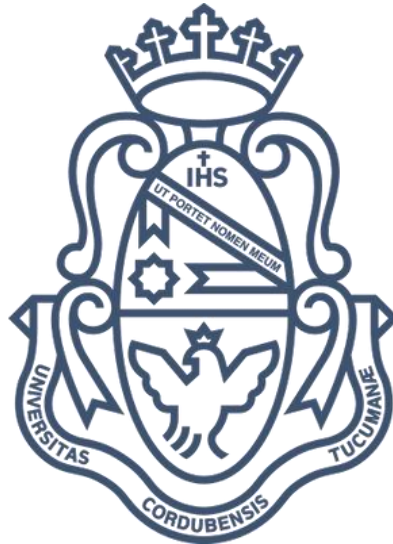


**ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES NUTRACÉUTICAS DE  
COMPUESTOS NATURALES BIOACTIVOS DE TOMATE  
QUE INTERVIENEN EN LA RESISTENCIA A ESTRÉS,  
EMPLEANDO UN MODELO *IN VIVO* EN *CAENORHABDITIS  
ELEGANS*.**

**Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas**

**Bioq. ANDREA DEL VALLE CARRANZA**



**Universidad Nacional de Córdoba**

**Facultad de Ciencias Químicas**

**Dpto. de Bioquímica Clínica – CIBICI**

**2020**



**Director de Tesis:**

Dr. Ramón Asis

**Comisión de Tesis:**

Dra. Ma. Gabriela Ortega

Dr. Ariel Goldraj

Dr. Gustavo Bonacci

**Evaluador externo:**

Dra. Mónica Azucena Nazareno



A mi mamá y mi hermano,  
por acompañarme siempre...

A mi papá,  
por cuidarme desde lejos...



## AGRADECIMIENTOS

Estos cinco años de formación fueron por mucho, una parte muy importante de mi vida. Las interminables horas de los días de experimento, la incertidumbre al analizar los resultados, la desilusión y la frustración cuando las cosas no funcionaron y la felicidad de los éxitos. Pero más importante que eso, fue toda la gente que me acompañó en cada momento, las horas interminables siempre tuvieron a alguien haciéndome el aguante, la incertidumbre siempre fue más liviana cuando alguien me cebó un mate, cuando las cosas no funcionaron siempre alguien me apoyó para empezar de nuevo, y ni hablar de las mil veces que festejamos los éxitos.

Por eso quiero decirle gracias a mi familia. A mi mamá y mi hermano que, aunque no estamos cerquita siempre, me apoyaron en cada momento para nunca bajar los brazos, y se pusieron felices conmigo con cada logro conseguido. No me alcanzan las palabras para agradecer todo lo que siento que me dan siempre, los quiero infinitamente.

A mi jefe, quien confió en mí y me dio un lugar en su laboratorio. Que cada vez que hizo falta, se puso la camiseta y estuvo en la mesada o en la compu conmigo ayudándome cuando me sobrepasaban las cosas. Ramón tuvo que escuchar mis llantos y desahogos cuando mis cosas personales se ponían intensas y sin embargo no se quejó nunca. Agradezco haber encontrado un excelente director y además una excelente persona.

A Ale Saragusti, que guio mis primeros pasos y me presentó a mis muchachos. Ella es la culpable que de sepa lo que sé sobre *C. elegans*, y mucho más importante, la culpable de que me guste mi trabajo.

Gracias a Vale y Magda, que además de ser jefas me han escuchado más de una vez, y me han regalado buenos consejos.

Gracias a Chani, Juli, Yan, Flor, Cin, Lid, Guido, y Juan quienes además de ser mis compañeros de trabajo, son mis amigos. Es genial que después de pasar 8 horas juntos, tengamos ganas de seguir haciendo cosas después del laboratorio. El aguante, los consejos, los mates, todo. Ustedes hicieron que este trabajo valiera la pena cada día.

Y a Pipi, Paulita y ahora a Lu, pseudo miembros del labo tan firmes y al pie del cañón como los demás. Las quiero tantísimo, y estoy muy feliz de tenerlas en mi vida.

A Valdecita, Rosarito y Santi, que me cuidan, y que formaron esto tan lindo que perdura después de separarnos. Los quiero, y su compañía me hace muy muy feliz. Gracias.

A mis amigas de siempre, Lola, Piqui, Pau, Lu, Sol que siempre están ahí, son la constante desde antes de empezar, y siguen estando conmigo. Me acompañaron siempre y no puedo estar más agradecida de ser su amiga. Saben lo que siento. Las quiero muchísimo.

¡A Ini y a Mel! Mis amigas de la vida misma. Son más hermanas que amigas, saben todo, conocen todo, ¡y siguen estando ahí! Agradezco a la vida que existen, y que van a seguir siendo tan importantes siempre. Las adoro mucho mucho.

A mi primo Héctor, que escuchó todo lo que tenía para decir siempre, y es una compañía invaluable, te quiero chuchin.

A Mel, mi amiga con la que me puedo identificar y sincerar todo el tiempo. Sos una amiga de oro.

A Espachu, que tuvo que soportar quizá el año más intenso de esta tesis. Es increíble lo feliz que me hace saber que estás conmigo. Le agradezco a la vida cada día que comparto con vos y tener tu apoyo. Creo que no podría haber terminado esto sin vos. Infinitamente Gracias.



# ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	vii
ABREVIATURAS .....	i
RESUMEN.....	iii
ABSTRACT .....	vii
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1. - El origen del fruto del tomate .....	1
1.1.1. - Compuestos Naturales Bioactivos .....	3
1.1.2. - Radicales libres.....	4
1.1.3. - Compuestos Antioxidantes .....	6
1.1.4. - Compuestos electrófilos .....	7
1.2. - Caenorhabditis elegans .....	9
1.3. - Escenario de la Tesis Doctoral .....	12
1.4. - Objetivo General .....	13
1.5. - Objetivos específicos .....	13
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
2.1. - Obtención de muestras .....	17
2.2. - Procesamiento de la muestra.....	20
2.3. - Obtención de extractos .....	20
2.4. - Medición de actividad antioxidante.....	21
2.4.1. - Método de TEAC (Capacidad Antioxidante en equivalentes de Trolox).....	21
2.4.2. - Método de FRAP (Poder Antioxidante Reductor del ion Férrico).....	22
2.5. - Medición de actividad electrofílica .....	23
2.5.1. - Método de p-Nitrobencenotiol para cuantificación de electrófilos.....	23
2.5.2. - Preparación de reactivos para la cuantificación de electrófilos.....	24
2.6. - Cuantificación e Identificación de compuestos presentes en los extractos .....	25

2.6.1. - Cuantificación de compuestos fenólicos totales por Folin- Ciocalteu.....	25
2.6.2. - Identificación de compuestos fenólicos por HPLC.....	26
2.6.3. - Cuantificación de pigmentos lipofílicos por HPLC .....	26
2.7. - Técnicas empleadas sobre el modelo in vivo C. elegans.....	27
2.7.1. - Cepas de C. elegans utilizadas.....	27
2.7.2. - Sincronización de poblaciones.....	27
2.7.3. - Cepa bacteriana, crecimiento y condiciones de ensayo.....	28
2.7.4. - Ensayo de estrés térmico .....	29
2.7.5. - Inducción de HIF-1 .....	33
2.7.6. - Utilización de ARN de interferencia.....	33
2.7.7. - Extracción de proteínas y análisis de Western blot.....	34
2.7.8. - Extracción de ARN, transcripción reversa y PCR a tiempo real .....	35
2.7.9. - Medición de las especies reactivas de oxígeno (EROs).....	35
2.7.10. - Cuantificación de autofagia .....	36
2.7.11. - Cuantificación de la expresión de SKN-1 .....	37
2.7.12. - Condición de hormesis térmica para cuantificación de autofagia .....	37
2.7.13. - Cuantificación de actividades enzimáticas .....	37
2.7.14. - Análisis estadísticos y obtención de gráficos.....	38
<b>CAPÍTULO III: ANTIOXIDANTES HIDROFÍLICOS DE TOMATE: COMPUESTOS FENÓLICOS</b>	
3.1. - Introducción .....	43
3.2. - Cuantificación de antioxidantes en la fracción hidrofílica .....	45
3.2.1. - Contenido total de compuestos fenólicos .....	45
3.3. - Composición fenólica de las accesiones de tomate.....	46
3.4. - Capacidad antioxidante in vitro de los cultivares de tomate.....	50
3.5. - Relación existente entre las actividades observadas.....	52
3.6. - Ensayo in vivo de actividad biológica .....	54

3.7. - Relaciones entre actividad biológica in vivo y la composición de metabolitos de tomate .....	56
3.8. - Efectos del ácido Clorogénico en la actividad de termotolerancia en <i>C. elegans</i> .....	58
3.9. - Discusión y conclusión.....	60
3.9.1. - Discusión .....	60
3.9.2. - Conclusión.....	62
CAPÍTULO IV: MECANISMOS DE ACCIÓN DEL ÁCIDO CLOROGÉNICO .....	65
4.1. - Introducción .....	65
4.2. - Vías de señalización, mecanismos y factores de transcripción de interés .....	66
4.2.1. - Vía del receptor de insulina Daf-2.....	66
4.2.2. - HIF-1 (Factor de transcripción inducido por hipoxia 1) .....	67
4.2.3. - Autofagia .....	68
4.2.4. - Proteínas de shock térmico.....	69
4.3. - Identificación de los factores o vías de señalización involucrados en la termotolerancia conferida por ACG .....	70
4.3.1. - Importancia del Factor de transcripción HIF-1 y la vía DAF-2/DAF-16 para la termotolerancia inducida por ACG .....	71
4.3.2. - Efecto de ACG sobre la expresión de HIF-1. ....	74
4.3.3. - Evaluación de los niveles de EROs y el estado antioxidante durante la exposición con ACG.....	77
4.3.4. - La termotolerancia inducida por ACG, y su relación con los procesos de autofagia y la vía del factor de choque térmico .....	80
4.4. - Discusión y conclusión.....	85
4.4.1. - Discusión .....	85
4.4.2. - Conclusión.....	88
CAPÍTULO V: COMPUESTOS ELECTROFILOS .....	93

5.1. - Introducción .....	93
5.2. - Cuantificación de actividad electrofílica .....	94
5.2.1. - Parámetros óptimos de cuantificación .....	95
5.2.2. - Cuantificación de actividad electrofílica en extractos hidrofílicos y lipofílicos .....	97
5.3. - Cuantificación e identificación de pigmentos .....	98
5.4. - Relación entre actividad electrofílica y pigmentos identificados .....	103
5.4.1. - Identificación de compuestos electrófilos por espectrometría de masas	106
5.5. - Determinación de la actividad biológica .....	109
5.5.1. - Estudio de la actividad de termotolerancia en el extracto lipofílico y sus fracciones obtenidas por HPLC .....	110
5.6. - Vías de señalización relacionadas con la resistencia al estrés. SKN1/Nrf2....	111
5.6.1. - Cuantificación de SKN-1 .....	114
5.7. - Discusión y conclusión.....	116
5.7.1. - Discusión .....	116
5.7.2. - Conclusión .....	119
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES GENERALES .....	123
ARTÍCULOS CIENTIFICOS PUBLICADOS .....	127
Bibliografía.....	131
ANEXO I.....	147

## ABREVIATURAS

**ABTS:** Ácido 2,2'-azinobis (3- etilbenzotiazolín)-6-sulfónico

**ACG:** Ácido Clorogénico

**ACN:** Acetonitrilo

**ANOVA:** Análisis de la Varianza (*"ANalysis Of VAriance"*)

**C. elegans:** *Caenorhabditis elegans*

**CafAH:** Acido Cafeoil-O-Hexosas

**CAH:** Ácido Cumárico-O-Hexosas

**Caf.Hex:** Ácido Cafeoilhexárico

**CDNB:** dinitroclorobenceno

**CF:** Compuestos Fenólicos

**CM-H2DCFDA:** Sonda identificadora de estrés oxidativo. Derivado de clorometilo de H2DCFDA

**CNB:** Compuestos Naturales Bioactivos

**DAD:** Detector de Arreglo de Diodos

**DE<sub>50</sub>:** Dosis Efectiva 50

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**DO:** Desviación Óptica

**EDTA:** Ácido Etilendiaminotetra acético

**EGL-9:** Prolil hidroxilasa del factor inducible por hipoxia (*"Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase"*).

**EM:** Espectrometría de Masas

**ERA:** Elemento de Respuesta Antioxidante

**EROs:** Especies Reactivas de Oxígeno

**ESI:** Ionización por Electro pulverización (*"Electrospray ionization"*).

**FAH:** Ácido Ferúlico-O-Hexósido

**FRAP:** Poder Antioxidante Reductor del ion Férrico.

**GFP:** Proteína Fluorescente Verde (*"Green Fluorescent Protein"*)

**HIF-1:** Factor Inducible por Hipoxia - 1 (*"Hypoxia-inducible factor 1"*)

**HSF-1:** Factor de Shock Térmico – 1 (*"Heat Shock Factor 1"*)

**HPLC:** Cromatografía Líquida de alto rendimiento (*"High Performance Liquid Chromatography"*)

**HSP:** Proteínas de shock Térmico (*"Heat Shock Proteins"*)

**IGFR:** Receptor del factor de crecimiento tipo insulina (*"Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) receptor"*)

**Keap-1:** Proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch

**LB:** Medio de cultivo para bacterias Luria-Bertani

**LDL:** Lipoproteínas de baja Densidad (*"Low density lipoproteins"*)

**m/z:** Coeficiente masa sobre carga

**NADPH:** Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido

**NBT:** NitroBencenotiol

**NGM:** Agar de Crecimiento para Nematodos (*"Nematode Growth Media"*)

**Nrf2:** Factor Nuclear Eritroide-2 (*"Nuclear factor erythroid 2-related factor 2"*)

**PBS:** Tampón Fosfato Salino

**pb:** Pares de bases

**QTOF:** Analizador cuadrupolo-tiempo de vuelo (*"cuadropole-time-of-flight"*)

**ARNi:** ARN interferente

**SKN-1:** Proteína *skinhead-1*

**SOD:** Súper Óxido Dismutasa

**TEAC:** Capacidad Antioxidante en equivalentes de Trolox (*"Trolox Equivalent Antioxidant Capacity Assay"*)

**tR:** Tiempo de Retención

**VHL:** Factor oncosupresor Von Hippel-Lindeau

## RESUMEN

Desde hace algunos años, el estudio de los compuestos naturales bioactivos (CNB) se ha convertido en un área emergente de investigación debido a la evidente asociación entre el consumo regular de los alimentos que los contienen y la disminución del riesgo de aparición de enfermedades crónicas. En el fruto del tomate se han identificado CNB que están involucrados con dichas propiedades de prevención, pero aún no se conoce claramente los mecanismos de acción de todos ellos. Estos CNB poseen en común propiedades antioxidantes que estarían mediando los efectos biológicos, sin embargo, los estudios actuales proponen otros mecanismos que impulsan a identificar diferentes CNB alimenticios. Algunos CNB identificados en frutas u hortalizas son compuestos electrófilos que tienden a reaccionar con moléculas ricas en electrones, como por ejemplo los grupos sulfhidrilos presentes en algunas estructuras proteicas. Esta reacción puede activar al sistema antioxidante Keap1/Nrf2 involucrado en la atenuación de patologías de tipo inflamatorias, como el cáncer y las enfermedades cardiovasculares.

El objetivo de este proyecto, fue dar respuestas al modo de acción que tienen los CNB presentes en alimentos y en especial el tomate, en la prevención de patologías y la identificación de nuevos principios activos que permitan generar estrategias para obtener alimentos con un mayor poder nutracéutico. Para abordar este estudio se propuso evaluar los CNB con actividad antioxidante y electrófilos, en una población de frutos de tomates con una alta diversidad genética (reflejada en sus caracteres morfométricos y metabólicos). Los efectos biológicos *in vivo* de los extractos de tomate o CNB fueron evaluados en un modelo de estrés térmico en el organismo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) donde la actividad biológica beneficiosa se manifestó como un incremento de la termotolerancia.

A partir de una población de tomates andinos, se obtuvieron extractos hidrofílicos donde se evaluó la composición de CNB con actividad antioxidante y su actividad *in vivo* en el modelo de *C. elegans*. Se encontraron diferencias significativas en la composición de CNB, actividad antioxidante y actividad de termotolerancia. Para poder identificar los principios activos, se emplearon herramientas de estadísticas multivariadas. Se determinó que los compuestos más importantes en los estudios realizados, fueron los ácidos cafeoilquínicos, y ácido ferúlico-O-hexósido. Dentro de los ácidos cafeoilquínicos,

el ácido clorogénico (ACG) es el más compuesto fenólico abundante en tomate que mejor correlacionó con las actividades cuantificadas y por lo tanto fue un compuesto interés para avanzar en el estudio del mecanismo de acción en la actividad de termotolerancia. Para este estudio se emplearon cepas de *C. elegans* con mutaciones en las vías de señalización de respuesta a estreses. Los resultados obtenidos indicaron que ACG requiere del factor de transcripción inducible por hipoxia 1 (HIF-1) para generar termotolerancia. Estudios posteriores mostraron que ACG activa HIF-1 y sus genes blancos durante la incubación previa al estrés térmico. Subsecuentemente, empleando una cepa transgénica de *C. elegans* para evaluar autofagia y silenciando genes por RNA de interferencia, pudimos demostrar que ACG requiere de HIF-1 y el factor de transcripción *Heat shock factor 1* (HSF-1) y de las chaperonas HSP-90 y HSP-16 para activar autofagia y finalmente este proceso es requerido para que *C. elegans* pueda resistir el estrés térmico.

Para el estudio de CNB electrófilos, se desarrolló un método químico para cuantificar la actividad electrofílica de extractos de tomate. Esta técnica está basada en la capacidad que poseen los CNB de tomate para reaccionar con el grupo sulfhidrilo del sustrato p-nitrobenzenotiol (NBT), reflejando la capacidad que tendrían los mismos para interactuar con sulfhidrilos de proteínas. Con esta herramienta se pudo detectar actividad electrofílica solamente en los extractos lipofílicos obtenidos a partir del fruto del tomate. La actividad electrofílica y la composición de pigmentos fue cuantificada en una población de tomates originados a partir de padres contrastantes en color, forma y tamaño del fruto. Por medio de un análisis de correlación, licopeno y  $\beta$ -caroteno mostraron la mayor asociación con la actividad electrofílica, indicando que podrían ser los precursores de los compuestos responsables de generar actividad. Como licopeno y  $\beta$ -caroteno no poseen sitios electrofílicos, se propuso identificar CNB de tomate a partir de la combinación de la reacción de los compuestos electrófilos presentes con NBT y el análisis de cromatografía acoplado a un espectrómetro de masas. Esta estrategia permitió detectar 15 compuestos electrófilos y se realizó la identificación tentativa de 10 de ellos. Estos metabolitos resultaron ser principalmente carotenales, compuestos derivados de la oxidación de carotenos.



Los estudios de las actividades biológicas de termotolerancia en *C. elegans* mostraron que las fracciones que contenían los compuestos electrófilos fueron activas y que el mecanismo de acción estaría mediado por la reactividad de los electrófilos sobre el complejo de proteínas WDR-23/SKN-1, quien genera el incremento de la actividad citoprotectora en el gusano.

En conjunto, estos resultados muestran nuevos CNB de tomate y sus mecanismos de acción sobre las vías de señalización que intervienen en la respuesta frente a estreses y que permiten un mejor entendimiento de la biología del estrés en *C. elegans*.



## ABSTRACT

For some years now, the study of bioactive natural compounds (BNC) has become an emerging area of research due to the association between regular consumption of foods that contain them and the decrease in the risk of suffer chronic diseases. The BNC identified in tomato fruit, have been involved with several prevention properties, but their mechanisms of action are not clearly known. These BNC have in common antioxidant properties that would be mediating the biological effects, however current studies propose other mechanisms that drive to identify different BNC. Some BNC identified in fruits or vegetables are electrophilic compounds that react with electron-rich molecules, such as sulfhydryl groups present in some protein structures. This reaction can activate the antioxidant system Keap1/Nrf2 involved in the attenuation of inflammatory pathologies, such as cancer and cardiovascular diseases.

The objective of this project is to respond to the mode of action of BNC present in foods and especially tomatoes, have in the prevention of pathologies and the identification of new active principles to develop strategies for obtaining food with greater nutraceutical power. To realize this study, we proposed to evaluate BNC with antioxidant and electrophilic activity, in a population of tomato fruits with a high genetic diversity (reflected in their morphometric and metabolic characteristics). *In vivo* biological effects of tomato BNC or tomato extracts were evaluated in a thermal stress model in the organism *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), where the beneficial biological activity was manifested as an increase in thermotolerance.

Hydrophilic extracts were obtained from a population of Andean tomatoes. Composition of BNC, antioxidant activity and *in vivo* activity of tomato extracts were evaluated in *C. elegans* model. Results about BNC composition, antioxidant activity and thermotolerance activity showed significant differences. In order to identify the active compounds, multivariate statistical tools were used. It was determined that the most important compounds in the studies carried out were Caffeoylquinic acids and Ferulic acid-O-hexoside. Caffeoylquinic acids and Chlorogenic acid (CGA) were the most abundant compounds in tomato, and therefore it was of our interest to advance in the study of the mechanism of action of thermotolerance activity. For this study, *C. elegans* strains with mutations in stress response signaling pathways were used. The results

indicated CGA requires hypoxia-inducible transcription factor 1 (HIF-1) to generate thermotolerance. Subsequent studies showed that CGA activates HIF-1 and its target genes during incubation prior to thermal stress. Subsequently, using a transgenic strain of *C. elegans* to evaluate autophagy and silencing genes by RNAi, we could demonstrate that CGA requires HIF-1, the transcription factor Heat shock factor 1 (HSF-1) and chaperone proteins HSP-90 and HSP-16 to activate autophagy. *C. elegans* requires an increase in autophagy to resist thermal stress.

For the study of electrophile BNC, a chemical method was performed to quantify the electrophilic activity of tomato extracts. This technique is based on the ability of tomato BNC to react with the sulfhydryl group of the p-nitrobenzenethiol (NBT) substrate, reflecting their ability to interact with protein's sulfhydryl. With this tool, we only could detect electrophilic activity in lipophilic extracts from tomato fruit. The electrophilic activity was quantified in a population of tomatoes originating from contrasting parents in color, shape and size of the fruit. In this population, we also evaluated the composition of pigments. By means of a correlation analysis, lycopene and  $\beta$ -carotene were identified as the most responsible for electrophilic activity, or the precursors of the compounds responsible for generating activity. Due to the absence of evidence on the electrophilic characteristics of these compounds, it was proposed to identify tomato BNC from the combination of the reaction of the electrophilic BNC and NBT, using chromatography analysis coupled to mass spectrometry. This strategy identified 15 electrophilic compounds, of which only 10 compounds could be tentatively identified. These metabolites were mainly carotenals, compounds derived from the oxidation of carotenes.

Studies of the biological activities of thermotolerance in *C. elegans* showed that fractions containing electrophilic compounds were active and mechanism of action would be mediated by the reactivity of the electrophiles on the WDR-23 / SKN-1 protein complex, who generates the increase in the worm cytoprotective activity.

Together, these results show new tomato BNC and their mechanisms of action on signaling pathways involved in the response to stress, and allow to get a better understanding of the *C. elegans* stress biology.



# **CAPITULO 1**

## **INTRODUCCIÓN GENERAL**



# CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL

## 1.1. - El origen del fruto del tomate

Las Solanáceas conforman una de las familias más amplias en el reino vegetal, conteniendo una gran cantidad de especies, aproximadamente entre 9000 y 10000, que pueden habitar en una enorme diversidad de ambientes. Los miembros de esta gran familia se encuentran distribuidos en todos los continentes, pero la mayor diversidad está ubicada en la región comprendida entre el sur de EEUU-Méjico hasta la Patagonia. Dentro de esta familia se encuentra el género *Solanum* aportando alrededor de 2000 especies distribuidas en variados ambientes. El tomate (*Solanum lycopersicum*) (Figura 1) tuvo su origen en las zonas montañosas de Los Andes en América del Sur, lo que incluye las regiones del norte de Chile, Bolivia, Ecuador, Colombia y Perú. Este fruto fue llevado por los pobladores originarios desde su hábitat silvestre en las zonas andinas hacia las planicies de América Central, y fue allí donde se inició el primer evento de domesticación de la especie donde fueron seleccionados los genotipos de mayor interés alimenticio, que luego serían distribuidos por diferentes civilizaciones en el resto de América. Se cree que dos de los centros de domesticación más importantes fueron, la zona de Perú (1), y el sur de Méjico (2); (3).



Figura 1: *Solanum Lycopersicum*. Milan Kořínek (2018).

A principios del siglo XVI, el tomate fue llevado a Europa y otras partes del mundo, inicialmente como una curiosidad botánica ya que se sospechaba la presencia de alcaloides en la fruta (4), pero luego su aplicación abordó el campo de la gastronomía. El primer registro escrito sobre el consumo de tomate fue realizado en el año 1544 por Matthiolus, indicando que el tomate ya se estaba estableciendo en la cocina italiana en

ese tiempo (1). En el siglo XVIII la especie fue llevada desde Europa a América del Norte (5) y en el siglo XIX hacia América del Sur por la región del Río de la Plata. Después de eso, debido a su éxito como cultivo, el tomate encontró otros centros secundarios de diversificación (6) (7). Se cree que, en estos viajes de retorno, solo unas pocas variedades de semillas y plantas fueron devueltas hacia el continente de origen. Precisamente a partir de esos pocos individuos seleccionados comenzó a perfilarse el fruto del tomate moderno que se conoce en la actualidad. Históricamente se asume que el proceso se inició con una serie pequeña de individuos, seleccionados como los más aptos. Estos pocos individuos comenzaron a cruzarse generando descendencia con características genéticas similares y posteriormente esta nueva generación comenzó a cruzarse entre pares, produciendo progresivamente una drástica reducción de la variabilidad genética en la especie *S. lycopersicum* (8).

Por la importancia comercial que tiene el fruto de tomate alrededor del mundo, los productores han enfocado sus esfuerzos en conseguir buenos rendimientos de cosecha aún en condiciones ambientales no óptimas. Actualmente el tomate resultante, crece bajo un amplio rango de condiciones, se adapta bien a diferentes tipos de suelos y tiene cierta tolerancia a la salinidad, aunque el crecimiento de las plantas está condicionado por la luz y la humedad, entre otros factores climáticos y por la nutrición que reciben, dependiente de la fertilidad del suelo (9) (10) (11). En cuanto a las condiciones térmicas, para un desarrollo completo de su ciclo, la planta necesita una gran cantidad de calor. La temperatura mínima de germinación se sitúa sobre los 10 °C, y la óptima entre los 20 y 30 °C.

El tomate es uno de los vegetales más populares, consumidos y cultivados a nivel mundial. Este fruto no es solo un componente importante de la tradicional dieta mediterránea, sino también de muchas otras dietas occidentales. Las estadísticas indican que en el año 2018 se produjeron 37.7 millones de toneladas de tomate para la industria en todo el mundo, y Argentina fue responsable de 0.43 millones de toneladas de dicha producción. Además, en nuestro país, el consumo per cápita de fruto de tomate alcanza los 14 kg/ habitante/ año, una de las tasas de consumo más elevadas de toda América ([www.tomate2000.com](http://www.tomate2000.com)). En la Argentina, el fruto del tomate es la tercera especie hortícola en importancia por su superficie cultivada. Una de las zonas productoras más importantes de tomate para la industria es la región de Cuyo, mientras



que la producción de tomate para el mercado en fresco se localiza en los cinturones hortícolas de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, La Plata, Rosario, Corrientes y Salta (12). Debido a la importancia económica de su producción, los programas de mejoramiento de la especie han pasado por diferentes intereses a medida que transcurrían las épocas. En la década del 90, las características buscadas por estos programas fueron: consistencia en el tamaño, forma, color, resistencia a enfermedades y estrés abiótico, mayor rinde por planta, maduración pareja, menor deterioro postcosecha; todas características que apuntaban a una finalidad comercial (13). Pero, a expensas de obtener estas aptitudes mencionadas, se fueron desvaneciendo otras características muy estimadas por los consumidores habituales del fruto, como por ejemplo el aroma y sabor característicos del tomate. En los últimos años, junto con el aumento en la tendencia del autocuidado, los consumidores regulares de tomate han reclamado, incluso con la intención de pagar mayores precios, alimentos que además del valor nutritivo y calidad organoléptica, aporten beneficios a las funciones fisiológicas del organismo humano. Gracias a estas nuevas demandas, se generó una nueva área de desarrollo en las ciencias de los alimentos y de la nutrición que corresponde al estudio de las propiedades nutraceuticas de los alimentos.

#### 1.1.1. - Compuestos Naturales Bioactivos

Se define como nutraceutico a cualquier sustancia, que puede ser un alimento o parte de un alimento que provee beneficios a la salud de quien los consume, incluyendo la prevención y el tratamiento de las enfermedades (14). Los vegetales son alimentos con características nutraceuticas, ya que proveen múltiples compuestos naturales bioactivos (CNB). Desde hace algunos años, el estudio de los CNB se ha convertido en un área emergente de investigación debido a la evidente asociación entre el consumo regular de los alimentos donde están presentes y la disminución del riesgo de padecer enfermedades crónicas como el cáncer, trastornos cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas.

Un compuesto bioactivo es una sustancia que tiene una actividad biológica, relacionada con su capacidad para modular uno o más procesos metabólicos, lo que resulta en la promoción de mejores condiciones de salud (15) (16). Dichos compuestos forman parte de las propiedades nutricionales de un alimento favoreciendo una buena capacidad

física y buen estado mental de la persona que los consume. Incluir CNB en la dieta produce un efecto beneficioso sobre el organismo a corto, mediano y largo plazo (17).

Los frutos de tomate al igual que muchos otros vegetales, pueden ser considerados como alimentos con características nutracéuticas ya que son excelentes fuentes de CNB, incluyendo ácido ascórbico, ácido clorogénico, rutina, carotenos, y tocoferol.

Actualmente, numerosos estudios mostraron que existe una estrecha asociación entre el consumo de tomate y la prevención de afecciones crónicas. Se indica que el tomate puede tener un efecto beneficioso contra la depresión inmunitaria, aterosclerosis, trastornos cardiovasculares y afecciones cancerosas del aparato digestivo gracias al alto contenido de compuestos antioxidantes y vitaminas (18).

¿Qué efectos generan sobre el organismo los CNB del tomate para producir las propiedades beneficiosas recién mencionadas? ¿De qué manera se relacionan los CNB presentes en el fruto del tomate y el retraso o disminución en la aparición de enfermedades crónicas?

Para responder estas interrogantes es necesario definir algunos conceptos.

#### 1.1.2. - Radicales libres

Los radicales libres forman parte de nuestra fisiología, se generan en los organismos como resultado del metabolismo celular y de los factores ambientales, pero cuando su producción es exacerbada, puede causar daño sobre diferentes moléculas biológicas y ser la causa de numerosas enfermedades crónicas como algunos cánceres, diabetes,



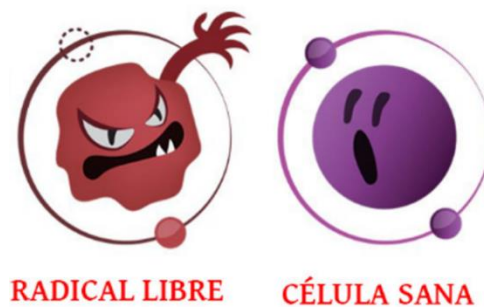
patologías cardiovasculares, procesos reumáticos, patologías gastro-entéricas, afecciones broncopulmonares o procesos neurodegenerativos (19) (20).

Estas enfermedades se caracterizan por cursar con un elevado nivel de estrés oxidativo,

que puede ser debido a una sobreproducción de especies reactivas o a una disminución de las defensas antioxidantes (21).

Los radicales libres son moléculas o fragmentos moleculares (orgánicos e inorgánicos) que tienen uno o más electrones desapareados o libres en su orbital externo, por lo que son muy reactivos ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesitaba, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una verdadera reacción en cadena (22) (23) (24) (25) (26) (27). Un radical libre será más estable cuanto mayor sea su capacidad para deslocalizar su electrón impar, lo cual depende de su estructura química y en particular de factores electrónicos y estéricos. La vida media de un radical libre es inversamente proporcional a su reactividad (26).

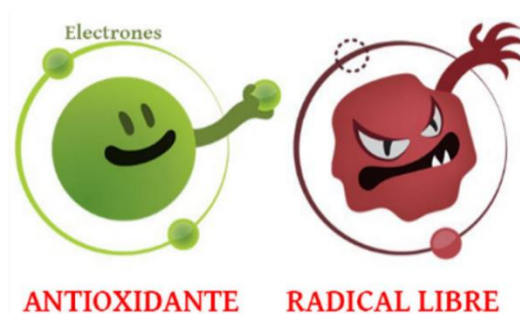
Un exceso de radicales libres en el sistema puede alcanzar niveles tóxicos, originando daño celular como resultado de las alteraciones sobre el metabolismo de los proteínas, carbohidratos y lípidos (28). La capacidad que tenga cada radical libre para actuar como agente oxidante está determinada por factores como su reactividad, especificidad, selectividad y difusibilidad. La importancia toxicológica que pueda tener un radical libre en el organismo, dependerá tanto de su reactividad como del lugar en que sea generado, así como de la distancia del lugar de generación a la que se hallen moléculas vitales para la célula (29).



Nuestro organismo, dispone de mecanismos de defensa frente el estrés oxidativo, pero muchas veces estas defensas pueden no ser suficientes, el efecto antioxidante de los CNB de los alimentos funcionaría como una fuente exógena para compensar el desbalance.

## 1.1.3. - Compuestos Antioxidantes

Un antioxidante es cualquier sustancia que en presencia de un sustrato oxidable retrasa o inhibe la oxidación del mismo (aún en bajas concentraciones en relación al sustrato oxidable) (30). Se caracterizan por ser muy heterogéneos, pueden ser hidrofílicos o lipofílicos, localizarse intra o extracelularmente, y proceder de diferentes fuentes (algunos son nutrientes o proceden de éstos y otros son productos del metabolismo). Los antioxidantes tienen la capacidad de arrestar los procesos de lipoperoxidación y sus efectos, y pueden prevenir la oxidación debido a la inactivación de los radicales libres o las especies reactivas de oxígeno (EROs) (31).



Las moléculas antioxidantes protegen del daño inducido por radicales libres, previniendo la formación de nuevos radicales, eliminándolos o promoviendo su descomposición. Entonces, los antioxidantes pueden actuar en diferentes pasos de la cadena de la secuencia de propagación, dependiendo de las características propias de los reactivos involucrados (32) (33).

Un antioxidante dietético es una sustancia que forma parte de los alimentos de consumo cotidiano y que puede prevenir los efectos adversos de especies reactivas sobre las funciones fisiológicas normales de los humanos que los consumen. Estos antioxidantes se forman en la planta como defensa contra radiación ultravioleta, condiciones ambientales desfavorables o agresión por patógenos y también para contribuir a las características organolépticas de los frutos como la amargura y la astringencia (34).

Los compuestos antioxidantes presentes en el tomate se pueden clasificar como: hidrofílicos (lipofóbicos) o lipofílicos (hidrofóbicos). Entre los antioxidantes hidrofílicos se encuentran numerosos compuestos fenólicos (flavonoides y ácidos fenólicos) quienes contribuyen a la formación de una dieta saludable (35) y por su capacidad de eliminar

de radicales libres, se les sugirió un rol protector, reduciendo la aparición de enfermedades cardíacas (36) (37). Entre los lipofílicos se destacan dos carotenoides principales: licopeno, que representa un 80-90% del contenido total de carotenoides y el  $\beta$ -caroteno quien ocupa el 7-10%. Se ha demostrado ampliamente que el licopeno tiene una fuerte actividad antioxidante, y exhibe la mayor tasa de eliminación de oxígeno singlete. Por su parte,  $\beta$ -caroteno es de especial interés debido a su actividad pro vitamina A (38). La presencia de estos compuestos en el fruto de tomate serían los responsables de los efectos beneficiosos en los consumidores (39).

Actualmente, la teoría de las propiedades antioxidantes ya no es la única que explicaría los beneficios de incluir ciertos alimentos en la dieta. En los últimos años se ha hecho mención de compuestos con actividad antioxidantes y también de compuestos con características de electrófilos presentes en ciertos alimentos (lipoalquenos, carotenoides, isotiocianatos, etc.) que pueden estar también relacionados con la prevención o el tratamiento de enfermedades crónicas (40).

#### 1.1.4. - Compuestos electrófilos

Un electrófilo es una molécula deficiente en electrones que participa de una reacción química aceptando un par de electrones para formar un enlace con un nucleófilo (molécula de alta densidad electrónica) (Figura 2). En la mayoría de los casos la formación directa de aductos con los nucleófilos presentes en las proteínas, es la responsable de la actividad biológica de los mismos (40).

El hecho de que existan proteínas sensibles a reaccionar con electrófilos controlando sistemas de respuesta celular, como por ejemplo la respuesta al estrés oxidativo (41), hace que las moléculas electrófilas puedan modular vías de señalización y desencadenar respuestas a eventos patológicos. Es por esta razón que se justifica la relación establecida entre el consumo de electrófilos y la atenuación del estrés oxidativo en el organismo.

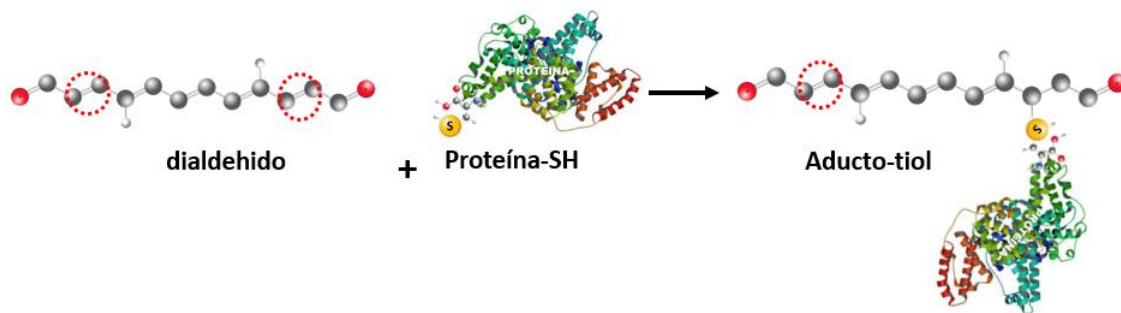


Figura 2: Representación esquemática de la interacción entre los derivados carotenoides con un grupo tiol proteico. Los carotenoides electrófilos contienen carbonilos insaturados (destacado con un círculo punteado) que pueden formar aductos de Michael con los grupos tiol nucleófilos presentes en las proteínas. Como resultado se forma una unión entre la doble ligadura conjugada del derivado y el grupo tiol de la proteína. Karin Linnewiel y col. (2014)

Se conoce actualmente que los productos de oxidación derivados de los compuestos presentes en el fruto del tomate, poseen propiedades de electrófilos (42). Sus potenciales actividades benéficas han generado interés en su estudio. Sin embargo, existe poca información sobre su aporte en las propiedades nutraceuticas del fruto de tomate.

Con la información disponible hasta el momento, debemos considerar mucho más que los antioxidantes convencionales a la hora de evaluar las propiedades nutraceuticas del fruto del tomate, y para ello, es necesario desarrollar nuevas técnicas de laboratorio que permitan explorar diferentes tipos de actividades biológicas y permitan además la identificación de los compuestos activos. Por otro lado, necesitamos un modelo lo suficientemente completo y sencillo para llevar a cabo las determinaciones deseadas, en periodos cortos de tiempo.

Para poder realizar un trabajo que incluya todo lo anteriormente mencionado, se propone el modelo de *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), el cual es actualmente una herramienta experimental sumamente útil para el estudio de las actividades biológicas de compuestos presentes en los alimentos. Este nematodo permite evaluar con facilidad, los efectos generados por compuestos puros y extractos obtenidos a partir de frutos y profundizar sobre las vías de señalización que pueden ser moduladas por los CNB presentes.

## 1.2. - *Caenorhabditis elegans*

En la década de los 60, Sydney Brenner tuvo la visionaria idea de proponer a *C. elegans* como un posible modelo animal para el estudio de la biología molecular, biología del desarrollo, genética, desarrollo del sistema nervioso entre otras áreas (43). Con el paso del tiempo, la investigación sobre *C. elegans* se expandió para explorar múltiples y diversas áreas de la biología moderna, incluyendo los estudios de las interacciones entre células eucariotas, las interacciones huésped-parásito y en nuestro caso, el estudio de los efectos de los CNB presentes en los alimentos.



Figura 3: nematodo *Caenorhabditis elegans* hermafrodita adulto. © Ian D. Chin-Sang 2019

*C. elegans* (Figura 3) se clasifica como un nematodo de vida libre y en la naturaleza puede encontrarse en el suelo, más específicamente en la materia vegetal en descomposición, la cual suministra la fuente bacteriana necesaria para su alimentación y desarrollo (44).

Actualmente se considera a *C. elegans* como un modelo óptimo para la investigación. Se pueden detallar varias características del modelo, que demuestran su versatilidad experimental: el bajo costo de mantenimiento y aplicación en laboratorio, el sencillo desarrollo de las cepas a gran escala, y la fácil manipulación de los individuos en comparación con otros modelos *in vivo*.

Además *C. elegans* tiene un ciclo de vida corto. Un ciclo completo, desde la eclosión de huevos hasta alcanzar el estadio adulto, toma aproximadamente 3 días a 20 °C. De incrementar la temperatura a 25 °C, el ciclo de vida puede acortarse a 2.5 días, ya que la tasa de desarrollo animal se puede controlar con la variación de la temperatura (Figura 4). Es remarcable que la estrecha relación que existe entre la temperatura de desarrollo y el ciclo de vida del *C. elegans*, hace posible que los tiempos de trabajo sean flexibles y

puedan adaptarse a las necesidades de laboratorio (siempre que los cambios en la temperatura no tengan un efecto *per se* sobre el organismo).

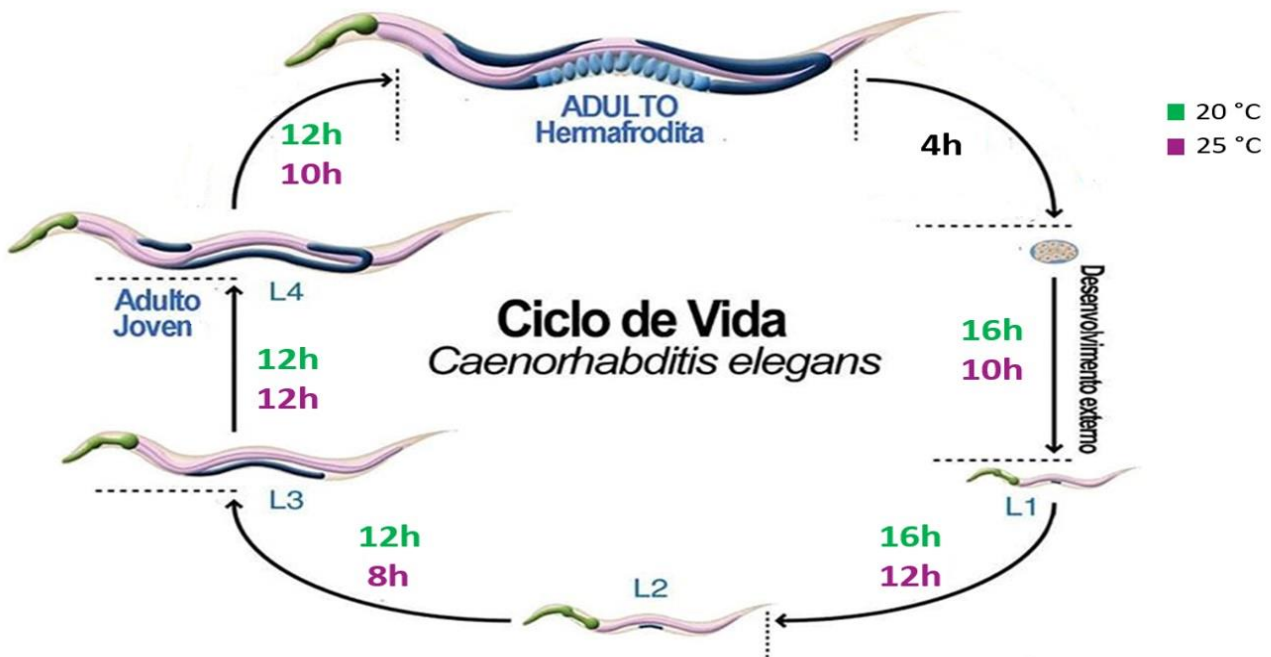


Figura 4: Modificación de los tiempos de desarrollo dependiendo de la temperatura. En verde y violeta se observan los tiempos en horas, cuando el desarrollo se lleva a 20 y 25 °C respectivamente. Modificado de Altun y Hall (2012).

Una cualidad a resaltar sobre el modelo de *C. elegans*, es la capacidad de sobrevivir después de ser congelados. Esta característica disminuye la tasa de mutaciones de las cepas, las tareas y los costos de mantenimiento.

Por otro lado, gracias a su tamaño milimétrico, el desarrollo de poblaciones enteras puede llevarse a cabo en placas de Petri. Las larvas recién nacidas de *C. elegans* tienen 0.25 mm de largo, y los adultos alcanzan aproximadamente 1 mm. Una lupa de disección es suficiente para observar los nematodos y permite distinguir con facilidad los diferentes estadios larvales, el tipo de movimiento, el proceso de alimentación y la postura de huevos en la población. Con el uso de un microscopio óptico o un confocal, puede alcanzarse una resolución mucho más fina, lo que permite llevar a cabo análisis relacionados al desarrollo y la función celular.

Además, debido a que *C. elegans* es transparente, se pueden discriminar detalles de su estructura interna mediante el uso de proteínas fluorescentes, y esta técnica puede utilizarse también para etiquetar proteínas o compartimentos subcelulares, lo que



permite llevar a cabo estudios sobre el desarrollo y la caracterización de las proteínas *in vivo* (Figura 5).

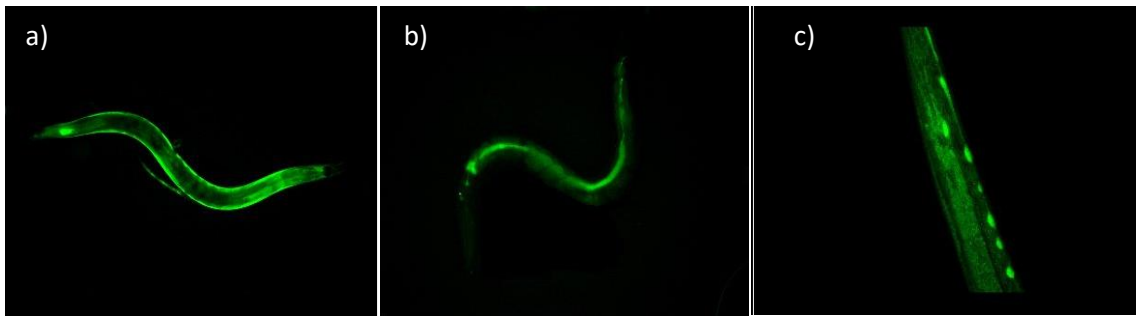


Figura 5: Representación de algunas cepas con incorporación de GFP.

a) Cepa CL2166, permite visualizar el incremento de las concentraciones de la enzima GST, b) cepa LG331, muestra el incremento del factor de transcripción Skn-1. c) cepa DA2123 muestra el punteo resultado de la inducción de autofagia.

En cuanto a las facilidades para la reproducción de gusanos, debido a que un alto porcentaje de la población de *C. elegans* son hermafroditas autofertilizantes, un solo adulto grávido puede poner hasta 200 huevos, durante un período de seis días, razón por la cual un solo animal puede poblar una placa de desarrollo y generar una población completa. Gracias a las características propias de los huevos, antes de comenzar un ensayo de laboratorio, los animales se pueden sincronizar aislando larvas recién nacidas o tratando adultos grávidos, con una solución de hipoclorito e hidróxido de sodio concentrado, lo que ayuda también a evitar la propagación de contaminaciones en las placas de desarrollo. Este tratamiento elimina larvas adultas, pero deja intactos a los huevos, ya que están protegidos por una cubierta resistente.

En cuanto a la manipulación genética, el modelo de *C. elegans* se ha destacado también por sus facilidades (45). La autofecundación anteriormente mencionada, significa que después de mutagenizar los hermafroditas (POs), cualquier alelo mutante (excepto los letales dominantes) puede mantenerse a través de la autopropagación en la progenie de primera generación (F1), de segunda generación (F2), etc. sin necesidad de que ocurra apareamiento. Esta propiedad permite la amplificación de una cepa mutante sin dificultad. Por otro lado, contamos con la posibilidad de reducir la actividad genética mediante la alimentación con ARNi (ARN interferente), ya que con la utilización de bacterias transformadas como alimento, los nematodos pueden incorporar a través de

su intestino un vector que generará la modificación deseada en el gusano y esta modificación se volverá estable y podrá ser heredada a la generación posterior (46).

Una característica sumamente importante, es que *C. elegans* fue el primer organismo multicelular con una secuencia del genoma completa (*C. elegans* Sequencing Consortium 1998) lo que ha conducido a la identificación molecular de muchos genes clave en los procesos biológicos y de desarrollo celular. Las similitudes entre los procesos celulares y moleculares presentes en *C. elegans* y otros animales a lo largo del tiempo evolutivo (metabolismo, estructura y función de los orgánulos, regulación génica, y biología de proteínas) han hecho de *C. elegans* un excelente organismo con el cual estudiar biología general de metazoos. Al menos el 38% de los genes codificadores de proteínas de *C. elegans* tienen ortólogos en el genoma humano (47) y el 60-80% de los genes humanos tienen un ortólogo en el genoma de *C. elegans* (48). Por lo tanto, que el modelo posea estos mecanismos conservados en relación a organismos superiores, hace que muchos descubrimientos en *C. elegans* tengan relevancia para el estudio de la salud y la enfermedad humana.

