

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“Interacción del Brócoli (*Brassica oleracea*, var. *itálica*) – uretano (carbamato de etilo) en la Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas (SMART) en ala de *Drosophila melanogaster*”.

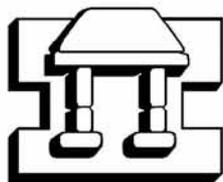
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

LUIS FELIPE SANTOS CRUZ.



IZTACALA

DIRECTORA DE TESIS:
M. en C. MARÍA DE JESÚS LAURA
CASTAÑEDA PARTIDA

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉX.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 DIOS

Por hacer posible todo en mi vida.

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

Por permitirme ser parte de la más importante casa de estudios.

A LA M. EN C. LAURA CASTAÑEDA

Mi madre académica que durante mi estancia en el Laboratorio de Genética Toxicológica me brindo apoyo, cariño y paciencia; Sin perder la dureza de una asesora de alto nivel académico y gran experiencia profesional “gracias por todo”.

A LAS M. EN C. MARÍA EUGENIA HERES E IRMA ELENA DUEÑAS

Por enriquecer mi formación profesional y brindarme todo su apoyo y consejos.

AL M. EN C. ÁNGEL DURÁN

Por su importante participación en la realización de esta tesis asesorándome en la parte estadística; Pero sobre todo por brindarme su amistad y apoyo.

AL DR. ELIAS PIEDRA Y AL M. EN C. JOSE LUIS SÁNCHEZ

Quienes fungieron como evaluadores de esta tesis, enriqueciendo su contenido y siendo piezas muy importantes para la culminación de la misma.

AL M. EN C. RAMÓN MORENO

Por su aportación en la culminación de este trabajo de tesis; y también por su amistad desde hace ya algunos años cuando fue mi profesor en la materia de evolución.

DEDICATORIAS

A MI HERMANO CESAR AUGUSTO SANTOS CRUZ

Por estar a mi lado y ayudarme a alcanzar esta meta. Y por que me ha hecho darme cuenta que, cuando llegamos a este mundo, pareciera ser que no tenemos ningún objetivo, ningún porque, pero al conocernos comprendemos que podemos llegar a ser la luz para las personas que nos rodean “por favor sigue alumbrando mi vida, mi lucecita querida”.

A MIS PADRES: JUANA CRUZ OVANDO Y FELIPE DE JESÚS SANTOS FLORES, A MI HERMANA: ESMERALDA SANTOS CRUZ Y A MI ABUELITA: CARMEN OVANDO CASTILLEJOS

Por todo su apoyo, cariño, cuidado, comprensión, dedicación, paciencia, en fin por toda una vida de amor hacia mí.

A MIS AMIGOS: MOISES ONOFRE Y DIANELA AGUILAR

Por su apoyo y consejos cuando los necesite, por su amistad sincera y por todo lo que hemos vivido.

A MI FAMILIA ACADÉMICA LAURA, IRMA, MARU, ÁNGEL, VIRIDIANA, JUAN CARLOS, PATRICIA, ALEJANDRA, STEPHANY, SAMANTHA, DIEGO, ZORAYA, RUBEN

Por todos los momentos que compartimos y porque fue un verdadero placer conocerlos.

ÍNDICE

RESUMEN

I INTRODUCCIÓN.	1
1. Mecanismos de respuesta celular.	2
1.1. Metabolismo xenobiótico.	2
1.1.a. Fase 1 del metabolismo xenobiótico.	2
1.1.a.1. Citocromos P450.	2
1.1.b. Fase 2 del metabolismo xenobiótico.	3
1.1.b.1. Conjugación con glutatión (GSH).	3
1.2. Mecanismos de reparación del daño en el DNA.	4
1.2.1. Daños al DNA.	4
1.2.2. Mecanismos de reparación.	6
1.3. Actividad “checkpoint”.	8
1.4. Apoptosis.	9
1.5. Pruebas para el análisis de los daños genotóxicos.	9
1.5.1. Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas (SMART) en ala de <i>Drosophila melanogaster</i>.	11
1.6. Uretano.	16
1.6.1. Metabolismo del uretano.	16
1.7. Brócoli (<i>Brassica oleracea</i>, var. <i>Itálica</i>).	18
1.7.1. Glucosinolatos.	19
1.7.2. Isotiocianatos (ITCs).	20
1.7.3. Propiedades anticancerígenas/genotóxicas de los ITCs.	20
II ANTECEDENTES.	21
III JUSTIFICACIÓN.	24

IV HIPÓTESIS.	24
V OBJETIVO GENERAL.	25
VI OBJETIVOS PARTICULARES.	25
VII MATERIALES Y MÉTODOS.	26
VIII RESULTADOS.	31
IX DISCUSIÓN.	44
X CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.	49
XI REFERENCIAS.	50
XII ANEXOS.	59
XIII GLOSARIO.	63

RESUMEN

Los trabajos realizados con vegetales de la familia Brassicaceae han demostrado que éstos tienen propiedades anticancerígenas y antioxidantes. Dentro de esta familia se encuentra el brócoli (*Brassica oleracea* var. Itálica) que contiene glucosinolatos, indoles y vitaminas A, C y E que en el humano previenen la cancerogénesis. Se ha reportado que el efecto antigenotóxico o genotóxico de la mezcla compleja brócoli, depende de numerosos factores, como el sistema de prueba, la dosis, el momento de aplicación y la genotoxina. El uretano o carbamato de etilo ($\text{NH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$) es un promutágeno y cancerígeno multipotencial en animales. Se puede encontrar como producto de la fermentación en alimentos como el pan y el queso. Es transformado por los CYP450s (CYPs) a vinil carbamato epóxido, que puede formar aductos con el DNA o a N-hidroxiuretano que forma un radical nitroso y óxido nítrico que causan daños al DNA por oxidación y depuración. En función de lo anterior se diseñó un protocolo para estudiar la interacción del brócoli, orgánicamente cultivado, en co-tratamiento crónico con el promutágeno uretano en *Drosophila melanogaster*. Larvas de 72 ± 4 h de edad producto de las cruzas E y BE de la prueba SMART en ala de *Drosophila melanogaster* fueron alimentadas con diferentes proporciones de brócoli liofilizado (0, 25, 50 y 100%) y medio instantáneo para *Drosophila*, con y sin Uretano (20 mM). Se realizaron tres experimentos independientes con cinco réplicas por tratamiento. Los resultados se analizaron con el programa SMART para PC. Se demostró la activación del uretano en la cruce BE. No se demostró un efecto protector del brócoli contra el uretano en esta prueba y bajo estas condiciones experimentales.

I. INTRODUCCIÓN

Hoy en día los seres vivos están expuestos a numerosos agentes físicos y químicos que en algunos casos pueden provocar severos daños tóxicos o genotóxicos (Rodríguez Arnaiz, 2000; Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, 1988). Los daños genotóxicos son considerados como resultado de la interacción entre el DNA y un compuesto cancerígeno/mutágeno. Si estos daños no son reparados, la replicación del DNA puede dar por resultado una lesión permanente en el DNA y en presencia de un promotor de tumor, originar células preneoplásticas, neoplásticas y finalmente metastasis. Por lo cual, la célula posee diferentes mecanismos de respuesta a fin de mantener la fidelidad e integridad de la información genética, lo que da la posibilidad de intervención en cada etapa del proceso cancerígeno (Verhoeven *et al.*, 1997).

Los principales mecanismos de respuesta son: la modulación del metabolismo de compuestos xenobióticos, mecanismos de reparación en el DNA, mecanismos celulares de reconocimiento del daño “checkpoint” e inducción de apoptosis (Figura 1) (Casarett y Doull, 2001).

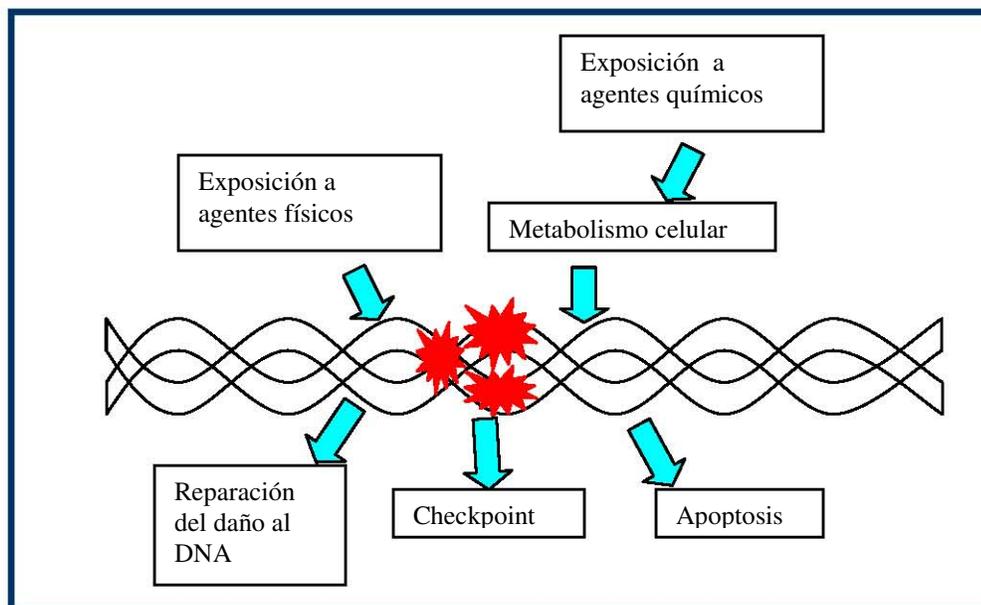


Figura 1. Mecanismos de respuesta celular ante el daño de agentes genotóxicos.

1. MECANISMOS DE RESPUESTA CELULAR.

1.1. METABOLISMO XENOBIÓTICO.

Los agentes extraños al cuerpo son llamados xenobióticos, los cuales al entrar al mismo provocan que se dispare la síntesis de complejos enzimáticos del metabolismo xenobiótico, que ayudan a excretarlos y/o biotransformarlos. El metabolismo xenobiótico consta de 2 Fases: en la Fase 1 los xenobióticos son convertidos en productos más hidrosolubles mediante reacciones de óxido-reducción, pero también pueden ser activados (promutágenos o indirectos) formándose compuestos más reactivos que los originales, los cuales podrían causar daños al DNA (Figura 2) (Casarett y Doull, 2001). En la fase 2, los metabolitos producidos en la Fase 1 son conjugados con moléculas tales como glutatión, sulfato, glucagón, etc, dando por resultado un aumento grande de la hidrofiliidad del xenobiótico, lo que facilita su eliminación (Figura 2) (Murray *et al.*, 1994).

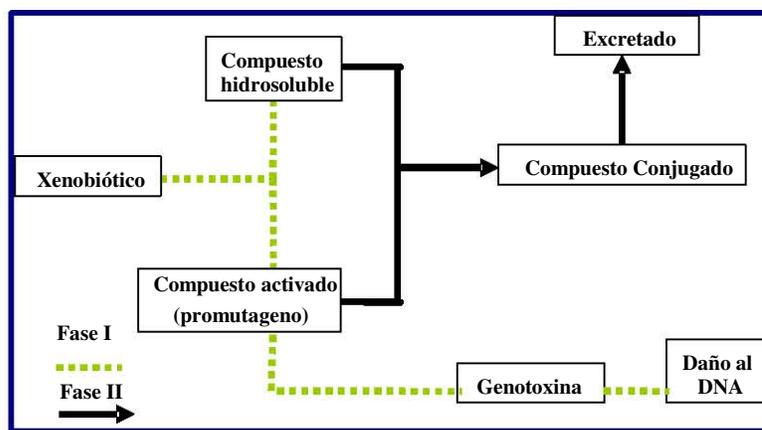


Figura 2. Metabolismo xenobiótico.

1.1.a. FASE 1 DEL METABOLISMO XENOBIÓTICO

1.1.a.1. CITOCROMOS P450

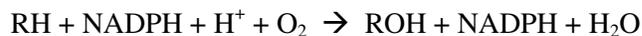
Entre las enzimas biotransformadoras de la Fase 1, el sistema de Citocromos P450 (CYPs) ocupa el primer lugar en lo que se refiere a la versatilidad catalítica (oxididasas, reductasas y peroxididasas) y al número absoluto de moléculas endógenas (esteroides, ácidos biliares, ácidos grasos, prostaglandinas) y xenobióticos (productos naturales en plantas, drogas, contaminantes) que desintoxica o activa hacia

intermediarios reactivos. En los eucariontes la concentración más alta de enzimas CYPs activas en la biotransformación de xenobióticos se encuentra en el retículo endoplásmico liso de las células del hígado, pero también se hallan en casi todos los tejidos (Xu *et al.*, 2005).

Las enzimas CYPs son hemoproteínas formadas por complejos de hierro-porfirina conocidos como grupo hemo, que también constituyen parte integral de la hemoglobina, el pigmento respiratorio de los glóbulos rojos. El nombre P450 deriva del espectro de absorción de 450 nm causado por este complejo en una atmósfera de monóxido de carbono (CO) (Murray *et al.*, 1994; Omura y Sato, 1964).

Como otras hemoproteínas poseen una parte proteínica (apoproteína) y un grupo prostético donde se localiza el átomo de hierro que puede llevar una molécula de oxígeno o monóxido de carbono; desde el punto de vista bioquímico, los CYPs se caracterizan por ser capaces de transportar electrones (Casarett y Doull, 2001).

Los CYPs catalizan gran variedad de reacciones, teniendo mayor preferencia por reacciones de monoxidación que añaden un átomo de oxígeno al sustrato:



Donde R: el resto de la estructura química del sustrato.

Para llevar a cabo estas reacciones los CYPs tienen un ciclo catalítico muy complejo, donde se usa oxígeno molecular que se une al grupo hemo donde es escindido, quedando unido posteriormente un solo átomo de oxígeno. El otro átomo de oxígeno es reducido para formar agua y para ello se requieren dos electrones que son donados por el NADPH, en pasos subsecuentes, por la enzima NADPH-450 reductasa (Boelsterli, 2002).

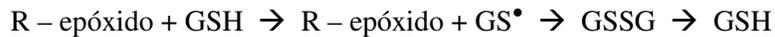
1.1.b. FASE 2 DEL METABOLISMO XENOBIÓTICO

1.1.b.1 CONJUGACIÓN CON GLUTATIÓN (GSH)

La conjugación con GSH representa una de las reacciones más importantes en el metabolismo de la Fase 2. El GSH es un tripéptido (β -glutamyl-cisteinglicina) que consiste en ácido glutámico, cisteína y

glicina. El glutamato está unido a la cisteína por el grupo γ -carboxilo, lo que impide su digestión por proteasas. La SH indica el grupo sulfhidrilo de la cisteína y es la parte activa antioxidante de la molécula (Kelly, 1999). En muchos tejidos el GSH alcanza concentraciones estables en milimoles. Además de ser un importante antioxidante, reductante y capturar radicales, es un co-sustrato de la familia de enzimas glutatión-S-transferasas (GSTs) y glutatión peroxidasa (GS-Px).

Este conjugado es químicamente inerte y es un blanco para sustratos químicamente reactivos, entre los que se encuentran alquilos, isotiocianatos, carbonilos, quinonas y químicos que contienen epóxidos. La conjugación es catalizada por las enzimas glutatión S-transferasas (GSTs) las cuales se encuentran en el citosol, retículo endoplásmico y la membrana interna mitocondrial (Plant, 2003; Boelsterli, 2002).



Donde R-epóxido: el resto de la estructura química del sustrato.

Las reacciones de biotransformación de la Fase 2 incluyen también la glucuronidación, sulfatación, acetilación, metilación y conjugación con aminoácidos (Murray *et al.*, 1994). La glucuronidación consiste en la transferencia de ácido glucurónico (del complejo UDP-ácido glucurónico) al xenobiótico vía la UDP-glucuronosiltransferasa (UGT). La sulfatación consiste en la transferencia de un sulfato del fosfoadenosín fosfosulfato al xenobiótico, vía sulfotransferasas (SULT) y la acetilación es la transferencia de acetatos de la acetil-CoA al xenobiótico, vía la *N*-Acetiltransferasa (NAT) (Boelsterli, 2002).

1.2. MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL DAÑO EN EL DNA

1.2.1. DAÑOS AL DNA

Cuando los compuestos xenobióticos no son eliminados o son biotransformados durante el metabolismo xenobiótico, pueden llegar a ocasionar alteraciones en el DNA como: formación de sitios apurínicos/apirimídicos (AP), desemparejamientos en los pares de bases, rompimientos sencillos y dobles, bases alteradas, enlaces cruzados y formación de aductos (Figura 3). Cuando estos no son reparados se producen mutaciones puntuales, aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas (ICH) y recombinación (Jenkins *et al.*, 2005).

Sitios apurínicos/ apirimídicos (AP). Son sitios en la cadena de DNA sin una base. Resultan de eliminar el enlace glicosídico de la base nitrogenada, entre el N1 de pirimidinas ó N9 de purinas con el C1 de la desoxirribosa en el esqueleto de azúcar-fosfato. Los sitios AP se forman por alquilación de bases o cuando una enzima glicosilasa del sistema BER elimina una base extraña.

Desemparejamientos. Llamados “*mismatches*” son pares de bases que no forman las parejas complementarias del DNA: A-T y G-C en la doble cadena. Se originan por fallas durante la replicación, la recombinación meiótica, o por desaminación espontánea de las bases.

Bases alteradas. Se dañan por exposición a especies reactivas de oxígeno, luz ultravioleta (UV), radiaciones electromagnéticas como los rayos X y gammas y enzimas o agentes químicos.

Rompimientos sencillos (SSBs). Son cortes en una de las cadenas en el esqueleto azúcar-fosfato. Los causan la radiación electromagnética, ROS y varios agentes químicos.

Rompimientos dobles (DSBs). Son interrupciones a ambos lados de la doble hélice que son resultado de dos eventos *extremadamente* cercanos o uno sólo que llega a ser suficiente; por ejemplo, la radiación ionizante produce radicales que la mayor parte inciden en dos sitios muy cercanos y rompen a la misma altura al esqueleto azúcar-fosfato del DNA.

Enlaces cruzados en el DNA. Consisten en la unión entre bases, azúcares o fosfatos que forman enlaces covalentes entre ellos, o los enlaces puente entre los O y N en una banda o en bandas opuestas del DNA formando aductos que impiden la replicación o la transcripción (Casarett y Doull, 2000; Friedberg *et al.*, 1995).

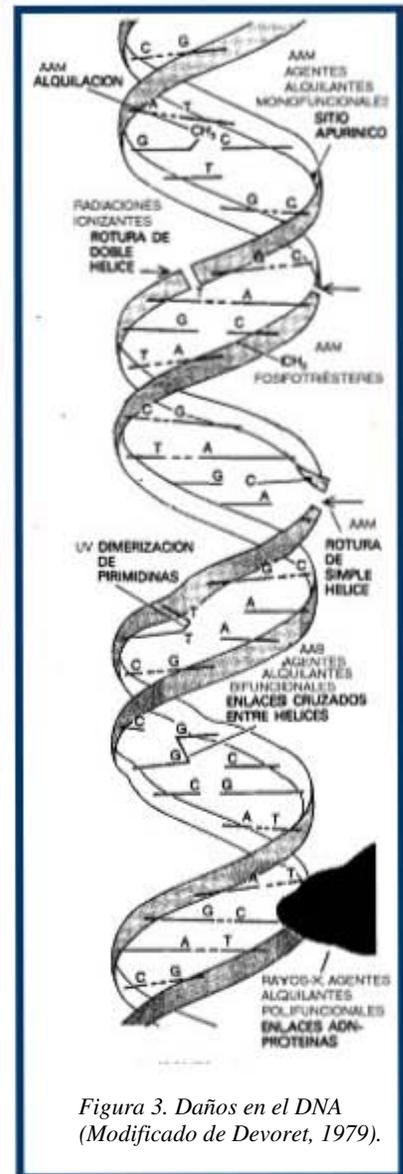


Figura 3. Daños en el DNA (Modificado de Devoret, 1979).

1.2.2. MECANISMOS DE REPARACIÓN

De acuerdo con el momento del ciclo celular los mecanismos de reparación se pueden clasificar como pre-replicativos (antes de la fase S del ciclo celular), edición de errores durante la replicación, post-replicativos (después de la fase S) y los que están específicamente acoplados a la transcripción. Los mecanismos de reparación pre-replicativos son: reversión simple, reversión por alquiltransferasas, fotoreparación, escisión de bases (BER) y escisión de nucleótidos (NER). Los post-replicativos son reparación de rompimientos dobles (DSB's) por recombinación entre homólogos (HRR) o entre no homólogos (NHEJ), y corrección de errores o desemparejamientos (MMR).

