



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DEL BRÓCOLI (*Brassica oleracea*, var. *italica*)
CON EL CARBAMATO DE ETILO (URETANO), METIL METANOSULFONATO
(MMS) Y 4-NITROQUINOLINA-1-ÓXIDO (4-NQO) EN LA PRUEBA SMART
EN ALA DE *Drosophila melanogaster*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

ROSA GLORIA REBOLLAR VEGA

DIRECTORA DE TESIS:

M. en C. **MARÍA DE JESÚS LAURA CASTAÑEDA PARTIDA**



LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉX. 2008



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 la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la **M. en C. Laura Castañeda Partida**, mi mamá académica, por ser una excelente maestra que siempre me brindo cariño, apoyo, paciencia y dedicación, mil gracias.

A las **M. en C. Irma Dueñas y Maria Eugenia Heres**, como una muestra de mi cariño y agradecimiento, por todo el apoyo brindado, les agradezco la orientación que me otorgaron.

Al **M. en C. Ángel Duran**, por su apoyo en la prueba estadística.

Al **Dr. Ignacio Peñalosa, Dr. Diego Arenas y Biol. Héctor Barrera** quienes evaluaron este trabajo realizando comentarios enriquecedores.

A la **Dra. Margarita Canales y Dra. Tzasná Hernández** por los gemelitos que prestaron y principalmente porque siempre se preocuparon por mí.

Al **Biol. Felipe de Jesús Cruz López** por la amistad que me brindo.



DEDICATORIA

A mis padres **Juan Manuel Rebollar Rodríguez** y **Gloria Vega Osnaya**, porque gracias a su cariño, guía y apoyo he llegado a realizar uno de los anhelos más grandes de mi vida, fruto del inmenso apoyo, amor y confianza que en mi se depositó y con los cuales he logrado terminar mis estudios profesionales que constituyen el legado más grande que pudiera recibir y por lo cual les viviré eternamente agradecida.

A mis hermanos **María del Sol** (Visogodo), **Juan Manuel** (cua cua) y **Luz Elena** (Lu), porque me enseñaron que no debemos darnos por vencidos para lograr nuestras metas e ideales, por la oportunidad de contar con ustedes y compartir mis fracasos, triunfos, tristezas y alegrías. Gracias.

A mi mejor amigo **Octavio Olalde Valdivia** (Cariño) por todos estos años juntos TE AMO.

Al equipo número uno: **Guadalupe** (la mejor), **Cesar** (no olvides contar conmigo), **Valerio** (gracias por ser parte de mi vida), **Daniel Octavio** (el mejor √), **Erick** (te quiero mucho) y **Carlos** (compañero).

A mis miguis **Juls** y **Angélique** (las quiero mucho), **Auriz** y **Paloma** gracias por todo. Porque siempre estuvieron conmigo, en los momentos buenos, malos y peores. Por las clases, prácticas y sesiones en los gises tan agradables y divertidas.

A las princesas del laboratorio **Karina**, **Diana**, **Soledad** y **Rocío** porque con ustedes fueron más fáciles los días de experimentación y el laboratorio era tan alegre y lleno de vida con esos ataques de risa. Gracias

A los niños del laboratorio **Gerardo** y **Biol. Luis Felipe** gracias por ser el hermano mayor que siempre me apoyo en todo lo que necesitaba.



Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Genética
Toxicológica de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala,
UNAM.



ÍNDICE

| | |
|--|----|
| Resumen..... | 1 |
| Introducción..... | 2 |
| Metabolismo Xenobiótico..... | 2 |
| Brócoli..... | 7 |
| Carbamato de etilo (Uretano)..... | 12 |
| Metil metanosulfonato (MMS)..... | 14 |
| 4-Nitroquinolina- 1-óxido (4-NQO)..... | 15 |
| <i>Drosophila melanogaster</i> | 17 |
| Prueba de mutación y recombinación somática (SMART)..... | 17 |
| Antecedentes..... | 18 |
| Justificación..... | 18 |
| Hipótesis..... | 18 |
| Objetivos..... | 19 |
| Materiales..... | 20 |
| Métodos..... | 21 |
| Diagrama metodológico..... | 23 |
| Resultados..... | 24 |
| Discusión..... | 36 |
| Conclusiones..... | 42 |
| Anexos 1..... | 43 |
| Anexo 2..... | 45 |
| Anexo 3..... | 50 |
| Referencias..... | 54 |



ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Principales reacciones de algunos compuestos xenobióticos en las diferentes fases del metabolismo.

Cuadro 2. Diseño experimental.

Cuadro 3. Resultados de la prueba SMART, Cruzas Estándar (E) y Bioactivación Elevada (BE) para los testigos Agua, T-OH, Brócoli y T-OH+Brócoli.

Cuadro 4. Resultados de la prueba SMART, Cruzas Estándar (E) y Bioactivación Elevada (BE) para Uretano y Uretano+Brócoli.

Cuadro 5. Resultados de la prueba SMART, Cruzas Estándar (E) y Bioactivación Elevada (BE) para MMS y MMS+Brócoli.

Cuadro 6. Resultados de la prueba SMART, Cruzas Estándar (E) y Bioactivación Elevada (BE) para 4NQO y 4NQO+Brócoli.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo catalítico mediado por los citocromos P450

Figura 2. Brócoli (*Brassica oleracea*, var. *italica*)

Figura 3. Conversión enzimática de glucosinolatos al intermediario de aglucon por la mirosinasa y subsecuente conversión a isotiocianatos, nitrilos o tiocianatos

Figura 4. Estructura de los principales isotiocianatos

Figura 5. Carbamato de etilo (Uretano)

Figura 6. Metabolismo del uretano

Figura 7. Oxidación del uretano a vinil carbamato epóxido

Figura 8. Metil metanosulfonato (MMS)

Figura 9. 4-nitroquinolina-1-óxido (4-NQO)

Figura 10. Estructura de los aductos de 4-NQO. a) dGuo-C8-AQO; b) dGuo-N2-AQO; c) dAdo-N6-AQO

Figura 11. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*

Figura 12. Discos imaginales de *Drosophila melanogaster*

Figura 13. Mancha *mwh*

Figura 14. Mancha *flr³*

Figura 15. Ala Serratia

Figura 16. Eventos que ocasionan la pérdida de heterocigosis en *Drosophila melanogaster*



ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Frecuencia de los diferentes tipos de manchas por individuo para los testigos Agua, T-OH, Brócoli y T-OH+Brócoli en las cruzas Estándar (E) y Bioactivación Elevada (BE).

Gráfica 2. Distribución de tamaño de clones *mwh* por individuo para los testigos Agua, T-OH, Brócoli y T-OH+Brócoli en las cruzas Estándar (E) y Bioactivación Elevada (BE).

Gráfica 3. Frecuencia de los diferentes tipos de manchas por individuo para el Uretano y el co-tratamiento Uretano+Brócoli en las cruzas Estándar (E) y Bioactivación Elevada (BE).

Gráfica 4 Distribución de tamaño de clones *mwh* por individuo para el Uretano y el co-tratamiento Uretano+Brócoli en las cruzas Estándar (E) y Bioactivación Elevada (BE).

Gráfica 5. Frecuencia de los diferentes tipos de manchas por individuo para el MMS y el co-tratamiento MMS+Brócoli en las cruzas Estándar (E) y Bioactivación Elevada (BE).

Gráfica 6. Distribución de tamaño de clones *mwh* por individuo para el MMS y el co-tratamiento MMS+Brócoli en las cruzas Estándar (E) y Bioactivación Elevada (BE).

Gráfica 7. Frecuencia de los diferentes tipos de manchas por individuo para 4NQO y el co-tratamiento 4NQO+Brócoli en las cruzas Estándar (E) y Bioactivación Elevada (BE).

Gráfica 8. Distribución de tamaño de clones *mwh* por individuo para 4NQO y el co-tratamiento 4NQO+Brócoli en las cruzas Estándar (E) y Bioactivación Elevada (BE).



ABREVIATURAS

Ac-4-HAQO Acetoxiaminoquinolina
AITC alil-isotiocianato
Bd^S *Beaded Serratia*
BE Cruza Bioactivación elevada
NER Sistema de reparación por escisión de nucleótidos
BITC Bencil isotiocianato
CYP450 Citocromos P450
DNA Ácido desoxirribonucleico
E Cruza Estándar
ETU Etilentiourea
flr³ Marcador del ala *flare* (flama)
GSH Glutación
GST Glutación-S-transferasa
IARC Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
I3C Indol 3 carbinol
ITCs Isotiocianatos
MIC Medio Instantaneo Carolina
MMS Metil metanosulfonato
mwh Marcador del ala multiple wing hairs (tricomas múltiples)
PEITC Fenil isotiocianato
QR Quinona reductasa
REL Reticulo endoplásmico liso
ROS Radicales libres
SF Sulforafano
SMART Prueba de Mutación y Recombinación Somática
T-OH Tween 80 5%+Etanol 5%
TM3 Cromosoma balanceador con inversiones múltiples
UDP Glucoronil transferasa
URETANO Carbamato de etilo
UV Luz ultravioleta
4-NQO 4Nitroquinolina-1-óxido



RESUMEN

Estudios sobre el Brócoli señalan que este vegetal posee efecto anticancerígeno mientras otros concluyen lo contrario. Por ello, se estudió la interacción del Brócoli (*Brassica oleracea*, var. *italica*) con los mutágenos carbamato de etilo (uretano), metil metanosulfonato (MMS) y 4-nitroquinolina-1 óxido (4-NQO) en larvas de las cruza Estándar (E) y Bioactivación Elevada (BE) de la prueba SMART en ala de *Drosophila melanogaster*. Brócoli fresco y crudo de supermercado fue liofilizado y pulverizado. Larvas de 72 ± 4 h se expusieron a diferentes tratamientos: Agua, T-OH (Tween 5%-OH 5%), T-OH+Brócoli, Uretano (20mM), MMS (0.5mM), 4-NQO (2mM), Brócoli, Uretano (20mM)+ Brócoli, MMS (0.5mM)+Brócoli, 4-NQO (2mM)+Brócoli. Posteriormente permanecieron en incubadora (25° C y 65% de humedad) hasta la emergencia de los imagos. Estos se colectaron en alcohol al 70%. Las alas de fenotipo silvestre se disectaron y montaron en preparaciones permanentes con solución Faure y se observaron al microscopio óptico 40x. Los resultados se analizaron con el programa SMART para PC. El Brócoli de supermercado utilizado en este trabajo tuvo un efecto genotóxico disuelto en Agua y T-OH. La interacción Uretano+Brócoli mostró un efecto sinérgico en la cruza E y en la cruza BE hubo una disminución en la frecuencia de manchas grandes. En el co-tratamiento MMS+Brócoli se encontró una reducción en la frecuencia de manchas grandes con respecto al testigo MMS. Finalmente en el co-tratamiento 4-NQO+Brócoli no se encontraron diferencias en la frecuencia de manchas con respecto al testigo 4-NQO.



INTRODUCCIÓN

La Genética Toxicológica es la disciplina científica que identifica y analiza la acción de agentes físicos o químicos capaces de interactuar con el material genético de los seres vivos (*genotóxicos*). Pretende establecer la correlación que existe entre la exposición a tales agentes genotóxicos y la inducción de alteraciones genéticas tanto en las células germinales como en las células somáticas de los organismos, y definir a partir de ello, los efectos que las toxinas ambientales producen sobre la integridad genética de los seres vivos.

La inducción de daño genético por exposición a agentes genotóxicos es un proceso de varios pasos. Durante este, el agente ingresa al organismo, se absorbe, se distribuye y atraviesa las membranas celulares. Una vez dentro de la célula, el agente puede ser reactivo por sí mismo (*acción directa*), o bien puede ser activado por las enzimas del Metabolismo Xenobiótico (*acción indirecta*) por lo que se le llama *promutágeno*. Se da entonces la interacción con el DNA, que puede ser reparada eficiente o ineficientemente de manera tal que el daño genético inicial se fijará o no, expresándose en las diferentes estirpes celulares (Murray *et al.*, 1992).

METABOLISMO XENOBIÓTICO

El metabolismo de los compuestos exógenos, también llamados *xenobióticos*, es esencialmente un mecanismo de desintoxicación, pero en ocasiones puede ser un proceso de activación de compuestos inicialmente inertes a metabolitos intermedios muy reactivos (Rodríguez-Arnáiz, 2004).

El metabolismo de los sustratos exógenos es un fenómeno dual en el que intervienen tanto la activación como la desintoxicación. En la mayoría de los casos los metabolitos intermediarios son bioactivados y desintoxicados, pero en otros pueden provocar cambios fisiológicos y bioquímicos como consecuencias de una deficiente desintoxicación y/o reacción de los metabolitos intermedios con los constituyentes celulares, lo cual produce efectos tóxicos, desde el daño celular hasta la muerte (Rodríguez-Arnáiz, 2004).



El metabolismo xenobiótico es el proceso mediante el cual un sustrato exógeno (xenobiótico), esencialmente poco soluble en agua, se convierte en un metabolito más hidrosoluble y así facilita su excreción. Este proceso se divide en dos fases (Murray *et al.*, 1992; Rodríguez-Arnáiz, 2004).

La fase I consiste en todas las reacciones que introducen grupos funcionales o reactivos a las moléculas. Estas transformaciones metabólicas incluyen diversas reacciones químicas, como la hidrólisis, la oxidación y la reducción. Esta fase es catalizada principalmente por un sistema enzimático denominado citocromos P450 (CYP450), que son hemoproteínas monooxigenasas de función mixta. La fase II consiste en la conjugación de los metabolitos generados en la fase I, usualmente compuestos electrofílicos muy reactivos, con el glutatión (GSH), reacción que es catalizada por la superfamilia de genes que codifican para las glutatión-S-transferasas (GST). Estas conjugaciones facilitan el transporte y la eliminación de los metabolitos electrofílicos y por lo tanto la fase II es esencialmente de desintoxicación (Cuadro 1) (Rodríguez-Arnáiz, 2004).

Cuadro 1. Principales reacciones de algunos compuestos xenobióticos en las diferentes fases del metabolismo.

| Reacción | Enzima | Sustrato |
|----------------------------|---------------------------------------|---------------------------|
| Fase I Funcionalización | | |
| Oxidación | Oxidasas de función mixta (CYP450) | Alcanos, alquenos, aminas |
| Oxidación | Alcohol deshidrogenasa | Alcoholes |
| Reducción | Oxidasas de función mixta | Grupos azo y nitro |
| Hidrólisis | Esterasas | Ésteres |
| Fase II Conjugación con: | | |
| Agua | Epóxido-hidrolasa | Époxidos |
| Glutatión | Glutatión-transferasa | Electrofílicos |
| Ácido glucorónico | Glucoronil-transferasa | Fenoles, tioles, aminas |
| Ácido acético (Acetil-CoA) | N-acetiltransferasas | Aminas |



Citocromos P450 (CYP450)

La estructura de los CYP450 contiene un grupo hemo, que se sintetiza a partir del precursor inmediato la protoporfirina IX, unido a la cadena polipeptídica de la apoproteína por medio de dos uniones, una de ellas covalente cisteína-hierro. Todas las isoformas tienen un peso molecular entre 42 y 60 kilodaltones. El átomo de hierro presenta seis uniones: cuatro con los átomos de nitrógeno del grupo hemo, una con el residuo cisteína del CYP450 y el último generalmente con una molécula de agua, pero también puede establecerse con los grupos hidrófilos de los aminoácidos serina, treonina y tirosina (Rodríguez-Arnáiz, 2004).

Los CYP450 participan en diferentes reacciones de oxidación de diversos sustratos, reacciones que corresponden a la fase I del metabolismo. El ciclo catalítico es el siguiente:

- 1) Formación del complejo P450-sustrato: Durante esta fase el sustrato se fija al sitio hidrofóbico de la enzima.
- 2) Formación del complejo P450-reductasa: La reducción de un electrón del complejo citocromo P450-férrico-sustrato a un complejo CYP450-ferroso-sustrato es mediada por la NADPH-CYP450 reductasa, flavoproteína que transfiere electrones del NADPH al citocromo.
- 3) Unión de un átomo de oxígeno molecular: Mediante la interacción del oxígeno con el complejo ferroso-sustrato de la hemoproteína para formar el CYP450 oxiferroso.
- 4) Reducción del complejo oxiferroso: Se lleva a cabo por la aportación de un segundo electrón del NADPH por medio de la reductasa o mediante el NADH vía la citocromo b_5 reductasa.
- 5) Rearreglo intramolecular: En el complejo, un átomo de oxígeno es reducido a agua y otro átomo de oxígeno molecular se introduce al sustrato como un grupo hidroxilo.
- 6) Oxidación del sustrato: Esta hidroxilación da como resultado la formación de un producto oxidado (sustrato) y el CYP450 férrico.
- 7) Disociación del complejo CYP450-sustrato: La enzima regresa a su estado inicial con la liberación del producto (Fig. 1).

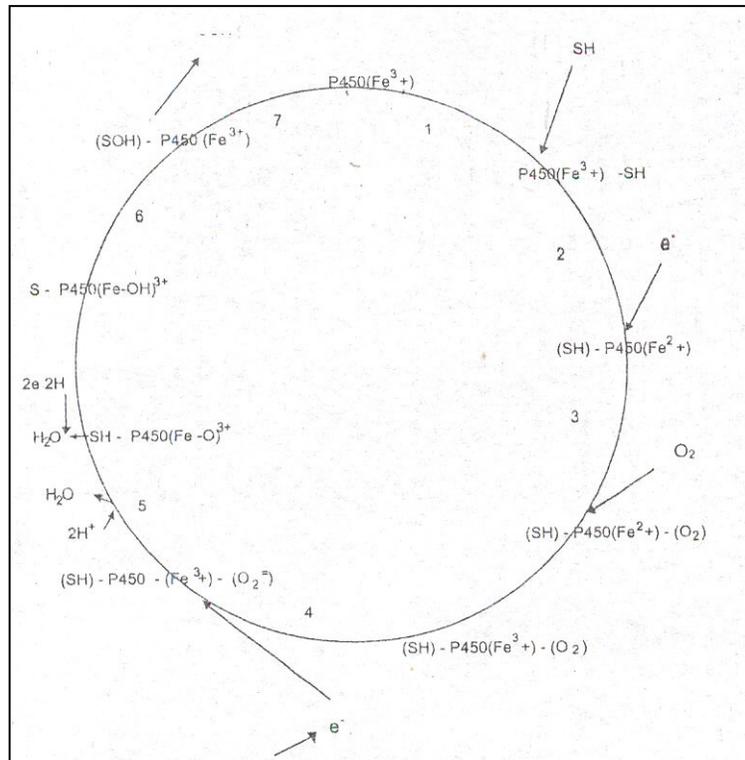


Figura 1. Ciclo catalítico mediado por los citocromos P450
(Tomado de Rodríguez-Arnáiz, 2004).