Las características mencionadas, propias del modelo, justifican de una excelente manera la elección de *C. elegans* como una herramienta experimental, para el estudio *in vivo* de la actividad biológica y los mecanismos de acción de los CNB, que otorgan propiedades nutraceuticas al fruto de tomate.

### 1.3. - Escenario de la Tesis Doctoral

Desde hace algunos años, el estudio de los CNB se ha convertido en un área emergente de investigación debido a la evidente asociación entre el consumo regular de los alimentos que los contienen y la disminución del riesgo de aparición de enfermedades crónicas. Numerosos estudios indican que existe una estrecha asociación entre el consumo de tomate y la prevención de las patologías antes mencionadas. En el fruto se han identificado CNB que están involucrados en dichas propiedades de prevención, pero no se conoce claramente sus mecanismos de acción (49). Estos CNB poseen en común propiedades antioxidantes que estarían mediando sus efectos biológicos. Sin embargo, los estudios actuales proponen otros mecanismos que impulsan a identificar nuevos CNB en alimentos. En nuestro laboratorio, contamos con el modelo *in vivo* de *C. elegans*,

para el estudio de las propiedades nutracéuticas de los frutos de tomate. En este proyecto, se pretende dar respuestas al modo de acción y la bioactividad del fruto de tomate en la prevención de patologías, e identificar nuevos principios activos que permitan generar estrategias para obtener alimentos con un mayor poder nutracéutico. Finalmente, a partir de los resultados que se obtengan de este estudio, se pretenderá hacer un aporte al entendimiento de los mecanismos moleculares y bioquímicos que están involucrados en la biología del estrés térmico.

#### 1.4. - Objetivo General

El objetivo general de este plan de tesis consiste en investigar los mecanismos moleculares y bioquímicos por los cuales los CNB derivados del fruto del tomate, regulan los procesos celulares y tisulares asociados con el estrés.

Para poder conseguir nuestro objetivo principal, se plantean los siguientes objetivos específicos, alrededor de los cuales se irá desarrollando el siguiente trabajo de tesis:

#### 1.5. - Objetivos específicos

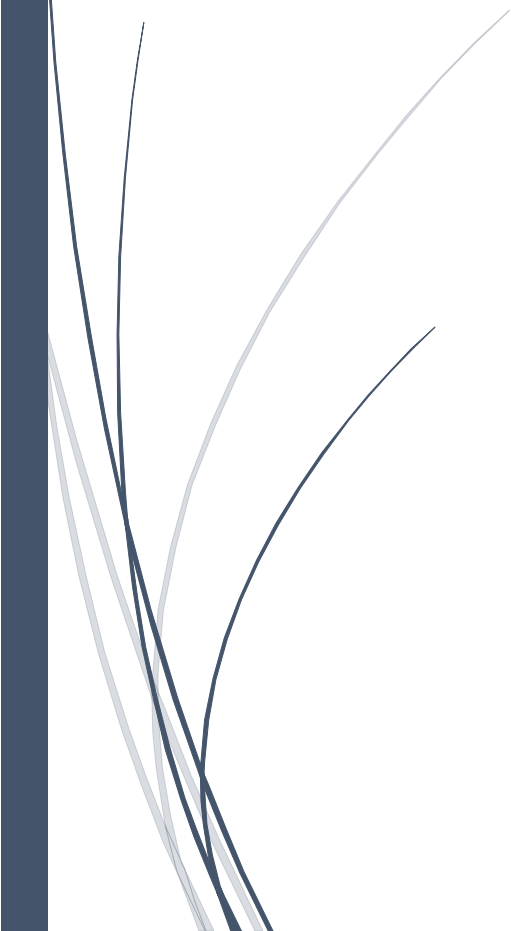
- 1-** Caracterizar la actividad antioxidante y de electrófilos e identificar la composición de CNB en una población de frutos de tomate.
- 2-** Establecer la actividad biológica de extractos y CNB de frutos de tomate en *C. elegans*.
- 3-** Investigar las posibles interacciones de los extractos/CNB de tomate con las vías de señalización relacionadas con el estrés térmico.





# **CAPITULO 2**

## **MATERIALES Y MÉTODOS**





## CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. - Obtención de muestras

En el presente trabajo se utilizaron 2 grandes poblaciones de tomate. Los cultivos de ambos grupos se llevaron a cabo en el Campo Experimental del Instituto de Horticultura de la Facultad de Ciencias Agrarias dependiente de la Universidad Nacional de Cuyo, en Mendoza, Argentina (33°0,3'S, 68°52'O, a 912 metros sobre el nivel mar).

El primer grupo de frutos está conformado por 11 variedades locales de tomate andino autóctonos (A), 3 cultivares comerciales (C) y 2 cultivares silvestres (S). Este grupo de muestras fue originado a partir de semillas de 16 accesiones de tomate, obtenidas del Banco de Germoplasma de la Estación Experimental de La Consulta del Instituto de Tecnología Agropecuaria (INTA) en La Consulta, Mendoza, Argentina. Las accesiones #407 de *Solanum habrochaites* y #4739 de *Solanum pimpinellifolium* fueron multiplicadas de semillas enviadas por CM-Rick Genética de Tomates (Universidad de California). Las demás accesiones pertenecían a *Solanum Lycopersicum* (Tabla I). Las semillas fueron plantadas en macetas de 150 mL hasta que produjeron de 3 a 4 hojas, en ese momento, fueron trasplantadas a tierra en una parcela homogénea conservando un diseño aleatorio para cada genotipo, en diferentes sectores de la parcela. De esta manera, los frutos fueron obtenidos de diferentes sectores, minimizando las variaciones que los efectos naturales del sitio de cultivo pudieran generar sobre los frutos. El cosechado fue realizado manualmente, y se priorizaron los frutos que poseían un estadio de madurez similar. El estadio madurativo se definió por el color y la firmeza del fruto. Se obtuvieron 3 frutos provenientes de 3 plantas distintas de un mismo genotipo (50). Teniendo en cuenta todas estas consideraciones, cada fruto pudo ser considerado como una réplica biológica y analítica de un mismo cultivar.

Especie	Accesión n°	País, provincia	color
<i>Solanum lycopersicum</i>	3819 (A)	Arg, La Plata	rojo
<i>Solanum lycopersicum</i>	565 (A)	Arg, Jujuy	rojo
<i>Solanum lycopersicum</i>	3842 (A)	Arg, Mendoza	rojo
<i>Solanum lycopersicum</i>	4735 (C)	comercial	rojo
<i>Solanum lycopersicum</i>	3815 (A)	Arg, Mendoza	rojo
<i>Solanum lycopersicum</i>	571 (A)	Arg, Catamarca	rojo
<i>Solanum lycopersicum</i>	GPEA ( <i>Garden Peach</i> ) (C)	comercial	rojo
<i>Solanum lycopersicum</i>	572 (A)	Arg, Catamarca	rojo
<i>Solanum lycopersicum</i>	3806 (A)	Arg, Mendoza	rojo
<i>Solanum lycopersicum</i>	560 (A)	Arg, Salta	amarillo
<i>Solanum habrochaites</i>	LA407 (S) (colección SAL 160)	Ecuador, Guayas	verde
<i>Solanum lycopersicum</i>	4742 (C)	comercial	amarillo
<i>Solanum lycopersicum</i>	552 (A)	Arg, Catamarca	rojo
<i>Solanum lycopersicum</i>	4750 (A)	Arg, Luján	azul-morado
<i>Solanum lycopersicum</i>	557 (A)	Arg, Salta	rojo
<i>Solanum pimpinellifolium</i>	4739 (S) (LA1589, colección SAL)	Perú, La Libertad	rojo

Tabla I: Primer conjunto de muestras. De cada uno de las muestras listadas, se obtuvieron 3 frutos, consideradas como replicas biológicas.

El segundo grupo de muestras estaba originalmente conformado por 73 frutos, derivados de un proyecto que tuvo como propósito profundizar el conocimiento sobre los genotipos híbridos y el mejoramiento de las variedades, la herencia del color del fruto y otros caracteres de calidad nutricional en el tomate cultivado.

La mayoría de las variedades cultivadas y algunas especies silvestres, poseen frutos rojos a la madurez, pero también hay variedades que producen frutos de color verde, amarillo, anaranjado y marrón. Esta población se generó a partir del cruzamiento de dos variedades altamente contrastantes en tamaño, forma y color de sus frutos. La población estuvo conformada por las variedades cruzadas y su progenie F1 y F2 (Figura 1).

Las semillas utilizadas para obtener los individuos progenitores fueron generadas por selección de plantas autofecundadas durante cinco temporadas. A partir de una muestra original de semillas de polinización abierta depositadas en el Banco de Germoplasma del INTA La Consulta. Se utilizó un progenitor femenino de origen ruso, con frutos de color marrón, gran tamaño y forma semiaplanada. Por otro lado, como progenitor masculino, se utilizó un fruto tipo cherry de color amarillo pálido y forma esférica, procedente de Inglaterra.



Durante la temporada estival 2014-2015 se evaluaron cinco plantas del progenitor femenino, seis plantas del progenitor masculino, cuatro plantas de la generación F1 y 58 plantas de la generación F2, en un diseño completamente aleatorizado (51). El marco de plantación fue de 1.5 m entre surcos y 0.3 m entre plantas. El cultivo estuvo protegido por malla antigranizo, y se realizaron las tareas de cultivo y fitosanitarias típicas, necesarias para su desarrollo hasta finalizar el período de cosecha.

Una vez que los frutos fueron cosechados, se trasladaron en hielo por una corta distancia hacia el laboratorio, donde se enjuagaron con agua, se retiró el pedúnculo de los frutos y fueron trozados groseramente, para inmediatamente congelarlos con nitrógeno líquido y conservarlos en congelador de -80 °C en cajas individuales plásticas hasta el procesamiento de los mismos (52). Para llevar a cabo el trabajo experimental, se decidió conservar solamente las muestras de tomate de color rojo. Como el foco de estudio se ubicó sobre los pigmentos presentes en las muestras, fue necesaria una división del conjunto total, y por el número de muestras disponible para cada color, solo los tomates rojos permitían llevar a cabo análisis estadísticos.



Figura 1: Imágenes de la parte interna de los frutos del progenitor femenino 4637, del progenitor masculino 4635, el híbrido F1 y la distribución fenotípica de la población F2.

## 2.2. - Procesamiento de la muestra

Los frutos congelados pertenecientes al primer grupo de muestras que se encontraban en grandes trozos, fueron procesados en un molinillo eléctrico (Molino Molab Mod.2 70 W) a bajas temperaturas. El molinillo fue enfriado durante todo el proceso de molienda con nitrógeno líquido para evitar que las muestras se descongelaran. De esta forma se obtuvieron muestras finamente molidas, que posteriormente fueron guardadas en tubos plásticos de polipropileno de 15 ml debidamente rotulados a -80 °C.

Las muestras del segundo grupo pertenecientes a la cosecha 2015, fueron liofilizadas y el material resultante fue guardado en tubos plásticos estancos, que se mantuvieron en condiciones refrigeradas hasta el momento de su procesamiento.

## 2.3. - Obtención de extractos

Los extractos hidrofílicos y lipofílicos se obtuvieron según los procedimientos propuestos por Toor y Savage, 2004 y Capanoglu y col, 2008 (53) (54) con pequeñas modificaciones, a partir de aproximadamente 500 mg de tomate finamente molido frío o a partir de 50 mg de muestra molida liofilizada.

El extracto hidrofílico fue obtenido a partir del polvo de tomate, mediante dos extracciones sucesivas con 1.5 mL de metanol 75%, protegido de la luz, seguido por un período de sonicación y centrifugación (Centrífuga Presvac DC5-16RTV- 6000 rpm) de 15 min cada uno, para separar la nueva fase formada del pellet de tomate.

El extracto lipofílico fue obtenido posterior a la separación de la fase hidrofílica. Sobre el pellet resultante de la primera separación, se agregaron metanol p.a. y tampón salino Tris-HCl 20 mM pH 7, NaCl 1M, y posteriormente 3 mL de cloroformo p.a, intercalando las adiciones con períodos cortos de sonicación y centrifugado. Al final de la extracción se obtuvo un extracto hidrofílico y uno lipofílico de 3 y 4 mL respectivamente (Figura 2). Los extractos finales se mantuvieron al resguardo de la luz para evitar degradación de compuestos fotolábiles a una temperatura de -80 °C.

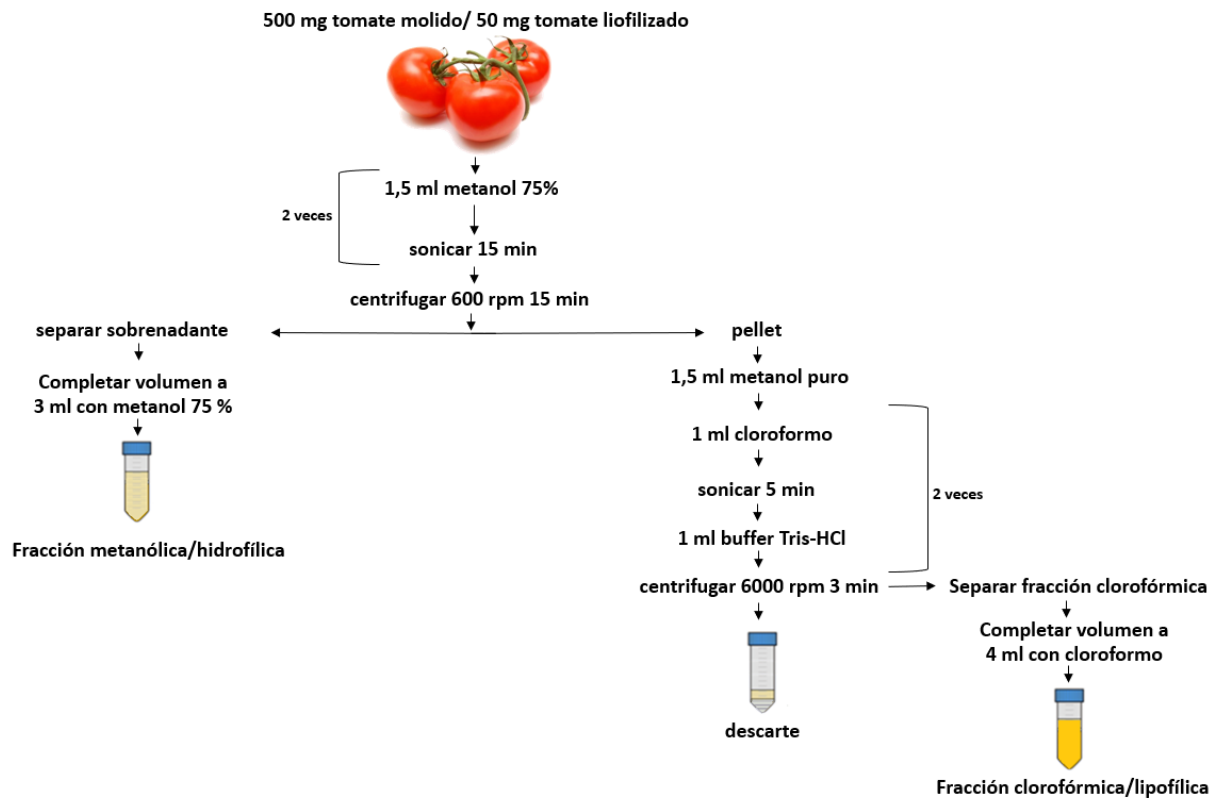


Figura 2: Diagrama de obtención de extractos a partir de frutos de tomate.

## 2.4. - Medición de actividad antioxidante

### 2.4.1. - Método de TEAC (Capacidad Antioxidante en equivalentes de Trolox)

El radical ABTS<sup>•</sup> se generó a partir de su precursor el Ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico (ABTS). La generación del radical ABTS<sup>•+</sup> se llevó a cabo químicamente utilizando persulfato potásico, esta reacción se realiza a temperatura ambiente en ausencia de luz, en un tiempo de 12 a 16 h. El radical catiónico obtenido es un compuesto de color verde-azulado, estable y con un espectro de absorción en el UV-visible. Una vez generado el radical, la medición se realiza mediante un ensayo de posadición de la sustancia antioxidante. La capacidad antioxidante de los compuestos de prueba se midió como una disminución del color, a una longitud de onda de 734 nm. La ventaja de este ensayo es que puede realizarse tanto en muestras hidrofílicas como lipofílicas, eligiendo el solvente apropiado en cada caso. Los resultados de los compuestos a analizar se expresan en relación con equivalentes de trolox utilizado como reactivo de calibración (55).

Reactivos:

- ABTS 7 mM.
- Solución persulfato potásico 2.45 mM.
- Etanol al 96 % v/v o tampón salino PBS 1x.
- Curva de calibración con la solución de Trolox. Para la curva se utilizan concentraciones de 1; 0.5; 0.25; 0.125; 0.0625; 0.03125 mM.

Conformación de muestras en placa de 96 pocillos:

Blanco: 50  $\mu$ L etanol 96 % + 150  $\mu$ L de reactivo.

Curva de calibración: 50  $\mu$ L dilución de Trolox + 150  $\mu$ L de reactivo.

Muestras: 50  $\mu$ L muestra + 150  $\mu$ L de reactivo.

Posteriormente al agregado del reactivo, se permite que la reacción tenga lugar durante 10 minutos en oscuridad y luego se mide por espectrofotómetro.

\*(Los extractos lipofílicos deben diluirse previamente en etanol 96 %, los extractos hidrofílicos se utilizan sin tratamiento previo).

El valor obtenido en equivalentes mM de Trolox es corregido por el volumen utilizado de muestra y expresado finalmente por cada 100 g de tomate fresco.

## 2.4.2. - Método de FRAP (Poder Antioxidante Reductor del ion Férrico)

Este método se basa en el poder que tiene una sustancia antioxidante para reducir el  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ . El complejo férrico-2, 4, 6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) incoloro es reducido al complejo ferroso coloreado.

Es un método espectrofotométrico ya que se mide la absorbancia del  $\text{Fe}^{2+}$ . Así, cuanto más antioxidante es la sustancia objeto de estudio, mayor es la reducción, mayor la concentración de  $\text{Fe}^{2+}$  y más alta la señal de absorbancia (56).

Este método sólo se utiliza en muestras hidrofílicos.

Reactivos:

- Ácido clorhídrico (HCl) 40 mM.
- Solución TPTZ 10 mM.
- Solución  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  20 mM.
- Tampón acetato 0.3 mM, pH 3.6.

-Curva de calibración con la solución de Trolox. Para la curva se utilizan concentraciones de 1; 0.5; 0.25; 0.125; 0.0625; 0.03125 mM.

Conformación de muestras en placa de 96 pocillos:

Blanco: 10  $\mu$ L metanol 75 % + 200  $\mu$ L de reactivo.

Curva de calibración: 10  $\mu$ L dilución de Trolox + 200  $\mu$ L de reactivo

Muestras: 10  $\mu$ L muestra + 200  $\mu$ L de reactivo

Posteriormente a adicionar el reactivo, se permitió que la reacción tenga lugar durante 6 minutos en oscuridad y luego se midió por espectrofotómetro a 593 nm.

El valor obtenido en equivalentes mM de Trolox es corregido por el volumen utilizado de muestras y expresado finalmente por cada 100 g de tomate fresco.

## 2.5. - Medición de actividad electrofílica

### 2.5.1. - Método de p-Nitrobencenotiol para cuantificación de electrófilos

Este método se basa en una cuantificación espectrofotométrica que involucra la reactividad de un compuesto electrofílico con p-nitrobencenotiol (NBT). El progreso de la reacción se lleva a cabo monitoreando la pérdida del tiol libre del NBT a 412 nm, donde se encuentra el mayor coeficiente de absortividad molar ( $\epsilon$ ), durante un período de tiempo de 30 min. La progresiva pérdida del grupo tiol libre, se puede observar como una disminución en la coloración amarilla del reactivo utilizado. Este método representa el ataque nucleofílico que el grupo tiol del NBT realiza en un centro deficiente de electrones (57). El decaimiento propio (pendiente de la curva de decaimiento) de la absorbancia del reactivo utilizado, es utilizado como blanco de reacción. La curva de calibración se realiza con concentraciones definidas de dinitroclorobenceno (CDNB), y las muestras se analizan individualmente. Una vez obtenidas todas las curvas como resultado de la reacción, a cada muestra analizada, se le resta el blanco de reactivo, y adicionalmente se grafica la curva de calibración para definir el límite de cuantificación. Este ensayo puede realizarse tanto en muestras hidrofílicas como lipofílicas, utilizando Dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente de trabajo.

Reactivos:

- Solución NBT 0.2 mM.
- Tampón salino fosfato de potasio 0.1 M, pH 7.4.
- Solución CDNB 10 mM.
- DMSO.
- Curva de calibración de CDNB. Para la curva se utilizan concentraciones de 1; 0.5; 0.25; 0.125; 0.0625; 0.03125 y 0.015 mM.

Conformación de muestras en placa de 96 pocillos:

Blanco: 30  $\mu$ L DMSO + 170  $\mu$ L NBT 0.2 mM.

Curva de calibración: 30  $\mu$ L dilución CDNB + + 170  $\mu$ L NBT 0.2 mM.

Muestras: 30  $\mu$ L muestra\* + 170  $\mu$ L NBT 0.2 mM.

\*(Las muestras deben secarse y resuspenderse en DMSO).

El valor obtenido en equivalentes mM de CDNB es corregido por el volumen utilizado de muestras y expresado finalmente por cada 1 g de tomate fresco.

2.5.2. - Preparación de reactivos para la cuantificación de electrófilos

El NBT fue disuelto en tampón salino fosfato pH 7.4 para lograr las condiciones óptimas de reacción (57). El CDNB fue disuelto en acetonitrilo donde demostró una disolución estable y presentó una buena reactividad con el NBT. Sin embargo, los extractos lipofílicos de tomate presentaron una baja solubilidad en acetonitrilo (ACN).

Como los extractos lipofílicos de tomate son prácticamente insolubles en medio acuoso, se realizaron pruebas con diferentes sistemas de solubilización que permitieran reaccionar los electrófilos de tomate con el NBT en tampón salino fosfato. El DMSO resultó ser el solvente más práctico y estable para la resuspensión de los extractos lipofílicos, siempre y cuando la concentración de los pigmentos no sobrepasara la capacidad de dilución del solvente. Para ello se estableció una masa fija de extracto para secar y re suspender, que garantizara la disolución completa de los pigmentos. A su vez el DMSO no interfirió con la coloración del NBT y disolvió completamente el CDNB para realizar la curva de calibración.

## 2.6. - Cuantificación e Identificación de compuestos presentes en los extractos

### 2.6.1. - Cuantificación de compuestos fenólicos totales por *Folin- Ciocalteu*

La cuantificación del contenido de fenoles totales se llevó a cabo mediante un ensayo que determina la capacidad que tienen los polifenoles para reducir el Mo (VI) a Mo (V). Como resultado de la reducción del Mo, el reactivo de color amarillo adquiere un intenso color azul que se mide con el espectrofotómetro. En un tubo de vidrio de 1,5 mL se adicionaron, el extracto, agua mili Q, el reactivo de *Folin- Ciocalteu* y se agitó con vortex durante 1 min, luego la solución de carbonato de sodio fue adicionada y se dejó reaccionar en oscuridad durante 120 min. Las muestras se midieron espectrofotométricamente a 750 nm. Por la afinidad de los compuestos fenólicos, este método solo se aplicó a muestras hidrofílicos. (58)

Reactivos:

- Reactivo de *Folin- Ciocalteu* (Sigma- Aldrich).
- Solución de carbonato sódico al 10% ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ).
- Solución de ácido gálico.

Curva de calibración de ácido gálico: Para la curva se utilizan concentraciones de 0.25 mM, 0.125 mM, 0.0625 mM, 0.03125 mM y 0.015625 mM.

#### Conformación de muestras en tubos de Khan para medición espectrofotométrica:

Blanco: 50  $\mu\text{L}$  de metanol 75 % + 750  $\mu\text{L}$  agua miliQ + 50  $\mu\text{L}$  reactivo *Folin- Ciocalteu* + 150  $\mu\text{L}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

Curva de calibración: 50  $\mu\text{L}$  dilución ácido gálico + 750  $\mu\text{L}$  agua miliQ + 50  $\mu\text{L}$  reactivo *Folin- Ciocalteu* + 150  $\mu\text{L}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

Muestras: 50  $\mu\text{L}$  muestra + 750  $\mu\text{L}$  agua miliQ + 50  $\mu\text{L}$  reactivo *Folin- Ciocalteu* + 150  $\mu\text{L}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

El valor obtenido en equivalentes mM de ácido gálico fue corregido por el volumen utilizado de muestras y expresado finalmente por cada 100 g de tomate fresco.

### 2.6.2. - Identificación de compuestos fenólicos por HPLC

Los compuestos fenólicos de las muestras de tomate fueron analizados por cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas HPLC-DAD-ESI-EM/EM utilizando un Agilent Technologies 1200 Series equipado con una bomba de gradiente (Agilent G1312B SL Binary), desgasificador de solventes (Agilent G1379 B) y muestreador automático (Agilent G1367 D SL+WP). El sistema de HPLC fue conectado a un detector con arreglo de fotodiodo (Agilent G1315 C Starlight DAD) y luego a un espectrómetro de masa tiempo de vuelo (QTOF) (micrOTOF-Q11 Series, Bruker) equipado con una interface de ionización por electro-pulverización (ESI). Las condiciones de la corrida se llevaron a cabo de acuerdo con el trabajo descrito por Frenich y col. 2005 (59). La identificación tentativa de los compuestos se realizó por su tiempo de retención, orden de elución, espectro UV-visible y espectro de fragmentación-EM en comparación con los estándares fenólicos (9 estándares utilizados), en adición a los descriptos por la literatura. La cuantificación de polifenoles se basó en las curvas de calibración externas generadas con los estándares de polifenoles, utilizando las áreas de los picos de masa obtenidas de los cromatogramas, a concentraciones entre 0.78 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Las muestras fueron filtradas (0.45  $\mu\text{m}$ ) e inyectadas en el HPLC-ESI-EM/EM.

### 2.6.3. - Cuantificación de pigmentos lipofílicos por HPLC

Las determinaciones para cuantificar contenido y perfil de pigmentos de los frutos se realizaron por cromatografía líquida de alta rendimiento con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) en un equipo Agilent Technologies 1200 Series. Se utilizó una columna de fase reversa C18 (agilent eclipse plus c18, de 5  $\mu\text{m}$ , 14.6 x 150mm), con detección UV a 440 nm provisto de bomba cuaternaria. Las condiciones de ensayo y fase móvil fueron las descritas por Frenich y col (2005) y Torres y Andrews (2006) (59) (60). Los criterios de identificación de los compuestos individuales fueron los tiempos de retención y los espectros de masa de los iones obtenidos respecto a estándares comerciales.



## 2.7. - Técnicas empleadas sobre el modelo *in vivo* *C. elegans*

### 2.7.1. - Cepas de *C. elegans* utilizadas

Las cepas de *C. elegans*: N2 (Bristol *wild-type*, gusanos silvestres); ZG31 *hif-1(ia4)* V; ZG596 *hif-1(ia7)* V; CB1370 *daf-2 (e1370)* III; CF1038 *daf-16(mu86)* I, DA2123 *adIs2122[P<sub>lgg-1</sub>::gfp::lgg-1; rol-6(df)]II*, CL2166 *dvIs19 [(pAF15) *gst-4p* :: GFP :: NLS]* III, LG331 *gels7 [ *skn-1b* :: GFP]* y TK22 *mev-1 ( kn1 )* III, fueron obtenidas del *Caenorhabditis Genetic Center*. Todas las cepas fueron mantenidas en agar medio de crecimiento para nematodos (NGM) utilizando los procedimientos estándar detallados en el Worm Book (61).

Medio de crecimiento de gusanos: [Nematode Growth Medium (NGM)]. El NGM agar se preparó del siguiente modo: se pesaron 0.6 g NaCl, 3.4 g de agar, 0.5 g de peptona, para un volumen de 200 mL y se autoclavó 50 minutos a 121 °C (30 min adicionales para la completa disolución y el aclarado del medio). Finalizado el proceso de autoclave, se llevó a un baño caliente a 55 °C durante 20 minutos, para que descienda la temperatura. Posteriormente, bajo llama de mechero, se añadieron 200 µL de colesterol (5 mg/mL), 200 µL CaCl<sub>2</sub> 1M, 200 µL MgSO<sub>4</sub> 1M y 5 mL de tampón fosfato, siempre por este orden para evitar que se formaran precipitados, agitando bien antes de añadir cada compuesto. Luego se vertió en placas de 10 cm, intentando llenar todas por igual y sin hacer burbujas. Preferentemente se dejaron solidificar una noche a temperatura ambiente antes de utilizarlas.

Reactivos:

Bacteriological Peptone: OXOID (England) LP0037 (IVD)

Agar bacteriológico: Britania (Argentina) Lot: 259 B0101406

NaCl: Biopack art 164607 [7647-14-5].

Colesterol: Sigma, 95% lot: S67959-159 cat: C75209

### 2.7.2. - Sincronización de poblaciones

Para la sincronización y el mantenimiento de cepas limpias, se utilizó el método descrito en el Wormbook, ligeramente modificado.

Reactivos para la solución de blanqueo:

-5M NaOH

-Lavandina comercial (NaClO)

-Tampón salino M9: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6 g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g, NaCl 5 g, llevar a Vf (1000 mL) con agua mili Q y esterilizar. Luego del esterilizado agregar 1 mL de MgSO<sub>4</sub> 1M.

Se mezclaron 7:2:1 partes de reacción de H<sub>2</sub>O miliQ-NaClO-NaOH 5 M (la solución debe ser preparada justo antes de llevar a cabo la sincronización), para una placa de 80 mm se utilizaron 10 mL de solución de blanqueo. Se agregaron 5 mL de la solución a la placa de adultos L4 con algunos huevos visibles, y se realizaron lavados con una pipeta para intentar levantar todos los huevos posibles. Se recolectó el líquido de lavados en un tubo plástico de 15 mL y se repitió el procedimiento con los 5 mL restantes. Se agitó bien el tubo con los gusanos adultos y los huevos utilizando un vortex. Se realizaron 5 ciclos de agitación (10 s) espaciados cada un minuto. Este tiempo establecido, es suficiente para que los nematodos grávidos se disuelvan, pero no lo suficiente para que los huevos se vean afectados.

Al finalizar el ciclo de agitado, el tubo con la solución y los huevos, fue centrifugado a 1400 rpm por 1 minuto para que todos los huevos y restos se depositaran en el fondo. El sobrenadante fue descartado y el pellet fue lavado dos veces con agua miliQ y una vez con tampón salino M9 para eliminar los restos de hidróxido y lavandina que pudieran quedar. Finalmente, el precipitado que contenía los huevos, se sembró sobre una nueva placa de NGM limpia, con un pasto de *E. coli* ya desarrollado, cuidando de no sembrar un número excesivo de huevos que luego pudiera afectar el desarrollo de la población.

### 2.7.3. - Cepa bacteriana, crecimiento y condiciones de ensayo

El inóculo de *E. coli* OP50 fue desarrollado en medio Luria-Bertani (LB) a 37 °C. El césped Bacteriano usado para el mantenimiento de *C. elegans* fue preparado esparciendo 500 µL de un inóculo de la cepa bacteriana desarrollado durante la noche en placas de agar NGM de 10 cm de diámetro. El inóculo fue colocado en el centro de la placa para que, durante el desarrollo, los gusanos permanezcan dentro de la comida. Si el sembrado de la bacteria se realiza cerca del borde, los gusanos tendrían más posibilidades de salir del agar, perderse por los bordes de la placa y morir (61).

Las placas fueron incubadas durante toda la noche a 37 °C en una estufa de cultivo y posteriormente enfriadas a temperatura ambiente antes de ser utilizadas. El inóculo bacteriano utilizado para los ensayos de estrés térmico con *C. elegans* fue concentrado hasta una absorbancia de 1,7 (OD<sub>660nm</sub>= 1,7) e inactivado a 65 °C durante 30 minutos. Una vez que la bacteria fue inactivada, 100 µL fueron adicionados a placas de agar NGM y enfriadas hasta 20 °C antes de ser utilizadas. La inactivación de la bacteria, aseguró que la concentración de la fuente de alimento no presentara variaciones entre placas y además evita interacciones extra en el momento en que los compuestos tienen contacto con la bacteria.

Reactivos: Tryptone: OXOID (England) LP0042 (IVD)

Bacto yeast extract: OXOID (England) LP0021 (IVD)

NaCl: Biopack art 164607 [7647-14-5]

#### 2.7.4. - Ensayo de estrés térmico

El efecto biológico de los extractos de tomate, o sus componentes puros fue evaluado a través del aumento de la resistencia o sobrevivencia de los nematodos frente a una condición de estrés térmico. El tratamiento de estrés térmico, es un ensayo rápido, sencillo y de buena reproducibilidad, apto para demostrar los efectos biológicos producidos por compuestos y extractos tanto hidrofílicos como lipofílicos sobre el modelo. Las adaptaciones y mejoras del modelo, permitieron mantener controladas la mayor cantidad de variables y analizar exclusivamente el efecto de los aditivos de interés.

Todas las cepas de *C. elegans* fueron mantenidas en placas de Petri con agar NGM a 20 °C. Luego de 4 días (1 generación), las cepas fueron sincronizadas y limpiadas de cualquier contaminante usando el protocolo anteriormente descrito. Tres días después de la eclosión de huevos, 20 - 30 gusanos jóvenes adultos sincronizados fueron pasados a placas de ensayo de 3.5 cm de diámetro con agar NGM y alimento, donde el compuesto de interés a evaluar fue previamente adicionado.

Luego de un período de incubación de 18 h a 20 °C, las placas de ensayo se sometieron a 37 °C durante un período de 4 horas y 15 minutos (tiempo necesario para observar una mortalidad del 50% de la población en la placa control). Una vez que el tratamiento térmico finalizó, las placas de ensayo retornaron a 20 °C durante un tiempo de

recuperación de 18h (Figura 3). Finalmente, la supervivencia de los nematodos fue evaluada aplicando un estímulo suave con un ansa de vidrio para gusanos. Los gusanos que no respondieron al estímulo fueron contados como muertos. El resultado obtenido en porcentaje de supervivencia post estrés, finalmente fue relativizado con el valor obtenido para la placa control y se realizó un ANOVA mediante el uso del programa estadístico Infostat para determinar la existencia de diferencias significativas entre tratamientos. Para realizar estos ensayos de actividad biológica, los compuestos fueron disueltos en DMSO para su almacenamiento en frío y redisueltos en concentraciones seriadas antes de ser utilizados. El grupo denominado control, poseía la misma concentración de disolvente que las muestras del grupo tratamiento. La concentración final de DMSO no excedió el 2% y no causó ningún efecto *per se* en la población.

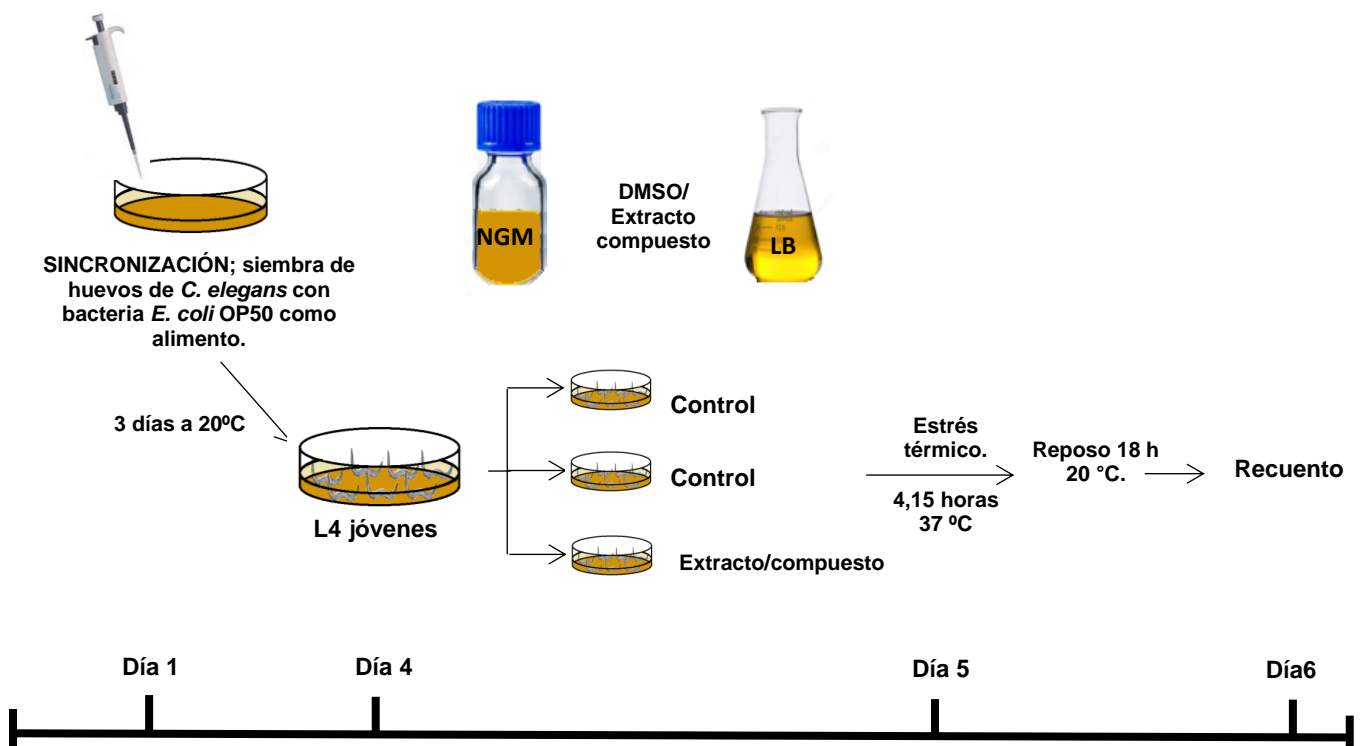


Figura 3: Esquematización del ensayo de estrés térmico.

#### 2.7.4.1 –Utilización de compuestos hidrofílicos:

Por la naturaleza hidrofílica de los compuestos presentes, las diferentes diluciones pudieron ser adicionadas a las placas de ensayo junto con el agar NGM en el mismo momento en que se conformaban las placas (Figura 4). Por las características propias de la cutícula que rodea al nematodo y gracias a trabajos anteriores, se conoce con certeza que los compuestos agregados en el agar de ensayo llegan a ser incorporados por el gusano (62).

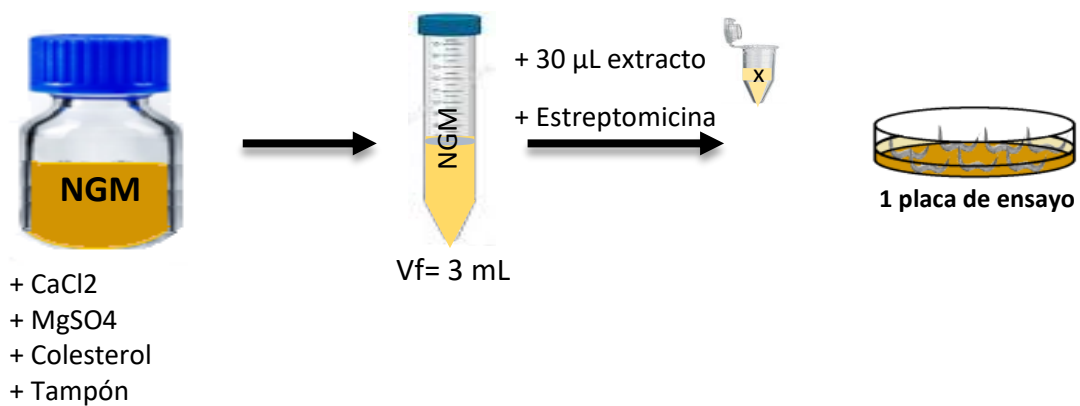


Figura 4: Esquema del procedimiento de incorporación de aditivos hidrofílicos en las placas de ensayo.

#### 2.7.4.2 –Incorporación de compuestos lipofílicos en el ensayo:

Por la naturaleza lipofílica de los compuestos contenidos en el extracto lipofílico, y los reportes sobre la afinidad que tienen con los materiales plásticos, la adición de las diluciones se llevó a cabo sobre la bacteria utilizada como alimento para los gusanos (Figura 5), en lugar de agregarlo en las placas de ensayo.

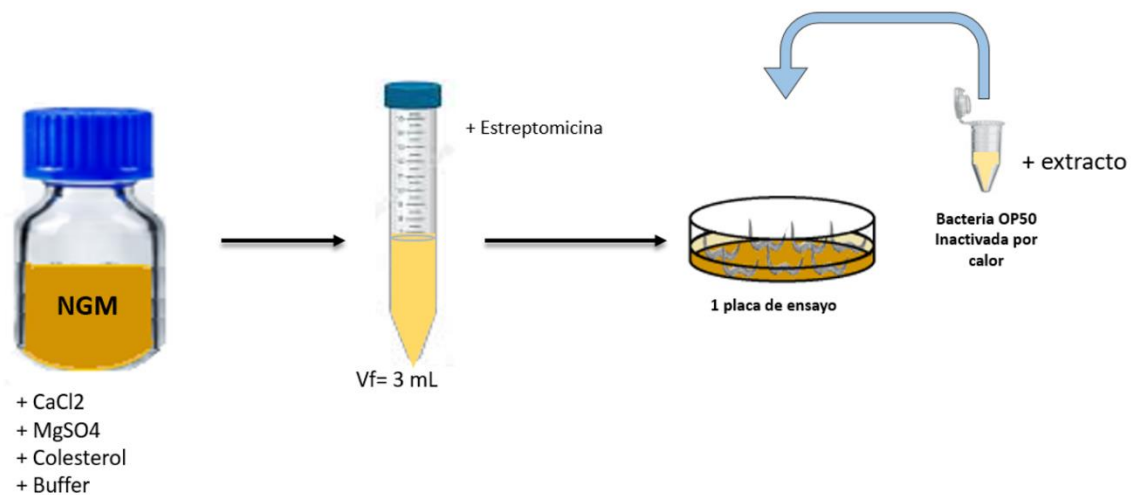


Figura 5: Esquema del procedimiento de incorporación de aditivos hidrofílicos en las placas de ensayo.

#### 2.7.4.3 Diagrama de disolución de extractos

**Extractos hidrofílicos:** Para llevar a cabo los ensayos de actividad biológica, se conformó un *pool* con los frutos pertenecientes a un mismo cultivar, utilizando volúmenes equivalentes de cada muestra. De este procedimiento se obtuvo una nueva muestra de volumen final= 1 mL que representaba al cultivar completo.

La muestra final (conformada por 3 frutos), fue llevada a sequedad bajo el flujo de N<sub>2</sub> gaseoso, y posteriormente el residuo seco fue redisoluto en 200 µL de DMSO. De esta manera se obtiene la concentración cero (0) (Figura 5).

**Extracto lipofílico:** Para cuantificar la actividad biológica de los compuestos lipofílicos, se tomó un extracto o fracciones de extracto y se secaron bajo flujo de N<sub>2</sub> gaseoso. Una vez obtenido el residuo seco (a partir de 300 µL originales), se resuspendió en 100 µL de DMSO. Este primer eppendorf se denominó concentración 0, y se realizaron diluciones sucesivas 1/10 hasta llegar al tubo n°5 en DMSO. (Figura 6)

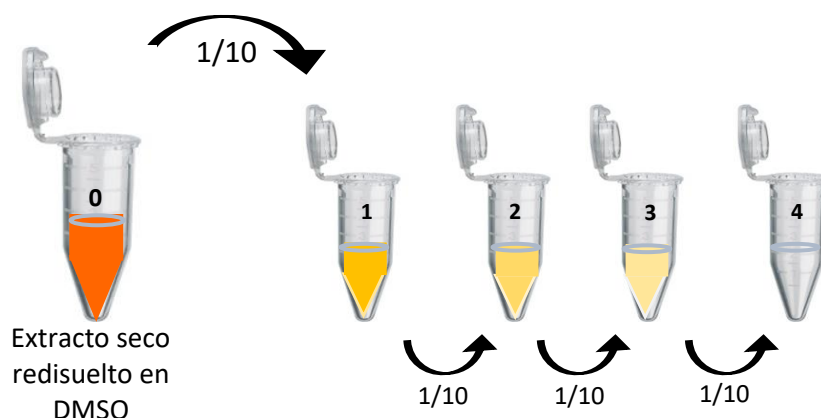


Figura 6: Esquema de obtención de dosis para realizar el ensayo de actividad biológica

#### 2.7.5. - Inducción de HIF-1

Para la inducción de HIF-1, una población de gusanos sincronizados fue mantenida a 20 °C hasta el estadio larval joven adulto (L4). Luego los gusanos fueron incubados a 25 °C durante 18 h, la cual es una temperatura ligeramente mayor a la óptima recomendada para el desarrollo de los nematodos, generando una condición de estrés no letal (63) o bien fueron transferidos a nuevas placas de agar NGM conteniendo 100 µM de  $\text{CoCl}_2$  [Carlo Erba (Milano, Italia), p.a.], el cual generó en los nematodos un estado de hipoxia química y la posterior estabilización de HIF-1 (64).

#### 2.7.6. - Utilización de ARN de interferencia

En el nematodo, *C. elegans*, el uso de ARNi es particularmente fácil y efectivo porque puede administrarse simplemente alimentando a los gusanos con bacterias que contienen los plásmidos (con ARNdc complementario al gen de interés). La bacteria *E. coli* que contenga el plásmido deseado, puede utilizarse para alimentar nematodos, y el ARNdc se transfiere mediante el tracto intestinal. Los plásmidos ARNi consisten de una secuencia codificante para ADN del gen deseado, entre dos promotores T7. El plásmido también tiene un marcador selectivo que confiere resistencia contra un antibiótico, por ejemplo, contra ampicilina (Figura 7).

Los experimentos llevados a cabo de ARNi se realizaron alimentando a los nematodos con bacteria donde fue incorporado el vector con el ARNdc contra los genes de interés (y la muestra control incorporó una bacteria que posee un vector vacío [L4440]). La

bacteria transformada con los vectores apropiados fue crecida durante toda la noche a 37 °C en medio LB y posteriormente sembradas en placas con agar NMG que contenían el antibiótico ampicilina (100 µg/mL) para evitar la generación de bacterias contaminantes. El inicio del promotor fue inducido por adición de 1 mM isopropylβ-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG; Sigma) en el medio, y posteriormente los huevos obtenidos mediante sincronización fueron adicionados sobre este césped bacteriano. Los clones de ARNi fueron obtenidos de Ahringer's RNAi library (65).

Los gusanos a los que se les efectuó ARNi fueron desarrollados en placa a 20 °C durante 3 días y en el cuarto día, al comienzo del estadio L4, fueron pasados hacia las placas de ensayo e incubados durante 18 h y sometidos a estrés térmico. En las placas de ensayo, el pasto de bacteria fue generado a partir del mismo inóculo de bacteria que contiene el vector, que fue utilizado para desarrollar la población de gusanos.

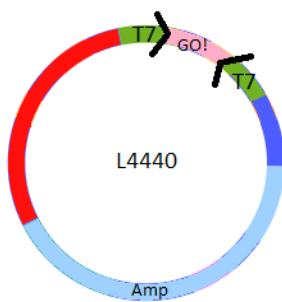


Figura 7: Mapa del vector L4440 vector comúnmente utilizado para experimentos para ARNi en *C. elegans*. Un fragmento del gen de interés (GOI) es amplificado por PCR y clonado dentro del vector L4440 doble T7, el cual tiene dos promotores T7 en orientaciones invertidas flanqueando el sitio de clonado múltiple. Los plásmidos clonados son transformados dentro de HT115, una cepa de *E. coli* deficiente en ARNasa con la expresión inducible de la polimerasa T7 por IPTG. Adaptado de <https://www.addgene.org/1654/>.

#### 2.7.7. - Extracción de proteínas y análisis de *Western blot*

Para preparar el extracto total de gusanos, los nematodos fueron lavados de las placas de ensayo utilizando dodecilsulfato sódico (SDS), [US BIOLOGICAL CORP. Lot: L1022105M (Bs as)] al 1% frío. Luego de una centrifugación a 8000 rpm, el pellet de gusanos fue resuspendido en tampón salino de lisis [NaCl 137 mM, Tritón-Tris 20 mM pH: 8, glicerol 10 %, EDTA 2 mM], junto con el agregado de un inhibidor de proteasas (PMSF) y sonificado durante 20 seg. Luego de la incubación en hielo durante 20 min, las muestras fueron centrifugadas y las proteínas cuantificadas por el ensayo de ácido Bicinconínico (BCA) [Pierce™ PCA Protein Assay Kit Lot# SE248349 Thermo Scientific (USA)]. Luego de la adición del tampón salino de muestra [SDS Tris-HCl 1 M, pH 6.8, glicerol 50 %, azul de bromofenol 1 %] 5x y ditiotreitól 50mM (DDT), el extracto de



proteínas fue desnaturalizado por 10 min a 95 °C y separado por electroforesis en gel de poliacrilamida 10 % con 1 % SDS. Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa a 110 V durante 60 min a 4 °C. Estas membranas fueron incubadas con leche en polvo 5 % (p/v) en TBS-Tween 20, 0.1 % (TBS-T20) por 2 h, lavadas dos veces con TBS, dos veces con TBS-T20 e incubado con los anticuerpos primarios anti-c-myc tag [ratón (1/1000)] durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, las membranas fueron incubadas con un anticuerpo secundario [anti-ratón (1/2500)] durante 2h a temperatura ambiente. Para determinar la carga de proteínas se utilizó un anticuerpo anti-actina de cabra (sc- 1616 Santa Cruz). Las bandas de proteínas fueron escaneadas y analizadas densitométricamente utilizando un software de imágenes (UVP Vision Work s LS Image Acquisition and Analysis Software).

