



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA**

**EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD  
DEL BRÓCOLI (*Brassica oleracea var. italica*) CON  
*Drosophila melanogaster*.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGA:**

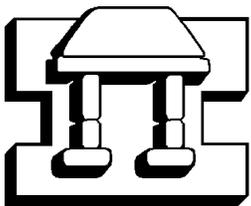
**PRESENTA:**

**LUZ ZORAYA LÓPEZ ROCHA**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**M. en C. IRMA ELENA DUEÑAS GARCIA**

**LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO, 2004.**



**IZTACALA**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## AGRADECIMIENTOS

*A la Maestra Irma, por haberme aceptado como su alumna, por permitirme conocer parte del mundo de la toxicología, y por darme la oportunidad de concluir con una etapa de mi vida profesional Gracias.*

*A la Maestra Laura, por sus consejos, su confianza y por las platicas tan amenas acerca de la vida que tenia conmigo, por estar siempre con una sonrisa y ayudarme cuando tenia dudas. Gracias.*

*A la Maestra Maru Gracias, por apoyarme en todo, por su interés en mí y corregirme en mis faltas.*

*A Diego Gracias por tu ayuda en el laboratorio y por permitirme conocerte.*

*A mis compañeros de laboratorio: Viridiana, Luis, Juan Carlos, Stephanie y a los que faltaron Gracias por su hacer tan agradable mi estancia en el laboratorio.*

*A al laboratorio de bacteriología de la Unidad de Investigación Interdisciplinaria (UIICSE) por su ayuda para la liofilización del brócoli.*

*A toda la gente que de una u otra forma intervino en la realización de esta tesis.*

## DEDICATORIA

*A mis padres Clara Luz y Daniel: por la oportunidad de existir, por su total e incondicional amor, apoyo y paciencia, por su comprensión, por su sacrificio en algún tiempo incomprendido, por su ejemplo de superación incansable, por darme un hogar feliz, por hacerme entender que las cosas más difíciles son las que mas valen la pena, por la confianza que en mi depositaron, ya que con todo esto he logrado terminar mis estudios profesionales que constituyen el legado mas grande que pudiera recibir, y es la herencia más grande que podría recibir, por todo esto MUCHAS GRACIAS.*

*“solo el universo mismo se compara con mi amor a si ustedes”*

## DEDICATORIA

*A mis hermanos Daniel, Juan José y Lisette por siempre estar con migo y apoyarme en todo momento Gracias los Quiero.*

*A mis sobrinos Cynthia, Daniela, Leticia, Carlos y Alejandro por que espero que esto les sirva de ejemplo en el futuro y se esfuercen por ser mejores cada día. Los Quiero.*

*A mis cuñadas Lourdes y Patricia por su apoyo Gracias.*

*A Omar por se mi mejor amigo, por el camino recorrido a mi lado, por creer en mi y en mi trabajo, por cambiarme la vida y dejarme ser parte de la tuya, por darme tu amistad y cariño por tu paciencia y apoyo, por todo el tiempo que hemos compartido por estar con migo cuando más lo necesité, por seguir formando parte fundamental de la realización de muchos sueños, por ser una persona muy importante en mi vida  
MUCHAS GRACIAS.*

*A mis mejores amigos y hermanos académicos, Gracias por tantas cosas que hicieron por mí, por todos los momentos de alegría, tristeza y locura compartida, por su tolerancia y entusiasmo, por los momentos que estimularon mi crecimiento personal y profesional, por siempre estar dispuestos a ayudarme, pero sobre todo por brindarme su amistad la cual es un tesoro muy valioso y la que espero conservar toda mi vida,  
GRACIAS: Paloma, Idania, Enrique, Luis y Tomas.*

## DEDICATORIA

*A mis mejores y mas queridos tíos Gris y Héctor por su gran apoyo y cariño, por su siempre interés en lo que hago y su felicidad cuando lo logro. Gracias*

*A mis primos Yermain Giovanna y Alex por formar parte importante de la familia, gracias por tu apoyo.*

*A mis compañeros de generación por los breves pero sin duda agradables momentos en los cuales coincidimos.*

*A mis maestros y todo lo que significa el haber estudiado en la FES-Iztacala, por toda su ayuda, enseñanza y consejos a lo largo de la carrera, pero sobre todo por transmitirme su pasión por la Biología.*

*Y a todas las personas que me han ayudado de una u otra manera para pasar este obstáculo.*

## ÍNDICE GENERAL

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Brócoli.....	3
Citocromos p450.....	6
<i>Drosophila melanogaster</i> .....	13
Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas (SMART).....	14
Antecedentes.....	15
Justificación.....	17
Hipótesis.....	17
Objetivos.....	17
Materiales y métodos.....	18
Diagrama metodológico.....	21
Resultados.....	22
Discusión.....	26
Conclusiones.....	28
Recomendaciones.....	28
Anexo 1.....	29
Anexo 2.....	32
Referencias.....	37

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.

Figura 1. Brócoli ( <i>Brassica oleracea var. italica</i> ).....	3
Figura 2. Estructura general de los glucosinolatos.....	4
Figura 3. Estructura del sulforafano.....	5
Figura 4. Citocromo P450.....	7
Figura 5. Vías clásicas de la biotransformación de xenobióticos.....	8
Figura 6. La mosca <i>Drosophila melanogaster</i> .....	13
Tabla 1. Resultados obtenidos con SMART. Se muestra la frecuencia y el número de manchas por mosca.....	21
Figura 7. Frecuencia por mosca de cada uno de los tipos de manchas a las diferentes concentraciones de brócoli.....	22
Figura 8. Distribución de clones <i>mwh</i> por individuo, de diferente tamaño y a diferentes concentraciones de brócoli.....	23
Tabla 2 Resultados obtenidos con SMART inverso se muestra la frecuencia y el número de manchas para las concentraciones del 25%, 50% y 100%.....	24
Figura 9. Ciclo de vida de <i>D. melanogaster</i> .....	27
Figura 10. Distribución de los discos imagales en la larva de <i>D. melanogaster</i> .....	28
Figura 11. Mancha <i>mwh</i> .....	31
Figura 12. Tricomias normales.....	31
Figura 13. Mancha <i>flare</i> .....	32
Figura 14. Ala serrata.....	32
Figura 15. Eventos que ocasionan la pérdida de heterocigocis en <i>D. melanogaster</i> .....	34

## RESUMEN

Se ha reportado que el brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) previene o impide la transformación de células neoplásicas e promueve la desintoxicación por inducción de las enzimas de la fase II del metabolismo xenobiótico. Los brotes jóvenes de este vegetal son fuentes ricas y excepcionales en glucosinolatos, índoles, flavonoides, hierro, y vitaminas A, C y E. Los glucosinolatos, son heterósidos mayoritariamente glucósidos que contienen azufre. Dentro de éstos se ha reportado que uno de los principios activos más importantes debido a su concentración es el sulforafano (200 µg/ 500 mg de brócoli). Algunos de estos compuestos pueden ser insecticidas y en ciertos mamíferos pueden inducir hipotiroidismo y bocio. En la cruce Bioactivación Elevada (BE) de la prueba SMART en ala en *Drosophila melanogaster*, el metabolismo xenobiótico dependiente de los citocromos P450 es constitutivo y se desconocía si éste pudiera biotransformar a alguno de los componentes del brócoli haciéndolo(s) genotóxico(s). Para valorar lo anterior se usó brócoli comercial liofilizado, sin control conocido de contaminantes químicos agrícolas (no orgánicos). Para valorar el efecto insecticida se realizaron pruebas de toxicidad (CL<sub>50</sub>) en las tres líneas (*flare*, *mwh* y *Oregon-flare*) de *D. melanogaster* que se usan para SMART en ala, a 0, 25, 50, 100% de brócoli con respecto al Medio Instantáneo para *Drosophila*. La genotoxicidad de esta Brassicacea se valoró con SMART en ala (cruce BE) utilizando las mismas proporciones de brócoli/ MIC descritas. Contrariamente al efecto insecticida reportado para otro díptero, la mortalidad fue nula en todos los tratamientos y en todas las líneas por lo que no se determinó la CL<sub>50</sub>. En SMART en ala se encontró un efecto dosis respuesta estadísticamente significativo presentado por la reducción de la tasa de mutación basal en los tratamientos con 50 y 100 % de brócoli. Este resultado puede ser explicado: 1. Por la acción de alguno(s) de los diversos componentes que contiene el brócoli y que pueden atrapar radicales libres (ROS) y/ o 2. Por la acción del sulforafano ya que éste interviene en la fase II del sistema de desintoxicación.

## INTRODUCCIÓN

Desde la década de los 80 ha habido notables avances en el área de la Genética Toxicológica. Las investigaciones en este campo han permitido el entendimiento del efecto de las mutaciones en la estructura del ADN (Carnevale, 1992) que pueden ser de diferentes tipos y magnitudes: si afectan al genoma somático se perpetúan sólo en la clona correspondiente a la célula que sufrió la mutación original, mientras que si los gametos participan, la mutación se transforma en hereditaria a través de la reproducción sexual (Pérez, 1990).

Todos los días los seres vivos están expuestos a agentes físicos, químicos y biológicos los cuales son potencialmente tóxicos y/o peligrosos y algunos de ellos están relacionados con el inicio y la promoción del cáncer (Loomis, 1994; Vázquez, 1994).

Existen compuestos vegetales con efecto protector, que pueden ser capaces de intervenir para impedir de forma directa o indirecta las alteraciones de los ácidos nucleicos presentando así una posible actividad antimutagénica y/o anticancerígena. Estas sustancias se pueden encontrar en plantas como la coliflor y el brócoli (Figura 1) (Talalay, 2001).

## BRÓCOLI:



Fig. 1 Brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*)

El brócoli es originario de Asia Occidental y Europa. La palabra brócoli deriva del italiano brocco, que significa brazo o rama y se refiere a un brote del repollo, mientras que brócoli es el plural de broccolo refiriéndose a los numerosos retoños que se desarrollan en esta forma de *Brassica oleracea* (Ross *et al.*, 2000). El brócoli pertenece a la familia de las brassicáceas y su nombre científico es *Brassica oleracea*, variedad *italica*. Es una planta similar a la coliflor aunque la pella o cabeza que forma es más pequeña y está formada por un conjunto de yemas florales junto con sus pedúnculos carnosos, las hojas son de color verde oscuro, algo rizadas y festonadas, la raíz es pivotante con raíces secundarias y superficiales (Carlson, 1987). A diferencia de la coliflor puede producir otras pellas pequeñas laterales que salen de las axilas de las hojas del tallo principal (Nestle, 1998).

El consumo de este vegetal no es elevado por varias razones: falta de hábito alimenticio, poca difusión y poco conocimiento de las características culinarias y nutricionales. La parte comestible, es la cabeza o pella (Nestle, 1998).

El brócoli fresco contiene 1.670 mg de fibra por 100 g de porción comestible, el doble que el apio. Es una buena fuente de vitamina A, C y E (Toporek, 1984). Una porción de brócoli proporciona 68% de las necesidades diarias de vitamina A y de ácido ascórbico (vitamina C) correspondiente a un adulto. También brinda una cantidad considerable de hierro y otros minerales. Además, es bajo en calorías, ya que 100 g de porción comestible aportan tan solo 26 calorías (Kall *et al.*, 1997).

Después de varios días de refrigeración el brócoli conserva las proporciones de tiamina, riboflavina y ácido nicotínico, de forma contraria pierde sus propiedades a temperaturas altas (Mozafar, 2000).

El brócoli también es rico en indoles, flavonoides, glucosinolatos e isotiocianatos. Estudios epidemiológicos han demostrado que la ingestión en la dieta de cantidades considerables de vegetales verdes con glucosinolatos e isotiocianatos proporcionan una protección natural frente a agentes cancerígenos al inhibir la activación de sustancias procancerígenas y activar la acción de enzimas desintoxicantes (NADPH-Quinona reductasa y Glutathion S-Transferasa) (Clapper *et al.*, 1997, Bradburne y Mithen, 2000).

Los glucosinolatos (Figura 2), también llamados heterósidos azufrados, son mayoritariamente glucósidos, contienen azufre y se biosintetizan a partir de aminoácidos diversos, lo que da lugar a diferentes estructuras químicas. El enlace heterosídico se produce en este caso entre la función reductora del azúcar y un grupo tiol (Stoner, 1999).