REPARACIÓN PRE-REPLICATIVA

Reversión simple. Los rompimientos simples son corregidos por una ligasa que une los extremos, siempre y cuando el daño consista únicamente en la pérdida de la unión fosfodiéster.

Reversión por alquiltransferasas. Los daños en las bases nitrogenadas pueden ser corregidos por reversión, mediante enzimas de reparación y sin romper el enlace fosfodiéster. Ésta es responsable de la respuesta de adaptación a la exposición sucesiva a alquilantes. Consiste en la eliminación de los grupos alquilo, en los oxígenos exocíclicos de la guanina (O^6G), de la timina (O^4-T) y fosfatos.

Fotoreparación (FR). La luz ultravioleta (A, B y C) puede producir dímeros de pirimidina 5-4 (*cis-syn* *ciclobutane-pirimidines*) y fotoproductos 6-4 mediante la formación de un puente estable entre los carbonos de dos pirimidinas adyacentes (T-T o T-C) que forman un anillo ciclo butano. Para romper estos anillos existe la enzima desoxi-ribo pirimidina fotoreparadora producida por el gen *phr*. Esta enzima se pega en la oscuridad al DNA dañado, cuando es activada por la luz de 350 a 500 nm que absorbe un fotón y lo pasa a dos cofactores de la enzima: MTFH (5,10-metenil-tetra-hidrofolil) poliglutamato y $FADH^-$ (1,5-dihidroflavin adenin-dinucleótido) transformandolos sucesivamente en $MTFH^*$ y $FADH^*$. El $FADH^*$ transfiere el electrón al dímero y lo monomeriza (ciclo-reversión). Diferentes transferencias de electrones eliminan a todos los dímeros pirimidina, y por último se regenera la forma original de la enzima y de sus cofactores ($FADH$ y $MTFH$) (Casarett y Doull, 2001).

Escisión de bases (BER). La alteración de las bases puede ocurrir por la inserción de una base extraña, por la alquilación de bases formando aductos y por la pérdida de bases (sitios *AP*). El mecanismo BER implica la escisión de una o hasta 7 bases por acción de glicosilasas que rompen el enlace glicosídico

entre el C1 de la desoxirribosa y el N1 de las pirimidinas o el N9 de las purinas; Provocando la formación de sitios AP que activan a AP-endonucleasas que rompe el enlace fosfodiéster en los sitios 5' ó 3' cercanos al daño, exonucleasas eliminan los residuos del esqueleto sin bases, la DNA polimerasa sintetiza el segmento faltante (5'→3') y una ligasa une los extremos libres (Hung *et al.*, 2005).

Escisión de nucleótidos (NER). Reparación realizada cuando se reconocen los daños (sitios AP, desemparejamientos, compuestos intercalados o alquilación doble) que abarcan de 7 a 50 nucleótidos. La reparación inicia con el corte de la cadena a ambos lados de los nucleótidos dañados por endonucleasas, la eliminación de los residuos abásicos por exonucleasas, la síntesis de nuevos nucleótidos por la DNA polimerasa y la unión de los extremos por ligasas.

REPARACIÓN POST-REPLICATIVA

Recombinación entre cromosomas homólogos (HRR). Repara los rompimientos dobles (DSB's) ocasionados principalmente por la acción de agentes físicos y ROS. La presencia de DSB's detiene la transcripción y el ciclo celular. La reparación de DSB's se relaciona con genes que producen cinasas Ser/Tre las cuales se pegan a los extremos libres y facilitan la recombinación entre las cromátidas de los cromosomas homólogos. En esta reparación la cadena que no está rota sirve de molde o templete para que se polimerice el segmento faltante y por último enzimas ligasas unen los extremos libres y las cadenas reparadas se separan.

Reparación por recombinación entre no homólogos (NHEJ). Aunque se presenta en todo el ciclo se ubica en la reparación post-replicativa porque repara rompimientos dobles (DSBs), que en su mayoría se producen después de la fase S, por defectos en la replicación en presencia de los rompimientos simples. En esta reparación intervienen diversas proteínas como la DNA-PK Ser/Tre (Ku70 + Ku86 + DNA-PKcs) que se pega a los DSBs facilitando la recombinación entre cromosomas no homólogos.

Corrección de errores o desemparejamientos (MMR). Cuando el DNA está dañado puede ocurrir la síntesis que ignora los errores en la información y produce errores a lo largo de la nueva cadena. Estos son corregidos mediante la corrección de errores o reparación *MMR* que reconoce los defectos en la cadena nueva. La cadena parental, que sirvió de molde para la síntesis, es reconocida por las enzimas de reparación, debido a que el DNA está marcado con metilos en las secuencias GATC.

La reparación *MMR* comienza cuando la proteína MutS reconoce el error en la cadena nueva y se pega a él, MutL se pega a MutS, MutH (endonucleasa) corta en la cadena nueva en cualquier sitio GATC que no esté metilado, las exonucleasa VII y la exonucleasa I eliminan los oligonucleótidos dañados, la DNA polimerasa III llena el hueco con la participación de proteínas estabilizadoras (SSB) y por último los extremos son unidos por ligasas y la enzima Dam metilasa, metila correctamente las secuencias GATC en la cadena nueva que fue reparada (Heres y Pulido, 2001; Friedberg *et al.*, 1995).

1.3. ACTIVIDAD “CHECKPOINT”

Se refiere a varios mecanismos celulares de reconocimiento de daño al DNA asociado con caminos bioquímicos que retrasan o detienen la progresión del ciclo celular. Los checkpoints comprenden proteínas sensoras del daño, tales como el complejo Rad 9-Rad 1-Hus 1 (9-1-1) y el complejo Rad17-RFC estas mandan las señales a los transductores ATM, ATR, y las Checkpoint (chk 1 y chk 2 cinasas). Estas ultimas regulan la supresión de moléculas efectoras Cdc25, Wee 1 y P53, que son proteínas que inhiben la progresión del ciclo celular para la activación de mecanismos de reparación o en casos extremos la inducción de apoptosis (Figura 4) (Niida y Nakanishi, 2005).

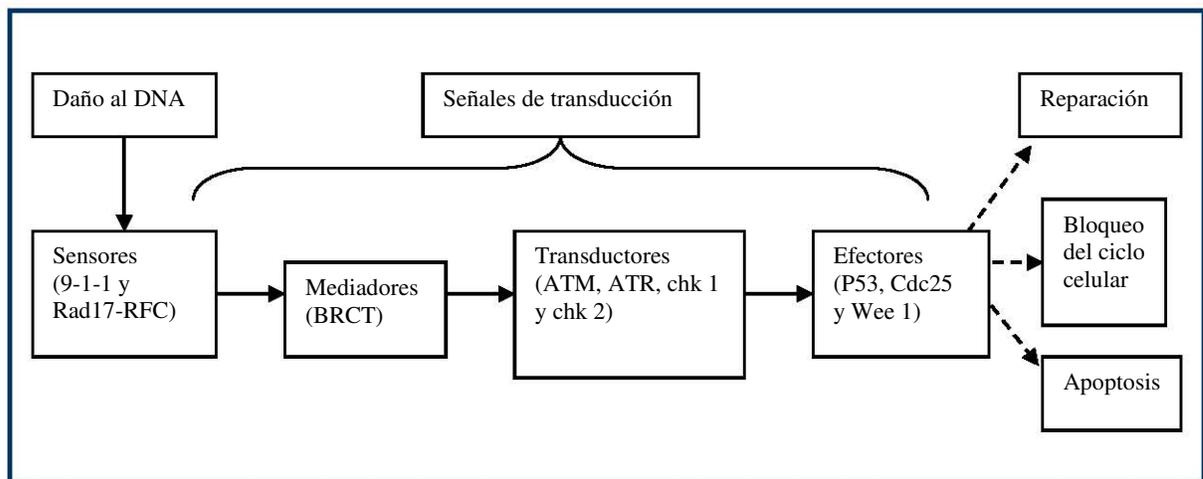


Figura 4. Organización conceptual de las señales de transducción de respuesta Checkpoint. Los daños al DNA son reconocidos por sensores. Las señales son transmitidas a los transductores y los transductores regulan la supresión de moléculas efectoras que detienen el ciclo celular en fases específicas.

1.4. APOPTOSIS

Es el último mecanismo de respuesta celular, para activarlo existen dos principales caminos, los cuales son mediados vía receptores de la superficie celular (FAS/APOI/CD95 y la familia TNF) y la mitocondria, respectivamente. En el primero se enlazan estímulos extracelulares de muerte a receptores de la superfamilia de tumores de necrosis (TNF), lo que da inicio a la formación del complejo celular (FADD) y procaspasa-8. Ésto inicia la activación de la caspasa-8, que activa el efector caspasa 3, 6 y 7. Mientras que, en el camino mitocondrial se inicia la activación por una variedad de estímulos, incluyendo agentes que dañan al DNA, stress citotóxico o ausencia de factores de crecimiento. La proteína pro-apoptótica Bax facilita la liberación de Citocromo C de la mitocondria al interior de la membrana. Una asociación del Citocromo C, APAF-1 y procaspasa-9 en el citosol forma un apoptosoma que activa caspasa-9 y el efector caspasa que inducen la apoptosis (Johnson, 2002).

1.5. PRUEBAS PARA EL ANÁLISIS DE LOS DAÑOS GENOTÓXICOS

Existen diferentes pruebas para identificar cambios genéticos inducidos por agentes químicos que tienen en cuenta, en última instancia, el riesgo potencial que presentan para el ser humano (cuadro 1). El ensayo de Ames con bacterias es la prueba genotóxica más rápida y económica; sin embargo, las conclusiones obtenidas con estas pruebas deben ser confirmadas en pruebas con organismos pluricelulares, con metabolismo similar al del humano. Otras pruebas utilizan mamíferos (prueba de micronúcleos en ratones y células de ovario de Criceto Chino (CHO), prueba de letales dominantes en ratones, prueba citogenética *in vitro* en células de mamíferos, prueba citogenética *in vivo* en ratones, prueba de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) *in vitro* con células de mamíferos), que aunque no necesitan ser confirmados con otros modelos, presentan el inconveniente de requerir tiempos amplios y costos elevados (Sánchez Lamar *et al.*, 2000; Rodríguez-Arnáiz y Ramos, 1992).

Cuadro 1. Pruebas genotóxicas (modificado de Sánchez Lamar *et al.*, 2000).

ENSAYOS PARA MUTACIONES GÉNICAS.

- * Prueba de Ames (*Salmonella typhimurium*/microsomos de mamífero).
- * Prueba de mutaciones puntuales en *Saccharomyces cerevisiae*.
- * Letales recesivos ligados al sexo en *Drosophila melanogaster*.
- * Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas (SMART) en *Drosophila melanogaster*.
- * Prueba de mutación de los polos estamiantes de *Tradescantia*.

ENSAYOS PARA MUTACIONES CROMOSÓMICAS.

- * Prueba citogenética *in vitro* en células de mamífero.
- * Prueba citogenética *in vivo* en ratones.
- * Prueba de micronúcleos (ratones y células de ovario de Criceto Chino: CHO).
- * Prueba de letales dominantes en ratones.
- * Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas (SMART): deleciones y aneuploidías parciales.
- * Prueba citogenética de las células merestimáticas de la raíz de *Vicia faba*.

PRUEBAS PARA DAÑO PRIMARIO AL DNA.

- * Prueba de segregación mitótica en *Aspergillus nidulans*.
- * Prueba de conversión génica y recombinación mitótica en *Saccharomyces cerevisiae*.
- * Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas (SMART).
- * Prueba de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) *in vitro* con células de mamífero.

OTRAS PRUEBAS.

- * Prueba de la morfología de la cabeza del espermatozoide en ratones.
 - * Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas (SMART): detección de recombinación mitótica.
-

En este sentido las pruebas hechas con *Drosophila melanogaster* (Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas (SMART) y letales resesivos ligados al sexo) son reconocidas como ideales para realizar investigación (Vogel, 1999; Ramos *et al.*, 1993) debido a que son tan rápidas y económicas como las pruebas en bacterias; pero además *Drosophila melanogaster* puede realizar *in*

vivo la mayoría de las funciones enzimáticas que se efectúan en los hepatocitos humanos, lugar donde se activan gran cantidad de cancerígenos y mutágenos indirectos (Guzmán y Graf, 1995) por lo que los resultados obtenidos con este organismo no necesitan ser confirmados con otros modelos biológicos.

1.5.1. PRUEBA DE MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN SOMÁTICAS (SMART) EN ALA DE *Drosophila melanogaster*

Prueba a corto plazo con valiosos resultados para la evaluación de posibles compuestos genotóxicos, que ha sido validada a la fecha en más de 400 compuestos (Graf *et al.*, 1996; 1984) y que como apoyo de esta prueba se tiene la correlación positiva entre la genotoxicidad de antidepresivos tricíclicos en *D. melanogaster* (van Schaik and Graf, 1993, 1991) y el aumento del riesgo de cáncer mamario lo cual fue demostrado por Sharpe *et al.* (2002).

La prueba SMART también brinda la posibilidad de elaborar protocolos para la evaluación antigenotóxica de compuestos simples o mezclas complejas, mediante co-tratamientos, pre-tratamientos y post-tratamientos a varias duraciones (Graf *et al.*, 1998). El primer trabajo de antigenotoxicidad utilizando SMART fue publicado por Negishi *et al.*, (1989) donde mostraron que la clorofilina inhibió la genotoxicidad de Trp-p-2(3-amino-1-metil-SH-pirido [4,3-b] indol); otro trabajo es el de Olvera *et al.* (1995) quienes demostraron efecto protector del ácido ascórbico (vitamina C) contra la genotoxicidad de los rayos gamma y óxido de cromo (VI) en células somáticas de *D. melanogaster*. Con respecto a la actividad antigenotóxica de mezclas complejas, Abraham y Graf, (1996) y Abraham (1994) mostraron evidencia de que el café instantáneo exhibe protección contra reconocidos mutágenos como el uretano, ciclofosfamida, dietil-nitrosamina y mitomicina C.

La prueba SMART se basa en el hecho de que durante el inicio del desarrollo larvario *Drosophila melanogaster* posee 2 linajes celulares: larval e imagal. El larval está implicado exclusivamente con el desarrollo larvario, mientras que el imagal está formado por paquetes de células que se conocen como discos imagales, los cuales permanecen en estado embrionario durante todo el desarrollo larvario, sólo proliferando mitóticamente desde un promedio inicial de 50 células por disco hasta alcanzar las 48800 células. Durante la metamorfosis parte del material larvario degenera y las estructuras del adulto (patas, alas, etc.) se derivan de cada disco imagal (Soriano *et al.*, 1995; Mitchell y Combes, 1984). Por ello, esta prueba tiene la posibilidad de exponer a tratamientos a grandes poblaciones de células, que se reproducen mitóticamente en los discos imagales de la larva. Si una alteración genética ocurre en una de las células de los discos imagales, esta alteración estará presente en todas las células descendientes,

lo que podría originar un clon o mancha de células mutantes sobre la superficie del cuerpo de las moscas adultas (Graf *et al.*, 1998; 1984).

El fundamento de la prueba SMART es “la pérdida de heterocigosis de genes marcadores que se expresan como clones o manchas de tricomas múltiples o malformados, derivados de células mutantes en las alas de los organismos adultos” ocasionada por la actividad genotóxica de compuestos que inducen eventos genéticos como: mutaciones puntuales, deleciones (Figura 5 a), recombinaciones somáticas y no-disyunción (Figura 5 b) (Graf *et al.*, 1998; 1984).

La prueba SMART utiliza 3 cepas mutantes de *D. melanogaster* con marcadores recesivos:

mwh/ mwh (*multiple wing hairs*): Mutación autosómica recesiva localizada en el brazo izquierdo del cromosoma 3 a 0.3 unidades de mapa (3-0.3). En homocigosis total o en mosaicos somáticos tiene la expresión fenotípica de la aparición de tres o más tricomas por célula (figura 7 color rojo) en lugar de uno, como es el caso del fenotipo silvestre (figura 6) (Graf *et al.*, 1996; 1984).

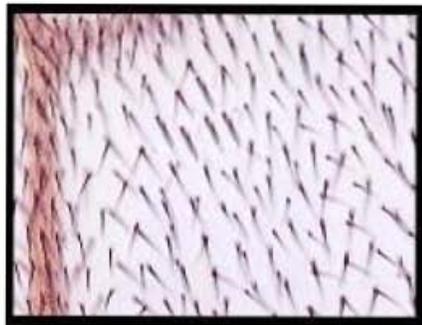


Figura 6. Expresión fenotípica de tricomas silvestres.

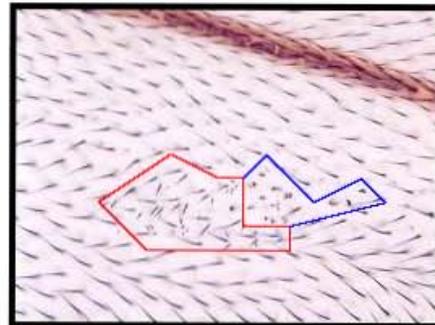


Figura 7. Expresión fenotípica del marcador *mwh* (color rojo) y *flr³* (color azul).

flr³ / TM3, Bd^f (*flare³*): Mutación autosómica recesiva ubicada en el cromosoma 3 a 38.8 unidades de mapa (3-38.8). La expresión fenotípica son tricomas malformados y cortos en forma de "flama" o "rosetas de maíz" (figura 7 color azul). En condición homocigota es letal por lo que posee el cromosoma balanceador TM3 con inversiones múltiples que le permiten mantenerse en heterocigosis; este cromosoma balanceador se reconoce indirectamente por la presencia del gen dominante *Bd^f* (*Beaded Serratia*), el cual se expresa presentando muescas en el borde de las alas (figura 9) (Graf *et al.*, 1996; 1984).

ORR(1); ORR(2); *flr*³ / TM3, *Bd*^s (Oregon-*flare*³): Esta cepa fue construida por Frölich y Würigler en 1989. Presenta los cromosomas 1 y 2 de la cepa ORR (resistente a DDT). El marcador dominante Rst (2) DDT está localizado en el cromosoma 2 a 65 unidades de mapa (2-65) que provoca la expresión constitutiva de los genes *CYP6A8* y *CYP6A9* del cromosoma 1 y *Cyp6A2* del cromosoma 2 (Graf *et al.*, 1998; Graf y Van Schaik, 1992; Graf y Singer, 1992).

Con estas cepas se realizan dos cruza: la cruza Estándar (E) (hembras vírgenes *flare*³ con machos *mwh*) (Graf *et al.*, 1989) y la cruza de Bioactivación Elevada (BE) (hembras vírgenes Oregon-*flare*³ con machos *mwh*) (Graf y Van Schaik, 1992).

En la cruza E se producen 2 tipos de descendientes: trans-heterocigotos *mwh* +/+ *flr*³ con alas de tipo silvestre (figura 8) y heterocigotos *mwh* +/ TM3, *Bd*^s con alas de fenotipo *Beaded Serratia* (figura 9); la cruza BE produce dos tipos de descendientes: trans-heterocigotos ORR(1);ORR(2);*mwh* +/+ *flr*³ con alas de fenotipo silvestre (figura 8) y heterocigotos ORR(1);ORR(2);*mwh* +/ TM3, *Bd*^s con alas de fenotipo *Beaded Serratia* (figura 9).

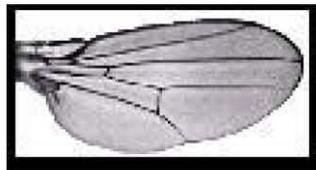


Figura 8. Ala silvestre.

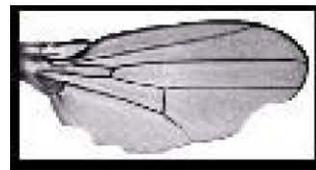


Figura 9. Ala con el marcador *Beaded Serratia*.