#### 2.7.8. - Extracción de ARN, transcripción reversa y PCR a tiempo real

El ARN total fue aislado utilizando TRIzol sobre poblaciones sincronizadas de gusanos L4 (estadio adulto) previamente sometidos a una incubación de 18 h con ACG. La transcripción reversa fue desarrollada utilizando el kit de síntesis iScript DNAc (Bio-Rad, CA, USA) utilizando 2 µg de ARN por muestra. Los experimentos de qPCR tiempo real fueron desarrollados de acuerdo a las instrucciones del fabricante, como se describe en el manual StepOnePlus para el sistema de detección iCycler iQ™ Real-Time PCR (Bio-Rad). Los productos de PCR fueron amplificados utilizando los siguientes primers: gen act-2, FP: GCGCAAGTACTCCGTCTGGATCG RP: GGGTGTGAAAATCCGTAAGGCAGA, gen k10h10.2 FP: TGCTGAGGTGATTCTTACCG RP: TAATGGGCTTCTGGATTTC

#### 2.7.9. - Medición de las especies reactivas de oxígeno (EROs)

Los nematodos bajo condiciones de control o con previa incubación con ACG fueron transferidos a 0.5 mL de tampón salino M9 conteniendo 5 µM de la sonda CM-H2DCFDA (un derivado clorometílico de H2DCFDA -Sigma-Aldrich, USA) y preincubados por 3 h a 20 °C. Esta sonda resulta útil como indicadora de las EROs en las células. La sonda utilizada ingresa pasivamente en las células, donde las esterasas intracelulares escinden los grupos acetato. La oxidación posterior, gracias a las especies reactivas presentes,

produce un aducto fluorescente que queda atrapado dentro de la célula, por lo que facilita los estudios a largo plazo.

Para la determinación de las EROs, se llevaron a cabo dos procedimientos diferentes.

**Determinación por microscopio:** Luego de la incubación, los nematodos fueron montados sobre una fina capa de agar 5 % en 15  $\mu$ L de tampón salino M9 conteniendo 0.1 % de  $\text{NaN}_3$  (Sigma-Aldrich) (Monica Driscoll technique) y fueron examinados bajo un microscopio de fluorescencia (FV1200 Laser Scanning Microscopes) utilizando filtros de 480/40 y 535/50 nm para excitación y emisión respectivamente. Los niveles de fluorescencia fueron analizados utilizando software de imagen (ImageJ) mediante la determinación de la intensidad/píxel promedio en cada animal. La intensidad de fluorescencia relativa de cada gusano fue semicuantificada. Las EROs semicuantificadas fueron expresadas como unidades relativas de fluorescencia en relación al control (URF).

**Medición por lector de microplaca:** después de la pre-incubación, 50  $\mu$ L de tampón salino M9 con sonda y aproximadamente 150 nematodos fueron colocados en una placa de 96 pocillo y leídos con un lector microplaca fluorescente (Biotek) utilizando filtros de 480/40 y 535/50 nm para excitación y emisión respectivamente. Las EROs cuantificadas fueron expresadas como el incremento de la fluorescencia en una hora en relación al control por cada gusano. Para realizar esta última relación fue necesario realizar el recuento de nematodos por pocillo.

#### 2.7.10. - Cuantificación de autofagia

LGG-1 es el ortólogo en *C. elegans* de LC3 de mamíferos y se utiliza comúnmente como marcador de autofagia (66). Para estudiar la autofagia en nematodos vivos, se generó un marcador visual de autofagia utilizando gusanos transgénicos que expresan la proteína LGG-1 fusionada con GFP (67). En este trabajo la cuantificación in vivo de autofagosomas se consiguió por el conteo de puntos densos (GFP:LGG-1) en las células hipodermales *seam cell* de la cepa DA2123. Para realizar el recuento de puntos, se utilizaron: gusanos L3 provenientes del tratamiento con ARNi, que fueron incubados con ACG o gusanos que fueron sometidos a estrés hormético. Los gusanos post tratamiento fueron montados sobre una fina capa de agar 5 % y examinados con un microscopio de fluorescencia (FV1200 Laser Scanning Microscopes) utilizando filtros de 480/40 y 535/50 nm para excitación y emisión respectivamente. Finalmente, el recuento se llevó a cabo

utilizando el software de imágenes ImageJ. Con fines estadísticos, se observaron entre 10 y 20 nematodos por tratamiento.

#### 2.7.11. - Cuantificación de la expresión de SKN-1

SKN-1 es el ortólogo en *C. elegans* de Nrf-2. Cuando este factor de transcripción está fusionado a una proteína fluorescente verde, como en la cepa LG331 (gels7 [skn-1b::GFP]), los nematodos pueden ser utilizados para la evaluación *in vivo* de la inducción de dicho factor de transcripción. En este trabajo la cuantificación de SKN-1 se llevó a cabo analizando la fluorescencia total de los nematodos incubados durante 72 h con los compuestos de interés. Para obtener las imágenes se utilizó un microscopio Leica DMI 8, con cámara Leica monocromática, platina motorizada y software Las-X. Las imágenes obtenidas fueron analizadas utilizando el software de imágenes ImageJ. Con fines estadísticos, se cuantificó la fluorescencia de al menos 10 gusanos por tratamiento.

#### 2.7.12. - Condición de hormesis térmica para cuantificación de autofagia

Una parte de los nematodos que fueron generados mediante el uso de ARNi y que fueron incubados con DMSO cuando alcanzaron el estadio larval L3, fueron sometidos a 36 °C durante 1h antes de ser colectados y colocados sobre el *pad* de agar, para la posterior observación en microscopio.

Esta breve incubación a una temperatura letal es estímulo suficiente para incrementar la presencia de autofagosomas en los nematodos (68).

#### 2.7.13. - Cuantificación de actividades enzimáticas

**Superóxido dismutasa (SOD):** Esta enzima existe en todos los seres vivos aeróbicos. Su principal función es catalizar la reacción de dismutación del radical superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno. (69)

**Catalasa:** Es la mayor defensa antioxidante que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno, generada por la SOD. Comparte esta función con la glutatión peroxidasa. (26) (24) (70) (27) (71) (72).

**Catalasa:** La actividad de la enzima catalasa fue medida en gusanos utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como sustrato, inmediatamente después de la extracción de enzimas. Para la extracción de enzimas se utilizó un protocolo de Bertrand y col, (2016) (73) ligeramente modificado.

Descripción breve del método: una población de aproximadamente 60000 gusanos en placas de NGM fue lavada con tampón salino M9 y centrifugada. El pellet de gusanos fue homogeneizado en un homogeneizador de vidrio utilizando 600  $\mu\text{L}$  de tampón salino de ruptura/extracción frío [PBS 80ml 0.1M pH: 6.5, glicerol 20 mL, DTE 0.022 g, EDTA 0.045 g]. Luego de la centrifugación durante 10 min, 5500 rpm a 4 °C, el sobrenadante fue separado y conservado (extracto enzimático). Del extracto resultante, 30  $\mu\text{L}$  fueron incubados con 200  $\mu\text{L}$  con solución de reacción [TRIS base 50.5 mM, EDTA 0.25 mM y  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.01 mM]. La absorbancia fue determinada a 240 nm utilizando un lector microplaca (Biotek).

Superóxido dismutasa: La actividad de la enzima SOD fue determinada utilizando el método de reducción fotoquímico cloruro de nitrotetrazolio-azul. La reacción comenzó con 30  $\mu\text{L}$  de metionina 47.7 mM, nitrotetrazolio-azul 10  $\mu\text{L}$  0.82 mM en PSB, EDTA 30  $\mu\text{L}$  0.37  $\mu\text{M}$  y 30  $\mu\text{L}$  de riboflavina 7.33  $\mu\text{M}$ , que fueron adicionados al extracto de enzimas, en presencia de luz (20 W). Después de 30 min de incubación, la absorbancia fue determinada a 595 nm.

La actividad de ambas enzimas fue calculada en términos de contenido de proteínas, y las proteínas fueron cuantificadas utilizando el método de Bradford.

Para evaluar el efecto de ACG sobre ambas enzimas, los nematodos fueron incubados con ACG 1,4  $\mu\text{M}$  durante 18 h en placas a 20 °C y luego se procedió a obtener el extracto de gusanos.

La actividad de catalasa fue reportada como nanokatales por miligramo de proteína (nKat mg prot<sup>-1</sup>), donde un nKat es la conversión de 1 nmol de sustrato por segundo. La unidad de actividad de SOD fue definida como la cantidad de enzima requerida para causar el 50 % de inhibición en la reducción de nitrotetrazolio-azul. Los resultados se relativizan con los valores obtenidos para el control (DMSO).

#### 2.7.14. - Análisis estadísticos y obtención de gráficos

Las curvas de calibración utilizadas en los ensayos de cuantificación fueron elaboradas en Excel, donde se obtuvo la gráfica correspondiente, la ecuación de la recta y R. Los análisis estadísticos multivariados y análisis de correlaciones fueron llevados a cabo con el Software Infostat. Los datos obtenidos en ensayos fueron relativizados con el control

y expresados como la media de las réplicas  $\pm$  DS (desviación estándar) y las diferencias significativas fueron encontradas utilizando el test ANOVA con  $p < 0.05$  en todas las comparaciones. Se llevaron a cabo al menos 3 réplicas de cada tratamiento.





## **CAPITULO 3**

### **ANTIOXIDANTES**

# **HIDROFÍLICOS DE TOMATE: COMPUESTOS FENÓLICOS**





## CAPÍTULO III: ANTIOXIDANTES HIDROFÍLICOS DE TOMATE: COMPUESTOS FENÓLICOS

### 3.1. - Introducción

Todas las especies de tomate son nativas del oeste de Sudamérica (1). Aquí los agricultores locales han seleccionado y mantenido diversas variedades autóctonas de tomate de la especie cultivable *S. lycopersicum*. Los tomates cultivados de dichas variedades comprenden un recurso valioso para la reproducción debido a su variación genética.

Desde 2004, las variedades autóctonas de tomate argentino, cultivadas en los valles andinos del centro y noroeste, se han recolectado, evaluado y conservado en el Banco Nacional de Germoplasma como un recurso de dominio público (74) (1). La selección durante la domesticación del tomate ha contribuido a reducir la diversidad genética en este cultivo (75). Por lo tanto, las especies silvestres junto con las variedades autóctonas que no han sido sometidas a procesos de mejoramiento, son una fuente invaluable de compuestos beneficiosos para el estudio de los efectos nutraceuticos. El tomate es ampliamente consumido alrededor del mundo y su consumo es considerado beneficioso para la salud, por reducir el riesgo de padecer múltiples enfermedades crónicas como las enfermedades cardiovasculares, y ciertos tipos de cáncer (76) (77).

Las propiedades antioxidantes de la mayoría de los productos naturales se atribuyen principalmente a la capacidad de neutralizar radicales libres, debido a la habilidad de donar los átomos de hidrógeno de los grupos hidroxilos presente en su estructura de anillos aromáticos, la capacidad de atrapar radicales libres, funciones como agentes quelantes y la inducción de enzimas antioxidantes (78) (79) (80) (81). En el tomate la actividad antioxidante es producida por numerosos compuestos de diversa naturaleza química con baja o alta solubilidad en medio acuoso. El licopeno es el pigmento principal que se encuentra en los frutos rojos y maduros de tomate. El licopeno es un antioxidante lipofílico carotenoide que ha sido asociado con varios beneficios para la salud y por esta razón, numerosos trabajos se han enfocado en evaluar sus propiedades biológicas y en la producción de frutos con mayores contenidos del mismo (82). Sin embargo, el fruto de

tomate posee otros numerosos y no menos importantes compuestos antioxidantes. Entre los compuestos hidrofílicos, el fruto del tomate posee múltiples compuestos fenólicos (flavonoides y ácidos fenólicos) que contribuyen a conformar una dieta saludable, ya que pueden proteger contra las enfermedades cardiovasculares mediante su efecto antiplaquetario y su capacidad de incrementar la concentraciones de HDL en sangre (83) (35).

Se han aplicado varios métodos *in vitro* para evaluar la capacidad antioxidante en los frutos de tomate (84) (85). Sin embargo, estos ensayos de capacidad antioxidante no reflejan necesariamente las condiciones fisiológicas celulares ni consideran el proceso de absorción, la biodisponibilidad de los compuestos y los procesos metabólicos y por eso los modelos de cultivo de células de mamíferos se han desarrollado para apoyar la investigación de antioxidantes antes de la evaluación en modelos animales *in vivo* y en ensayos clínicos en humanos (86). Estos ensayos de cultivo celular son más simples que los modelos animales, pero, solo abordan aspectos bioquímicos y moleculares parciales de la capacidad antioxidante. El invertebrado *C. elegans* ofrece un modelo experimental de preferencia en relación al cultivo celular ya que es un organismo completo que posee un sistema digestivo simple y fácil manipulación (87).

Basado en estos antecedentes, el objetivo desarrollado en este capítulo fue evaluar las potenciales propiedades nutraceuticas de la fracción hidrofílica de los extractos correspondientes de las variedades locales de tomate recolectadas en los valles andinos argentinos e identificar los principales compuestos antioxidantes, responsables de estas propiedades. Para ello, se evaluó la composición, contenido y actividad biológica de 11 variedades autóctonas de tomate andino en comparación con 3 cultivares comerciales y 2 especies pertenecientes al género *Solanum* (ver tabla I, capítulo II, materiales y métodos). En primer lugar, se midió el contenido total de compuestos fenólicos, y luego se llevó a cabo el análisis de la composición de polifenoles con HPLC-ESI-QTOF. En segundo lugar, las capacidades antioxidantes del tomate fueron caracterizadas por métodos *in vitro*. Finalmente, se evaluó la actividad biológica *in vivo* de los extractos del fruto en términos de su capacidad para conferir tolerancia al estrés térmico en un modelo de *C. elegans*.

### 3.2. - Cuantificación de antioxidantes en la fracción hidrofílica

#### 3.2.1. - Contenido total de compuestos fenólicos

La determinación del contenido total de compuestos fenólicos (CF) fue realizada siguiendo el método de *Folin-Ciocalteu* sobre los extractos hidrofílicos obtenidos a partir de frutos de tomate. El procedimiento de obtención de extractos y el método están desarrollados en el capítulo II de materiales y métodos (página 24). El contenido medio de CF arrojó un rango de valores entre 37 y 147 mg/100 g de tomate (Figura 1). Las especies silvestres *S. habrochaites* y *S. pimpinellifolium* (#407 y #4739 respectivamente) mostraron el mayor contenido de CF en comparación con todas las accesiones de *S. lycopersicum*. La proporción de CF en estas especies concuerda con lo reportado por Kavitha y col, 2014 (88). Sin embargo, en ese estudio, los contenidos de antioxidantes reportados para cultivares comerciales y especies silvestres fueron más bajos que los obtenidos en esta investigación (4 a 25 mg / 100 g para CF). Entre las accesiones de *S. lycopersicum*, la accesión autóctona andina # 572 mostró los niveles más altos de CF, que fueron equivalentes a los valores detectados en las especies silvestres. Por el contrario, la accesión # 3842 tenía los niveles más bajos de CF.

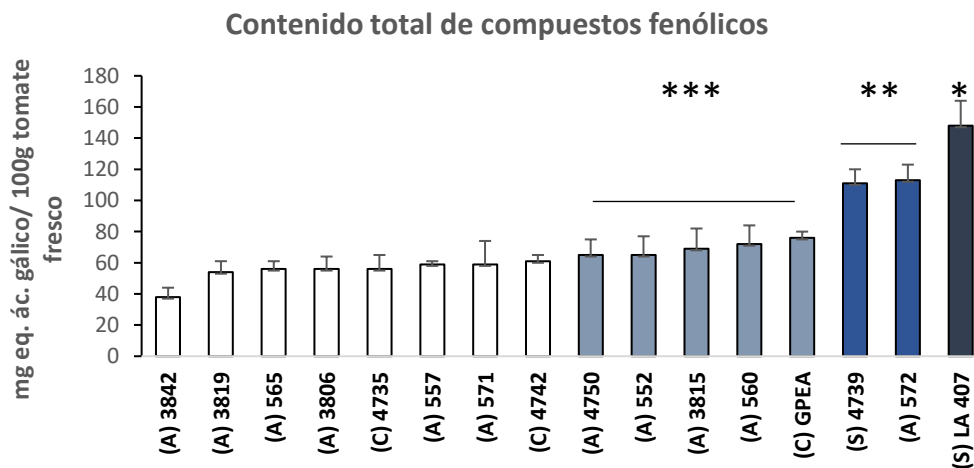


Figura 1: El contenido total de compuestos fenólicos es expresado como mg de ácido gálico por cada 100 g de tomate fresco. Accesiones autóctonas (A), accesiones silvestres (S) y accesiones comerciales (C). Colores diferentes y (\*) para los diferentes cultivares, indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ , Scott and Knott test).

### 3.3. - Composición fenólica de las accesiones de tomate

Además de cuantificar el contenido total de compuestos fenólicos en cada muestra de tomate, fue necesario hacer una identificación de los compuestos presentes.

Los extractos hidrofílicos de tomate se analizaron por HPLC-DAD-EM/EM, de acuerdo con la metodología que se detalló en el capítulo II de materiales y métodos (página 25). Se identificaron 16 compuestos fenólicos de acuerdo con sus tiempos de retención, datos de patrones de fragmentación (espectrometría de masas), comparación con los estándares disponibles (ANEXO I, pág. 129) y datos de espectros UV-visible (tabla I). Todos estos compuestos ya habían sido reportados en tomate con anterioridad (89) (90) (91) (92). El ácido clorogénico (ACG), y la Rutina fueron los componentes más abundantes. Además, otros compuestos cafeoilquínicos como el ácido Criptoclorogénico (criptoACG) ácido Neoclorogénico (neoACG), un isómero del ácido Clorogénico (ACGisómero) y ácido trihidroxicinamoilquínico (TriOH-ACG), fueron también encontrados en todas las accesiones. En contraste, naringenina-chalcona estuvo presente en 14 de los 16 cultivares estudiados.

Se encontraron también compuestos correspondientes a hexosas del ácido Cafeico (CafAH) y dos ácidos cumárico-O-hexosas (CAH) los cuales pueden encontrarse como diferentes isómeros constitucionales en los tomates. Estos isómeros fueron nombrados con números consecutivos de acuerdo al orden de elución.

También fueron identificados, en todas las accesiones, el ácido cafeoilhexárico (Caf-Hex) y el ácido ferúlico-O-hexósido (FAH).

Para todos los compuestos identificados, los análisis cuantitativos fueron llevados a cabo utilizando los estándares respectivos o de derivados íntimamente relacionados de la misma familia de polifenoles (Figura 2) (ANEXO I, pág. 122).

Compuestos identificados por HLPC-DAD-EM/EM					
Pico	tR (min)	Ion molecular (M-H) <sup>-</sup> m/z	EM-EM de [M-H] <sup>-</sup> m/z	λ (mx) nm	Identificación tentativa
1	6.7	341	179-161	n.d.	Ac. Cafeoil-O-hexosa I
2	7.2	353	191-179	325	Ac. Clorogénico isómero
3	7.3	371	209-191	n.d.	AC. Cafeoil hexárico
4	11.6	353	191-179	325	Ac. Neoclorogénico (Ácido <u>5-O-cafeoilquínico</u> )
5	11.9	341	179-161-135	287-303	Ac. Cafeoil-O-hexosa II
6	11.9	325	163	287	Ac. Cumárico-O hexosa I
7	12	371	191	n.d.	Ac. Trihidroxi cinamoil quínico
8	12.1	355	193	313	Ac. Ferúlico-O-hexósido
9	12.4	341	179	n.d.	Ac. Cafeoil-O-hexosa III
10	12.4	353	191-179	325-294	Ac. Clorogénico
11	12.7	341	179-135	n.d.	Ac- Cafeoil-O-hexosa IV
12	12.8	325	163	286	Ac. Cumárico-hexosa II
13	13.3	353	191	325	Ac. Criptoclorogénico (Ácido <u>4-O-cafeoilquínico</u> )
14	13.7	341	n.d.	n.d.	Ac. Cafeoil-hexosa V
15	18.0	609	301	354	Rutina
16	24.1	271	151	366	Naringenina-chalcona

Tabla I: Listado de compuestos identificados por HLPC-DAD-EM/EM

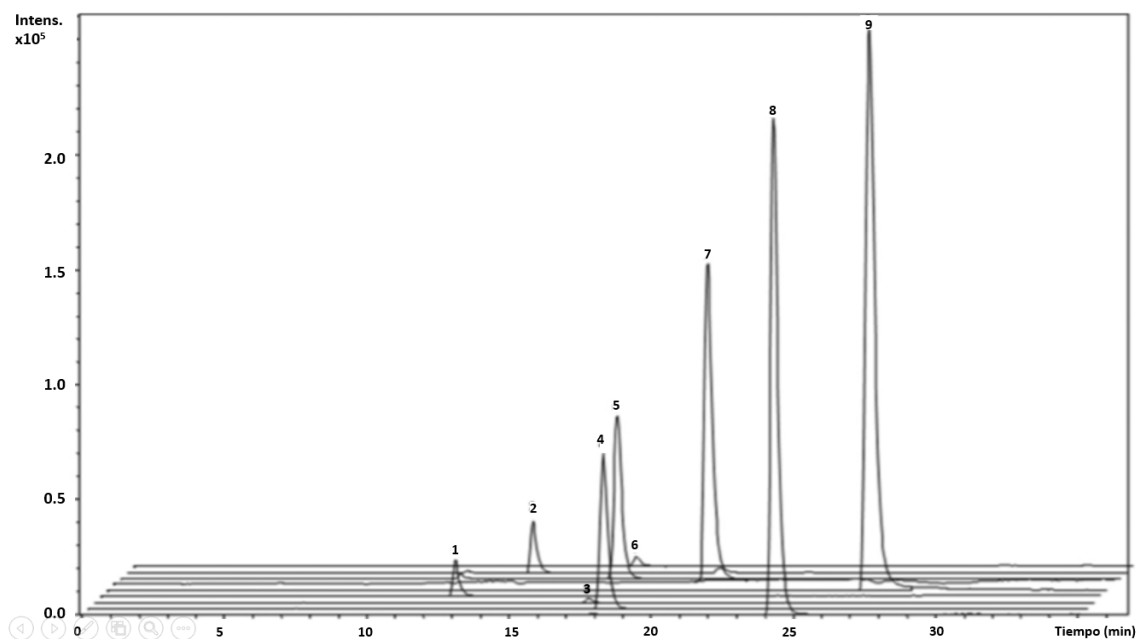


Figura 2: Cromatograma de iones extraídos a partir de compuestos fenólicos estándar. Picos: 1. Ácido Clorogénico, 2) Ácido Caféico, 3) Ácido p-Cumárico, 4) Naringina, 5) Ácido Ferúlico, 6) Rutina, 7) Miricetina, 8) Naringenina, 9) Kaempferol.

Con la identificación de dichos picos, se cuantificaron los compuestos por cada accesión utilizando las áreas y las curvas de calibración construidas con los estándares disponibles. Los compuestos fenólicos fueron expresados como mg por cada 100 g de tomate fresco (Figura 3).

**Cuantificación de compuestos fenólicos**

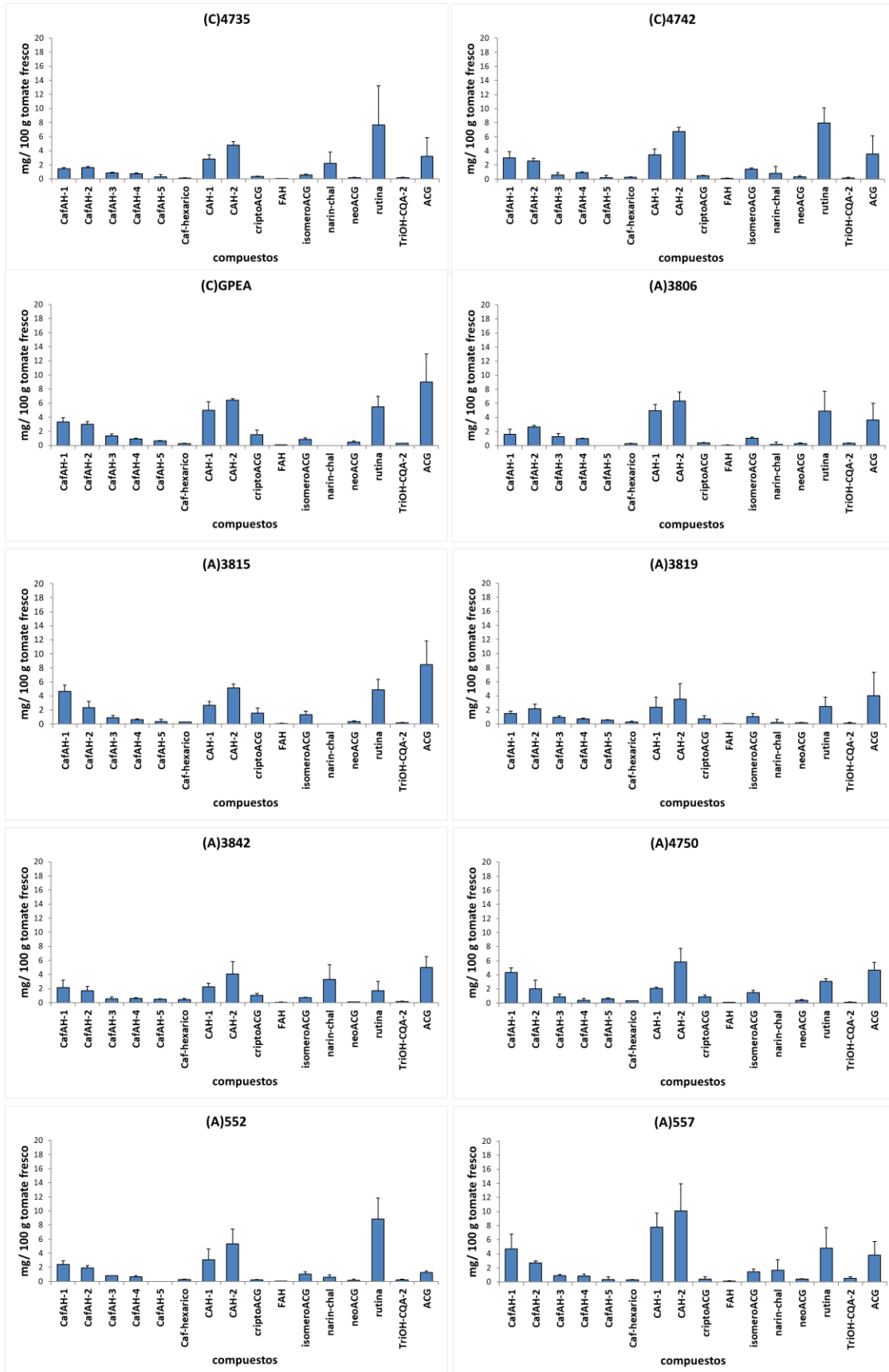


Figura 3- continúa en la siguiente página -

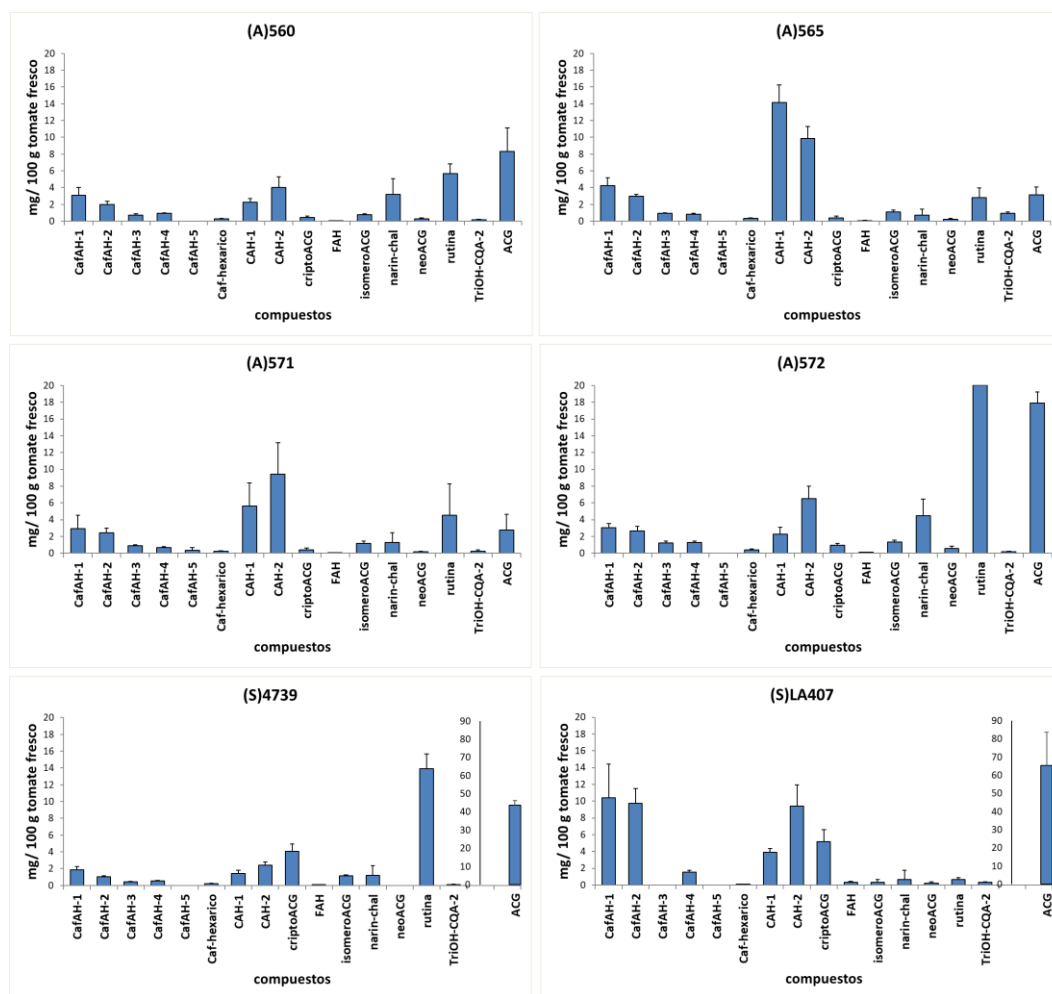


Figura 3: Composición de compuestos fenólicos en los frutos de tomate, por accesión. Los compuestos fenólicos fueron expresados como mg por cada 100 g de tomate fresco. #LA407, #4739 son accesiones silvestres (S), #4735 Y #4742 son accesiones comerciales (C) y las demás muestras son accesiones autóctonas (A).

Se puede observar en las gráficas como varía la presencia de compuestos en los diferentes frutos, por ejemplo, CafAH-5 no está presente en todas las accesiones. Por otro lado, existen diferencias en las concentraciones cuando analizamos el mismo compuesto en las diferentes muestras.

### 3.4. - Capacidad antioxidante *in vitro* de los cultivares de tomate

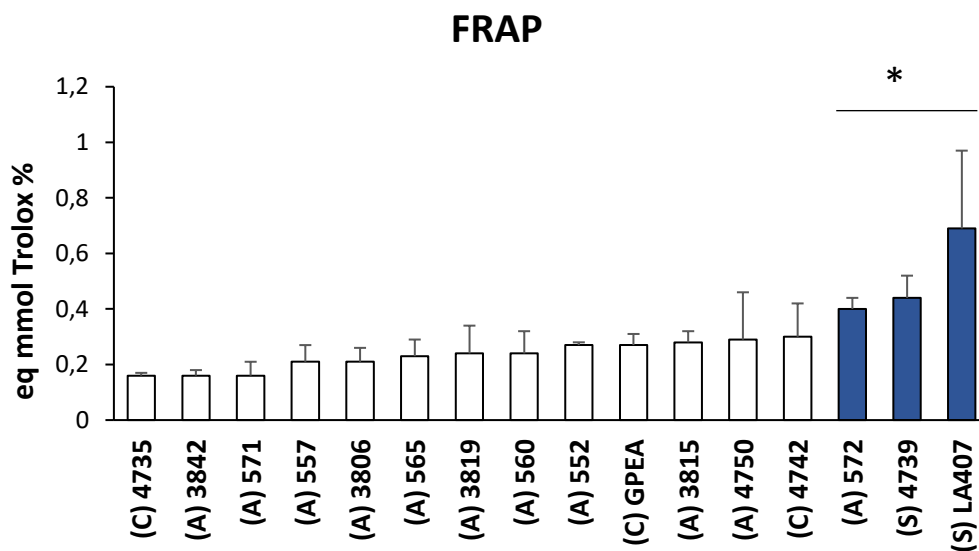
La capacidad antioxidante se midió mediante los ensayos *in vitro* FRAP (Actividad de Reducción del ion Férrico) y TEAC (Capacidad Antioxidante en Equivalentes de Trolox), métodos descriptos en el capítulo II de materiales y métodos (página 21). La Figura 4



muestra las mediciones de la capacidad antioxidante expresadas como equivalentes mM de Trolox /100 g tomate fresco. Se obtuvieron valores que van desde 0.2 mM hasta valores mayores de 1 mM de Trolox.

Las diferencias más claras en los ensayos TEAC y FRAP fueron las exhibidas por las especies silvestres en comparación con las *S. lycopersicum*, y concuerdan con los resultados reportados por Kavitha y col, (2014) (88). Los resultados obtenidos por ambos métodos mostraron que las dos accesiones de tomate silvestre (S), #4739 y #LA407, tenían la mayor capacidad antioxidante in vitro, seguidas por la accesión andina (A) # 572. Esto está de acuerdo con los altos niveles de PT anteriormente observados en estas accesiones (Figura 1).

A)



B)

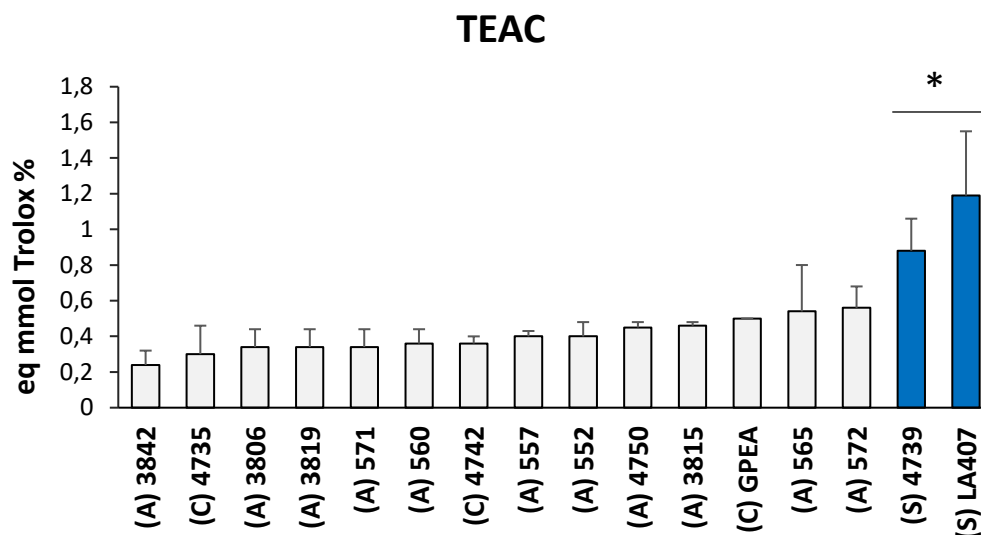


Figura 4: A) Actividades antioxidantes *in vitro* calculadas como FRAP B) Actividades antioxidantes *in vitro* calculadas como TEAC. Ambas expresadas como equivalente mmol de Trolox por cada 100g de tomate fresco. Se pueden observar accesiones autóctonas (A), accesiones silvestres (S) y accesiones comerciales (C). Colores diferentes para los diferentes cultivares y (\*) indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ , Scott and Knott test).

### 3.5. - Relación existente entre las actividades observadas

Para comprender mejor las posibles asociaciones existentes entre la capacidad antioxidante *in vitro* y la composición de antioxidantes, se llevó a cabo un análisis de correlaciones canónicas (capítulo II de materiales y métodos, página 38).

Las actividades antioxidantes *in vitro* cuantificadas se correlacionaron significativamente con el set de metabolitos ( $r = 0.83$ ,  $p < 0.0001$ ) (Figura 5 A). La correlación entre variables mostró que los compuestos fenólicos, ACG, cripto-ACG y CafAH-2 fueron los metabolitos que se correlacionaron positivamente con las actividades y por ende quienes más contribuyeron a las mismas, mientras que, por el otro lado compuestos como CafAH-3 mostraron una correlación negativa con las actividades antioxidantes *in vitro* (Figura 5 B).

A)

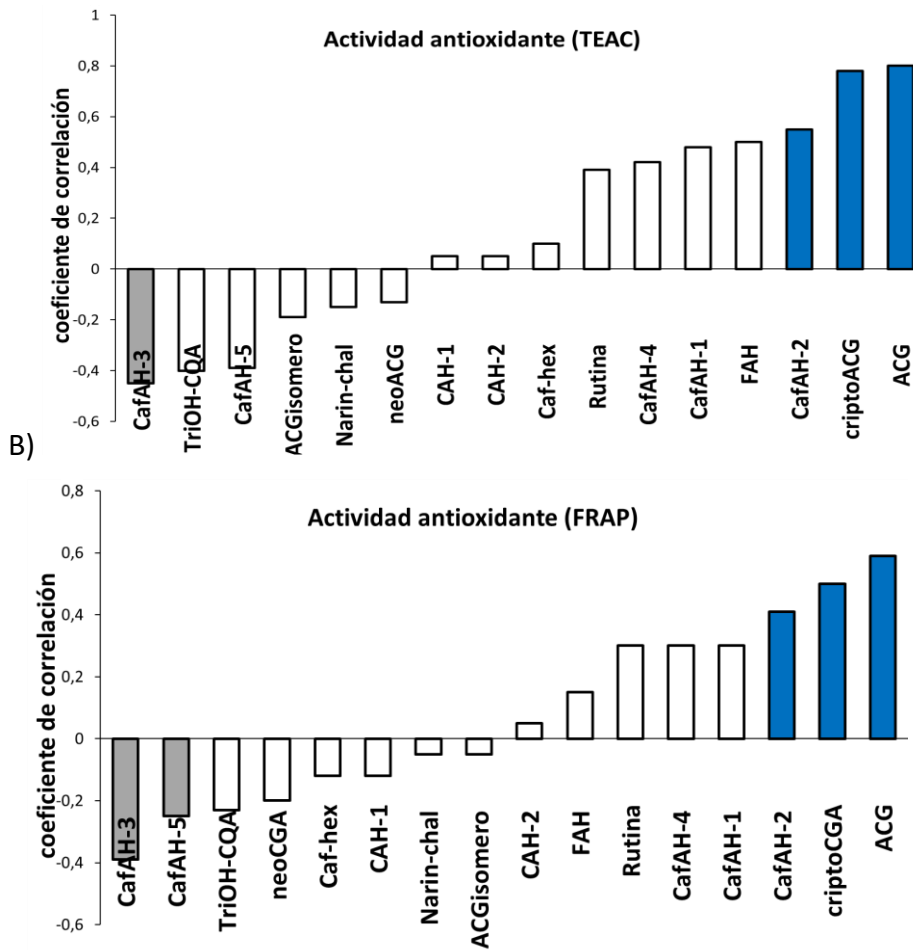
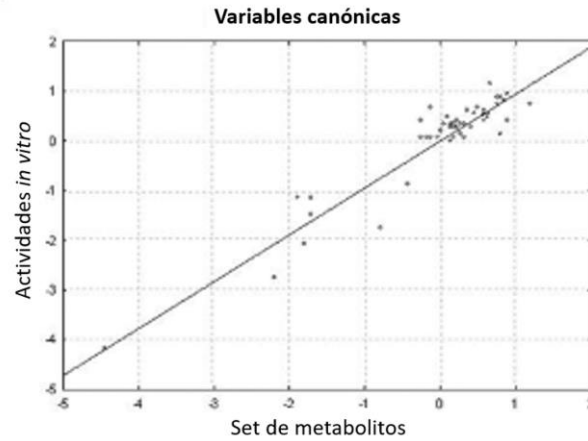


Figura 5: A) Linealidad de la correlación hallada entre metabolitos y actividades cuantificadas. B) Correlaciones halladas entre los compuestos presentes y las actividades antioxidantes cuantificadas. Las diferencias significativas entre muestras ( $p < 0.05$ , Scott y Knott test) se representan con barras de diferente color.

Los resultados obtenidos permitieron identificar: ácido clorogénico, cripto clorogénico y un ácido cafeoil-O-hexosa como los compuestos más influyentes o responsables de la actividad antioxidante *in vitro*.

### 3.6. - Ensayo *in vivo* de actividad biológica

El siguiente paso fue evaluar la actividad biológica de estos extractos, la cual se expresó como el incremento en la termotolerancia desarrollada por *C. elegans* posterior a la incubación con los extractos provenientes de cada una de las accesiones.

Como medida del efecto citoprotector contra el estrés que posee la fracción hidrofílica de los tomates, se evaluó la capacidad de conferir termotolerancia en *C. elegans*. La incubación de *C. elegans* a 37 °C genera un estrés térmico y una acumulación de EROs que es letal en pocas horas (93). Para esta parte se expuso a los gusanos a 37 °C durante 4 h y 15 min, lo que fue suficiente para provocar la muerte de más del 50% de la población control incubada con DMSO (ensayo descrito en el capítulo II de materiales y métodos, página 30). Para llevar a cabo los ensayos de actividad biológica, se conformó un *pool* con los extractos de las repicas biológicas de un mismo cultivar, utilizando volúmenes equivalentes de cada una. Las 16 muestras resultantes fueron llevadas a sequedad bajo el flujo de N<sub>2</sub> gaseoso, y posteriormente los residuos secos fueron redissueltos en DMSO. Como control positivo se incluyeron placas de ensayo en las que se adicionó Quercetina (3.3 µM) disuelto en DMSO (94).

Luego de llevar a cabo el ensayo, y obtener los resultados de sobrevida para cada dilución del extracto, se trazó una curva dosis respuesta (Figura 6) y se calculó la Dosis Efectiva 50 (DE<sub>50</sub>).

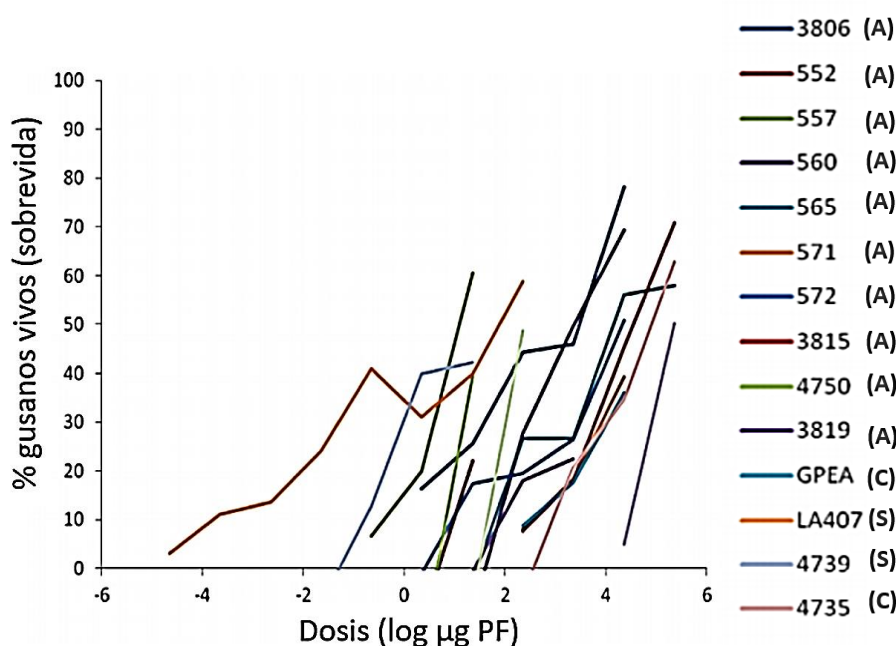


Figura 6: Curvas dosis respuesta de gusanos expuestos a estrés térmico, los cuales fueron previamente incubados con diluciones seriadas de extractos obtenidos a partir de los tomates de diferentes accesiones. En los ejes se representa el porcentaje de sobrevivencia de gusanos y el Log ug PF (logaritmo de microgramos de tomate en peso fresco). #LA407, #4739 son accesiones silvestres (S), #4735 Y #4742 son comerciales (C) y las demás muestras son autóctonas (A). Las líneas de color de la derecha diferencian las accesiones evaluadas.

Se observó un amplio rango de dosis que generaron termotolerancia ( $DE_{50}$  que fueron desde 0.02 a 313  $\mu\text{g}$ ).

La accesión # 4739 (*S. pimpinellifolium*), las accesiones locales autóctonas # 557, # 4750, # 4742, # 552, LA407 (*S. habrochaites*) y # 3806 (accesión comercial) mostraron la  $DE_{50}$  más baja y, por lo tanto, la actividad de termotolerancia más fuerte, mientras que las variedades comerciales GPEA y razas locales # 3842, # 3819, # 572 y # 571 mostraron valores de  $DE_{50}$  significativamente más altos y, por lo tanto, la actividad de termotolerancia más baja (Figura 7).

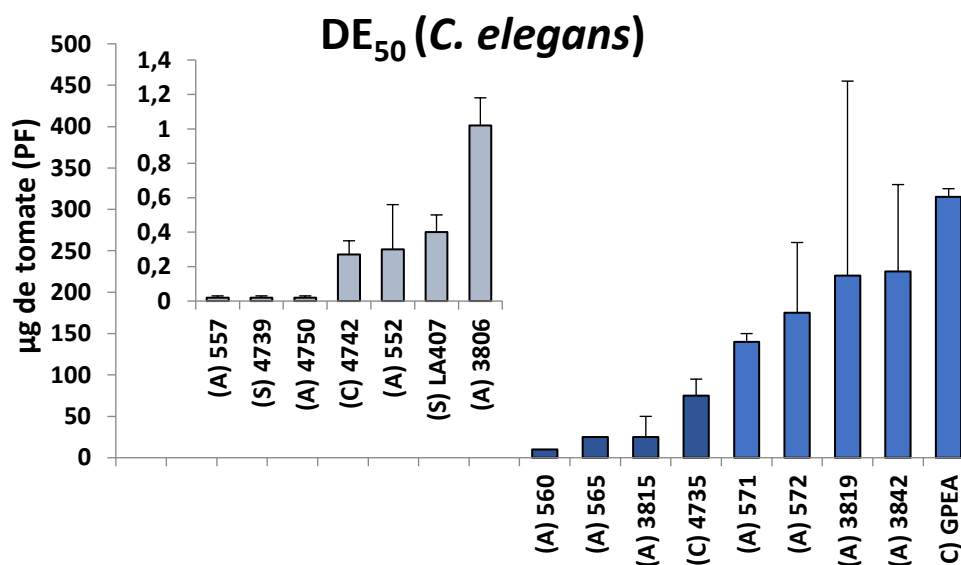


Figura 7: Actividad de los extractos sobre *C. elegans* representada como  $DE_{50}$  ( $\mu\text{g}$  de peso tomate fresco). #LA407, #4739 son accesiones silvestres (S), #4735 Y #4742 son accesiones comerciales (C) y las demás muestras son accesiones autóctonas (A). Las diferencias significativas entre muestras ( $p < 0.05$ , Scott y Knott test) se representan con barras de diferente color.

De esta manera se pudo observar que una diferencia en la composición de compuestos fenólicos en los cultivares se tradujo como una diferencia en la actividad biológica.

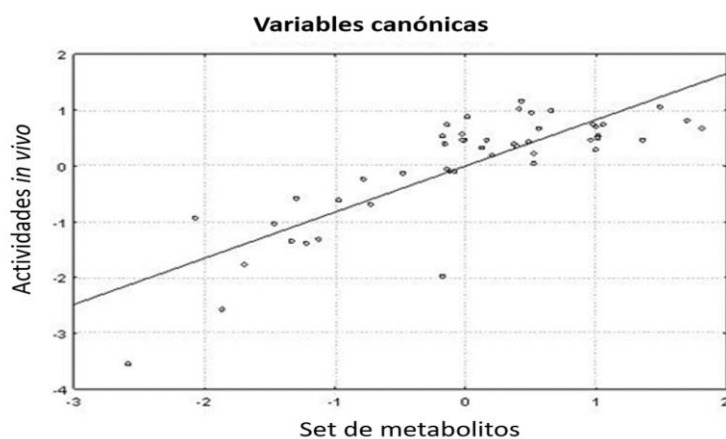
### 3.7. - Relaciones entre actividad biológica *in vivo* y la composición de metabolitos de tomate

De la misma manera que se analizó antes, en esta oportunidad se llevó a cabo una correlación canónica entre la actividad de termotolerancia (DE<sub>50</sub>) y los metabolitos antioxidantes.

Las actividades *in vivo* cuantificadas se correlacionaron significativamente con el set de metabolitos ( $r = 0.94$ ,  $p < 0,0001$ ) (Figura 8 A).

Cuando se observan los coeficientes de correlación obtenidos para cada uno de los metabolitos en relación a la DE<sub>50</sub>, se deben tener en cuenta que menores valores de DE<sub>50</sub> significan mayor potencia del extracto para generar un efecto biológico. Pudimos observar que compuestos como ACG y FAH fueron los metabolitos que se relacionaron con los valores más pequeños de DE<sub>50</sub> (termotolerancia observada en el modelo de *C.elegans*) (Figura 8 B) mientras que en el otro extremo se observa que CafAH5 y CafAH3 son los metabolitos que se relacionaron con los valores más grandes de DE<sub>50</sub> (extractos menos potentes)

A)



B)

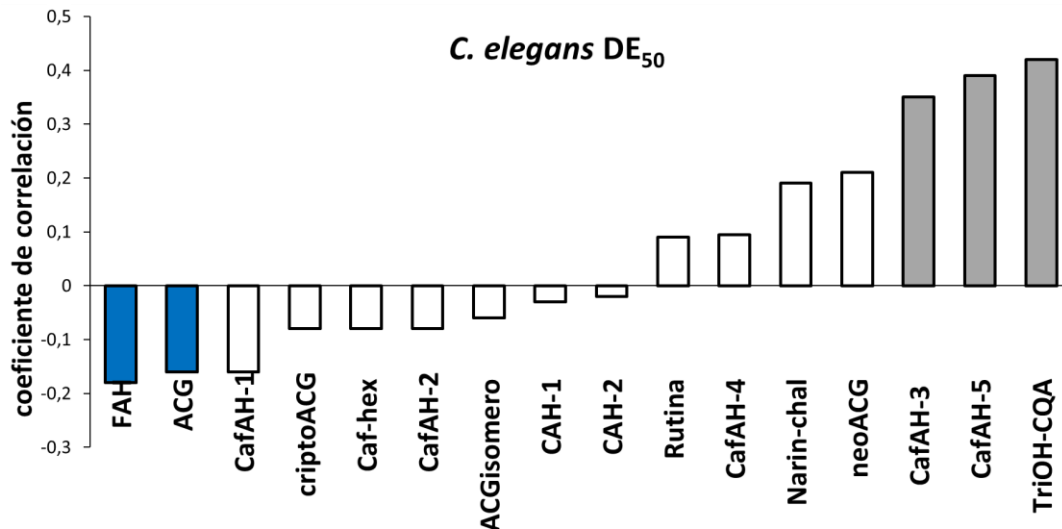


Figura 8: A) Linealidad de la correlación hallada entre metabolitos y actividades cuantificadas. B) Coeficientes de correlación de los metabolitos individuales y los valores obtenidos para DE<sub>50</sub>. Las correlaciones significativas ( $p < 0.05$ , Scott y Knott test) se representan con barras de diferente color.