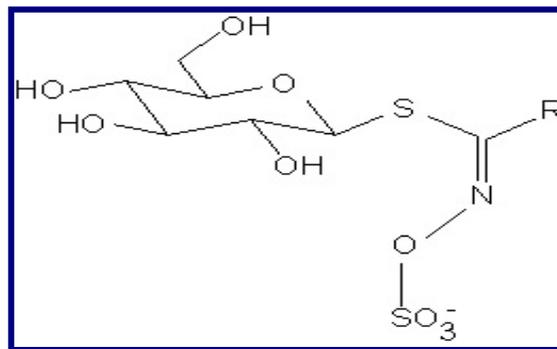


Fig. 2 Estructura general de los glucosinolatos.

Un ejemplo de estos glucosinolatos es el sulforafano (Figura 3) (4-metilsulfinilbutil isotiocianato) que estimula la producción de enzimas del metabolismo de la fase II, las cuales facilitan la excreción de agentes xenobióticos del organismo. Está reportado que 500 mg de brócoli contienen 200 µg de sulforafano (Nestle, 1997; Talalay, 1999).

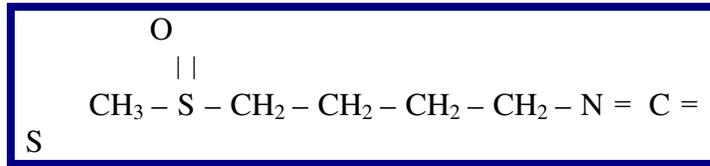


Fig.3 Sulforafano.

Otros estudios demuestran que los glucosinolatos de origen vegetal, cuyos productos catabólicos son los isotiocianatos, reaccionan con los grupos amino de la lisina modificando de esta forma la estructura proteínica. Ésta es una modificación a nivel de la tubulina de los axones, este tipo de daño es similar a la que se produce por otras vías como en la neuropatía diabética y en la alcohólica y por agentes químicos. Esto puede fundamentar bioquímicamente un posible efecto neurotóxico por la ingestión excesiva de glucosinolatos e isotiocianatos en la dieta (Mainguet y Louveaux, 2000).

Los glucosinolatos son tóxicos para algunos insectos y en ciertos mamíferos pueden inducir hipotiroidismo y bocio, debido a la actividad antitiroidea de los isotiocianatos. Además, pueden llegar a provocar aborto. Solamente algunas drogas con glucosinolatos e isotiocianatos han sido y son empleadas en la industria farmacéutica (Giamoustaris y Mitthen, 1995).

Actualmente los seres humanos están expuestos a un sinnúmero de productos industriales sintéticos como, alimentos, cosméticos, medicamentos, productos de limpieza entre otros (Vogel, 1991). Aunado a todo esto la mayor parte de los vegetales que el ser humano consume hoy en día contienen gran cantidad de herbicidas utilizados para destruir plantas indeseables (maleza) para la agricultura, inhibir o alterar su crecimiento e interferir y malograr la germinación de sus semillas (Gómez, 1993). Con frecuencia los daños de los herbicidas a la salud humana no se traducen en alteraciones sensibles e inmediatas, sino que a la larga pueden producir síntomas tóxicos de diagnóstico difícil (Burroughs *et al.*, 1999).

## CITOCROMO P450

Una de las principales familias de enzimas implicadas en dicho metabolismo son los citocromos P450 (CYP450), los cuales están formados por complejos de hierro-porfirina conocidos como grupo hemo, que también constituyen parte integral de la hemoglobina, el pigmento respiratorio de los glóbulos rojos (Nelson y Cox, 2001). Como otras hemoproteínas poseen una parte proteínica (apoproteína) y un grupo prostético donde se localiza el átomo de hierro (Black y Coon, 1986), desde el punto de vista bioquímico, los CYP450 se caracterizan por ser capaces de transportar electrones (Nelson y Cox, 2001).

Los CYP450 (Figura 4) están involucrados tanto en el metabolismo oxidativo de compuestos endógenos como esteroides, ácidos grasos o vitaminas liposolubles (A y D), como en el metabolismo xenobiótico de diversas drogas, cancerígenos, pesticidas y alcaloides, entre otros (Ortiz de Montellano, 1995).

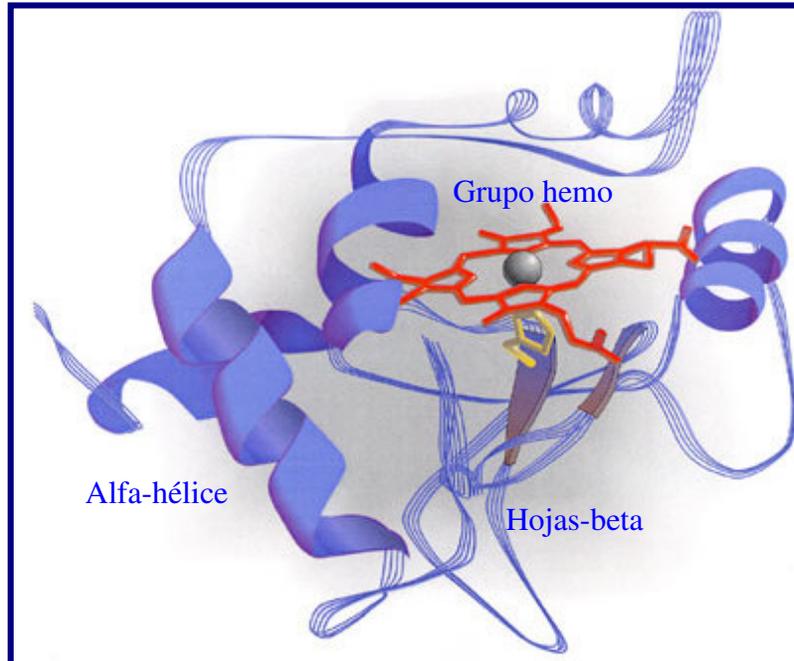


Fig. 4 Citocromo P450 (tomada de Kopplin, 2001)

El complejo enzimático de los CYP450 está distribuido en humanos, animales, plantas y protistas (Black y Coon, 1986). En mamíferos se ha encontrado en gran variedad de órganos, glándulas y tejidos, pudiendo destacar entre otros, riñones, cerebro, testículos, mucosa intestinal, membrana nasal, garganta e hígado (Gandhi *et al.*, 1992).

En organismos eucariotas esta superfamilia enzimática ha sido detectada prácticamente en todas las membranas subcelulares examinadas, principalmente el retículo endoplásmico liso (Lee *et al.*, 1981).

Los CYP450 funcionan como monooxigenasas, es decir, catalizan reacciones en las que se incorpora uno de los dos átomos de la molécula de oxígeno y el otro se reduce para formar agua. Además, precisa de dos sustratos reductores de los dos átomos de la molécula de oxígeno (Nelson y Cox, 2001).

Gracias a su intervención los CYP450 producen una hidroxilación del sustrato que tiene como consecuencia la formación de productos solubles en agua; generalmente se producen derivados farmacológicos menos potentes que pueden ser excretados directamente, o después de una conjugación con el ácido glucurónico o el glutatión (Sipes y Gandolfi, 1986).

De esta forma, entre las funciones que ejercen los CYP450, y teniendo en cuenta que también pueden ser mediadores de la activación de precancerígenos, destaca el papel desintoxicador que realizan gracias al cual se facilita la eliminación de muchas drogas y sustancias perjudiciales para el organismo (Deutsh *et al.*, 1978).

Las enzimas que transforman los compuestos xenobióticos se han clasificado en dos categorías: la fase I, que cumple una misión metabolizadora y la fase II (Figura 5), que tiene la misión de conjugar los metabolitos (Kopplin, 2001) por acción de enzimas como las glutatión-S-transferasas (GST por sus siglas en inglés) y las N-acetiltransferasas (NAT) (Nebert, 1999).

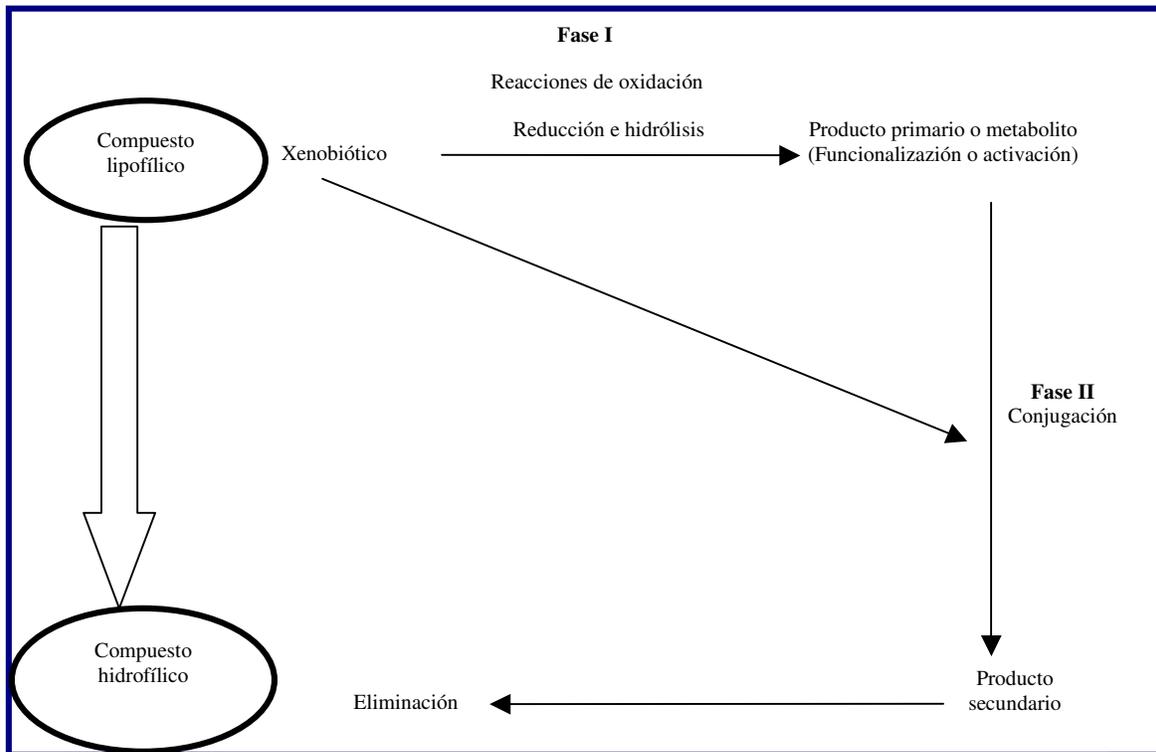


Fig. 5 Vías clásicas de la biotransformación de xenobióticos

Las sustancias tóxicas van a ser reconocidas por la célula como señales exógenas mediante diversos mecanismos de recepción y entrarán en ella por difusión pasiva o mediante transportes activos. Una vez dentro, actuarán las enzimas de la fase I. Los metabolitos que se generen y las propias moléculas no metabolizadas podrán actuar sobre su blanco y ser eficaces, o podrán resultar tóxicos para la célula por formar uniones covalentes a proteínas y ácidos nucleicos o por una perturbación en el ciclo celular provocado por un estrés oxidativo (Nebert, 1999).

El que una droga, cancerígeno o agente terapéutico resulte inocuo para la célula impidiendo su efecto benéfico o perjudicial va a depender de la cantidad de sustratos intermedios formados, de la estabilidad química de éstos y de la presencia cercana de enzimas de la fase II (Nebert y González, 1987). Si dichas enzimas pueden actuar, formarán conjugados que serán excretados de la célula no teniendo ninguno de los efectos mencionados (Nebert, 1999).