Actividades

El sistema CYP450 interviene en diferentes rutas metabólicas y posee al menos tres tipos de actividad:

- 1) Actividad monooxigenasa. Se lleva a cabo en presencia de O_2 y NADPH; a través de esta actividad los compuestos xenobióticos inertes (no polares) sufren diversos tipos de reacciones.
- 2) Actividad de oxidasa. En ella ocurre la transferencia de electrones de un CYP450 reducido al oxígeno molecular acompañado de la formación de radicales aniónicos superóxidos (O_2^-) y de peróxido de hidrógeno.
- 3) Actividad reductasa. Ocurre en condiciones anaerobias y en ella se da la transferencia de electrones a sustratos para producir radicales libres.



Localización y Regulación

En los eucariontes los CYP450 se encuentran tanto en el retículo endoplásmico liso (REL) como en las mitocondrias. En el REL se encuentran orientados hacia el interior de la membrana, al igual que en las mitocondrias hacia el interior del organelo (Rodríguez-Arnáiz, 2004).

En los insectos, los CYP450 están involucrados en el crecimiento y en el desarrollo a través del procesamiento de ácidos grasos, hormonas y feromonas; catalizan también un amplio rango de reacciones enzimáticas de una gran diversidad de compuestos exógenos, tales como la biotransformación de productos secundarios de planta y de productos químicos sintéticos como los insecticidas. Los CYP450 se expresan en larvas en el tubo digestivo, en los cuerpos grasos y, además en el aparato reproductivo y en los tubos de Malpighi en los adultos (Jiménez y Merchant, 2003).

En los vertebrados se encuentran en la gran mayoría de los tejidos; sin embargo, se localizan en cantidades más elevadas en el hígado, intestino, pulmones, riñón, ovarios, testículos, glándulas suprarrenales y placenta (Rodríguez-Arnáiz, 2004).

La regulación en la expresión de los CYP450 aparece como una respuesta adaptativa al estrés ejercido por los agentes xenobióticos. Los fenómenos de inducción e inhibición de los CYP450 están muy relacionados con la regulación de la expresión génica. Los mecanismos de inducción son el resultado de la activación transcripcional, post-transcripcional y post-traducciona ejercida por diversos compuestos químicos (Rodríguez-Arnáiz, 2004).



BRÓCOLI

En términos de genotoxicidad el Brócoli es una mezcla compleja, debido a que la interacción entre sus muchos compuestos puede tener diferentes efectos de antagonismo o sinergia en relación con agentes cancerígenos, ya que se le relaciona con la capacidad de modificar la actividad enzimática de los CYP450 (Verhoeven *et al.*, 1997).

Uno de los grupos de vegetales con capacidad potencial de protección contra el cáncer es la familia Brassicaceae. Los vegetales *Brassica* son un género de esta familia, de consumo frecuente en el mundo, que incluyen todos los tipos de col, col de bruselas, coliflor y Brócoli (Verhoven *et al.*, 1997).

El Brócoli (Fig. 2) es similar a la coliflor, las hojas son más estrechas y más erguidas, con peciolo generalmente desnudos, limbos normalmente con los bordes más ondulados; así como nervaduras más marcadas y blancas; pellas claras o ligeramente menores de tamaño, superficie más granulada, y constituyendo conglomerados parciales más o menos cónicos que suelen terminar en este tipo de formación en el ápice. El color de las inflorescencias es verde (http://www.uga.edu/vegetable-broccoli_archivos).



Figura 2. Brócoli (*Brassica oleracea*, var. *italica*)

Se cree que estos vegetales reducen el riesgo de cáncer por su alto contenido de glucosinolatos (Verhoven *et al.*, 1997; Perocco *et al.*, 2006). Los glucosinolatos son solubles en agua, aniónicos, no volátiles y estables (Fahey y Talalay, 1999). Cuando el vegetal sufre algún daño se libera la enzima mirosinasa, que cataliza la hidrólisis de los glucosinolatos (Verhoeven *et al.*, 1997; Fahey y Talalay, 1999).



Los productos de la hidrólisis de glucosinolatos consisten en cantidades equimolares de aglucon, glucosa y sulfatos. El aglucon sufre un ajuste intramolecular a isotiocianatos (ITCs), tiocianatos y nitrilos (Fig. 3) (Liang *et al.*, 2006).

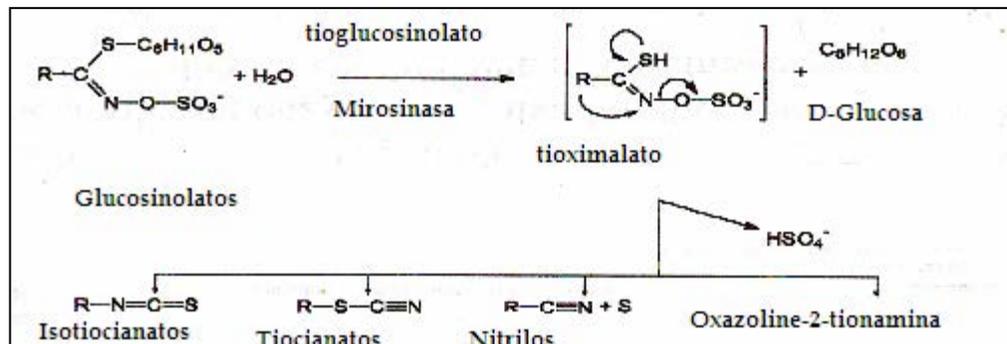


Figura 3. Conversión enzimática de glucosinolatos al intermediario de aglucon por la mirosinasa y su subsecuente conversión a isotiocianatos, nitrilos o tiocianatos (Tomado de Steinkeller *et al.*, 2001).

Los isotiocianatos (ITCs) ejercen su acción quimioprotectora contra el cáncer por la modulación de las actividades de la fase I y II del metabolismo xenobiótico. En estudios recientes, se ha reportado que los ITCs y sus conjugados tiol inhiben el ciclo celular y causan apoptosis, posiblemente por la activación de las señales de transducción (Steinkellner *et al.*, 2001; Conaway *et al.*, 2002).

Los ITCs inducen la actividad de las enzimas de la fase II, por ejemplo: glutatión S-transferasa (GST), quinona reductasa (QR), sulfatasa y UDP glucoronil transferasa. Las enzimas modulan el riesgo de cáncer por la formación de conjugados polares de carcinógenos electrofílicos que son fácilmente excretados en la orina, reduciendo el efecto del carcinógeno (Conaway *et al.*, 2002).

El fenil isotiocianato (PEITC) induce las enzimas de la fase II en tratamientos de 1mmol/Kg administrado a ratas. Sin embargo, en otro estudio una dieta de PEITC (0.1% en dos semanas) induce ambas fases del metabolismo xenobiótico (Conaway *et al.*, 2002).

El bencil isotiocianato (BITC) a 0.3 mmol/g en la dieta induce la actividad de GST en el intestino delgado y en hígado de rata (Conaway *et al.*, 2002).



El sulforafano (SF) (Fig. 4), producto del glucorafanin, el principal glucosinolato en el Brócoli, se ha reportado que es un potente inductor de enzimas de la fase II en cultivos de hepatocitos de rata (Conaway *et al.*, 2002).

Uno de los glucosinolatos que predomina es el glucobrasicin precursor del indol-3-carbinol (I3C) (Verhoeven *et al.*, 1997).

Una dieta rica en vegetales como el Brócoli contiene I3C, SF, diferentes flavonoides, vitamina C y otros compuestos. Estos juegan un papel muy importante en la prevención de enfermedades (Vallejo *et al.*, 2003). Sin embargo, algunos estudios no confirman que la prevención del cáncer se asocie con el consumo de Brassicaceae (Perocco *et al.*, 2006).

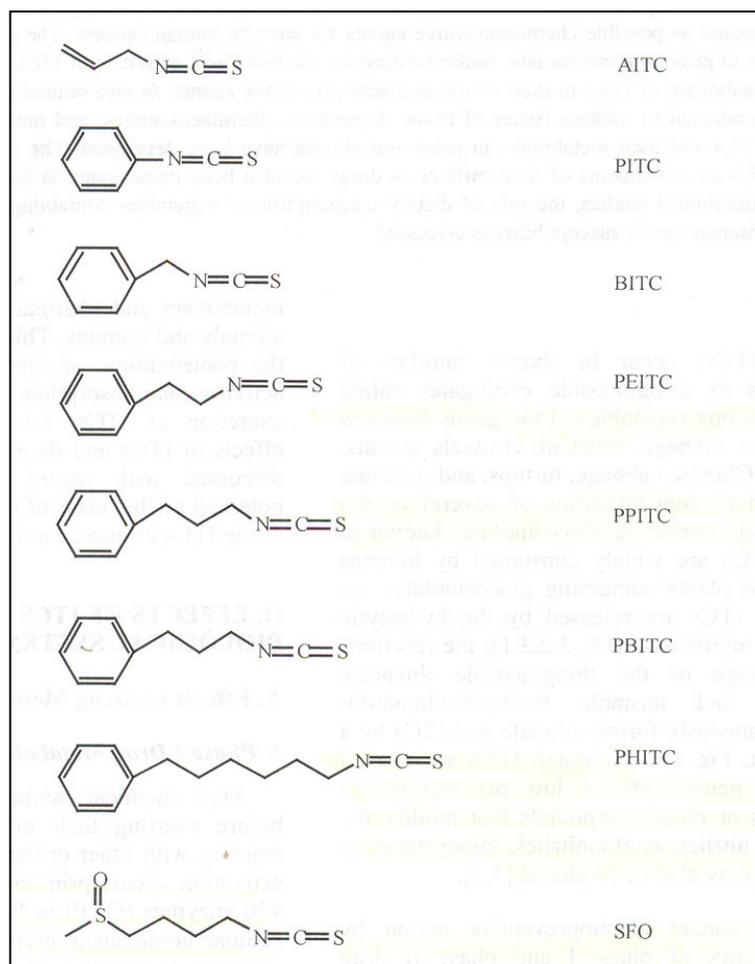


Figura 4. Estructura de los principales isotiocianatos

(Tomado de Conaway *et al.*, 2002).



Cultivo de *Brassica oleracea*

Las principales limitantes que los productores identifican en los cultivos son: las plagas, la falta de fertilidad en el suelo y las enfermedades de la planta. Para mitigarlas han recurrido a soluciones tecnológicas basadas en el empleo intensivo de insumos industriales. En estudios realizados por Santiago y Perales (2007) con cultivos de col (*Brassica oleracea* var. capitata) en el estado de Chiapas se encontró que para controlar las plagas, 90% de los productores aplican productos insecticidas sintéticos. De estos, 79% ocupan productos del grupo toxicológico II (altamente tóxico), 15% utiliza productos clasificados como extremadamente tóxicos (I) y 6% usan productos del nivel III (moderadamente tóxicos). Los productos organofosforados como Metomidofos y Paratión fueron los más frecuentemente mencionados para el control de las plagas de col, 75% y 15% respectivamente; estos productos están autorizados para este tipo de cultivo.

80% de los productores aplica los insecticidas en una dosis inadecuada y debido a la frecuente aplicación difícilmente se respeta el intervalo de seguridad, que es el tiempo que debe transcurrir entre la última aplicación y la cosecha para evitar residuos superiores al máximo permitido (Santiago y Perales, 2007).

En general, 66% de los productores aplica una combinación de productos químicos y orgánicos, 23% solamente aplica fertilización química y 11% aplica exclusivamente abonos orgánicos (Santiago y Perales, 2007).

Para controlar las enfermedades en el cultivo de col 82% de los productores realizan aplicaciones de funguicidas. De éstos, 98% utilizan el ditiocarbamato Mancozeb, 1% el benomyl Bencimidazol y el 1% restante usa el producto inorgánico Oxiclورو de cobre. Estos tres productos están clasificados con Toxicidad III (moderadamente tóxicos) según la norma NOM-Y-302 (Santiago y Perales, 2007).

Los riesgos a la salud tanto de productores como de consumidores son múltiples ya que estas sustancias tienen efectos inmediatos y a largo plazo. Por ejemplo, la biotransformación de los ditiocarbamatos es compleja y conduce a la formación de varios productos como la etilentiourea (ETU) que se forma *in vivo*, en el ambiente y durante la cocción de alimentos que contienen residuos de este tipo de funguicidas. Se ha comprobado que la ETU es cancerígena, mutagénica, teratogénica y antitiroidea. Por lo



tanto, su presencia en los alimentos, como resultado del uso de estos funguicidas, es una causa importante de preocupación (Santiago y Perales, 2007).

La vida de almacenamiento y retención de la calidad de este vegetal puede ser de cinco a seis meses bajo las condiciones apropiadas de refrigeración, las cuales deben incluir una temperatura de 0° C y humedad relativa mayor al 95% (Agronegocios, 2002; OSU, 2002). Sin embargo, los productores de col en Los Altos de Chiapas no cuentan con infraestructura de almacenamiento, por lo que 98% de ellos comercializa su producto inmediatamente después de la cosecha; 85% lo traslada a los almacenes de los intermediarios mayoristas en los mercados regionales, principalmente de San Cristóbal Teopisca, Comitán y Tuxtla Gutiérrez. El 13% de los productores vende su producto en los mercados locales o en la misma parcela a intermediarios mayoristas. Sólomente 2% siembra este vegetal para autoabasto familiar (Santiago y Perales, 2007).



CARBAMATO DE ETILO (URETANO)

El carbamato de etilo (uretano) ($\text{NH}_2 \text{COOCH}_2\text{CH}_3$) (Fig. 5) 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 solvente 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 (Frölich y Würgler, 1990; Sakano *et al.*, 2002). El uretano es también producto de los procesos de fermentación de alimentos y bebidas alcohólicas (Abraham *et al.*, 1998; Hoffler *et al.*, 2003; Uthurry *et al.*, 2004).

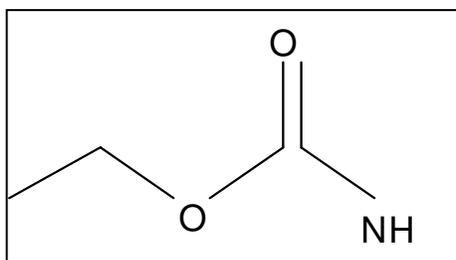


Figura 5. Carbamato de etilo
(Tomado de Kempler *et al.*, 1995).

La Agencia Internacional para la Investigación del 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 (Kempler *et al.*, 1995). El uretano es un cancerígeno múltiple en animales de laboratorio que provoca linfomas, hepatomas, melanomas y tumores de pulmón (Sakano *et al.*, 2002; Hoffler *et al.*, 2003).

El uretano es un promutágeno que debe ser metabolizado para ocasionar daños al DNA (Kempler *et al.*, 1995). El metabolismo del uretano puede llevarse a cabo al menos por tres caminos. En el primero, el uretano es hidrolizado por esterasas a etanol, amonio y dióxido de carbono por lo que es excretado sin causar daño (Fig. 6) (Woo Cha *et al.*, 2000). En el segundo, el uretano es transformado por los CYP450 a vinil carbamato epóxido, que puede formar aductos con el DNA (Kempler *et al.*, 1995; Hübner *et al.*, 1997; Hoffler *et al.*, 2003). En el tercero, el uretano es convertido por los CYP450 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 esterasas, formando hidroxilamina, un compuesto genotóxico (Woo Cha *et al.*, 2000).

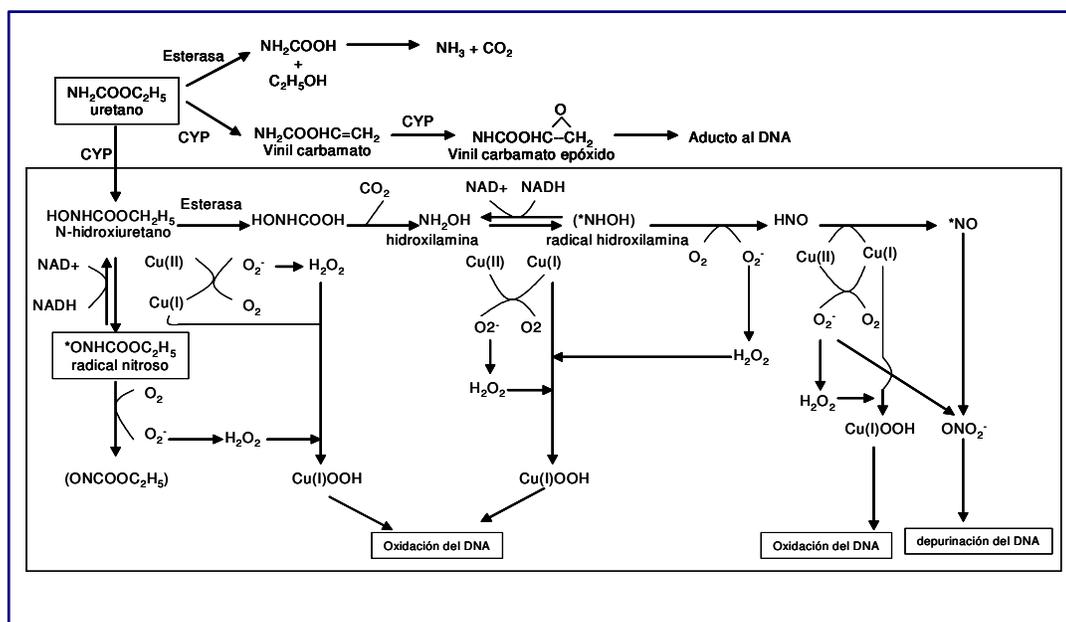


Figura 6. Metabolismo del uretano

(Tomado de Sakano *et al.*, 2002).