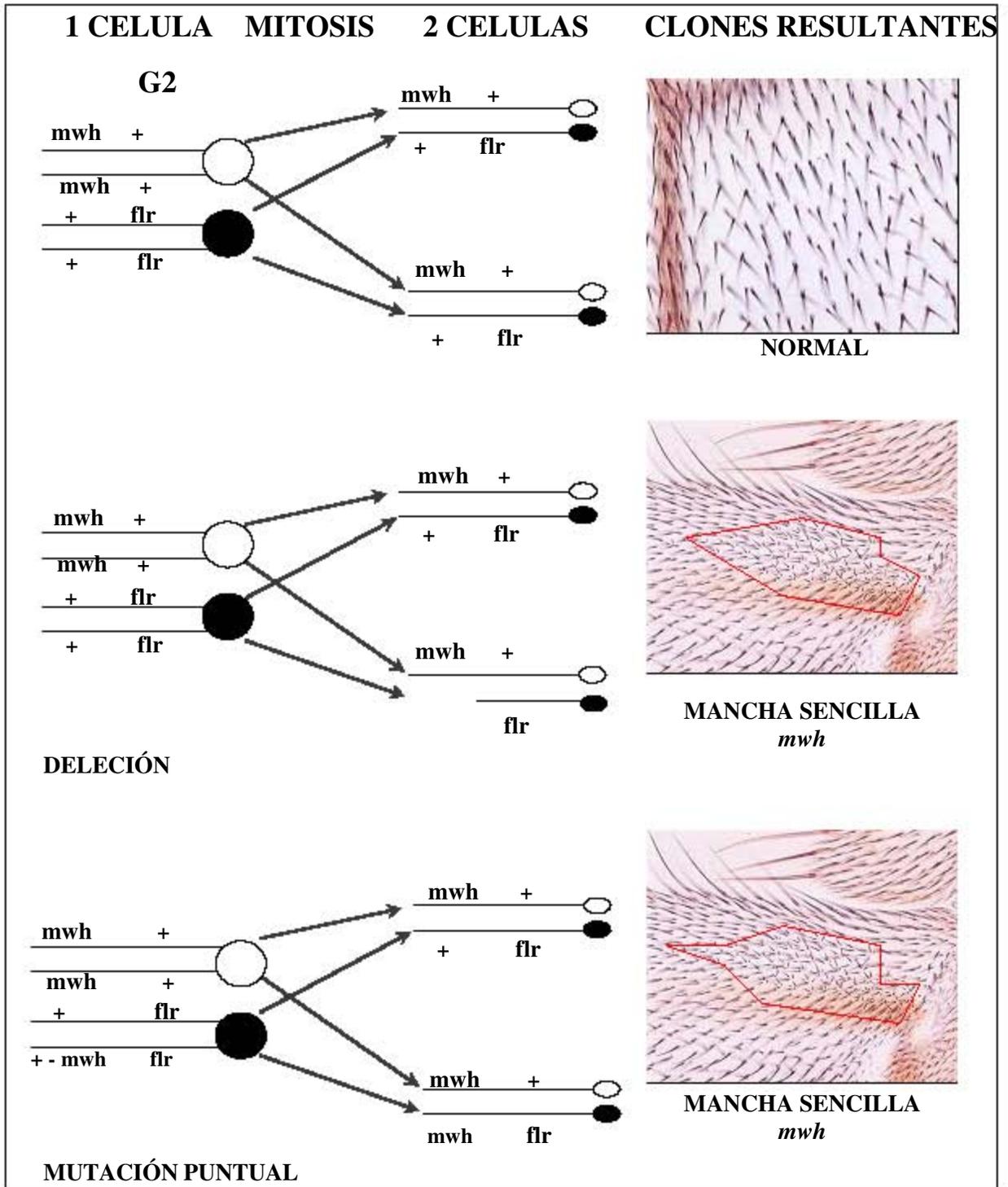


Figura 5 a. Eventos genéticos que llevan a la pérdida de la heterocigosis y la Formación de manchas en la prueba SMART (tomado de Guzmán-Rincón y Ramírez-Victoria, 2001. Modificado de Graf et al., 1984).

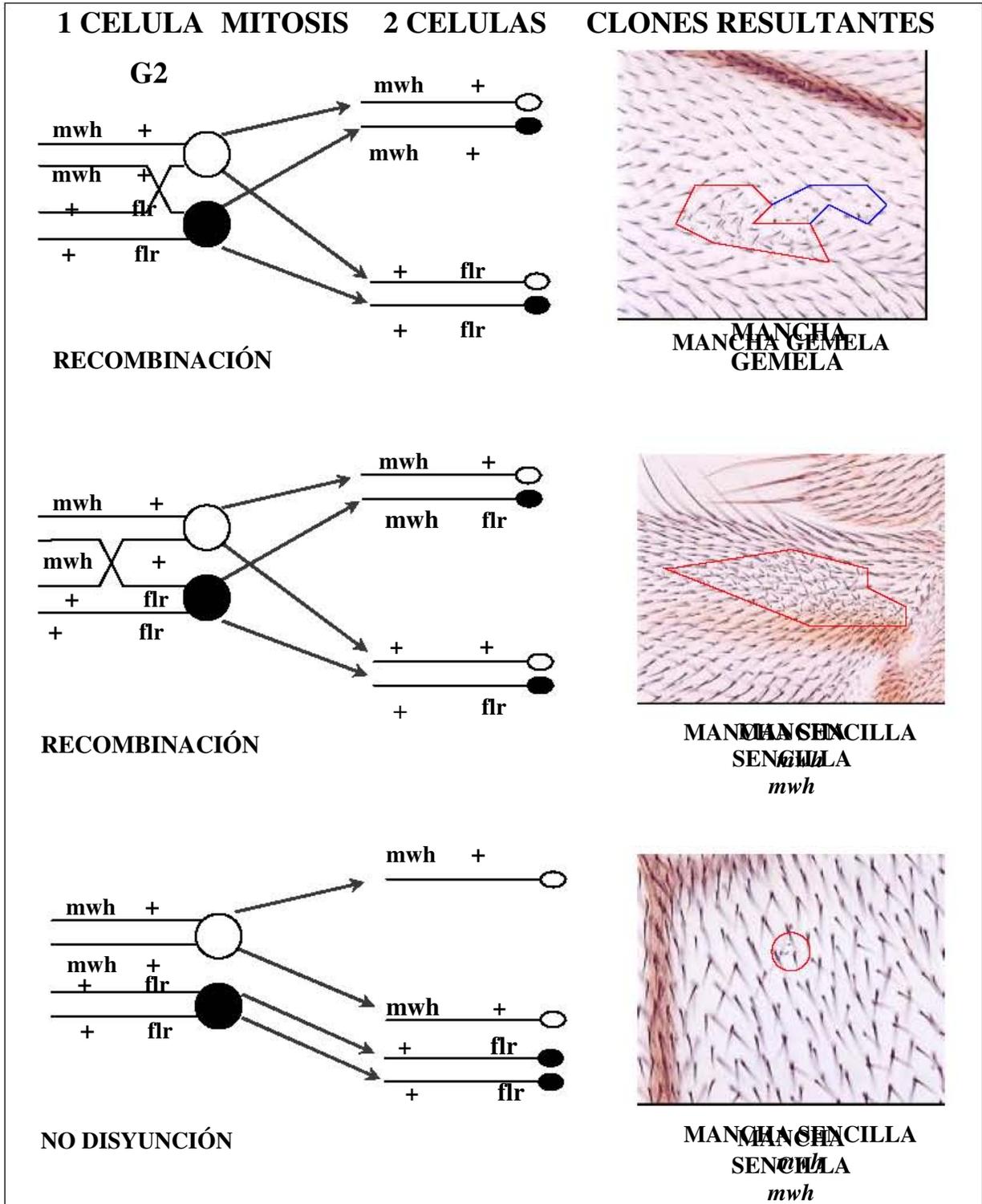


Figura 5 b. Continuación Eventos genéticos que llevan a la pérdida de la heterocigosis y la Formación de manchas en la prueba SMART (tomado de Guzmán-Rincón y Ramírez-Victoria, 2001. Modificado de Graf et al., 1984).

1.6. URETANO

El uretano o carbamato de etilo ($\text{NH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$) (Figura 10), éter etílico del ácido carbámico, se origina por la reacción entre la urea y el alcohol etílico (Woo Cha *et al.*, 2000). Comercialmente se ha empleado como cosolvente para pesticidas, fumigantes y cosméticos; en medicina humana y veterinaria ha sido usado como agente hipnótico, en el tratamiento de várices, leucemia crónica y mieloma múltiple (De la Torre y Buxaderas, 2002; Sakano *et al.*, 2002; Hübner *et al.*, 1997; Frölich y Würigler, 1990; Windholz *et al.*, 1976).

Se le puede encontrar como producto de los procesos de fermentación de alimentos y bebidas alcohólicas (Uthurry *et al.*, 2004; Hoffler *et al.*, 2003; Abraham *et al.*, 1998).

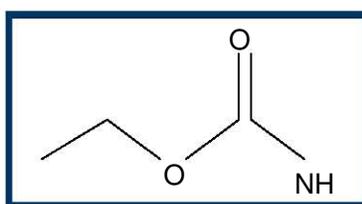


Figura 10. Uretano o carbamato de etilo (tomado de Kempler *et al.*, 1995).

La Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) ha clasificado al uretano dentro del grupo 2B, que corresponde a los compuestos con suficiente información sobre su potencial cancerígeno en animales de experimentación, pero insuficiente en el hombre (De la Torre y Buxaderas, 2002; Kempler *et al.*, 1995). Se ha reportado que el uretano es un cancerígeno múltiple en animales de laboratorio que provoca linfomas, hepatomas, melanomas y tumores de pulmón (Hoffler *et al.*, 2003; Sakano *et al.*, 2002).

1.6.1. METABOLISMO DEL URETANO

El uretano es un promutágeno que debe ser metabolizado para ocasionar daños al DNA (Kempler *et al.*, 1995). Este metabolismo puede llevarse a cabo al menos por tres caminos distintos. En el primero, el uretano es hidrolizado por esterasas a etanol, amonio y dióxido de carbono, por lo que es excretado sin causar daño (Figura 11) (Woo Cha *et al.*, 2000). En el segundo el uretano es transformado por los CYPs a vinil carbamato epóxido, que puede formar aductos con el DNA (Figura 11 y 12) (Hoffler *et al.*, 2003; Hübner *et al.*, 1997; Kempler *et al.*, 1995). En el tercero el uretano es convertido por los

CYPs a N-Hidroxiuretano que puede formar un radical nitroso de forma no enzimática y provocar daños por oxidación al DNA, o sufrir una descarboxilación, reacción catalizada por enzimas esterases, formando hidroxilamina, un compuesto genotóxico (Woo Cha *et al.*, 2000). Además Sakano *et al.*, 2002 propone que la hidroxilamina puede llegar a producir óxido nítrico *in vivo* causando daños por oxidación y depuración al DNA (Figura 11) en presencia de cobre, el cual puede ser obtenido de las regiones heterocromáticas de la cromatina.

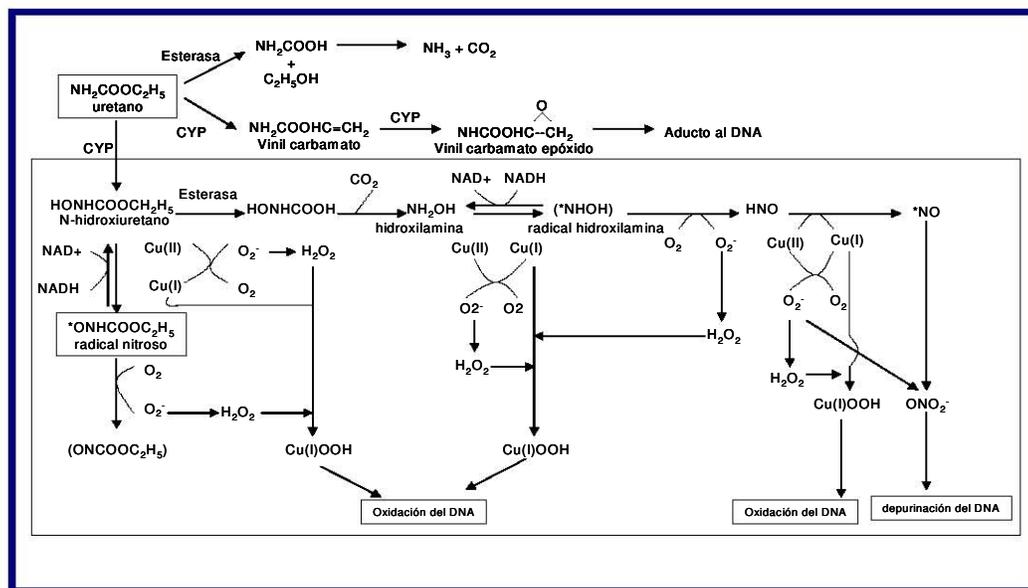


Figura 11. Metabolismo del uretano (tomado de Sakano *et al.*, 2002).

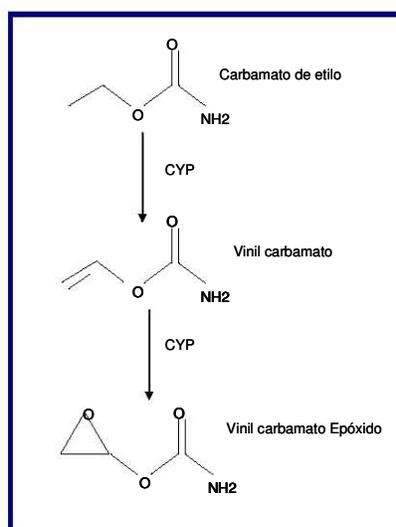


Figura 12. Transformación del uretano a vinil carbamato epóxido (tomado de Kempler *et al.*, 1995).

1.7. BRÓCOLI (*Brassica oleracea*, var. *Itálica*)

Varios estudios epidemiológicos y de cancerogénesis animal han demostrado que vegetales de la familia Brassicaceae, en particular del género *Brassica*, tales como brócoli, coliflor y coles de Bruselas, tienen propiedades preventivas de cancerogénesis química (Zhu y Loft, 2003, 2001; London *et al.*, 2000; Conaway *et al.*, 2000; Verhagen *et al.*, 1997).

El brócoli es una verdura formada por racimos compactos de color verde, presenta tallos carnosos y gruesos que emergen de axilas foliares que forman inflorescencias, generalmente una central de mayor tamaño, y otras laterales (Figura 13).

El brócoli es un ingrediente muy importante en la nutrición humana, es conocido como “la joya de la corona del vegetarianismo”. Su valor nutritivo radica principalmente en su alto contenido de vitaminas A, B, C, D, E y K, minerales como potasio y hierro, fibra, hidratos de carbono, proteínas (Anexo 1) y fitoquímicos, algunos de los cuales han sido reconocidos como quimiopreventivos del cáncer (Nestlé, 1997).

Actualmente sus propiedades de quimioprotección están relacionadas con su contenido relativamente alto de glucosinolatos (compuestos específicos de vegetales de la familia Brassicaceae) (Sorensen *et al.*, 2001; Verhoeven *et al.*, 1997) y a su contenido de vitaminas (Podsdek, 2005; Steinkellner *et al.*, 2001; Nestlé, 1997).



Figura 13. Brócoli (*Brassica oleracea*, var. *Itálica*)
(Tomado de www.shopi.com/idees/img/12/brocoli.jpg)

1.7.1. GLUCOSINOLATOS

Los glucosinolatos (β -tioglucosidos N-hidroxisulfatos) son compuestos solubles en agua, aniónicos, no volátiles y muy estables (Kushad *et al.*, 2003; Fahey y Talalay, 1999; Zhang *et al.*, 1995).

El contenido y distribución de los glucosinolatos varía en cantidad y tipo en diferentes partes del brócoli como: raíces, hojas, tallos y semillas. Además la edad de la planta es el mayor determinante de la composición de los glucosinolatos; aunque también pueden afectar factores ambientales como: la fertilidad del suelo, ataque de patógenos, heridas y regulaciones en el crecimiento (Kushad *et al.*, 2003; Fahey *et al.*, 2001; Verhoeven *et al.*, 1997).

Los glucosinolatos pueden ser descompuestos a isotiocianatos (ITCs), tiocianatos y nitrilos por acción de la enzima mirosinasa (β -tioglucosido glicosilasa) que cataliza la hidrólisis de los glucosinolatos (figura 14). La mirosinasa es una glucoproteína que está en compartimentos junto al sustrato del glucosinolato, y que es segregada cuando el brócoli sufre algún daño, por ejemplo, cuando se mastica (Conaway *et al.*, 2000; London *et al.*, 2000; Kassie y Knasmüller, 2000; Fahey *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1995).

La enzima mirosinasa se encuentra también en hongos, bacterias e indirectamente en los mamíferos debido a las bacterias que se encuentran en la microflora intestinal. Se ha demostrado que las bacterias de la flora intestinal juegan un papel importante en la descomposición de los glucosinolatos que son ingeridos por los mamíferos, ya que un tercio de ellos no son descompuestos por la mirosinasa de la planta (Verhoeven *et al.*, 1997).

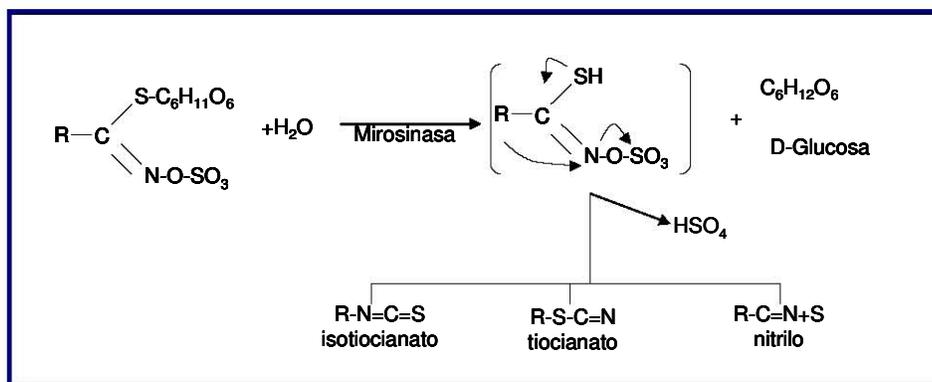


Figura 14. Hidrólisis de los glucosinolatos a isotiocianatos, tiocianatos y nitrilos por acción de la enzima mirosinasa (tomado de Streinkellner *et al.*, 2001).

1.7.2. ISOTIOCIANATOS (ITCs)

Los ITCs son uno de los mayores productos formados por la hidrólisis de los glucosinolatos (Fahey y Talalay, 1999). En contraste a los glucosinolatos, los ITCs son típicamente lipofílicos y pueden ser altamente reactivos, volátiles, malolientes y con sabor fuerte. Poseen propiedades farmacológicas: antibacteriales, fungicidas, antiprotozoos, nematocidas y alelopáticas; así como propiedades tóxicas: hepatotóxicas y goitrogénicas (inflamación de la glándula tiroidea por consumir una cantidad alta de vegetales que contienen el glucosinolato progoitrin, goitrin o epi-progoitrin) (Kushad *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 1995).

1.7.3. PROPIEDADES ANTICANCERÍGENAS/GENOTÓXICAS DE LOS ITCs

Desde hace algunos años ha aumentado el interés por consumir vegetales del género *Brassica*, ya que se sospecha que poseen propiedades anticancerígenas, estas han sido relacionadas con su capacidad modulante de enzimas de la Fase 1 y 2 del metabolismo xenobiótico, principalmente inducción de enzimas desintoxicantes como, GST y quinona reductasa (Zhu y Loft, 2003; Fahey y Talalay, 1999). Así lo han demostrado algunos trabajos de investigación, como el de Fahey *et al.* (2001), quienes reportaron que el sulforafano fue encontrado como el principal inductor de enzimas de la Fase 2, lo que provocó una reducción de la incidencia y tamaño de tumores en mama de rata, actuando como un antioxidante indirecto y que fenil-isotiocianato (PEITC) inhibió la inducción de cáncer de pulmón en ratones y ratas, sugiriendo con ello una inhibición de CYPs como su principal mecanismo de protección.

Por otra parte, también se reportan trabajos que demuestran efectos genotóxicos/cancerígenos de ITCs: alil-isotiocianato demostró efecto mutagénico en *Salmonella Typhimurium* TA100 y en células de papiloma en vejiga urinaria de ratas macho F344 (Kassie y Knasmüller, 2000) y fenil-isotiocianato indujo aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas (Musk *et al.*, 1995).

Así mismo, la inducción de enzimas de la Fase 1 por los ITCs puede dar por resultado la inhibición/activación de agentes promutágenos/procancerígenos: Verhoeven *et al.*, (1997) realizó un estudio donde contrastó ITCs con 2 promutágenos, obteniendo por resultado: la inhibición de la activación de nitrosaminas, pero un aumento en la formación de aductos al DNA por el benzo(a)pireno.