Como se mencionó anteriormente la fase II consiste en reacciones de conjugación, catalizadas por un conjunto de enzimas, la mayoría de ellas localizadas en el citosol. Las

reacciones consisten en agregar un grupo polar de tamaño relativamente grande a los productos de las reacciones de la fase I o a los xenobióticos originales que contienen los grupos funcionales apropiados para ser sustratos de las reacciones de conjugación. Los donadores de los grupos polares tienen que ser compuestos de alta energía, ya que las reacciones de conjugación no son termodinámicamente favorables (Murray *et al.*, 1992; Kopplin, 2001; Stanley, 2003). El resultado que se logra con estas reacciones es un incremento de la solubilidad en agua del xenobiótico. Estas reacciones pueden ser (Murray *et al.*, 1992; Kopplin, 2001):

**Glucuronidación:** Consiste en agregar un grupo glucuronil a un grupo hidroxilo, amino o sulfhidrilo de la sustancia tóxica. La enzima que cataliza la reacción es la glucuronil transferasa (UDP por sus siglas en inglés) y el donador del grupo polar es el ácido UDP glucurónico. La enzima se encuentra localizada en el retículo endoplásmico y en el citosol. Los compuestos glucuronidados son muy solubles en agua y se excreta por la orina y la bilis. Existe un número muy grande de xenobióticos que son sustrato de esta enzima.

**Sulfatación:** Consiste en la transferencia de un grupo sulfato del 3'-fosfoadenosil-5'-fosfosulfato (PAPS por sus siglas en inglés), a un grupo hidroxilo o amino en el xenobiótico. La reacción es catalizada por sulfotransferasas, enzimas solubles localizadas en el citosol. El producto de la reacción es un sulfato orgánico ionizado, muy soluble en agua, que se excreta en la orina.

**Aminoacidación:** Consiste en la formación de una unión peptídica entre el grupo amino de un aminoácido, normalmente glicina, y un carboxilo en el xenobiótico. Obviamente para que esta reacción se pueda dar es indispensable que el xenobiótico tenga un grupo carboxilo. Estos conjugados son eliminados en la orina debido a que el sistema de transporte del riñón reconoce al aminoácido.

**Glutacionización:** Consiste en la adición de glutatión (GSH por sus siglas en inglés), a través de su grupo sulfhidrilo (nucleofílico) con un carbono electrofílico del xenobiótico. La reacción es catalizada por la glutatión-S-transferasa que se encuentra en el citosol de

hepatocitos y el glutatión mismo es el cofactor de alta energía. El glutatión es un tripéptido de Glu-Gli-Cis. El compuesto que se forma es hidrolizado en células renales produciendo el derivado, que se acetila para producir un conjugado del ácido mercaptúrico, el cual se excreta en la orina. Esta reacción es importante en la desintoxicación de epóxidos y peróxidos. La glutatión-S-transferasa se encuentra en muy diversos tejidos. Si esta reacción disminuye significativamente el nivel celular de glutatión, el organismo puede sufrir daños considerables debido a la peroxidación de lípidos o por otros tipos de agresión química.

**Metilación:** La metilación juega un papel menor en la biotransformación de xenobióticos, excepto en la desintoxicación de arsénico. Los compuestos inorgánicos de arsénico se transforman en metabolitos monometilados y dimetilados que son menos tóxicos. La reacción general consiste en la transferencia de un grupo metilo a un hidroxilo, amino o sulfhidrilo, que es catalizada por las metiltransferasas y el compuesto donador de grupos metilo es la S-adenosil-metionina (SAM por sus siglas en inglés).

Las reacciones de la fase I activan grupos funcionales, pero la metilación los enmascara impidiendo que participen en reacciones de la fase II, por lo tanto, si se metilan los xenobióticos se disminuye la tasa de eliminación del compuesto. Como se ha visto, varias de las reacciones de la fase II requieren de los mismos grupos funcionales, así que los compuestos que pueden ser modificados por más de una enzima entran en reacciones mutuamente competitivas (Kopplin, 2001).

Las sustancias tóxicas pueden actuar como agonistas o antagonistas para inducir o reprimir los genes que codifican para las enzimas de las fases I y II. Esto les va a permitir regular su propio metabolismo (Nebert, 1999).

Para valorar la genotoxicidad de un agente químico es necesario realizar previamente una serie de experimentos con el fin de conocer la concentración que tolera el organismo modelo para asegurar que el número de individuos sobrevivientes sea estadísticamente representativo.

La mayoría de los estudios en insectos están diseñados para determinar la concentración media de la sustancia tóxica  $CL_{50}$  que es la concentración a la que muere el 50 % de la población. Se utiliza la  $CL_{50}$ , debido a que los organismos para los que se aplica son muy pequeños y no se tiene un parámetro de la cantidad que ingieren del compuesto a probar, como sucede con la  $DL_{50}$  (Worthing y Raymond, 1991).

Para identificar y analizar la acción directa o indirecta de los agentes que pudieran modificar a los componentes hereditarios de los sistemas vivos y detectar las propiedades de un grupo de agentes que pudieran inducir cambios a los ácidos nucleicos y/o producir efectos deletéreos en las dos estirpes celulares (somáticas y germinales), es necesario recurrir al uso de pruebas, ya que no es ético exponer a las personas a los posibles cancerígenos ambientales (Vogel, 1991).

Bajo este contexto, la Genética Toxicológica ha desarrollado diversos métodos para evaluar los daños o beneficios que los compuestos y sus metabolitos intermediarios pudieran causar sobre los ácidos nucleicos del organismo. Esta disciplina se encarga de analizar el efecto de un compuesto sobre el material hereditario, tratando de comprender los eventos que ocurren desde la interacción de ADN con el xenobiótico, hasta la expresión fenotípica del daño (Vogel, 1991).

Se ha propuesto que el uso de antimutágenos y anticancerígenos, en un futuro no muy lejano será el procedimiento más efectivo para prevenir el cáncer y las enfermedades genéticas, dado que existen diferentes rutas por las cuales un compuesto con características antimutagénicas puede estar reduciendo o previniendo el daño, formando complejos inactivos ya sea con el mutágeno o con sus metabolitos o bien cuando actúan como agentes antimutágenos (Shigenaga, 1993)

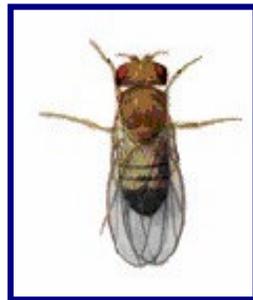
Dada la complejidad que implica el identificar a un posible mutágeno o antimutágeno entre diversos organismos y a lo largo de todo su ciclo de vida, la tendencia actual es el empleo de ensayos a corto plazo que permitan la obtención de resultados en intervalos de tiempo

relativamente breves. La mayoría de estos ensayos utilizan como elementos de experimentación a microorganismos, sobre todo a bacterias, cultivos celulares, insectos y mamíferos (Dean, 1981).

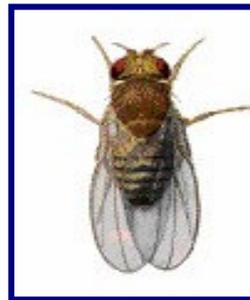
## *Drosophila melanogaster*

La mosca del vinagre o de la fruta *Drosophila melanogaster* (Figura 6) por muchos años ha sido un organismo de investigación prominente para los genetistas. Se han aislado gran cantidad de mutantes y ha estado sujeta a estudios exhaustivos, lo que contribuye a un conocimiento genético y molecular de su genoma. Al comparar la homología de muchos de los genes implicados en diversas especies de organismos, incluyendo los seres humanos, se ha revelado que hay mecanismos comunes involucrados en la respuesta de mutagenicidad (Russell *et al.*, 1990).

Otra ventaja de *D. melanogaster* como modelo experimental es la semejanza de los CYP450 con los del ser humano ya que estos realizan funciones enzimáticas parecidas a las que se efectúan en el retículo endoplásmico liso (REL) de hepatocitos humanos. El retículo endoplásmico es considerado el responsable del metabolismo de drogas y pesticidas en insectos; las enzimas involucradas tienen acción de oxidasas y se caracterizan por carecer de especificidad al sustrato, tal como ocurre en hepatocitos de mamíferos (Guzmán-Rincón y Graf, 1995). Ver anexo 1.



Macho



Hembra

Fig. 6 La mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*

## **PRUEBA DE MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN SOMÁTICAS (SMART)**

Uno de los bioensayos a corto plazo que ha dado excelentes resultados es la prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART por sus siglas en inglés) que detecta mutaciones puntuales, aneuploidías y recombinaciones somáticas provocadas por la exposición a distintas dosis de algún agente químico o físico, utilizando como modelo experimental a *D. melanogaster* (Guzmán- Rincón y Graf, 1995).

Con esta prueba también son posibles estudios de antigenotoxicidad de compuestos específicos o de mezclas usando cotratamientos crónicos, así como pretratamientos separados con un agente antigenotóxico seguido por un tratamiento crónico con una genotoxina (Graf y Würigler, 1996; Graf *et al* 1998). Ver anexo 2.

## ANTECEDENTES

Estudios epidemiológicos recientes indican que personas que tienen una dieta rica en vegetales de la familia brassica tienen menos riesgo de desarrollar cáncer en comparación a las que no los consumen (Zhang *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1994; Munday y Munday, 2004), además de reducir la incidencia de tumores en rata (Talalay, 1992; Talalay, 1994a, 1994b) y considerar al brócoli y sus compuestos como anticancerígenos (Verhoeven *et al.*, 1997; Faulkner *et al.*, 1998; Brooks, *et al.*, 2001; Shapiro *et al.*, 2001; Ye y Zhang, 2001; Keck *et al.*, 2003; Petri *et al.*, 2003).

Los vegetales de la familia Brassicacea han demostrado tener diversos compuestos, como los glucosinolatos (Zhang *et al.*, 1992; Pérez y Hurtado 1997; Verhoeven *et al.*, 1997; Faulkner *et al.* 1998; Kushad *et al.* 1999; Brooks, *et al.* 2001; Munday y Munday, 2004).

El brócoli es la Brassicacea con mayor concentración de glucosinolatos (Kushad *et al.* 1999), los cuales se encuentran en mayor cantidad en el brócoli fresco (Talalay, 1992; Conaway *et al.*, 2000), crudo (Talalay, 1994a; 1994b; Friedman, 1997; Fahey *et al.*, 1997), en el cultivado en época de frío (Troyer *et al.*, 2001) y en las inflorescencias primarias (Rosa y Rodríguez, 2001).

El producto de la hidrólisis de los glucosinolatos son los isotiocianatos de los cuales el más importante es el sulforafano que interviene en el sistema de desintoxicación (Talalay, 1992; Zhang *et al.*, 1992; Talalay, 1994a; 1994b; Verhoeven *et al.*, 1997; Faulkner *et al.* 1998; Kushad *et al.* 1999; Conaway *et al.* 2000; Rosa y Rodríguez, 2001; Troyer *et al.*, 2001; Ye y Zhang, 2001; Shapiro *et al.*, 2001; Keck *et al.*, 2003; Munday y Munday, 2004).

Se ha demostrado que el sulforafano presenta actividad antimutágena estimulando la fase II del sistema de desintoxicación, en la que éste reduce la incidencia de tumores cancerígenos hasta en un 60%. Se ha demostrado que 500mg de brócoli contienen 200µg de sulforafano (Talalay, 1992; Talalay, 1994a; 1994b; Nestle, 1997 Talalay, 1999; Brooks, *et al.* 2001; Petri *et al.*, 2003; Keck *et al.*, 2003).

Los isotiocianatos se acumulan rápidamente en las células de algunos órganos como conjugados del glutatión y de la quinona reductasa, esta acumulación intracelular induce la expresión de las enzimas de la fase II del sistema de desintoxicación inactivando la acción tóxica de algunos compuestos (Talalay, 1992; Zhang *et al.*, 1992; Talalay, 1994a; 1994b). También aumentan la eficacia de los antioxidantes (Verhoeven *et al.*, 1997; Ye y Zhang, 2001; Munday y Munday, 2004) y protege químicamente a las células animales de la inducción del cáncer (Zhang *et al.*, 1994; Shapiro *et al.*, 2001; Petri *et al.*, 2003).

Una versión bibliográfica acerca de la actividad anticancerígena de vegetales que contienen glucosinolatos e isotiocianatos (*Brassicas*) se revela que estos componentes sí son efectivos, ya que como se mencionó anteriormente activan la fase II del metabolismo de biotransformación, pero esto sólo puede suceder si es aplicado adecuadamente en el experimento. Por otro lado hay que tomar en cuenta el modelo biológico utilizado porque estos compuestos pueden llegar a ser tóxicos, la magnitud del daño que se va a producir, el tiempo y la cantidad del vegetal administrado porque en algunos casos se llega a obtener un daño mayor de lo esperado al no tomar en cuenta todas estas consideraciones. Esta investigación nos revela que estos vegetales no siempre actúan como un protector natural sino que muchas veces tienen efectos adversos (Giamoustaris y Mitthen, 1995; Verhoeven *et al.*, 1997).