### 3.8. - Relaciones entre actividad biológica *in vivo* y capacidad antioxidante *in vitro*.

Para evaluar si existía una relación entre la actividad antioxidante y la actividad biológica observada, se llevó a cabo una correlación canónica entre la actividad de termotolerancia (DE<sub>50</sub>) y la capacidad antioxidante cuantificada como TEAC y FRAP (Figura 9).

Cuando se observan los coeficientes de correlación obtenidos para las capacidades antioxidantes en relación a la DE<sub>50</sub>, se deben tener en cuenta que menores valores de DE<sub>50</sub> significan mayor potencia del extracto para generar un efecto biológico. Pudimos observar que la capacidad antioxidante cuantificada como FRAP se correlacionó

significativamente con los valores más pequeños de  $DE_{50}$  (termotolerancia observada en el modelo de *C. elegans*).

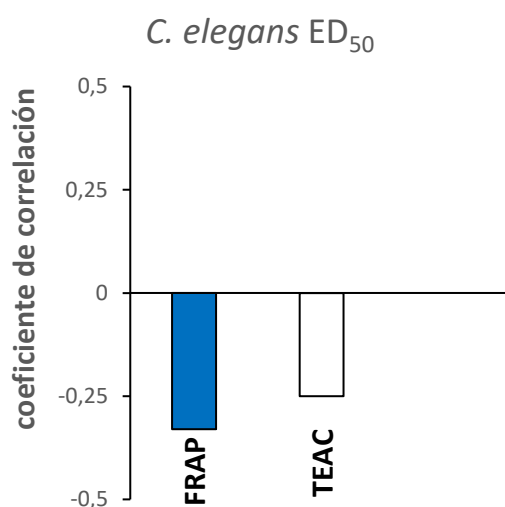


Figura 9: Coeficientes de correlación de las capacidades antioxidantes y los valores obtenidos para  $DE_{50}$ . Las correlaciones significativas ( $p < 0.05$ , Spearman test) se representan con barras de diferente color.

Este resultado indica que mientras mayor actividad antioxidante cuantificada como capacidad reductora del ion férrico, menores serán las concentraciones necesarias del extracto para generar un efecto de termotolerancia en el modelo. Este resultado además demuestra que los mismos compuestos que generan la actividad antioxidante serían los que están generando el efecto biológico sobre el modelo.

### 3.9. - Efectos del ácido Clorogénico en la actividad de termotolerancia en *C. elegans*

En los resultados obtenidos, el ACG se asoció con la actividad de termotolerancia mediante pruebas estadísticas. Para confirmar experimentalmente esta asociación, evaluamos la actividad de termotolerancia en *C. elegans* ejercida por el compuesto puro (ACG) a las mismas concentraciones encontradas en las especies silvestres y en la accesión local #572 (la cual presentó la mayor concentración de ACG en las accesiones de la especie cultivable).

Como primera medida, se evaluó la capacidad del compuesto puro para generar el rescate en una población de *C. elegans* sometida a estrés térmico y determinar la concentración



óptima para llevar a cabo las siguientes pruebas (utilizando las concentraciones encontradas en los cultivares de tomate analizados) (Figura 9). Se realizó entonces una curva dosis-respuesta para evaluar la actividad *in vivo* del ACG puro.

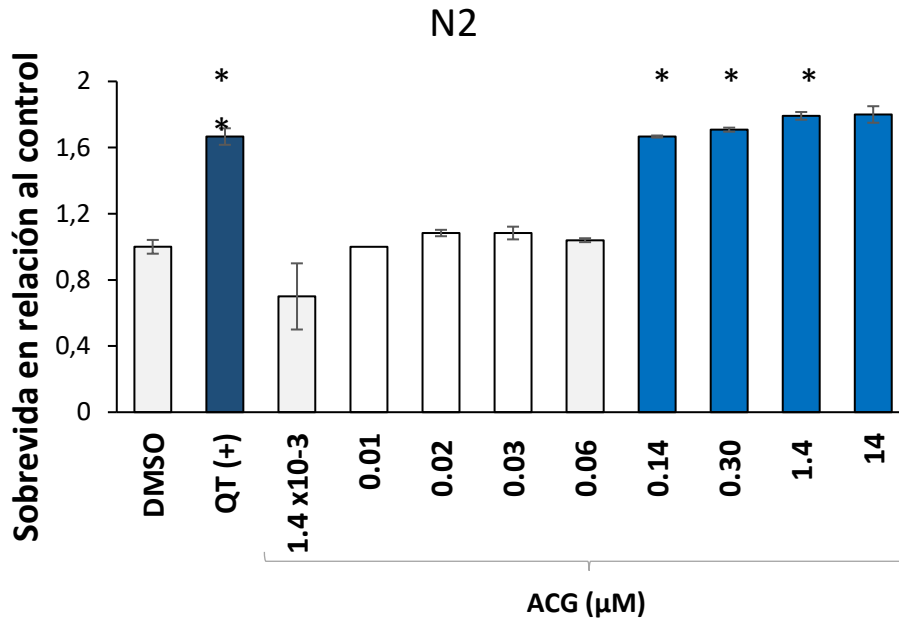


Figura 10: Curva dosis respuesta sobre cepa N2 de *C. elegans*, utilizando dosis crecientes de ACG. Se utilizó Quercetina como control + para corroborar el incremento de la sobrevivencia. (\*) Diferencias significativas para los resultados de las muestras respecto al control ( $p < 0.05$  LSD Fisher).

El ACG mostró un aumento significativo en la tasa de supervivencia de los gusanos al estrés térmico a las diferentes concentraciones estudiadas, con valores comparables con los obtenidos para el control positivo (Quercetina 3.3  $\mu\text{M}$ ) incluso utilizando concentraciones menores (95). Concentraciones entre 0.14 y 14  $\mu\text{M}$  generaron termotolerancia en el modelo.

Curiosamente, a pesar de que la accesión #572 poseía las concentraciones más elevadas de ACG entre las muestras autóctonas, el extracto mostró una baja actividad de termotolerancia en el modelo de *C. elegans* a diferencia de lo que se observó para las otras accesiones con altas concentraciones de ACG (Fig. 7). Como la rutina fue el segundo antioxidante mayoritario en este cultivar después del ACG, se procedió a evaluar el efecto de termotolerancia de la combinación de ambos antioxidantes. La rutina a la misma concentración encontrada en las accesiones silvestres y la concentración del cultivar #572, mostró individualmente una termotolerancia significativamente alta. Sin embargo, la actividad de termotolerancia de la mezcla de ACG y rutina a los mismos niveles de sus

correspondientes accesiones de tomate (Figura 10) mostró actividad en las especies silvestres, mientras que la mezcla correspondiente a la accesión # 572 no contribuyó a la termotolerancia. Este resultado evidencia un efecto antagonista de la rutina y el ACG cuando se encuentran en ciertas concentraciones, que podrían explicar la baja actividad de termotolerancia observada en la accesión # 572.

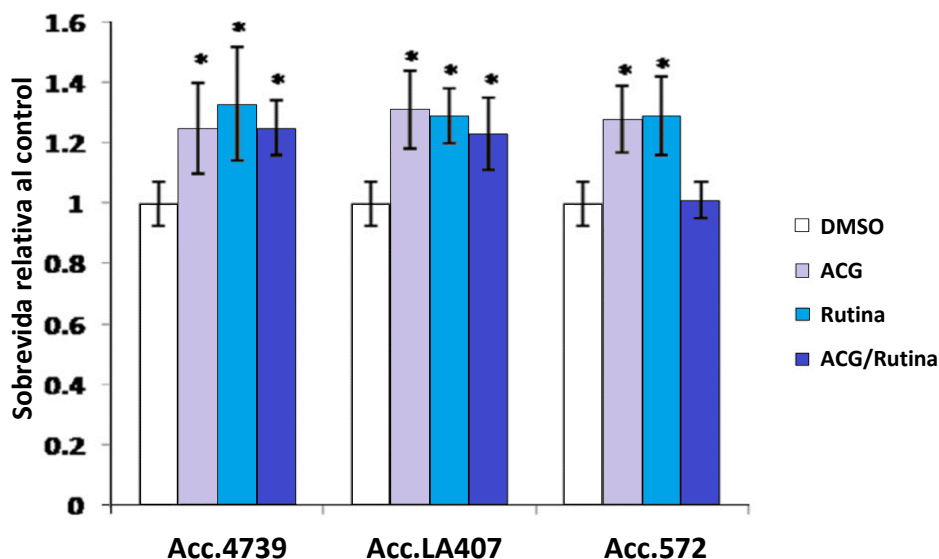


Figura 11: Tasa de supervivencia post estrés de gusanos *C. elegans* expuestos a estrés térmico preincubados con diferentes concentraciones de los estándares ACG y rutina. (ACG: 0.33, 0.48, y 0.135  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y rutina: 0.105, 0.049 y 0.486  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en el medio de reacción para representar las accesiones #4739, #LA407 y #572 respectivamente). (\*) Diferencias significativas para los resultados de las muestras respecto al control ( $p < 0.05$  LSD Fisher).

### 3.10. - Discusión y conclusión

#### 3.10.1. - Discusión

La composición antioxidante en los frutos de tomate parece estar relacionada con la historia evolutiva de la especie y la domesticación del cultivo. La composición antioxidante de las especies silvestres *S. habrochaites* (#LA407) y *S. pimpinellifolium* (#4739) difirió claramente de la cuantificada para las accesiones de *S. lycopersicum* (Fig. 1 y 3). Las divergencias genéticas entre estas especies han sido bien establecidas (96) y estudios previos han reportado diferencias metabólicas entre estas especies (97) (98). Además, se encontró una diversidad importante para la composición de antioxidantes entre las accesiones de *S. lycopersicum* (Figs. 1 y 3). Esta diversidad de antioxidantes

podría estar jugando un papel importante en la supervivencia y la adaptabilidad al entorno cambiante. Por ejemplo, los metabolitos fenólicos antioxidantes son actores clave para proteger las frutas contra la radiación solar (99). Aunque para este estudio todas las accesiones se cultivaron en el mismo ambiente (Mendoza, 700 metros sobre el nivel del mar), el mayor contenido de antioxidantes observado en las accesiones del noroeste, podría estar relacionado con una respuesta genética adaptada a las condiciones ambientales (regiones con alturas superiores a 2000 metros sobre el nivel del mar).

Los antioxidantes pueden generar un efecto protector contra las enfermedades humanas crónicas al activar diferentes mecanismos para neutralizar la producción de EROs y contribuir así a las propiedades nutraceuticas de los alimentos. Un desafío actual es identificar las propiedades nutraceuticas de los alimentos y medir su capacidad para revertir los procesos oxidativos. Para este propósito, aquí demostramos que las potenciales propiedades nutraceuticas de las frutas de tomate pueden caracterizarse fácilmente por un método basado en la termotolerancia mostrada por *C. elegans* cuando se incubaba con extractos de tomate. De este modo identificamos ocho accesiones de tomate (especies silvestres *S. habrochaites* #LA407 y *S. pimpinellifolium* # 4739 y accesiones de variedades locales, # 557, # 4750, # 552, # 560, # 565 y # 3815, y accesiones comerciales # 4735, # 4742, # 3806) con el mayor impacto en la tolerancia a estrés térmico. Esta actividad se correlacionó significativamente con algunos metabolitos antioxidantes. Los principales compuestos asociados con la resistencia al térmico en *C. elegans* fueron ácido ferúlico-O-hexósido, ácido trihidroxicinamoilquínico y ACG. La rutina y el ACG se probaron puros con dosis equivalentes a las encontradas en los frutos; ambos compuestos mostraron actividad significativa de termotolerancia en *C. elegans* (Fig. 10). Sin embargo, la actividad de termotolerancia de la mezcla rutina/ACG fue fuertemente dependiente de su relación molar (Fig. 10). Este resultado expuso como las propiedades nutraceuticas de los compuestos naturales bioactivos, pueden variar dependiendo de la interacción que puede existir entre ellos, cuando se encuentran en una matriz alimentaria compleja. La selección y mejoramiento de nuevas variedades de tomate con alto contenido de ACG podría contribuir a desarrollar nuevos alimentos con propiedades mejoradas para la salud humana. Sin embargo, en las estrategias para mejorar el

contenido en ácidos fenólicos (100) se deben considerar las interacciones entre los diferentes ácidos fenólicos individuales.

#### 3.10.2. - Conclusión

La composición y concentración de compuestos antioxidantes en las especies silvestres y variedades locales fue significativamente diferente. Las actividades antioxidantes *in vitro* e *in vivo* cuantificadas fueron significativamente diferentes entre las accesiones. Las actividades antioxidantes se asociaron significativamente a metabolitos antioxidantes específicos como los ácidos cafeoilquínicos, y ácido ferúlico-O-hexósido. Se observó también que sus actividades están sujetas a las proporciones en las que se encuentren respecto a otros compuestos antioxidantes presentes en los frutos.



## **CAPITULO 4**

# **MECANISMOS DE ACCIÓN DEL ÁCIDO CLOROGÉNICO**



## CAPÍTULO IV: MECANISMOS DE ACCIÓN DEL ÁCIDO CLOROGÉNICO

### 4.1. - Introducción

Con el objetivo de investigar las posibles interacciones de los CNB antioxidantes de tomate con las vías de señalización relacionadas con el estrés térmico, en este capítulo se estudian los mecanismos de acción y las vías de señalización moduladas por el ácido Clorogénico (ACG) para conferir tolerancia al estrés térmico en el nematodo *C. elegans*.

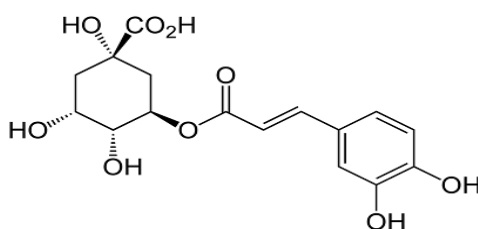


Figura 1: Ácido Clorogénico.

El ACG (Figura 1) es un éster del ácido Caféico y el ácido Quínico. Es uno de los polifenoles más abundantes en la dieta humana ya que se encuentra en numerosos alimentos como por ejemplo café, frutas y vegetales y se ha reportado que su consumo genera efectos beneficiosos en la salud (101).

El ACG inhibe la carcinogénesis en el sistema gastrointestinal, protege contra el estrés oxidativo in vivo; modula enzimas implicadas en el metabolismo de la glucosa (102) y reduce el riesgo cardiovascular por disminución de la LDL y el colesterol total (103) (104). Este ácido al igual que otros hidroxicinámicos, tienen propiedades antioxidantes, representadas por su habilidad de eliminar radicales libres. El ACG genera beneficios sobre la enfermedad de Alzheimer (105), infartos (106) y sobre la presión sanguínea y la función endotelial (107) (108). Además, el ACG es capaz de revertir los efectos pro-oxidantes de drogas como el paraquat (109).

En *C. elegans* el ACG mejora la resistencia al estrés térmico por mecanismos que aún no habían sido explorados. En este trabajo nos propusimos evaluar las vías de señalización y mecanismos moleculares que podrían estar involucradas en la termotolerancia inducida por ACG.

## 4.2. - Vías de señalización, mecanismos y factores de transcripción de interés

### 4.2.1. - Vía del receptor de insulina Daf-2

La vía de señalización insulina/IGF-1 (*insulin/insulin-like signaling (IIS)*) conecta el nivel de nutrientes con el metabolismo celular, crecimiento, desarrollo, longevidad y comportamiento en *C. elegans*. Esta vía fundamental es regulada por ligandos peptídicos similares a la insulina que se unen al ortólogo del receptor transmembrana de insulina/IGF-1 (IGFR), DAF-2.

DAF-2/IGFR controla la actividad de una cascada de proteínas quinasas altamente conservada (PI3K/AKT) que culmina en la regulación del factor de transcripción DAF-16/FoxO, quien gobierna la mayoría de las funciones en esta vía. La entrada al estadio de supervivencia dauer, la longevidad y reproducción en cada individuo, son determinadas por la integración de información acerca de la disponibilidad de nutrientes, tamaño de la población (competencia) y temperatura ambiente. Todas estas variables pueden ser interpretadas como predictores de la supervivencia futura y las condiciones de reproducción. Muchas de las respuestas sistémicas de *C. elegans* a los factores ambientales, están mediadas a través de IIS y su interacción con otras vías de señalización. Los mutantes de DAF-2/IGFR se caracterizan por la formación de dauers constitutivos y una longevidad incrementada en comparación con la cepa silvestre, y además son resistentes a diversos tipos de estrés, incluyendo calor (110) (111) (112) (113) (114) (115), estrés oxidativo (116), hipoxia (117), estrés osmótico (118), toxicidad por metales pesados (119), radiación ultravioleta (120), y proteotoxicidad (115) (121); (122); (123); (124); (125).

La cepa mutante de daf-16/FoxO pierde las resistencias otorgadas por la alteración del receptor de insulina, sugiriendo que los fenotipos resistentes son una consecuencia de un incremento en la actividad de DAF-16/FoxO (126). Esta vía de señalización mediada por DAF-16 resulta de interés como un posible blanco para la resistencia térmica o termotolerancia inducida por los CNB de tomate.



#### 4.2.2. - HIF-1 (Factor de transcripción inducido por hipoxia 1)

HIF-1 $\alpha$  está involucrado con la respuesta a hipoxia (127) (128). Cuando los niveles de oxígeno son altos, los residuos específicos de prolina de HIF-1 $\alpha$  se hidroxilan mediante enzimas pertenecientes a la superfamilia EGL-9/PH de dioxigenasas dependientes de oxígeno y 2-oxoglutarato (129) (130). La hidroxilación de las prolinas en HIF-1 $\alpha$  aumenta su afinidad por la proteína supresora de tumores de *Von Hippel-Lindau* (VHL), que es parte de un complejo E3 ubiquitina-ligasa que dirige a las proteínas para la degradación por proteasoma. Por lo tanto, cuando las concentraciones de oxígeno decaen (situación de hipoxia), las oxigenasas no trabajan con normalidad y HIF-1 no se degrada, se acumula y puede ingresar al núcleo celular para ejercer su actividad de factor de transcripción (Figura 1).

Las células en mamíferos responden a la hipoxia implementando cambios en la expresión génica para aumentar la producción de energía anaeróbica, proteger las células del estrés, regular la supervivencia celular y aumentar la angiogénesis local. Dichos cambios están mediados mayoritariamente por HIF-1 (131) (132).

*C. elegans* ha demostrado ser un sistema modelo con importantes homologías con modelos animales superiores, lo que permite estudiar la respuesta frente a hipoxia. El homólogo de *C. elegans* de la subunidad HIF-1 $\alpha$  es HIF-1, y la ruta HIF-1 / EGL-9 / VHL se conserva evolutivamente (129), (133). En este organismo HIF-1 establece una conexión en las redes reguladoras que vinculan la homeostasis de oxígeno, respuesta al estrés y envejecimiento (Figura 1).

En *C. elegans*, la disponibilidad del Fe (II), condiciones de hipoxia, al igual que las especies reactivas de oxígeno provenientes de una inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial, promueven la activación del factor de transcripción HIF-1. El aumento de HIF-1 induce mayor longevidad y expectativa de vida en *C. elegans* (134) (135) (136) (137) (138).

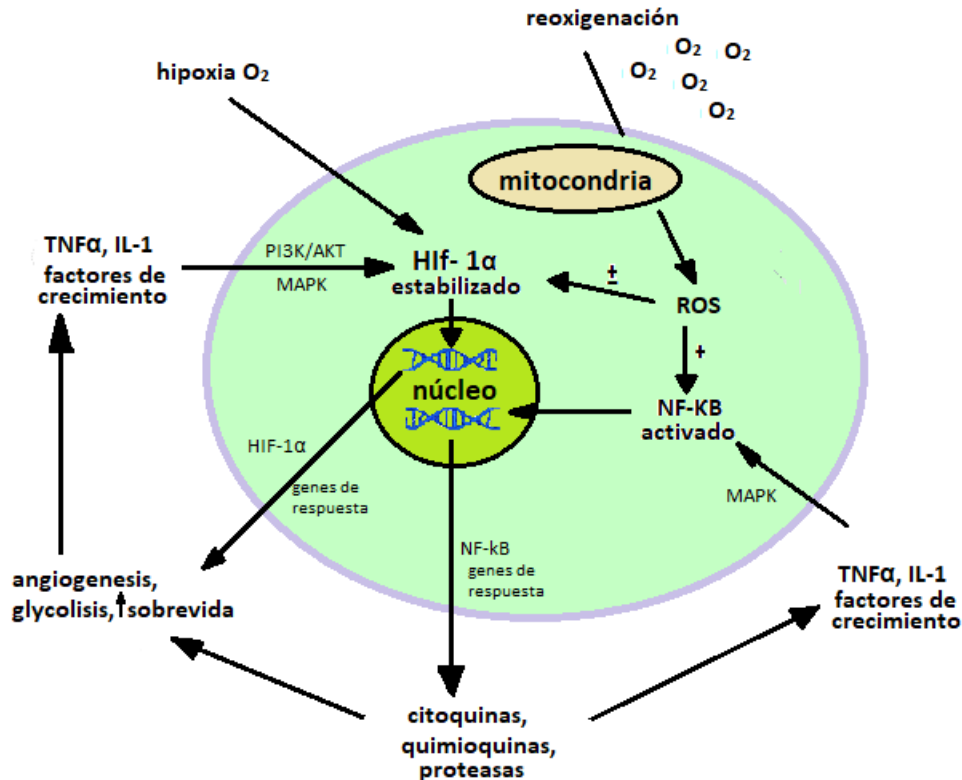


Figura 1: Funciones principales de HIF-1 en las células. En el gráfico se aprecian también los estímulos que llevan a la estabilización del factor de transcripción y su siguiente translocación al núcleo. Imagen adaptada de *Arthritis Research & therapy* (2009).

#### 4.2.3. - Autofagia

Múltiples estudios que se han llevado a cabo en *C. elegans*, han mostrado que la autofagia es un mecanismo que está íntimamente involucrado con las variaciones de la longevidad (139). La autofagia es un proceso celular ubicuo responsable de la degradación masiva de los componentes citoplasmáticos a través de una vía autofagosomal-lisosómica. Las principales funciones fisiológicas conocidas de la autofagia incluyen: 1- suministro de nutrientes durante el catabolismo, 2- generación de ATP en células estresadas o hambrientas, 3- generación de señales para la eliminación de residuos apoptóticos, 4- degradación de proteínas mal plegadas, 5- eliminación de orgánulos sobrantes o dañados, y 6- preservación de la estabilidad genómica.

La autofagia tiene un papel esencial en el desarrollo de *C. elegans* ya que está involucrada en supervivencia y muerte celular, desarrollo normal, desarrollo en condiciones adversas, longevidad, eliminación de proteínas tóxicas o agregadas y tráfico de receptores de superficie celular. En *C. elegans* los diferentes pasos en la secuencia de

formación de autofagosomas (Figura 2) se encuentran conservados en relación a modelos mamíferos, lo que facilita su análisis y posterior extrapolación en modelos superiores.

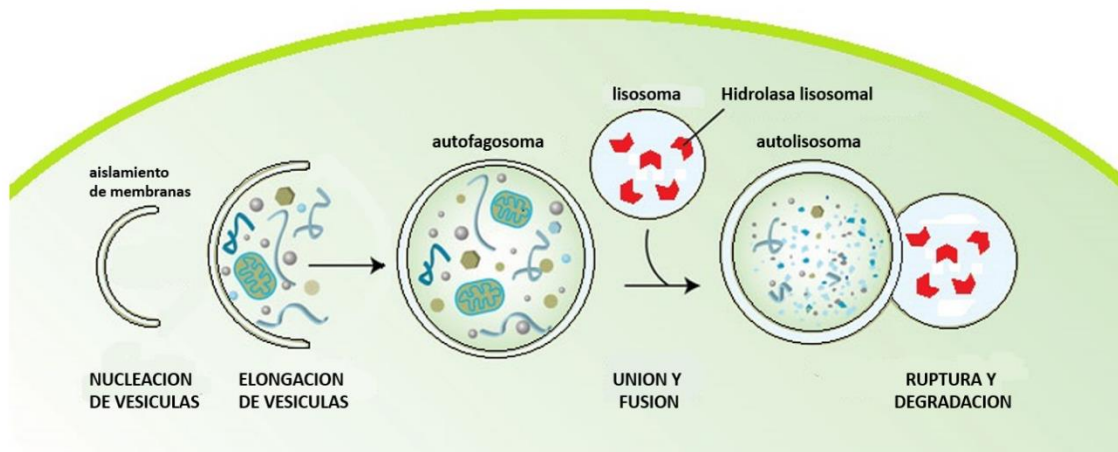


Figura 2: Diagrama esquemático del proceso de autofagia: La autofagia comienza con la formación del fagóforo o membrana de aislamiento (etapa de nucleación de vesículas). Se cree que las proteínas de la maquinaria central en el sitio de ensamblaje del fagóforo (SEF) conducen a la expansión del fagóforo a un autofagosoma (alargamiento de la vesícula). El autofagosoma puede engullir el citoplasma a granel de forma inespecífica, incluidos orgánulos completos o cargas objetivo específicamente. Cuando la membrana externa del autofagosoma se fusiona con un endosoma (formando un anfisoma antes de fusionarse con el lisosoma) o directamente con un lisosoma (pasos de acoplamiento y fusión), forma un autofagolisosoma. Finalmente, el material secuestrado se degrada dentro del autofagolisosoma (descomposición y degradación de las vesículas) y se recicla. Imagen adaptada de Alicia Meléndez. Wormbook (2009)

Se presume que en *C. elegans*, la autofagia ocurre a niveles basales en la mayoría de los tejidos durante condiciones normales de crecimiento, pero se regula rápidamente en respuesta a ciertos tipos de estreses ambientales. La autofagia puede ser inducida por una serie de estímulos, incluidos los períodos de escasez de alimento, hormonas, hipoxia, altas temperaturas, y diversas señales de desarrollo (140); (141).

La evidencia científica sugiere que la autofagia puede ser inducida en múltiples tejidos de *C. elegans* posterior a ser sometidos a estrés térmico o luego de sufrir una sobreexpresión de HSF-1 (142), por lo que la evaluación de la autofagia será una herramienta muy útil en el análisis de la respuesta del nematodo, posterior a la incubación con los compuestos de interés y antes de ingresar a la situación de estrés.

#### 4.2.4. - Proteínas de shock térmico

En modelos de *C. elegans* se observó también que la longevidad requiere del Factor de Transcripción de shock térmico (HSF-1) (143).

La respuesta al shock térmico (HSR, por sus siglas en inglés *Heat Shock Response*), involucra un conjunto de respuestas que se dan como consecuencia del estrés oxidativo y fisiológico, relacionado con cambios en la temperatura, pH y concentración del calcio intracelular. Esta respuesta es mediada por la familia de factores de shock térmico (HSF) que se compone de seis factores de transcripción dentro de los cuales HSF-1 es el más relevante (HSF-1) (143). En modelos de *C. elegans* se observó que el incremento de la longevidad, también requiere de HSF-1. En condiciones basales, HSF-1 se encuentra en el citoplasma unido a su complejo inhibidor formado por las proteínas chaperonas HSP40, 70 y 90. A pesar de que no se conoce con exactitud el mecanismo de activación de HSF-1, se cree que está relacionado con modificaciones en el complejo inhibidor. En condiciones de estrés, HSF-1 es liberado de su proteína inhibidora e ingresa al núcleo, las unidades se asocian formando un trímero activo, el cual se une a regiones conservadas en el genoma denominadas elementos de shock térmico (HSE), activando la transcripción de genes blanco inducidos por estrés (144). Cuando HSF-1 se sobreexpresa, extiende la expectativa de vida por una vía dependiente de DAF-16/FoxO (115) y retrasa la agregación de proteínas en animales (145) (115). HSF-1 y DAF-16/FoxO promueven la longevidad por unión al elemento de shock térmico (HSEs) y de unión a Daf-16/FoxO (DBEs), promoviendo la expresión de genes que codifican proteínas de shock térmico pequeñas (115).

En este punto podemos observar como la respuesta frente al estrés, es un evento que incluye múltiples vías de señalización, y que estas pueden actuar individualmente o correlacionadas entre ellas, por lo que es necesario hacer un estudio integral que incluya todas las vías mencionadas.

#### 4.3. - Identificación de los factores o vías de señalización involucrados en la termotolerancia conferida por ACG

4.3.1. - Importancia del Factor de transcripción HIF-1 y la vía DAF-2/DAF-16 para la termotolerancia inducida por ACG

Para evaluar si ACG confiere tolerancia al estrés térmico en *C. elegans*, gusanos jóvenes adultos (L4) fueron expuestos a ACG y luego sometidos a temperatura letal (37 °C) siguiendo el protocolo de estrés térmico que fue detallado en el capítulo II de materiales y métodos (página 30).

Para este ensayo, se utilizó una concentración de 1.4 µM de ACG (146). Los gusanos expuestos a ACG mostraron una sobrevivencia significativamente mayor en relación a los gusanos expuestos al vehículo control.

Numerosos trabajos reportaron que ACG puede extender la expectativa de vida de *C. elegans* mayormente mediante el factor de transcripción DAF-16 en la vía de señalización del receptor de insulina/IGF-1 (147).

Para analizar la participación de la vía DAF-2/DAF-16 en la termotolerancia inducida por ACG, gusanos mutantes *daf-2* (cepa CB1370) y mutantes *daf-16* (cepa CF1038) en estadio L4 fueron expuestos a ACG (1.4 µM) y posteriormente a la misma temperatura letal.

Anteriormente, en el trabajo de Treinin y col. (63) se estableció que adicionalmente a los conocidos roles de HIF-1 relacionados con la sensibilidad al oxígeno, este factor de transcripción también es indispensable para que *C. elegans* logre una adaptación al calor a largo plazo. Para evaluar la participación del factor de transcripción HIF-1 en la bioactividad del ACG, se sumó al ensayo una población de gusanos mutantes *hif-1* (cepa ZG31), los cuales poseen una delección de 1,231 pb en los exones 2, 3 y 4 en el gen *hif-1* generando una pérdida de función (133). El procedimiento experimental fue detallado en el capítulo II de materiales y métodos, pág. 30.

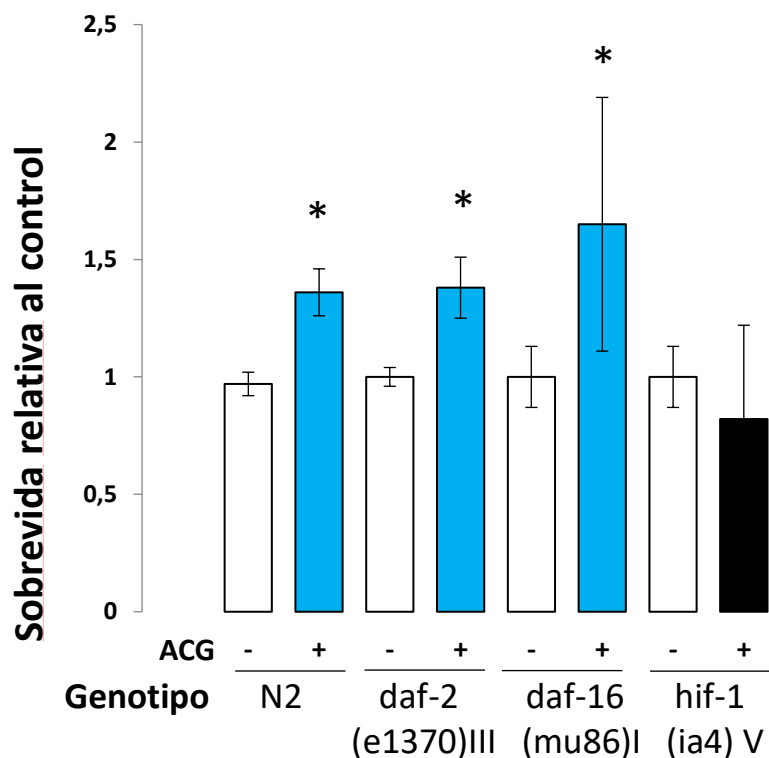


Figura 3: Efecto del ACG sobre la supervivencia frente al estrés térmico en las cepas, N2 silvestre, y los mutantes *daf-2* (e1370), *daf-16* (mu86) I y *hif-1* (ia4) V. (\*) Diferencias significativas para los resultados de las muestras respecto al control correspondiente sin agregado de ACG ( $p < 0.05$  LSD Fisher).

Como se observa en la Figura 3, ambas cepas mutantes (*daf-2* y *daf-16*) expuestas a ACG, desarrollaron una supervivencia significativamente superior en comparación con sus propios controles (gusanos CB1370 y CF1038 respectivamente) incubados con DMSO. En el caso de los mutantes de *hif-1*, esta cepa no mostró una diferencia significativa en la supervivencia en relación con su propio control (gusanos ZG31) en ausencia de ACG.

Estos resultados sugirieron que la ausencia del receptor de insulina y el factor de transcripción DAF-16 no alteran la respuesta de termotolerancia inducida por ACG. Por lo tanto, la respuesta al ACG es independiente de la vía DAF2/DAF16. Sin embargo, la ausencia de respuesta al ACG en la cepa mutante de *hif-1* nos indicó la existe una relación entre este factor de transcripción y la respuesta de termotolerancia.

Para validar posteriormente la ausencia de termotolerancia inducida por ACG en los mutantes de *hif-1*, se utilizaron dos cepas distintas:

i) la cepa ZG596, la cual posee una mutación puntual en el gen de HIF-1 lo que produce una proteína truncada sin dominio de activación (148) y

ii) gusanos cepa silvestre N2 depletados de HIF-1 mediante el uso de ARNi (la técnica se desarrolla en la página 32 del capítulo II, materiales y métodos).

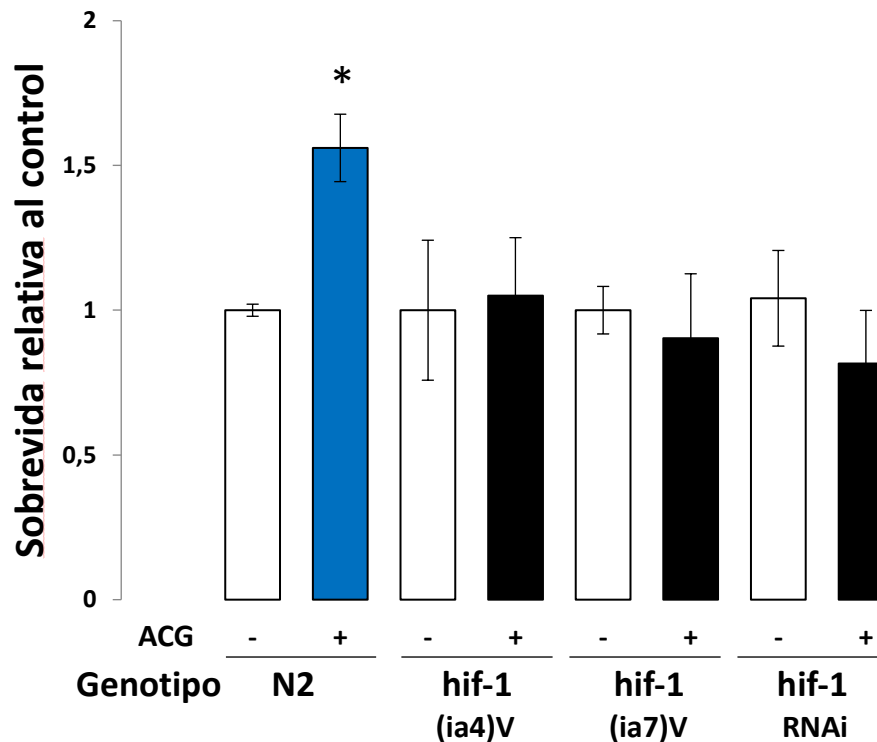


Figura 4: Efecto del ACG sobre la sobrevida de gusanos sin modificaciones (N2), gusanos mutantes con expresión defectiva de hif-1 (hif-1(ia4) V y hif-1(ia7) V) y gusanos N2 depletados de hif-1 mediante el uso de ARNi. (\*) Diferencias significativas para los resultados de las muestras respecto al control correspondiente sin agregado de ACG ( $p < 0.05$  LSD Fisher).

Los resultados observados en la Figura 4 confirmaron lo que se observó anteriormente con la cepa ZG31. Los dos modelos experimentales mostraron la misma ausencia de respuesta cuando fueron sometidos a estrés térmico. Confirmando a HIF-1 como un mediador del mecanismo de termotolerancia.

Para evaluar si la ausencia de respuesta estaba condicionada por las concentraciones utilizadas en el ensayo, se evaluó también la actividad de termotolerancia, aplicando diferentes dosis de ACG en gusanos silvestres y mutantes de hif-1 (cepa ZG31) (Figura 5).

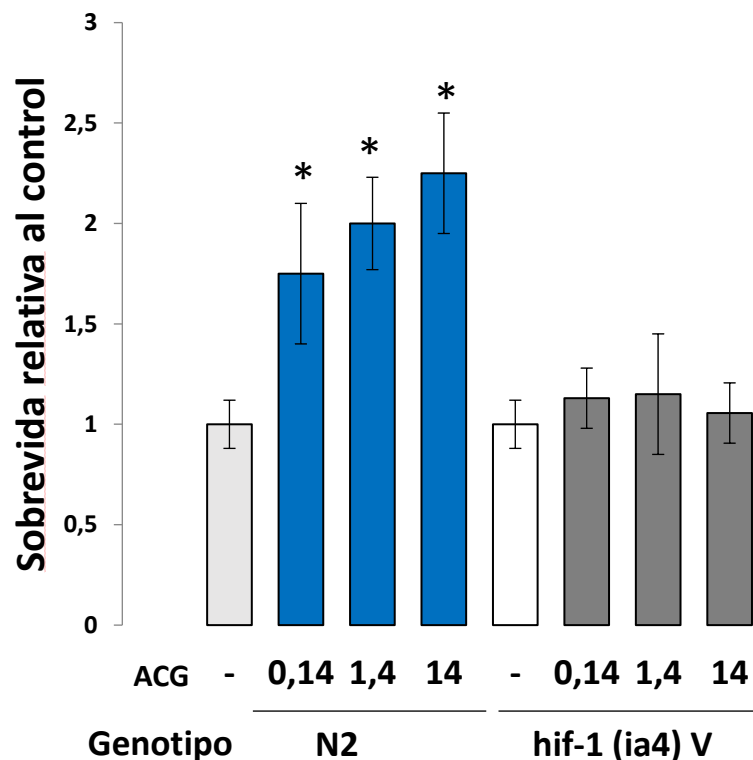


Figura 5: Respuesta sobrevida relativa sobre gusanos N2 silvestre y los mutantes hif-1 (ia4) V con diferentes dosis de ACG  $\mu\text{M}$  (\*) Diferencias significativas para los resultados de las muestras respecto al control correspondiente sin agregado de ACG ( $p < 0.05$  LSD Fisher).

Se observó un incremento en la sobrevida post estrés de los gusanos silvestres expuestos a dosis de ACG desde 0.14 a 14.0  $\mu\text{M}$  (Figura 5) en comparación a los gusanos control. Sin embargo, ninguna de las dosis ensayadas indujo termotolerancia en los gusanos mutantes comparados con su propio control (cepa ZG31) incubados con DMSO, evidenciando que la ausencia de respuesta no es debida a una sensibilidad diferenciada por el ACG.

Estos resultados confirmaron entonces que la termotolerancia inducida por ACG, necesita de un HIF-1 funcional.

#### 4.3.2. - Efecto de ACG sobre la expresión de HIF-1.

El siguiente paso fue estudiar el efecto de ACG sobre la expresión de HIF-1. El nivel proteico de HIF-1 fue cuantificado en gusanos L4 de acuerdo a lo descrito en el capítulo II de materiales y métodos, página 33.



Luego de una incubación con ACG 1.4  $\mu\text{M}$  por 18 h, los niveles proteicos de HIF-1 fueron significativamente mayores comparados con el tratamiento control (Figura 6).

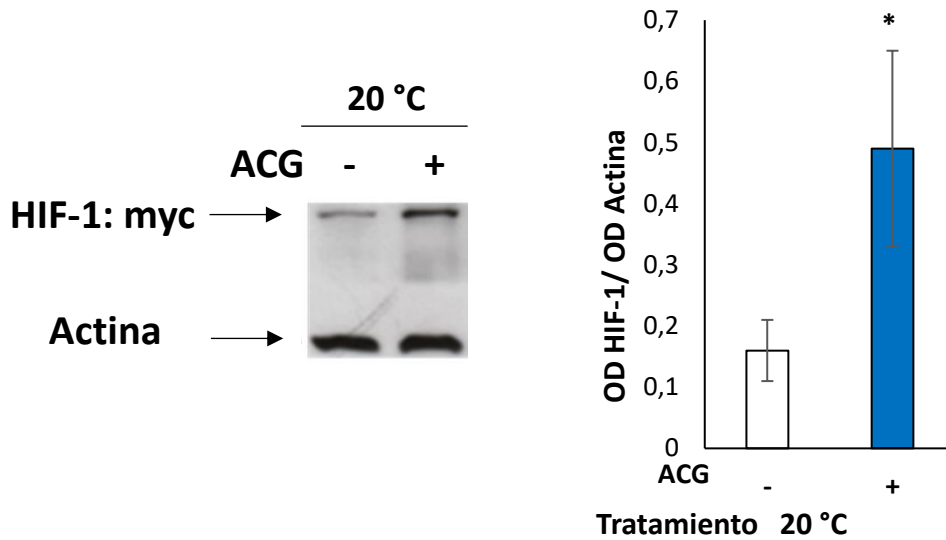


Figura 6: Análisis *western blot* de HIF-1 y los niveles relativos de HIF-1 en gusanos incubados con ACG (1.4  $\mu\text{M}$ ) o DMSO. (\*) Diferencias significativas para los resultados de las muestras respecto al control correspondiente sin agregado de ACG ( $p < 0.05$  LSD Fisher).

Con el propósito de evaluar la actividad del HIF-1 inducido por ACG, se evaluó la expresión de genes bajo la regulación de dicho factor de transcripción. Para ello se evaluó la expresión de *k10h10.2*.

Se pudo observar que los nematodos incubados con ACG mostraron un incremento significativo de la expresión de ARNm (casi unas 70 veces) en comparación al control con DMSO (Figura 7).

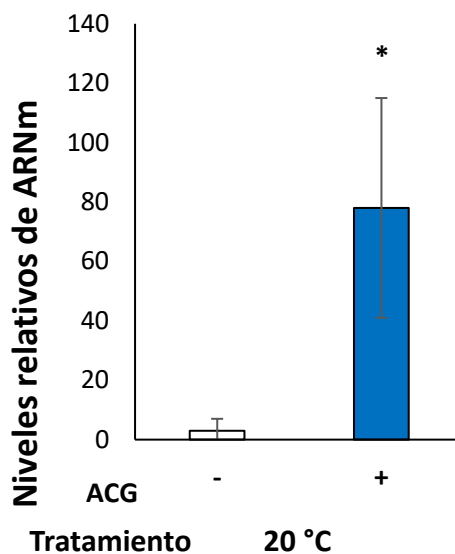


Figura 7: Niveles relativos de ARN de K10H10.2 en gusanos expuestos a ACG (1.4  $\mu\text{M}$ ) o DMSO. (\*) Diferencias significativas para los resultados de las muestras respecto al control correspondiente sin agregado de ACG ( $p < 0.05$  LSD Fisher).

Para corroborar si la inducción de HIF-1 era suficiente para conferir termotolerancia en *C. elegans*, se analizaron gusanos L4 que fueron previamente sometidos a aclimatación al calor (25 °C) o a 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{CoCl}_2$  (inductor de HIF-1 por medio de hipoxia química). En ambos tratamientos, los niveles de proteína hif-1 fueron significativamente incrementados en relación al control (Figura 8a). Además, al igual que la incubación con ACG, la aclimatación a temperaturas elevadas y el tratamiento con  $\text{CoCl}_2$  incrementaron la sobrevivencia de la población de *C. elegans* sometidos a temperatura letal, mostrando que el incremento de HIF-1, es suficiente para inducir termotolerancia (Figura 8b).

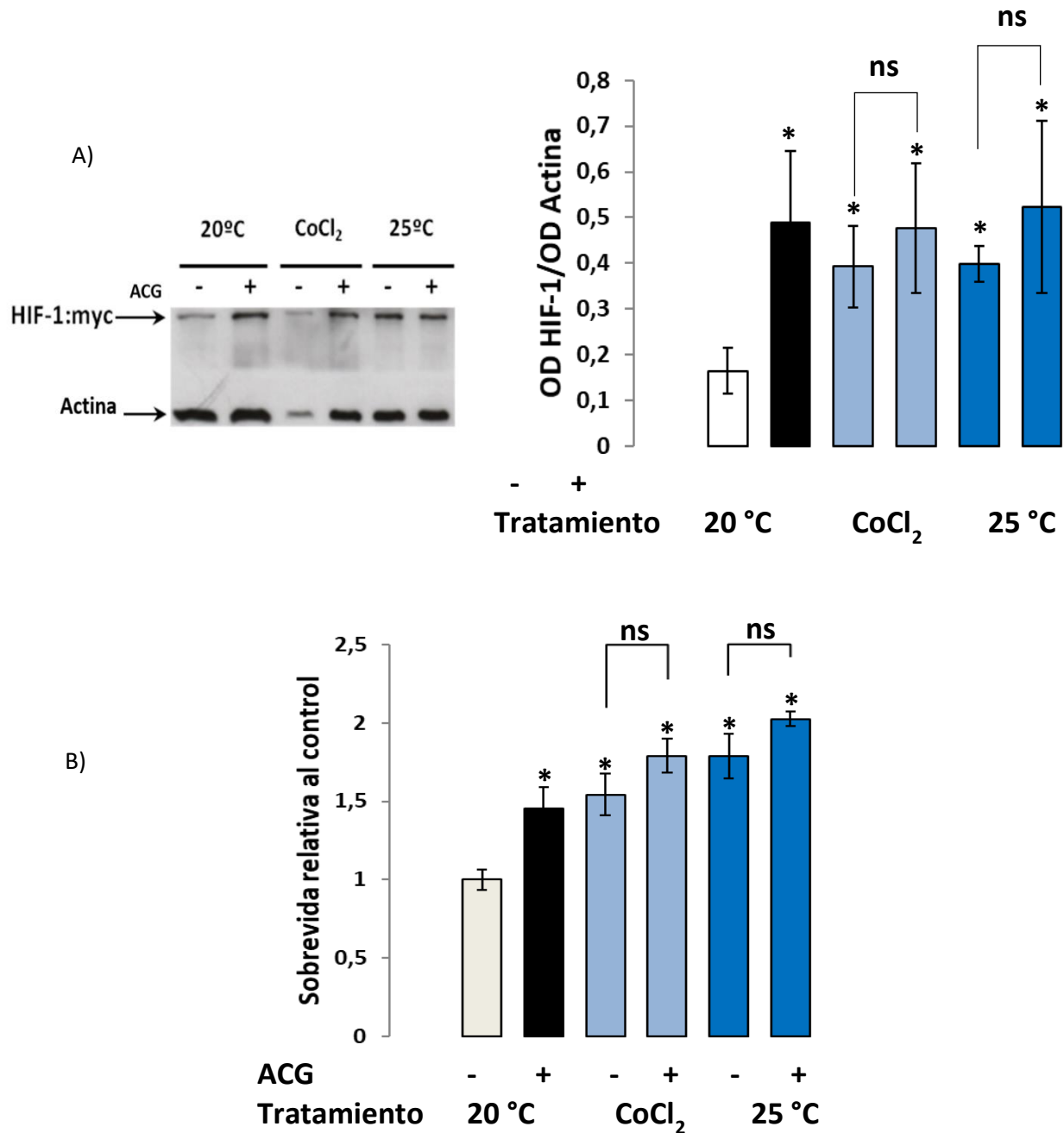


Figura 8: Efectos del ACG, CoCl<sub>2</sub>, y aclimatación a temperaturas elevadas sobre HIF-1 y termotolerancia. A) Análisis de *western blot* de hif-1 y sus niveles en gusanos incubados a 20 °C con ACG, o DMSO, o en condiciones inductoras de HIF-1 (CoCl<sub>2</sub> a 20°C y aclimatación 25 °C). B) sobrevividas relativas de gusanos incubados con ACG o tratados con las condiciones inductoras de HIF-1, luego de ser sometidos a condiciones de estrés térmico. (\*) Diferencias significativas para los resultados de las muestras respecto al control correspondiente (DMSO a 20 °C) (p < 0.05 LSD Fisher).

4.3.3. - Evaluación de los niveles de EROs y el estado antioxidante durante la exposición con ACG

Múltiples trabajos indican que los niveles de las EROs influyen la expectativa de vida del *C. elegans*, actuando más como una molécula de señalización que como un agente

nocivo (149). De la misma manera, se ha sugerido que, en ciertas concentraciones, los compuestos antioxidantes pueden actuar como pro-oxidantes (150), incrementando las concentraciones internas de las EROs, e induciendo los sistemas de detoxificación y resistencia al estrés. Para analizar esta posibilidad, fue necesario evaluar el estado oxidativo del nematodo posterior a la incubación con ACG. Para evaluar las especies reactivas de oxígeno, se utilizó la cepa N2 con la sonda fluorescente CM-H2DCFDA, la cual permite analizar las concentraciones de EROs de manera proporcional a la fluorescencia observada en los nematodos. Luego de 3 horas de incubación con la sonda, los gusanos se observaron bajo microscopio de fluorescencia (FV1200 Laser Scanning Microscopes) y se tomaron fotografías para comparar los valores totales de fluorescencia por cada individuo. Los gusanos incubados durante 18 h con ACG mostraron un incremento significativo de la fluorescencia en relación al control (el cual fue incubado con el solvente vehículo) (Figura 9).