II. ANTECEDENTES

DAÑOS AL DNA (ROS)

(1) Fahey et al. (2001) reportaron que los principales ITCs presentes en el brócoli son: alil-ITC (AITC), fenil-ITC (PEITC), indol 3-carbinol (I3C) y sulforafano. Este último reportado por Fahey y Talalay (1999) como el principal compuesto con propiedades preventivas del cáncer; Sin embargo, (2) Kassie y Knasmüller en el 2000 encontraron ITCs con potencial genotóxico (AITC y PEITC) mediante la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS), además (3) Park et al. (1996) reportaron que I3C es un importante inductor de CYPs lo que podría estar asociado con el incremento de daño oxidativo al DNA por ROS. Por otra parte, (4) Kassie y Knasmüller (2000) y (5) Podsedek (2005) reportaron que los vegetales *Brassica* son ricos en captadores de radicales libres (Vitamina E > Vitamina C = vitamina A) lo que podría reducir los efectos de ROS producidos por los ITCs.

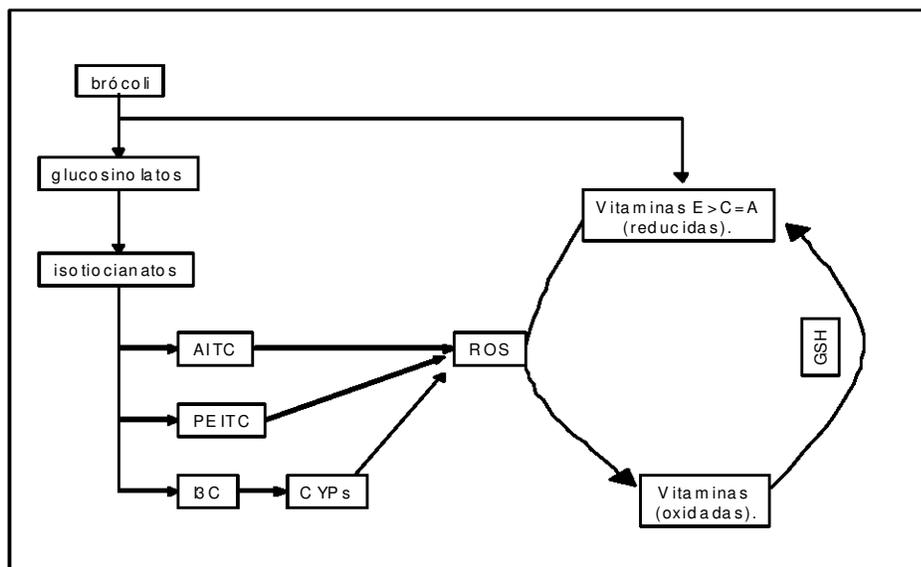


Figura 15. Mapa metabólico según los resultados de los trabajos (1-5).

FASE 1

(6) Verhoeven et al. (1997), (7) Vang et al. (1997) y (8) Bjeldanes et al. (1991) demostraron que a pH neutro, el glucobrassicin forma un isotiocianato inestable, que degrada a I3C, un ión tiocianato y 3,3'-diindolilmetano. El I3C puede condensarse espontáneamente bajo condiciones ácidas del estómago y formar un compuesto muy parecido en genotoxicidad a las dioxinas; Según (9) Podsedek (2005), si I3C reacciona con ácido ascórbico forma ascorbigen, que es un potente inductor de enzimas de la Fase 1 y 2. El ascorbigen ocupa un papel importante ya que (10) Sorensen et al. (2001), (11) He et al. (2000) y (12) Vang et al. (1991), reportan que la inducción de CYPs por I3C es responsable del incremento de la bioactivación de promutagenos.

Por otra parte, los trabajos de (13) McDanell y McLean (1988) y (14) Tiedink et al. (1988), reportaron una ruta alternativa de genotoxicidad por I3C al unirse con nitrilos y formar compuestos N-nitrosos mutagénicos.

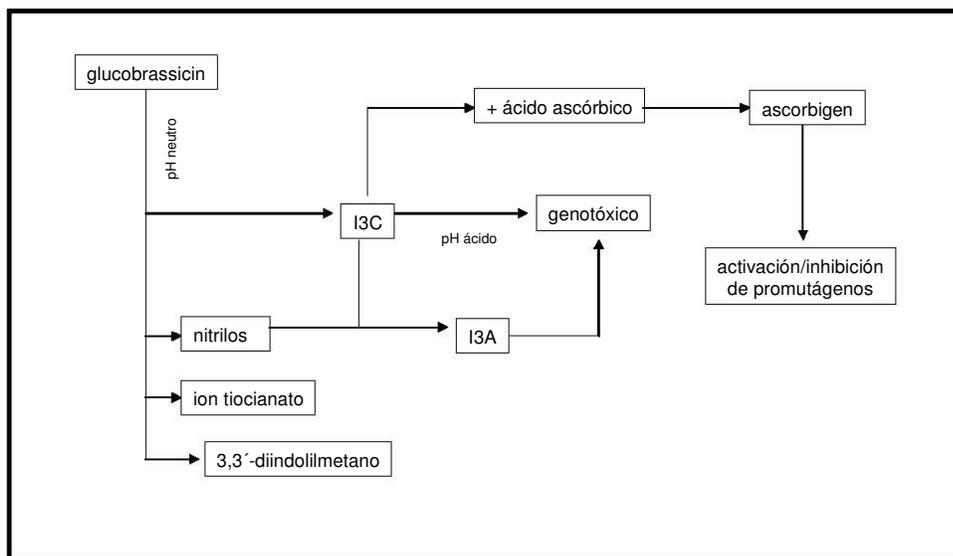


Figura 16. Mapa metabólico según los resultados de los trabajos (6-14).

FASE 2

(15) Fahey et al. (2001), reportaron que los principales glucosinolatos presentes en el brócoli son: gluconasturtiin, sinigrin, glucobrassicin y glucorafanin, que se descomponen por acción de la mirosinasa a PEITC, AITC, I3C y sulforafano, respectivamente. (16) London et al. (2000) y (17) Kassie y Knasmüller (2000), reportaron que la desintoxicación de los ITCs involucran enlaces de manera directa con proteínas como glutatión (GSH). La glutatión S-transferasa (GST) tiene una alta especificidad por conjugar GSH con ITCs, por lo que se podrían reducir los niveles de GSH intracelular. Pese a ello, (18) Fahey y Talalay (1999), (19) Vang et al. (1995) y (20) Zhu y Loft (2001) reportaron que los ITCs (sulforafano e I3C) inducen enzimas de la Fase 2 (principalmente GST y quinona reductasa) por lo que los niveles de GSH intracelular pudieron haberse compensado.

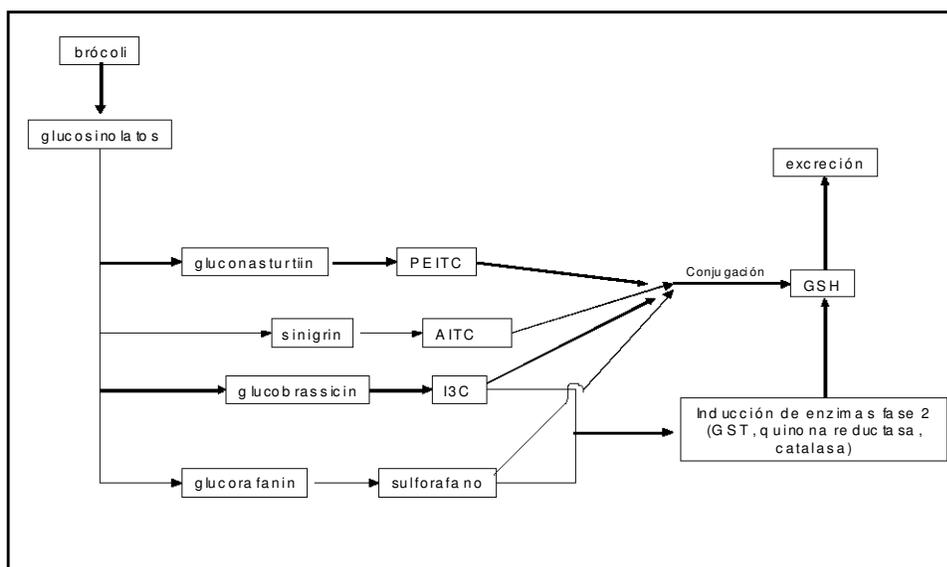


Figura 17. Mapa metabólico según los resultados de los trabajos (15-20).

Además López (2004), analizó un brócoli obtenido en un supermercado en la prueba SMART, únicamente para la cruz BE, y encontró reducciones estadísticamente significativas de las frecuencias de mutaciones espontáneas para todos los tipos de manchas. Por su parte, Nestlé (1997) concluye que siendo el brócoli una mezcla compleja, presenta una naturaleza dual de los sistemas enzimáticos, un vasto número de compuestos que pueden inducirlos, químicos que inducen activación/inhibición de promutágenos o de las enzimas desintoxicantes, lo cual lleva a un problema muy grande para concluir sin dudas la quimioprotección anticancerígena del brócoli.

III. JUSTIFICACIÓN

Desde hace más de 20 años se ha reconocido que el consumo de vegetales, entre ellos el brócoli, pueden prevenir varios tipos de cáncer. Actualmente se sostiene que fitoquímicos tales como los glucosinolatos y los productos de su metabolismo, son los responsables de la actividad quimioprotectora del brócoli contra el cáncer. Sin embargo, sus mecanismos no están completamente entendidos, e inclusive existe en la actualidad una controversia entre la comunidad científica, ya que en los últimos años se han reportado fitoquímicos presentes en el brócoli con propiedades tóxicas, genotóxicas o cancerígenas en algunos sistemas de prueba.

Por ello se realizará la Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas (SMART) en ala de *Drosophila melanogaster*, para valorar el presumible efecto antígenotóxico del brócoli (*Brassica oleracea*, var. Itálica) como mezcla compleja en co-tratamiento crónico con el promutágeno uretano cuyos efectos genotóxicos son bien conocidos en las cruzas de esta prueba.

IV. HIPOTESIS

El brócoli ha sido reportado como antígenotóxico a través de la inhibición de enzimas de la Fase 1 e inducción de enzimas desintoxicantes de la Fase 2 del metabolismo xenobiótico, por lo que se espera que en co-tratamiento crónico con el uretano, provoque la disminución del efecto genotóxico del uretano en la prueba SMART en ala de *Drosophila melanogaster*.

V. OBJETIVO GENERAL

Analizar la interacción del brócoli (*Brassica oleracea*, var. Itálica) orgánicamente cultivado y el promutágeno uretano mediante la prueba SMART en ala de *Drosophila melanogaster* cruza Estándar (E) y Bioactivación elevada (BE).

VI. OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar la CL₅₀ y la CL₂₀ del uretano para las cepas *flare*³ y Oregon *flare*³ de *Drosophila melanogaster*.

Reafirmar el efecto genotóxico del uretano en la prueba SMART en ala de *Drosophila melanogaster*.

Corroborar indirectamente la presencia de la mutación (altos niveles constitutivos de CYPs) de la cepa Oregon-*flare*³ de *Drosophila melanogaster* mediante el incremento de genotoxicidad del promutágeno uretano en la cruza BE de la prueba SMART.

Reconocer el efecto antígenotóxico del brócoli (*Brassica oleracea*, var. Itálica) solo, en la prueba SMART en ala de *Drosophila melanogaster*.

Conocer el comportamiento del brócoli (*Brassica oleracea*, var. Itálica) orgánicamente cultivado en co-tratamiento crónico con el promutágeno uretano en la prueba SMART en ala de *Drosophila melanogaster*.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

- Uretano $\text{NH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ (Fluka 94300) CAS. 51-79-6.
- Medio de cultivo instantáneo (Carolina Biological Supply Co. Burlington N.C. USA).
- Brócoli (*Brassica oleracea* var. Itálica) orgánicamente cultivado, donado por la empresa MarBran (Irapuato, Guanajuato) (Anexo 1).
- Cepas de *Drosophila melanogaster*: Oregon-*flare*³ (ORR(1);ORR(2);*flr*³/TM3,Bd^s), *flare*³ (*flr*³/TM3,Bd^s) y *mwh* (*mwh/mwh*) del Laboratorio de Genética Toxicológica de la FES-Iztacala, UNAM., donadas originalmente por el Dr. U. Graf del Instituto de Toxicología (Swiss Federal Institute of Technology) y de la Universidad de Zurich, Schwerzenbach, Suiza.

MÉTODOS

CULTIVO Y PROPAGACIÓN DE CEPAS DE *Drosophila melanogaster*

Las cepas Oregon-*flare*³, *flare*³ y *mwh* se cultivaron y se propagaron en frascos de vidrio de 250 ml con 5 g de hojuela de papa y 20 ml de solución conservadora (5 ml de tegosept al 12% (OH) y 5 ml de ácido propionico, aforados a 1 litro de agua) (Dueñas *et al.*, 2001) en una incubadora a 25 °C, humedad relativa de 65 % y total oscuridad.

PRUEBA DE TOXICIDAD (CL₅₀) DEL URETANO EN LAS CEPAS DE *D. melanogaster*

Para realizar la prueba de genotoxicidad SMART se debe llevar acabo una prueba de toxicidad previa con el modelo biológico utilizado para encontrar la concentración letal media (CL₅₀) del compuesto que el modelo tolera (Rodríguez-Arnáiz y Ramos, 1992; Radeleff, 1967). Se determinó el efecto tóxico (CL₅₀) del uretano sobre las cepas Oregon-*flare*³ y *flare*³ colocando larvas de tercer estadio en tubos con 0.5 g de medio Instantáneo Carolina y 2 ml de uretano a las concentraciones: 0 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM y 40 mM. Se realizaron 3 experimentos independientes con 5 réplicas por concentración colocando 10 larvas por tubo. Las larvas tratadas permanecieron en los tubos en la

incubadora hasta que emergieron los imagos. Las moscas sobrevivientes fueron colocadas en alcohol al 70 % y se cuantifico la mortalidad de 0 a 100 % (Dueñas *et al.*, 2005).

LIOFILIZACIÓN DEL BRÓCOLI ORGÁNICAMENTE CULTIVADO

El brócoli orgánicamente cultivado (BOC) libre de pesticidas se congeló después de su cosecha y se liofilizó por un periodo de 24 h a -50 °C utilizando una liofilizadora LABCONCO, Freeze Dry System Lock 4.5. Posteriormente se pulverizó para los experimentos.

PRUEBA DE GENOTOXICIDAD (SMART)

CRUZAS ESTÁNDAR (E) Y BIOACTIVACIÓN ELEVADA (BE)

Se separaron hembras vírgenes de las cepas Oregon-*flare*³ y *flare*³ y machos de la cepa *mwh*, esto se realizó basándose en el dimorfismo sexual, ya que en los machos se presenta un peine sexual, que es un grupo de 10 cerdas gruesas que se encuentran en la superficie distal del segmento tarsal basal de la pata anterior. Además, se observan las diferencias en la estructura externa de los genitales y se considera la fusión de los últimos segmentos abdominales en el macho, lo cual le da un color negro característico al final del abdomen (Figura 18) (Rodríguez-Arnaiz y Ramos, 1992).

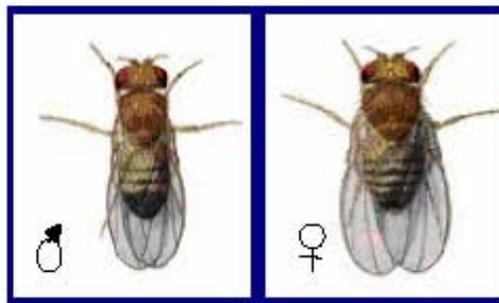


Figura 18. Dimorfismo sexual en *D. melanogaster*: macho  hembra 
(tomado de www.gen.cam.ac.uk/Images/ashburner/maflies.jpg).

La cruce E se realizó con hembras vírgenes *flare*³ y machos *mwh* y la cruce de BE con hembras vírgenes Oregon-*flare*³ y machos *mwh*, ambas cruces se mantuvieron en frascos con hojuela de papa por tres días. Al término de este tiempo las moscas se trasvasaron a frascos con levadura fresca activa suplementada con sacarosa para la colecta de huevos, durante 8 h a 25 °C, 65 % de humedad y total

oscuridad. Posteriormente los padres fueron retirados y los frascos con la colecta de huevos regresaron a la incubadora. A las 72 ± 4 h se recuperaron las larvas diluyendo el medio de levadura en agua corriente a temperatura ambiente usando una coladera de malla fina de acero inoxidable.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se realizaron 3 experimentos independientes con 5 repeticiones por tratamiento colocando aproximadamente la misma cantidad de larvas de 72 ± 4 h en tubos de ensayo con diferentes proporciones de medio instantáneo, brócoli orgánico liofilizado, agua desionizada y uretano (20 mM) Cuadro 2.

Cuadro 2. Composición de los medios utilizados en cada tratamiento.

Tratamiento.	Solución (2 ml).	Medio instantáneo (g).	Brócoli orgánico liofilizado (g).
Testigo Agua	Agua	0.5	-
Testigo Brócoli	Agua	-	0.5
Testigo Uretano (20 mM)	Uretano (20 mM)	0.5	-
Co-Tratamiento 25%	Uretano (20 mM)	0.375	0.125
Co-Tratamiento 50%	Uretano (20 mM)	0.25	0.25
Co-Tratamiento 100%	Uretano (20 mM)	-	0.5

Las larvas tratadas permanecieron en la incubadora a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 65 % de humedad hasta que emergieron como imagos. Estos se colocaron en frascos con alcohol al 70 %. Se separaron las moscas con las alas de fenotipo silvestre (que corresponde a las trans-heterocigotas) para disectarlas y montarlas en preparaciones permanentes con solución de Faure (goma arábica 30 g, glicerol 20 ml, hidrato de cloral 50 g, agua 50 ml). Se analizaron las superficies dorsal y ventral de las alas al microscopio óptico (40X)

para detectar las manchas pequeñas, grandes y gemelas (Graf *et al.*, 1984). La lectura se realizó bajo estricta clave para evitar prejuicios.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se analizaron 60 individuos por tratamiento (tamaño de muestra óptimo para la prueba) (Frei y Würgler, 1995) con el programa estadístico SMART PC-versión 2.1 (Frei y Würgler, 1988) que analiza estadísticamente los resultados de SMART en ala detectando las diferencias que puedan existir entre los valores espontáneos entre un testigo y las series de tratamientos experimentales. Este análisis está basado en la prueba no paramétrica de ji cuadrada para proporciones. En ésta, el efecto genotóxico es diagnosticado porque la frecuencia de manchas verdadera de los tratamientos es al menos, el doble de la frecuencia obtenida en los testigos negativos. Esta frecuencia es $m = 2$ para manchas pequeñas y totales y $m = 5$ para manchas grandes y gemelas.

Con esta prueba se tiene la probabilidad de definir un riesgo genotóxico mínimo inaceptable. Si se puede excluir este riesgo con una significancia estadística, entonces los resultados son negativos. Si la muestra no es lo suficientemente grande, los datos pueden ser insuficientes y el resultado es no concluyente; es decir, que en los casos no concluyentes no se puede excluir la hipótesis nula pero tampoco la alterna. Los resultados con esta prueba tienen cuatro categorías: positivos, negativos, débiles positivos y no concluyentes. Para evitar los resultados no concluyentes en al menos 95 % de los casos se recomienda revisar como mínimo 110 alas por tratamiento (Frei y Würgler, 1995).

HIPOTESIS

- 1) Nula: la frecuencia de mutación (inducida + espontánea) de las moscas tratadas no es mayor que la frecuencia de mutación espontánea del control.
- 2) Alterna: la frecuencia de mutación (inducida + espontánea) de las moscas tratadas no es menor que la frecuencia de mutación espontánea del control.

Cada hipótesis fue probada al 5% de significancia. En base a estas hipótesis pueden ser posibles las siguientes decisiones:

- 1) Aceptar ambas hipótesis: resultado inconcluso.
- 2) Aceptar la primera hipótesis y rechazar la segunda: resultado negativo.
- 3) Rechazar la primera hipótesis y aceptar la segunda: resultado positivo.

- 4) Rechazar ambas hipótesis: efecto débil (Graf *et al.*, 1984).