## JUSTIFICACIÓN

Con base a la revisión anterior sobre los efectos anticancerígenos y tóxicos del brócoli se decidió estudiar la posible actividad tóxica y genotóxica sobre nuestro modelo biológico *D. melanogaster*. Este proyecto es parte de una investigación del Laboratorio de Genética Toxicológica de la FES Iztacala, en el que se probara el efecto antigenotóxico del brócoli ante diversos mutágenos por lo que es importante primero verificar si hay acción insecticida contra *D. melanogaster* y la posible acción genotóxica del brócoli a través de la prueba SMART.

## HIPÓTESIS

El brócoli es una planta rica en glucosinolatos, de acuerdo con referencias bibliográficas estos tienen un efecto antimutagénico, por lo tanto se espera que al adicionarse al medio de cultivo de *D. melanogaster* no exista diferencia estadísticamente significativa entre el testigo negativo (agua) y los tratamientos experimentales.

## OBJETIVOS

### GENERAL:

- Evaluar el efecto tóxico y genotóxico del brócoli (*Brassica oleracea*, var. *italica*) en *Drosophila melanogaster*.

### PARTICULARES:

- Determinar si el brócoli tiene efecto insecticida en las líneas mutantes (“multiple wing hairs” (*mwh/mwh*), “flare” (*flr<sup>3</sup> /TM3, Bd<sup>(s)</sup>*) y “Oregon-flare” (*OR (1); OR (2); flr<sup>3</sup>/TMB, Bd<sup>(s)</sup>*) de *Drosophila melanogaster*.
- Evaluar el posible efecto genotóxico del brócoli, utilizando SMART en la cruce BE.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### MATERIALES:

#### 1) Biológicos:

Líneas de *D. melanogaster*:

*mhw* (*mwh/mwh*).

Oregon-*flare* (*OR(1); ORR(2); flr<sup>3</sup> /TM3, Bd<sup>s</sup>*)

*flare* (*flr<sup>3</sup> /TM3, Bd<sup>s</sup>*)

Las líneas fueron donadas por el Dr. Ulrich Graf del Instituto de Toxicología (*Swiss Federal Institute of Technology*) y de la Universidad de Zurich, Schwerzenbach, Suiza. Las cuales han sido propagadas y mantenidas en el Laboratorio de Genética Toxicológica en la FES Iztacala, UNAM.

Brócoli (B) (*Brassica oleracea var. italica*): Se adquirió en el supermercado.

#### 2) Químicos:

Medio Instantáneo Carolina (MIC) (Carolina Biological Supply Company, Burlington, North Carolina).

Solución de Faure (30 g de goma arábiga, 20 ml de glicerol, 50 g de hidrato de cloral y 50 ml de agua de la llave).

Solución conservadora (5 ml de tegosept al 12 % (OH), 5 ml de ácido propionico: ácido ortofosforico (1:10) y 1 litro de agua) (Dueñas *et al.*, 2001).

Agua desionizada para hidratar el MIC.

### MÉTODOS:

Propagación de las líneas:

La propagación de las líneas *flare*, Oregon-*flare* y *mwh* de *D. melanogaster* se efectuó colocando a las moscas en una serie de frascos de vidrio de 250 ml, con 5 g de puré de papa

instantáneo en hojuelas, más 20 ml de solución conservadora (Dueñas *et al.*, 2001) manteniéndose en incubadora a 25° C y 60% de humedad.

Simultáneamente a la propagación se procedió a la liofilización del brócoli (B) fresco congelado (20g) la cual se realizó por un periodo de 24 horas a -50° C en una liofilizadora modelo, LABCONCO, Freeze Dry System ly Ph Lock 4.5.

Para determinar el posible efecto tóxico (CL<sub>50</sub>) del brócoli sobre las tres líneas de *D. melanogaster* (*mwh*, *flare* y *Oregon-flare*) se alimentaron larvas de 3er estadio con diferentes concentraciones de brócoli liofilizado. Se realizaron tres experimentos independientes con cinco repeticiones por concentración. En cada tubo de ensayo esterilizado, se colocaron 20 larvas de 72 ± 4 h con 0.5 g de (MIC) más 2 ml de agua desionizada para el grupo control (B0) y para los demás se utilizaron diferentes concentraciones de B25% (0.125g de B + 0.375g de MIC), B50% (0.25g de B + 0.25g de MIC) y B100% (0.5g de B).

Para determinar el efecto genotóxico (SMART) del brócoli se procedió a separar hembras vírgenes *Oregon-flare* y machos *mwh*.

Para confirmar que las moscas hembras fueran vírgenes se separaron en tubos de ensayo que contenía 0.5g de puré de papa hidratados con 2 ml de solución conservadora para su manutención durante un periodo de 72 horas. Si en este lapso de tiempo no se encontraban larvas se procedía a realizar la cruce.

La cruce BE se efectuó con hembras vírgenes *Oregon-flare* (*ORR (1)*; *ORR (2)*; *flr3/TM3,Bd<sup>s</sup>*) y machos *mwh* (*mwh/mwh*) en frascos de vidrio de 250 ml con puré de papa fresco por un lapso de tiempo de aproximadamente 72 horas, lo que permitió que las hembras fueran fecundadas, para así proseguir a la colecta de huevos.

La colecta de huevos se realizó en frascos de vidrio de 250 ml estériles a los que se les agregó levadura fresca de uso comercial previamente activada con sacarosa y agua. En este medio se colocaron los organismos de la crusa, durante 8 h a 25° C y 60% de humedad en completa oscuridad. Se sacaron los adultos de los frascos y estos últimos se mantuvieron a 25° C y 60% de humedad, hasta completar 72 h  $\pm$  4 h después de la colecta de huevos.

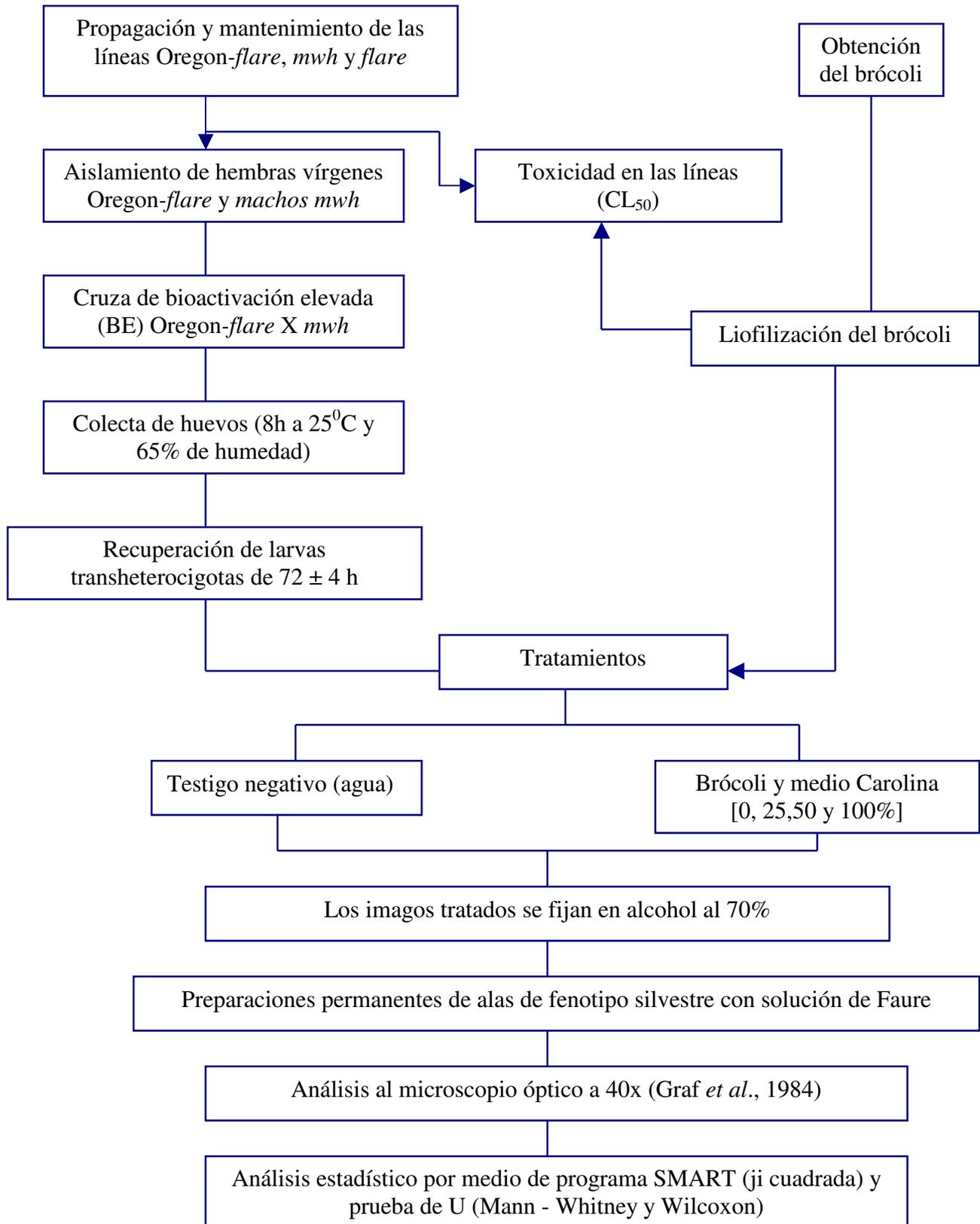
Las larvas se obtuvieron lavando la levadura con agua corriente a temperatura ambiente en una coladera de acero de malla fina.

Se realizaron dos experimentos independientes con cinco repeticiones por concentración. Se colocó aproximadamente la misma cantidad de larvas de 72  $\pm$  4 h de edad en tubos de ensayo con 0.5 g de MIC y 2 ml de agua desionizada para el grupo control, en el caso de los experimentos se utilizaron las concentraciones de B25%, B50% con respecto al MIC y de B100% y 2 ml de agua desionizada. Los tubos se incubaron a una temperatura de 25° C hasta que las larvas completaron su desarrollo y emergieron los imagos.

Una vez emergidos los imagos se colectaron y almacenaron en frascos con alcohol al 70 %. Se analizaron las alas de fenotipo silvestre en un microscopio óptico a 40X para cuantificar el número, tamaño y tipo de mancha (Graf *et al.*, 1984). Se analizaron 60 individuos por concentración, (tamaño de muestra óptimo para la prueba) (Frei y Würgler, 1998). Los datos obtenidos se analizaron con el programa estadístico SMART PC-versión 2.1 (Frei y Würgler, 1988), el cual se basa en la prueba no paramétrica de ji cuadrada para proporciones (de una cola), con un grado de libertad y una probabilidad de 0.05.

Para corroborar los resultados no concluyentes obtenidos con SMART se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney y Wilcoxon con modificaciones para dos colas para datos individuales. Se empleó para ello el programa estadístico STAT graphics versión 6.0. En este análisis estadístico, el diagnóstico puede ser no significativo cuando hay probabilidades menores o iguales a 0.05, 0.01 ó 0.001.

## METODOLOGÍA



## RESULTADOS

### TOXICIDAD:

En investigaciones previas (Giamoustaris y Mitthen, 1995; Verhoeven *et al.*, 1997), el brócoli presentó un efecto insecticida sobre algunos dípteros. En el presente trabajo se observó el 100% de sobrevivencia en todos los tratamientos y en todas las líneas. De acuerdo a estos datos el brócoli resultó ser inocuo para *Drosophila melanogaster*, por lo que se decidió utilizar las mismas concentraciones probadas para encontrar la CL<sub>50</sub> para determinar el posible efecto genotóxico del brócoli mediante la prueba SMART en ala (Graf *et al.*, 1984)

### GENOTOXICIDAD:

Los resultados obtenidos en la prueba SMART se muestran en la Tabla I y en las Figuras 7 y 8.