Además Sakano *et al.* (2002) proponen que la hidroxilamina puede llegar a producir óxido nítrico *in vivo* causando daños por oxidación y depuración al DNA (Fig. 7) en presencia de cobre, el cual puede ser obtenido de las regiones heterocromáticas de la cromatina.

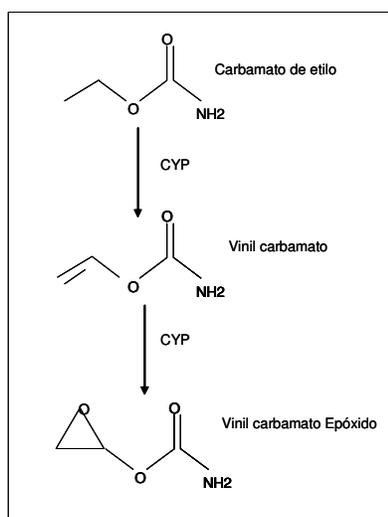


Figura 7. Oxidación del uretano a vinil carbamato epóxido

(Tomado de Kempler *et al.*, 1995).



METIL METANOSULFONATO (MMS)

El metil metanosulfonato (MMS) (Fig. 8) es utilizado como solvente, insecticida y agente quimioterapéutico. Es tóxico en animales y humanos y carcinogénico, mutagénico y teratogénico en roedores. Se usa como solvente en catálisis de polimerización, alquilación y reacciones de esterificación y en investigaciones de quimioterapia en cáncer.

Es un alquilante mutagénico, que posee gran afinidad a centros nucleofílicos del DNA como el N7G. El MMS es un agente directo, porque no necesita ser metabolizado para inducir alquilaciones al DNA (Friedberg *et al.*, 1995).

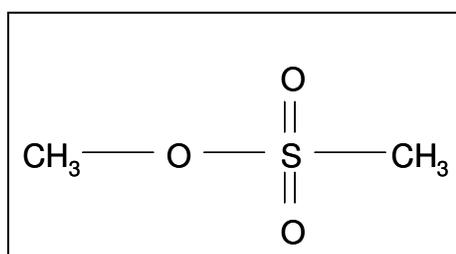


Figura 8. Metil metanosulfonato (MMS)
(Tomado de Dueñas-García *et al.*, 2005).

Los agentes alquilantes son conocidos por su capacidad para generar especies metiladas y etiladas que interactúan con diferentes tipos de biomoléculas como el DNA. El mecanismo molecular de acción de los agentes alquilantes es conocido. Estudios previos en agentes alquilantes como el MMS revelan que es posible correlacionar tipos específicos de aductos de DNA con varios genes en *Drosophila* y en células de mamífero (Rodríguez-Arnáiz *et al.*, 1996).



4-NITROQUINOLINA-1-ÓXIDO (4-NQO)

La 4-nitroquinolina-1-óxido (4-NQO) (Fig. 9) es un potente mutágeno y carcinogénico. Causa aberraciones cromosómicas en células de mamíferos e induce mutación de genes en algunos organismos (Ong *et al.*, 1975) y cáncer en varios tejidos, particularmente en pulmón, páncreas y estomago (Bailleul *et al.*, 1989; Pecklak-Scott *et al.*, 2005).

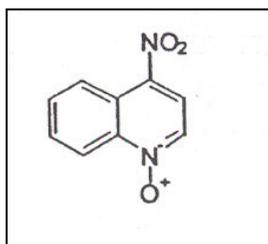


Figura 9. La 4-nitroquinolina-1-óxido (4-NQO)
(Tomado de Heres- Pulido *et al.*, 2004).

Este carcinógeno pluripotente incrementa los radicales de oxígeno (ROS), produce rompimientos sencillos en la cadena de DNA (SSBs) y sitios alquilo lábiles igual que la luz UV.

El metabolismo xenobiótico de 4-NQO produce el metabolito acetoxiaminoquinolina (Ac-4-HAQO), este metabolito reacciona con el DNA para formar tres aductos de purina. Así como las fotolesiones producidas por la luz UV, los aductos 4-NQO-DNA pueden ser reparados por escisión de nucleotidos (NER) (Mirzayans *et al.*, 1999); esta actividad incrementa los eventos de recombinación dependiendo del metabolismo por las enzimas de los CYP450 (Heres- Pulido *et al.*, 2004). La 4-NQO muestra especificidad por sustitución de pares de bases (90%), principalmente la transición de G-A, poca conversión de G-T y una sustitución rara de adeninas (Bailleul *et al.*, 1989).

Los aductos estables de 4-NQO *in vivo* y de (Ac-4-HAQO) *in vitro* son 3-(deoxiguanosin-N2)-4-amino-quinolina 1-oxido (dGuo-N2-AQO) y N-(deoxiguanosin-C8)-4-aminoquinolina 1-óxido (dGuo-C8-AQO) en guanina y 3-(deoadenosin-N6)-4-aminoquinolina 1-óxido (dAdo-N6-AQO) en adenina (Fig. 10) (Bailleul *et al.*, 1989; Rodolfo *et al.*, 1994).

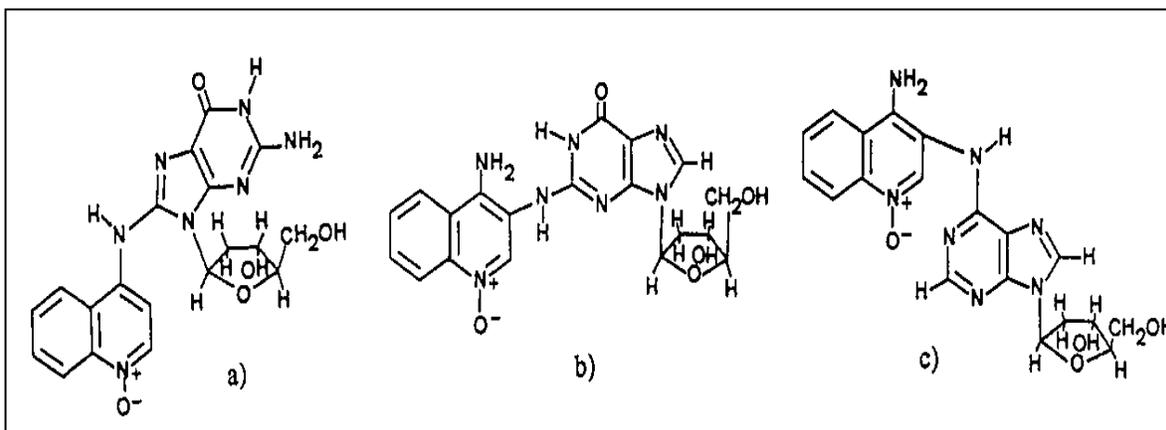


Figura 10. Estructura de los aductos de 4-NQO. a) dGuo-C8-AQO; b) dGuo-N2-AQO; c) dAdo-N6-AQO

(Tomado de Bailleu *et al.*, 1989).

El metabolito de 4-NQO es acetilado, se pega al DNA produciendo monoadductos quinolina-purina en la posición N2 y C8 de guanina y N6 de adenina (Bailleu *et al.*, 1989). Investigaciones recientes han demostrado que 4-NQO, a diferencia de 254 nm de UV, puede generar un grado intracelular de estrés oxidativo (Ramotar *et al.*, 1998). 4-NQO produce anión superóxido, el cual puede convertirse en una especie reactiva de oxígeno genotóxica (Hang *et al.*, 2007).



Drosophila melanogaster

La mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* ha sido empleada como organismo modelo para el estudio de la Genética, desde el nacimiento de esta disciplina a principios del siglo XX.

Las ventajas de la mosca de la fruta para poder realizar investigaciones sobre biología celular y evolutiva son, entre otras: un tamaño pequeño (cultivo en espacios reducidos), ciclo de vida corto de aproximadamente 10 días a 25° C con una humedad relativa de 60% (Jiménez y Merchant, 2003) (Anexo 1), cientos de descendientes por generación, lo cual es estadísticamente conveniente, cientos de variedades mutantes disponibles, un genoma de cuatro pares de cromosomas totalmente mapeados y secuenciados (Adams *et al.*, 2000; Bernards y Hariharan, 2001).

Drosophila melanogaster tiene enzimas CYP450 similares a las que se encuentran en la fracción S9 de hígado de mamíferos (Clark, 1982). Además se ha probado que la familia CYP6 de *D. melanogaster* muestra una fuerte homología con la familia CYP3 de vertebrados, junto con la familia CYP2, las cuales son responsables del metabolismo de drogas en vertebrados (Danielson *et al.*, 1998).

PRUEBA DE MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN SOMÁTICAS (SMART)

La Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas (SMART) en el ala de *D. melanogaster* se utiliza para determinar la actividad mutagénica (mutaciones puntuales, deleciones, aneuploidías) y recombinogénica provocada por agentes químicos en sistemas eucariotos *in vivo* (Spanó *et al.*, 2001). Esta prueba ha demostrado ser eficaz al confirmarse con más de 400 agentes químicos, puros y en mezclas (Vogel *et al.*, 1999) (Anexo 2).



ANTECEDENTES

López (2004) estudió Brócoli de supermercado con la cruza BE de la prueba SMART y encontró reducciones dependientes de la concentración estadísticamente significativas en las frecuencias de mutación espontánea para todos los tipos de manchas.

Santos (2006) evaluó la interacción del Brócoli orgánicamente cultivado con etil carbamato (uretano) en la prueba SMART y no demostró protección en ambas cruzas.

Gómez (2008, en prensa) evaluó la interacción del Brócoli orgánicamente cultivado con el mutágeno radiomimético 4NQO (2 mM). Encontró diferencias significativas entre las cruzas: resultados negativos en E y positivos en HB. Sin embargo, los co-tratamientos 4NQO-Brócoli fueron positivos con una clara respuesta según aumentaba la concentración de Brócoli. Finalmente, en la cruza BE encontró reducciones estadísticamente significativas también dependientes de la concentración.

Vega (2006) demostró que el Brócoli orgánicamente cultivado no protege del daño provocado por el MMS y que su interacción produce un efecto sinérgico en ambas cruzas.



JUSTIFICACIÓN

Un alto porcentaje de la evidencia experimental acumulada sobre el Brócoli señala que posee un efecto protector contra el cáncer mientras otros autores concluyen lo contrario. Los estudios del Proyecto del Laboratorio de Genética Toxicológica también muestran controversia, por tanto, se realizará el estudio de la Interacción del Brócoli de supermercado (*Brassica oleracea, var. italica*) con el etilcarbamato (uretano), metil metanosulfonato (MMS) y 4-nitroquinolina-1 óxido (4-NQO) en las cruces Estándar (E) y Bioactivación Elevada (BE) de la prueba SMART en ala de *Drosophila melanogaster*.

HIPÓTESIS

El Brócoli ha sido reportado como antigenotóxico y antimutagénico; por su contenido de glucosinolatos (ITC y SF). Por lo tanto se espera que al adicionarle Brócoli de supermercado al medio de cultivo y a los diferentes co-tratamientos baje la tasa de mutación basal e/o inducida.



OBJETIVOS

Objetivo General:

Estudiar la interacción del Brócoli (*Brassica oleracea*, var. *italica*) con etil carbamato (uretano), metilmetanosulfonato (MMS) y 4-nitroquinolina-1óxido (4-NQO) en las cruzas Estándar (E) y Bioactivación Elevada (BE) de la prueba SMART en ala de *Drosophila melanogaster*.

Objetivo Particular:

Comparar los resultados de éste protocolo con los antecedentes del Brócoli orgánicamente cultivado y el ITC (SF) retados con estos mutágenos.



MATERIALES

Químicos

- Etil carbamato (Uretano) $\text{NH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ (Fluka 94300 CAS no. 51-79-6).
- Metilmetanosulfato (MMS) CAS no. 66-27-3 (Sigma, St Luis, MO, USA).
- 4-nitroquinolina-1-óxido (4-NQO) CAS no. 62-75-9
- Brócoli (*Brassica oleracea var. italica*) se adquirió en el supermercado.
- Medio Instantáneo Carolina (MIC) (Carolina Biological Supply Company, Burlington, North Carolina).
- Solución conservadora (5 ml de tegosept al 12 % (OH), 5 ml de ácido propionico: ácido ortofosforico (1:10) y 1 litro de agua) (Dueñas *et al.*, 2001).
- Solución de Faure (30 g de goma arábiga, 20 ml de glicerol, 50 g de hidrato de cloral y 50 ml de agua).
- Agua desionizada.
- Tween 80 Sigma CAS no.9005-65-5
- Etanol absoluto (Merck. Darmstadt, Germany).

Líneas de *Drosophila melanogaster*

- Oregon-*flare*³ (ORR(1); ORR(2); *flr*³/TM3, *Bd*^S),
- *flare*³ (*flr*³/TM3, *Bd*^S)
- *mwh* (*mwh/mwh*)

Las líneas se cultivan en el Laboratorio de Genética Toxicológica de la FES-Iztacala, UNAM., originalmente donadas por el Dr. Graf del Swiss Federal Institute of Technology y 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 propagaron en frascos de vidrio de 250 ml con 5 g de hojuela de papa y 20 ml de solución conservadora (Dueñas *et al.*, 2001) en una incubadora a 25° C, humedad relativa de 65% y total oscuridad.

Liofilización del Brócoli de supermercado:

El Brócoli fresco de supermercado se liofilizó a -50° C en una liofilizadora modelo LABCONCO, Freeze Dry System Lock 4.5, por 24hrs.

Prueba de Genotoxicidad (SMART)

Cruzas Estándar (E) y Bioactivación Elevada (BE):

Se separaron hembras vírgenes de las cepas Oregon-*flare*³, *flare*³ y machos de la cepa *mwh*, basándose en el dimorfismo sexual, ya que los machos presentan 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. También se observaron 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 (Rodríguez-Arnáiz y Ramos, 1992).

La cruce E se realizó con hembras vírgenes *flare*³ (*flr*³/TM3, *Bd*^S) y machos *mwh* (*mwh/mwh*), y la cruce BE con hembras vírgenes Oregon-*flare*³ (ORR(1); ORR(2); *flr*³/TM3, *Bd*^S), y machos *mwh* (*mwh/mwh*). Las cruces se mantuvieron en frascos con hojuela de papa hidratada por tres días. Al término de este tiempo las moscas se trasvasaron a frascos con levadura fresca activada, 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.

Se realizaron tres experimentos independientes con tres repeticiones por tratamiento colocando aproximadamente la misma cantidad de larvas de 72 ± 4 h en tubos de ensayo con los diferentes tratamientos (Cuadro 2).



Las larvas tratadas permanecieron en la incubadora a 25° C y 65% de humedad. Al emerger los imagos se colocaron en frascos con alcohol al 70%. Se separaron las moscas con las alas de fenotipo silvestre (trans-heterocigotas) para diseccionar las alas y montarlas en preparaciones permanentes con solución de Faure. Se analizaron las superficies dorsal y ventral de éstas 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.

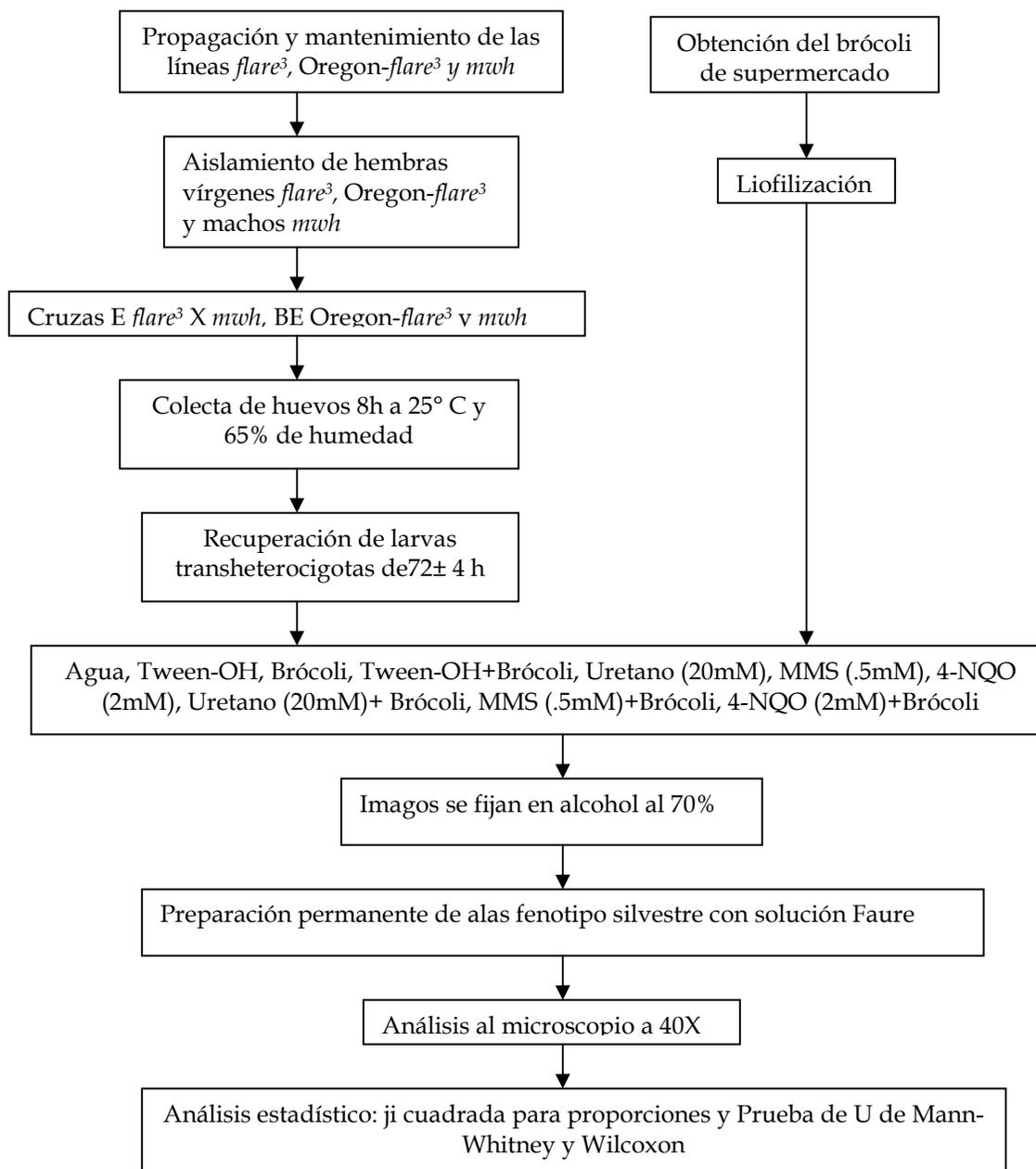
Para el análisis estadístico se utilizó el programa SMART para PC; donde se evaluó la frecuencia de las manchas en las alas con: ji cuadrada para proporciones y para los resultados débiles (w) o indecisos (i) se empleó la Prueba de U de Mann-Whitney y Wilcoxon que considera la variabilidad individual.