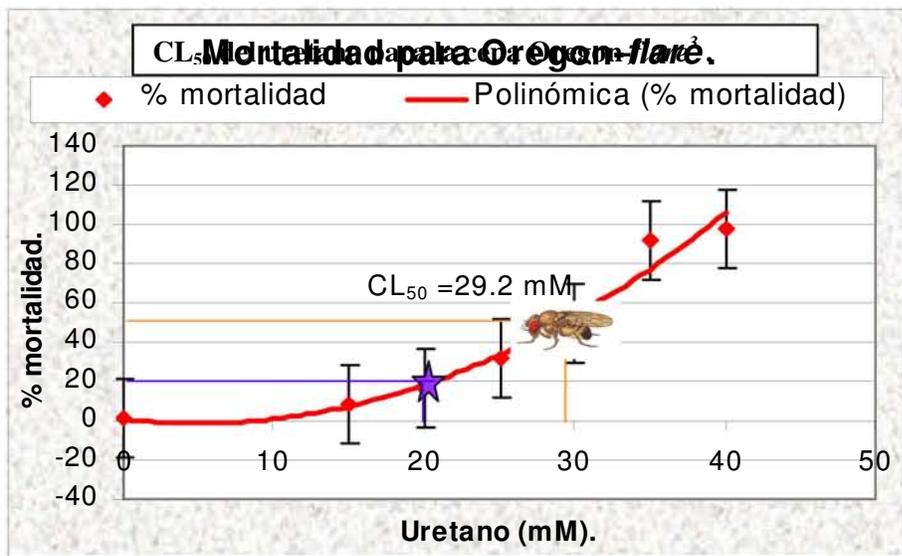
A los resultados no concluyentes obtenidos con SMART se les realizó la prueba de U de Mann-Whitney y Wilcoxon, que considera la variabilidad entre los individuos y no requiere una distribución normal de los datos (prueba no paramétrica) con modificaciones para dos colas para datos individuales usando el programa estadístico STAT Graphics versión 6.0.

Esta prueba se usa cuando no se puede definir el riesgo genotóxico mínimo inaceptable basándose en la frecuencia de las manchas en los testigos negativos; por lo tanto sólo se compararán los datos contra la hipótesis nula. Los resultados son no significativos o significativos. La ausencia de significancia nos dice que uno no puede concluir que el tratamiento produjo daño genotóxico, sin embargo no se puede eliminar completamente esta posibilidad, por lo tanto es lo mismo que un resultado no concluyente. Los resultados significativos nos permiten concluir con certeza que los resultados son positivos (Frei y Würigler, 1995).

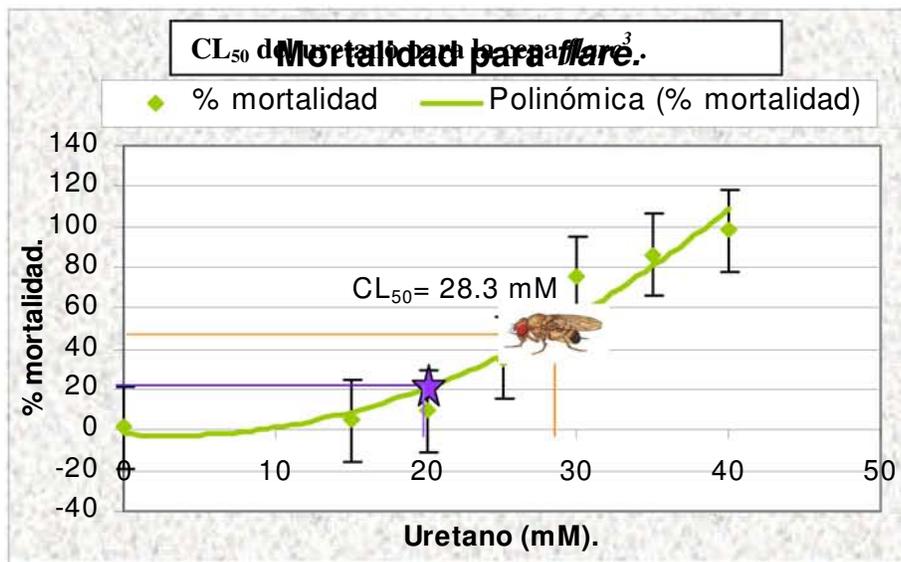
VIII. RESULTADOS

PRUEBA DE TOXICIDAD (CL₅₀)

Los resultados mostraron que la concentración letal media (CL₅₀) del uretano fue: 29.2 mM para Oregon-flare³ (Gráfica 1) y 28.3 mM para flare³ (Gráfica 2) (Dueñas *et al.*, 2005). También se calculó la CL₂₀, concentración subtoxica que permitirá obtener 80% de sobrevivencia que se recomienda generalmente para realizar la prueba de genotoxicidad SMART, esta concentración fue de 20 mM para ambas cepas. A pesar de ser la primera vez que se calcula la CL₂₀ para el uretano en *D. melanogaster*, el valor de 20 mM concuerda con otros trabajos previos realizados con la prueba SMART, donde se ha usado esta concentración y por encima de la cual hay toxicidad aguda (Heres y Pulido, 2001; Graf *et al.*, 1998, Frölich y Würigler, 1990).



Gráfica 1. Regresión polinómica del uretano para la cepa Oregon-flare³, se indica la CL₅₀= 29.2 mM y la CL₂₀= 20 mM



Gráfica 2. Regresión polinómica del uretano para la cepa *flare*³, se indica la CL₅₀ = 28.3 mM y la CL₂₀ = 20 mM.

PRUEBA SMART

CRUZA ESTÁNDAR (E)

En el Cuadro 3 y Gráfica 3 se muestran los resultados del estadístico χ^2 de la prueba SMART para PC (Frei y Würigler, 1988) comparando las frecuencias y el número de manchas por individuo en cada uno de los co-tratamientos y testigos.

Cuadro 3. Resumen de resultados SMART para la cruza E y su diagnóstico estadístico*.

(a) Testigo agua vs Testigo brócoli y Testigo uretano. (b) Testigo uretano vs Co-tratamientos 25, 50 y 100%.

(a)

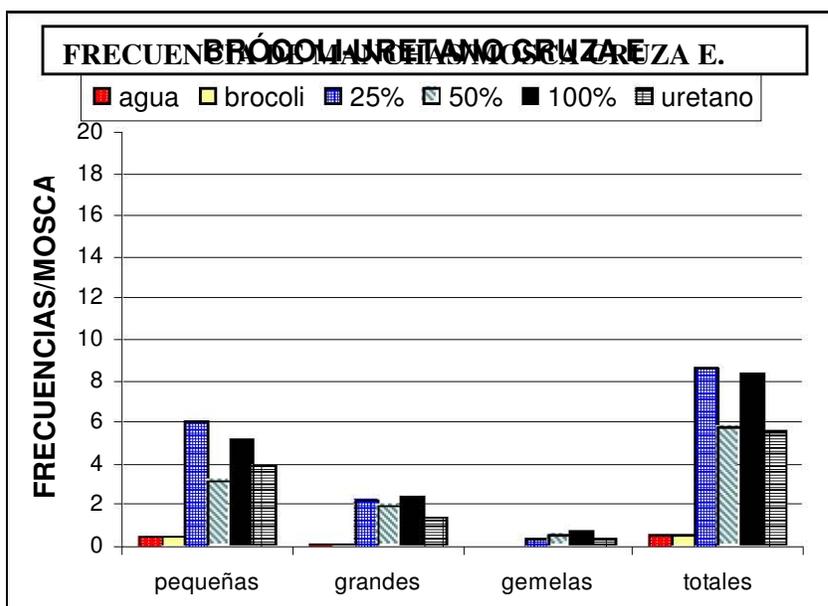
Tratamientos	Nº de ind´s.	Manchas pequeñas (1-2 células) m = 2.00	Manchas grandes (> 2 células) m = 5.00	Manchas gemelas m = 5.00	Manchas totales M = 2.00
Testigo Agua	669 **	0.49 (325)	0.09 (59)	0.02 (13)	0.59 (397)
Testigo brócoli	120 **	0.42 (50) -	0.08 (10) -	0.02 (2) -	0.52 (62) -
Testigo Uretano (20 mM)	60	3.88 (233) +	1.35 (81) +	0.33 (20) +	5.57 (334) +

(b)

Tratamientos	Nº de ind´s.	Manchas pequeñas (1-2 células) m = 2.00	Manchas grandes (> 2 células) m = 5.00	Manchas gemelas m = 5.00	Manchas totales M = 2.00
Testigo uretano (20 mM)	60	3.88 (233)	1.35 (81)	0.33 (20)	5.57 (334)
Co-trat.25%	60	5.98 (359) w	2.20 (132) w	0.38 (23) -	8.57 (514) w
Co-trat.50%	60	3.13 (188) -	1.97 (118) w	0.60 (36) w	5.70 (342) -
Co-trat.100%	60	5.22 (313) w	2.42 (145) w	0.72 (43) w	8.35 (501) w

* *Diagnostico estadístico de acuerdo a Frei y Würigler (1988). Prueba estadística de una cola. m = factores de multiplicación. Resultados: +, positivo; w, débil positivo; -, negativo. Nivel de probabilidad $\beta = 0.05$.*

** *Testigos históricos para la cruza E del Laboratorio de Genética Toxicológica. FES-IZTACALA, UNAM.*



Gráfica 3. Frecuencias de los diferentes tipos de manchas/ individuo para los Testigos: agua, brócoli, uretano y los co-tratamientos brócoli-uretano: 25%, 50% y 100% (cruza E).

En el Cuadro 3 (a) y Gráfica 3 se muestra la comparación del testigo histórico agua y el testigo histórico brócoli del Laboratorio de Genética Toxicológica, obteniéndose resultados negativos (-) para todos los tipos de manchas, lo que determina que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre estos testigos. Este resultado indica que el brócoli no provocó ningún incremento en la tasa de mutación espontánea. Comparando al testigo agua contra el testigo uretano se obtuvieron resultados positivos (+) en todos los tipos de manchas para el control uretano, principalmente de manchas pequeñas, lo que indica el aumento estadísticamente significativo en la tasa de mutación inducida por el uretano

En el Cuadro 3 (b) y Gráfica 3 se compara el testigo uretano contra los co-tratamientos 25, 50 y 100%. Se encontraron resultados débiles positivos (w) en todos los co-tratamientos y en todos los tipos de manchas, con excepción de las manchas pequeñas y totales para el co-tratamiento 50%, y manchas gemelas para el co-tratamiento 25%.

A los tipos de manchas de los co-tratamientos que presentaron valores (w) se les realizó la prueba de U de Mann-Whitney y Wilcoxon, arrojando resultados no significativos (Anexo 2), lo que muestra que ninguno de los co-tratamientos presenta un incremento significativo de la genotoxicidad con respecto al uretano.

Debido a que las frecuencias de manchas del brócoli mostraron una *tendencia* a ser menores a las del testigo agua (Cuadro 3 (a) y Gráfica 3) se corrió el programa SMART de forma inversa usando el testigo brócoli como control y el testigo agua como experimental, para detectar si existía reducción significativa de la tasa de mutación espontánea (Cuadro 4).

Cuadro 4. Resumen de resultados SMART inverso para la cruza E y su diagnostico estadístico *.
Testigo brócoli vs Testigo agua.

Tratamientos	Nº de ind's.	Manchas pequeñas (1-2 células) m = 2.00	Manchas grandes (>2 células) m = 5.00	Manchas gemelas m = 5.00	Manchas totales M = 2.00
Testigo brócoli	120**	0.42 (50)	0.08 (10)	0.02 (2)	0.52 (62)
Testigo Agua	669**	0.49 (325) -	0.09 (59) -	0.02 (13) i	0.59 (397) -

* *Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Würzler (1988). Prueba estadística de una cola. m = factores de multiplicación. Resultados: -, negativo; i, indeciso. Nivel de probabilidad $\beta= 0.05$.*

** *Testigos históricos para la cruza E del Laboratorio de Genética Toxicológica. FES-IZTACALA, UNAM.*

Los resultados del Cuadro 4 muestran que el testigo agua no presenta un aumento estadísticamente significativo de la frecuencia de manchas con respecto al testigo brócoli, indicando que en lo general éste no provocó una reducción significativa de la tasa de mutación espontánea para esta cruza y en este sistema de prueba. Sin embargo, se obtuvo un resultado (i) en las manchas gemelas, por lo que se realizó la prueba de U de Mann-Whitney y Wilcoxon, que arrojó un resultado no significativo.

Para saber si existían reducciones significativas de las frecuencias de los co-tratamientos con respecto al uretano se corrió el programa SMART de forma inversa para los co-tratamientos con respecto al testigo uretano, usando como control a cada co-tratamiento y al testigo uretano como un experimental (Cuadro 5).

Cuadro 5. Resumen de resultados SMART inverso para la cruz E y su diagnóstico estadístico *
(a) Co-tratamiento 25%, (b) Co-tratamiento 50% y (c) Co-tratamiento 100% vs Testigo uretano.

(a)

Tratamientos	Nº de ind's.	Manchas pequeñas (1-2 células) m = 2.00	Manchas grandes (>2 células) m = 5.00	Manchas gemelas m = 5.00	Manchas totales M = 2.00
Co-trat. 25%	60	5.98 (359)	2.20 (132)	0.38 (23)	8.57 (514)
Testigo uretano (20 mM)	60	3.88 (233) -	1.35 (81) -	0.33 (20) -	5.57 (334) -

(b)

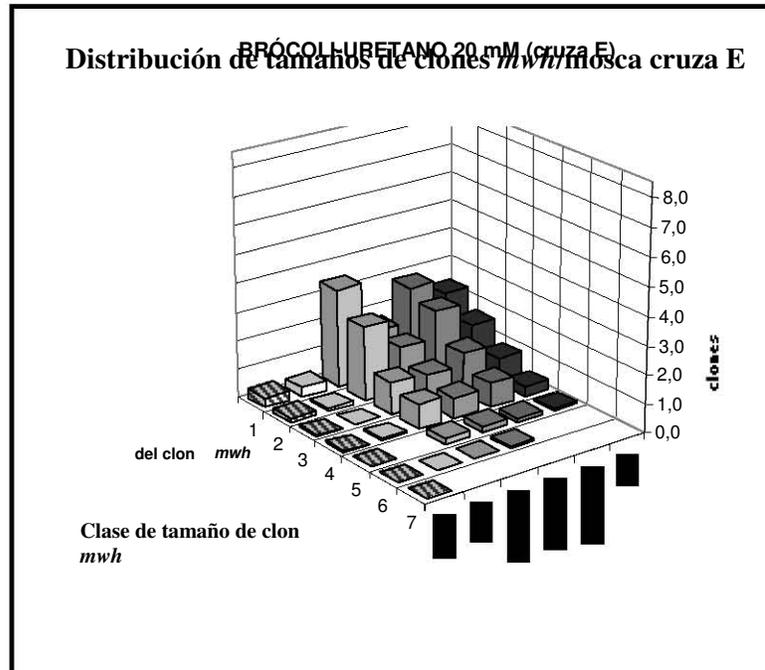
Tratamientos	Nº de ind's.	Manchas pequeñas (1-2 células) m = 2.00	Manchas grandes (>2 células) m = 5.00	Manchas gemelas m = 5.00	Manchas totales M = 2.00
Co-trat. 50%	60	3.13 (188)	1.97 (118)	0.60 (36)	5.70 (342)
Testigo uretano (20 mM)	60	3.88 (233) -	1.35 (81) -	0.33 (20) -	5.57 (334) -

(c)

Tratamientos	Nº de ind's.	Manchas pequeñas (1-2 células) m = 2.00	Manchas grandes (>2 células) m = 5.00	Manchas gemelas m = 5.00	Manchas totales M = 2.00
Co-trat. 100%	60	5.22 (313)	2.42 (145)	0.72 (43)	8.35 (501)
Testigo uretano (20 mM)	60	3.88 (233) -	1.35 (81) -	0.33 (20) -	5.57 (334) -

* Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Würzler (1988). Prueba estadística de una cola. m = factores de multiplicación. Resultado: -, negativo. Nivel de probabilidad $\beta = 0.05$.

Los resultados del Cuadro 5 indican que el uretano no provocó aumento estadísticamente significativo en la frecuencia de ningún de los tipos de manchas y que ningún co-tratamiento redujo de manera significativa la tasa de mutación inducida por el uretano.



*Gráfica 4. Distribución de tamaños de clones *mwh* por individuo (cruza E).*

Los tamaños de clones representan el número de divisiones que ocurrieron en las células somáticas mutantes [1(1), 2(2), 3(3-4), 4(5-8), 5(9-16), 6(17-32) 7(33-64)] del disco imagal del ala.

En la Gráfica 4 se muestra la distribución de tamaños de clones *mwh* por individuo para cada testigo y co-tratamiento de la cruza E. Se observa que el brócoli no disminuyó la tasa de mutación espontánea, el claro efecto genotóxico del uretano con respecto al testigo agua y brócoli y que ningún co-tratamiento provocó aumento o disminución significativa de la genotoxicidad inducida por el uretano.

CRUZA BIOACTIVACIÓN ELEVADA (BE)

El Cuadro 6 y Gráfica 5 muestran los resultados del estadístico χ^2 de la prueba SMART para PC (Frei y Würgler, 1988) comparando las frecuencias y el número de manchas por individuo en cada uno de los co-tratamientos y testigos.

Cuadro 6. Resumen de resultados SMART para la cruz a BE y su diagnóstico estadístico *.

(a) Testigo agua vs Testigo brócoli y Testigo uretano. (b) Testigo uretano vs Co-tratamientos 25, 50 y 100%.

(a)

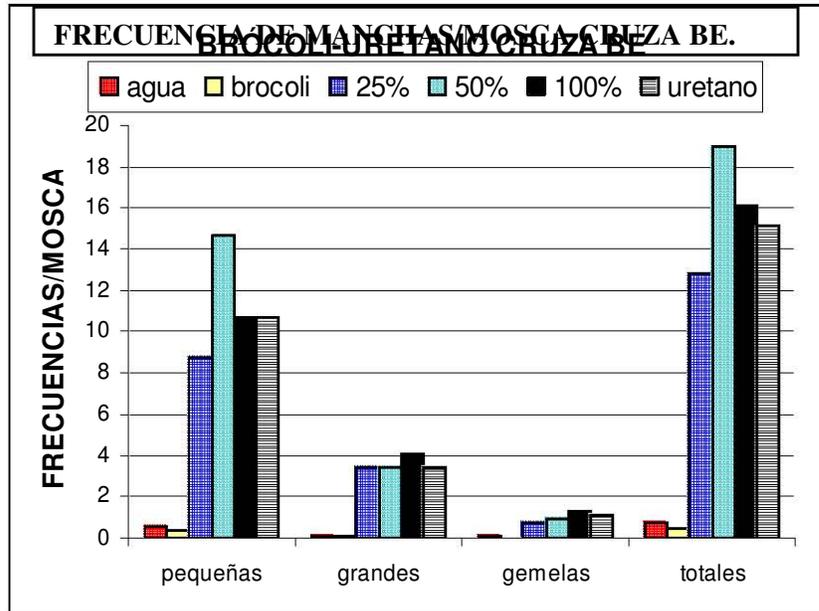
Tratamientos	Nº de ind's.	Manchas pequeñas (1-2 células) m = 2.00	Manchas grandes (> 2 células) m = 5.00	Manchas gemelas m = 5.00	Manchas totales M = 2.00
Testigo agua	864**	0.53 (460)	0.12 (105)	0.05 (40)	0.70 (605)
Testigo brócoli	120**	0.40 (48)-	0.07 (8)-	0.00 (0)-	0.47 (56)-
Testigo uretano (20 mM)	60	10.65 (639)+	3.42 (205)+	1.07 (64)+	15.13 (908)+

(b)

Tratamientos	Nº de ind's.	Manchas pequeñas (1-2 células) m = 2.00	Manchas grandes (> 2 células) m = 5.00	Manchas gemelas m = 5.00	Manchas totales M = 2.00
Testigo uretano (20 mM)	60	10.65 (639)	3.42 (205)	1.07 (64)	15.13 (908)
Co-trat.25%	60	8.75 (525)-	3.40 (204)-	0.70 (42)-	12.85 (771)-
Co-trat.50%	60	14.68 (881)w	3.38 (203)-	0.88 (53)-	18.95 (1137)w
Co-trat.100%	60	10.70 (642)-	4.07 (244)-	1.33 (80)-	16.10 (966)-

* Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Würzler (1988). Prueba estadística de una cola. m = factores de multiplicación. Resultados: +, positivo; w, débil positivo; -, negativo. Nivel de probabilidad $\beta = 0.05$.