Tabla I Resultados obtenidos con SMART para PC (Frei y Wingler, 1988) donde se muestra la frecuencia y el número de manchas por mosca para cada concentración, así como el diagnóstico estadístico

		Frecuencia de manchas por individuo (número de manchas por mosca). Diagnóstico estadístico *			
Concentración en % (p/p)	Número de individuos	Manchas pequeñas (1-2 células) m=2	Mancha grandes (>de 2 células) m=5	Manchas gemelas m=5	Manchas totales m=2
0	691**	0.60 (417)	0.13 (88)	0.06 (39)	0.79 (544)
25	60	0.57 (34)-	0.07 (4)-	0.05 (3)-	0.68 (41)-
50	60	0.43 (26)-	0.07 (4)-	0.00 (0)-	0.50 (30)-
100	60	0.35 (21)-	0.10 (6)-	0.05 (3)-	0.50 (30)-

\*Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Würzler (1988). Donde m: Factores de multiplicación; Prueba estadística de una cola. Niveles de proporción de  $\hat{\alpha}$  resultados negativos: - ( $\hat{\alpha} = 0.05$ ). \*\*Control histórico de la cruz BE del Laboratorio de Genética Toxicológica de la FES-Iztacala de UNAM correspondiente a 30 experimentos.

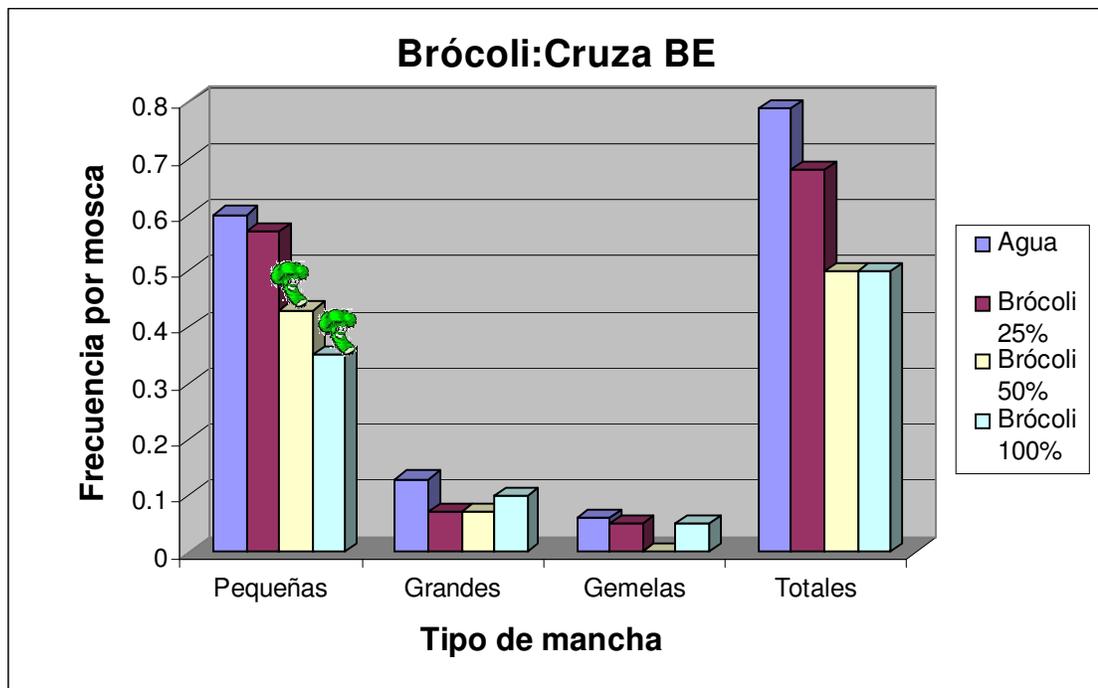


Fig. 7 Frecuencia por mosca de cada uno de los tipos de manchas a las diferentes concentraciones de brócoli. Se observa una disminución de la frecuencia de manchas con respecto al testigo agua. El brócoli señala las barras estadísticamente significativas con una  $p = 95\%$ .

La Tabla I y la Figura 7 muestran la frecuencia de manchas por individuo obtenidas al alimentar larvas de *D. melanogaster* con brócoli. Estos resultados se analizaron contrastando con control histórico del testigo agua para transheterocigotos de la cruz BE, obtenido en el Laboratorio de Genética Toxicológica de la FES Iztacala con los resultados de 30 experimentos independientes. Se obtuvieron resultados negativos para todas las concentraciones y para todos los tipos de manchas.

El brócoli, como muchas plantas comestibles se expone a herbicidas y a otros químicos usados en la agricultura. Por lo tanto, las consecuencias de biotransformación deben ser tomadas en cuenta porque el efecto en las formas de activación pueden representar una amenaza a la salud pública (Gómez, 1993).

Se utilizó la cruz BE (que presenta niveles altos constitutivos de citocromos P450) tomando en cuenta que el brócoli fue adquirido en el supermercado y se desconoce su procedencia y su contenido respecto a estos químicos. Si en el brócoli hubiera residuos de pesticidas o compuestos endógenos que requieren activación metabólica (promutágenos) su

efecto se vería más claramente en esta cruz. No obstante con el análisis para la prueba SMART presentó resultados negativos con respecto al testigo agua.

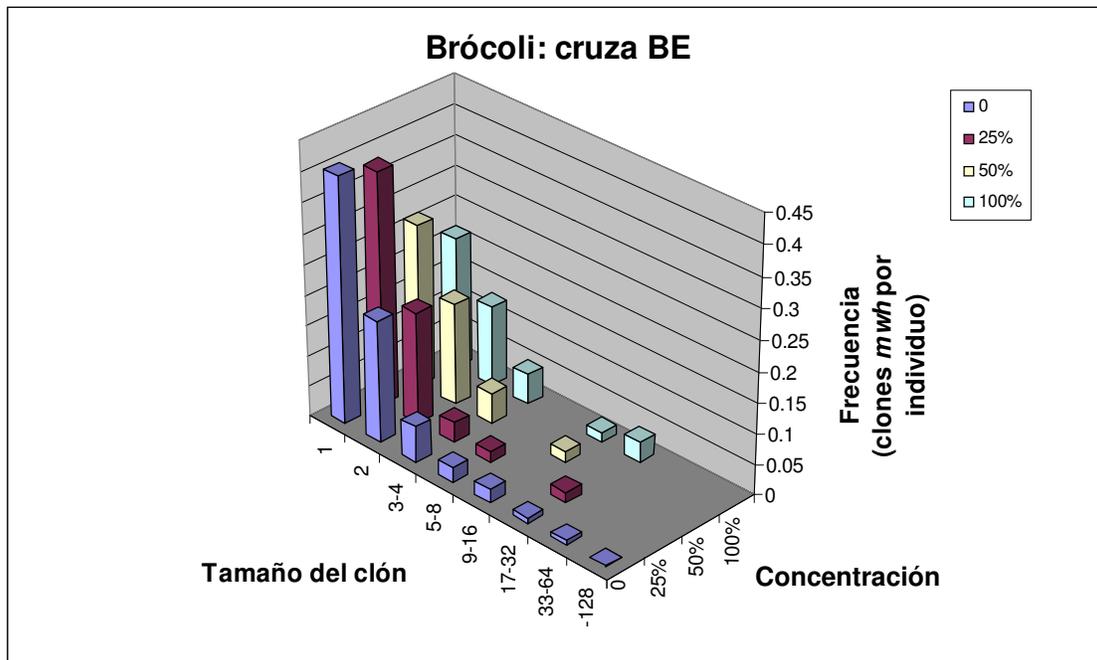


Fig.8 Distribución de clones *mwh* por individuo, de diferente tamaño y a diferentes concentraciones de brócoli. Se observa una disminución significativa para los clones *mwh* de una célula en 50 y 100% con respecto al testigo agua.

En vista de que las frecuencias de manchas estuvieron por debajo del testigo agua (Figura.7 y 8), se procedió a correr de forma inversa el programa SMART, para detectar si esta diferencia era estadísticamente significativa. Esto se hizo tomando en cuenta a cada concentración como si fuera el testigo agua y al agua como si se tratara de un experimental (Tabla 2 A, B y C).

De acuerdo a estos datos se puede observar que las frecuencias de manchas pequeñas para las concentraciones del 50 y 100% resultaron estadísticamente significativas por debajo del testigo agua. Se asumió que el brócoli redujo la frecuencia de mutación basal, esto nos puede sugerir que existe una posible actividad quimioprotectora.

Tabla II. Resultados obtenidos con SMART inverso para PC Donde se muestra la frecuencia y el número de manchas para las concentraciones del 25% (A), 50% (B) y 100% (C) así como el diagnóstico estadístico.

		Frecuencia de manchas por individuo (número de manchas por mosca) Diagnostico estadístico * <sup>a</sup>			
Concentración en % (p/p)	Número de individuos	Manchas pequeñas (1-2 células) m=2	Mancha grandes (>de 2 células) m=5	Manchas gemelas m=5	Manchas totales m=2
A					
25	60	0.57 (34)	0.07 (4)	0.05 (3)	0.68 (41)
0	691**	0.60 (417)-	0.13 (88)i, ns	0.06 (39)-	0.79 (544)-
B					
50%	60	0.43 (26)	0.07 (4)	0.00 (0)	0.50 (30)
0%	691**	0.60 (417)+	0.13 (88)i, ns	0.06 (39)+	0.79 (544)+
C					
100%	60	0.35 (21)	0.10 (6)	0.05 (3)	0.50 (30)
0%	691**	0.60 (417)+	0.13 (88)+	0.06 (39)+	0.79 (544)+

\*Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Würigler (1988). Donde m: Factores de multiplicación; Prueba estadística de una cola. Niveles de proporción de  $\hat{\alpha}$  resultados negativos: ( $\hat{\alpha} = \hat{\alpha} = 0.05$ ), i = indeciso ns = no significativo

\*\*Control histórico de la cruz BE del laboratorio de Genética toxicológica de la FES-Iztacala de UNAM correspondiente a 30 experimentos.

## DISCUSIÓN

En informes anteriores del brócoli, este presenta un efecto insecticida sobre algunos dípteros (Giamoustaris y Mitthen, 1995; Verhoeven *et al.*, 1997), en el presente trabajo no se presentó este efecto, sino que se obtuvo un 100% de sobrevivencia en todos los tratamientos y en todas las líneas de *D. melanogaster*.

El encontrar resultados negativos en todas las concentraciones con respecto al testigo agua nos hace suponer que el brócoli tiene un efecto protector (Talalay, 1992; Zhang *et al.*, 1992; Talalay, 1994a; 1994b; Verhoeven *et al.*, 1997; Faulkner *et al.* 1998; Kushad *et al.* 1999; Conaway *et al.* 2000; Rosa y Rodríguez, 2001; Troyer *et al.*, 2001; Ye y Zhang, 2001; Shapiro *et al.*, 2001; Keck *et al.*, 2003; Munday y Munday, 2004).

Además de que este trabajo se realizó con inflorescencias primarias de brócoli fresco y crudo del supermercado adquirido en época de frío el cual según (Kushad *et al.* 1999; Talalay, 1992; Conaway *et al.*, 2000; Talalay, 1994a; 1994b; Friedman, 1997; Fahey *et al.*, 1997; Troyer *et al.*, 2001; Rosa y Rodríguez, 2001) este es el que tiene mayor concentración de compuestos de mejor calidad.

El brócoli contiene varias vitaminas como la A, E, C y K (Murray *et al.*, 1992), indoles, flavonoides y glucosinolatos los cuales tienen un efecto protector (Talalay, 1992; Zhang *et al.*, 1992; Talalay, 1994a; 1994b; Verhoeven *et al.*, 1997; Faulkner *et al.* 1998; Kushad *et al.* 1999; Conaway *et al.* 2000; Rosa y Rodríguez, 2001; Troyer *et al.*, 2001; Ye y Zhang, 2001; Shapiro *et al.*, 2001; Keck *et al.*, 2003; Munday y Munday, 2004).

El análisis de la prueba SMART en ala mostró que el brócoli presenta un efecto quimioprotector estadísticamente significativo con efecto dosis respuesta a las concentraciones de 50 y 100% de brócoli.

La Figura 8 muestra la significancia estadística de las manchas pequeñas de una célula, lo que podría ser explicado si el brócoli fuera citotóxico o citostático al matar o inhibir el crecimiento y la división celular, sin embargo el hecho de encontrar manchas de 2 o más células, contradicen esta suposición.