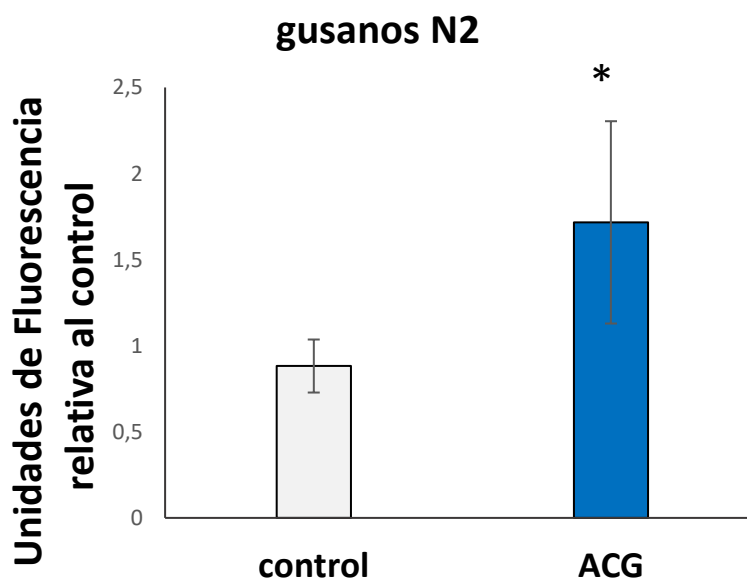


Figura 9: Cuantificación de EROs en gusanos N2, incubados por 18 h con ACG, relativo al control incubado con DMSO. (\*) Diferencias significativas para los resultados de las muestras respecto al control correspondiente sin agregado de ACG ( $p < 0.05$  LSD Fisher).

Luego de observar que la incubación con el ACG generaba cambios en el estado oxidativo de los gusanos, se procedió a evaluar, si el efecto era el mismo en todas las cepas de *C. elegans*, incluyendo las cepas mutantes que tienen afectadas las vías de señalización relacionadas a la resistencia al estrés.

Los niveles de las EROs fueron medidos en una población silvestre (N2) y en las cepas de gusanos mutantes (*daf-16*, *hif-1*) incubados con ACG o vehículo a 20 °C por 18 h (Figura 10). En este caso por el mayor número de cepas utilizadas, la lectura de fluorescencia se llevó a cabo utilizando un lector multiplaca Biotek, con un número de individuos por pocillo de 150 gusanos aproximadamente.

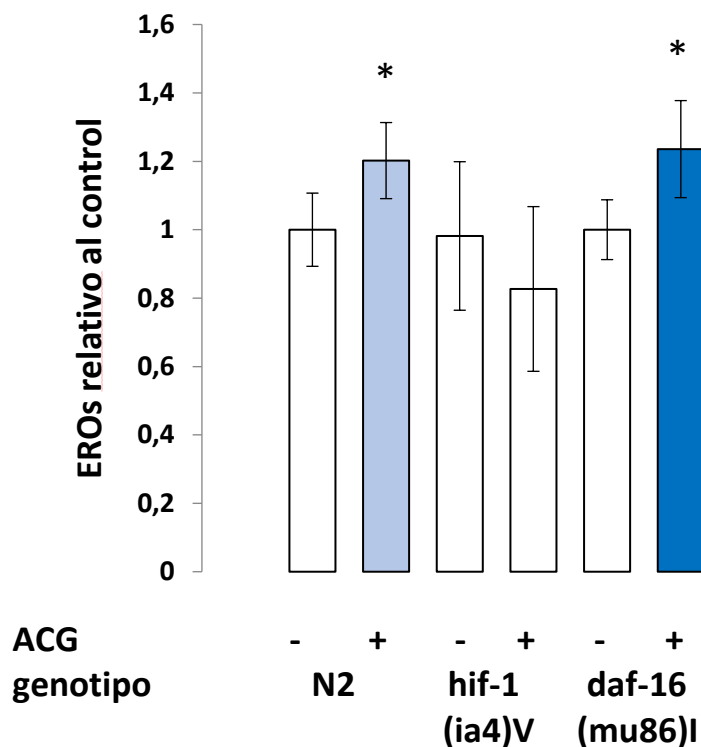


Figura 10: Niveles de EROs relativos en nematodos N2 y las mutantes *hif-1*(*ia4*) V y *daf-16*(*mu86*) I incubados con ACG. Los resultados fueron relativizados con sus propios controles incubados con DMSO. (\*) Diferencias significativas para los resultados de las muestras respecto al control correspondiente sin agregado de ACG ( $p < 0.05$  LSD Fisher).

La cepa silvestre y los gusanos mutantes *daf-16* mostraron un incremento significativo en los niveles de EROs después de una incubación de 18 h con ACG con respecto a los niveles del control incubado con DMSO. Sin embargo, la cepa mutante de *hif-1* (ZG31) no mostró cambios significativos en relación al control luego de la incubación con ACG. Para evaluar si el incremento de las especies reactivas de oxígeno ocurrió por una perturbación en el funcionamiento de las enzimas de detoxificación, se procedió a evaluar el estado oxidativo de una población silvestre incubada con ACG midiendo las actividades de las enzimas Superóxido Dismutasa (SOD) y Catalasa (CAT) (Figura 11).

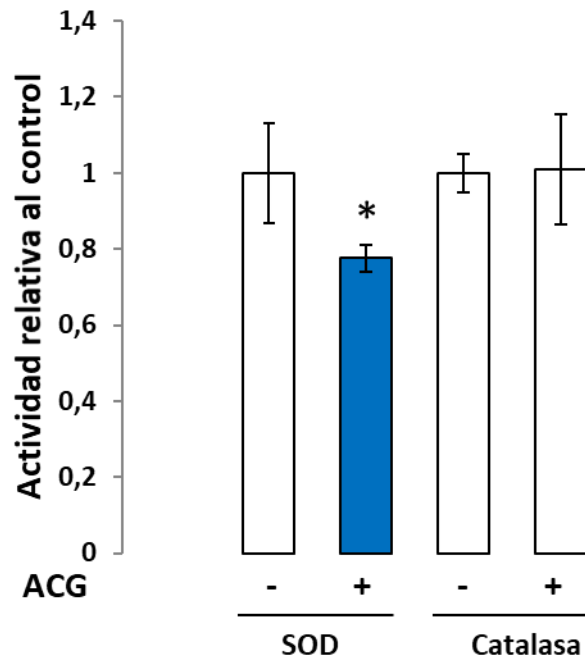


Figura 11: Actividades de SOD y Catalasa relativas en gusanos silvestres N2. Los gusanos fueron expuestos a ACG o DMSO durante 18h. (\*) Diferencias significativas para los resultados de las muestras respecto al control correspondiente sin agregado de ACG ( $p < 0.05$  LSD Fisher).

Se observó que la actividad de SOD en la población incubada con ACG, fue significativamente menor respecto al control, mientras que la actividad de la enzima catalasa no mostró cambios estadísticamente significativos. Estos resultados sugieren que ACG incrementa la resistencia al estrés térmico mediante un aumento de las EROs, modificando la actividad de la enzima SOD y que este incremento de las especies reactivas de oxígeno, estaría mediado por HIF-1, ya que en ausencia de este factor de transcripción no se observan cambios en las concentraciones cuantificadas.

4.3.4. - La termotolerancia inducida por ACG, y su relación con los procesos de autofagia y la vía del factor de choque térmico

Trabajos previos han incluido a la autofagia entre los mecanismos que confieren termotolerancia a *C. elegans* (68) (151).

Para evaluar si existía alguna relación entre la autofagia y el desarrollo de la resistencia al estrés térmico generado por ACG, se evaluó el efecto que este compuesto tiene sobre una población deficiente en el desarrollo de procesos autofágicos (152) (Figura 12).

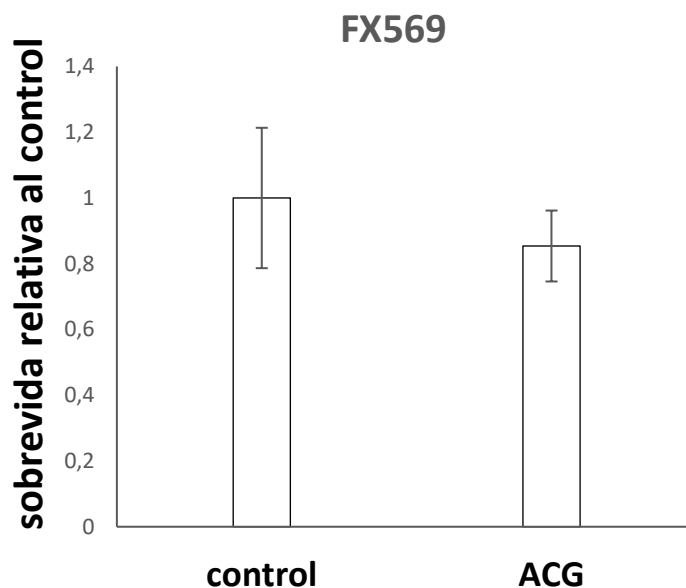


Figura 12: Sobrevida relativa post estrés térmico de nematodos FX569 incubados con ACG (1.4  $\mu$ M) o DMSO durante 18 h. (\*) Diferencias significativas para los resultados de las muestras respecto al control correspondiente sin agregado de ACG ( $p < 0.05$  LSD Fisher).

Como se observa en la Figura 12 donde se compara la supervivencia post estrés térmico de la placa tratada con ACG en relación a la placa control, no se evidenció diferencia significativa. Este resultado sugiere que probablemente el incremento de la resistencia térmica observada en *C. elegans* está siendo mediada por la autofagia, o al menos necesita de condiciones normales de autofagia en el organismo.

Para explorar la relación que existe entre autofagia y la respuesta frente al ACG, se realizó una comparación con las condiciones de hormesis térmica, (gusanos incubados a 36 °C durante 1 h) donde los nematodos experimentan termotolerancia vía una inducción de la autofagia (153). Para ello, la autofagia fue monitoreada en las *seam cells* de una cepa de *C. elegans* que expresa un reportero *lgg-1*-fusionado a GFP (cepa DA2123), la cual permite visualizar la formación de autofagosomas como un punteado fluorescente.

*Lgg-1* es el ortólogo en *C. elegans* del LC3 de mamíferos. LC3 es una de las proteínas relacionadas a autofagia más importantes, ya que ayuda a elongar la membrana del autofagosoma y reclutar al cargo. Su forma lipidada (LC3-II) se encuentra en ambas superficies del autofagosoma (externa e interna) donde se degrada con su cargo cuando el autofagosoma se fusiona con el lisosoma.

En condiciones normales, los gusanos presentan un número bajo de autofagosomas, (154) (155) pero ante un estímulo que induzca el proceso de autofagia, el número de autofagosomas se incrementa significativamente. Los gusanos fueron expuestos a ACG durante 18 h a 20 °C, y posteriormente se cuantificó el punteado fluorescente por microscopia confocal de fluorescencia. Los valores obtenidos fueron comparados con los correspondientes al control negativo (DMSO) y también con los valores obtenidos para los gusanos expuestos a 36 °C por 1 h (hormesis térmica o control positivo) (Figura 13). Se analizaron 10 gusanos por tratamiento, y se cuantificó el punteado de al menos tres *seam cell* en cada individuo.

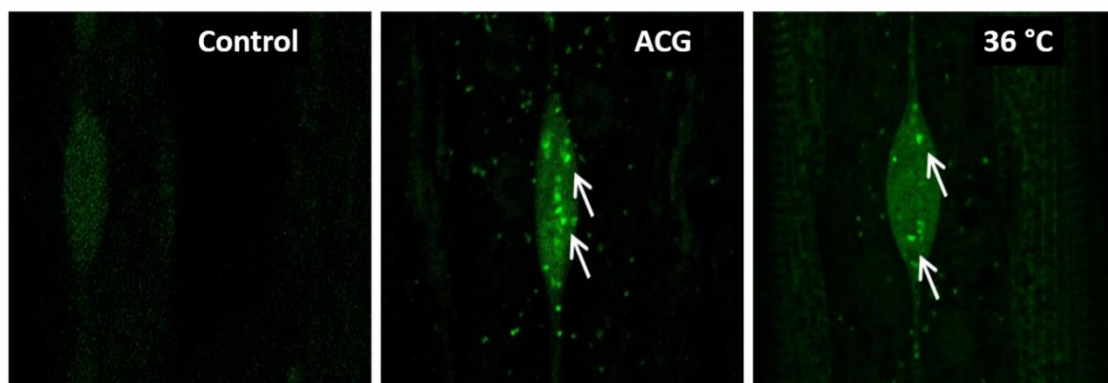


Figura 13: Análisis de autofagia en *C. elegans* DA2123. Se muestra una *seam cell* por tratamiento. Las flechas indican el punteado autofágico GFP::LGG-1. Célula control incubada con DMSO, célula de gusano incubado con ACG y célula del control positivo expuesto a la condición de hormesis térmica (36 °C 1h).

Los resultados mostraron un incremento significativo en el número de autofagosomas tanto en los gusanos que sufrieron tratamiento de hormesis térmica como los que fueron incubados con ACG, comparados con el control (DMSO).



Para evaluar la participación de HIF-1 en el proceso autofágico, se evaluó la autofagia en gusanos tratados con ARNi para hif-1. Se adicionaron al ensayo, un control negativo, conformado por gusanos tratados con ARNi para Bec-1 (ortólogo de Beclina un regulador clave en la formación de autofagosomas) y un control positivo utilizando la condición de hormesis térmica (Figura 14). Para cada grupo de gusanos se realizó la incubación con ACG 1.4  $\mu$ M por 18 h.

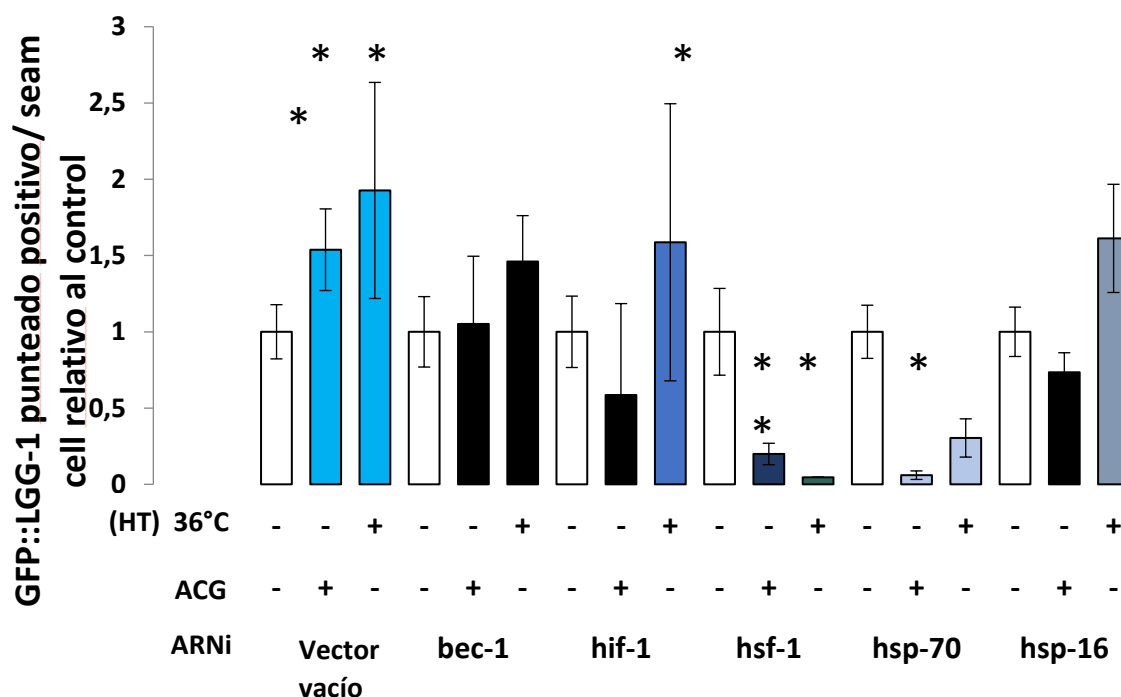


Figura 14: Promedio relativo de punteados por seam cell de gusanos DA2123 depletados de bec-1, hif-1, hsf-1, hsp-70, y hsp-16 mediante el uso de ARNi expuestos a ACG (1.4  $\mu$ M), DMSO o a 36 °C. (\*) Diferencias significativas para los resultados de las muestras respecto al control correspondiente incubado con DMSO (p < 0.05 LSD Fisher).

El ensayo realizado con los gusanos silenciados para Bec-1, suprimió tanto la autofagia inducida por ACG como por hormesis térmica. Sin embargo, cuando los gusanos silenciados para hif-1 fueron evaluados, también se observó una supresión en el incremento de los autofagosomas inducidos por ACG, pero en dicha población el incremento de autofagosomas producido por hormesis térmica no se vio modificado (Figura 14).

Además, decidimos evaluar el Factor de Shock Térmico 1 (HSF-1) ya que es un reconocido como un efector en el mecanismo de termotolerancia a *C. elegans* a partir de la activación de la autofagia (68) (153). Por lo tanto, se evaluó la contribución del HSF-1 y las proteínas de shock térmico HSP-70 y HSP-16 en la autofagia inducida por ACG, y se comparó con la condición de hormesis térmica. Notablemente, los gusanos silenciados para *hsf-1*, *hsp-70* y *hsp16* por ARNi, incubados con ACG, mostraron un descenso significativo en el conteo de autofagosomas en comparación con sus controles incubados con DMSO. La autofagia inducida por hormesis térmica por otro lado, fue fuertemente reducida en los gusanos depletados de *hsf-1* y *hsp-70* con respecto a sus controles que permanecieron a 20 °C. Por otro lado, los gusanos tratados con ARNi para *hsp-16* mostraron un incremento significativo de los autofagosomas cuando son incubados a 36 °C.

Además, se evaluó la sobrevivencia post estrés térmico de las mismas cepas tratadas con ARNi, previamente incubados con ACG 1.4  $\mu$ M durante 18 h (Figura 15).

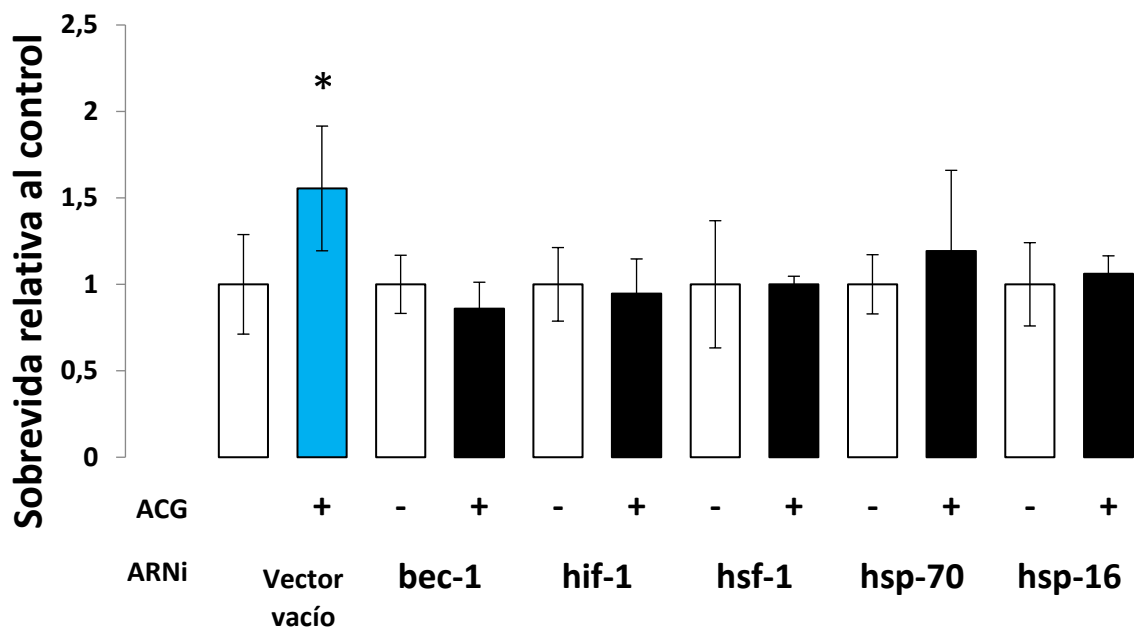


Figura 15: Tasa de sobrevivencia relativa de gusanos DA2123 depletados de *bec-1*, *hif-1*, *hsf-1*, *hsp-70*, and *hsp-16* mediante el uso de ARNi expuestos a ACG (1.4  $\mu$ M) o DMSO sometidos a estrés térmico. (\*) Diferencias significativas para los resultados de las muestras respecto al control correspondiente sin el agregado de ACG ( $p < 0.05$  LSD Fisher).

Como se observa en el gráfico, luego de la incubación con ACG sólo los gusanos que incorporaron el vector vacío (control) mostraron un incremento significativo en la sobrevivencia post estrés. Ninguna de las poblaciones restantes mostró un incremento en la sobrevivencia en relación a su propio control, evidenciando la participación de los genes en estudio, en la termotolerancia inducida por ACG.

#### 4.4. - Discusión y conclusión

##### 4.4.1. - Discusión

Estudios previos reportaron que ACG es capaz de extender la expectativa de vida de *C. elegans* en dosis que van desde los 50 a los 2000  $\mu\text{M}$ . Además, la concentración de 50  $\mu\text{M}$  fue descrita como la dosis más activa y capaz de generar un efecto de termotolerancia sobre el modelo (147). También se reportó que ACG fue el mayor compuesto bioactivo presente en los frutos de tomate responsable de conferir termotolerancia en *C. elegans* (146) y que la dosis activa de ACG se encuentra en un amplio rango de concentraciones que van desde 0.14 a 14  $\mu\text{M}$ .

Zheng y col (2017) (147) demostraron que la extensión de la expectativa de vida generada por ACG ocurría a través de la activación de DAF-2/DAF-16.

La vía de señalización del receptor de insulina DAF-2, es considerada una de las vías principales que participa en el incremento de la resistencia al estrés y produce una extensión de la vida (156). Aquí se evaluó si la vía DAF2/DAF16 también contribuía a mejorar la termotolerancia inducida por ACG. Los resultados mostraron que ACG incrementó la sobrevivencia posterior a estrés térmico en gusanos mutantes DAF-2 y DAF-16, evidenciando que la termotolerancia no es dependiente de esas vías. En el mismo trabajo de Zheng y col (2017) (147) también fue reportado que la extensión de vida mediada por ACG podría ser en parte dependiente de HIF-1. Aquí encontramos que evidentemente HIF-1 es requerido para obtener la termotolerancia inducida por ACG, ya que este compuesto no fue capaz de inducir termotolerancia en una población de gusanos deficientes de HIF-1.

Por otro lado, encontramos que la incubación con ACG, antes de someter la población a estrés térmico, incrementa los niveles proteicos de HIF-1 y su actividad como factor de transcripción. Además, se observó que el incremento en los niveles de HIF-1 por aclimatación al calor o Cloruro de Cobalto (64) fue suficiente estímulo para aumentar la tolerancia al estrés térmico. Esto es consistente con un reporte previo que revela que la aclimatación al calor en *C. elegans* no solo incrementa la termotolerancia a través de la actividad de HIF-1 sino que también, puede ser inducida por la tolerancia a metales pesados (cadmio) y la hipoxia química (63). Por lo tanto, podemos concluir que HIF-1 es requerido en *C. elegans* para desarrollar la termotolerancia inducida por ACG.

Adicional de lo anteriormente descrito, nuestro interés se enfocó en conocer como HIF-1 estaba siendo regulado por ACG. HIF-1 es un factor de transcripción que es estabilizado bajo condiciones de hipoxia (157). Las mitocondrias censan la hipoxia y generan EROs, las cuales se presupone, participan en la estabilización de la proteína HIF-1 (158). En *C. elegans* se ha reportado que la inhibición en la cadena transportadora de electrones, incrementa las EROs, HIF-1 y la expectativa de vida de los gusanos (159). También se ha reportado que dosis definidas de ACG inducen la producción de EROs en células (160) (161). Por lo tanto, es posible que ACG incremente las concentraciones de HIF-1 a través de un aumento de EROs. En este trabajo observamos que en los gusanos incubados con ACG a 20 °C por 18 h se produjo un leve incremento en los niveles de EROs. En estos resultados no hay una participación de DAF-16, y de esta manera se postula que la actividad de ACG no requiere de esta vía. Se evidencia que ACG podría estar induciendo EROs y explicar el incremento de HIF-1. Lo cual podría ser explicado, ya que los niveles de EROs en mutantes de HIF-1 no se incrementaron con la incubación con ACG, sugiriendo que la generación de EROs podría ser mediada vía HIF-1. Un efecto similar fue reportado por Hwang y col (2014) (161), donde el incremento del EROs total y los niveles de peróxido de hidrogeno en los nematodos silvestres producido por bajas dosis de paraquat (un inhibidor de respiración mitocondrial) fueron abolidos en los mutantes de HIF-1. En este trabajo se encontró que algunas cepas que poseen niveles constitutivos de HIF-1 elevados, también exhiben un nivel elevado de EROs, pero no de todas las especies (no peróxido de hidrógeno), evidenciando que HIF-1 podría estar modulando solo algunas de las especies que componen las EROs. Los autores

propusieron que HIF-1 contribuye a la amplificación de EROs mediante la regulación de expresión de genes relacionados con la homeostasis del hierro.

Para continuar el estudio, se evaluó el estado antioxidante de los gusanos expuestos a ACG mediante el análisis de la actividad de enzimas antioxidantes como catalasa y superóxido dismutasa. Se encontró que ACG no altera la actividad de la enzima catalasa, pero modifica la actividad de SOD. Tomando en cuenta estos resultados, y los resultados reportados por Hwang y col. (2014) (161), podemos pensar que es posible que ACG induzca la actividad de HIF-1 mediante un mecanismo similar al utilizado por paraquat. De este mecanismo podemos proponer que HIF-1 contribuye a la amplificación de EROs mediante una reducción de la actividad de SOD (mediante un incremento de las especies superóxido). Respecto a esto, Du y col. (2017) (160) propuso que la producción de EROs inducida por ACG, es generada por un incremento de la actividad de NADPH oxidasa en las células endoteliales, y también contribuiría a la generación de anión superóxido. Otros estudios serían requeridos para entender mejor como HIF-1 es inducido por ACG y como contribuye a la generación de EROs.

De la misma manera, nos propusimos evaluar los efectores río-abajo de HIF-1 inducidos por ACG. La autofagia, es un proceso de degradación lisosomal que genera un mecanismo citoprotectivo el cual juega un papel esencial en la homeostasis celular. Kumsta y col. (2017) (151) reportaron que la hormesis térmica en *C. elegans* extiende la expectativa de vida, incrementa la termotolerancia y la autofagia a través del factor de shock térmico (HSF-1). A su vez, HIF-1 también participa en la aclimatación al calor (63) y extensión de sobrevivencia (148). Por lo tanto, nos propusimos estudiar si el incremento de HIF-1 inducido por ACG también está interconectado con HSF-1 y autofagia. Encontramos que los gusanos expuestos a ACG a 20 °C incrementaron notoriamente el número de autofagosomas en condiciones de hormesis térmica. Sin embargo, los gusanos depletados de HIF-1 y HSF-1 expuestos a ACG mostraron una reducción del número de autofagosomas en relación al control sin ACG. Estos resultados evidenciaron que existe una dependencia entre la autofagia inducida por ACG y los factores de transcripción HIF-1 y HSF-1.

Adicionalmente, en condiciones de hormesis térmica los gusanos depletados de HSF-1 mostraron una reducción en el número de autofagosomas, mientras que los gusanos

depletados de HIF-1, bajo las mismas condiciones mostraron un incremento en los autofagosomas respecto a los controles a 20 °C. Estos resultados indicaron que la autofagia inducida por hormesis térmica requiere de HSF-1, de acuerdo con lo reportado por Kumsta y col (2017) (151), pero no requiere del factor HIF-1.

Luego examinamos el rol de los efectores de HSF-1: HSP-70 y HSP-16, sobre la autofagia inducida tanto por ACG como por hormesis térmica. Notablemente, los gusanos depletados de HSP-70 expuestos a ambos tratamientos, mostraron en ambos casos, una reducción en el número de autofagosomas, mientras que los gusanos depletados de HSP-16 mostraron que el número de autofagosomas fue reducido en la incubación con ACG, pero fue incrementado en condiciones de hormesis térmica. Estos resultados indican que la autofagia inducida por hormesis y ACG requiere tanto de HSP-70 como de HSF-1. Por otro lado, HSP-16 es requerido para que ACG induzca autofagia, pero no para que la autofagia sea inducida por hormesis térmica. Estos resultados evidencian regulaciones diferenciadas de HSF-1 para HSP-70 y de HIF-1 para HSP-16 en la inducción de autofagia. Finalmente encontramos que bloqueando la autofagia por la alteración del gen *bec-1*, se produce una pérdida la termotolerancia conferida por ACG. El mismo efecto fue observado en gusanos con autofagia reducida por HIF-1, HSF-1, HSP-16 o HSP-70, lo que revela la contribución imprescindible de la autofagia a la resistencia al estrés térmico.

#### 4.4.2. - Conclusión

El ACG es un compuesto natural bioactivo fuertemente asociado con el desarrollo de termotolerancia en *C. elegans*.

Los estudios mecanísticos desarrollados, evidenciaron un posible modo de acción del ACG para conferir termotolerancia en *C. elegans*. La incubación con ACG previa a ingresar al estrés térmico, genera en los nematodos una inducción en la actividad del factor de transcripción HIF-1. La activación de HIF-1 es requerida para obtener una tolerancia incrementada frente al estrés térmico. La incubación con ACG también genera un incremento en los niveles de EROs y altera la actividad de SOD, lo que podría estar causando la inducción de HIF-1. Por debajo de HIF-1, se observó que posterior a la incubación con ACG, la autofagia es activada por un mecanismo similar al reportado por

las condiciones de hormesis térmica (68). Sin embargo, aquí la autofagia es activada por HIF-1 mediante HSP-70/HSP-16 a diferencia de lo que sucede con la hormesis. Finalmente, se definió que la inducción de autofagia es requerida para conferir termotolerancia, probablemente incrementando en *C. elegans* la habilidad de contrarrestar el daño producido por el estrés térmico.







**CAPITULO 5**  
**COMPUESTOS**  
**ELECTRÓFILOS**



## CAPÍTULO V: COMPUESTOS ELECTROFILOS

### 5.1. - Introducción

En la segunda parte de este trabajo doctoral, nos enfocamos en la búsqueda de compuestos electrófilos presentes en el fruto del tomate y en determinar sus actividades biológicas.

Un electrófilo es un reactivo químico atraído hacia zonas ricas en electrones que participa en una reacción química aceptando un par de electrones formando un enlace con un nucleófilo (molécula rica en electrones). En los sistemas biológicos aquellas moléculas ricas en átomo de O, N, o S se considerarán nucleófilas y es por ello que las proteínas son blancos frecuentes de ataque electrófilos, sobre todo las que poseen aminoácidos como lisina, histidina, cisteína y metionina (162) (163) (164).

Los electrófilos pueden formarse endógenamente, por ejemplo a través de vías de peroxidación lipídica, tanto enzimáticas como no enzimáticas (165), o de nitración de ácidos nucleicos y lípidos (166) (167). Existen diferentes tipos de electrófilos los cuales tienen diferentes reactividades con los nucleófilos, debido a la forma y energía de sus orbitales externos. Los electrófilos suaves, tienden a reaccionar con nucleófilos suaves (grupos tioles en cisteínas y grupos aminos primarios o secundarios de lisina e histidina) y por el contrario los electrófilos duros reaccionan con los nucleófilos duros (por ejemplo, una molécula de ADN). La “suavidad” de un nucleófilo está dada por la polarizabilidad de los electrones de valencia.

La interacción de compuestos electrófilos con grupos tioles de las proteínas puede modular vías de señalización celular que participan en procesos de control de la homeostasis celular. Estas proteínas sensibles a electrófilos están involucradas en un gran número de procesos celulares fisiológicos y patológicos, sobre todo relacionadas con el control de la expresión de enzimas de detoxificación, las cuales son vitales cuando el organismo se enfrenta a situaciones de estrés. Un ejemplo de ello se ha observado con los nitrolípidos, compuestos electrófilos que reaccionan con grupos tioles de la proteína Keap1 e inducen la señalización de Nrf2, activan la expresión génica de

respuesta al estrés térmico e inhiben la señalización mediada por NF- $\kappa$ B, induciendo una respuesta antiinflamatoria y protectora de tejidos (168).

Siguiendo el mismo esquema de análisis de la primera parte de la tesis, se optimizó un método para medir la actividad electrofílica en extractos de frutos de una población de tomate y se analizó su composición de compuestos lipofílicos. Posteriormente, los compuestos electrófilos fueron detectados e identificados por HPLC-EM y fraccionados para el análisis de su bioactividad.

Para estudiar la bioactividad, se propuso analizar el efecto en conferir termotolerancia en *C. elegans* y evaluar la/s vía/s de señalización que podrían estar siendo moduladas por los electrófilos.

Con este estudio se logró: a) destacar compuestos naturales bioactivos adicionales a los antioxidantes convencionales, que serían un aporte de importancia en el estudio de las propiedades nutraceuticas del tomate, y b) hacer un aporte al entendimiento de su mecanismo de acción.

## 5.2. - Cuantificación de actividad electrofílica

Para poder avanzar en este objetivo, fue necesario adaptar y mejorar una metodología de cuantificación para obtener un ensayo lo suficientemente sencillo, rápido y confiable para ser utilizado en el laboratorio y que brinde información acerca de la actividad electrofílica presente en los extractos de tomate.

A partir del trabajo de Chipinda, 2010 (57) se desarrolló un ensayo cinético espectrofotométrico que involucra la reactividad de un electrófilo con el p-nitrobenzenotiol (NBT) (Figura 1).

Este tipo de estudio cinético se fundamentó en el hecho de que un nucleófilo (el grupo tiol del NBT) puede atacar un centro deficiente de electrones presente en un compuesto electrófilo, causando una sustitución. En condiciones normales, el NBT presenta su máxima absorptividad a 412 nm [mayor coeficiente de absorptividad molar ( $\epsilon$ )] pero

cuando su grupo tiol está comprometido químicamente, su máxima absorbancia presenta un corrimiento a 314 nm, lo cual permite monitorear la reacción.

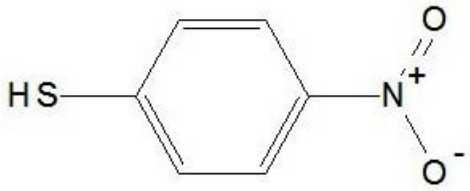


Figura 1: p- nitrobenzenotiol. (Chipinda et.al 2017, Chem Res Toxicol)

Para evaluar el funcionamiento de este método se utilizó el dinitroclorobenceno (CDNB) (Figura 2) como electrófilo de referencia. El CDNB es un reconocido electrófilo suave que se une irreversiblemente a proteínas como la albumina sérica humana, a citoqueratina y a la cofilina (169). Cuando CDNB reacciona con el NBT mediante un mecanismo de sustitución, el tiol presente en el NBT ataca el anillo de benceno del CDNB, y esta pérdida de tiol libre se expresa como una disminución en la coloración del reactivo.

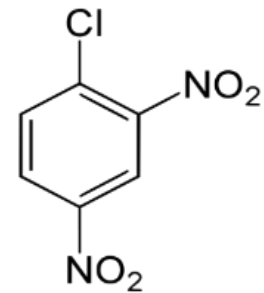


Figura 2: dinitroclorobenceno (Chipinda et.al 2017, Chem Res Toxicol)

El CDNB fue utilizado para ajustar y optimizar las condiciones del ensayo y realizar las curvas de calibración. Las actividades electrofílicas finalmente pudieron ser expresadas como equivalentes mM de CDNB y posteriormente las actividades cuantificadas en las muestras de tomate se expresaron como equivalentes mM de CDNB/g tomate.

#### 5.2.1. - Parámetros óptimos de cuantificación

La concentración del reactivo NBT fue elegida a partir de los valores de absorbancia inicial y las pendientes de decaimiento cuando se enfrentaba con el testigo de referencia. La concentración 0.2 mM de NBT nos garantizó una absorbancia inicial aceptable lo suficientemente alta para evidenciar un decaimiento, y que estaba incluida en el rango de linealidad del espectrofotómetro. Se determinó que la reacción mostraba un patrón lineal hasta los 60 minutos, y por razones de practicidad se eligió llevar a cabo

una reacción de 30 minutos (Figura 3 a). En estas condiciones, la curva dosis respuesta con CDNB presentó una respuesta lineal en un rango de concentraciones entre 0.03 y 1 mM (Figura 3 b).

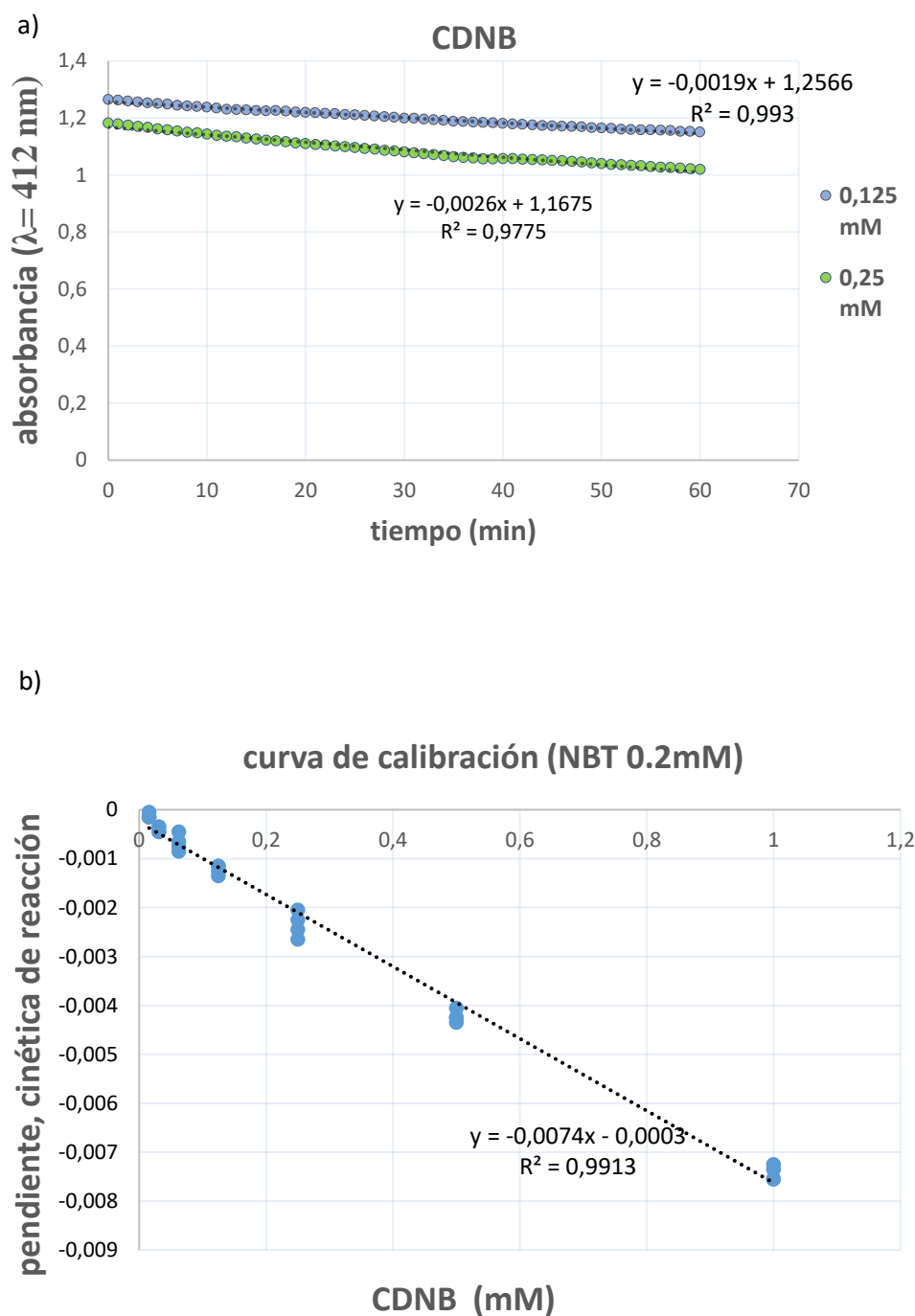


Figura 3: a) Decaimiento de la Abs de la muestra a lo largo del tiempo, utilizando concentraciones

diferentes de CDNB. b) Curva de calibración, se grafica la cinética de reacción (decaimiento de la absorbancia vs tiempo) resultante de la reacción entre NBT 0,2 mM y diferentes concentraciones de CDNB.

Luego de establecer los parámetros óptimos del método para llevar a cabo las determinaciones, se realizó la cuantificación de las actividades electrofílicas en los extractos de tomate.

#### 5.2.2. - Cuantificación de actividad electrofílica en extractos hidrofílicos y lipofílicos

A modo de prueba se evaluó la actividad electrofílica en extractos hidrofílicos y lipofílicos de algunos cultivares disponibles analizados en el capítulo 3 y se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla I).

Cultivar	Actividad Electrofílica hidrofílico	Actividad Electrofílica lipofílico
3837	no detectado	0,6104
3818	no detectado	0,4576
3831	no detectado	0,4396
3842	no detectado	0,2341
553	no detectado	0,5467
572	no detectado	2,3268

Tabla I: Valores de actividad electrofílica en mM CDNB/g tomate fresco, para ambos extractos obtenidos a partir de diferentes cultivares de tomate.

Las determinaciones realizadas en las fracciones hidrofílicas no arrojaron valores de actividad electrofílica cuantificables mediante nuestro método, incluso cuando las muestras tenían actividad antioxidante significativa (resultados no incluidos). Por otro lado, las fracciones lipofílicas presentaron diferentes actividades electrofílicas entre los cultivares. Estos primeros resultados muestran que la fracción lipofílica del tomate presenta la mayor proporción de electrófilos (Tabla 1).

En base a estos resultados, se propuso abordar el estudio de la actividad electrofílica en el extracto lipofílico del fruto de tomate. Por no disponer de frutos de la población de tomates andinos analizada previamente, se propuso emplear una población de tomates originadas de materiales contrastantes de color, forma y tamaño detallada en el capítulo II de materiales y métodos (página 18).

Los resultados del análisis de la actividad electrofílica de extractos lipofílicos de la población se presentan en la Figura 4.

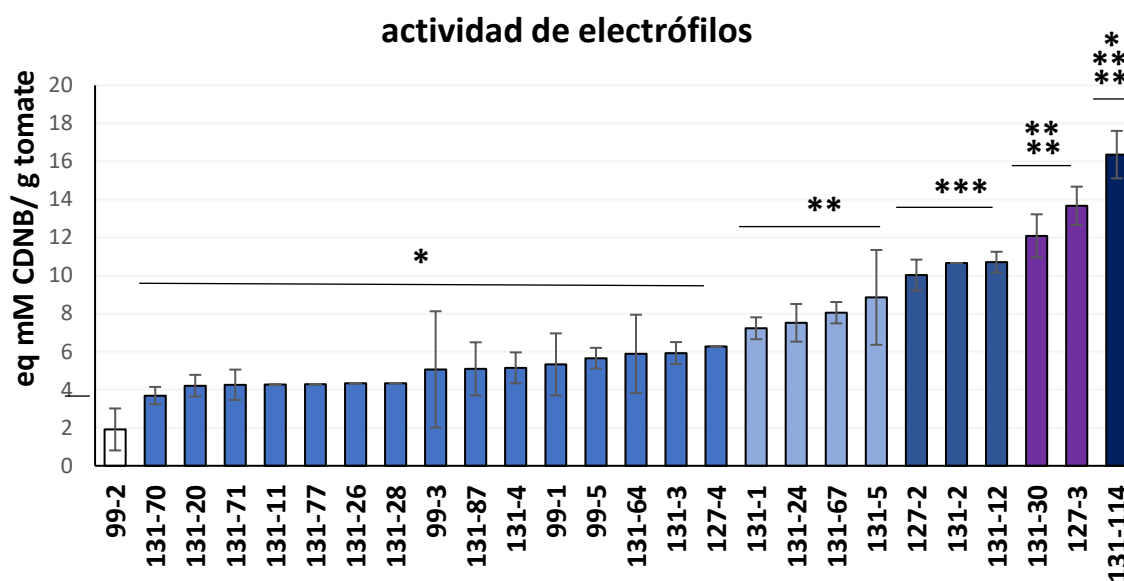


Figura 4: Actividades electrofílicas cuantificadas como eq. mM de CDNB por gramos de tomate liofilizado. (\*) Diferencias significativas para los resultados entre las muestras ( $p < 0.05$  LSD Fisher).

Los resultados muestran actividades electrofílicas en la población, que van desde 1.9 hasta más de 16.3 eq mM de CDNB por g de tomate liofilizado, evidenciando diferencias entre los cultivares.

### 5.3. - Cuantificación e identificación de pigmentos

Posteriormente, se propuso analizar los pigmentos en los frutos de la población en estudio. Las determinaciones para cuantificar y determinar la composición de pigmentos de los frutos se realizaron por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) según el procedimiento desarrollado en el capítulo II de materiales y métodos (páginas 25 y 26).



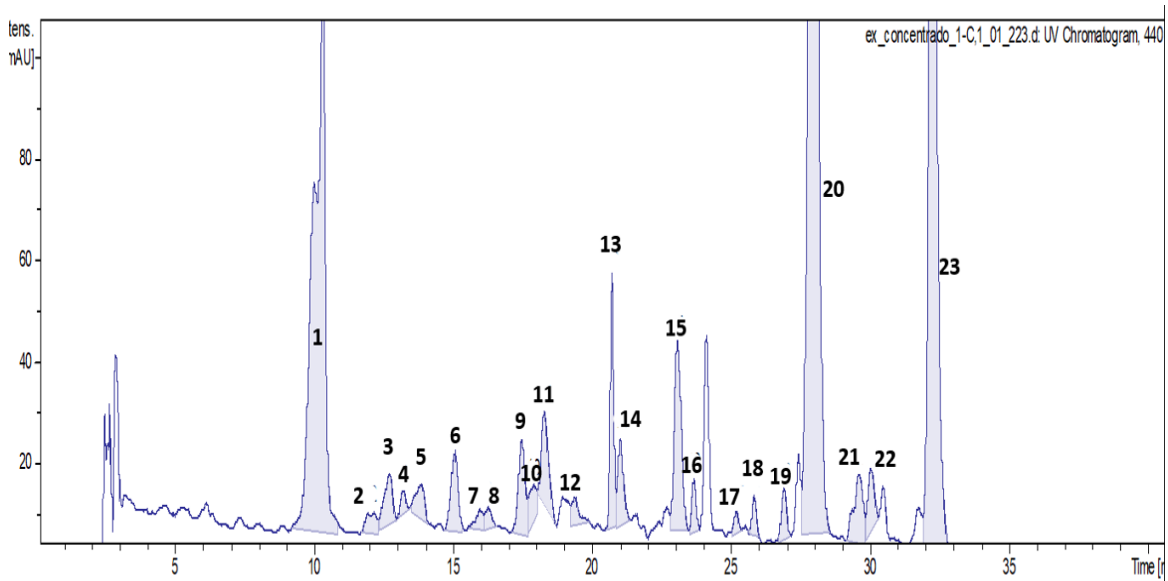


Figura 5: Cromatograma obtenido a 440 nm donde se aprecian los 23 picos obtenidos al inyectar las muestras lipofílicas.

Los criterios de identificación de los compuestos individuales fueron los tiempos de retención y la comparación con los espectros de absorción uv-visibles de cada pico con datos bibliográficos o con los espectros producidos cuando se utilizaban estándares comerciales (en el caso de que estuvieran disponibles) (ANEXO I, pág 126). Para continuar con los análisis estadísticos se etiquetó a cada pico con un número consecutivo de acuerdo al orden de elución (Figura 5).

La cuantificación se realizó en función del área de cada pico y se eligió una unidad arbitraria para realizar la comparación entre cultivares (ANEXO I, Tabla 2, pág. 160).

Se cuantificaron 23 picos provenientes de los extractos lipofílicos de tomate. De los 23 picos sólo pudieron identificarse 11, los cuales son: 1= luteína, 11= di-hidroxicopeno, 13= licoxantina, 14= licopeno-1,2,1,2-diepóxido, 15= cis-violaxantina, 16= prolicopeno, 19= ( $\epsilon$ )-5,6,5',8'-diepoxi-5,5,5',8'-tetrahidro- $\beta$ - $\beta$ -caroteno, 20= licopeno, 21= neurosporeno, 22= trans- $\gamma$ -caroteno, 23= trans- $\beta$ -caroteno.

Los resultados obtenidos a partir de la cuantificación de pigmentos de la población de tomate en estudio, se muestra en la Figura 6.