** Testigos históricos para la cruz a BE del Laboratorio de Genética Toxicológica. FES-IZTACALA, UNAM.



Gráfica 5. Frecuencias de los diferentes tipos de manchas/ individuo para los testigos: agua, brócoli, uretano; y los co-tratamientos brócoli-uretano: 25%, 50% y 100% (cruza BE).

En el Cuadro 6 (a) y Gráfica 5 se comparan el testigo histórico agua y el testigo histórico brócoli obteniéndose resultados negativos (-) para todos los tipos de manchas, lo que señala que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre estos testigos. Este resultado indica que el brócoli no provocó ningún incremento en la tasa de mutación espontánea. Comparando el testigo agua contra el testigo uretano se obtuvieron resultados positivos (+) en todos los tipos de manchas para el testigo uretano, principalmente de manchas pequeñas. Este resultado indica el aumento estadísticamente significativo en la tasa de mutación inducida por el promutageno uretano.

En el Cuadro 6 (b) y Gráfica 5 se compara el testigo uretano con los co-tratamientos 25, 50 y 100%. Se encontraron resultados débiles positivos (w) en el co-tratamiento 50% para las manchas pequeñas y totales. Por tanto, se realizó la prueba de U de Mann-Whitney y Wilcoxon arrojando resultados no significativos (Anexo2), lo que indica que ninguna de las frecuencias de manchas presenta un incremento significativo de la tasa de mutación con respecto a la provocada por el uretano.

Debido a que las frecuencias de manchas del brócoli mostraron una *tendencia* a ser menores a las del agua (Cuadro 6 (a) y Gráfica 5) se corrió el programa SMART de forma inversa, para detectar si existían reducciones significativas de las mutaciones espontáneas (Cuadro 7), esto se realizó usando el testigo brócoli como control y el testigo agua como experimental.

Cuadro 7. Resumen de resultados SMART inverso para la cruza BE y su diagnóstico estadístico *.
Testigo brócoli vs testigo agua.

Tratamientos	Nº de ind's.	Manchas pequeñas (1-2 células) m = 2.00	Manchas grandes (>2 células) m = 5.00	Manchas gemelas m = 5.00	Manchas totales M = 2.00
Testigo brócoli	120**	0.40 (48)	0.07 (8)	0.00 (0)	0.47 (56)
Testigo agua	864**	0.53 (460)-	0.12 (105)-	0.05 (40)+	0.70 (605)+

* *Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Würzler (1988). Prueba estadística de una cola. m = factores de multiplicación. Resultados: +, positivo; -, negativo. Nivel de probabilidad $\beta = 0.05$.*

** *Testigos históricos para la cruza BE del Laboratorio de Genética Toxicológica. FES-IZTACALA, UNAM.*

Los resultados del cuadro 7 muestran que el testigo agua sólo presenta un aumento estadísticamente significativo en las frecuencias de manchas gemelas que se reflejan en las totales, con respecto al testigo brócoli. Lo anterior indica que el brócoli presentó efecto anti-recombinogénico para la cruza BE en este sistema de prueba.

Para saber si existían reducciones significativas de las frecuencias de los co-tratamientos con respecto al uretano se corrió el programa SMART de forma inversa para los co-tratamientos con respecto al testigo uretano, usando como control a cada co-tratamiento y al testigo uretano como un experimental (Cuadro 8).

Cuadro 8. Resumen de resultados SMART inverso para la cruza BE y su diagnóstico estadístico *.
(a) Co-tratamiento 25%, (b) Co-tratamiento 50% y (c) Co-tratamiento 100% vs Testigo uretano.

(a)

Tratamientos	Nº de ind's.	Manchas pequeñas (1-2 células) m = 2.00	Manchas grandes (>2 células) m = 5.00	Manchas gemelas m = 5.00	Manchas totales M = 2.00
Co-trat. 25%	60	8.75 (525)	3.40 (204)	0.70 (42)	12.85 (771)
Testigo uretano (20 mM)	60	10.65 (639)-	3.42 (205)-	1.07 (64)w	15.13 (908)-

(b)

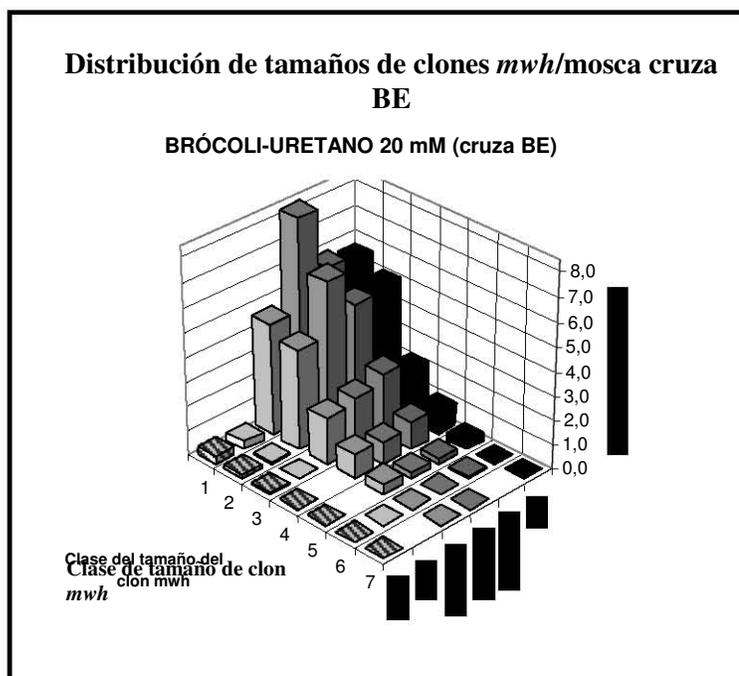
Tratamientos	Nº de ind's.	Manchas pequeñas (1-2 células) m = 2.00	Manchas grandes (>2 células) m = 5.00	Manchas gemelas m = 5.00	Manchas totales M = 2.00
Co-trat. 50%	60	14.68 (881)	3.38 (203)	0.88 (53)	18.95 (1137)
Testigo uretano (20 mM)	60	10.65 (639)-	3.42 (205)-	1.07 (64)-	15.13 (908)-

(c)

Tratamientos	Nº de ind's.	Manchas pequeñas (1-2 células) m = 2.00	Manchas grandes (>2 células) m = 5.00	Manchas gemelas m = 5.00	Manchas totales M = 2.00
Co-trat. 100%	60	10.70 (642)	4.07 (244)	1.33 (80)	16.10 (966)
Testigo uretano (20 mM)	60	10.65 (639)-	3.42 (205)-	1.07 (64)-	15.13 (908)-

* *Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Würzler (1988). Prueba estadística de una cola. m = factores de multiplicación. Resultados: w, débil positivo; -, negativo. Nivel de probabilidad $\beta = 0.05$.*

Los resultados del Cuadro 8 muestran un resultado (w) para el uretano con respecto al co-tratamiento 25%, por lo cual se realizó la prueba de U de Mann-Whitney y Wilcoxon arrojando resultados no significativos, lo que indica que el testigo uretano no presenta aumento estadísticamente significativo de la frecuencia en ningún de los tipos de manchas; ésto permite concluir que ningún co-tratamiento redujo de manera significativa la tasa de mutación inducida por el uretano.



Gráfica 6 . Distribución de tamaños de clones *mwh* por individuo (cruza BE).

Los tamaños de clones representan el número de divisiones que ocurrieron en las células somáticas mutantes [1(1), 2(2), 3(3-4), 4(5-8), 5(9-16), 6(17-32) 7(33-64)] del disco imagal del ala.

En la Gráfica 6 se muestra la distribución de tamaños de clones *mwh* por individuo para cada testigo y co-tratamiento de la cruza BE. Se observa que el brócoli no disminuyó la tasa de genotoxicidad espontánea, el claro efecto genotóxico del uretano con respecto al testigo agua y el testigo brócoli y que ningún co-tratamiento muestra aumento o disminución significativa de la genotoxicidad inducida por el uretano.

Cuadro 9. Resumen de los resultados SMART para el testigo uretano de la cruza E vs. BE y su diagnóstico estadístico*.

Tratamientos	Nº de ind's.	Manchas pequeñas (1-2 células) m = 2.00	Manchas grandes (>2 células) m = 5.00	Manchas gemelas m = 5.00	Manchas totales m = 2.00
Testigo uretano (20 mM) cruza E	60	3.88 (233)	1.35 (81)	0.33 (20)	5.57 (334)
Testigo Uretano (20 mM) Cruza BE	60	10.65 (639) +	3.42 (205) +	1.07 (64) +	15.13 (908) +

* Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Würgler (1988). Prueba estadística de una cola. m = factores de multiplicación. Resultado: + positivo. Nivel de probabilidad $\beta= 0.05$.

En el Cuadro 9 se muestran los resultados del SMART para la comparación del testigo uretano de la cruza E y el de la cruza BE; los resultados indican que sí existen diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias de manchas de cada una de las cruza, así que hubo aumento estadísticamente significativo de la genotoxicidad del uretano en la cruza BE, lo que demuestra su fuerte dependencia sobre la activación metabólica por parte de los CYPs. Además, confirma la propiedad promutagénica del uretano y permite comprobar que las cepas utilizadas poseen los marcadores genéticos relacionados con la expresión regulada o constitutiva de los CYPs.

IX. DISCUSIÓN

En este trabajo el tratamiento crónico a larvas de 72 ± 4 h con uretano 20 (mM) produjo un aumento estadísticamente significativo de la genotoxicidad con respecto a los testigos agua y brócoli. Estos resultados demuestran el claro efecto genotóxico del uretano sobre *D. melanogaster* y concuerdan con lo reportado por Graf *et al.*, (1998) y Frölich y Würigler (1990). Además se observó que el efecto genotóxico del promutágeno uretano fue estadísticamente mayor en la cruce BE, lo que demuestra su fuerte dependencia sobre la activación metabólica por parte de los CYPs como lo había descrito Frölich y Würigler (1990) y permite comprobar que las cepas utilizadas poseen los marcadores genéticos en buen estado.

Durante las últimas dos décadas se ha puesto énfasis en el consumo de frutas y vegetales como parte de la dieta ya que algunos estudios han señalado su efecto preventivo del cáncer. Los trabajos más recientes han estado enfocados principalmente en el estudio de las propiedades quimiopreventivas de los glucosinolatos, presentes principalmente en vegetales del género *Brassica*: brócoli, col, coles de Bruselas, entre otras, los cuales inducen enzimas de desintoxicación de la Fase 2 e inhiben enzimas de la Fase 1 del metabolismo xenobiótico (Zhu y Loft, 2003; Sorensen *et al.*, 2001; Fahey *et al.*, 2001, 1997; London *et al.*, 2000; Abraham *et al.*, 1998; Nestlé, 1997; Verhoeven *et al.*, 1997).

Por el contrario, algunos reportes disponibles indican que algunos de estos compuestos poseen propiedades genotóxicas/ cancerígenas (Sorensen *et al.*, 2001; Steinkellner *et al.*, 2001; Fahey *et al.*, 2001, 1997; Kassie y Knasmüller, 2000; He *et al.*, 2000; Tiedink *et al.*, 1988; Nestlé, 1997).

El presente estudio se realizó para aportar datos que pudieran aclarar la controversia que existe sobre la alimentación frecuente con la mezcla compleja brócoli como una estrategia antígenotóxica y/o anticancerígena. Se demostró que, en la cruce E de la prueba SMART en ala de *D. melanogaster*, el brócoli orgánicamente crecido (BOC) no provocó aumento o disminución de la tasa de mutación espontánea. Por otra parte, en la cruce BE se observaron reducciones estadísticamente significativas en las frecuencias de manchas gemelas y totales, lo que concuerda con lo reportado por López (2004) quien para la cruce BE utilizó brócoli obtenido en un supermercado, encontrando reducciones estadísticamente significativas de las frecuencias de mutaciones espontáneas para todos los tipos de manchas. La diferencia en la disminución de manchas pequeñas y grandes con el brócoli de supermercado puede deberse a las diferencias cualitativas y cuantitativas de los glucosinolatos

presentes en ambos tipos de brócoli, tal vez mayores en el BOC, ocasionadas seguramente por las diferencias de maduración, lesiones, regulaciones en el crecimiento por congelamiento y descongelamiento, así como las condiciones de transporte y manejo, ya que de acuerdo con Fahey et al. (2001) y Nestlé (1997) los eventos descritos provocan la degradación de glucosinolatos a isotiocianatos en esta hortaliza, a la venta del público consumidor. Esta aseveración podría ser evaluada mediante el análisis de la composición química de glucosinolatos presentes en el brócoli, mediante un protocolo específico como HPLC que ha sido determinado como el modelo más viable para analizar el contenido de glucosinolatos individuales y también de los productos de su descomposición (Verhoeven *et al.*, 1997).

En varios trabajos se ha demostrado que los jugos crudos del brócoli fueron genotóxicos, por ejemplo en el sistema que evalúa mutaciones puntuales en *Salmonella* TA98 y TA100, inhibieron la reparación del daño en *E.coli* K-12 y tuvieron efectos clastogénicos en células de mamífero (aberraciones cromosómicas e ICH). Un 70-80% de la actividad genotóxica de esos jugos se debió a las fracciones que contienen isotiocianatos u otros productos de los glucosinolatos (Kassie *et al.*, 1996). Otros estudios han demostrado que alil-isotiocianato (AITC) tiene efecto mutagénico en *S. typhimurium* TA100 y en células de papiloma en vejiga urinaria de ratas machos F344 (Kassie y Knasmüller., 2000), fenil-isotiocianato (PEITC) induce aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas (Musk *et al.*, 1995) y el glucosinolato glucorafanin (GRP) puede activar la Fase I y generar ROS, como se ha demostrado en microsomas del pulmón de rata, o bien, facilita la activación metabólica del benzo[a]pireno a la forma cancerígena, en levaduras. Por lo anterior se sugiere que la administración regular de GRP y de los vegetales que contienen ITCs podrían aumentar el riesgo de cáncer (Paolini *et al.*, 2004). De esta manera aunque algunos ITCs como el sulforafano presentes en la mezcla compleja brócoli tengan propiedades antígenotóxicas, la presencia de ITCs genotóxicos pudieron haber enmascarado el potencial efecto quimioprotector reportado (Fahey y Talalay, 1999). Esto habla del problema que implica trabajar con mezclas complejas, y no con sólo uno de los componentes (Nestlé, 1997).

En este trabajo los co-tratamientos brócoli-uretano no mostraron aumento o disminución estadísticamente significativa de la genotoxicidad inducida por el uretano. Para explicar estos resultados se propone el mapa metabólico (Figura 19) elaborado con base en los reportes disponibles sobre el estudio de glucosinolatos e isotiocianatos.

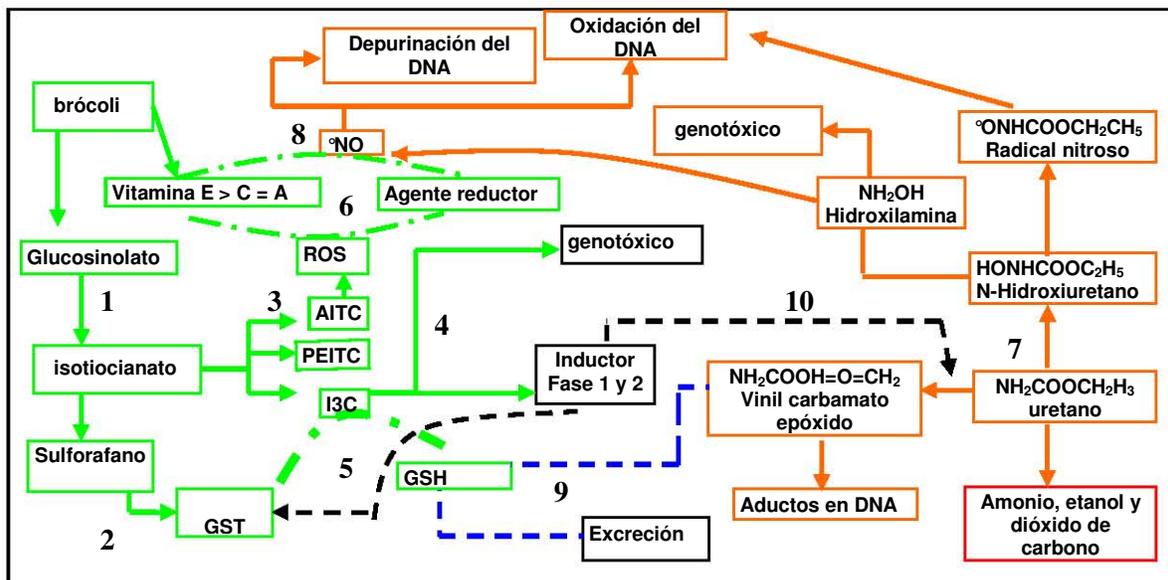


Figura 19. Mapa metabólico de la interacción brócoli-uretano elaborado con la información de distintas fuentes (ver descripción abajo).

(1) En el brócoli se encuentran 2 grupos importantes de fitoquímicos reportados como preventivos del cáncer: glucosinolatos y vitaminas. Los glucosinolatos predominantes en el brócoli son: glucorafanin, gluconasturtiin, sinigrin y glucobrassicin, que son precursores del sulforafano, fenil-isotiocianato (PEITC), alil-isotiocianato (AITC) e indol 3-carbinol (I3C) respectivamente (Fahey *et al.*, 2001). Mientras que las vitaminas predominantes son: α -tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C) y β -caroteno (vitamina A) (Verhoeven *et al.*, 1997 y Nestlé, 1997).

(2) El sulforafano ha sido reconocido como el isotiocianato mas predominante en el brócoli, es reportado por Fahey *et al.* (2001), Fahey y Talalay (1999), Kempler *et al.* (1995) y Zhan *et al.* (1995) como el principal inductor de enzimas de desintoxicación de la Fase 2 del metabolismo xenobiótico, principalmente glutatión S-transferasa (GST), que promueve el incremento del GSH.

(3) Los isotiocianatos PEITC y AITC han sido reportados como genotóxicos en pruebas con *Salmonella*, *E. coli* y cultivo de células de rata, mediante la producción de especies reactivas del oxígeno (Kassie y Knasmüller, 2000 y Musk *et al.*, 1995).

(4) El I3C ha sido reportado como uno de los inductores de enzimas tanto de la Fase 1 como de la Fase 2 (Sorensen *et al.*, 2001; Verhoenen *et al.*, 1997; Vang *et al.*, 1997 y Park *et al.*, 1996). Pero también el I3C puede condensarse bajo condiciones ácidas (en la larva el pH en la zona de mayor absorción del tracto digestivo va de 3.3 a 3.6 de acuerdo con Hopking, 1989) y formar compuestos parecidos en toxicidad y cancerogenicidad a las dioxinas. Por otra parte, Tiedink *et al.* (1988) encontraron que los índoles podrían reaccionar con nitrilos y formar indol-3-acetonitrilo (I3A), el cual forma compuestos N-nitrosos mutagénicos. Esto puede indicar la participación del I3C no solo como un inductor de enzimas del metabolismo xenobiótico, sino también como compuesto genotóxico.

(5). Los isotiocianatos AITC, PEITC, I3C e incluso el mismo sulforafano pudieron haber sido conjugados con el GSH (principal vía de desintoxicación de los ITCs), ya que como London *et al* (2000) y Zhang *et al* (1995) demostraron, el GSH tiene mayor especificidad por esta conjugación que por cualquier otra; así los niveles de GSH intracelular, aumentados con el sulforafano, pudieron haber disminuido.

(6) Las especies reactivas del oxígeno (ROS) producidas por los isotiocianatos AITC y PEITC o las producidas de forma endógena (ejemplo: peroxidación lipídica, respiración mitocondrial) pudieron haber sido reducidas, según Kassie y Knasmüller (2000) y Nestlé (1997), por las cantidades de vitaminas A, C y E (Anexo 1) que posee el brócoli.