Cuadro 2. Diseño Experimental

| Tratamiento | Solución (2ml). | Medio instantáneo (g). | Brócoli de supermercado (g). |
|--------------------------|-----------------|------------------------|------------------------------|
| Testigo Agua | Agua | 0.5 | - |
| Testigo Tween-OH | Tween-OH | 0.5 | - |
| Testigo Tween-OH-Brócoli | Tween-OH | - | 0.5 |
| Testigo Brócoli | Agua | - | 0.5 |
| Uretano | Uretano (20mM) | 0.5 | - |
| MMS | MMS (.5 mM) | 0.5 | - |
| 4-NQO | 4-NQO (2 mM) | 0.5 | - |
| Uretano-Brócoli | Uretano (20mM) | - | 0.5 |
| MMS-Brócoli | MMS (.5 mM) | - | 0.5 |
| 4-NQO-Brócoli | 4-NQO (2 mM) | - | 0.5 |



DIAGRAMA METODOLÓGICO



Cuadro 3. Resultados de la prueba SMART, Cruzas Estándar (E) y Bioactivación Elevada (BE) para Agua, Brócoli, T-OH y TOH+Brócoli

| Componentes | No. de ind. | Manchas por mosca (Número de manchas) Diagnóstico est. ^a | | | | Manchas con clones <i>mwh</i> | No. de células división | Frecuencia de formación de x 10 ⁻⁵ células | |
|-------------------|-------------|---|------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------------|-------------------------|---|-------------------|
| | | Manchas pequeñas (1-2 células) m = 2 | Manchas grandes (>2 células) m = 5 | Manchas gemelas m = 5 | Manchas totales m = 2 | | | observada | control corregido |
| Conc. (mM) | | | | | | | | | |
| A | | | | | | | | | |
| Cruza (E) | | | | | | | | | |
| AGUA | 60 | 0.47 (28) | 0.05 (3) | 0.00 (0) | 0.52 (31) | 28 | 1.25 | 1.9 | |
| BRÓCOLI | 57 | 0.70 (40)ns | 0.12 (7)- | 0.02 (1)ns | 0.84 (48)+ | 47 | 1.70 | 3.4 | 1.5 |
| Cruza (BE) | | | | | | | | | |
| AGUA | 60 | 0.72 (43) | 0.17 (10) | 0.00 (0) | 0.88 (53) | 53 | 1.87 | 3.6 | |
| BROCOLI | 57 | 1.46 (83)+ | 0.12 (7)- | 0.00 (0)i | 1.58 (90)+ | 90 | 1.43 | 6.5 | 2.9 |
| B | | | | | | | | | |
| Cruza (E) | | | | | | | | | |
| T-OH | 60 | 0.27 (16) | 0.08 (5) | 0.00 (0) | 0.35 (21) | 20 | 2.40 | 1.4 | |
| T-OH+B | 55 | 1.85 (102)+ | 0.29 (16)+ | 0.00 (0)i | 2.15 (118)+ | 118 | 1.78 | 8.8 | 7.4 |
| Cruza (BE) | | | | | | | | | |
| T-OH | 50 | 0.38 (19) | 0.08 (4) | 0.00 (0) | 0.46 (23) | 23 | 1.91 | 1.9 | |
| T-OH+B | 53 | 1.53 (81) + | 0.34 (18)+ | 0.00 (0)i | 1.87 (99)+ | 96 | 1.77 | 7.4 | 5.5 |

T-OH= Tween-Alcohol; B= Brócoli.^a Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Würzler (1988).

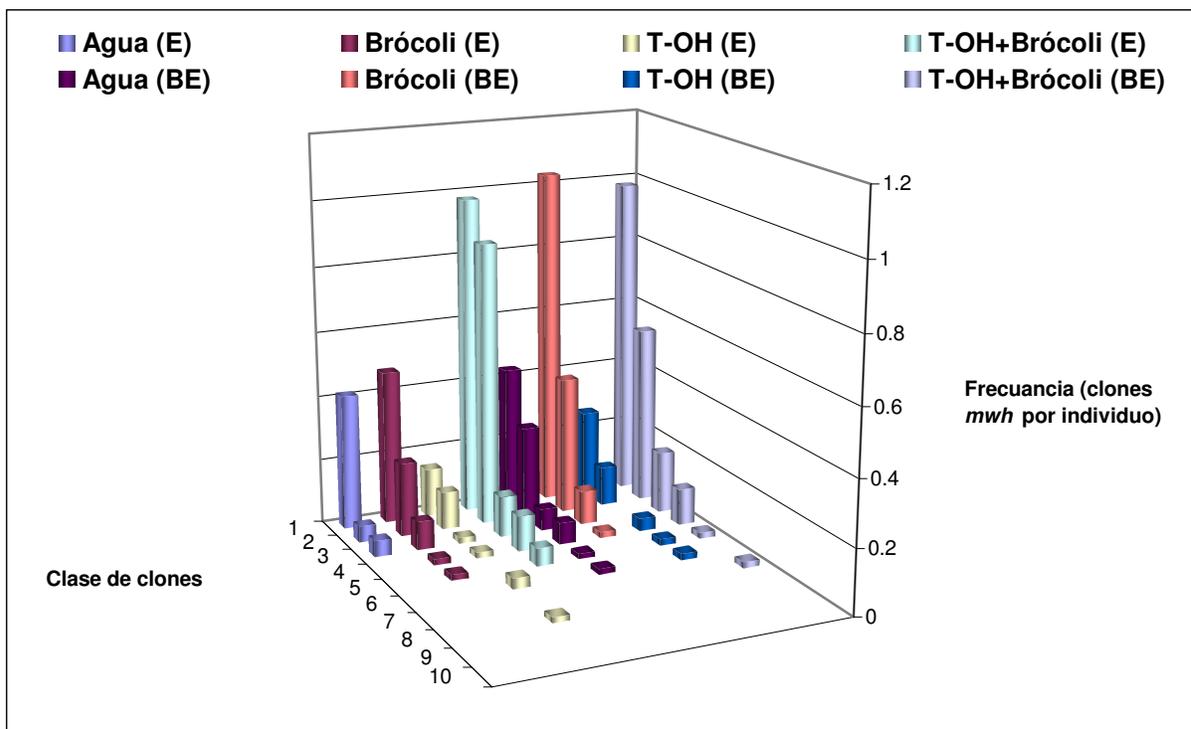
m: riesgo mínimo del factor de multiplicación para la valoración de los resultados negativos.

+ = positivo; - = negativo; i = inconcluso; ns= no significativo.

Niveles de probabilidad: alfa = beta = 0.05. Prueba estadística de un "factor".

El tamaño de clon (mancha) representa 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), 8(65-128), 9(129-256), 10(257-+) del disco imagal del ala.

La Gráfica 2 muestra la distribución del tamaño del clon *mwh* por individuo para cada testigo. Se observa el aumento de clones de dos células de 2.5 veces del testigo Brócoli con respecto al Agua. La frecuencia de clones en el testigo T-OH+Brócoli aumentó en ambas cruizas con respecto al testigo T-OH.



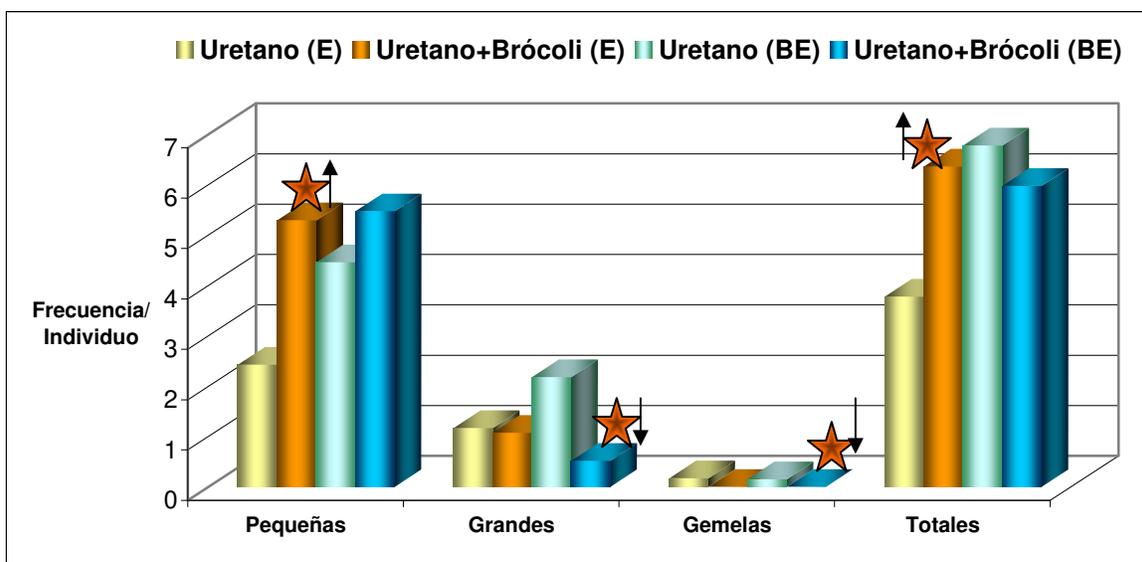
Gráfica 2. Distribución de tamaño de clones *mwh* por individuo para los testigos Agua, T-OH, Brócoli y T-OH+Brócoli en las cruizas Estándar (E) y Bioactivación Elevada (BE).

URETANO

En el Cuadro 4A se muestran los resultados SMART para el tratamiento Uretano, que generó resultados positivos en ambas cruzas, al compararlos con el testigo Agua; en la cruz BE la frecuencia fue mayor para todos los tipos de manchas por los altos niveles constitutivos de CYP450 que metabolizan este promutágeno.

En la cruz E el co-tratamiento Uretano+Brócoli mostró un aumento significativo en el número de manchas pequeñas con respecto al testigo Uretano, lo cual se refleja en la frecuencia de manchas totales (Cuadro 4B y Gráfica 3) e indica un efecto sinérgico del Brócoli de supermercado con el Uretano.

En la cruz BE en el co-tratamiento Uretano+Brócoli se observó un aumento en la frecuencia de manchas pequeñas y grandes con respecto al Agua, lo cual se refleja en la frecuencia de manchas totales. También se observó una disminución de las manchas gemelas para ambas cruzas (Cuadro 4A). El co-tratamiento Uretano+Brócoli mostró una disminución estadísticamente significativa en la frecuencia de manchas grandes y gemelas al compararlo con el testigo Uretano (Cuadro 4C y Gráfica 3).



Gráfica 3. Frecuencia de los diferentes tipos de manchas por individuo para el Uretano y el co-tratamiento Uretano+Brócoli en las cruzas Estándar (E) y Bioactivación Elevada (BE). La estrella señala la barra estadísticamente significativa con $p=95\%$. Significativo hacia arriba ↑, o hacia abajo ↓.

Cuadro 4. Resultados de la prueba SMART, Cruzas Estándar (E) y Bioactivación Elevada (BE) para Uretano y Uretano+Brócoli

| Componentes | No. de ind. | Manchas por mosca (Número de manchas) Diagnóstico est. ^a | | | | Manchas con clones <i>mwh</i> | No. de células división | Frecuencia de formación de x 10 ⁻⁵ células | |
|-------------|-------------|---|------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------------|-------------------------|---|-------------------|
| | | Manchas pequeñas (1-2 células) m = 2 | Manchas grandes (>2 células) m = 5 | Manchas gemelas m = 5 | Manchas totales m = 2 | | | observada | control corregido |
| A | | | | | | | | | |
| Cruza (E) | | | | | | | | | |
| AGUA | 60 | 0.47 (28) | 0.05 (3) | 0.00 (0) | 0.52 (31) | 28 | 1.25 | 1.9 | |
| BRÓCOLI | 57 | 0.70 (40)+ | 0.12 (7)- | 0.02 (1)+ | 0.84 (48)+ | 47 | 1.70 | 3.4 | 1.5 |
| URE | 20 | 2.43 (141)+ | 1.17 (68)+ | 0.17 (10)+ | 3.78 (219)+ | 181 | 1.93 | 12.8 | 10.7 |
| URE+B | 20 | 5.29 (74)+ | 1.07 (15)+ | 0.00 (0)i | 6.36 (89)+ | 89 | 1.70 | 26.1 | 24.2 |
| Cruza (BE) | | | | | | | | | |
| AGUA | 60 | 0.72 (43) | 0.17 (10) | 0.00 (0) | 0.88 (53) | 53 | 1.87 | 3.6 | |
| BROCOLI | 57 | 1.46 (83)+ | 0.12 (7)- | 0.00 (0)i | 1.58 (90)+ | 90 | 1.43 | 6.5 | 2.9 |
| URE | 20 | 4.46 (303)+ | 2.18 (148)+ | 0.15 (10)+ | 6.78 (461)+ | 357 | 1.86 | 21.5 | 17.9 |
| URE+B | 20 | 5.47 (350)+ | 0.52 (33)+ | 0.00 (0)i | 5.98 (383)+ | 382 | 1.51 | 24.5 | 20.9 |
| B | | | | | | | | | |
| Cruza (E) | | | | | | | | | |
| URE | 20 | 2.43 (141) | 1.17 (68) | 0.17 (10) | 3.78 (219) | 181 | 1.93 | 12.8 | 10.9 |
| URE+B | 20 | 5.29 (74) + | 1.07 (15)- | 0.00 (0)- | 6.36 (89)+ | 89 | 1.70 | 26.1 | 24.2 |
| C | | | | | | | | | |
| Cruza (BE) | | | | | | | | | |
| URE | 20 | 4.46 (303) | 2.18 (148) | 0.15 (10) | 6.78 (461) | 357 | 1.86 | 21.5 | 17.9 |
| URE+B | 20 | 5.47 (350)- | 0.52 (33)+• | 0.00 (0)+ | 5.98 (383)- | 382 | 1.51 | 24.5 | 20.9 |

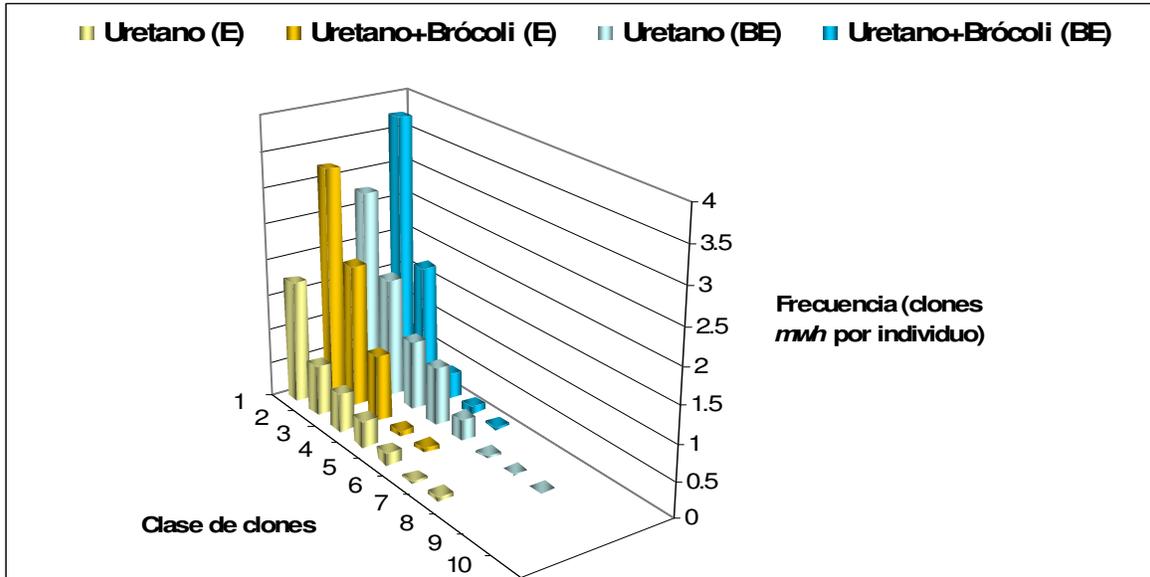
URE= URETANO; B= Brócoli. a Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Würzler (1988).

m: riesgo mínimo del factor de multiplicación para la valoración de los resultados negativos.

+ = positivo; - = negativo; i = inconcluso; •disminución.

Niveles de probabilidad: alfa = beta = 0.05. Prueba estadística de un "factor".

La Gráfica 4 muestra la distribución de los tamaños de clones *mwh* por individuo para el Uretano y el co-tratamiento Uretano+Brócoli en ambas cruzas. En la cruz E se observan diferencias significativas en el co-tratamiento Uretano+Brócoli donde la frecuencia de aumento con respecto al Uretano. En la cruz BE en el co-tratamiento las manchas grandes disminuyen.