El encontrar baja frecuencia de manchas de una sola célula nos hace suponer que el efecto protector del brócoli se da de manera tardía en el desarrollo larvario de *D. melanogaster*. La frecuencia de manchas de 2 ó más células no es diferente estadísticamente con respecto al testigo agua.

Se asumió que el brócoli al ser comercial pudo tener residuos de pesticidas o compuestos endógenos que requieren activación metabólica (promutágenos), por este motivo se utilizó la craza de BE en la que se presentan altos niveles constitutivos de citocromo P450, y se observaría más claramente la actividad de estos compuestos. Lo que no sucedió al obtener resultados negativos con respecto al testigo agua.

La reducción de la tasa de mutación basal en el ensayo SMART en ala de *D. melanogaster* puede ser explicada según lo siguiente:

1) Además de la mutación espontánea que se debe a errores durante la replicación del ADN. Los ácidos nucleicos pueden sufrir mutaciones por efecto de los radicales libres se generan por el metabolismo propio de la célula.

2) El brócoli contiene diversos antioxidantes como las vitaminas A, E, C y K que atrapan radicales libres, impidiendo así el daño al ADN, (Murray *et.,al* 1992) y en consecuencia reducir la tasa de mutación basal.

3) Estos resultados también pueden ser explicados a través del más importante principio activo del brócoli, el sulforafano, que estimula la fase II del sistema de desintoxicación (Talalay, 1992; Zhang *et al.*, 1992; Talalay, 1994a; 1994b; Verhoeven *et al.*, 1997; Faulkner *et al.* 1998; Kushad *et al.* 1999; Conaway *et al.* 2000; Rosa y Rodríguez, 2001;

Troyer *et al.*, 2001; Ye y Zhang, 2001; Shapiro *et al.*, 2001; Keck *et al.*, 2003; Munday y Munday, 2004), y así poder eliminar eficientemente a los agentes potencialmente genotóxicos. Se ha propuesto también que inhibe la fase I de metabolismo xenobiótico, impidiendo así la activación de promutágenos (Talalay, 1992; Talalay, 1994a; 1994b; Nestle, 1997 Talalay, 1999; Brooks, *et al.* 2001; Petri *et al.*, 2003; Keck *et al.*, 2003).

Sin embargo en este trabajo no puede ser probado esto último ya que la craza BE presenta niveles altamente constitutivos de citocromos P450 por lo que sería interesante probar el brócoli comercial a estas mismas concentraciones con la craza E que tiene niveles regulados de citocromos P450.

Para determinar el efecto antimutagénico del brócoli y el sulforafano, es importante realizar experimentos con estas mismas concentraciones ante mutágenos con efecto conocido en ambas cruza de la prueba SMART para ala.

## CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos concluir que:

- 1) El brócoli (*Brassica oleraceae var. italica*) adquirido en el supermercado, no tuvo efecto tóxico sobre las líneas (*mwh*, *flare* y *Oregon-flare*) de *D. melanogaster* ya que resultó ser inocuo para ellas.
- 2) Los tratamientos con brócoli al 50 y 100% disminuyeron significativamente la frecuencia de manchas pequeñas por mosca con respecto al testigo agua, mostrando un efecto dosis-respuesta.
- 3) El brócoli disminuyó la tasa de mutación basal de *D. melanogaster*, lo que sugiere una probable actividad quimioprotectora.
- 4) Los resultados de este trabajo pueden ser explicados por el efecto quimioprotector del brócoli ya que presenta altas concentraciones de antioxidantes y sulforafano.

## RECOMENDACIONES

Se propone probar al brócoli de supermercado con la cruz E, al brócoli orgánico y a su principio activo el sulforafano frente a mutágenos y promutágenos con ambas cruces

## ANEXO 1:

### *Drosophila melanogaster*.

El ciclo de vida de *D. melanogaster* (Figura 9) incluye cuatro fases: huevo, larva, pupa y adulto. La duración del ciclo varía con la temperatura de incubación del cultivo. A temperaturas superiores las moscas pueden quedar estériles o morir y a bajas temperaturas se reduce su viabilidad. La temperatura óptima de cultivo es de 25° C.

El desarrollo embrionario del huevo tarda aproximadamente 1 día. La fase larvaria dura alrededor de 4 días. La fase de pupa es considerada la fase reorganizativa del ciclo de vida de *D. melanogaster*; las estructuras adultas se desarrollan a partir de los tejidos embrionarios presentes llamados discos imagales. Estos tejidos han permanecido latentes en el animal desde su diferenciación en el huevo. La fase de pupa tarda alrededor de 5 días, el imago emerge del pupario. El adulto es considerado la fase reproductiva del ciclo (Mitchel y Combes, 1984).

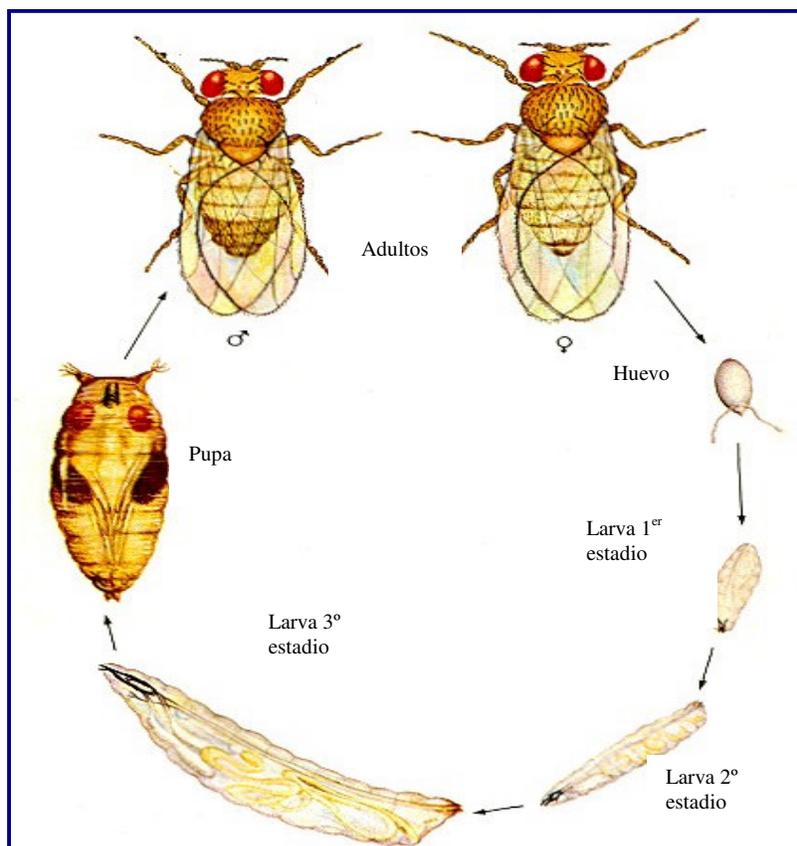


Fig. 9 Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* (tomado de Ramos *et al.*, 1993)

El promedio de vida de las moscas adultas es de 37 días a 25° C. La hembra empieza a depositar huevos aproximadamente a los 2 días de haber emergido y puede depositar hasta 50-75 huevos en un día, posteriormente disminuye la producción de huevos. Durante la fase larvaria la ingestión de alimento es continua, llegando a consumir de tres a cinco veces su peso, lo que hace que éste se incremente de 0.05 a 2.0 mg. Los imagos de *D. melanogaster* pueden aparearse 8 horas después de haber emergido de la fase de pupa (Mitchel y Combes, 1984).

Las larvas de *D. melanogaster* tienen dos linajes celulares: larvario e imagal (discos imagales) (Figura 10); el primero está implicado exclusivamente en el crecimiento y en la fisiología de la larva, el segundo, son pares de bolsas epiteliales que permanecen indiferenciadas desde el estadio embrionario. En la metamorfosis, los discos se invaginan y diferencian para formar las estructuras particulares del cuerpo del adulto: antenas, ojos, halterios, genitales externos, entre otros (Russell, 1998).

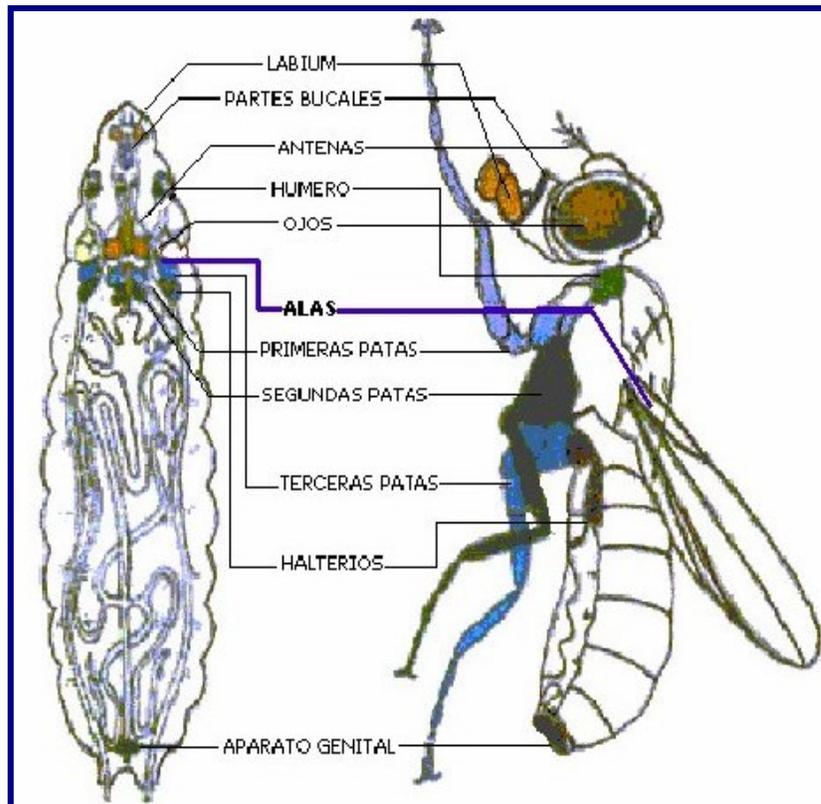


Fig. 10 Distribución de los discos imagales en la larva de *D. melanogaster* (tomado de Russell, 1998)

Desde el punto de vista genético, los discos imagales constituyen un excelente material de estudio. Cada disco aparece como primordio desde el primer estadio larval y consiste de 25 a 50 células. A partir de ese momento, el número de células por cada disco se incrementa por mitosis hasta el final de la fase larval, en la que llega a tener 24,400 células por disco. Al final del tercer estadio larval se inicia el periodo de pupa, en el que parte del material larval degenera, las células indiferenciadas forman tejidos y las estructuras del adulto derivan de cada disco imagal. De tal manera, si ocurre daño genético en una célula de los discos imagales, éste se expresaría en el imago como un clon de células mutantes en el tejido correspondiente (Mitchell y Combes, 1984).

## ANEXO 2:

### PRUEBA DE MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN SOMÁTICAS (SMART)

SMART tiene como fundamento la pérdida de heterocigosis de genes marcadores en las células de los discos imagales de las larvas que darán origen a las alas. Al exponer a las larvas portadoras de los marcadores a un agente sospechoso, el daño se expresará como clones o manchas de células mutantes en las alas de los imagos. Estas últimas se pueden observar y contabilizar con ayuda del microscopio óptico y analizar por medio de métodos estadísticos, comparando el tipo y frecuencia de manchas en los tejidos correspondientes con la obtenida en organismos no expuestos (Graf *et al.*, 1984, Guzmán-Rincón y Graf, 1995).

SMART en ala de *D melanogaster* ha sido validada con más de 400 compuestos (Graf *et al.*, 1984, Guzmán-Rincón y Graf, 1995) obteniéndose resultados positivos con varias drogas antineoplásicas, alquilantes pequeños, compuestos formadores de aductos grandes, compuestos formadores de entrecruzamiento, intercaladores, inhibidores de la topoisomerasa, antimetabolitos de la síntesis de ADN, análogos de nucleótidos y muchos otros. La prueba SMART detecta fácilmente los promutágenos que requieren bioactivación (productos de pirólisis, nitrosaminas, hidrazinas, dihaloalcanos, hidrocarburos policíclicos aromáticos, alcaloides de pirolizidina, aflatoxinas, y otros) (Frei *et al.*, 1998). Esta prueba *in vivo* puede ser vista como un enlace entre los sistemas de prueba *in vitro* de microorganismos y los *in vivo* de mamíferos.