(7) El uretano pudo haber sido metabolizado por 3 diferentes vías (Sakano *et al.*, 2002; Woo Cha *et al.*, 2000; Hübner *et al.*, 1997 y Kempler *et al.*, 1995). En la primera, el uretano pudo ser convertido por esterasas a etanol, amonio y dióxido de carbono que son excretados sin causar daño; en la segunda, el uretano pudo ser convertido por CYPs en vinil carbamato epóxido, que causa daños mediante la formación de aductos en el DNA y, en el tercero el uretano es convertido por los CYPs a N-Hidroxiuretano que puede formar un radical nitroso de forma no enzimática y provocar daños por oxidación al DNA, o puede sufrir una oxidación por CYPs seguido de una descarboxilación por enzimas esterasas, formando hidroxilamina, un compuesto genotóxico (Woo Cha *et al.*, 2000). Además Sakano *et al.* (2002) propone que la hidroxilamina puede llegar a producir óxido nítrico *in vivo* causando daños por oxidación y depurinación al DNA en presencia de cobre, el cual puede ser obtenido de las regiones heterocromáticas de la cromatina.

(8) Las ROS formadas por el uretano tal vez no pudieron ser reducidas por las cantidades de vitaminas presentes en el brócoli, ya que se probablemente se redujeron con las especies reactivas de los isotiocianatos (Nestlé, 1997).

(9) La mayoría de los compuestos que contienen epóxidos, tales como el vinil carbamato epóxido, son eliminados mediante reacciones de conjugación con GSH; sin embargo, la GST posee una mayor especificidad por la conjugación de GSH con isotiocianatos, cuando éstos están presentes, por lo que los metabolitos finales del uretano tal vez no pudieron haber sido desintoxicados por conjugación con GSH (Abraham *et al.*, 1998; Kempler *et al.*, 1995).

(10) Aunado a esto, el I3C ha sido reportado por varios trabajos como uno de los productos más potentes de la hidrólisis de glucosinolatos que induce tanto enzimas de Fase 1 como de la Fase 2, por lo que podría estar involucrado en la activación de promutágenos (Park *et al.*, 1996).

Por todo lo anterior, se plantean la siguiente alternativa para explicar los resultados: Aún cuando el sulforafano induzca enzimas de la fase 2 que desintoxican los metabolitos reactivos del uretano, al usar al brócoli como mezcla compleja esta protección no pudo ser observada debido a los isotiocianatos genotóxicos también presentes en el brócoli y que son desintoxicados por la GSH.

Se observaron pequeñas reducciones o aumentos en los co-tratamientos brócoli-uretano con respecto al uretano, que no fueron estadísticamente significativas, lo que tal vez implique la participación del I3C, que induce tanto enzimas de la fase 1 (biotransformadoras del uretano) como de la fase 2 (desintoxicantes del uretano); sin embargo, este compuesto no pudo reflejar un incremento o reducción significancia de la genotoxicidad del uretano posiblemente debido a que Fahey *et al.*, 2001 reportan que este compuesto se encuentra en concentraciones bajas en el brócoli. Para demostrar esta aseveración se recomienda un análisis con HPLC para reconocer el contenido de glucosinolatos individuales en el brócoli (BOC), así como de sus metabolitos en larvas de tercer estadio de *Drosophila melanogaster*.

X. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

- Se confirmó el efecto del brócoli en la disminución de la tasa de recombinación espontánea de los genes marcadores en SMART en ala de *D. melanogaster* para la cruza BE.
- La ingestión de la mezcla compleja brócoli no demostró una protección contra el uretano (20mM) en esta prueba y bajo estas condiciones experimentales, lo que confirma la conveniencia de no generalizar su uso como anticancerígeno de amplio espectro.
- Se comprueba que siendo el brócoli una mezcla compleja, no es posible interpretar los resultados genotóxicos o extrapolarlos con respecto al efecto de sus componentes aislados y purificados.

RECOMENDACIONES

- Realizar HPLC para identificar y cuantificar los principales compuestos presentes en el brócoli orgánicamente crecido, así como de sus metabolitos en larvas del tercer estadio de *D. melanogaster*.
- Evaluar con la prueba SMART algunos de los principales compuestos puros del brócoli (sulforafano, I3C y vitamina C).

XI. ANEXOS.

ANEXO 1. Nutrientes del BOC (datos proporcionados por la empresa MarBran, Guanajuato, Méx.).

Brócoli. NDB No: 11095 Día: 1/3/2006 9:16. Peso (tamaño de porción): 100.00 g

Origen: USDA National Nutrient Database for Standard Reference.

Nutrientes	unidades	valor	Nutrientes	unidades	valor
Agua	g	90.72	12:0	g	0
Energía	Kcal	28	14:0	g	0
Energía	Kj	117	16:0	g	0.016
Proteínas	g	3.10	18:0	g	0.002
Lípidos totales (grasas)	g	0.11	Ácidos grasos monoinsaturados totales	g	0.008
Ash	g	0.71	16:1 indiferenciados	g	0
Carbohidratos	g	5.35	18:1 indiferenciados	g	0.008
Fibra total en la dieta	g	3.0	20:01	g	0
Azúcares totales	g	1.44	22:1 indiferenciados	g	0.008
Calcio, Ca	mg	51	Ácidos grasos poliinsaturados totales	g	0.055
Hierro, Fe	mg	0.61	18:2 indiferenciados	g	0.013
Magnesio, Mg	mg	20	18:3 indiferenciados	g	0.042
Fosforo, P	mg	55	18:04	g	0
Potasio, K	mg	180	20:4 indiferenciados	g	0
Sodio, Na	mg	24	20:5 n-3	g	0
Zinc, Zn	mg	0.30	22:5 n-3	g	0
Cobre, Cu	mg	0.043	22:6 n-3	g	0
Manganesio, Mn	mg	0.325	Colesterol	mg	0
Selenio, Se	mcg	1.9	Triptofano	g	0.032
Vitamina C total ácido ascórbico	mg	40.1	Treonina	g	0.101
Thiamina	mg	0.055	Isoleucina	g	0.121
Riboflavina	mg	0.081	Leucina	g	0.145
Niacina	mg	0.458	Lisina	g	0.156
Ácido pantoténico	mg	0.274	Metionina	g	0.037
Vitamina B-6	mg	0.130	Cisteína	g	0.022
Folato total	mcg	30	Fenilalanina	g	0.094
Ácido fólico	mcg	0	Tirosina	g	0.070
Folato alimenticio	mcg	30	Valina	g	0.142
Folato DFE	mcg	30	Arginina	g	0.161
Vitamina B-12	mcg	0	Histidina	g	0.055
Vitamina A	IUIU	1118	Alanina	g	0.131
Vitamina A, RAE	mcg	56	Ácido aspártico	g	0.236
Retinol	mcg	0	Ácido glutámico	g	0.417
Vitamina E (β-tocoferol)	mg	1.32	Glicina	g	0.105
Vitamina K (filoquinone)	mcg	99.5	Prolina	g	0.127
Ácidos grasos saturados totales	g	0.018	Serina	g	0.111
4:0	g	0	β-caroteno	mcg	663
6:0	g	0	α-caroteno	mcg	15
8:0	g	0	β-Criptoxantina	mcg	1
10:0	g	0	Lutein+Zeaxantina	mcg	1498

ANEXO 2. Resultados de la prueba de U.

Prueba no paramétrica de Mann-Whitney y Wilcoxon donde solo se comparan los datos contra la hipótesis nula, usando el programa estadístico STAT Graphics versión 6.0.

Este programa nos da como resultado las tablas que se muestran abajo, de ellas se obtienen las Z ajustadas y dependiendo de:

- si el valor de Z ajustada es negativo entonces:

$p/2$ { - si $> 0 = 0.05$ entonces no es significativo.
- si < 0.05 entonces si es significativo.

- si el valor de Z ajustada es positivo entonces:

$1 - p/2$ { - si $> 0 = 0.05$ entonces no es significativo.
- si < 0.05 entonces si es significativo.

CRUZA E

1. Resultado (w) entre el testigo uretano y el co-tratamiento 25% para la cruz E.

The screenshot shows the STATISTICA software window with the following data table:

variable	Rank Sum Cont. uretano	Rank Sum Group .25	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N Cont. uretano	Valid N Group 2	2*sided exact p
pequeñas	3653.000	3607.000	1777.000	0.12072	0.903914	0.12644	0.899382	60	60	0.906344
grandes	3416.500	3843.500	1586.500	-1.12058	0.262466	-1.23113	0.218276	60	60	0.263518
gemelas	3502.000	3758.000	1672.000	-0.67183	0.501695	-1.03545	0.300458	60	60	0.504738
totales	3563.500	3696.500	1733.500	-0.34903	0.727064	-0.35342	0.723771	60	60	0.728011
mwh	3704.000	3556.000	1726.000	0.36840	0.697721	0.42249	0.672670	60	60	0.700687

- Z ajustada para manchas pequeñas es positiva entonces $1 - p/2 > 0.05$ por lo que se obtuvo un resultado no significativo.

- Z ajustada para manchas grandes y totales son negativas entonces $p/2 > 0.05$ por lo que se obtuvo un resultado no significativo.

2. Resultado (w) entre el testigo uretano y el co-tratamiento 50% para la cruz E.

Mann-Whitney U Test (E uretano)
By variable concentración
Marked tests are significant at $p < .05000$

variable	Rank Sum Cont. uretano	Rank Sum conc50	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N Cont. uretano	Valid N conc50	2*1sided exact p
pequeñas	3734.500	3525.500	1695.500	0.548483	0.583361	0.57465	0.565531	60	60	0.584639
grandes	3452.000	3808.000	1622.000	-0.934258	0.350172	-1.02700	0.304420	60	60	0.352822
gemelas	3711.000	3549.000	1719.000	0.425140	0.670735	0.78812	0.430629	60	60	0.673742
totales	3717.500	3542.500	1712.500	0.459256	0.646051	0.46566	0.641461	60	60	0.647207
mwh	3960.000	3300.000	1470.000	1.732051	0.083265	1.98115	0.047575	60	60	0.083737

- Z ajustada para manchas gemelas es positiva entonces $1-p/2 > 0.05$ por lo que se obtuvo un resultado no significativo.

- Z ajustada para manchas grandes es negativa entonces $p/2 > 0.05$ por lo que se obtuvo un resultado no significativo.

3. Resultado (w) entre el testigo uretano y el co-tratamiento 100% para la cruz E.

Mann-Whitney U Test (E uretano)
By variable concentración
Marked tests are significant at $p < .05000$

variable	Rank Sum Cont. uretano	Rank Sum conc100	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N Cont. uretano	Valid N conc100	2*1sided exact p
pequeñas	3653.000	3607.000	1777.000	0.12072	0.903914	0.12644	0.899382	60	60	0.906344
grandes	3416.500	3843.500	1586.500	-1.12058	0.262466	-1.23113	0.218276	60	60	0.263518
gemelas	3502.000	3758.000	1672.000	-0.67183	0.501695	-1.03545	0.300458	60	60	0.504738
totales	3563.500	3696.500	1733.500	-0.34903	0.727064	-0.35342	0.723771	60	60	0.728011
mwh	3704.000	3556.000	1726.000	0.38840	0.697721	0.42249	0.672670	60	60	0.700687

- Z ajustada para manchas pequeñas es positiva entonces $1-p/2 > 0.05$ por lo que se obtuvo un resultado no significativo.

- Z ajustada para manchas grandes, gemelas y totales son negativas entonces $p/2 > 0.05$ por lo que se obtuvo un resultado no significativo.

CRUZA BE.

1. Resultado (w) entre el testigo uretano y el co-tratamiento 50% para la cruz BE.

Mann-Whitney U Test (HB uretano)
By variable conc
Marked tests are significant at $p < .05000$

variable	Rank Sum Cont. Uretano	Rank Sum conc.50	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N Cont. Uretano	Valid N conc.50	2*1sided exact p
pequeñas	3525.500	3734.500	1695.500	-0.548483	0.583361	-0.567656	0.570269	60	60	0.584639
grandes	3581.500	3678.500	1751.500	-0.254559	0.799064	-0.262470	0.792959	60	60	0.799789
gemelas	3582.000	3678.000	1752.000	-0.251935	0.801092	-0.340008	0.733851	60	60	0.803832
totales	3522.500	3737.500	1692.500	-0.564229	0.572599	-0.568665	0.569584	60	60	0.573894
mwh	3472.000	3788.000	1642.000	-0.829285	0.406944	-0.883722	0.376847	60	60	0.409798

- Z ajustada para manchas pequeñas y totales son negativas entonces $p/2 > 0.05$ por lo que se obtuvo un resultado no significativo.

XIII. GLOSARIO

Apoptosis: Es la muerte celular programada, ocasionada por el daño excesivo a la integridad de la célula.

ATM y ATR quinasas: Proteínas extremadamente grandes que fosforilan un gran número de sustratos.

Cancerígeno: Agente cuya administración a animales previamente no tratados conduce a un aumento estadísticamente significativo de la incidencia de neoplasias de uno o más tipos histogénicos, en comparación con los no tratados.

Concentración Letal media (CL₅₀): Concentración de un compuesto a la que muere el 50% de una población estudiada.

Conjugación: Enlace químico de los metabolitos producidos en la Fase 1 del metabolismo con estructuras químicas complejas (el conjugado), principalmente glutatión, sulfato y péptidos.

Delección: Pérdida de un segmento del cromosoma.

Discos imagales: Bolsas epiteliales que durante la metamorfosis se evaginan y diferencian para formar las estructuras de la mosca adulta.

Epóxido: Molécula que tiene un puente de oxígeno entre dos átomos de carbono en posición α (U. Oxirano) uno con respecto a otro y enlazadas por covalencia simple.

Glucosinolato: Glucósido que contiene azufre y se biosintetiza a partir de diversos aminoácidos: El enlace heterosídico se produce entre la función reductora del azúcar y un grupo tiol (SH). Estos compuestos son encontrados principalmente en vacuolas.

Glutatión: Tripeptido de bajo peso molecular formado por ácido glutámico, cisteína y glicina. Es encontrado en abundancia en todas las células, usualmente en concentraciones milimolares en citosol, mitocondria y núcleo.

Goitrogenicidad: Respuesta inflamatoria de la glándula tiroidea ocasionada por el consumo excesivo de los productos de los glucosinolatos, en particular los iones tiocianato y los isotiocianatos progoitrin, goitrin y epi-progoitin. El mecanismo de goitrogenicidad difiere entre los iones tiocianato e isotiocianatos. El ión tiocianato compite por el yodo de la glándula tiroidea, por lo que sus efectos disminuyen con el aumento de yodo en la dieta. Por otro lado, los isotiocianatos pueden intervenir en la síntesis de la hormona tiroidea.

Grupo Hemo: Desde el punto de vista químico, el grupo hemo presenta una estructura tetrapirrólica conocida como protoporfirina IX, con un núcleo central de hierro unido a ésta. Es una estructura plana, altamente hidrofóbica, que se aloja en un “bolsillo” hidrofóbico de las globinas como la hemoglobina y la mioglobina.

Heterocigoto: Designa organismos que poseen 2 alelos diferentes de algún gen particular entre el conjunto diploide de cromosomas.

Hidroxilamina: Base débil de fórmula NH_2OH formado por un hidroxilo y una amina.

Isotiocianatos: Compuestos biológicamente activos formados por la hidrólisis enzimática de los glucosinolatos.

Metabolismo: Destino total de un compuesto, incluyendo absorción, distribución, biotransformación y eliminación.

Metástasis: Son crecimientos secundarios de células que provienen de la neoplasia primaria.

Mirosinasa: Enzima β -tioglucosidasa que está presente en plantas, hongos, bacterias e indirectamente en humanos y animales debido a muchas bacterias presentes en su microflora intestinal. Su trabajo es hidrolizar glucosinolatos para formar isotiocianatos, iones tiocianatos y nitrilos.

Neoplasia: Es un crecimiento de tejido con alteraciones hereditarias, relativamente autónomo.

No-disyunción: Un fallo en la correcta separación de un par de cromosomas homólogos durante la división celular.

P53: Proteína supresora de tumores, juega un papel muy importante en el bloqueo del ciclo celular o apoptosis ante el stress, daño al DNA, hipoxia y activación de oncogenes.

Porfirinas: Compuestos cíclicos formados por la unión de cuatro anillos pirrólicos enlazados por puentes metilénicos. Una propiedad característica de las porfirinas es la de formar complejos con los iones metálicos unidos a los átomos de nitrógeno de los anillos pirrólicos. Ejemplos son las hierroporfirinas como el grupo hemo de la hemoglobina y la clorofila.

Tioles: Grupo $-SH$ también llamado grupo “sulfidrilo”, se caracteriza por tener olor intenso y desagradable.

Trícoma: Estructura formada por la acumulación de fibras de actina en un polo de la célula.

XII. REFERENCIAS

Abraham, S., S. P. Singh and P. C. Kesavan. (1998). In vivo antigenotoxic effects of dietary agents and beverages co-administered with urethane: assessment of the role of glutathion S-transferase activity. *Mutat. Res.*, **413**: 103-110.

Ashburner, M. Genomics and Speciation. MMWR (en línea) 2003 (22 febrero 2006). Disponible en: www.gen.cam.ac.uk/Images/ashburner/maflies.jpg.

Bjeldanes, L. F., J. Y. Kim., K. R. Grose., J. C. Bartholomew and C. A. Bradfield. (1991). Aromatic hydrocarbon responsiveness-receptor agonists generated from indole-3-carbinol *in vitro* and *in vivo*: comparisons with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *P. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**: 9543-9547.

Boelsterli U. A. (2002). Mechanistic toxicology. Taylor and Francis. Great Britain. 93-147 pp.

Bouquerel, J. La nourriture pour cichidés. MMWR (en línea). 2004 (22 febrero 2006). Disponible en: www.shopi.com/idees/img/12/brocoli.jpg.

Casarett y Doull. (2001). Manual de Toxicología. Ed. McGraw Hill Interamericana. 5ª ed. Traducido por Dr. Bernardo Rivera Muñoz. México. D. F. 981 pp.

Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. (1988). Evaluación epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales. Ed. Limusa. México, D. F. 727 pp.

Conaway, C., S. Getahun., L. Liebes., D. Pusateri., D. Topham., M. Botero-Omary and F. Chung. (2000). Disposition of Glucosinolates and sulforaphane in humans after ingestion of steamed and fresh Broccoli. *Nutr. Cancer.*, **38**: 168-178.

De la Torre, M. C. y S. Buxaderas. El carbamato de etilo: situación del problema. 2002 (22 de febrero 2006). *Ciencia y técnica.* N° 39. Disponible en: http://www.rubes_esface_anterior/axiv-c/1c39/ciencia-c.htm.

Dueñas, G. I. E., M. E. Heres, P. L. Castañeda, and U. Graf. (2001). Easy raising of *Drosophila melanogaster* on a medium consisting of mashed potato flakes and a preservative solution. *DIS.*, **84**: 166.

Dueñas-García, I. E., V. Vega-Contreras., J. C. Gómez-Luna, L. F. Santos-Cruz., L. Castañeda-Partida., A. Durán-Díaz and M. E. Heres-Pulido. (2005). Toxicity parameters of 4-nitroquinoline-1-oxide, urethane and methyl methanesulfonate in the *flare* and *Oregon-flare* strains of *Drosophila melanogaster*. *DIS.*, **88** (en prensa).

Fahey, J. W. and P. Talalay. (1999). Antioxidant functions of sulphoraphane: a potent inducer of phase II detoxication enzymes. *Food. Chem. Toxicol.*, **37**: 973-979.

Fahey, J. W., A. T. Zalcmann and P. Talalay. (2001). The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, **56**: 5-51.

Fahey, J. W., Y. Zhang and P. Talalay. (1997). Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *P. Natl. Acad. Sci.USA.*, **94**: 10367-10372.

Frei, H. and F. E. Würgler. (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. and F. E. Würgler. (1995). Optimal experimental desing and sample size for the statistical evaluation of data from Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila*. *Mutat. Res.*, **334**: 247-258.

Frei, H., J. Clements, D. Howe. and F. E. Würgler. (1992). The genotoxicity of the anti-cancer drug mitoxantrone in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, **279**: 21-33.

Friedberg, E. C., G. C. Walker and W. Siede. (1995). *DNA Repair and Mutagenesis*. American Society for Microbiology (ASM) Press, Washington DC. 32–33 pp.

Frölich, A. and F. E. Würgler. (1990). Genotoxicity of ethyl carbamate in the *Drosophila* wing spot test: dependence on genotype-controlled metabolic capacity. *Mutat. Res.*, **244**: 201-208.

Graf, U. and D. Singer. (1992). Genotoxicity testing of promutagens in the wing Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. *Rev. Int. Contam. Ambient.* **8**: 15-27.