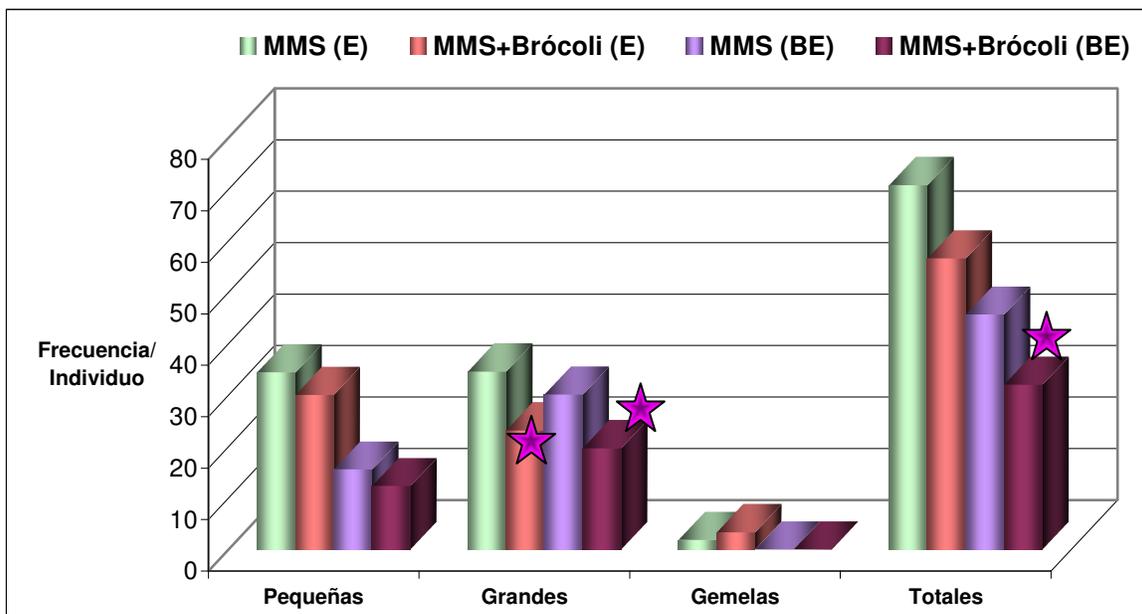


Gráfica 4. Distribución de tamaño de clones *mwh* por individuo para el Uretano y el co-tratamiento Uretano+Brócoli en las cruzas Estándar (E) y Bioactivación Elevada (BE).

MMS

En el Cuadro 5A se muestran los resultados SMART donde el MMS solo y con Brócoli arrojó resultados positivos en las cruzas E y BE al compararlos con el testigo Agua.

En el co-tratamiento MMS+Brócoli en ambas cruzas se observó menor frecuencia de manchas pequeñas y grandes que las observadas en el testigo MMS (Cuadro 5A). Para saber si estas diferencias eran significativas, se comparó el co-tratamiento MMS+Brócoli contra MMS obteniendo un resultado débil positivo en la frecuencia de manchas grandes en la cruz E (Cuadro 5B y Gráfica 5) y para la cruz BE resultados débiles positivos en manchas pequeñas y grandes que se refleja en la frecuencia de manchas totales (Cuadro 5C y Gráfica 5); por lo tanto, se efectuó la prueba de U de Mann-Whitney y Wilcoxon (Anexo 3), generando resultados estadísticamente significativos en la frecuencia de manchas grandes para la cruz E y para la cruz BE resultados significativos en manchas grandes y totales.



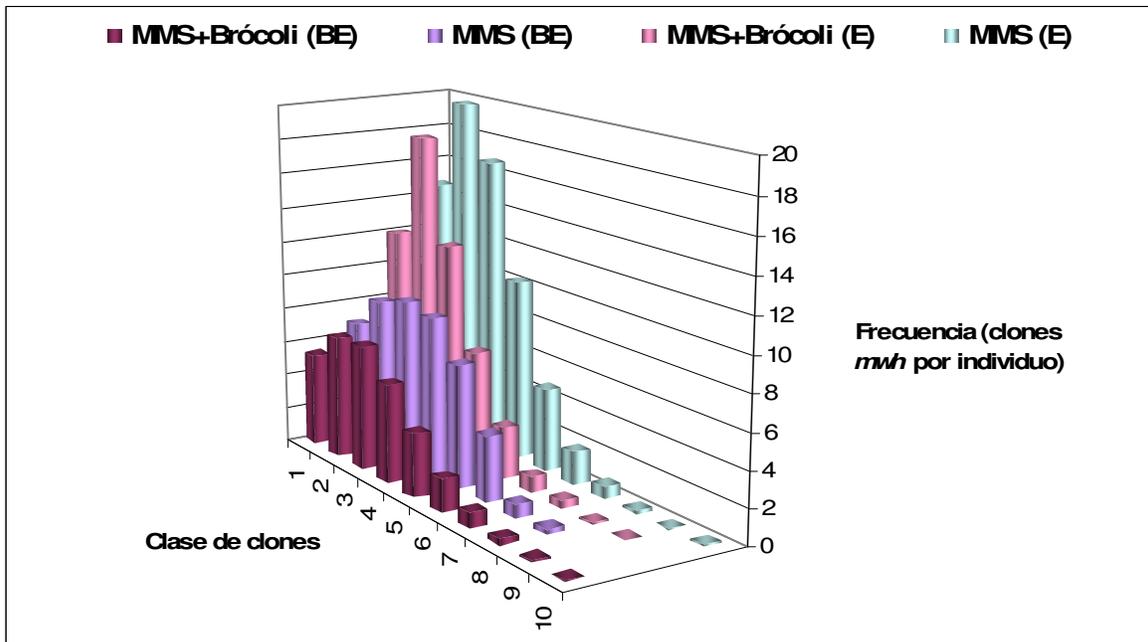
Gráfica 5. Frecuencia de los diferentes tipos de manchas por individuo para el MMS y el co-tratamiento MMS+Brócoli en las cruzas Estándar (E) y Bioactivación Elevada (BE). La estrella señala la barra estadísticamente significativa con p=95%

Cuadro 5. Resultados de la prueba SMART, Cruzas Estándar (E) y Bioactivación Elevada (BE) para MMS y MMS+Brócoli

| Componentes | No. de ind. | Manchas por mosca (Número de manchas) Diagnóstico est. ^a | | | | Manchas con clones <i>mwh</i> | No. de células división | Frecuencia de formación de | | |
|-------------|-------------|---|---------------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------------|-------------------------|----------------------------|-------------------|--|
| | | Manchas pequeñas | Manchas grandes | Manchas gemelas | Manchas totales | | | x 10 ⁻⁵ células | | |
| | | (1-2 células) m = 2 | (>2 células) m = 5 | m = 5 | m = 2 | | | observada | control corregido | |
| A | | | | | | | | | | |
| Cruza (E) | | | | | | | | | | |
| AGUA | 60 | 0.47 (28) | 0.05 (3) | 0.00 (0) | 0.52 (31) | 28 | 1.25 | 1.9 | | |
| BRÓCOLI | 57 | 0.70 (40) <i>i</i> | 0.12 (7) <i>i</i> | 0.02 (1) <i>i</i> | 0.84 (48) ⁺ | 47 | 1.70 | 3.4 | 1.5 | |
| MMS | 0.5 55 | 34.40 (1892) ⁺ | 34.56 (1901) ⁺ | 1.82 (100) ⁺ | 70.78 (3893) ⁺ | 3870 | 2.75 | 288.7 | 286.7 | |
| MMS+B | 0.5 55 | 30.04 (1652) ⁺ | 23.16 (1274) ⁺ | 3.35 (184) ⁺ | 56.55 (3110) ⁺ | 2985 | 2.57 | 222.6 | 220.7 | |
| Cruza (BE) | | | | | | | | | | |
| AGUA | 60 | 0.72 (43) | 0.17 (10) | 0.00 (0) | 0.88 (53) | 53 | 1.87 | 3.6 | | |
| AGUA+B | 57 | 1.46 (83) ⁺ | 0.12 (7) ⁻ | 0.00 (0) <i>i</i> | 1.58 (90) ⁺ | 90 | 1.43 | 6.5 | 2.9 | |
| MMS | 0.5 11 | 15.55 (171) ⁺ | 30.09 (331) ⁺ | 0.00 (0) <i>i</i> | 45.64 (502) ⁺ | 502 | 3.35 | 187.2 | 183.6 | |
| MMS+B | 0.5 35 | 12.34 (432) ⁺ | 19.69 (689) ⁺ | 0.00 (0) <i>i</i> | 32.03 (1121) ⁺ | 1120 | 3.22 | 131.3 | 127.7 | |
| B | | | | | | | | | | |
| Cruza (E) | | | | | | | | | | |
| MMS+B | 0.5 55 | 30.04 (1652) | 23.16 (1274) | 3.35 (184) | 56.55 (3110) | 2985 | 2.57 | 222.6 | | |
| MMS | 0.5 55 | 34.40 (1892) ⁻ | 34.56 (1901) [*] | 1.82 (100) ⁻ | 70.78 (3893) ⁻ | 3870 | 2.75 | 288.7 | 66.0 | |
| C | | | | | | | | | | |
| Cruza (BE) | | | | | | | | | | |
| MMS+B | 0.5 35 | 12.34 (432) | 19.69 (689) | 0.00 (0) | 32.03 (1121) | 1120 | 3.22 | 131.3 | | |
| MMS | 0.5 11 | 15.55 (171) <i>ns</i> | 30.09 (331) <i>w*</i> | 0.00 (0) <i>i</i> | 45.64 (502) [*] | 502 | 3.35 | 187.2 | 55.9 | |

MMS = Metil metanosulfonato; B= Brócoli. ^a Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Würigler (1988).
m: riesgo mínimo del factor de multiplicación para la valoración de los resultados negativos.
+ = positivo; - = negativo; w = débil positivo; i = inconcluso y ns= no significativo
Niveles de probabilidad: alfa = beta = 0.05. Prueba estadística de un "factor". *p=0.05

La Gráfica 6 muestra la distribución de los tamaños de clones *mwh* por individuo para el MMS y el co-tratamiento MMS+Brócoli en las cruzas E y BE. El co-tratamiento MMS+Brócoli muestra una disminución en los clones de una célula con respecto al MMS, en ambas cruzas.

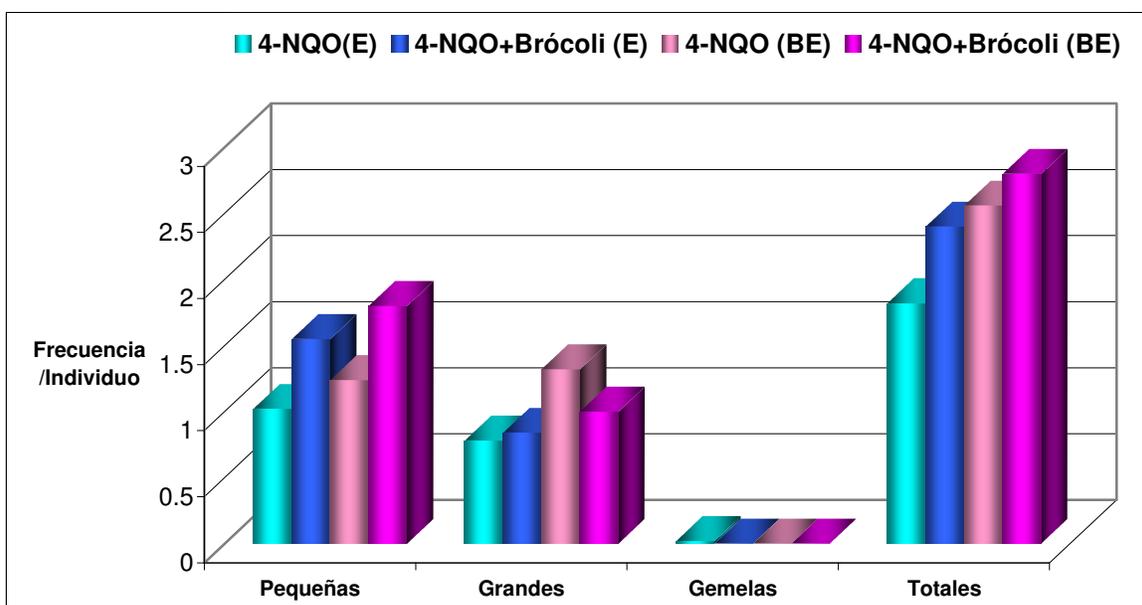


Gráfica 6. Distribución de tamaño de clones *mwh* por individuo para el MMS y el co-tratamiento MMS+Brócoli en las cruzas Estándar (E) y Bioactivación Elevada (BE).

4-NQO

En el Cuadro 6A se muestran los resultados SMART para ambas cruzas con 4-NQO, el cual arrojó resultados positivos en E y BE, como se esperaba para este mutágeno radiomimético. El co-tratamiento 4-NQO+Brócoli también resultó positivo al compararlo con el testigo T-OH en ambas cruzas.

Para saber si existían diferencias significativas entre el co-tratamiento 4-NQO+Brócoli y la 4-NQO se compararon con el programa SMART (Cuadro 6B, 6C y Gráfica 7), obteniendo resultados débiles positivos para las manchas pequeñas y totales en cruz E y débiles positivos (w) en las machas pequeñas en la cruz BE; por lo tanto, se realizó la prueba de U de Mann-Whitney y Wilcoxon, que arrojó un resultado no significativo para cada caso (Anexo 3).



Gráfica 7. Frecuencia de los diferentes tipos de manchas por individuo para 4NQO y el co-tratamiento 4NQO + Brócoli en las cruzas Estándar (E) y Bioactivación Elevada (BE).

Cuadro 6. Resultados de la prueba SMART, Cruza Estándar (E) y Bioactivación Elevada (BE) 4NQO y 4NQO+Brócoli

| Componentes | No. de ind. | Manchas por mosca (Número de manchas) Diagnóstico est. ^a | | | | Manchas con clones <i>mwh</i> | No. de células división | Frecuencia de formación de | | |
|-------------|-------------|---|------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------|-----|
| | | Manchas pequeñas (1-2 células) m = 2 | Manchas grandes (>2 células) m = 5 | Manchas gemelas m = 5 | Manchas totales m = 2 | | | observada | control corregido | |
| | Conc. (mM) | | | | | | x 10 ⁻⁵ células | | | |
| A | | | | | | | | | | |
| Cruza (E) | | | | | | | | | | |
| T-OH | | 60 | 0.27 (16) | 0.08 (5) | 0.00 (0) | 0.35 (21) | 20 | 2.40 | 1.4 | |
| T-OH+B | | 55 | 1.85 (102)+ | 0.29 (16)+ | 0.00 (0)i | 2.15 (118)+ | 118 | 1.78 | 8.8 | 7.4 |
| 4NQO | 2 | 60 | 1.02 (61) + | 0.78 (47)+ | 0.02 (1)i | 1.82 (109)+ | 109 | 2.69 | 7.5 | 6.1 |
| 4NQO+B | 2 | 58 | 1.55 (90) + | 0.84 (49)+ | 0.00 (0)i | 2.40 (139)+ | 123 | 2.07 | 8.7 | 7.3 |
| Cruza (BE) | | | | | | | | | | |
| T-OH | | 50 | 0.38 (19) | 0.08 (4) | 0.00 (0) | 0.46 (23) | 23 | 1.91 | 1.9 | |
| T-OH+B | | 53 | 1.53 (81) + | 0.34 (18)+ | 0.00 (0)i | 1.87 (99) + | 96 | 1.77 | 7.4 | 5.5 |
| 4NQO | 2 | 59 | 1.24 (73) + | 1.32 (78)+ | 0.00 (0)i | 2.56 (151)+ | 150 | 2.66 | 10.4 | 8.5 |
| 4NQO+B | 2 | 49 | 1.80 (88) + | 1.00 (49)+ | 0.00 (0)i | 2.80 (137)+ | 135 | 2.33 | 11.3 | 9.4 |
| B | | | | | | | | | | |
| Cruza (E) | | | | | | | | | | |
| 4NQO | 2 | 60 | 1.02 (61) | 0.78 (47) | 0.02 (1) | 1.82 (109) | 109 | 2.69 | 7.5 | 6.1 |
| 4NQO+B | 2 | 58 | 1.55 (90)ns | 0.84 (49)- | 0.00 (0)i | 2.40 (139)ns | 123 | 2.07 | 8.7 | 7.3 |
| C | | | | | | | | | | |
| Cruza (BE) | | | | | | | | | | |
| 4NQO | 2 | 59 | 1.24 (73) | 1.32 (78) | 0.00 (0) | 2.56 (151) | 150 | 2.66 | 10.4 | 8.5 |
| 4NQO+B | 2 | 49 | 1.80 (88)ns | 1.00 (49)- | 0.00 (0)i | 2.80 (137)- | 135 | 2.33 | 11.3 | 9.4 |

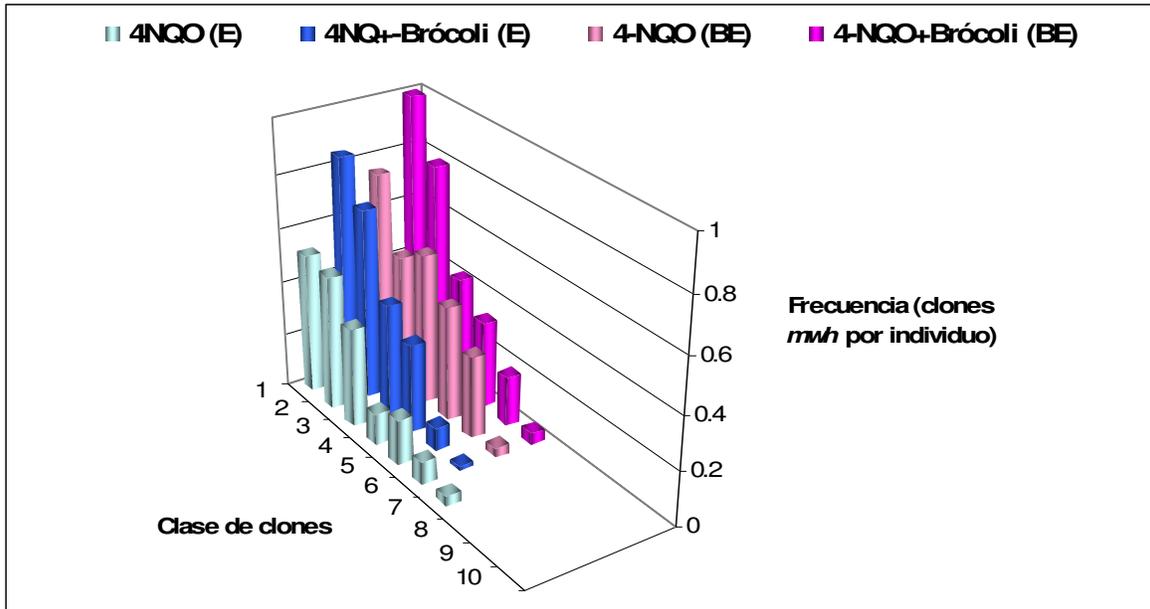
4NQO= 4-Nitroquinolina-1 óxido; B= Brócoli. ^a Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Würzler (1988).

m: riesgo mínimo del factor de multiplicación para la valoración de los resultados negativos.