En general, los resultados que son positivos en ésta pueden ser considerados como válidos para la predicción de posible genotoxicidad y antigenotoxicidad en mamíferos (Guzmán-Rincón y Graf, 1995; Sharpe *et al.*, 2002).

#### LÍNEAS:

En esta prueba se utilizan tres líneas: “multiple wing hairs” (*mwh/mwh*), “flare” (*flr<sup>3</sup>/TM3, Bd<sup>f(s)</sup>*) y “Oregon-flare” (*OR (1); OR (2); flr<sup>3</sup>/TMB, Bd<sup>f(s)</sup>*).

La línea: *Oregon-flare*: fue constituida por Frölich y Würzler en 1989. Presenta los cromosomas 1 y 2 de la línea Oregon R (R) resistente al DDT. El cromosoma 2 acarrea la mutación dominante *Rst* (2) DDT localizada en la región 43E (2-65) que provoca la expresión constitutiva de una proteína inductora de los genes *Cyp* (*Cyp6a8* y *Cyp6a9* del cromosoma 1 y *Cyp6a2* del cromosoma 2). Esta mutación confiere en consecuencia, no sólo resistencia al DDT e insecticidas organofosforados en larvas y adultos, sino también el incremento general en el metabolismo xenobiótico, permitiendo valorar la activación, *in vivo*, de promutágenos (Saner *et al.*, 1996).

### MARCADORES:

*mwh* (*multiple wing hairs*): Mutación recesiva localizada en el brazo izquierdo del cromosoma 3 (3-0.3). Su expresión fenotípica se observa como un cambio en el número de tricomas por célula (2-5) (Figura 11), mientras en el fenotipo silvestre a cada célula le corresponde un solo tricoma (Figura 12).

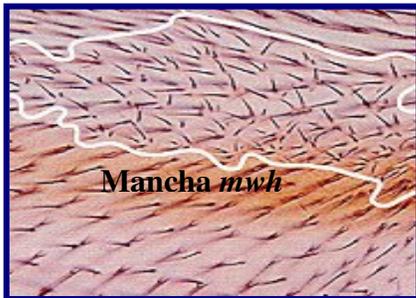


Fig. 11 Mancha *mwh*



Fig. 12 Tricomas normales

*flr<sup>3</sup>* (*flare*): Es una mutación recesiva que en homocigosis es letal, se expresa como tricomas mal formados y cortos con apariencia de flama o de roseta de maíz (Figura 13). Este marcador está localizado en el brazo izquierdo del cromosoma 3 (3-38) pero en una posición más próxima al centrómero que *mwh* (Ramos, 1993).

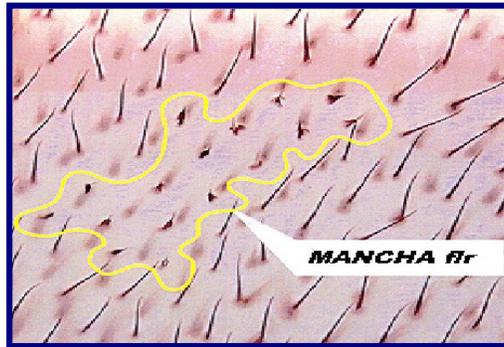


Fig. 13 Mancha *flr*<sup>3</sup>

*Bd*<sup>S</sup> (*Beaded-Serratia*): Este marcador dominante es para reconocer fenotípicamente a la línea *flare*, se manifiesta como muescas en los bordes de las alas (Figura 14). En condiciones de homocigosis es letal y se localiza en el cromosoma 3 (3-92.5) (Ramos *et al.*, 1993).

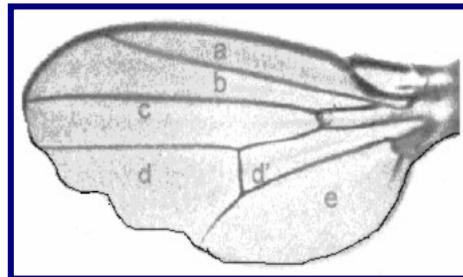


Fig. 14 Ala serratia

*In(3LR)TM3* (Inversion (3 Left, Right) Third Multiple 3): Como los marcadores *flr*<sup>3</sup> y *Bd*<sup>S</sup> son letales en homocigosis, para mantener las líneas *flare* y *Oregon-flare* se requiere la presencia del cromosoma balanceador *TM3* que porta tres inversiones que reducen la probabilidad de obtener recombinación entre los cromosomas del par tres durante la meiosis, manteniendo así intacto el gen mutante de interés, ya que se impide la formación de nuevos arreglos cromosómicos originados por recombinación y sólo se producen los individuos heterocigotos para los marcadores letales (Graf y Würigler, 1996).

#### CRUZAS:

SMART presenta dos tipos de cruzas: La estándar (E) en la que cruzan hembras vírgenes *flare* con machos *mwh* es decir (*flr*<sup>3</sup>/*TM3*, *Bd*<sup>S</sup> X *mwh/mwh*) esta crusa tiene niveles regulados de los CYP450, por ello, requiere una concentración mínima del compuesto a

metabolizar para que haya síntesis de estas enzimas (Graf *et al.*, 1984, Parke *et al.*, 1991). La Cruza de bioactivación elevada (BE): hembras vírgenes de la línea “Oregon-flare” (*OR (1); OR (2); flr<sup>3</sup>/TM3, Bd<sup>(s)</sup>*) X machos “multiple wing hairs” (*mwh/mwh*), (Graf y van Schaik, 1992) con altos niveles constitutivos de CYP450. Esta última es más sensible para identificar un gran número de promutágenos y/o procancerígenos.

Las larvas obtenidas son transheterocigotas con un genotipo *mwh flr<sup>3</sup>+ / mwh+ flr<sup>3</sup>* o heterocigotas *mwh flr<sup>3</sup>+ / TM3, Bd<sup>s</sup>*, teóricamente en proporción 1:1. Ambos tipos de larvas son indistinguibles pero al recuperar los imagos, el primer genotipo genera moscas con alas de fenotipo silvestre y el segundo alas tipo *Beaded Serratia* (Figura 14). Los genotipos obtenidos proporcionan diferente información: el que presenta alas con fenotipo silvestre, permite observar manchas sencillas *mwh* (Figura 11), sencillas *flare* (Figura 13) y gemelas. Sin embargo, en los organismos que presentan el fenotipo *Beaded Serratia*, sólo se podrán observar manchas sencillas tipo *mwh* originadas por mutación, ya que la presencia del balanceador TM3 no permite la recombinación (Graf y van Schaik, 1992; Graf y Würigler, 1996).

Al utilizar marcadores localizados en cromosomas homólogos, se permite discernir fenómenos de recombinación somática en la región delimitada por el marcador *flr<sup>3</sup>* y el centrómero o en la región entre los dos marcadores (Figuras 15).

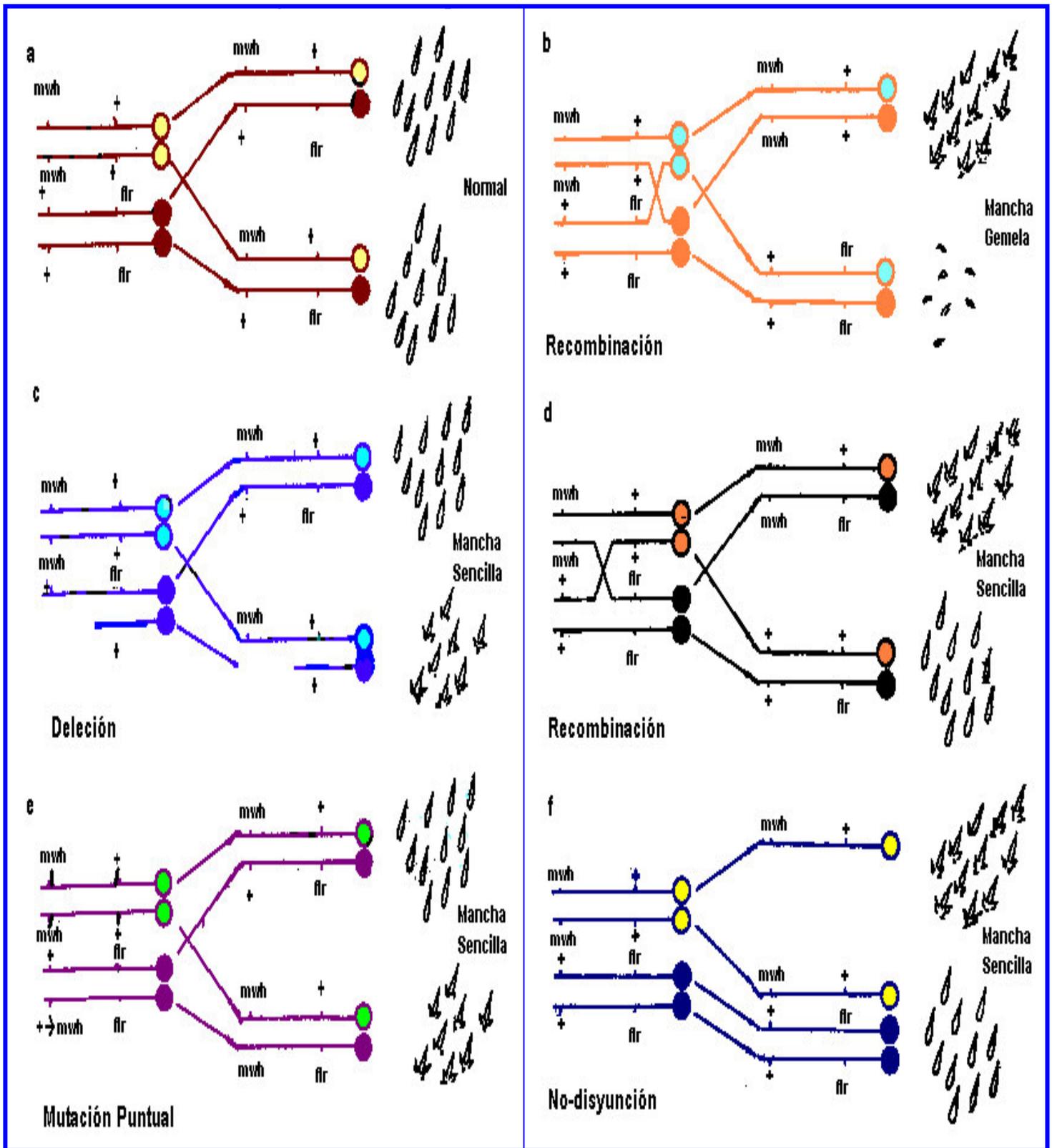


Figura 15 Eventos que ocasionan la pérdida de heterocigocis en *Drosophila melanogaster*

## REFERENCIAS

- Black, S.D. and Coon, M.J. (1986). Cytochrome P450 Plenum, New York, pp. 161-216.
- Bradburne, P. and Mithen, F. (2000). Glucosinolate genetics and the attraction of *Brassica*. *Proc. R Soc. London.* **267**: 89-95.
- Brooks, J. Paton, V. and Vidanes, G. (2001). Potent induction of phase 2 enzymes in human prostate cells by sulforaphane. *Canc. Epid. Biomark & Prev.* **10**: 949-954
- Burroughs, B., Tarone, R., Kesner, J. S. y Garry, V. F. (1999). Herbicides and adjuvants: an evolving view. *Toxicol. Indus. Health*, **15**, 160-168.
- Carlson, D. (1987). Glucosinolates in crucifer vegetables. *Horto Science*, **112**: 173-178.
- Carnevale, A. (1992). Genética y Cáncer: Aspectos clínicos. *Gaceta Médica Mexicana*, **138**: 107-109.
- Clapper, L., Szarka, E. and Pfeiffer, R. (1997). Preclinical and clinical evaluation of broccoli supplements as inducers of glutathione S-transferase activity. *Clin Cancer Res.* **3**: 25-30.
- Conaway, C., Serkadis, G. and Liebes, L. (2000). Disposition of glucosinolates and sulforaphane in human after ingestion of steamed and fresh broccoli. *Nut. and Can.* **38**: 168-178.
- Dean, R. (1981). Toxicology in walter use problemes and solution. Academic Press, USA. p. 264.