Graf, U. and N. Van Schaik. (1992). Improved high bioactivation cross for the wing Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. *Rev. Int. Contam. Ambient.*, **8**: 15-27.

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

Graf, U., H. Frei, A. Kägi, A. J. Katz, and F. E. Würgler. (1989). Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res.*, **222**: 359-373.

Graf, U., M. A. Spanó, J. Guzmán Rincón, S. K. Abraham and H. H. de Andrade. (1996). The wing Somatic Mutation And Recombination Test (SMART) in *Drosophila melanogaster*: an efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixtures as well as for studies on antigenotoxicity. *Afr Newslett on occup Health and Safety*, **6**: 9-13.

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

Guzmán, R. J. and U. Graf. (1995). *Drosophila melanogaster* Somatic Mutation and Recombination Test as a biomonitor. In: Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change. *Envir. Sci. Res.*, **50**: 169-181.

Guzmán-Rincón, J., P. Ramírez-Victoria and L. Benítez. (2001). Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster* used for biomonitoring of Environmental pollutants. In: Butterworth, F. M, Gonatilaka, A. and Gonsebatt, M. E. (eds). *Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change. A handbook*. Vol. 2. Klumer Academic/plenum Press publishers. New York, NY. 221-237 pp.

He, Y. H., M. D. Friesen, R. J. Ruch and H. A. J. Schut. (2000). Indole-3-carbinol as a chemopreventive agent in 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazol (4, 5, b) pyridine (phIp) carcinogenesis: Inhibition of phIp-DNA adduct formation, acceleration of phIp metabolism and induction of cytochrome P450 in female F344 Rats. *Food. Chem. Toxicol.*, **38**: 15-23.

Heres y Pulido, M. E. (2001). Efecto de los nitratos de plomo y de calcio sobre la acción mutagénica y recombinogénica del metilmetanosulfonato en *Drosophila melanogaster*. Tesis de maestría en ciencias. UNAM, México, D. F.

Hoffler, U., H. El-Masri and B. Ghanayem. (2003). Cytochrome P450 2E1 (CYP-2E1) is the principal enzyme responsible for urethane metabolism: Comparative studies using CYP2E1- null and wild-type mice. *J. pharmacol. Exp. Ther.*, **305**: 557-564.

Hopking, J. P. (1989). Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates. Elsevier Applied Science Publ. LTD Pollution Monitoring series Ed. Prof. K. Mellanby. Inglaterra. 366 pp.

Hübner, P., P. Groux, B. Weibel, C. Sengstag, J. Holbeck, P. Leong-Morgent and J. Lüthy. (1997). Genotoxicity of ethyl carbamate (urethane) in *Salmonella*, yeast and human lymphoblastoid cells. *Mutat. Res.*, **390**: 11-19.

Hung, R. J., J. Hall, P. Brennan and P. Boffetta. (2005). Genetic polymorphisms in the Base Excision Repair pathway and Cancer risk: A HuGE Review. *American Journal of Epidemiology*, **162**: 925-942.

Jenkins, G. J. S., S. H. Doak, G. E. Johnson, E. Quick, E. M. Waters and J. M. Parry. (2005). Do dose response thresholds exist for genotoxic alkylating agents?. *Mutagenesis*, **20**: 389-398.

Johnson, I. T. (2002). Review anticarcinogenic effects of diet-related apoptosis in the colorectal mucosa. *Food. Chem. Toxicol.*, **40**: 1171-1178.

Kassie, F. and S. Knasmüller. (2000). Genotoxic effects of allyl isothiocyanate (AITC) and phenethyl isothiocyanate (PEITC). *Chem-Biol. Interact.*, **127**: 163-180.

Kassie, F., W. Parzefall, S. Musk, I. Johnson, G. Lamprecht, G. Sontag and S. Siegfried Knasmüller. (1996). Genotoxic effects of crude juices from *Brassica* vegetables and juices and extracts from

phytopharmaceutical preparations and spices of cruciferous plants origin in bacterial and mammalian cells. *Chem-Biol. Interact.*, **102**: 1-16.

Kelly, F. J. (1999). Gluthathione: in defense of the lung. *Food. Chem. Toxicol.*, **37**: 963-966.

Kempler, R., S. Myers and H. Hurst. (1995). Detoxification of vinyl carbamate epoxide by glutathione: evidence for participation of glutathione S- transferases in metabolism of ethyl carbamate. *Toxicol. Appl. pharm.*, **135**: 110-118.

Kushad, M., R. Cloyd and M. Babadoost. (2003). Distribution of glucosinolates in ornamental cabbage and kale cultivars. *Sci. Hortic-Amsterdam.*, (article in press).

London, S., J. Yuon, F. Chung, Y. Gao, A. Coetzee, R. K. Ross and M. C. Yu. (2000). Isothiocyanates, glutathiones S- transferase M1 and T1 polymorphisms and lung-cancer risk: a prospective study of men in Shanghai, China. *Lancet*, **356**: 724-729.

López, L. Z. (2004). Evaluación de la toxicidad y genotoxicidad del Brócoli (*Brassica oleracea* var. Itálica) con *Drosophila melanogaster*. Tesis para obtener el título de Bióloga. UNAM, Edo. México.

McDanell, R. and A. E. M. McLean. (1988). Chemical and biological properties of indole glucosinolates (glucobrassicins): a review. *Food. Chem. Toxicol.*, **26**: 59-70.

Mitchell, I. and R. Combes. (1984). Mutation test with the fruit fly *Drosophila melanogaster*. In: Mutagenicity testing a practical approach, Edited by S. Venitt and J. M. Parry. IRL Press. U. K. 149-155 pp.

Murray, R., D. Granner, P. Mayes y U. Rodwell. (1994). Bioquímica de Harper. Ed. El manual moderno. 13ª ed. México, D.F. 961 pp.

Musk, S. R. R., T. K. Smith and I. T. Johnson. (1995). On the cytotoxicity and genotoxicity of allyl and phenethyl isothiocyanates and their parent glucosinolates sinigrin and gluconasturtiin. *Mutat. Res.*, **348**: 19-23.

Nestlé, M. (1997). Brócoli sprouts as inducers of carcinogen-detoxifying enzyme systems: Clinical, dietary, and policy implications. *P. Natl. Acad. Sci. USA.*, **94**: 11149-11151.

Niida, H. and M. Nakanishi. (2006). DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis.*, **21**: 3-9.

Omura, T. and S. Sato. (1964). The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomas. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.*, **239**: 2370-2378.

Paolini M., P. Perocco, D. Canistro, L. Valgimigli, G. F. Pedulli, R. Iori, C. Della Croce, G. Cantelli-Forti, M. S. Legator and S. Z. Abdel-Rahman. (2004). Induction of cytochrome P450, generation of oxidative stress and *in vitro* cell-transforming and DNA-damaging activities by glucoraphanin, the bioprecursor of the chemopreventive agent sulforaphane found in broccoli. *Carcinogenesis.*, **25**: 61-67.

Park, J. Y., M. K. Shigenaga and B. N. Ames. (1996). Induction of cytochrome P4501A1 by 2, 3, 7, 8,- tetrachlorodibenzo-p-dioxin or indolo (3, 2-b) Carbazole is associated with oxidative DNA damage. *P. Natl. Acad. Sci.USA.*, **93**: 2322-2327.

Plant, N. (2003). Molecular toxicology. Bios Scientific Publishers. United States of America.

Podsedek, A. (2005). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT* (Article in press).

Radeleff, R. (1967). Guía practica de toxicología veterinaria. Ed. Collage station. Texas, EE.UU. 378 pp.

Ramos, P. A., H. Gaytan, M. G. Ordaz, P. A. Orozco, J. Maldonado, J. Hernández, E. González, P. Reyes, E. M. Galicia and J. A. Muñoz. (1993). Manual de Laboratorio de genética para *Drosophila melanogaster*. Ed. McGraw-Hill. México.131 pp.

Rodríguez-Arnaiz, R. (2000). Las toxinas ambientales y sus efectos genéticos. Serie: la ciencia para todos. Fondo de Cultura Económica: ILCE.V3. LibrosElectrónicos.http://www.biomedicas.unam.mx/html/pwb/ciencia_para_todos.htmlNºBIOLOGIA.

Rodríguez-Arnáiz, R. y P. Ramos. (1992). *Drosophila* como sistema para detectar agentes genotóxicos. Manual. Ed. Coordinación de Servicios Editoriales de la Facultad de Ciencias, UNAM. 50 pp.

Sakano, K., S. Oikawa, Y. Hiraku and S. Kawanishi. (2002). Metabolism of carcinogenic urethane to nitric oxide is involved in oxidative DNA damage. *Free. Radical. Bio. Med.*, **33**: 703-714.

Sánchez Lamar, A., G. Fonseca López, N. Capiro Trujillo y D. Fernández Fuentes. (2000). Propuesta de ruta crítica para la evaluación genotóxica de plantas medicinales en Cuba. *Rev. Cubana Farm.*, **34**: 34-43.

Shape, C. P., J-P. Collet, E. Belzile, J. A. Hanley and J-F. Boivin. (2002). The effects of tricyclic antidepressants on breast cancer risk. *British Journal of Cancer*, **86**: 92-97.

Sorensen, M., B. R. Jensen, H. E. Poulsen, X. Deng, N. Tygstrup, K. Dalhoff and S. Loft. (2001). Effects of a Brussels sprouts extract on oxidative DNA damage and metabolizing enzymes in rat liver. *Food. Chem. Toxicol.*, **39**: 533-540.

Soriano, M., L. Cruz y G. Ortiz. (1995). Biología, cultivo y manipulación de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. Iztacala. UNAM. 23 pp.

Steinkellner, H., S. Rabot, C. Freywald, E. Nobis, G. Scharf, M. Chabicovsky, S. Knasmüller and F. Kassie. (2001). Effects of cruciferous vegetables and their constituents on drug metabolizing enzymes involved in the bioactivation of DNA-reactive dietary carcinogens. *Mutat. Res.*, **480-481**: 285-297.

Tiedink, H. G. M., J. A. R. Davies, L. W. Van Broekhoven, H. J. Van der Kamp and W. M. F. Jongen. (1988). Formation of mutagenic N-nitroso compounds in vegetable extracts upon nitrile treatment: a comparison with the glucosinolate content. *Food. Chem. Toxicol.* **26**: 947-954.

Uthurry, C. A., F. Varela, B. Colomo, J. A. Suárez Lepe, J. Lombardero and J. R. García del Hierro. (2004). Ethyl carbamate concentrations of typical spanish red wines. *Food. Chem.*, (Article in press).

Van Schaik and U. Graf. (1993). Structure-activity relationships of tricyclic antidepressant and related compounds in the wing Somatic Mutation and Recombination Test of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, **289**: 155-163.

Van Schaik and U. Graf. (1991). Genotoxicity evaluation of the five antidepressants in the wing Somatic Mutation and Recombination Test of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, **260**: 99-104.

Vang, O., H. Jensen and H. Atrup. (1991). Induction of cytochrome P4501A1, 1A2, IIB1, IIB2, and IIE1 by broccoli in rat liver and colon. *Chem-Biol. Interac.*, **78**: 85-96.

Vang, O., B. F. Rasmussen, H. Sorensen, J. Clausen and O. Andersen.(1995). Effects of dietary broccoli on antioxidant enzymes. *Clin. Chem.*, **41**: 1910-1911.

Vang, O., B. F. Rasmussen and O. Andersen. (1997). Combined effects of complex mixtures of potentially anti-carcinogenic compounds on antioxidant enzymes and carcinogen metabolizing enzymes in the rat. *Cancer. Lett.*, **114**: 234-286.

Verhagen, H., A. De Vries, W. A. Nijhoff, A. Schouten, G. Van Poppel, W. H. Peters and B. H. Van den. (1997). Effect of Brussels sprouts on oxidative DNA-damage in man. *Cancer. Lett.*, **114**: 127-130.

Verhoeven, D. T. H., H. Verhagen, R. A. Goldbohm, P. A. Van den Brandt and G. Van Poppel. (1997). A review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by *Brassica* vegetables. *Chem-Biol. Interac.*, **103**: 79-129.

Vogel, E. W., U. Graf, H. J. Frei. And M. M. Nivard. (1999). The results of assays in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens. *IARC Sci. Publ.*, **146**: 427-470.

Windholz, M., S. Budavari, L. Stroumtsos and M. Norther. (1976). The Merck index an Encyclopedia of Chemical and drugs. Ed. Merck & Co. Inc. Rahway. 9^a ed. N. J., U. S. A.

Woo Cha, S., H. Kyoung Gu, K. Poong Lee, M. Han Lee, S. Seop Han and T. Cheon Jeong. (2000). Immunotoxicity of ethyl carbamate in female BALB/c mice: role of esterase and cytochrome P450. *Toxicol. Lett.*, **115**: 173-181.

Xu, C., C. Yong-TaoLi and A. Tony Kong. (2005). Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch. Pharm. Res.*, **28**: 249-268.

Zhang, Y., R. H. Kolm, B. Mannervik and P. Talalay. (1995). Reversible conjugation of isothiocyanates with glutathione catalyzed by human glutathione transferases. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, **206**: 748-755.

Zhu, C. Y. and S. Loft. (2003). Effect of chemopreventive compounds from *Brassica* vegetables on NAD(P)H:quinone reductase and induction of DNA strand breaks in murine hepa1c1c7 cells. *Food. Chem. Toxicol.*, **41**: 455-462.

Zhu, C. Y. and Loft. (2001). Effects of Brussels sprouts extracts on hydrogen peroxide-induced DNA strand breaks in human lymphocytes. *Food. Chem. Toxicol.*, **39**: 1191-1197.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de respuesta celular ante el daño de agentes genotóxicos.	1
Figura 2. Metabolismo xenobiótico.	2
Figura 3. Daños en el DNA.	5
Figura 4. Organización conceptual de las señales de transducción de respuesta Checkpoint.	8
Figura 5 a. Eventos genéticos que llevan a la pérdida de la heterocigosis y la formación de manchas en la prueba SMART (tomado de Guzmán-Rincón y Ramírez-Victoria, 2001. Modificado de Graf <i>et al.</i> , 1984).	14
Figura 5 b. Continuación eventos genéticos que llevan a la pérdida de la heterocigosis y la formación de manchas en la prueba SMART (tomado de Guzmán-Rincón y Ramírez-Victoria, 2001. Modificado de Graf <i>et al.</i> , 1984).	15
Figura 6. Expresión fenotípica de trócomas silvestres.	12
Figura 7. Expresión fenotípica del marcador <i>mwh</i> y <i>flr</i> ³ .	12
Figura 8. Ala silvestre.	13
Figura 9. Ala con el marcador <i>Beaded Serratia</i> .	13
Figura 10. Uretano o carbamato de etilo (tomado de Kempler <i>et al.</i> , 1995).	16
Figura 11. Metabolismo del uretano (tomado de Sakano <i>et al.</i> , 2002).	17
Figura 12. Transformación del uretano a vinil carbamato epóxido (tomado de Kempler <i>et al.</i> , 1995).	17

Figura 13. Brócoli (<i>Brassica oleracea</i> , var. Itálica) (Tomado de www.shopi.com/ideas/img/12/brocoli.jpg).	18
Figura 14. Hidrólisis de los glucosinolatos a isotiocianatos, tiocianatos y nitrilos por acción de la enzima mirosinasa (tomado de Streinkellner <i>et al.</i> , 2001).	19
Figura 15. Mapa metabólico según los resultados de los trabajos (1-5).	21
Figura 16. Mapa metabólico según los resultados de los trabajos (6-14).	22
Figura 17. Mapa metabólico según los resultados de los trabajos (15-20).	23
Figura 18. Dimorfismo sexual en <i>D. melanogaster</i> .	27
Figura 19. Mapa metabólico de la interacción brócoli-uretano elaborado con la información de distintas fuentes.	46

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Regresión polinómica del uretano para la cepa <i>Oregon-flare</i> ³ .	31
Gráfica 2. Regresión polinómica del uretano para la cepa <i>flare</i> ³ .	32
Gráfica 3. Frecuencias de los diferentes tipos de manchas/ individuo para los testigos: agua, brócoli, uretano y los co-tratamientos brócoli-uretano: 25%, 50% y 100% (cruza E).	34
Gráfica 4. Distribución de tamaños de clones <i>mwh</i> por individuo (cruza E).	37
Gráfica 5. Frecuencias de los diferentes tipos de manchas/ individuo para los testigos: agua, brócoli, uretano; y los co-tratamientos brócoli-uretano: 25%, 50% y 100% (cruza BE).	39
Gráfica 6. Distribución de tamaños de clones <i>mwh</i> por individuo (cruza BE).	42

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Pruebas genotóxicas (modificado de Sánchez Lamar <i>et al.</i> , 2000)	10
Cuadro 2. Composición de los medios utilizados en cada tratamiento.	28
Cuadro 3. Resumen de resultados SMART para la cruza E y su diagnóstico estadístico. (a) Testigo agua vs Testigo brócoli y Testigo uretano. (b) Testigo uretano vs Co-tratamiento 25, 50 y 100%.	33
Cuadro 4. Resumen de resultados SMART inverso para la cruza E y su diagnóstico estadístico. Testigo brócoli vs Testigo agua.	35
Cuadro 5. Resumen de resultados SMART inverso para la cruza E y su diagnóstico estadístico. (a) Co-tratamiento 25%, (b) Co-tratamiento 50% y (c) Co-tratamiento 100% vs Testigo uretano.	36
Cuadro 6. Resumen de resultados SMART para la cruza BE y su diagnóstico estadístico. (a) Testigo agua vs Testigo brócoli y Testigo uretano. (b) Testigo uretano vs Co-tratamientos 25, 50 y 100%.	38
Cuadro 7. Resumen de resultados SMART inverso para la cruza BE y su diagnóstico estadístico. Testigo brócoli vs Testigo agua.	40
Cuadro 8. Resumen de resultados SMART inverso para la cruza BE y su diagnóstico estadístico. (a) Co-tratamiento 25%, (b) Co-tratamiento 50% y (c) Co-tratamiento 100% vs Testigo uretano.	40
Cuadro 9. Resumen de los resultados SMART para el Testigo uretano de la cruza E vs BE y su diagnóstico estadístico.	43

LISTA DE ABREVIATURAS

A: Adenina.	IUIU: Unidades Internacionales.
AITC: Alil-isotiocianato.	I3C: Indol 3-carbinol.
AP: Sitios apurínicos/apirimídicos.	I3A: Indol 3-acetonitrilo.
Bd ^s : <i>Beaded Serratia</i> .	µg o mcg: Microgramos.
BER: Reparación por escisión de bases.	mM: milimolar.
BOC: Brócoli orgánicamente crecido.	MMR: Reparación de desemparejamientos “mismatch repair”.
C: Citocina.	MTFH: 5,10-metenil-tetra-hidrofolil.
Chk: punto de chequeo “checkpoint”.	<i>mwh</i> : Marcador pelos múltiples en el ala “ <i>multiple wing hairs</i> ”.
CHO: Criceto chino.	NADPH: Fosfato de dihidronicotinamida- adenindinucleótido.
CL ₂₀ : Concentración subtóxica con 80% de sobrevivencia.	NAT: N-acetiltransferasa.
CL ₅₀ : Concentración Letal Media.	NER: Reparación por escisión de nucleótidos.
CoA: Coenzima A.	NHEJ: Recombinación entre no homólogos.
CYPs: Citocromos P450.	nm: Nanometros.
DSBs: Rompimientos dobles en el DNA.	NO: Oxido nítrico.
FADH: 1,5-dihidroflavin adenin-dinucleótido.	ORR: Marcador Oregon- <i>flare</i> ³ .
<i>flr</i> ³ : Marcador flama “ <i>flare</i> ”.	PEITC: Fenil-isotiocianato.
G: Guanina.	ROS: Especies reactivas del oxígeno.
GRP: Glucorafanin.	SMART: Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas.
GSH: Glutación reducido.	SSBs: Rompimientos sencillos en el DNA.
GS-Px: Glutación peroxidasa.	SULT: Sulfotransferasas.
GSSG: Glutación disulfuro.	T: Timina.
GST: Glutación S-transferasa.	TM3: Cromosoma balanceador con inversiones múltiples.
HPLC: Cromatografía líquida de alta presión.	UDP: Uridindifosfato.
HRR: Recombinación entre homólogos.	UGT: UDP-glucuronosiltransferasa.
IARC: Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer.	UV: Luz ultravioleta.
ICH: Intercambio de cromátidas hermanas.	
ITCs: Isotiocianatos.	