+ = positivo; - = negativo; w = débil positivo; i = inconcluso y ns=no significativo

Niveles de probabilidad: alfa = beta = 0.05. Prueba estadística de un "factor".

La Gráfica 8 muestra la distribución de los tamaños de clones *mwh* por individuo para 4NQO y el co-tratamiento 4NQO+Brócoli, no se observaron diferencias del co-tratamiento con respecto al 4NQO.



Grafica 8. Distribución de tamaño de clones *mwh* por individuo para 4NQO y el co-tratamiento 4NQO+Brócoli en las cruzas Estándar (E) y Bioactivación Elevada (BE).

DISCUSIÓN

Testigos

Brócoli

Se encontraron resultados positivos en la frecuencia de manchas pequeñas que se refleja en manchas totales en ambas cruza, lo que no concuerda con López (2004), quien obtuvo una disminución significativa en la frecuencia de todos los tipos de manchas en la cruza BE, con Brócoli de supermercado. El aumento en la frecuencia de manchas pequeñas puede deberse a que el Brócoli contenía compuestos que necesitaban ser metabolizados para inducir la mutación y que el daño no fue a temprana edad larval (Graf, 1995). Estos resultados tampoco concuerdan con Santos (2006) y Vega (2006) quienes trabajaron con Brócoli orgánicamente cultivado en la cruza E y no encontraron aumento o disminución de la tasa de mutación espontánea. En la cruza BE se observaron reducciones en las frecuencias de manchas gemelas al igual que Santos (2006) y (Vega 2006).

La diferencia entre el Brócoli orgánicamente cultivado y entre los de supermercado puede deberse a las condiciones de maduración, lesiones, transporte y manejo, ya que estos eventos provocan la degradación de glucosinolatos (Fahey *et al.*, 2001). Además, la concentración de glucosinolatos de los vegetales *Brassica* también se ve afectada por la temperatura y el tiempo que se almacenan (Rungapamestry, 2007), así como por factores ambientales y agronómicos como la irrigación, composición mineral, nutrientes orgánicos, fertilización (Vallejo *et al.*, 2003), productos químicos que son tóxicos para controlar plagas de insectos, fertilidad del suelo y enfermedades de la planta (Santiago y Perales, 2007).

Estudios previos demuestran que consumir vegetales *Brassica* frecuentemente reduce el riesgo de desarrollar una variedad de cánceres, incluyendo cáncer de colon, estómago y pulmón; sin embargo, en algunos trabajos se ha descubierto que muchos de sus fitonutrientes actúan sinérgicamente (Singh *et al.*, 2007). La acción anticancerígena de los glucosinolatos depende de las condiciones experimentales. En varias pruebas realizadas con estos vegetales, se han obtenido diferentes resultados en la modulación de la actividad enzimática con compuestos mutagénicos y carcinogénicos (Verhoeven *et al.*, 1997).

Genotoxicidad de los isotiocianatos

Existe evidencia experimental que indica que los isotiocianatos (ITCs) presentes en los vegetales *Brassica* son responsables de daños al DNA y actúan directamente como genotoxinas. Su concentración es suficientemente alta para atribuirles estos efectos. Por otra parte, Kassie et al. (1996) mencionan que la genotoxicidad que observaron en jugos crudos de Brócoli puede deberse a los glucosinolatos y productos de su degradación. Finalmente, se ha demostrado que los vegetales *Brassica* contienen compuestos que son mutagénicos en bacterias y en células de mamífero.

Plantas en estrés contienen numerosos “pesticidas naturales” (genotoxinas y carcinógenos) los cuales son de alto riesgo como los químicos sintéticos; de hecho, muchos de estos constituyentes son el mayor origen de exposición a genotoxinas naturales (Kassie et al., 1996).

Kassie y Knasmüller (2000) reportaron que las especies reactivas de oxígeno podrían estar implicadas en el efecto genotóxico de los ITCs; por ello, se presume que son cancerígenos.

El Glucorafanin, un compuesto que se consume en la dieta de vegetales *Brassica*, es el glucosinolato más abundante en el Brócoli (55% del total de glucosinolatos) y genera grandes cantidades de radicales libres (Perocco et al., 2006).

Antigenotoxicidad de los isotiocianatos

Los vegetales *Brassica* también han mostrado protección o antigenotoxicidad, lo que se puede atribuir a compuestos individuales como indoles e ITCs (Steinkellner et al., 2001). Se ha reportado que éstos últimos protegen contra varias clases de cancerígenos reactivos contra el DNA inhibiendo la actividad de las reacciones metabólicas y/o inducción de enzimas de desintoxicación (Kassie et al., 1999).

Zhu y Loft (2001) sugieren que la prevención del cáncer con vegetales *Brassica* en estudios epidemiológicos y experimentales también podría deberse a la protección del daño oxidativo al DNA.

Los vegetales *Brassica* contienen compuestos genotóxicos como Bencil isotiocianato (BITC), antioxidantes como polifenoles, flavonoides, carotenoides, clorofila; la presencia en la dieta de estos factores de protección modera la genotoxicidad *in vivo* de BITC (Kassie et al., 1999).

Los vegetales *Brassica* son relativamente buenos en origen y abundancia de antioxidantes pero existe una variación sustancial y significativa entre subespecies en

cuanto a estos compuestos fitoquímicos (Singh *et al.*, 2007). La vitamina C es el principal antioxidante en estos vegetales por su alto contenido. Generalmente los vegetales muestran una rápida pérdida de vitamina C a temperatura ambiente; en Brócoli almacenado después de 7 y 14 días a 20° C el contenido de vitamina C disminuye el 44% y 28%, respectivamente. Sin embargo, cuando se almacena a 4° C la retención de vitamina C es buena, la pérdida es de 20% después de 21 días. La vitamina C en Brócoli no empaquetado se reduce 26% después de 3 días de almacenamiento a temperatura ambiente, pero en el caso de envoltura en papel, la retención es de 100%. Por el contrario, el almacenamiento a 5° C evita una pérdida de vitamina C en muestras no empaquetadas (Podsdek, 2007).

Productos químicos

La probable presencia de productos químicos pudo ocasionar las frecuencias de manchas tan altas en el testigo Brócoli, ya que no se sabe como lo cultivan; se tienen referencias del cultivo de col (Santiago y Perales, 2007) para éste utilizan varios productos que son tóxicos.

T-OH

La frecuencia de manchas del testigo T-OH es más baja que el agua, sin embargo el testigo T-OH+Brócoli mostró un aumento estadísticamente significativo en la frecuencia de las manchas totales en ambas cruzas contrario a datos obtenidos en el laboratorio donde demuestran que el Brócoli orgánicamente cultivado con T-OH baja las frecuencias de todos los tipos de manchas con respecto al testigo T-OH. Sin embargo el testigo Brócoli de supermercado que se utilizó resultó ser genotóxico al ser disuelto en agua; cabe mencionar que el Tween 80 solubiliza membranas y pudieron actuar compuestos más polares.

El tween 80 es un detergente biológico que se utiliza ampliamente debido a que es efectivo a bajas concentraciones y presenta una toxicidad relativamente baja. Un efecto adverso es el daño oxidativo de los residuos de peróxido del tween 80 que genera procesos de autooxidación durante su almacenamiento (Wang *et al.*, 2007). El tween 80 es utilizado en la fórmula de algunas drogas anticancerígenas que son insolubles en agua. Uno de los mecanismos de este agente es inducir el estrés oxidativo (Kovacic y Osuna, 2000). Por otra parte, la Glutación-S-transferasa (GST) es una enzima de la fase II que protege a las células del estrés oxidativo (Meister y Anderson, 1983).

La disminución del contenido de GST por el tween 80 (Hirama *et al.*, 2004) puede aumentar la vulnerabilidad de las células al estrés oxidativo.

Carbamato de etilo (Uretano)

El uretano (20mM) produjo un aumento estadísticamente significativo de la genotoxicidad con respecto al testigo agua, lo que coincide con Graf *et al.* (1998) y Frölich y Würigler (1990). Se observó el efecto genotóxico de este promutágeno, el cual fue estadísticamente mayor en la cruce BE, lo que demuestra su activación metabólica por parte de los citocromos CYP450 (Frölich y Würigler, 1990) con niveles constitutivos en esta cruce y permite comprobar que las cepas utilizadas poseen los marcadores genéticos.

El co-tratamiento Uretano+Brócoli en la cruce E mostró un aumento estadísticamente significativo en la frecuencia de manchas pequeñas con respecto a su testigo Uretano, lo cual indica un efecto sinérgico. Lo anterior no coincide con Santos (2006), quien realizó un estudio con Brócoli orgánicamente cultivado y en el co-tratamiento Uretano+Brócoli no encontró aumento o disminución estadísticamente significativo en la genotoxicidad inducida por el uretano en ambas cruces.

El aumento en la frecuencia de las manchas pequeñas indica que el Uretano+Brócoli necesitó ser metabolizado para inducir la mutación y que el daño no fue a temprana edad larval (Graf, 1995).

En la cruce BE disminuyó la frecuencia de manchas grandes y gemelas en el co-tratamiento Uretano+Brócoli, con lo que se sugiere una desintoxicación vía CYP450; 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. En el primero, es hidrolizado por esterasas a etanol, amonio y dióxido de carbono, por lo que es excretado sin causar daño (Woo Cha *et al.*, 2000). En el segundo el uretano es transformado por los CYP450 a vinil carbamato epóxido, que puede formar aductos en el DNA (Hoffler *et al.*, 2003; Hübner *et al.*, 1997; Kempler *et al.*, 1995). En el tercero, el uretano es convertido por los CYP450 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 esterasas, formando hidroxilamina, un compuesto genotóxico (Woo Cha *et al.*, 2000). Sakano *et al.* (2002) plantean que la hidroxilamina puede llegar a producir óxido nítrico *in vivo*

causando daños por oxidación y depuración al DNA en presencia de cobre, el cual puede ser obtenido de las regiones heterocromáticas de la cromatina.

Otra opción que explicaría la disminución en las manchas grandes es la apoptosis. Como respuesta al estrés genotóxico, la célula pudo haber encendido rutas que juegan un papel crítico en la regulación del ciclo celular, tales como: reparación del DNA y la muerte celular programada (apoptosis) (Jiang *et al.*, 2005) para contrarrestar el daño celular que ocasionó la interacción del co-tratamiento y los posibles productos químicos que pudo contener el Brócoli de supermercado.

Metilmetanosulfonato (MMS)

El MMS (0.5mM) produjo un aumento estadísticamente significativo de la genotoxicidad con respecto al testigo agua, lo que concuerda con Kaya (2003), El-Hamss et al. (2003), Heres-Pulido (2001) y Lehmann et al. (2000).

Se observó una disminución en la frecuencia de manchas totales en el co-tratamiento MMS-Brócoli en ambas cruza, sin embargo ésta solo fue estadísticamente significativa en la cruza BE. Vega (2006) obtuvo un efecto sinérgico con Brócoli orgánicamente cultivado. Sin embargo, Sánchez (2007) reportó una disminución en la frecuencia de machas totales en co-tratamientos del isotiocianato sulforafano (SF)-MMS, con lo que se sugiere que en la mezcla compleja Brócoli de supermercado intervino el SF o que el Brócoli pudo contener insecticidas, plaguicidas y fertilizantes que interactuaron induciendo apoptosis.

Se sabe que las enzimas de la fase II del metabolismo xenobiótico juegan un papel importante en la desintoxicación de electrófilos y su inducción protege a las células contra carcinogénesis y mutagénesis. El SF induce enzimas de esta fase como glutatión s-transferasa, quinona reductasa y hemo oxigenasa que pueden funcionar como protectoras contra el estrés oxidativo (Fahey y Talay, 1999).

El Brócoli contiene antioxidantes que incluyen los carotenoides, tocoferoles, vitamina C y flavonoides. Los extractos de Brócoli protegen contra las especies reactivas de oxígeno, pero hay diferencias en el nivel de protección de las distintas variedades de esta crucífera (Kurilich *et al.*, 2002). Los antioxidantes pueden reducir la inducción de mutación generada por químicos; por ejemplo, pueden competir con los sitios nucleofílicos en el DNA por un mutágeno electrofílico. El efecto antioxidante de la vitamina C protege de la mutación celular mediada por radicales, no sólo de especies reactivas de oxígeno, sino también por la acción de mutágenos directos. La acción

antimutagénica del co-tratamiento vitamina C-MMS está relacionada a la capacidad de bloquear las uniones covalentes de agentes alquilantes directos en el DNA (Kaya, 2003).

4 Nitroquinolina-1-óxido (4-NQO)

El mutágeno 4-NQO (2mM) produjo un aumento estadísticamente significativo de la genotoxicidad con respecto al testigo T-OH y coinciden con lo reportado por Heres-Pulido *et al.*, (2004).

El metabolismo de 4-NQO produce el metabolito acetoxiaminoquinolina, el cual produce tres aductos de purina, que son reparados por escisión de nucleótidos (Mirzayans *et al.*, 1999).

Heres- Pulido et al. (2004) reportan que el daño directo por estrés oxidativo podría producir eventos mutacionales en ambas cruza. Los aductos en el DNA se producen por el metabolismo xenobiótico, inducidos por la actividad de reparación que incrementan los eventos de recombinación. Esto indica que 4-NQO es mutagénico pero también recombinogénico dependiendo del metabolismo, por las enzimas de los CYP450s. No se obtuvieron efectos recombinogénicos en la cruza BE, contrario a Heres-Pulido et al. (2004).

En el co-tratamiento 4-NQO+Brócoli no se encontraron diferencias en la frecuencia de manchas con respecto al testigo 4-NQO, contrario a Gómez (2008) quien obtuvo resultados positivos con Brócoli orgánicamente cultivado en la cruza E y en la cruza BE encontró reducciones estadísticamente significativas.



CONCLUSIONES

- El Brócoli de supermercado presentó un efecto genotóxico disuelto en agua o en Tween-OH.
- El Brócoli mostró efecto sinérgico con el Uretano en la cruza E; en la cruza BE disminuyó la frecuencia de manchas grandes.
- En el co-tratamiento MMS+Brócoli se encontró disminución en la frecuencia de manchas gemelas en ambas cruzas.
- No se encontró disminución en la frecuencia de manchas por parte de la mezcla compleja Brócoli en el co-tratamiento 4-NQO+Brócoli en ambas cruzas.

Comentario

Se asume que la genotoxicidad del Brócoli pudiera deberse a los productos químicos que se utilizaron para controlar las plagas, enfermedades de la planta, fertilización del suelo, así como el tratamiento que se le dio desde su cosecha y el transporte que se requiere para comercializarlo.



Anexo 1

Drosophila melanogaster

Es un organismo de metamorfosis completa, con varios estadios de desarrollo: huevo, larva (tres estadios), pupa e imago (Fig. 11). El desarrollo completo de la mosca es aproximadamente de diez días en condiciones ambientales óptimas (temperatura, pH y medio de cultivo adecuado). El desarrollo embrionario se produce dentro del huevo, originándose una larva que pasa por tres estadios (2 mudas); varios tejidos de la larva están constituidos por células que contienen cromosomas politénicos. Durante la fase de pupa se produce la metamorfosis, en la que se destruyen la mayor parte de las células de la larva y se forman las estructuras externas del adulto (imago), a partir de estructuras larvales denominadas "discos imagales" (Fig. 12).

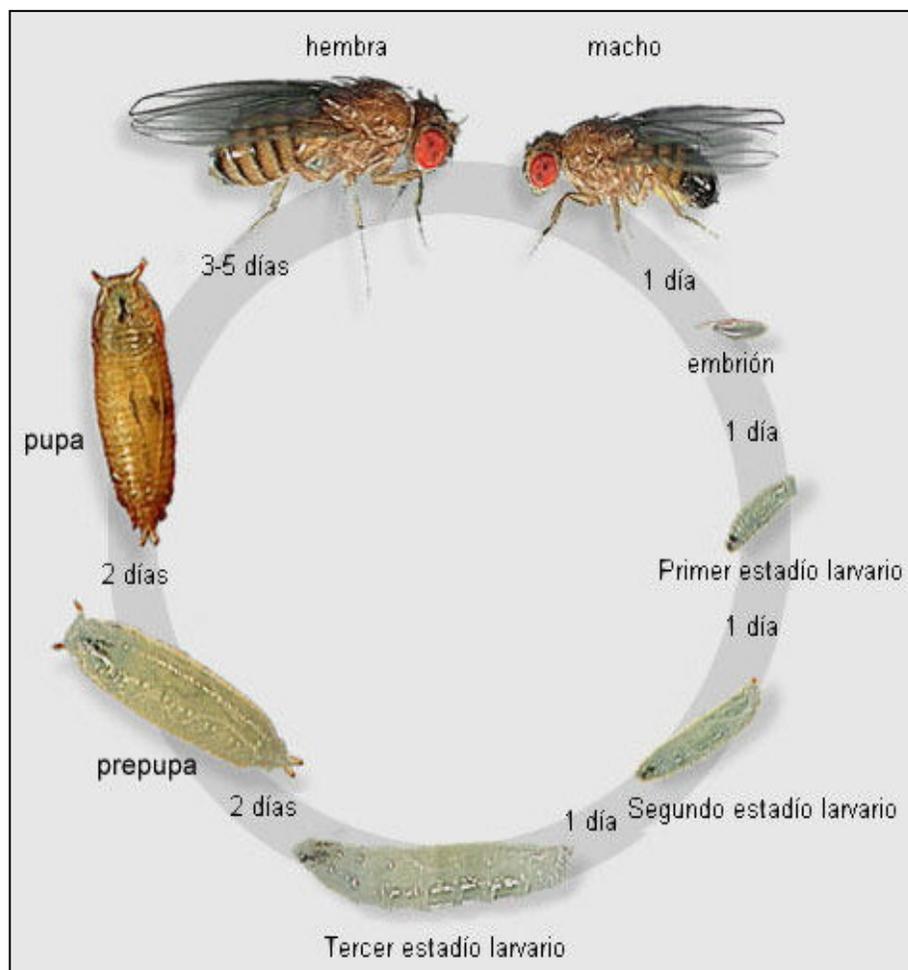


Figura 11. Ciclo de vida *Drosophila melanogaster*
(Tomado de <http://www.ucm.es/info/genetica/grupod/Genenzima/Genenzima.htm>)



Finalizada la metamorfosis, la pupa se abre por la parte superior y emerge el imago de apariencia de adulto. Pasadas 8 horas de la emergencia de la pupa, las hembras adultas pueden ser fecundadas.