### Cuantificación de compuestos lipofílicos

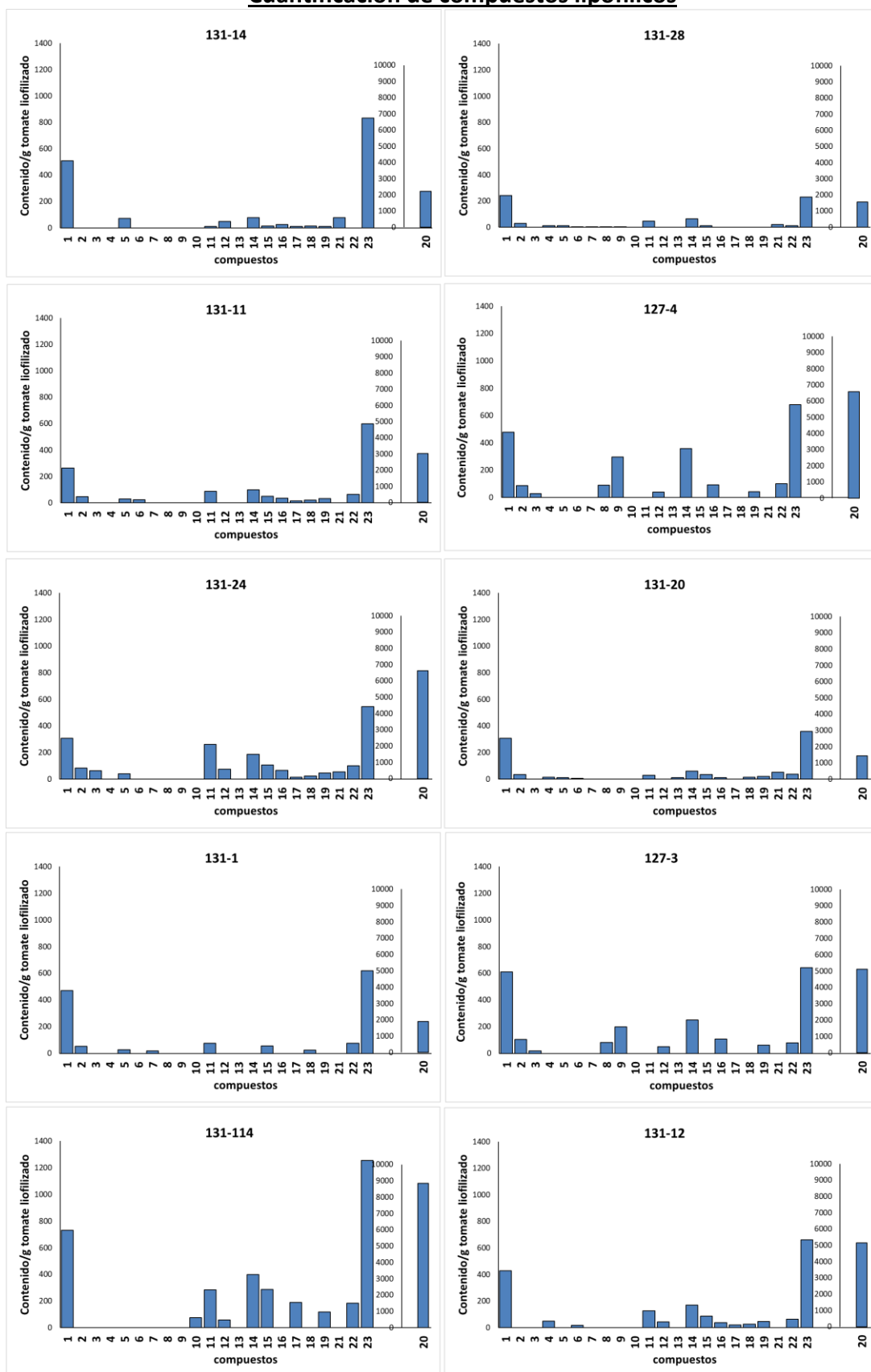


Figura 6- continúa en la siguiente página -

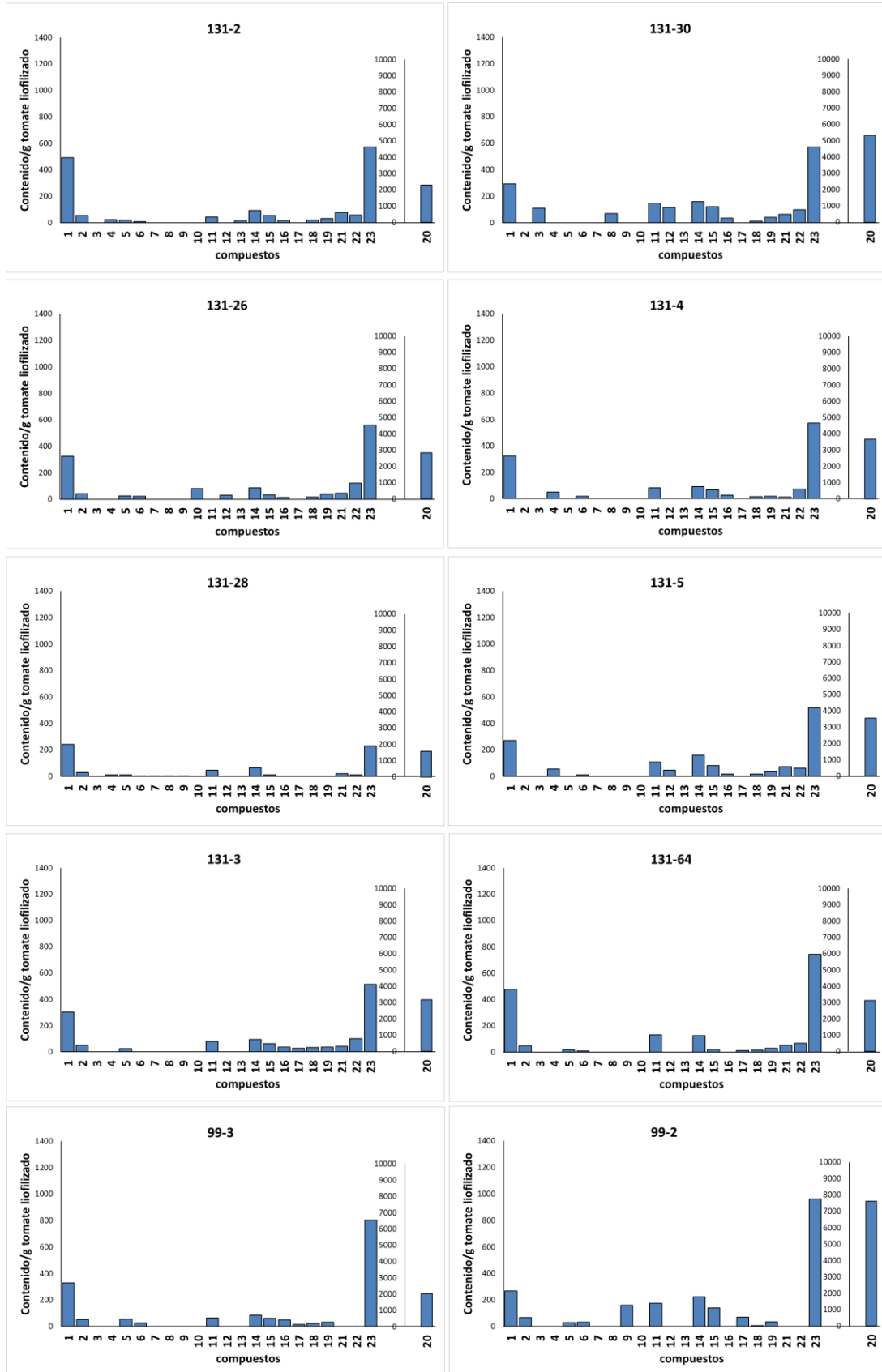


Figura 6- continúa en la siguiente página -

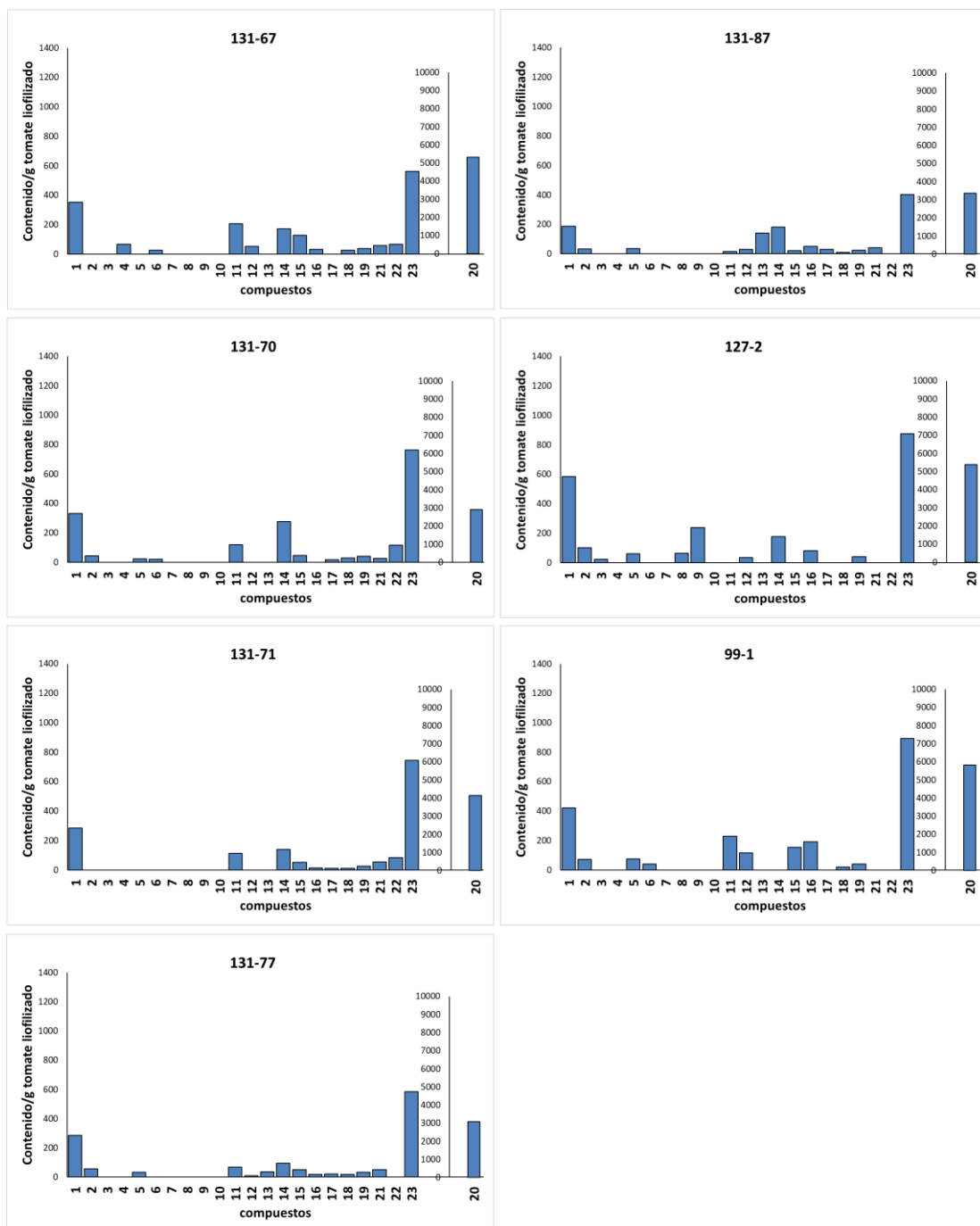


Figura 6: Concentración de los 23 compuestos identificados por cromatografía, para cada una de las accesiones analizadas. A cada compuesto se le asignó un número de acuerdo al orden de elución de la corrida cromatográfica. Los picos identificados corresponden a: 1= luteína, 11= di-hidroxilicopeno, 13= licoxantina, 14= licopeno-1,2,1,2-diepóxido, 15= cis-violaxantina, 16= prolicopeno, 19= ( $\epsilon$ )-5,6,5',8'-diepoxi-5,5,5',8'-tetrahidro- $\beta$ - $\beta$ -caroteno, 20= licopeno, 21= neurosporeno, 22= trans- $\gamma$ -caroteno, 23= trans- $\beta$ -caroteno.

Entre los cultivares se observan diferencias significativas en el contenido y composición de pigmentos. Con excepción de luteína, licopeno y  $\beta$ -caroteno que están presentes en todos los cultivares a diferentes concentraciones, el resto de los compuestos están

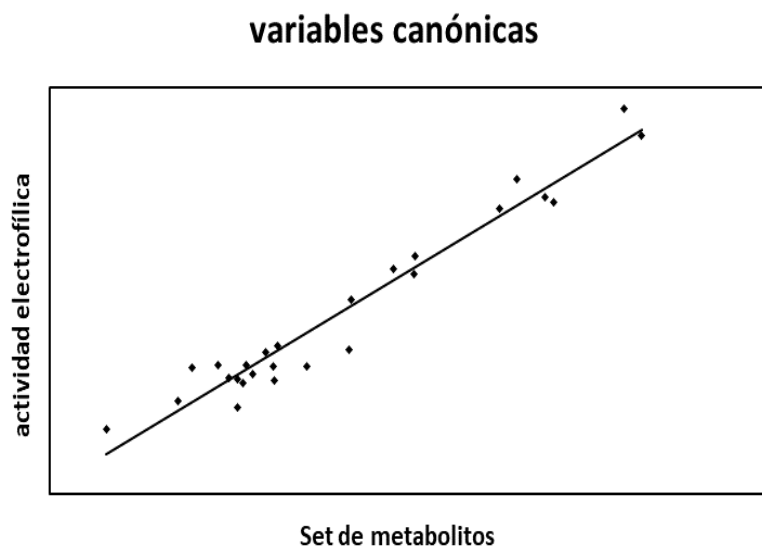
presentes en solo algunas de las muestras. Estos resultados nos indican que existe una amplia variabilidad de compuestos en las muestras, que podría ser la causante de las diferencias en la actividad electrofílica anteriormente cuantificada.

#### 5.4. - Relación entre actividad electrofílica y pigmentos identificados

Con los datos previamente obtenidos, se realizó un análisis de correlaciones canónicas, con el fin de comprender mejor las asociaciones existentes entre actividad electrofílica y composición de pigmentos.

El análisis de correlaciones canónicas mostró una correlación positiva y significativa ( $r=0.95$ ,  $p=0.03$ ) entre el conjunto de metabolitos derivados de pigmentos y la actividad electrofílica (Figura 7 A)). La contribución de cada metabolito a esta asociación puede observarse en la Figura 7 B), donde los compuestos licopeno (C20) y  $\beta$ -caroteno (C23) muestran valores elevados que los relacionan positivamente con la actividad cuantificada (coeficiente de correlación mayor a 0.5). Por el contrario, algunos compuestos como el C21, mostraron coeficientes de correlación negativos indicando que su presencia se relaciona inversamente con la actividad electrofílica observada para este conjunto de muestras.

A)



B)

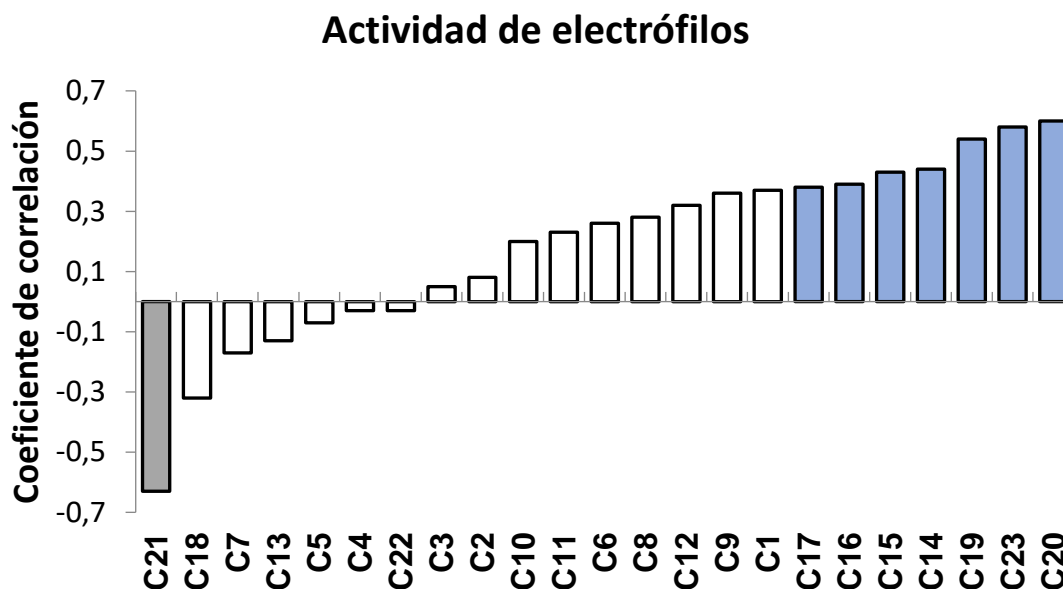


Figura 7: Correlaciones halladas entre los 23 compuestos presentes en las muestras analizadas y las actividades electrofílicas cuantificadas. Las diferencias significativas entre muestras ( $p < 0.05$ , Scott y Knott test) se representan con barras de diferente color.

Para corroborar estas asociaciones e identificar los compuestos responsables, se procedió a evaluar la actividad electrofílica en fracciones provenientes de un extracto lipofílico obtenidas en el análisis de pigmentos por HPLC. Para realizar el fraccionamiento se eligió la muestra 131-2, la cual poseía un valor medio de actividad de electrófilos. Para ello, se colectaron fracciones cada 5 minutos de elución, obteniendo 7 fracciones que incluyen todos los compuestos cuantificados en el análisis (Figura 8).

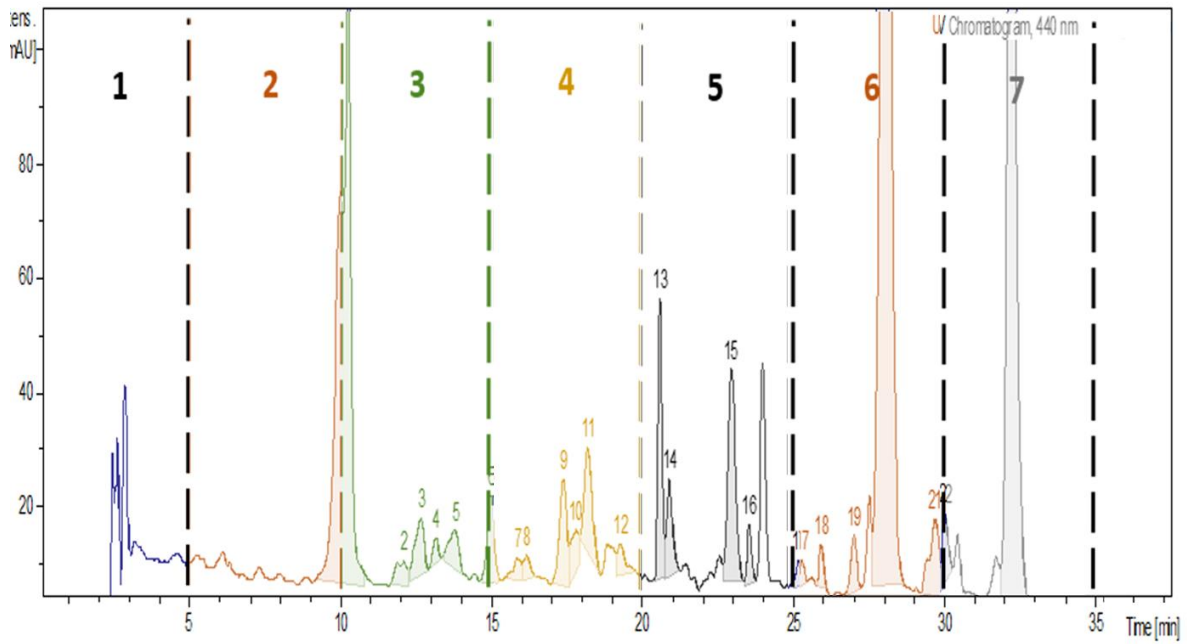


Figura 8: Diagrama de las fracciones colectadas. En la imagen se pueden observar que picos quedaron incluidos en cada una de las fracciones.

Las 7 fracciones obtenidas fueron secadas en corriente de Nitrógeno gaseoso y reconstituidas en DMSO para la cuantificación de la actividad electrofílica. De esta manera se intentó identificar y aislar el conjunto de compuestos responsables de la actividad electrofílica observada en el extracto.

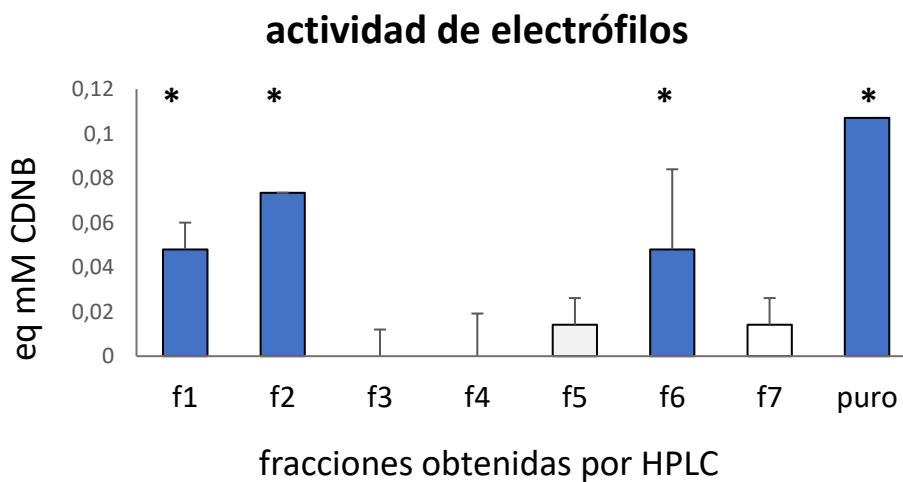


Figura 9: Actividad electrofílica correspondientes a las 7 fracciones y al extracto puro sin fraccionar. Los valores de actividad se expresan como eq. mM de CDN B. \* significa diferencias significativas (p<0,05).

Los resultados de la actividad electrofílica de cada fracción están representados en la Figura 9. Se observa que solo las fracciones 1, 2, 5, 6 y 7 mostraron una actividad electrofílica superior al límite de detección, pero solo las fracciones 1, 2 y 6 mostraron una actividad superior al límite de cuantificación del método.

El análisis de correlación mostró a los compuestos licopeno,  $\beta$ -caroteno y C19 poseían los valores más positivos de correlación. Teniendo en cuenta este análisis, licopeno y C19 podrían ser los responsables de la actividad detectada en la fracción 6. Sin embargo, en la fracción 7 donde eluye  $\beta$ -caroteno no se cuantificó actividad electrofílica. Por otro lado, en la fracción 2, donde observamos el mayor valor de actividad, solamente eluye luteína (con detección a 440 nm) la cual no mostró una asociación significativa con la actividad electrofílica en el análisis de correlaciones. Finalmente, en la fracción 1, donde se observa una buena actividad electrofílica, no se registró ningún pico a 440 nm.

Estos resultados ponen en evidencia que la actividad electrofílica está siendo generada por compuestos no detectados en nuestro sistema de análisis. Por lo tanto, para su correcta detección, fue necesario desarrollar una estrategia de análisis diferente.

#### 5.4.1. - Identificación de compuestos electrófilos por espectrometría de masas

Para llevar a cabo esta identificación, se propuso un estudio dirigido a los compuestos que reaccionen con el NBT. Empleando el mismo sistema de análisis de pigmentos, pero acoplado a un detector de espectrometría de masas (QTOF) y se procedió a analizar la desaparición o reducción de compuestos producto de la reacción con el NBT. Para ello se inyectó un extracto lipofílico, y se comparó posteriormente con el mismo extracto reaccionado con NBT durante 1 hora.

Para la identificación de los compuestos electrófilos, se utilizaron dos estrategias:

1. Identificación a partir de una búsqueda bibliográfica de compuestos electrófilos derivados de pigmentos. Se conformó una lista de compuestos que posteriormente fueron buscados en todos los tratamientos.
2. Búsqueda no dirigida de compuestos mediante el uso de programas de análisis, como MzMine y Matlab. De esta forma se obtiene el total de iones con sus respectivas áreas registradas en la corrida y con ello la detección de todos los picos que generaban



diferencias significativas entre el extracto antes y después de reaccionar con el NBT. La potencial identificación de estos iones fue realizada por la masa exacta en librerías de espectros de masas (bases de datos de metabolómica [www.metabolomicsworkbench.org](http://www.metabolomicsworkbench.org), [www.nist.gov](http://www.nist.gov)).

Del análisis anterior se obtuvieron 15 compuestos, que disminuyeron o redujeron significativamente su área luego de la adición del NBT, indicando reactividad con el NBT (Tabla II).

Metabolitos que disminuyen luego de reaccionar con NBT				
Fracción	ion	Nombre del compuesto	Grupo funcional	% de reducción del área
1	415.26	$\epsilon$ -apo-8'-lutenial	Aldehído	54.61
1	536.28	No identificado	No identificado	79.27
1/2	551.35	[M+H-18] <sup>+</sup> diepoxi- $\beta$ -caroteno/semi- $\beta$ -carotenona	Cetona	57.96
2	313.27	$\beta$ -apo-14-carotenal	Aldehído	67.16
2	419.24	8'-apo- $\beta$ -carotenol/al	Aldehído	42.35
2	427.29	apo-10'-licopenal	Aldehído	58.33
2	453.32	(3R)-3-hidroxi-8'-apo- $\beta$ -carotenal	Aldehído	62.96
2	549.31	3'-hidroxi- $\epsilon,\epsilon$ -caroten-3-ona [M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	Cetona	39.39
2	259.20	13-apo- $\beta$ -carotenona/apo-13-licopenona	Cetona	23.08
2	379.27	10'-apo- $\alpha$ -caroten-10'-ol	Alcohol	41.18
2	381.27	No identificado	No identificado	20.00
2	455.33	No identificado	No identificado	26.47
2	425.31	6'-apo- $\beta$ -carotenal	Aldehído	28.57
2/3	439.33	No identificado	No identificado	28.57
3	455.33	No identificado	No identificado	21.88

Tabla II: Compuestos identificados mediante la reacción con NBT, que generaron diferencias significativas entre los picos generados a 0 y 60 minutos de la reacción con NBT.

De los 15 compuestos encontrados, sólo 10 compuestos pudieron ser tentativamente identificados y clasificados por sus grupos químicos funcionales. Como el procedimiento de separación fue el mismo que para el análisis de pigmentos, conociendo el tiempo de retención (Rt) de dichos compuestos, se pudo determinar en cuál de las 7 fracciones estudiadas eluían estos compuestos.

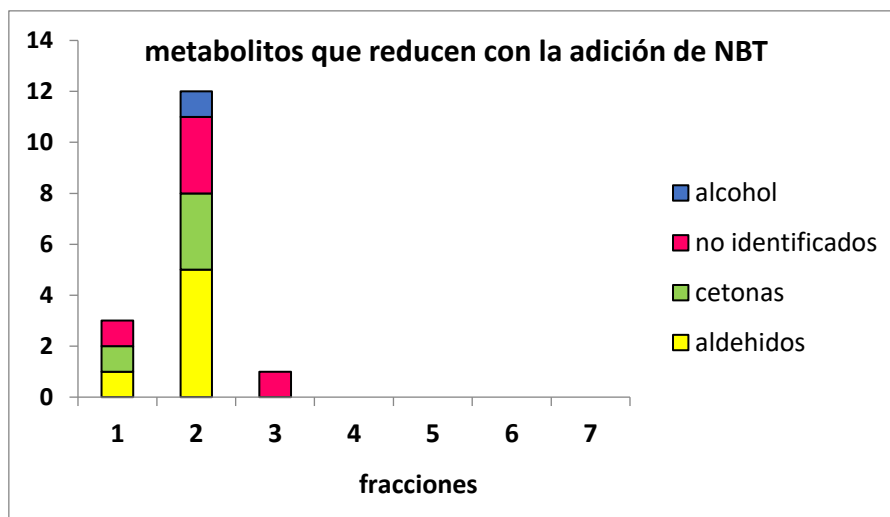


Figura 10: Clasificación de los compuestos identificados mediante búsqueda bibliográfica, según su naturaleza química.

En la Figura 10 se grafica el número de compuestos que eluyen en cada fracción por grupo funcional. De esta manera pudimos observar que la totalidad de los compuestos que se modifican posteriormente a la adición del NBT, se encuentran en las primeras 3 fracciones, siendo la fracción 2 la que más compuestos contiene. Estos resultados ponen en evidencia la presencia de ciertos compuestos no detectados por espectrofotometría a 440 nm, que son potenciales electrófilos por su interacción con NBT. La mayoría de los compuestos identificados (Tabla II), son derivados oxigenados de carotenos, lo cual explicaría la correlación hallada entre estos compuestos y la actividad electrofílica cuantificada en la población.

El porcentaje de reducción de área para cada compuesto, nos da una idea de la magnitud de la reactividad con el NBT. Teniendo en cuenta este parámetro, se puede observar que la reactividad de los compuestos es mayor en la fracción 1, seguida de la fracción 2 y por último los de menor reactividad se observan en la fracción 3. La diferencia en

reactividad de los compuestos presentes en las diferentes fracciones, estaría correlacionándose con las actividades electrofílicas cuantificadas previamente, ya que no solo la cantidad de compuestos en cada fracción otorgaría actividad, sino que dicha actividad varía dependiendo de la intensidad con que estos compuestos reaccionan con el reactivo NBT.

### 5.5. - Determinación de la actividad biológica

En el segundo objetivo específico propuesto (página 13) se buscó demostrar el efecto biológico de los compuestos electrófilos identificados en el extracto de tomate. En primera instancia se propuso evaluar si un compuesto electrófilo puede generar tolerancia al estrés térmico en nematodos *C. elegans*. Para esto, se usaron diferentes concentraciones de CDNB adicionadas al agar de la placa de ensayo donde posteriormente se expuso a los gusanos, previo a ingresar al estrés térmico tal y como se describe en materiales y métodos del capítulo II (página 30). Los resultados de sobrevivencia de este ensayo se presentan en la Figura 11.

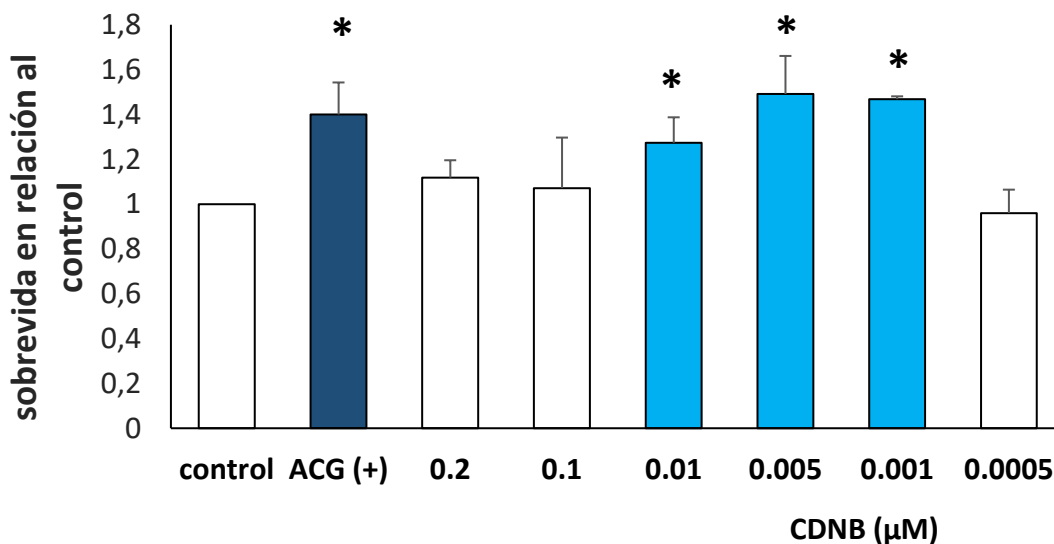


Figura 11: Curva dosis respuesta del CNDB sobre la sobrevivencia frente al estrés térmico en la cepa N2 (\*) Diferencias significativas para los resultados de las muestras respecto al control sin agregado de CDNB ( $p < 0.05$  LSD Fisher). Se utilizó ACG como control positivo.

Las concentraciones entre 0.01 y 0.001  $\mu\text{M}$  de CDNB mostraron un aumento significativo de la sobrevivida post estrés respecto al control. Estos resultados ponen en manifiesto que un compuesto electrófilo en determinadas dosis puede producir un incremento en la tolerancia al estrés térmico en *C. elegans*.

5.5.1. - Estudio de la actividad de termotolerancia en el extracto lipofílico y sus fracciones obtenidas por HPLC

Para analizar la actividad de termotolerancia en *C. elegans* de los compuestos electrófilos, se utilizó el mismo extracto lipofílico analizado por HPLC, obtenido a partir de la muestra 131-2. Este extracto fue secado bajo flujo de  $\text{N}_2$  gaseoso, se resuspendió en DMSO y se realizaron diluciones seriadas (1/10). Las diluciones fueron incorporadas a la bacteria inactivada por calor y adicionadas a los gusanos 18 h antes de realizar el estrés térmico, como se describió en el capítulo II de materiales y métodos (página 31).

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 12.

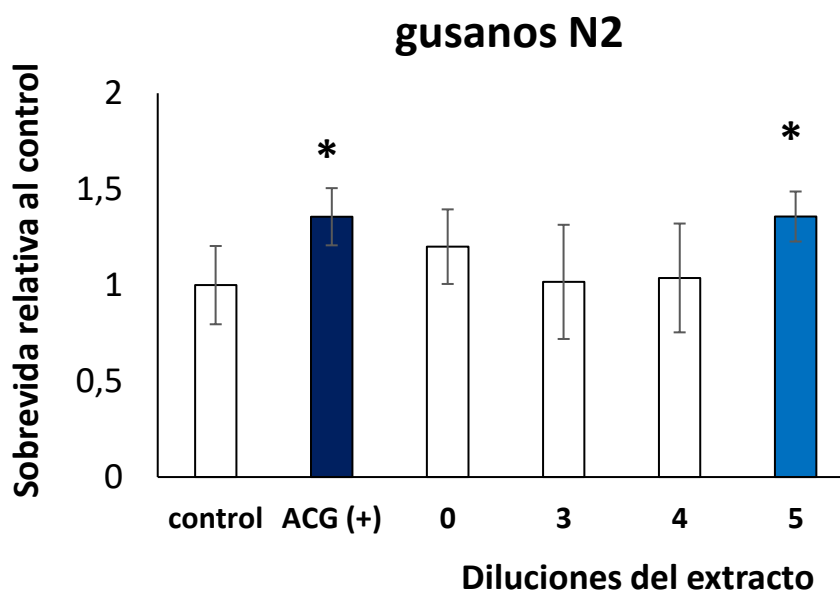
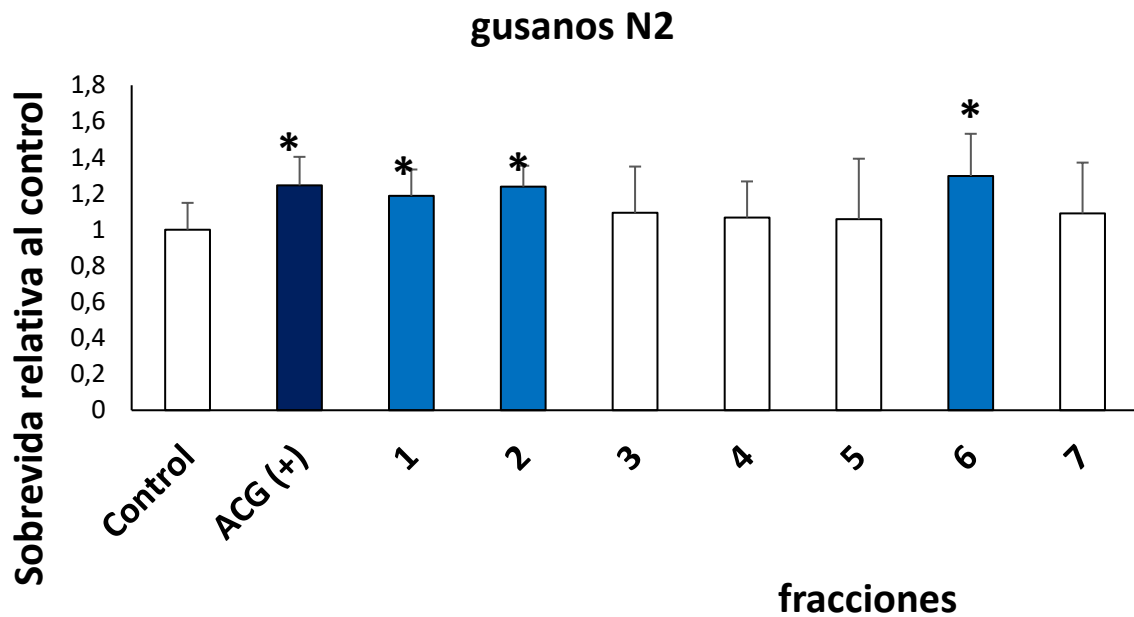


Figura 12: Curva dosis respuesta del extracto obtenido de la accesión 131-2 sobre la sobrevivida frente al estrés térmico en la cepa N2. (\*) Diferencias significativas para los resultados de los tratamientos respecto al control incubado con DMSO ( $p < 0.05$  LSD Fisher). Se utilizó ACG como control positivo.

Como se puede observar en la Figura 12, sólo la quinta dilución utilizada fue la que generó un incremento significativo en la termotolerancia de *C. elegans*.

Para estimar cual es el aporte de cada fracción en la actividad de termotolerancia observada en el extracto completo, las fracciones obtenidas por HPLC fueron procesadas de la misma forma que el extracto hasta la dilución activa del extracto completo (quinta dilución). Con esta dilución se llevó a cabo el ensayo de estrés térmico.



## 5.6. - Vías de señalización relacionadas con la resistencia al estrés.

### Keap1/Nrf2

En mamíferos, el complejo Keap1/Nrf2 participa en la activación transcripcional de los genes de fase II y actúa como el mayor regulador de la respuesta protectora celular a estrés inducido por las EROs o compuestos electrófilos. Nrf2 un factor de transcripción que se une al elemento de respuesta antioxidante sobre el ADN. Keap1 es el regulador de Nrf2 (proteína asociada a ECH tipo kelch), es una proteína electrófilo-sensible (170) que contiene entre 25 y 27 residuos cisteínas, y hasta 10 de ellos pueden interactuar con electrófilos debido a su orientación y su carga positiva. En condiciones basales Nrf2 está unido a Keap1 en el citoplasma y éste a su vez está anclado al esqueleto de actina. En estas condiciones, Nrf2 se mantiene en concentraciones citosólicas bajas, debido a su inhibidor Keap-1 facilita su degradación a partir de *Ubiquitin/Proteasome System* (UPS), sirviendo de complejo adaptador para este sistema de degradación (Figura 14).

La formación de aductos entre electrófilos y por ende la oxidación de cisteínas de Keap-1 alteran el ensamblaje Keap1-Nrf2-Cul3 debido a un cambio conformacional, lo que culmina rompiendo la interacción de baja afinidad de Nrf2 aumentando su movilidad y su vida media, ya que en esta nueva posición es imposible ubiquitinarla (171). En condiciones de estrés o en presencia de compuestos que tienen como diana la activación de Nrf2, la degradación se suprime, lo que permite la translocación de Nrf2 al núcleo donde el factor de transcripción puede combinarse con pequeñas proteínas MAF, permite la unión con el elemento de respuesta en la región de los genes de fase II y acelera su transcripción (Figura 15). Estos genes incluyen enzimas detoxificantes de fase II como NAD(P)H quinona oxidoreductasa I (NQO-1) y glutatión S transferasa. Las enzimas detoxificantes de fase II pueden catalizar la reducción o conjugación de xenobióticos reactivos, produciendo metabolitos menos tóxicos y más fáciles de excretar por el organismo. Nrf2 puede mantenerse activado durante el período de tiempo que dure el estímulo.

En *C. elegans* existe un sistema equivalente de respuesta antioxidante, donde Keap1 es representado por WDR-23 y Nfr2 por SKN-1. SKN-1 regula genes claves de detoxificación de fase II a través de mecanismos constitutivos y otros inducibles por estrés, en las neuronas ASI y en el intestino del gusano (172).

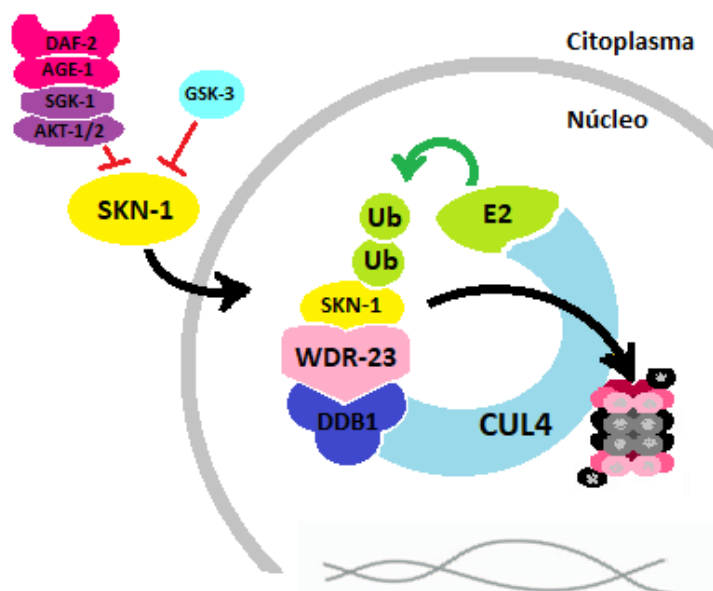


Figura 14: Esquema del secuestro del factor de transcripción skn-1 en células de *C. elegans*. Imagen adaptada del trabajo de Choe y col. (2009). (173)

SKN-1 ingresa constitutivamente en el núcleo de células no estresadas donde WDR-23 lo recluta conjuntamente con el complejo CUL4/DDB-1 ubiquitin ligasa, para direccionarlo hacia la degradación proteasomal.

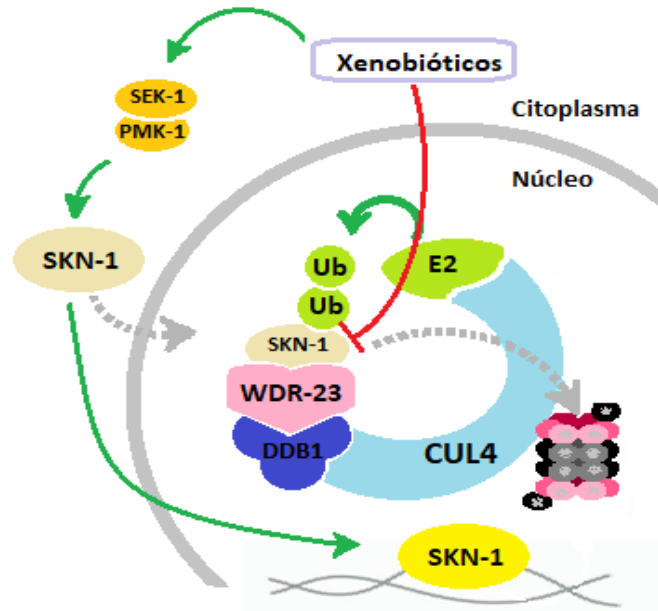


Figura 15: Esquema del ingreso al núcleo del factor de transcripción SKN-1, ante la presencia de estímulos, en células de *C. elegans*. Imagen adaptada del trabajo de Choe y col. (2009). (173)

En células expuestas a oxidantes o xenobióticos, WDR-23 es inhibido por los xenobióticos, permitiendo la acumulación de SKN-1 y activación de la transcripción de sus genes blanco (ej: GST4, GST30 y SOD) (Figura 15).

El factor de transcripción SKN-1 de *C. elegans* es un importante componente de la respuesta de los organismos frente al estrés oxidativo y es requerido para la extensión de la expectativa de vida, cuando hay restricción dietaria o inhibición de las vías de TORc1 o TORc2 (174) (175) (176). El factor de transcripción SKN-1 regula genes que defienden al organismo contra estrés oxidativo o estrés por xenobióticos, junto con importantes genes involucrados en la homeostasis de proteínas y metabolismo (177) (178) (179) (180). Al igual que HSF-1, SKN-1 contribuye a la extensión de la expectativa de vida en animales con una actividad reducida de IIS (181).

Como WDR23 es una proteína sensible a electrófilos, será nuestra herramienta principal de evaluación de las vías de señalización modificadas por los derivados carotenoides lipofílicos frente a la respuesta a estrés térmico.

## 5.6.1. - Cuantificación de SKN-1

En condiciones normales, SKN-1 se encuentra mayoritariamente en la cabeza del nematodo, pero al enfrentarse a condiciones adversas, como situaciones de estrés oxidativo, comienza a concentrarse a nivel intestinal, esta localización particular hace que sea más fácil el seguimiento de la expresión del factor de transcripción.

Para esta parte del ensayo utilizamos la cepa LG331, la cual tiene un transgén de la proteína SKN-1 fusionado con una proteína fluorescente verde (GFP), lo que nos permitió evaluar por fluorescencia la expresión de este factor de transcripción. Es de esperarse que los compuestos electrófilos presentes en los extractos de tomate, interactúen con WDR-23, incrementando las concentraciones de SKN-1 y por lo tanto la fluorescencia.

Para evaluar la fluorescencia de los nematodos, previamente los gusanos fueron incubados con las fracciones de los extractos de la misma manera que se llevó a cabo para el estrés térmico. Una vez terminada la incubación, los gusanos fueron observados bajo microscopio de fluorescencia como se describió en el capítulo II de materiales y métodos, pág. 37. La fluorescencia total de las imágenes fue cuantificada por densitometría por el software imageJ. El compuesto paraquat (0.2 mM) fue empleado como control positivo ya que es un conocido inductor de SKN-1.



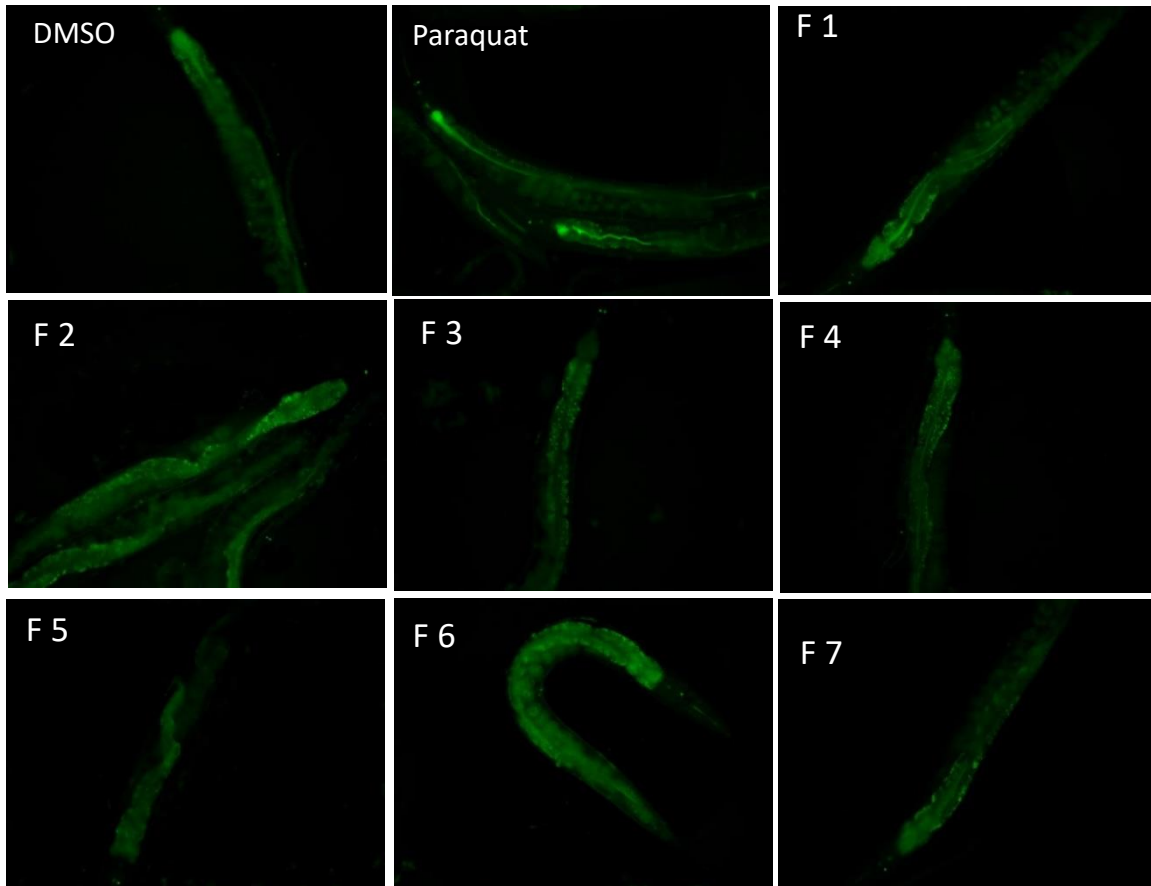


Figura 16: Imágenes obtenidas a partir de microscopia de fluorescencia sobre la cepa LG331. Se observa, control (DMSO,) el control (+) con paraquat 0.2 mM y las 7 fracciones obtenidas a partir del extracto 131-2.

En la Figura 16, se pueden observar las imágenes registradas para los gusanos incubados por las distintas fracciones y sus controles: positivo (paraquat) y negativo (DMSO). En la Figura 17, se muestra la intensidad de fluorescencia media por gusano respecto al control (la cuantificación de fluorescencia se realizó sobre 10 individuos para cada tratamiento). Como era de esperarse el control con paraquat produjo un incremento de SKN-1, de la misma manera, se observó un aumento de la fluorescencia en las fracciones, 1, 2 y 6. Estos resultados evidencian que las fracciones que han presentado actividad

electrofílica *in vitro*, también poseen actividad biológica, induciendo la termotolerancia e incrementando los niveles de SKN-1 en *C. elegans*.

