageing and carcinogenesis. En: Likhachev A, Anisimov V, Montesano R, editors. Age-related factors in carcinogenesis, Lyon, IARC, 1985; p. 127-50.
13. Friedberg EC, Walker GC, Siede W. DNA repair and mutagenesis. Washington, D.C., ASM Press, 1995.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species: its mechanism and measurement in mammalian systems. FEBS Lett 1991; 281: 9-19.
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.
20. Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen study. Lancet 1993; 342: 1007-11.
21. 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.
22. Jamieson DJ. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 1998; 14: 1511-27.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. Kulik I, Storz G. Transcriptional regulators of the oxidative stress response in prokaryotes and eukaryotes. Redox Report 1994; 1: 23-9.
28. 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.
29. 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.
30. Manach C, Texier O, Morand C, Crespy V, Régérat F, Demigne C, et al. Comparison of bioavailability of quercetin and catechin in rats. Free Radic Biol Med 1999; 11: 1259-66.
31. Mosca S, Cingolani H. Protección de la función miocárdica post isquemia por el vino Cabernet-Sauvignon argentino. Medicina (Buenos Aires) 2000; 60: 609-12.
32. 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.
33. 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.
34. 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.

35. 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