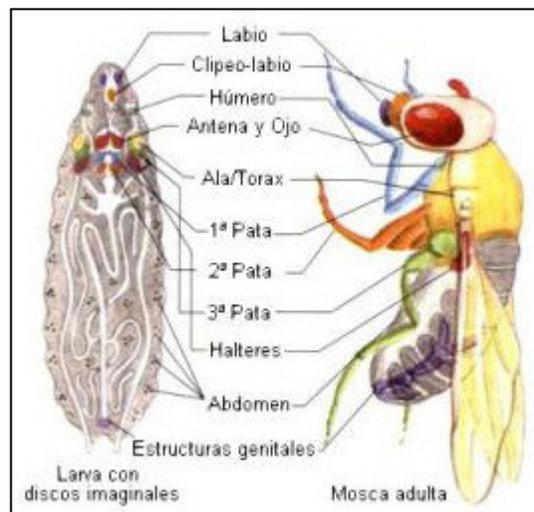


Figura 12. Discos imaginales *Drosophila melanogaster*
(Tomado de <http://www.ucm.es/info/genetica/grupod/Genenzima/Genenzima.htm>)



Anexo 2

PRUEBA DE MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN SOMÁTICAS (SMART)

SMART se basa en la pérdida de heterocigosis de genes marcadores de células de los discos imagales de las larvas que se expresan como manchas o clones de tricomas en alas de los organismos adultos. Estas manchas se pueden observar y contabilizar con ayuda del microscopio óptico y analizar por medio de métodos estadísticos, comparando el tipo y frecuencia de manchas las alas con la obtenida en organismos no expuestos (Graf *et al.*, 1984) (Guzmán-Rincón y Graf, 1995). Las dimensiones de las manchas dependen del momento de la edad larvaria en que se provocó la mutación o la recombinación y se formó el clon. Por ejemplo cuando aparecen clones *mwh* de manchas grandes significa que el daño fue en los primeros momentos de diferenciación larval y por lo tanto el compuesto a prueba causó mutaciones de manera directa o temprana en el desarrollo de la larva; cuando la frecuencia de estos clones es elevado en manchas pequeñas quiere decir que el compuesto a prueba necesitó ser metabolizado para inducir mutación y que por consiguiente el daño no fue a temprana edad larval (Graf, 1995).

Las manchas simples se observan como tricomas múltiples (*mwh*) o mal formados (*flr³*) que pueden indicar delección, mutación puntual y no disyunción. Las manchas gemelas indican recombinación por lo que se observan los dos tipos de marcadores *flr³* y *mwh* (Graf, 1995).

Esta prueba se utiliza para predecir la posible genotoxicidad y antigenotoxicidad de compuestos químicos en mamíferos (Guzmán-Rincón y Graf, 1995; Sharpe *et al.*, 2002)



Líneas y Marcadores

Para esta prueba se utilizan tres líneas de *D. melanogaster*: “multiple wing hairs” (*mwh/mwh*), “flare” (*flr³/TM3, Bd^S*) y “Oregon-flare” (OR (1); OR (2); *flr³/TM3, Bd^S*) con los siguientes marcadores:

mwh (*multiple wing hairs*) Mutación homocigótica viable localizada en el brazo izquierdo del cromosoma 3 (3-0.3). En homocigosis este marcador produce tricomas múltiples por célula en lugar del tricoma único de la condición silvestre (Fig. 13).

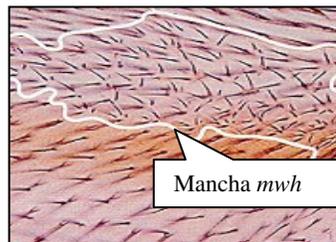


Figura 13. Mancha *mwh*

flr³ (*flare*) Mutación que afecta la forma de los tricomas (Fig.14), localizada en el brazo izquierdo del cromosoma 3 (3-38.8) y en homocigosis letal (Graf, 1995). Se mantiene la heterocigosis por efecto de un cromosoma balanceador (TM3).

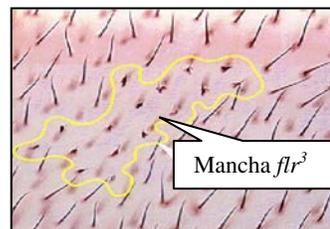


Figura 14. Mancha *flr³*

Bd^S (*Beaded-Serratia*). Este marcador se localiza en el brazo derecho del cromosoma 3 (3-92.5), es homocigoto letal y se identifica por muescas en el borde de las alas (Fig. 15) (Osaba *et al.*, 1999).

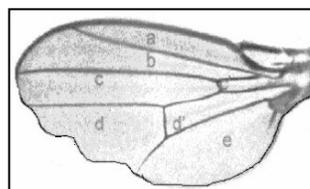


Figura 15. Ala serratia



In (3LR)TM3 (Inversion (3 Left. Right) Third Multiple 3). Cromosoma balanceador con tres inversiones, dos paracéntricas (L y R) y una pericéntrica (L+R), que impide la formación de nuevos arreglos cromosómicos originados por recombinación produciendo así individuos heterocigotos para los marcadores letales como es el caso de *flr³* y Oregon-*flr³* (Graf *et al.*, 1996).

OR (R) (“Oregon resistant”). La línea Oregon-*flr³* también posee el marcador *flr³* en carácter heterocigoto; sin embargo, esta línea presenta los cromosomas 1 y 2 de la línea Oregon resistente al DDT. El cromosoma 2 acarrea la mutación dominante Rst (2) DDT localizada en la región 43E, (2-64.5), que provoca la expresión constitutiva de una proteína inductora de los genes *Cyp* (*Cyp6a8* y *Cyp6a9* del cromosoma 1 y *Cyp6a2* del cromosoma 2). Los genes *Cyp* se expresan en las enzimas del complejo enzimático CYP450. Esta mutación confiere en consecuencia, no sólo resistencia al DDT e insecticidas organofosforados en larvas y adultos, sino también el incremento general en el metabolismo xenobiótico (Saner *et al.*, 1996).

Cruza Estándar (E) y Bioactivación elevada (BE)

En la cruce E con niveles regulados de CYP450 se utilizan hembras de la línea *flare* (*flr³/TM3, Bd^S*) y machos de la línea *multiple wing hairs* (*mwh/mwh*). La cruce BE tiene altos niveles constitutivos de CYP450. Para ésta se usan hembras de la línea Oregon-*flare* (OR (1); OR (2); *flr³/TM3, Bd^S*) y machos *mwh*. Cada una de estas cruces produce dos tipos de progenie: transheterocigotos *mwh flr³⁺/mwh⁺flr³* en cruce E y en cruce BE ORR(1)/+; ORR(2)/+; *mwh, flr³⁺/mwh⁺,flr³* con alas de fenotipo silvestre; y heterocigoto *mwh flr³⁺/mwh⁺flr³⁺* TM3 *Bd^S* para E y ORR(1)/+; ORR(2)/+; *mwh, flr³⁺/TM3, Bd^S* para cruce BE, con alas de fenotipo Serratia. En las moscas con alas tipo silvestre transheterocigotas se pueden producir daños como mutaciones y recombinación, mostrándose como manchas simples y gemelas. En las heterocigotas con alas Serratia, sólo se observan manchas simples causadas por mutaciones (Graf *et al.*, 1984).

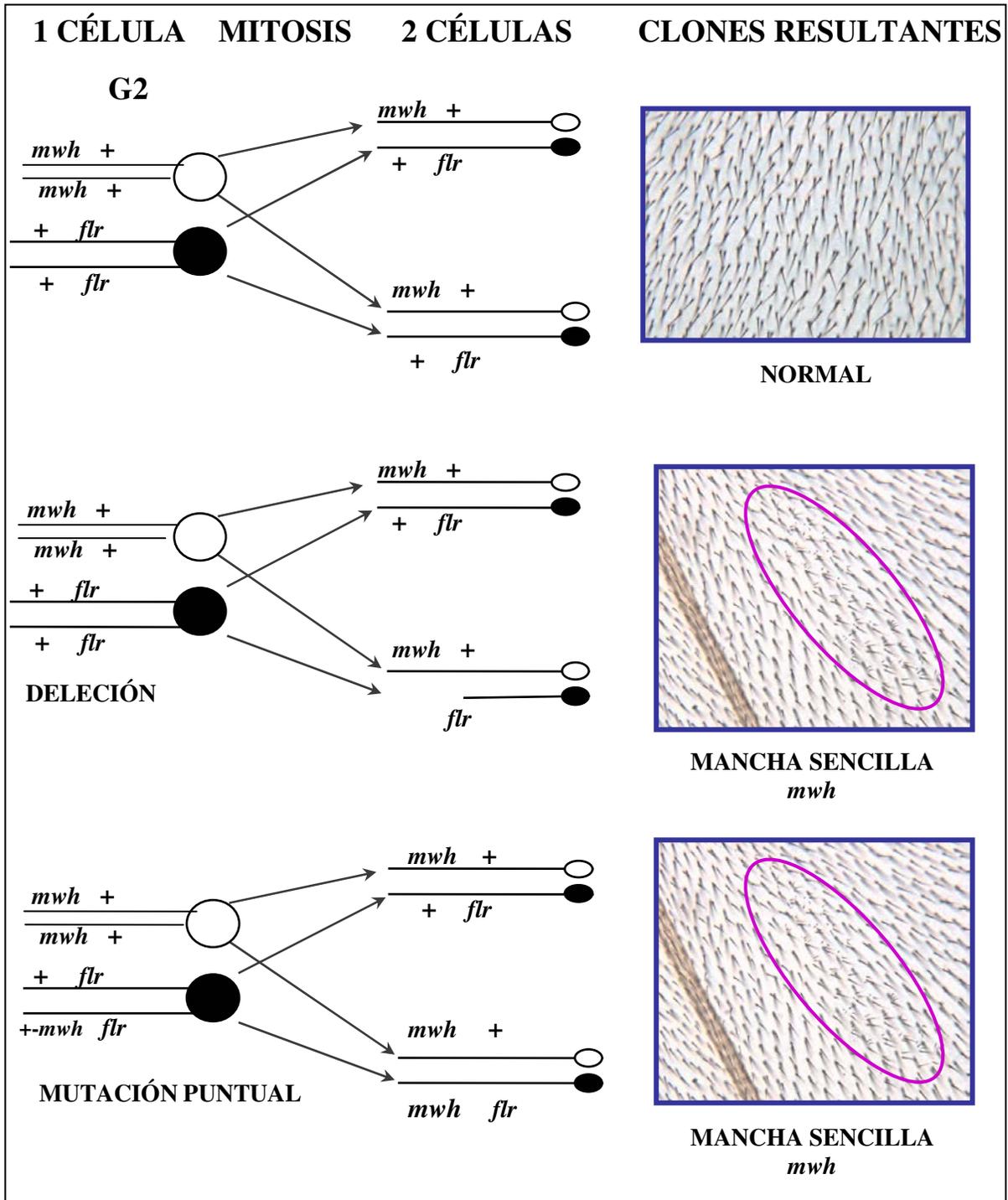


Figura 16. Eventos que generan la pérdida de heterocigosis en la prueba SMART en ala de *Drosophila melanogaster*. (Modificado de Guzmán-Rincón y Ramírez-Victoria, 2001. Modificado de Graf *et al.*, 1984).

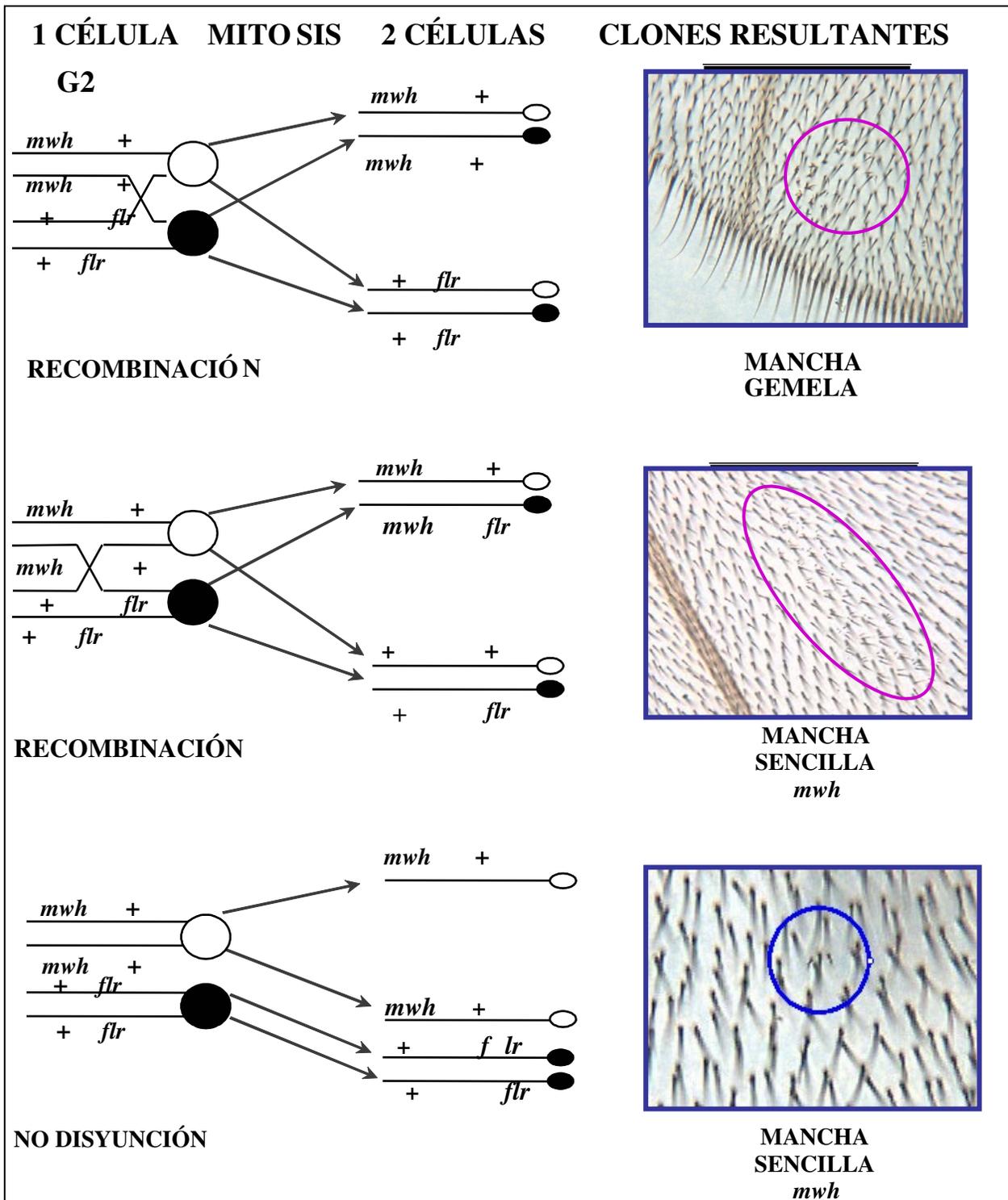


Figura 16. Eventos que generan la pérdida de heterocigosis en la prueba SMART en ala de *Drosophila melanogaster*.
(Modificado de Guzmán-Rincón y Ramírez-Victoria, 2001. Modificado de Graf *et al.*, 1984).



Anexo 3

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE U

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

Como el programa estadístico que se utiliza es para “dos colas”, y el análisis estadístico apropiado para estudios de genotoxicidad es de “una cola”, se tiene que hacer el siguiente ajuste:

- si el valor de Z ajustada es negativo entonces:

$$p/2 \begin{cases} \text{si } > 0 = 0.05 \text{ entonces no es significativo.} \\ \text{si } < 0.05 \text{ entonces si es significativo.} \end{cases}$$

- si el valor de Z ajustada es positivo entonces:

$$1 - p/2 \begin{cases} \text{si } > 0 = 0.05 \text{ entonces no es significativo.} \\ \text{si } < 0.05 \text{ entonces si es significativo.} \end{cases}$$

1. Resultados indecisos (i) entre el agua y Brócoli cruza (E).

Mann-Whitney U Test (Spreadsheet1)
By variable conc
Marked tests are significant at p < .05000

| variable | Rank Sum Agua | Rank Sum BS 100% | U | Z | p-level | Z adjusted | p-level | Valid N Agua | Valid N BS 100% | Z*1sided exact p |
|----------|------------------|---------------------|----------|----------|----------|---------------|----------|-----------------|--------------------|---------------------|
| peq | 3299.500 | 3603.500 | 1469.500 | -1.31145 | 0.189707 | -1.51996 | 0.128523 | 60 | 57 | 0.190444 |
| gdes | 3420.000 | 3483.000 | 1590.000 | -0.65436 | 0.512879 | -1.49641 | 0.134549 | 60 | 57 | 0.516036 |
| gemelas | 3510.000 | 3393.000 | 1680.000 | -0.16359 | 0.870054 | -1.02598 | 0.304903 | 60 | 57 | 0.872686 |
| tot | 3197.000 | 3706.000 | 1367.000 | -1.87038 | 0.061431 | -2.09845 | 0.035866 | 60 | 57 | 0.061644 |
| mw | 3192.000 | 3711.000 | 1362.000 | -1.89765 | 0.057743 | -2.12969 | 0.033198 | 60 | 57 | 0.057909 |



| Tipo de Mancha | P ajustada |
|----------------|------------|
| Pequeñas | 0.064 ns |
| Grandes | 0.067 ns |
| Gemelas | 0.152 ns |
| Totales | 0.0179 s |

s=significativo; ns= no significativo.