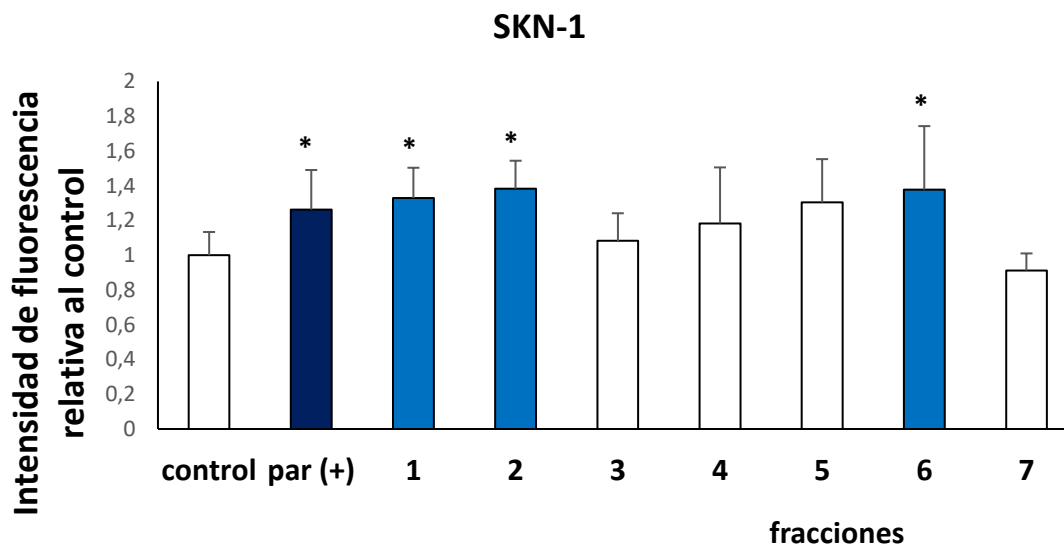


Figura 17: Cuantificación de la intensidad de fluorescencia total generada por cada fracción (F1-F7) obtenidas a partir de un extracto de tomate, sobre la cepa LG331. Se compara cada tratamiento con el grupo control tratado con DMSO. (\*) Diferencias significativas para las medias de los tratamientos (n=10) respecto al control incubado con DMSO ( $p < 0.05$  LSD Fisher). Se utilizó paraquat (par) como control positivo.

## 5.7. - Discusión y conclusión

### 5.7.1. - Discusión

La relación de los efectos beneficiosos de los alimentos y sus compuestos antioxidantes está ampliamente demostrada. Metodologías que valoran la actividad antioxidante de un alimento, permiten predecir su potencial efecto benéfico. De este mismo modo, en esta tesis se propuso desarrollar un método novedoso para valorar la actividad electrofílica de un alimento, en este caso tomate, con el fin de poder predecir su potencial actividad beneficiosa. Nuestra metodología se basó en evaluar espectrofotométricamente la capacidad de compuestos de tomate en reaccionar con

grupos tioles del sustrato p-nitrobencentiol. Los resultados demostraron que mayor actividad electrofílica predomina en la fracción lipofílica del tomate.

En la actualidad, los métodos propuestos para evaluar electrófilos en alimentos son escasos. Gijbers y col. (42) propusieron una metodología para evaluar la actividad electrofílica en tomate empleando células hepáticas tumorales transfectadas con un vector de expresión de luciferasa que tenían como promotor a un elemento de respuesta antioxidante (ERA). En ese estudio se evaluó la capacidad de extractos de tomate en inducir el factor de transcripción Nrf-2 y por su intermedio al sistema reportero de luciferasa. A diferencia de nuestro estudio, en el ensayo de luciferasa por el método de Gijbers, se evaluaron extractos hidrofílicos, y se propusieron principalmente a los compuestos fenólicos como los responsables de esta actividad. Notoriamente, los compuestos obtenidos en la fracción hidrofílica analizados por nuestro método no mostraron capacidad de reaccionar con los grupos tioles del NBT. Si bien el sistema reportero mostró una activación de Nrf-2, se conoce que la inducción de este factor de transcripción puede producirse no solo por acción de compuestos electrófilos sino también por compuestos con propiedades antioxidantes (182), y este sistema no permitiría dilucidar cuál es el mecanismo por el cual se activa Nrf-2.

Varios electrófilos fitonutrientes han demostrado que inducen el elemento de respuesta antioxidante/electrófilo mediante una disrupción en la actividad de Keap-1 sobre Nrf2. Dentro de este grupo de compuestos se pueden mencionar al sulforafano presente en vegetales crucíferos como brócoli (183), el 6-metilsulfinil hexilo, un análogo sulforano en el wasabi japonés y la curcumina, componente activo del polvo de cúrcuma. Uno de los rasgos estructurales de estos compuestos fue la presencia de grupos isotiocianatos o carbonilos  $\alpha$ ,  $\beta$  insaturados que le otorgan propiedades de electrófilos a moléculas como los lipoalquenos y carotenoides.

En nuestros resultados, el análisis de correlación entre la actividad electrofílica de los extractos de tomate y su contenido de pigmentos analizado por HPLC-UV, asoció la actividad cuantificada con el contenido de licopeno y  $\beta$ -caroteno, los carotenoides mayoritarios en el fruto. Sin embargo, en el estudio de HPLC-EM, ninguno de estos compuestos mostró una reactividad significativa con el sustrato NBT, evidenciando que no se comportan como electrófilos. Este resultado coincide con un estudio de análisis

estructural de licopeno donde se demostró que el carotenoide no poseía capacidad de comportarse como electrófilo (184).

Por otro lado, en ese mismo estudio se demostró que los productos de oxidación del licopeno presentaban una estructura química con una energía de ionización y energía de afinidad por electrones, que predecía un comportamiento de electrófilos. Dada la estructura altamente insaturada que poseen carotenos, estos compuestos pueden oxidarse fácilmente ya sea por autooxidación, por presencia de oxidantes o por actividad enzimática (185). Los productos de la oxidación son diversos en tamaño y en grupos funcionales, donde podemos encontrar compuestos de tipo aldehídos, alcoholes, epóxidos, cetonas y ácidos (184). Varios de estos compuestos han sido identificados en nuestro estudio por poseer la capacidad de reaccionar con el grupo tiol del NBT. Esta reactividad de los productos de oxidación de carotenos ha sido evaluada en células humanas de próstata y mama transfectadas con el vector de expresión de luciferasa que tiene como promotor a un elemento de respuesta antioxidante (ERA) (184). En ese estudio se evaluó la capacidad del licopeno,  $\beta$ -caroteno y derivados oxidados, de inducir el factor de transcripción Nrf-2 y por lo tanto al sistema reportero. Allí se demostró que licopeno y  $\beta$ -caroteno no eran capaces de activar este sistema, pero si lo eran sus productos de oxidación, donde carotenales, aldehídos derivados de estos carotenoides fueron las moléculas más activas. En nuestro estudio por HPLC-EM detectamos compuestos aldehídos derivados de carotenos que reaccionaron con NBT en las fracciones 1 y 2 del extracto lipofílico de tomate. Estas fracciones a su vez demostraron tener capacidad de inducir el sistema de transcripción del elemento de respuesta a electrófilos/antioxidantes y su factor de transcripción SKN-1 (ortólogo de Nrf-2) y además generar termotolerancia en *C. elegans*. Estos aldehídos presentaron una estructura con cadena de 8 a 13 carbonos y aquellos de mayor polaridad de elución mostraron una mayor reactividad con el NBT. Coincidiendo con nuestros resultados, Linnewiel y col. (184) evaluaron las diferentes estructuras químicas de los carotenoides y su capacidad de inducir Nrf-2 y llegaron a la conclusión de que los aldehídos de 12 carbonos y la posición más alejada del grupo metileno próximo al grupo aldehído terminal generaban las mayores actividades. Además de identificar aldehídos derivados de carotenos, se detectaron compuestos cuyas masas no pudieron identificarse con los

carotenoides conocidos y que mostraron una significativa reactividad con NBT. Estos compuestos también estuvieron presentes en las fracciones 1 y 2 e indujeron el factor de transcripción SKN-1. Estos resultados permiten postular a compuestos presentes en el tomate, que aún no han sido estudiados en profundidad, como electrófilos de interés biológico. Es necesario realizar estudios posteriores sobre la identidad de estos compuestos que permitirán conocer su naturaleza química y determinar su probable mecanismo de acción.

La fracción 6 proveniente del extracto de tomate también generó un efecto de termotolerancia y una inducción del factor de transcripción SKN-1. Si bien en esta fracción no se detectaron compuestos que reaccionaran significativamente con el NBT, en esta fracción se encuentra el licopeno, el pigmento más abundante en el fruto. Por la concentración que posee este compuesto en dicha fracción, existe una alta probabilidad de que sea el responsable o al menos el precursor de los compuestos que general las actividades biológicas observadas. Como el licopeno no posee características de electrófilo, existen posibles explicaciones para las actividades observadas; la primera es la formación de productos de oxidación en el período de incubación en el medio de cultivo durante el tiempo que dura el ensayo, tal y como fue observado por Linnewiel y col (184) en los cultivos con células, estos productos de oxidación podrían ser los responsables de las actividades observadas. Otra posible explicación es que licopeno esté actuando mediante un mecanismo no electrofílico para inducir SKN-1 (186). La última hipótesis posible a la actividad observada en esta fracción es la presencia de compuestos que no han sido detectados por nuestro sistema. Se conoce que determinados compuestos carotenoides tienen dificultad de ionizar en fuentes de ionización por electro-pulverización (ESI) como la que fue empleada en este estudio (187). Estudios posteriores deberán llevarse a cabo para esclarecer la causa y los mecanismos por los cuales esta fracción genera actividad biológica.

#### 5.7.2. - Conclusión

En el desarrollo de este capítulo se obtuvo un método eficiente y rápido para medir la actividad electrofílica de los extractos de tomate y con potenciales aplicaciones a otros alimentos. Con este método se pudo cuantificar la actividad electrofílica en las

fracciones lipofílicas, pero no se detectó una actividad significativa en las fracciones hidrofílicas.

Para la identificación de los compuestos electrófilos de tomate, se llevó a cabo una asociación entre la actividad electrofílica con la composición de pigmentos y una identificación de compuestos capaces de reaccionar con NBT mediante HPLC-EM. Ambas estrategias nos permitieron determinar que los compuestos electrófilos de la fracción lipofílica del tomate son derivados de carotenos. Se detectaron 15 compuestos electrófilos capaces de reaccionar con NBT, y se realizó la identificación tentativa de 10 de ellos. Estos metabolitos resultaron ser principalmente carotenales, derivados oxidados de carotenos. Las actividades biológicas observadas en las fracciones que contienen estos compuestos electrófilos nos permiten proponer que el efecto de termotolerancia sobre *C. elegans* estaría siendo mediado por la reactividad de los electrófilos sobre los tioles de la proteína WDR-23, quienes generan la liberación de SKN-1 y el incremento de la actividad citoprotectora del gusano.

Adicionalmente, se puede destacar que, en el ensayo de estrés térmico, se observó que concentraciones muy bajas de los compuestos identificados (en comparación con las concentraciones utilizadas de CDNB), fueron suficientes para producir un incremento en la resistencia al estrés.



## **CAPITULO 6**

# **CONCLUSIONES GENERALES**





## CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES GENERALES

A continuación, se detallan las principales actividades y conclusiones obtenidas de acuerdo a los objetivos específicos planteados al principio de este trabajo de tesis.

- En la primera parte de la tesis se propuso estudiar el aporte de los compuestos antioxidante hidrofílicos sobre las propiedades nutraceuticas de tomate y su modo de acción. Para estimar las potenciales propiedades nutraceuticas en frutos de tomate, se desarrolló un estudio *in vivo* con *C. elegans* que evalúa la actividad de extractos de tomate cuantificando el incremento en la sobrevivencia de una población de gusanos expuestos a un estrés térmico letal.

A partir de la diversidad genética de una población de tomate se pudo encontrar diferencias metabólicas en los frutos que se tradujeron en diferencias en su actividad antioxidante y en su actividad biológica de conferir termotolerancia en *C. elegans*.

La asociación estadística de la composición y contenido de metabolitos antioxidantes y las actividades antioxidante y biológica de la población de tomates, permitieron identificar al ácido clorogénico como uno de los principales responsables de estas actividades.

El estudio de termotolerancia con el ácido clorogénico puro, demostró que el compuesto es activo en el rango de concentraciones encontradas en los cultivares corroborando las correlaciones encontradas. Sin embargo, su actividad es dependiente de la presencia de otros antioxidantes en el fruto, como ocurre con la rutina.

El mecanismo de acción del ácido Clorogénico para conferir termotolerancia en *C. elegans*, se relacionó con su capacidad de inducir al factor de transcripción HIF-1 durante la exposición previa al estrés térmico y por su intermedio al factor HSF-1 y las proteínas chaperonas de respuesta al estrés por calor e inducir la autofagia como un mecanismo citoprotectivo.

- En la segunda parte de la tesis se propuso estudiar el aporte de los compuestos electrófilos en las potenciales propiedades nutraceuticas y su modo de acción.

Para abordar este estudio se desarrolló un método eficiente y rápido para llevar a cabo la cuantificación de la actividad electrofílica en fruto de tomate a partir de la reacción

electrofílica con un grupo tiol del reactivo NBT. Este método es una herramienta novedosa que permite clasificar a los extractos según su actividad, como una medida adicional de poder nutracéutico de los alimentos.

Los extractos lipofílicos de tomate mostraron contener la mayor actividad electrofílica. Esta metodología permitió caracterizar una población de tomates con una gran diversidad genética que se tradujo en diferentes valores de composición y contenido de pigmentos y diferencias en su actividad electrofílica.

La actividad de electrófilos se asoció estadísticamente al contenido de licopeno y  $\beta$ -caroteno, sin embargo, ya que no poseen actividad electrofílica, se los identificó como los precursores de los compuestos electrófilos que generan la actividad.

Basándonos en la reacción de los electrófilos con el grupo tiol del NBT, se detectaron por HPLC-EM 15 compuestos electrófilos de los cuales 10, pudieron ser tentativamente identificados. La mayoría de los compuestos identificados fueron aldehídos derivados de la oxidación de carotenos.

Las fracciones que contienen estos compuestos electrófilos mostraron capacidad de generar termotolerancia en *C. elegans*. Estas fracciones además mostraron la capacidad de inducir el factor de transcripción SKN-1.

Basado en estos resultados proponemos que los compuestos electrófilos detectados serían los responsables de generar termotolerancia en *C. elegans* a partir de la formación de uniones con los grupos tiol de la proteína represora WDR-23, deteniendo la represión de SKN-1 y activando por su medio las vías citoprotectoras en *C. elegans*.



# **ARTÍCULOS**

## **CIENTÍFICOS PUBLICADOS**



## ARTÍCULOS CIENTIFICOS PUBLICADOS

- Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis han sido publicados en los siguientes artículos científicos:

-**“Effects of chlorogenic acid on thermal stress tolerance in *C. elegans* via HIF-1, HSF-1 and autophagy”** Andrea del Valle Carranza, Alejandra Saragusti, Gustavo Alberto Chiabrando, Fernando Carrari, Ramón Asis. 2019  
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.153132>

-**“Hydrophilic antioxidants from Andean tomato landraces assessed by their bioactivities in vitro and in vivo”** Romina D. Di Paola Naranjo, Santiago Otaiza, Alejandra C. Saragusti, Veronica Baroni, Andrea del V. Carranza, Iris E. Peralta, Estela M. Valle, Fernando. 2016. Journal of Food Chemistry. Vol 206.

-**“Data on polyphenols and biological activity analyses of an Andean tomato collection and their relationships with tomato traits and geographical origin.”** Romina D. Di Paola Naranjo, Santiago Otaiza, Alejandra C. Saragusti, Veronica Baroni, A.V. Carranza, Iris E. Peralta, Estela M. Valle, Fernando Carrari, Ramón Asis. Data in Brief 7 (2016) 1258–1268.

- Durante el transcurso de la formación doctoral se realizaron trabajos en colaboración que culminaron en los siguientes artículos científicos:

-**“Down-regulation of tomato PHYTOL KINASE strongly impairs tocopherol biosynthesis and affects prenyl lipid metabolism in an organ-specific manner”** Juliana Almeida, Mariana da Silva Azevedo, Livia Spicher, Gaétan Glauser, Katharina vom Dorp, Luzia Guyer, Andrea del Valle Carranza, Ramón Asis, Amanda Pereira de Souza, Marcos Buckeridge, Diego Demarco, Cécile Bres, Christophe Rothan, Lázaro Eustáquio Pereira Peres, Stefan Hörtensteiner, Félix Kessler, Peter Dörmann, Fernando Carrari and Magdalena Rossi. 2015 Journal of Experimental Botany. Vol 66, No 21.

-**“Caracterización de la toxicidad de hongos alterantes de alimentos utilizando *Caenorhabditis elegans*”**. Benito Nacir, M.J.; Carranza, A.V.; Moran, Y.; Theumer, M.G.; Asis, R2018. La alimentación latinoamericana. Vol 339.





# **BIBLIOGRAFÍA**





## Bibliografía

1. **Peralta, IE, Spooner, David y Knapp, Sandra.** *Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (Solanum sect. Lycopersicoides, sect. Juglandifolia, sect. Lycopersicon; Solanaceae).* s.l. : American Society of Plant Taxonomists, 2008.
2. *The origin of the cultivated tomato.* **Jenkins, J.A.** 1948, *Economy Botany*, págs. 379-392.
3. *Allozyme variation in the cultivated tomato and closely related species.* **Rick, C.M y Fobes, j. F.** 1975, *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, págs. 376-834.
4. *Genetic diversity, structure and marker-trait associations in a collection of Italian tomato (Solanum lycopersicum L.) landraces.* **Mazzucato, A, y otros.** 2008, *Theoretical and Applied Genetics*, págs. 657-669.
5. **Rick, C.R.** *Tomato (family Solanaceae).* New York : Longman Publications, 1976.
6. **Bailey, LH.** *The standard cyclopedia of horticulture.* New York : The Macmillan Company., 1960.
7. *Evaluation of amplified fragment length polymorphism and simple sequence repeats for tomato germplasm fingerprinting: utility for grouping closely related traditional cultivars.* **Garcia Martinez, S., y otros.** 2006, *genome*, págs. 648-656.
8. **Cortina, P.** *Metabolómica Aplicada al Estudio del Olor y Sabor del fruto del Tomate.* Córdoba : s.n., 2015.
9. **Alarcón Zayas, A.** *Calidad poscosecha del tomate (Solanum lycopersicum L.) cultivado en sistemas ecológicos de fertilización.* 1-201 : Universidad Politécnica de Madrid, 2013.
10. **Sobrinho Illescas y Sobrinho Vesperinas.** *Tratado de Horticultura Herbácea.* s.l. : Editorial Aedos, 1989.
11. **Madhavi, D. L.** *El tomate.* Zaragoza : s.n., 2004.
12. **Corvo Dolcet, S.** *Zonas de Producción del Cultivo del Tomate en la Argentina.* s.l. : Secretaría de Agricultura, ganadería, pesca y alimentos., 2005.
13. **Redenbaugh, Keith, y otros.** *Safety Assessment of Genetically Engineered Fruits and Vegetables: A Case Study of the Flavr Savr Tomato.* s.l. : CRC press, 1992.

14. *Food companies must pursue nutraceutical R & D-now!* **DeFelice, S.** 1994, Journal of Food Engineering.
15. **Wiley-Blackwell.** *Dictionary of Food Information Service 2th edition.* Oxford : IFIS, 2009. pág. 42.
16. **Solomon, H.** *Encyclopedia of Food & Culture.* s.l. : Charles Scribner's Sons., 2003.
17. *Antioxidant Effects of Natural Bioactive Compounds.* **Balsano, C y Alisi, A.** 2009, Current Pharmaceutical Design, págs. 3063-3073.
18. *Lycopene: A Review of Its Potential as an Anticancer Agent.* **Bhuvanesswari, V. y Nagini, S.** 2005, Current Medicinal Chemistry , págs. 627-635.
19. **Rivas-Morales, Catalina.** *Investigación en plantas de importancia médica.* Nuevo León : Omnia Publisher SL, 2016.
20. *Free radicals in the physiological control of cell function .* **Gröge, W.** 2002, Physiol Rev. , págs. 47-95.
21. **Halliwell, Barry.** Free radicals and other reactive species in disease. *Encyclopedia of life science.* s.l. : National university of Singapore, 2001.
22. *Free radicals in physiology and pathology.* **Dianzani, M.** 1992, Bolletino della Società Italiana de biología sperimentale, págs. 491-511.
23. *Free radical mechanism in tissue injury.* **Slater, T.** 1984, biochemical journal, págs. 1-15.
24. **Rice-Evsans, Catherine y Diplock, Anthony.** *Techniques in free radical research. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology vol 22.* New York : Elsevier, 1991.
25. *Free radicals in toxicology.* **Aust, S, y otros.** 1993, Toxicology and applied pharmacology, págs. 168-178.
26. *Cellular defenses against damage from reactive oxygen species.* **Yu, BP.** 1994, Physiological Reviews, págs. 139-162.

27. *Reacciones de abstracción de hidrógeno en los radicales libres, peroxidación de lípidos y toxicología*. **Castro, G y Castro, JA**. 1990, *Bioquímica clínica latinoamericana XXIV*, págs. 127-146.
28. *Oxidative stress: the paradox of aerobic life*. . **Davies, KJ**. 1-31, s.l. : Biochem Soc Symp., 1995, Vol. 61.
29. **Galelli, Mirta**. *Alteraciones proteicas debidas al estrés oxidativo promovido por la activación del tetracloruro de carbono a radicales libres*. Buenos Aires : s.n., 2000.
30. **Halliwell, B y Gutteridge, J**. *Free radicals in Biology and Medicine 5th edition*. Oxford : Oxford university press, 2015.
31. *Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state*. **Gilgun-Sherki, Y, y otros**. 2002, *Pharmacol. Rev* , págs. 271-284.
32. *Strategies of antioxidant defense*. **Helmut, Sies**. 1993, *Eur J Biochem*, págs. 213-219.
33. *Natural Phenolic Antioxidants and their impact on Health*. **Frankel, Edwin N**. 1999, *Antioxidant Food Supplements in Human Health*, págs. 385-392.
34. *Changes of antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of selected fruits*. **Patthamakanokporn, Oruma, y otros**. 2008, *Journal of Food Composition and Analysis*, págs. 241-248.
35. *Review of flavonoids and other phenolics from fruit of different tomato (*Lycopersicon esculentum* mill) cultivars*. **Slimestada, R y Verheulb, M**. 2009, *Journal of the Science of food and agriculture*, págs. 1255-1270.
36. *Flavanols and Anthocyanins in Cardiovascular Health: a review of current evidence*. **de Pascual-Teresa, Sonia, Moreno, Diego A y García-Viguera, Cristina**. 2010, *Int. J. Mol. Sci.*, págs. 1679-1703.
37. *Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?* **Williams, Robert, Spencer, JP y Rice-Evans , C**. 2004, *Free Radical Biology and Medicine*, págs. 838-849.
38. *Importancia, contribución y estabilidad de antioxidantes en frutos y productos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.)*. **Luna-Guevara, M y Delgado-Alvarado, A**. 2014, *Avances en investigación Agropecuaria*, págs. 51-66.

39. *Antioxidant nutritional quality of tomato*. **Frusciante, Luigi, y otros**. 2007, Mol. Nutr. Food Research, págs. 609-617.
40. *Electrophiles in Foods: the current status of Isothiocyanates and their chemical biology*. **Nakamura, Y y Miyoshi, N**. 2010, bioscience, biotechnology and biochemistry, págs. 242-255.
41. *The role of lycopene and its derivatives in the regulation of transcription systems: implications for cancer prevention*. **Sharoni, Y., y otros**. 2012, Am J Clin Nutr.
42. *Induction of electrophile-responsive element (EpRE)-mediated gene expression by tomato extracts in vitro*. **Gijsbers, L, y otros**. 2012, Food Chemistry, págs. 1166-1172.
43. *The life cycle of the nematode Caenorhabditis elegans. Wild-type growth and reproduction*. **Byerly, L, Cassada, RC y Russell, RL**. 1976, Dev. Biology, págs. 23-33.
44. *Isolation of C. elegans and related nematodes*. **Barrière, Antonie y Féliz, Marie-Anne**. 2014, Wormbook, págs. 1-19.
45. *The genetics of Caenorhabditis elegans*. **Brenners, S**. 1974, Genetics, págs. 71-94.
46. **Database, JoVE. Science Education**. Essential elements of biology I: yeast, Drosophila and C. elegans. . *RNAi in C. elegans*. Cambridge : s.n., 2019.
47. *OrthoList: a compendium of C. elegans genes with human orthologs*. **Shaye, DD. y Greenwald, I**. 2011, Public Library of Science.
48. *Finding function in novel targets: C. elegans as a model organism*. **Kalleta, T. y Hengartner, O**. 2006, Nat. Rev. Drug Discov, págs. 387-398.
49. *Tomatoes and Cardiovascular Health*. **Willcox, Joye, Catignani, George y Lazarus, Sheryl**. 2003, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Vol. 43, págs. 1-18.
50. *Plant Metabolomics: Potential for Practical Operation*. **Fukusaki, Eiichiro y Kobayashi, Akio**. 2005, JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING, págs. 347-354.
51. *Diseño y análisis de experimentos*. **Montgomery, Douglas C**. 1991, Grupo editorial Iberoamérica.

52. *Metabolomic analysis in food science: a review*. **Cevallos-Cevallos, Juan, y otros**. 2009, Trends in Food Science & Technology, págs. 557-566.
53. *Antioxidant activity in different fractions of tomatoes*. **Toor, Ramandeep K y Savage, Geoffrey P**. 2004, Food Research International, págs. 487-494.
54. *Changes in Antioxidant and Metabolite Profiles during Production of Tomato Paste*. **Capanoglu, E, y otros**. 2008, Journal of Agricultural and Food Chemistry, págs. 964-973.
55. *Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements*. **Prior, Ronald L, Wu, Xianli y Schaich, Karen**. 2005, Journal of Agricultural and Food Chemistry, págs. 4290-4302.
56. *Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols as Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay*. **Pulido, Raquel, Bravo, Laura y Saura-Calixto, Fulgencio**. 2000, Journal of Agricultural and Food Chemistry, págs. 396-402.
57. *Rapid and Simple Kinetics Screening Assay for Electrophilic Dermal Sensitizers using Nitrobenzenethiol*. **Chipinda, I, y otros**. 2010, Chemical Research in Toxicology, págs. 918-925.
58. *Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant characteristics of aged red wines*. **Arnous, A, Makris, DP y Kefalas, P**. 2001, Journal of Agricultural and food chemistry, págs. 5736-5742.
59. *Determination of Ascorbic Acid and Carotenoids in Food Commodities by Liquid Chromatography with Mass Spectrometry Detection*. **Frenich, AG, y otros**. 2005, Journal of Agricultural and food chemistry, págs. 7371-7376.
60. *Developmental changes in antioxidant metabolites, enzymes, and pigments*. **Torres, C.A. y Andrews, PK**. 2006, Plant Physiology and Biochemistry, págs. 806-818.
61. **Stiernagle, Theresa**. Wormbook. [En línea] 2006.
62. **Carranza, A., y otros**. Congreso SAIB. *Chlorogenic acid bioavailability in Caenorhabditis elegans*. 2014.
63. *HIF-1 is required for heat acclimation in the nematode C elegans*. **Treinin, M, y otros**. 2003, Physiology Genomics, págs. 17-24.

64. *Cobalt Induces Hypoxia-Inducible Factor-1 Expression in Airway Smooth Muscle Cells by a Reactive Oxygen Species– and PI3K-Dependent Mechanism.* **Chachami, G, y otros.** 2004, American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, págs. 544-551.
65. *Systematic functional analysis of the Caenorhabditis elegans genome using RNAi.* **Kamath, Ravi S, y otros.** 2003, Nature, págs. 231-237.
66. *LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending of form-II formation.* **Kabeya, Y, y otros.** 2004, Journal of Cell Science, págs. 2805-2812.
67. *Detection of Autophagy in Caenorhabditis elegans.* **Palmisano, Nicholas J y Melendez, Alicia.** 2016, Cold spring Harb Protoc.
68. *Hormetic heat shock and HSF-1 overexpression improve C elegans survival and proteostasis by inducing autophagy.* **Kumsta, C y Hansen, M.** 2017, Autophagy, págs. 1076-1077.
69. **Emery y Rimoin.** Chapter 132. Motor neuron disease. *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics 6th Edition.* Chicago, IL : Academic Press, 2013.
70. *Toxicology: principles and applications.* **Niesink, Raymond JM, De Vries, John y Hollinger, Manfred A.** 1996, CRC press.
71. *Strategies of antioxidant defense.* **Sies, H.** 1993, European Journal of Biochemistry, págs. 213-219.
72. *Exercise and oxidative stress, sources of free radicals an their impact on antioxidant system.* **Ji, Li Li y Leichtweis, Steve.** 1997, Age, págs. 91-106.
73. *Sensitive biomarker responses of the shrimp palaemonetes argentinus exposed to chlorpyrifos at enviromental concentrations: Roles of alpha-tocopherol and metallothioneins.* **Bertrand, L, y otros.** 2016, Aquatic Toxicology, págs. 72-81.
74. *Recolección de germoplasma criollo de especies cultivadas y su distribución en regiones andinas de Argentina.* **Asprelli, PD, y otros.** 2011, Horticultura Argentina, págs. 30-45.
75. *Genomic analysis of wild tomato introgressions determining metabolism and yield associated traits.* **Kamenetzky, I, y otros.** 2010, Plant Physiology, págs. 1772-1786.

76. *Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice.* **Aviram, M, y otros.** 2000, Am J Clin Nutr, págs. 1062-1076.
77. *Anticarcinogenic, cardioprotective and other health benefits of tomato compounds lycopene,  $\alpha$ -tomatine, and tomatidine in pure form and in fresh and processed tomatoes.* **Friedman, M.** 2013, Journal of Agricultural and Food Chemistry, págs. 9534-9550.
78. *Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action.* **Vauzour, D, y otros.** 2010, Nutrients, Vol. 11, págs. 1106-1131.
79. *Nutritional Antioxidants: Mechanism of Action, Analysis of Activities and Medical Applications.* **Vaya, Jacob y Aviram, Michael.** 2001, Curr Med Chem, págs. 99-117.
80. *Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not?* **Hellier, B, Rafter, J y Jenner, A.** 2005, Am J Clin Nutr, págs. 268-276.
81. *How to standardize the multiplicity of methods to evaluate natural antioxidants.* **Frankel, E y Finley, J.** 2008, Journal of Agricultural and Food Chemistry, págs. 4901-4908.
82. *Engineered polyamine accumulation in tomato enhances phytonutrient content, juice quality, and vine life.* **Mehta, RA, y otros.** 2002, Nature Biotechnology, págs. 613-618.
83. *Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease.* **García-LaFuente, Ana, y otros.** 2009, Inflammation Research, págs. 537-552.
84. *In vitro measurement and interpretation of total antioxidant capacity.* **Fraga, C, Oteiza, P y Galleano, M.** 2014, Biochimica et Biophysica Acta General subjects, págs. 931-934.
85. *Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and action.* **Soobrattee, M, y otros.** 2005, Mutation Research, págs. 200-213.
86. *Potential cell culture models for antioxidant research.* **Liu, R y Finley, J.** 2005, Journal of Agricultural and food chemistry, págs. 4311-4314.
87. *Alternatives to animal testing: a review.* **Doke, Sonali K y Dhawale, Shashikant C.** 2013, Saudi Pharmaceutical Journal., págs. 223-229.

88. *Genotypic variability for antioxidant and quality parameters among tomato cultivars, hybrids, cherry tomatoes and wild species.* **Kavitha, Pillakenchappa, y otros.** 2014, Journal of the Science of Food and Agriculture, págs. 993-999.
89. *Metabolite profiling and quantification of phenolic compounds in methanol extracts of tomato fruit.* **Gómez-Romero, M., Segura-Carretero, A y Fernandez-Gutierrez, A.** 2010, Phytochemistry, págs. 1848-1864.
90. *Phenolic characterization and variability in leaves, stems and roots of Micro-Tom and patio tomatoes, in response to nitrogen limitation.* **Larbat, Romain, y otros.** 2014, Plant Science: An international Journal of Experimental plant Biology., págs. 62-73.
91. *A liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolome database for tomato.* **Moco, Sofia, y otros.** 2006, plant physiology, págs. 1205-1218.
92. *Screening of the polyphenol content of tomato-based products through accurate mass spectrometry (HPLC-ESI-QTOF).* **Vallverdu-Queralt, Anna, y otros.** 2011, Food Chemistry.
93. *The Ginkgo biloba extract EGb761 reduces stress sensitivity, ROS accumulation and expression of talase and glutathione S-transferase 4 in Caenorhabditis elegans.* **Kampkötter, A., y otros.** 2007, Pharmacological Research, págs. 139-147.
94. *Quercetin Increases Oxidative Stress Resistance and Longevity in Saccharomyces cerevisiae.* **Belinha, Iracema, y otros.** Porto : s.n., 2007, Journal of Agricultural and Food Chemistry, págs. 2446-2451.
95. *Effects of O-methylated metabolites of quercetin on oxidative stress, thermotolerance, lifespan and bioavailability on Caenorhabditis elegans.* **Surco-Laos, Felipe, y otros.** 2011, Food Funct, págs. 445-456.
96. *Comparative transcriptomics reveals patterns of selection in domesticated and wild tomato.* **Koenig, D, y otros.** 2013, Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america. , págs. 2655-2662.
97. *Exploration of three solanum species for improvement on antioxidant traits in tomato.* **Top, Oguz, y otros.** 2014, Hort Science, págs. 1003-1009.



98. *Natural occurring epialleles determine vitamin E accumulation in tomato fruits.* **Quadrana, Leandro, y otros.** 2014, Nature Communications.
99. *Fruit-localized photoreceptors increase phenolic compounds in berry skins of field-grown Vitis vinifera.* **Gonzalez, Carina Veronica, y otros.** 2014, Phytochemistry, págs. 46-57.
100. *Breeding vegetables with increased content in bioactive phenolic acids.* **Kaushik, P, y otros.** 2015, Molecules, págs. 18464-18481.
101. *In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid.* **Sato, Yuki, y otros.** 136-138, 2011, Vol. 403.
102. *Combined treatment of tetrahydrocurcumin and chlorogenic acid exerts potential antihyperglycemic effect on streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats.* **Karthikesan, K, Pari, L y Menon, VP.** 2010, General physiology and biophysics, págs. 23-30.
103. *Effects of Coffee Consumption on Oxidative Susceptibility of Low-Density Lipoproteins and Serum Lipid Levels in Humans.* **Yukaxa, GS, y otros.** 70-74, 2004, Biochemistry (Moscow), Vol. 69.
104. *The effect of chlorogenic acid enriched coffee on glucose absorption in healthy volunteers and its effect on body mass when used long-term in overweight and obese people.* **Thom, E.** 2007, The Journal of international medical research, págs. 900-908.
105. *Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice.* **Kwon, SH, y otros.** 2010, European journal of pharmacology, págs. 210-217.
106. *The phenylpropanoid micronutrient chlorogenic acid improves clinical rating scores in rabbits following multiple infarct ischemic strokes: synergism with tissue plasminogen activator.* **Lapchak, PA.** 2007, Experimental neurology, págs. 407-413.
107. *Improvement of hypertension and vascular dysfunction by hydroxyhydroquinone-free coffee in a genetic model of hypertension.* **Suzuki, A1, y otros.** 2006, FEBS letters, págs. 2317-2322.

108. *Green coffee bean extract and its metabolites have a hypotensive effect in spontaneously hypertensive rats.* **Suzuki, A, y otros.** 2002, Hypertension research: official journal of the Japanese Society of Hypertension, págs. 99-107.
109. *Protective effects of chlorogenic acid on paraquat-induced oxidative stress in rats.* **Tsuchiya, T, Suzuki, O y Igarashi, K.** 1996, Bioscience, biotechnology, and biochemistry, págs. 765-768.
110. *Genes that determine both thermotolerance and rate of aging in C. elegans.* **Walker, GA, Walker, DW y Lithgow, GJ.** 1998, Ann N Y Acad, págs. 444-449.
111. *Thermotolerance of a long-lived mutant of C elegans.* **Lithgow, GJ, y otros.** 1994, Journal of Gerontology, págs. 270-276.
112. *Evolution of lifespan in C. elegans.* **Walker, David W, y otros.** 2000, Nature, págs. 296-297.
113. *PI3K inhibition induces dauer formation, thermotolerance and longevity in C elegans.* **Babar, Parveen, y otros.** 1999, neurobiology and aging, págs. 513-519.
114. *Heat shock protein accumulation is upregulated in a long lived mutant of C. elegans.* **Walker, GA, y otros.** 2001, J Gerontology, págs. 281-287.
115. *Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor.* **Hsu, A, Murphy, CT y Kenyon, C.** 2003, Science, págs. 1142-1145.
116. *Oxidative stress and life span determination in the nematode C elegans.* **Honda, Y y Honda, S.** 2002, Ann N Y Acad Sci, págs. 466-474.
117. *Regulation of hypoxic death in C. elegans by the insulin/IGF receptor homolog DAF-2.* **Scott, BA, Avidan, MS y Crowder, CM.** 2002, Science, págs. 2388-2391.
118. *Transcriptional targets of Daf-16 insulin signaling pathway protect C. elegans from extreme hypertonic stress.* **Lamitina, ST y Strange, K.** 2005, Am J. Physiol. Cell Physiol, págs. 467-474.
119. *Longevity and heavy metal resistance in daf-2 and age-1 long-lived mutants of C elegans.* **Barsyte, D, Lovejoy, DA y Lithgow, GJ.** 2001, FASEB J, págs. 627-634.

120. *A genetic pathway conferring life extension and resistance to UV stress in C elegans*. **Murakami, S y Johnson, T.** 1996, Genetics, págs. 1207-1218.
121. *Regulation of longevity in C elegans by heat shock factor and molecular chaperones*. **J, Morley y Morimoto, R.** 2004, Mol Biol Cell, págs. 657-664.
122. *Opposing activities protect against age-onset proteotoxicity*. **Cohen, E, y otros.** 2006, Science, págs. 1604-1610.
123. *Fluoxetine protects against amyloid- $\beta$  toxicity, in part via daf-16 mediated cell signaling pathway, in C elegans*. **Keowkase, Roongpetch, Aboukhatwa, Marwa y Yuan, Luo.** 2010, neuropharmacology, págs. 358-365.
124. *Celecoxib extends C elegans lifespan via inhibition of insulin-like signaling but not cyclooxygenase-2 activity*. **Ching, TT, y otros.** 2011, Aging cell, págs. 506-519.
125. *Neuron-specific proteotoxicity of mutant ataxin-3 in C elegans rescue by the daf-16 and Hsf-1 pathways*. **Teixeira-Castro, A, y otros.** 2011, Hum mol Genet, págs. 2996-3009.
126. *FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation and transformation*. **Accili, D y Arden, KC.** 2004, Cell, págs. 421-426.
127. *Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O<sub>2</sub> tension*. **Jiang, BH, y otros.** 1996, American journal of physiology, págs. 1172-1180.
128. *The human hypoxia-inducible factor 1 alpha gene: hif1a structure and evolutionary conservation*. **Lyer, Narayan V, Leung, Sandra W y Semenza, Gregg L.** 1998, genomics, págs. 159-165.
129. *C elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation*. **Epstein, AC, y otros.** 2001, Cell, págs. 43-54.
130. *A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF*. **Bruick, RK y McKnight, SL.** 2001, Science, págs. 1337-1340.
131. *Cellular adaptation to hypoxia: O<sub>2</sub>-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O<sub>2</sub>-regulated gene expression*. **Wenger, RH.** Leipzig: s.n., 2002, FASEB journal, págs. 1151-1162.

132. *Hypoxia, inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology.* **Semenza, GL.** Baltimore : s.n., 2001, Trend Mol Med, págs. 345-50.
133. *The Caenorhabditis elegans hif-1 gene encodes a bHLH-PAS protein that is required for adaptation to hypoxia.* **Jian, H, Guo, R y Powell-Coffman, JA.** 2001, Proc Natl Acad Sci, págs. 7916-7921.
134. *A Mitochondrial Superoxide Signal Triggers Increased Longevity in Caenorhabditis elegans.* **Yang, W y Hekimi, S.** 2010, PLOS Biology, Vol. 8.
135. *Feeding a ROS-generator to C elegans leads to increased expression of small heat shock protein HSP-16.2 and hormesis.* **Hartwig, Kai, y otros.** 2009, genes nutr, págs. 59-67.
136. *Epigenetics silencing mediates mitochondria stress-induced longevity.* **Schroeder, EA, Raimundo, N y Shadel, GS.** 2013, Cell Metab, págs. 954-964.
137. *Glucose restriction extends C elegans life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress.* **Schulz, TJ, y otros.** 2007, Cell Metab, págs. 280-293.
138. *The complex interplay of iron metabolism, reactive oxygen species, and reactive nitrogen species: Insights into the potential of various iron therapies to induce oxidative and nitrosative stress.* **Koskenkorva-Frank, TS, y otros.** 2013, Free Radic Biol Med, págs. 1174-1194.
139. *Transcriptional and epigenetic regulation of autophagy in aging.* **Lapierre, Louis R, y otros.** 2015, Autophagy, págs. 867-880.
140. *Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation.* **Klionsky, DJ y Emr, SD.** 2000, Science, págs. 1717-1721.
141. *Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy.* **Levine, B y Klionsky, D.** 2004, dev cell, págs. 463-477.
142. *Heat shock response and autophagy-cooperation and control.* **Dokladny, Karol, Myers, Orrin y Moseley, Pope.** 2015, Autophagy, págs. 200-213.
143. **Shemesh, N y Ben-zvi, A.** HSF1 Regulation in aging and Its Role in Longevity. [aut. libro] A Nakai. *Heat Shock Factor.* Tokyo : Springer, 2016.

144. *Regulation of longevity in Caenorhabditis elegans by heat shock factor and molecular chaperones.* **Morley, James F y Morimoto, Richard I.** 2004, Mol Biol Cell, págs. 657-664.
145. *The threshold for polyglutamine-expansion protein aggregation and cellular toxicity is dynamic and influenced by aging in C elegans.* **Morley, JF, y otros.** 2002, Proc Natl Acad Sci USA, págs. 10417-10422.
146. *Hydrophilic antioxidants from Andean tomato landraces assessed by their bioactivities in vitro and in vivo.* **Di Paola, Romina D, y otros.** 2016, Food Chemistry, págs. 146-155.
147. *Chlorogenic acid extends the lifespan of Caenorhabditis elegans via insulin/Igf-1 signaling pathway.* **Zheng, SQ, y otros.** 2017, J. Gerontol, Ser. A. Biol. Sci. Med Sci, págs. 464-472.
148. *The hif-1 hypoxia-inducible factor modulates lifespan in c elegans.* **Zhang, Yi, y otros.** 2009, PLoS ONE.
149. *In vivo detection of ROS and redox status in Caenorhabditis elegans.* **Braeckman, BP, y otros.** 2016, Antioxidants and redox signaling.
150. *Assessing Antioxidant and Prooxidant Activities of Phenolic compounds.* **Fukumoto, LR y Mazza, G.** 2000, Agric Food chem., págs. 3597-3604.
151. *Hormetic heat stress and HSF-1 induce autophagy to improve survival and proteostasis in C. elegans.* **Kumsta, Caroline, Chang, Jessica T, Schmalz, Jessica y Hansen, Malene.** 2017, Nat. Commun.
152. *Autophagy protects C. elegans against necrosis during Pseudomonas aeruginosa infection.* **Cheng, Gang Zou, y otros.** 2014, PNAS, págs. 12480-12485.
153. *Roles of the Hif-1 hypoxia-inducible factor during hipoxia response in C elegans.* **Shen, C, y otros.** 2005, J Biol chem, págs. 580-588.
154. *A role for autophagy in the extension of lifespan by dietary restriction in c. elegans.* **Hansen, M, y otros.** 2008, plos genet.
155. *Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in C. elegans.* **Melendez, A, y otros.** 2003, Science, págs. 1387-1391.

156. *Forward and reverse genetics approaches to uncover metabolic aging pathways in C elegans.* **Gao, AW, y otros.** 2018, *Biochem Biophys Acts Mol Basis Dis* , págs. 2697-2706.
157. *Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing.* **Guzy, RD, y otros.** 2005, *Cell Metab*, págs. 401-408.
158. *Inhibition of respiration extends C elegans life span via reactive oxygen species that increase Hif-1 activity.* **Lee, SJ, Hwang, AB y Kenyon, C.** 2010, *Curr Biol*, págs. 2131-2136.
159. *Induction of cytotoxicity by chlorogenic acid in human oral tumor cell lines.* **Jiang, Y, y otros.** 2000, *Phytomedicine* , págs. 483-491.
160. *Involvement of NADPH oxidase in high-dose phenolic acid-induced pro-oxidant activity on rat mesenteric venules.* **Du, WY, y otros.** 2017, *Exp. Ther. Med*, págs. 17-22.
161. *Feedback regulation via AMPK and Hif-1 mediates ROS-dependent longevity in C elegans.* **Hwang, Ara B, y otros.** 2014, *Proc. Natl. Sci.*, págs. 4458-4467.
162. *Formación de especies químicas reactivas en la biotransformación de xenobioticos y toxicología.* **Castro, GD y Castro, JA.** 1988, *Acta Bioquímica Clínica latinoamericana* , págs. 221-238.
163. *Toward an "omic" physiopathology of reactive chemicals: thirty years of mass spectrometric study of the protein adducts with endogenous and xenobiotic compounds.* **Rubino, FM, y otros.** 2009, *Mass spectrometry reviews*, págs. 725-784.
164. *Assessment of the propensity for covalent binding of electrophiles to biological substrates.* **Carlson, RM.** 1990, *Environmental health perspectives*, págs. 227-232.
165. *The electrophile responsive proteome: integrating proteomics and lipidomics with the cellular function.* **Higdon, AN, y otros.** 2012, *antioxidant & redox signaling*, págs. 1580-1589.
166. *Antioxidant effect of a nitrated cyclic nucleotide functioning as an endogenous electrophile.* **Sawa, T, Ihara, H y Akaike, T.** 2011, *current topics in medicinal chemistry*, págs. 1854-1860.
167. *Nitro-fatty acid formation and signaling.* **Freeman, Bruce A, y otros.** 2008, *The journal of biological chemistry*, págs. 15515-15519.

168. *Modulation of nitro-fatty acid signaling prostaglandin reductase-1 is a nitroalkene reductase.* **Vitturi, Dario A, y otros.** 2013, the journal of biological chemistry , págs. 25626-25637.
169. *Mass spectrometric identification of covalent adducts of the skin allergen 2,4-dinitro-1-chlorobenzene and model skin proteins.* **Aleksic, M, y otros.** 2008, Toxicol. in vitro, págs. 1169-1176.
170. *The permissive role of mitochondria in the induction of haem oxygenase-1 in endothelial cells.* **Ricart, Karina C, y otros.** 2009, The biochemical journal, págs. 427-436.
171. *Covalent modification at Cys15q dissociates the electrophile sensor Keap1 from the ubiquitin ligase CUL3.* **Rachakonda, G, y otros.** 2008, Chem Res Toxicol., págs. 705-710.
172. *SKN-1 links c. elegans mesendodermal specification to a conserved oxidative stress response.* **Jae Hyung, An y Keith Blackwell, T.** 2003, genes & development, págs. 1882-1893.
173. *The WD40 Repeat Protein WDR-23 Functions with the CUL4/DDB1 Ubiquitin Ligase To Regulate Nuclear Abundance and Activity of SKN-1 in Caenorhabditis elegans.* **Choe, Keith, Przybysz, Aaron y Strange, Kevin.** 2009, Molecular and Cellular Biology.
174. *SKN-1 links C. elegans mesendodermal specification to a conserved oxidative stress response.* **Hyung An, Jae y Keith Blackwell, T.** 2005, Genes & development .
175. *Genetic links between diet and lifespan: shared mechanism from yeast to humans.* **Bishop, NA y Guarente, L.** 2001, Nature Rev Genet, págs. 835-844.
176. *TOR signaling and rapamycin influence longevity by regulating SKN-1/Nrf and DAF-16/FoxO.* **Robida-Stubbs, S, y otros.** 2012, Cell metabolism, págs. 713-724.
177. *Regulation of Caenorhabditis elegans oxidative stress defense protein SKN-1 by glycogen synthase kinase.* **An, JH, y otros.** 2005, Proc Natl Acad Sci USA, págs. 16275-16280.
178. *Proteasomal dysfunction activates the transcription factor SKN-1 and produces a selective oxidative-stress response in C elegans.* **Kahn, NW, y otros.** 2008, Biochem J, págs. 205-213.
179. *Condition-adapted stress and longevity gene regulation by C elegans SKN-1/Nrf.* **Oliveira, Riva P, y otros.** 2009, Aging cell, págs. 524-541.

180. *Specific SKN-1/Nrf stress responses to perturbations in translation elongation and proteasome activity.* **Li, Xuan, y otros.** 2011, PLoS genet.
181. *Direct inhibition of the longevity-promoting factor SKN-1 by insuline-like signaling in C elegans.* **Tullet, JM, y otros.** 2008, Cell , págs. 1025-1038.
182. *Activators and inhibitors of Nrf2: a review of their potential for clinical development.* **Robledinos-Antón, N, y otros.** 2019, Oxidative Medicine and Cellular Longevity.
183. *Chemopreventive activity of sulfopharane.* **Jiang, Xin, y otros.** Changchun : s.n., 2018, Drug Design, Development and Therapy, Vol. 12, págs. 2905-2913.
184. *Structure activity relationship of carotenoid derivatives in activation of the electrophile/antioxidant response element transcription system.* **Linnewiel, K, y otros.** 2009, free radical Biology & medicine, págs. 659-667.
185. *Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize.* **Schwartz, SH, y otros.** 1997, Science, págs. 1872-1874.
186. *Pasteurized Orange Juice Rich in Carotenoids Protects Caenorhabditis elegans against Oxidative Stress and  $\beta$ -Amyloid Toxicity through Direct and Indirect Mechanisms.* **Ricardo, y otros.** 2019, Oxidative Medicine and Cellular Longevity.
187. *Characterization by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time of flight mass spectrometry of the lipid fraction of spirulina platensis pressurized ethano extract.* **Herrero, M, y otros.** 2007, mass spectrometry.