- Deutsch, J., Leutz, C. and Yang, K. (1978). Regio and stereoselectivity of various forms of purified cytochrome P450 in the metabolism. *Natl Acad. Sci. USA.*, **75**: 3123-3127.
- Dueñas, G. I. E., Heres, M. E., Castañeda, P. L. and Graf, U. (2001). Easy raising of *Drosophila melanogaster* on a medium consisting of mashed potato flakes and a preservative solution. *D.I.S.* **88**: 166.
- Fahey, J. W., Zhang, Y. and Talalay, P. (1997). Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA.* **94**: 10367- 10372.
- Faulkner, K. Mithen, R. and Williamson, G. (1998) Selective increase of the potential anticarcinogen 4 – methylsulphinylbutyl glucosinolate in broccoli. *Carcinogenesis* **19**: 605-609.
- Frei, H. and Würgler, F. E. (1988). Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutat. Res.*, **203**, 297-308.
- Frei, H., Graf, U. and Würgler, E. (1998). Induced loss of heterozygosity in somatic cells of *Drosophila melanogaster* is a sensitive indicator of genotoxicity. *Toxicology Letters.* **95**: 43.
- Friedman, A. A. (1997). Anti-cancer effect of broccoli: selective inhibition of transformed mammalian cell growth, by *Brassica oleracea* extract. *Academy of Science* **50**: 665-669.
- Gandhi, R. Varak, E. and Goldberg, M.L. (1992). Molecular analysis of a cytochrome P450 gene of family 4 on the *Drosophila* X chromosome. *DNA and Cell Biology.* **11**: 397-404.
- Giamoustaris, A. and Mitthen, R. (1995). The effect of modifying the glucosinolate content of oilseed rapa on its interactions. *Ann. Appl. Biol.* **123**: 347-363.

Gómez-Arroyo, S., Díaz-Sánchez, Y., Meneses-Pérez, M. A., Villalobos-Pietrini, R. y De León-Rodríguez, J. D. (2000). Cytogenetic biomonitoring in a mexican floriculture worker group exposed to pesticides. *Mutat. Res.*, **466**, 117-124.

Gómez, B. J. (1993). Control Químico de la Maleza. Trillas, México. pp 15-35.

Graf, U., Würgler, F.E., Katz, A.J., Frei, H., Juon, H., Hall, C.B. and Kale, P.G. (1984). Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutag.* **6**: 153-188.

Graf, U and van Schaik, N. (1992). Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* **271**: 59-67.

Guzman-Rincón, J. and Graf. U. (1995). *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In: Butterworth, F.M., Corkum, L.D. and Guzman-Rincon, J. (eds). *Biomonitoring and biomarkers as indicators of Environmental Change: A handbook*. Plenum Press Publishes, New York, NY. pp.169-181.

Graf, U and Würgler, F. E. (1996). The Somatic white-ivory eye test does not detect the same spectrum of genotoxic events as the wing Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mol. Mutagen.* **27**: 219-226.

Graf, U., Abraham, S. K., Guzmán-Rincón, J. and Würgler, F. E. (1998). Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* **402**: 203-209.

- Guzmán-Rincón, J., Ramírez-Victoria, P., and Benítez, L. (2001). Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster* used for biomonitoring of Environmental Pollutants. In: Butterworth, F.M, Gonatilaka, A. y Gonsebatt, M.E. (eds). *Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change. A handbook. Vol 2.* Kluwer Academic / Plenum Press Publishers. New York, NY. pp: 221-237.
- Kall, M. A., Vang, O. and Clausen, J. (1997). Effects of dietary broccoli on human drug metabolising activity. *Cancer Lett.* **114**: 169-175.
- Keck, A.S., Qiao, Q. and Jeffery, E.H. (2003). Food matrix effects on bioactivity of broccoli-derived sulforaphane in liver and colon of 344 rats. *Juornal of Agricultural and Food Chemistry.* **51**: 3320-3327.
- Kopplin, M. (2001). Toxicología ambiental, Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental. 3ra Edición The University of Arizona, USA. p 586.
- Kushad, M. M., Brown, A.F., Kurlich, A.C. and Juvik, J.A.(1999). Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica oleracea*. *Arg. Food Chem.* **47**: 1541-1548.
- Lee, C. P., Schatz, G. and Dallner, G. (1981). Mitochondria and microsomes, Addison-wesley reading, Addison-wesley Reading, Massachusetts. P. 50-76.
- Loomis, T. A. (1994). Fundamentos de toxicología. 3ra.Edición, ACRIBIA, España. pp. 33-35.
- Mainguet, A.M. and Louveaux, A. (2000). Ability of generalis insects, to overcome thioglucoside defense in desert plants: tolerance or adaptation. *Entomologia Experimentalis et applicata*, **94**: 309- 317.
- Mitchell, I. and Combes, R. (1984). Mutation test with the fruit fly *Drosophila melanogaster*. Mutagenicity testing. pp. 149-155.

- Mozafar, A. (2000). Plant vitamins, agronomic, physiological, and nutritional aspects. CRC Press, Inc. USA. p. 412.
- Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A. and, Rodwell, V. W. (1992). Bioquímica de Harper. 12a Edición Manual Moderno México, pp. 656-660.
- Munday, R. and Munday, C. (2004). Induction of phase II detoxification enzymes in rats by plant – derived isothiocyanates: comparison of allyl isothiocyanate with sulforaphane and related compounds. *J. Agric. Food Chem.* **52**: 1867-1871.
- Nebert, D.W. and González, F. (1987). P450 genes: structure, evolution and regulation *Annu. Rev. Biochem.* **56**: 945- 1003.
- Nebert, D.W. (1999). Pharmacogenetics and pharmacogenomics *Clinic Genet.* **56**: 247-258.
- Nestle, M. (1997). Comentario: Broccoli sprouts as inducers of carcinogen – detoxifying enzyme systems: clinical, dietary and policy implications. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**: 11149-11151.
- Nestle, M. (1998). Broccoli sprouts in cancer prevention. *Nutr Rev.* **56**: 127-130
- Nelson, D. and Cox, M. (2001). Lehninger principios de bioquímica. 3ª Edición. Omega Barcelona, España. p 1152.
- Ortiz de Montellano D. (1995). Cytochrome P450: Structure, mechanism and biochemistry, 2<sup>da</sup> Ed. Plenum Press, New York. p. 700.
- Parke, V.D., Ionnides, C. and Lewis, D.F.V. (1991). The role of the cytochromes P450 in the detoxication and activation of drugs and other chemicals. *Pharmac. Manufact. Assoc. Can. Key. Lect.* **69**; 537-548.

- Pérez, P. A. and Hurtado, A. T. (1997). Actividad antimutágena de extractos vegetales sobre la aflatoxina B1. *Rev. Cubana Aliment Nutr.* **11**: 10-14.
- Pérez, T. (1990) Principios de Patología, 3ra. Ed. Panamericana, México, DF. p. 431.
- Petri, N., Tannergen, C. and Holst, B. (2003). Absorption/metabolism of sulforaphane and quercetin, and regulation of phase II, in human jejunum *in vivo*. *Drug Metabolism and Disposition.* **31**: 805-813.
- Ramos, P., Abundis, H. M., Gaytán, J. C., Ordaz, M. G., Orozco, P. G., Maldonado, J., Hernández, J., González, E., Reyes, P., Galicia, E. M. and Muñoz, J. A. (1993). Manual de laboratorio de genética para *Drosophila melanogaster*. McGraw-Hill. México. pp. 131.
- Rosa, E.A., and Rodríguez, A.S. (2001). Total and individual glucosinolate content in 11 broccoli cultivars grown in early and late seasons *Horto Science* **36**: 56-59.
- Ross, R. K., London, S. J. and Yuan, J. M. (2000). Isothiocyanates, glutathione S-transferase: A prospective study of men in Shanghai, China. *Horto Science* **356**: 724-729.
- Rusell, P., (1998), Genetics, the Benjamín/ Cummings Publissing Company, Inc, fith Edition USA, p. 805.
- Russell, R. J., Dumancic, M. M., Foster, G. G., Weller, G. L, Healy, M. J. and Oakeshott, J.G. (1990). Ecological and evolutionary genetics of *Drosophila*. Edited by J.S.F. Baker. Plenum Press, New York. pp 293-314.
- Saner. C. Weibel, B. Würgler, F. and Senggstag, C. (1996) Matabolism of promutagens catayzed by *Drosophila melanogarter* CYP6A2 enzyme in *Sacharomyces cerevisiae*. *Environ. Mol. Mutagen.* **27**: 46-58.

- Shapiro, T. Fahey, J. Wade, K. Stephenson, K. and Talalay, P. (2001) Chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of broccoli sprouts. *Canc. Epid. Biomark & Prev* **10**: 501-508.
- Sharpe, C.R., Collet, J-P., Belizle, E., Hanley, J.A. and Boivin, J. F. (2002). The effects of tricyclic antidepressants on breast cancer risk. *British Journal of Cancer*. **86**: 92-97.
- Shigenaga, M. K. (1993). Antioxidantes y enfermedades degenerativas de envejecimiento *Proc. Acad. Nacional Sci.* **90**: 7915-7922.
- Sipes, G. and Gandolfi, A. (1986). Biotransformation of toxicants. In Klaassen, C.D., Amdur, M. and Doull, J. Toxicology: the basic science of poison. Macmillan Publishing Company, New York. pp. 64-98.
- Stanley, E. (2003). Toxicological chemistry and biochemistry, 3<sup>rd</sup> edition, Lewis Publisher, USA, pp 79-74.
- Stoner, G. D. (1999). Differential effects of two isothiocyanates on cell progression and apoptosis in human. *Toxicol Sci*: **52**: 95-100.
- Talay, P.(1992). Chemoprotective glucosinolates and excretion in humans, cancer epidemiology biomarkers & prevention. *Proceedings of the American Society* **10**: 501-508.
- Talay, P., (1994 a). Antioxidant activity of sulforaphane, (en línea), fecha de acceso 2 de noviembre del 2002), disponible en <http://www.Brassicathescience>.
- Talay, P., (1994 b). History of Discoveries, Brassica, the Science, (en línea), fecha de acceso 8 de noviembre del 2002), disponible en <http://BrassicatheScience>.

- Talalay, P. (1999). The war against cancer: new hope. *Proceedings of the American Society*. **143**: 52-72.
- Talalay, P. (2001). Phytochemicals from Cruciferous Plants Protect against Cancer by Modulating, Carcinogen Metabolism. *American Institute for Cancer Research*: **131**: 3027-3032.
- Toporek, M. (1984) *Bioquímica 3ª edición Interamericana México* p 523.
- Troyer, J.K., Stehenson, K.K. and Fahey, W.J. (2001). Analysis of glucosinolates from broccoli and other cruciferous vegetables by hydrophilic interaction liquid chromatography. *Journal of Chromatography*. **919**: 299-304.
- Vázquez, J. (1994). *Genética clínica 2da. Edición, Manual Moderno, México DF.* p. 592.
- Verhoeven, D. Verhagen, H. Goldbohm, A. Van den Brandt, P. Poppel, G. (1997). Mini review: A review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by brassica vegetables. *Chemico-biological interactions*. **103**: 79-129.
- Vogel, E. W. (1991). *Genotoxic Chemicals. An introduction into basic principles of genetic toxicology. Apuntes del primer taller Latinoamericano en Genética Toxicológica en Drosophila melanogaster.* Tlaxcala, México. Sin publicar.
- Worthing, C.H. y Raymond, H. (1991). *The Pesticides Manual.* 9a ed, British Crop Protection Council, Great Britain. pp. 8377.
- Ye, L. and Zhang, Y. (2001). Total intracellular accumulation levels of dietary isothiocyanates determine their activity in elevation of cellular glutathione and induction of phase 2 detoxification enzymes. *Carcinogenesis*. **22**: 1987 – 1992.

Zhang, Y. Talalay, P. Cho, C. and Posner, G (1992). A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**: 2399 – 2403.

Zhang, Y. Kensler, T. Cho, C. Posner, G. and Talalay, P. (1994). Anticarcinogenic activities of sulforaphane and structurally related synthetic norbornyl isothiocyanates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 3147 – 3150.