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

2. Resultados débiles positivos (w) para el MMS y el co-tratamiento MMS+Brócoli cruza (E).

| variable | Rank Sum MMS+BS | Rank Sum MMS (0.5mM) | U | Z | p-level | Z adjusted | p-level adjusted | Valid N MMS+BS | Valid N MMS (0.5mM) | 2*1sided exact p |
|----------|-----------------|----------------------|----------|----------|----------|------------|------------------|----------------|---------------------|------------------|
| PEQ | 2979.500 | 3236.500 | 1439.500 | -0.59275 | 0.553348 | -0.59294 | 0.553218 | 55 | 56 | 0.554778 |
| GDES | 2735.500 | 3480.500 | 1195.500 | -2.03187 | 0.042168 | -2.03369 | 0.041984 | 55 | 56 | 0.041846 |
| GEMELAS | 2921.500 | 3294.500 | 1381.500 | -0.93484 | 0.349873 | -1.25986 | 0.207721 | 55 | 56 | 0.351272 |
| TOT | 2867.500 | 3348.500 | 1327.500 | -1.25333 | 0.210087 | -1.25352 | 0.210017 | 55 | 56 | 0.210979 |
| CLONES | 2811.500 | 3404.500 | 1271.500 | -1.58362 | 0.113282 | -1.58388 | 0.113221 | 55 | 56 | 0.113525 |

| Tipo de Mancha | P ajustada |
|----------------|------------|
| Pequeñas | 0.27656 ns |
| Grandes | 0.020992s |
| Gemelas | 0.10386 ns |
| Totales | 0.105 ns |

s=significativo; ns= no significativo.

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

Z ajustada para manchas grandes es negativa entonces $p/22 > 0.05$ por lo tanto se obtuvo un resultado significativo



3. Resultados para el 4NQO y el co-tratamiento 4NQO+Brócoli cruza (E).

Mann-Whitney U Test (Spreadsheet1)
By variable conc.
Marked tests are significant at $p < .05000$

| variable | Rank Sum T-OH+4NQO | Rank Sum 4NQO+BS | U | Z | p-level | Z adjusted | p-level | Valid N T-OH+4NQO | Valid N 4NQO+BS | 2*1sided exact p |
|----------|-----------------------|---------------------|----------|----------|----------|---------------|----------|----------------------|--------------------|---------------------|
| peq | 3319.000 | 3584.000 | 1489.000 | -1.20512 | 0.228159 | -1.25830 | 0.208284 | 60 | 57 | 0.230154 |
| gdes | 3625.500 | 3395.500 | 1684.500 | 0.29876 | 0.765124 | 0.33344 | 0.738805 | 60 | 58 | 0.765972 |
| gemelas | 3599.000 | 3422.000 | 1711.000 | 0.15611 | 0.875948 | 0.98319 | 0.325514 | 60 | 58 | 0.878530 |
| tot | 3364.000 | 3657.000 | 1534.000 | -1.10891 | 0.267472 | -1.13262 | 0.257375 | 60 | 58 | 0.269728 |
| clones | 3554.000 | 3467.000 | 1724.000 | -0.08613 | 0.931364 | -0.08830 | 0.929640 | 60 | 58 | 0.933758 |

| Tipo de Mancha | P ajustada |
|----------------|------------|
| Pequeñas | 0.104 ns |
| Grandes | -0.6305 ns |
| Gemelas | -0.8372 ns |
| Totales | 0.128 ns |

s=significativo; ns= no significativo.

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

4. Resultados para el MMS y el co-tratamiento MMS+Brócoli cruza (BE).

Mann-Whitney U Test (Spreadsheet7)
By variable CONC
Marked tests are significant at $p < .05000$

| variable | Rank Sum MMS+BS | Rank Sum MMS 0.5 mM | U | Z | p-level | Z adjusted | p-level | Valid N MMS+BS | Valid N MMS 0.5 mM | 2*1sided exact p |
|----------|--------------------|------------------------|----------|----------|----------|---------------|----------|-------------------|-----------------------|---------------------|
| PEQ | 773.0000 | 308.0000 | 143.0000 | -1.27473 | 0.202408 | -1.27737 | 0.201474 | 35 | 11 | 0.210276 |
| GDES | 744.5000 | 336.5000 | 114.5000 | -2.00866 | 0.044574 | -2.01120 | 0.044305 | 35 | 11 | 0.043414 |
| GEMELAS | 822.5000 | 258.5000 | 192.5000 | 0.00000 | 1.000000 | | | 35 | 11 | |
| TOT | 746.0000 | 335.0000 | 116.0000 | -1.97003 | 0.048836 | -1.97118 | 0.048704 | 35 | 11 | 0.049327 |
| CLONES | 746.0000 | 335.0000 | 116.0000 | -1.97003 | 0.048836 | -1.97118 | 0.048704 | 35 | 11 | 0.049327 |



| Tipo de Mancha | P ajustada |
|----------------|------------|
| Pequeñas | 0.100 ns |
| Grandes | 0.02 s |
| Gemelas | |
| Totales | 0.024 s |

Z ajustada para manchas grandes y totales es negativa $p/2 < 0.05$ por lo tanto se obtuvo un resultado significativo.



REFERENCIAS

Adams, M.D., Celniker, S.E. and Holt, R.A. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*. **287**: 2185-2195.

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.

Agronegocios. 2002. Guía técnica para el cultivo de col. (En Línea). Disponible en <http://www.agronegocios.gob.sv>

Bailleul, B., Daubersies, P., Galiegue-Zouitina, S and Marie-Henriette. (1989). Molecular Basis of 4-Nitroquinoline 1-Oxide Carcinogenesis. *J.Cancer Res.*, **80**: 691-697.

Bernards, A. and Hariharan, I. K. (2001). Of flies and men-studying human disease in *Drosophila*. *Current Opinion in Genetics & Development*. **11**: 274-278.

Bonnesen C., I. M. Eggleston, and J. D. Hayes. (2001). Dietary indoles and isothiocyanates that are generated from cruciferous vegetables can both stimulate apoptosis and confer protection against DNA damage in human colon cell lines. *Cancer Research*. **61**:6120-6130.

Clark, A. M. (1982). The use of larval stages of *Drosophila* in screening for some naturally occurring mutagens. *Mut. Res.*, **92**: 89-97

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. *Nutricion and Cancer* **38**: 168-178.

Danielson, P. B., Foster, J. L. M., McMahill, M. M., Smith, M. K. and Fogleman, J. C. (1998). Induction by alkaloids and phenobarbital of Family 4 cytochrome P450s in



Drosophila: evidence for involvement in host plant utilization. *Mol. Gen. Genet.*, **259**:54-59.

Dueñas, G. I. E., Heres, M. E., Castañeda, P. L. and Graf, U. (2001). Easy raising of *Drosophila melanogaster* on a medium consisting of mashed potato flakes and a preservative solution. *D.I.S.* **88**: 166.

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*. *D.I.S.*, **88**

El-Hamms R, Idaomar M, Alonso-Moraga A, and Muñoz Serrano A. 2003. Antimutagenic properties of bell and black peppers. *Food and Chemical Toxicology* **41**:41-47.

Fahey J. W. and P. Talalay. (1999). Antioxidant functions of sulforaphane: a potent inducer of phase II detoxication enzymes. *Food and Chemical Toxicology*. **37**: 973-979.

Fahey, J.W., Zhang, Y. and Talalay, P. (2001). The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plant. *Phytochemistry*, **56**:5-51.

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

Friedberg E. C., G. C. Walker and W. Siede. (1995). DNA repair and mutagenesis. Press. Washington D.C. 698 pp.



Glaab E. W., K. R. Tindall and T. R. Skopek. (1999). Specificity of mutations induced by methyl methanesulfonate in mismatch repair-deficient human cancer cell lines. *Mut Res.* **427**: 67-78.

Graf, U., F. E. Würigler, 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. (1995). Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots in the wing somatic mutation and recombination test of *Drosophila melanogaster*. *Experientia.* **51**: 168-173.

Graf U., M. A. Spanó, J. G. 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. *Environ. Mutagen Carcinogenesis.* **16**: 1-7.

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

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

Hang, H., Pan, Q., Zhang, B., Li, J., Deng, X., Lian, Z., and Li, N. (2007). 4-NQO induces apoptosis via p53-dependent mitochondrial signaling pathway. *Toxicology* **230**: 151-163.



Heres-Pulido, M. E. (2001). Efecto de los nitratos de plomo y de calcio sobre la acción mutagénica y recombinogénica del metil-metanosulfonato en *Drosophila melanogaster*. Tesis de maestría en ciencias (Biología). Fac. Ciencias, UNAM México. 174 pp.

Heres-Pulido, M.E., I. Dueñas-García, L. Castañeda-Partida, A. Sánchez-García, M. Contreras-Sousa, A. Durán-Díaz and U. Graf (2004). Genotoxicity of tamoxifen citrate and 4-nitroquinoline-1-oxide in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis* **19**:187-193.

Hirama, S., Tatsuishi, T., Iwase, K., Nakao, H., Umebayashi, C., Nishizaki, Y., Kobayashi, M., Ishida, S., Okano, Y., and Oyama, Y. (2004). Flow-cytometric analysis on adverse effects of polysorbate 80 in rat thymocytes. *Toxicology* **199**:137-143.

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

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.

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.

Jiang, H., Luo, S., Li, H. (2005). Cdk5 activator-binding protein C53 regulates apoptosis induced by genotoxic stress via modulating the G2/M DNA damage checkpoint. *J. Biol. Chem.* **280**:20804-20813

Jimenez, G. y Merchant, H. (2003). *Biología Celular y Molecular*. Ed. Pearson Prentice Hall.



Kassie F., W. Parzefall, S. Musk, I. Johnson, , G. Lamprecht, G. Sontag and Siegfried S. 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. *Chemico-Biological Interactions* **102**:1-16.

Kassie F. and S. Knasmüller. (2000). Genotoxic effects of allyl isothiocyanate (AITC) and phenethyl isothiocyanate (PEITC). *Chemico-Biological Interactions*. **127**: 163-180.

Kassie F., Pool-Zobel B., Parzefall W., and Knasmüller S. (1999). Genotoxic effects of benzyl isothiocyanate, a natural chemopreventive agent. *Mutagenesis*. **4**:595-603.

Katzung, G. (2002). *Farmacología Básica y Clínica*. 8ª ed. Manual Moderno. México. 59-85.

Kaya, B. (2003). Anti-genotoxic effect of ascorbic acid on mutagenic dose of three alkylating agents. *Turk J. Biol.* **27**:241-246.

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.

Kovacic, P. and Osuna, J.A. (2000). Mechanisms of anti-cancer agents: emphasis on oxidative stress and electron transfer. *Curr. Pharm. Des.* **6**: 277-309.

Kurilich, A., Jeffery, E., Juvik, J., Wallig, M. and Klein, B. (2002). Antioxidant Capacity of Different Broccoli (*Brassica oleracea*) Genotypes Using the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Assay. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 5053-5057.

Lehman M., U. Graf, M. L. Reguly and H. H. Rodríguez de Andrade. (2000). Interference of tannic acid on the genotoxicity of mitomycin C,



methylmethanesulfonate, and nitrogen mustard in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. **36**:195-200.

Liang, H., Luang, Q. and Xiao, Q. (2006). Effects of metal ions on myrosinase activity and the formation of sulforaphane in broccoli seed. *Jour. Mol. Catalysis B: Enzymatic* **43**:19-22

López R. L. Z. (2004). Evaluación de la toxicidad y genotoxicidad del brócoli (*Brassica oleracea var. Italica*) con *Drosophila melanogaster*. Tesis de licenciatura. Fac. Estudios Superiores Iztacala. UNAM, México. 46 pp.

Meister, A. and Anderson, M.E. (1983). Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.* **52**, 711-760.

Mirzayans, R., Bashir, S., Murria, D. and Paterson, M.C. (1999). Inverse correlation between p53 protein levels and DNA repair efficiency in human fibroblast strains treated with 4-nitroquinoline 1-oxide: evidence that lesions other than DNA strand breaks trigger the p53 response. *Carcinogenesis*, **20**: 941-946.

Murray R. K., D. R Granner., P. A Mayes and V. W Rodwell. (1992). Bioquímica de Harper. Manual Moderno. México, 656-660.

Ong, T., Matter, B. E. and De Serres, F. (1975). Genetic Characterization of Adenine-3 Mutant Induced by 4-Nitroquinoline 1-Oxide and 4-Hydroxyaminoquinoline 1-Oxide in *Neurospora crassa*. *Cancer Research*, **35**: 291-295.

Osaba L., A. Aguirre, A. Alonso and U. Graf. (1999). Genotoxicity testing of six insecticides in two crosses of the *Drosophila* wing spots test. *Mutation Research*. **439**: 49-61

OSU (Oregon State University). 2002. Commercial vegetable production guides. (En Línea). Disponible en <http://oregonstate.edu/Dept/NWREC/cabb.html>



Peklak-Scott, C., Townsend, A. J., and Morrow, C. S. (2005). Dynamics Of Glutathione Conjugation and Conjugate Efflux in Detoxification of the Carcinogen, 4-Nitroquinoline 1-Oxide: Contributions of Glutathione, Glutathione S-Transferase, and MRP1. *Biochemistry*, **44**: 4426-4433.

Perocco, P., Bronzetti, G., Canistro, D., Valgimigli, L., Sapone, A., Affatato, A., Pedulli, F., Pozzetti, L., Broccoli, M., Iori, R., Barillari, J., Sblendorio, V., Legator, M., Paolini, M., and Abdel-Rahman, S. Glucoraphanin, the bioprecursor of the widely extolled chemopreventive agent sulforaphane found in broccoli, induces Phase-I xenobiotic metabolizing enzyme and increases free radical generation in rat liver. *Mutat Res.* **595**: 125-136

Podsedek, A. (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT* **40**:1-11

Ramotar, D., Belanger, E., Brodeur, I., Jean-Yves Masson, and Elliot A. Drobetsk (1998). A Yeast Homologue of the Human Phosphotyrosyl Phosphatase Activator PTPA Is Implicated in Protection against Oxidative DNA Damage Induced by the Model Carcinogen 4-Nitroquinoline 1-Oxide. *J Biol Chem*, **273**: 21749-21496.

Rodolfo, C., Lanza, A., Tornaletti, S., Fronza, G., and Pedrini, A.M. (1994). The ultimate carcinogen of 4-nitroquinoline 1-oxide does not react with Z-DNA and hyperreacts with B-Z junctions. *Nucleic Acids Research*. **22**: 314-320.

Rodríguez- Arnáiz, R. (2004). *Metabolismo de las Toxinas Ambientales*. Ed. Fondo de Cultura Económica. 111 pp.

Rodríguez-Arnaiz, 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.



Rodríguez-Arnaiz, R., Orozco, S. P., Gaytán, O. C. and Graf, U. (1996). Analysis of mitotic recombination induced by several mono and bifunctional alkylating agents in the *Drosophila* wing-spot test. *Mutat. Res.*, **351**: 133-145.

Rungapamestry, V., Duncan, A., Fuller, Z., and Ratcliffe, B. (2007). Effect of cooking brassica vegetables on the subsequent hydrolysis and metabolic fate of glucosinolates. *Proceeding of the Nutrition Society*. **66**:69-81

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.

Saner. C. Weibel, B. Würzler, F. and Sengstag, C. (1996) Metabolism of promutagens catalyzed by *Drosophila melanogaster* CYP6A2 enzyme in *Sacharomyces cerevisiae*. *Environmental Molecular Mutagen.* **27**: 46-58.

Sánchez S. A. (2007). Valoración del efecto genotóxico del co-tratamiento metilmetanosulfonato y sulforafano en *Drosophila melanogaster* mediante SMART en ala. Tesis de licenciatura. Fac. Estudios Superiores Iztacala. UNAM, México. 41 pp.

Santiago, L. J. y Perales, R. (2007). Producción campesina con alto uso de insumos industriales: el cultivo de col (*Brassica oleracea var. capitata*). Rev. Ra Ximhai, Universidad Autónoma Indígena de México. **3**:481-507.

Santos C. L. F. (2006). Interacción del Brócoli (*Brassica oleracea var. Italica*)-uretano (carbamato de etilo) en la Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas (SMART) en ala de *Drosophila melanogaster*. Tesis de licenciatura. Fac. Estudios Superiores Iztacala. UNAM, México. 65 pp.

Shapiro, T., Fahey, J., Wade, K., Stephenson, K., and Talalay, P. (2001). Chemoprotective Glucosinolates and Isothiocyanates of Broccoli Sprouts Metabolism and Excretion in Human. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. **10**: 501-508.



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

Singh, J., Upadhyay, A., Prasad, K., Bahadur, A., and Rai, M. (2007). Variability of carotenes, vitamin C, E and phenolics in *Brassica* vegetables. *J. Food Comp. and Ana.* **20**: 106-112.

Spanó M. A., H. Frei, F. E. Würigler and U. Graf. (2001). Recombinogenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. *Mutagenesis*. **16**: 385-394.

Steinkellner H., S. Rabot, Ch. Freywald, E. Nobis, G. Sharf, 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. *Mutation Research*. **480-481**: 285-297.

Talalay, P. (1998). Citado en "Brócoli, el enemigo de (casi) todos los cánceres". Disponible en línea: <http://www.conganas.tripod.com/brócoli.htm>

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.*, **88**:329-326

Valle, V. y Lucas, F. (2000). Toxicología en Alimentos. Instituto Nacional de Salud Pública, Centro Nacional de Salud Ambiental. México, 267 pp.

Vallejo, F., García-Viguera, C., and Tomás-Barberán, F. (2003). Changes in Broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) Health-Promoting Compounds with Inflorescence Development. *J Agric. Food Chem.* **51**: 3776-3782.



Vega, C. V. (2006). Evaluación de la Interacción del Brócoli (*Brassica oleracea var. Italica*). Con el Metilmetanosulfonato (MMS) en la Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas (SMART) en ala de *Drosophila melanogaster* (Cruza E y BE). Tesis de licenciatura. Fac. Estudios Superiores Iztacala. UNAM, México. 77 pp.

Verhoeven D. T. H., H. Verhagen, R. A. Goldbohm, P. A. van den Brandt and G. van Poppel (1997). Mini review: A review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by brassica vegetables. *Chemico-Biological Interactions* **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, Scientific Publics*. **146**: 427-470.

Wang, W., Jhon, W., Wang, D. (2007). Dual effects of Tween 80 on protein stability. *Inter Journ of Farm*. En prensa.

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. *Toxicology Lett.*, **115**: 173-181.

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

[http--www_uga_edu-vegetable-broccoli_archivos](http://www.uga.edu-vegetable-broccoli_archivos)

<http://www.ucm.es/info/genetica/grupod/Genenzima/Genenzima.htm>