ANEXO I

Contenido de compuestos fenólicos en las diferentes accesiones

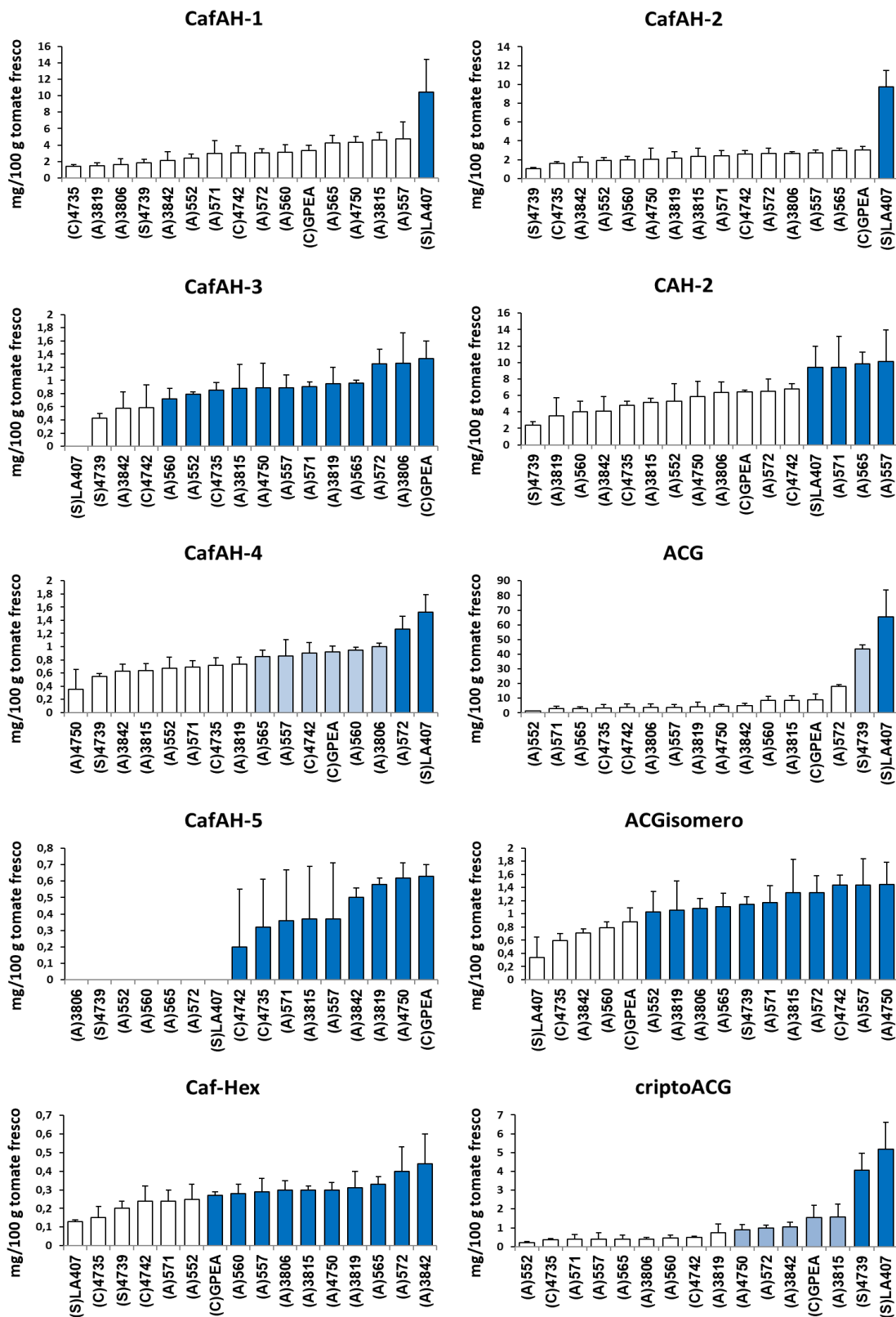


Figura 1 -continúa en la siguiente página-

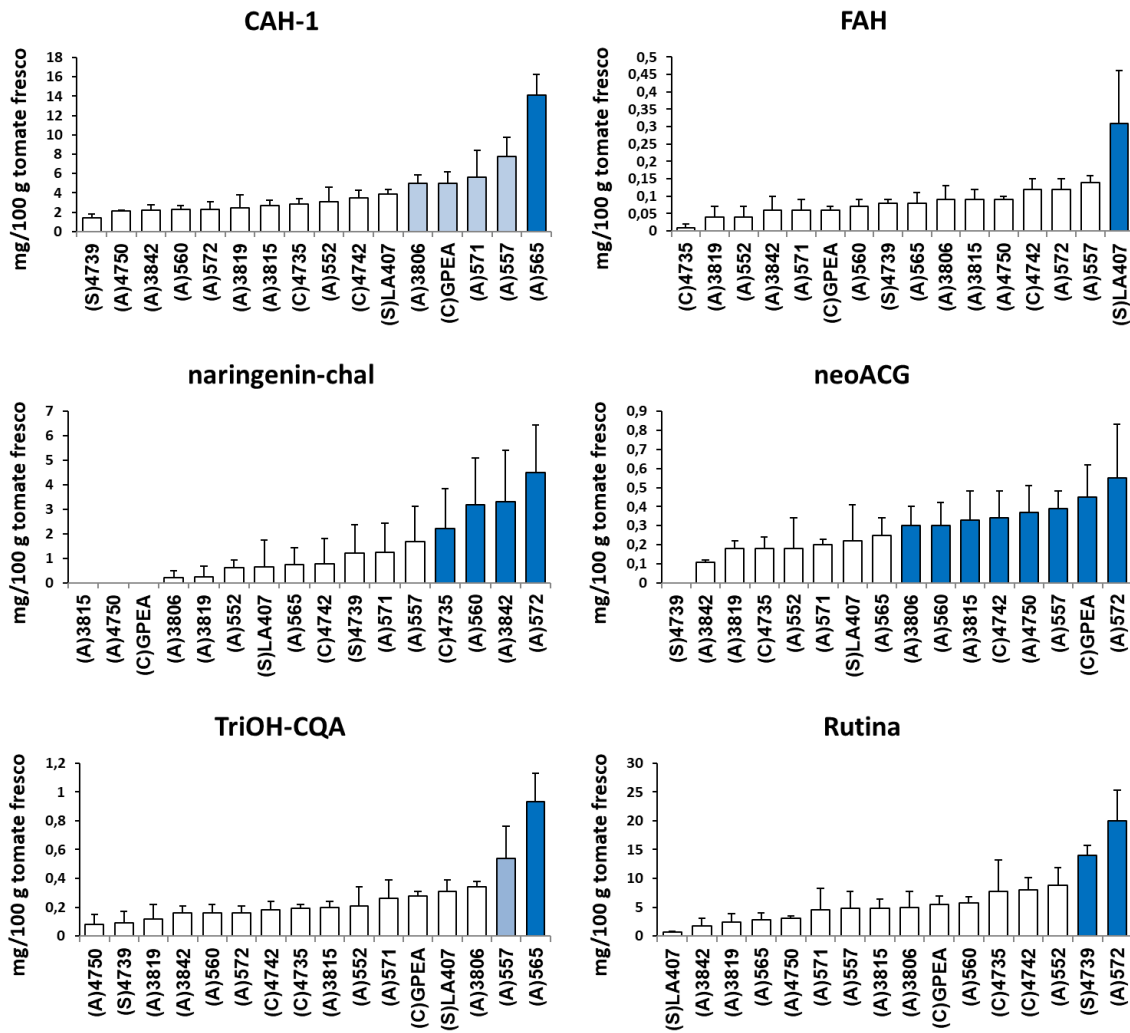


Figura 1: Concentraciones halladas para cada compuesto fenólico en todas las accesiones. Los compuestos fenólicos fueron expresados como mg por cada 100 g de tomate fresco. #LA407, #4739 son accesiones silvestres (S), #4735 Y #4742 son accesiones comerciales (C) y las demás muestras son accesiones autóctonas (A).

**Cromatogramas para la cuantificación de compuestos fenólicos (extractos hidrofílicos)**

**Detección de compuestos fenólicos,  $\lambda$ : 320 nm**

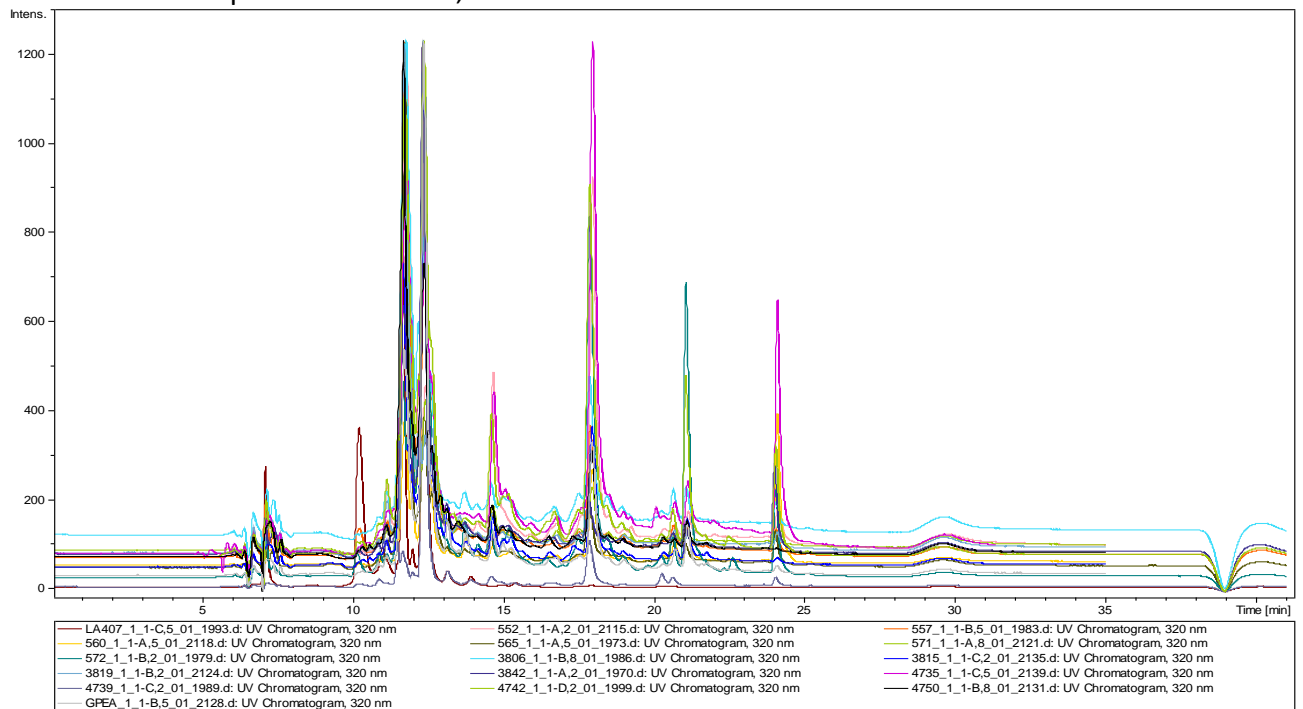


Figura 2: En el cromatograma se observan los 16 cultivares analizados en el estudio, a 320 nm.

**Detección de compuestos fenólicos,  $\lambda$ : 280 nm**

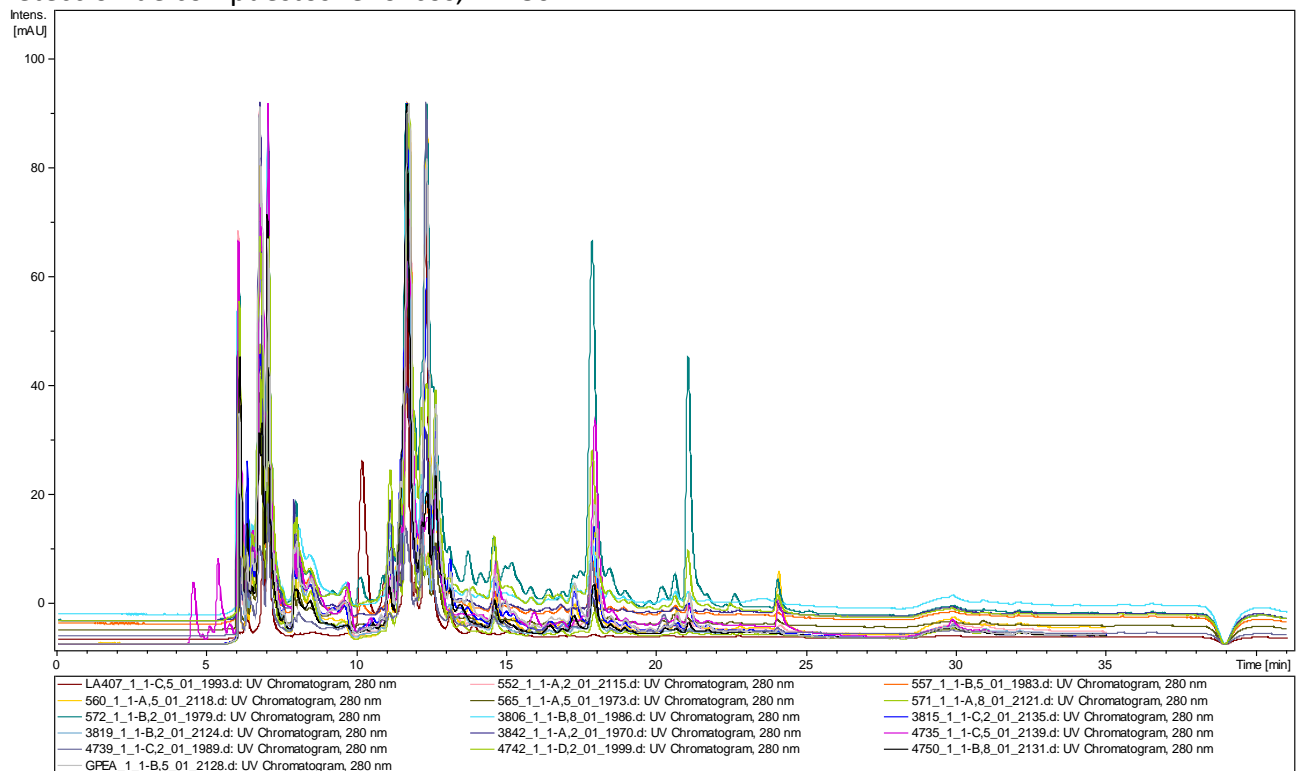


Figura 3: En el cromatograma se observan los 16 cultivares analizados en el estudio, a 280 nm.

Contenido de compuestos lipofílicos en las diferentes accesiones

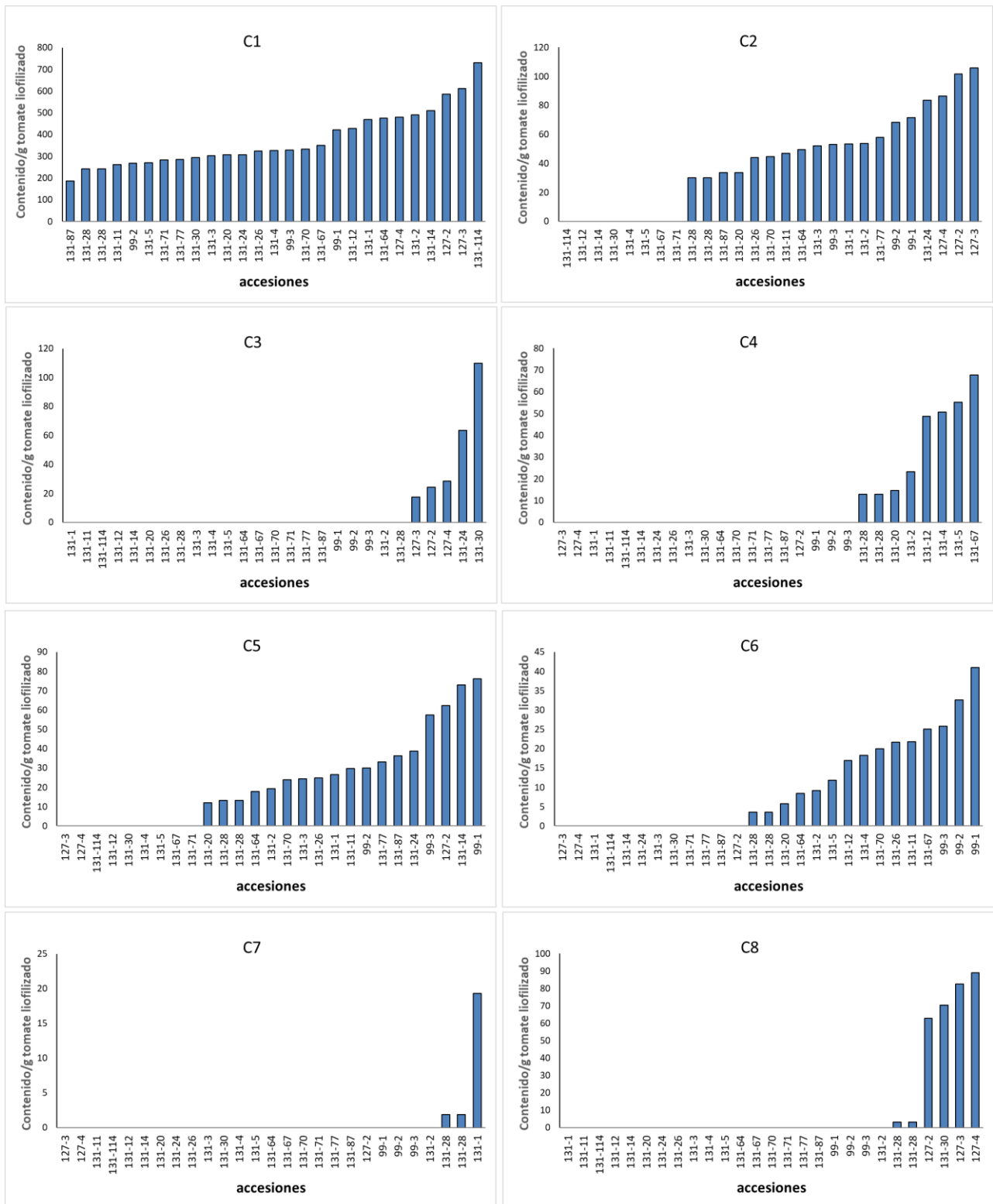


Figura 4 -continúa en la siguiente página-

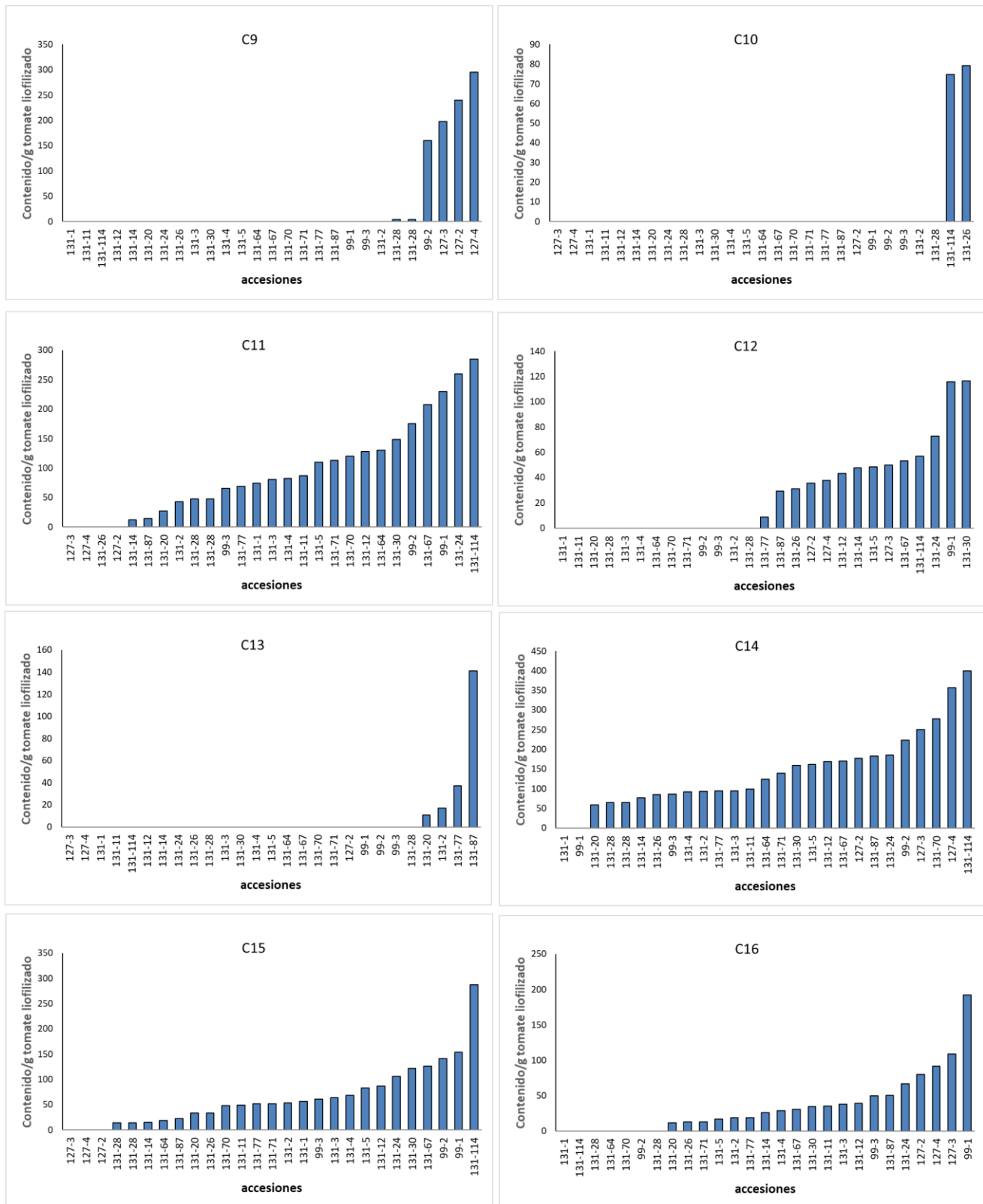


Figura 4 -continúa en la siguiente página-

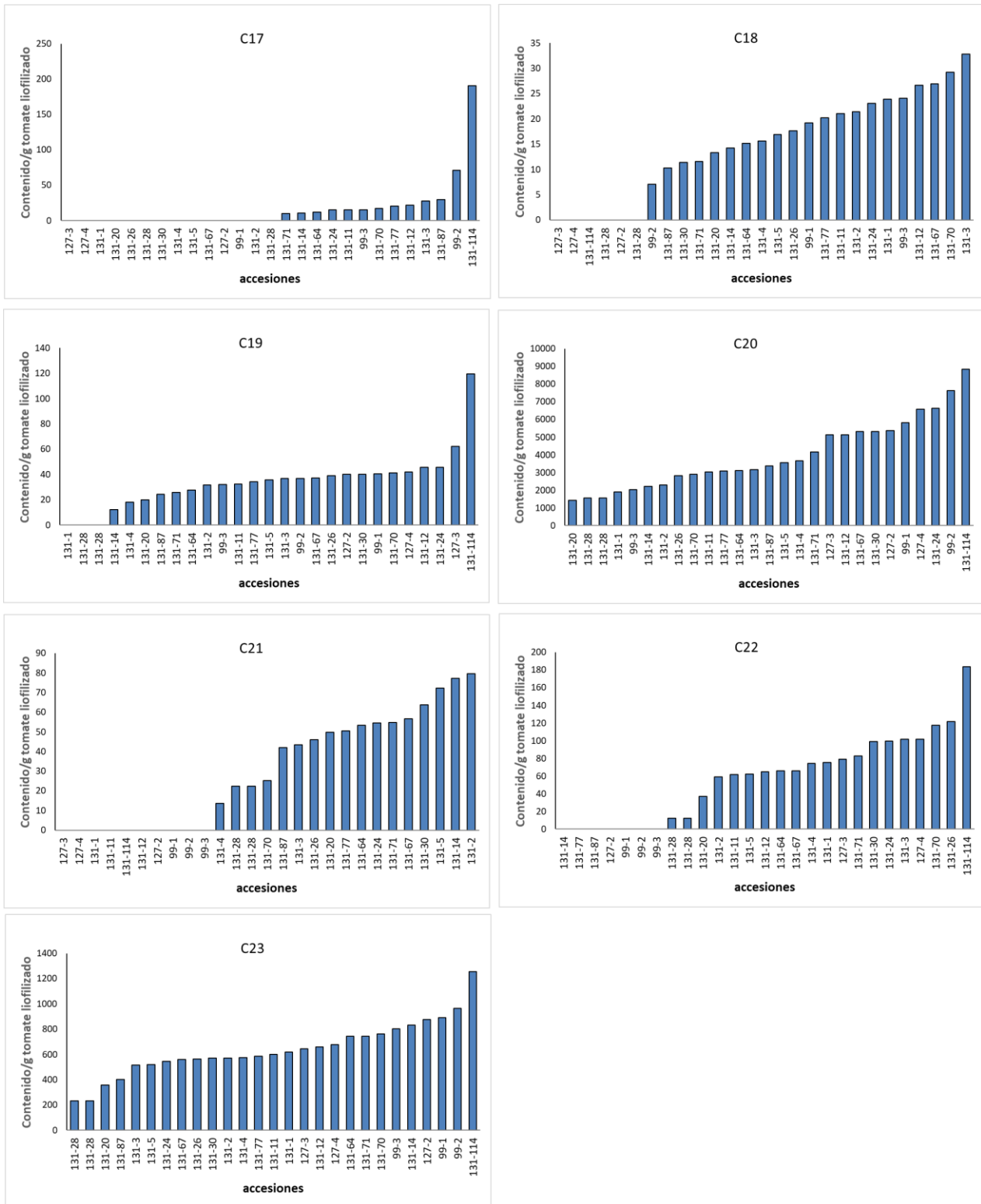


Figura 4: Concentraciones halladas para cada compuesto lipófilico en todas las accesiones analizadas. A cada compuesto se le asignó un número de acuerdo al orden de elución de la corrida cromatográfica. Los picos identificados corresponden a: 1= luteína, 11= di-hidroxicopeno, 13= licoxantina, 14= licopeno-1,2,1,2-diepóxido, 15= cis-violaxantina, 16= prolicopeno, 19= (ε)-5,6,5',8'-diepoxi-5,5,5',8'-tetrahydro-β-β-caroteno, 20= licopeno, 21= neurosporeno, 22= trans-γ-caroteno, 23= trans-β-caroteno.

Cromatogramas para la cuantificación de compuestos lipofílicos (extractos lipofílicos)

Detección de compuestos lipofílicos  $\lambda$ : 440 nm

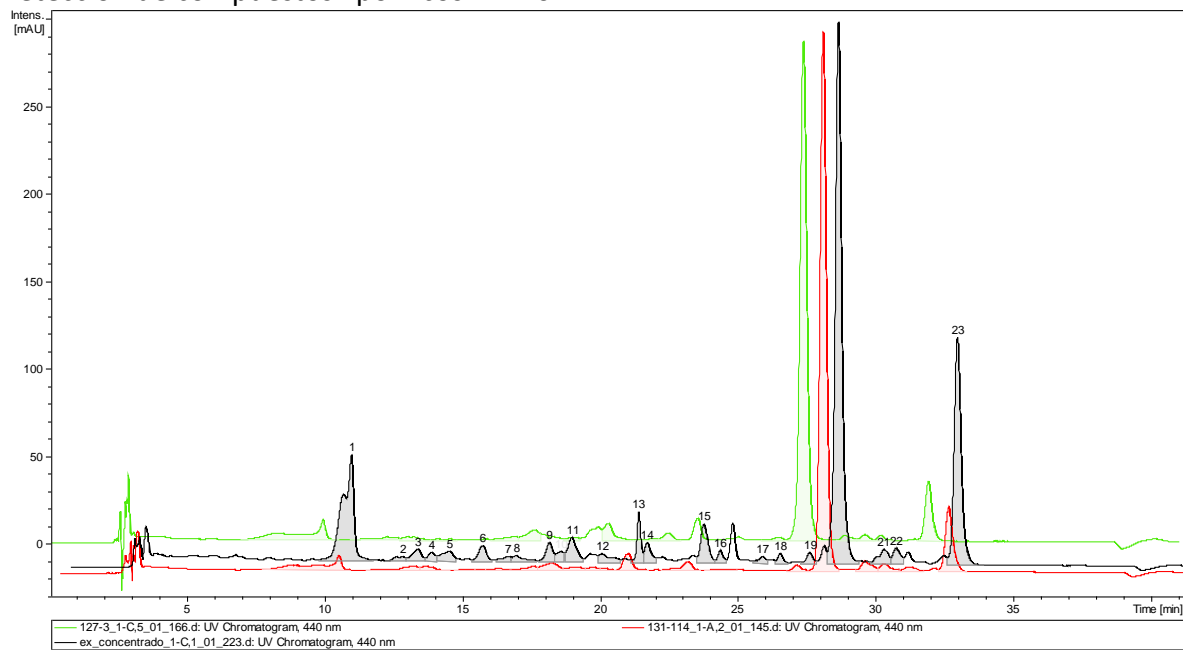


Figura 5: En el cromatograma se observan las accesiones 127-3, 131-114, y un extracto concentrado para identificar los picos de interés analizados a 440 nm.

Detección de compuestos lipofílicos  $\lambda$ : 440 nm

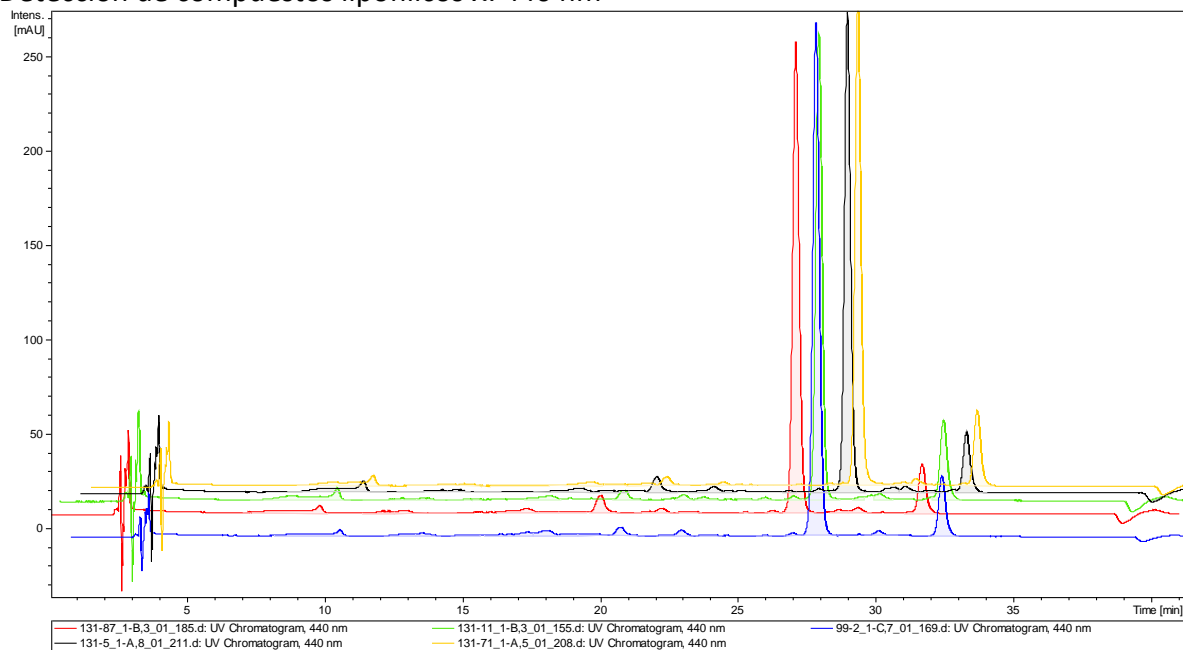


Figura 6: En el cromatograma se observan las accesiones 131-87, 131-5, 131-11, 131-71, y 99-2 analizados a 440 nm.

### Detección de compuestos lipofílicos $\lambda$ : 440 nm

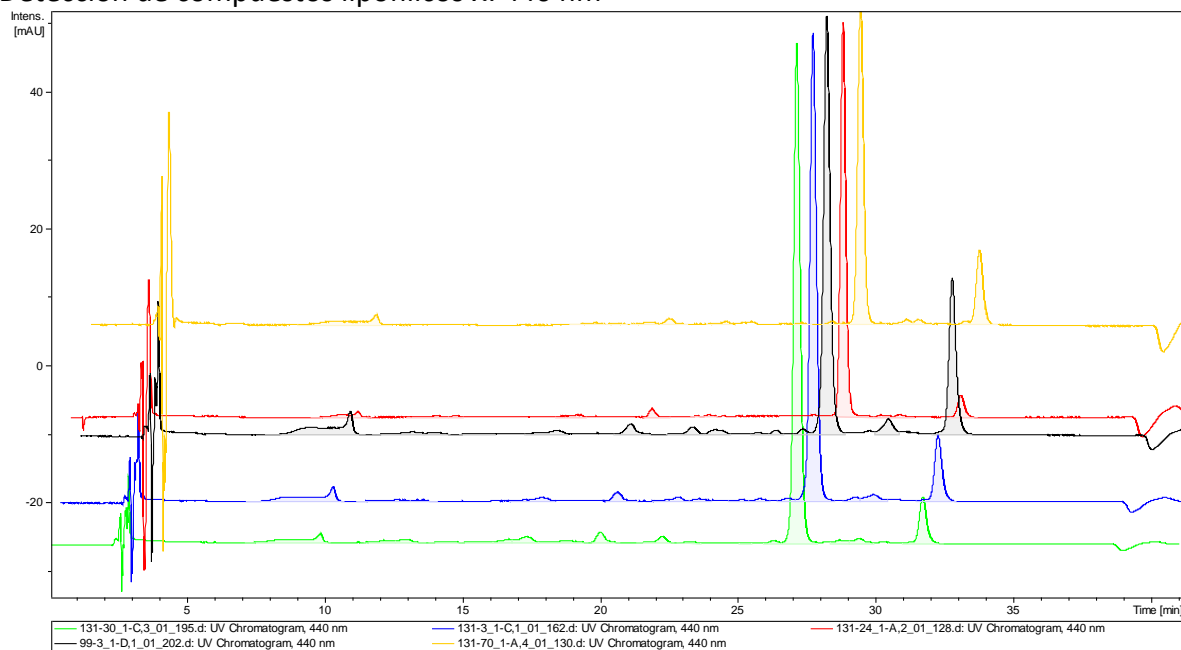


Figura 7: En el cromatograma se observan las accesiones 131-30, 99-3, 131-3, 131-70, y 131-24 analizados a 440 nm.

### Detección de compuestos lipofílicos $\lambda$ : 440 nm

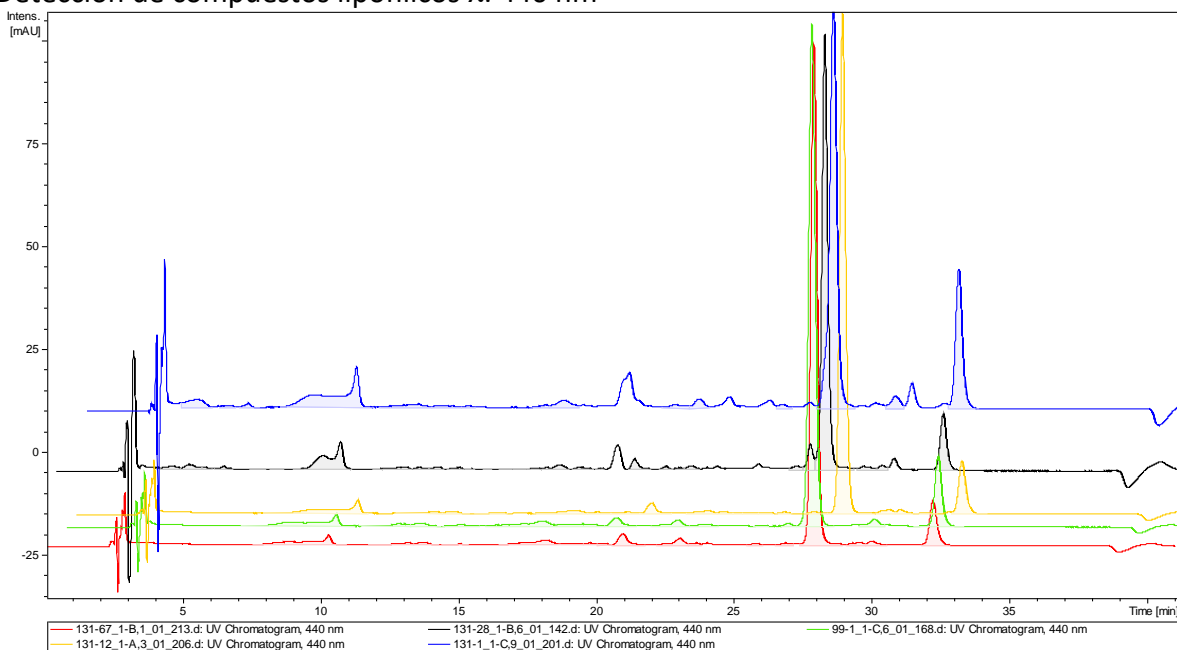


Figura 8: En el cromatograma se observan las accesiones 131-67, 131-12, 131-28, 131-1, y 99-1 analizados a 440 nm.



Detección de compuestos lipofílicos  $\lambda$ : 440 nm

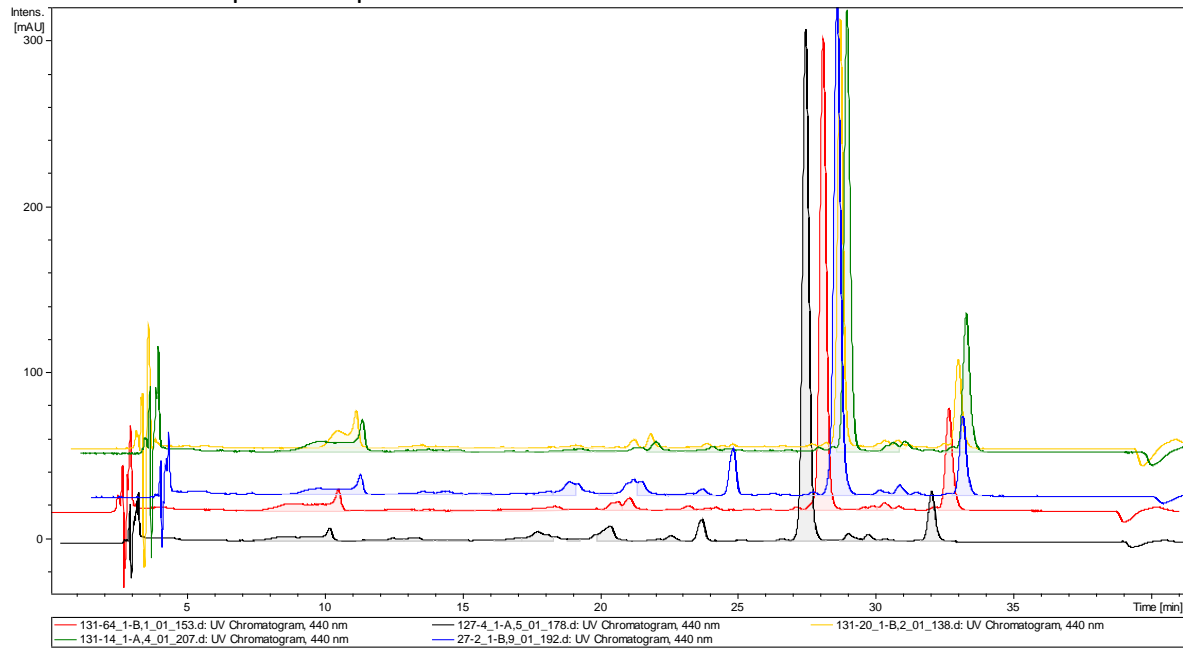


Figura 9: En el cromatograma se observan las accesiones 131-64, 131-14, 127-4, 127-2, y 131-20 analizados a 440 nm.

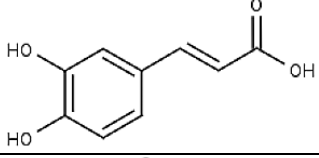
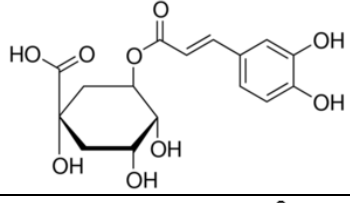
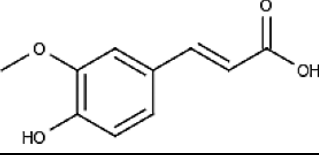
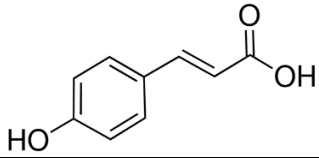
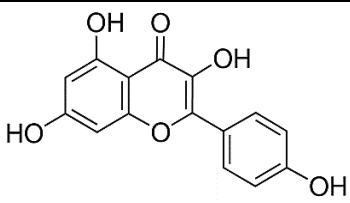
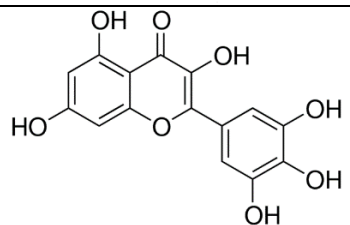
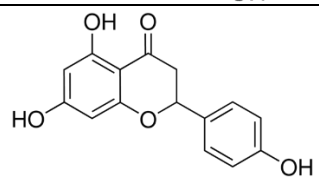
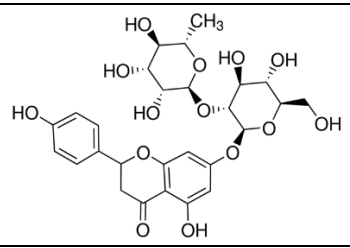
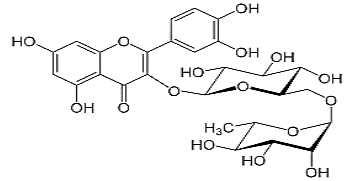
Estándares utilizados en la identificación de compuestos fenólicos		
Compuesto	Estructura química	Fórmula molecular
Ácido caféico		$C_9H_8O_4$
Ácido clorogénico		$C_{16}H_{18}O_9$
Ácido ferúlico		$C_{10}H_{10}O_4$
Ácido p-cumárico		$C_9H_8O_3$
Kaempferol		$C_{16}H_{10}O_8$
Miricetina		$C_{15}H_{10}O_8$
Naringenina		$C_{15}H_{12}O_5$
Naringina		$C_{27}H_{32}O_{14}$
Rutina		$C_{27}H_{30}O_{16}$

Tabla 1: Estándares utilizados en la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos.

Cuantificación de compuestos lipofílicos utilizando el área bajo la curva  
espectrofotométrica.

accesiones	compuestos						
	1	2	3	4	5	6	7
127-2	585,14	101,61	24,14	0,00	62,36	0,00	0,00
127-3	611,51	105,81	17,40	0,00	0,00	0,00	0,00
127-4	478,88	86,26	28,60	0,00	0,00	0,00	0,00
131-1	469,40	53,46	0,00	0,00	26,70	0,00	19,33
131-11	262,26	46,94	0,00	0,00	29,66	21,82	0,00
131-114	730,84	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
131-12	428,98	0,00	0,00	48,71	0,00	16,99	0,00
131-14	509,15	0,00	0,00	0,00	73,06	0,00	0,00
131-2	490,91	53,81	0,00	23,30	19,42	9,14	0,00
131-20	306,82	33,63	0,00	14,56	12,14	5,71	0,00
131-24	306,91	83,61	63,42	0,00	38,72	0,00	0,00
131-26	324,07	43,91	0,00	0,00	24,78	21,63	0,00
131-28	242,85	29,95	0,00	12,93	13,26	3,60	1,89
131-28	242,85	29,95	0,00	12,93	13,26	3,60	1,89
131-3	303,56	52,03	0,00	0,00	24,52	0,00	0,00
131-30	294,34	0,00	109,76	0,00	0,00	0,00	0,00
131-4	325,73	0,00	0,00	50,76	0,00	18,32	0,00
131-5	270,19	0,00	0,00	55,14	0,00	11,78	0,00
131-64	476,68	49,56	0,00	0,00	17,73	8,49	0,00
131-67	351,03	0,00	0,00	67,69	0,00	25,08	0,00
131-70	333,27	44,50	0,00	0,00	23,97	20,02	0,00
131-71	283,29	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
131-77	285,22	57,78	0,00	0,00	33,25	0,00	0,00
131-87	185,83	33,56	0,00	0,00	36,30	0,00	0,00
99-1	421,69	71,36	0,00	0,00	76,20	40,99	0,00
99-2	267,60	68,26	0,00	0,00	30,07	32,66	0,00
99-3	329,02	53,07	0,00	0,00	57,51	25,84	0,00

Tabla 2 -continúa en la siguiente página-

acciones	compuestos						14
	8	9	10	11	12	13	
127-2	62,86	239,75	0,00	0,00	35,50	0,00	177,32
127-3	82,45	198,04	0,00	0,00	50,07	0,00	250,04
127-4	88,92	295,05	0,00	0,00	37,79	0,00	356,82
131-1	0,00	0,00	0,00	74,78	0,00	0,00	0,00
131-11	0,00	0,00	0,00	87,18	0,00	0,00	99,40
131-114	0,00	0,00	74,83	284,50	56,87	0,00	398,77
131-12	0,00	0,00	0,00	128,17	43,40	0,00	169,10
131-14	0,00	0,00	0,00	12,35	47,86	0,00	76,19
131-2	0,00	0,00	0,00	43,29	0,00	16,91	93,48
131-20	0,00	0,00	0,00	27,05	0,00	10,57	58,42
131-24	0,00	0,00	0,00	259,86	72,82	0,00	185,42
131-26	0,00	0,00	79,21	0,00	31,06	0,00	85,07
131-28	3,17	4,10	0,00	47,28	0,00	0,00	64,93
131-28	3,17	4,10	0,00	47,28	0,00	0,00	64,93
131-3	0,00	0,00	0,00	81,00	0,00	0,00	93,78
131-30	70,28	0,00	0,00	148,42	116,52	0,00	159,90
131-4	0,00	0,00	0,00	82,37	0,00	0,00	92,24
131-5	0,00	0,00	0,00	109,79	48,54	0,00	161,43
131-64	0,00	0,00	0,00	130,60	0,00	0,00	124,28
131-67	0,00	0,00	0,00	207,97	53,10	0,00	170,44
131-70	0,00	0,00	0,00	120,06	0,00	0,00	276,98
131-71	0,00	0,00	0,00	112,76	0,00	0,00	138,75
131-77	0,00	0,00	0,00	69,14	8,74	37,01	93,73
131-87	0,00	0,00	0,00	14,62	29,20	141,22	182,78
99-1	0,00	0,00	0,00	229,91	115,81	0,00	0,00
99-2	0,00	160,44	0,00	175,17	0,00	0,00	223,30
99-3	0,00	0,00	0,00	66,06	0,00	0,00	86,34

Tabla 2 -continúa en la siguiente página-

	<b>compuestos</b>						
<b>acciones</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>21</b>
<b>127-2</b>	0,00	80,16	0,00	0,00	40,09	5376,80	0,00
<b>127-3</b>	0,00	108,50	0,00	0,00	62,22	5121,96	0,00
<b>127-4</b>	0,00	91,89	0,00	0,00	42,08	6576,24	0,00
<b>131-1</b>	56,81	0,00	0,00	23,86	0,00	1891,36	0,00
<b>131-11</b>	48,59	35,08	15,01	21,08	32,37	3023,02	0,00
<b>131-114</b>	286,99	0,00	190,81	0,00	119,50	8836,11	0,00
<b>131-12</b>	87,16	38,81	21,86	26,68	45,50	5142,73	0,00
<b>131-14</b>	14,81	26,03	10,37	14,24	12,11	2218,88	77,21
<b>131-2</b>	53,81	18,65	0,00	21,36	31,67	2300,60	79,53
<b>131-20</b>	33,63	11,66	0,00	13,35	19,80	1437,87	49,71
<b>131-24</b>	105,63	66,63	14,88	23,09	45,80	6626,80	54,53
<b>131-26</b>	33,72	12,54	0,00	17,60	39,14	2832,05	46,09
<b>131-28</b>	13,72	0,00	0,00	0,00	0,00	1570,24	22,44
<b>131-28</b>	13,72	0,00	0,00	0,00	0,00	1570,24	22,44
<b>131-3</b>	63,68	37,59	27,39	32,78	36,72	3166,44	43,41
<b>131-30</b>	121,83	34,58	0,00	11,39	40,14	5323,46	63,75
<b>131-4</b>	67,92	28,35	0,00	15,57	18,06	3658,79	13,70
<b>131-5</b>	83,37	17,02	0,00	16,87	35,59	3551,01	72,33
<b>131-64</b>	18,86	0,00	11,87	15,19	27,72	3121,38	53,42
<b>131-67</b>	126,69	30,58	0,00	26,91	37,25	5306,95	56,76
<b>131-70</b>	48,22	0,00	17,09	29,20	41,13	2908,79	25,11
<b>131-71</b>	51,96	12,59	9,84	11,57	25,81	4149,02	54,83
<b>131-77</b>	51,59	19,07	20,66	20,17	34,34	3094,09	50,58
<b>131-87</b>	22,49	50,17	29,42	10,25	24,39	3371,08	41,88
<b>99-1</b>	154,06	192,10	0,00	19,23	40,30	5817,95	0,00
<b>99-2</b>	140,90	0,00	70,81	7,05	36,84	7626,22	0,00
<b>99-3</b>	60,82	49,89	15,17	24,08	32,03	2038,02	0,00

Tabla 2 -continúa en la siguiente página-

acciones	Compuestos	
	22	23
127-2	0,00	875,96
127-3	79,22	643,44
127-4	101,71	679,24
131-1	75,38	618,29
131-11	61,98	599,06
131-114	183,67	1256,42
131-12	65,08	660,74
131-14	0,00	833,88
131-2	58,99	572,82
131-20	36,87	358,01
131-24	99,72	544,53
131-26	121,61	562,04
131-28	12,11	231,43
131-28	12,11	231,43
131-3	101,47	515,05
131-30	98,95	571,65
131-4	74,17	573,10
131-5	62,17	519,75
131-64	65,81	744,62
131-67	65,92	561,78
131-70	117,60	761,65
131-71	82,96	745,37
131-77	0,00	584,89
131-87	0,00	403,06
99-1	0,00	892,91
99-2	0,00	963,70
99-3	0,00	803,14

Tabla 2: Cuantificación de compuestos lipofílicos utilizando el área bajo los picos obtenidos espectrofotométricamente. Los compuestos se enumeran del 1 al 23 de acuerdo a su orden de elución en la corrida cromatográfica.